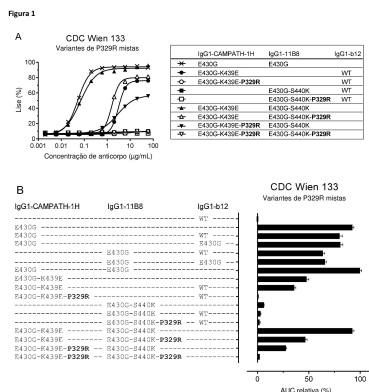


* R R 1 1 2 0 2 0 2 2 1 7 9 A 2 *

(43) Data da Publicação Nacional: 02/02/2021



PRIMEIRO ANTICORPO, ANTICORPO, COMPOSIÇÃO, MÉTODOS PARA TRATAR UM INDIVÍDUO TENDO UMA DOENÇA, PARA ESGOTAR UMA POPULAÇÃO DE CÉLULA E PARA INDUZIR A PROLIFERAÇÃO EM UMA POPULAÇÃO DE CÉLULA, E, KIT

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção se refere a anticorpos tendo funções efetoras de Fc modificadas resultantes de substituições de aminoácido na região Fc, isto é, tais como funções efetoras Fc aumentadas ou funções efetoras Fc diminuídas e o uso de tais anticorpos em combinação e composições compreendendo tais anticorpos.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002] As funções efetoras mediadas por Fc de anticorpos monoclonais, tais como citotoxicidade dependente de complemento (CDC), citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC) e fagocitose mediada por célula dependente de anticorpo (ADCP) contribuem para a janela terapêutica definida pela eficácia e toxicidade. A CDC é iniciada pela ligação de C1q às regiões Fc de anticorpos. C1q é uma proteína multimérica consistindo em seis cabeças de ligação globular fixadas a uma haste. As cabeças de ligação globular individuais têm baixa afinidade para a IgG; e C1q deve ganhar avidéz pela ligação de moléculas de IgG múltiplas em uma superfície celular para deflagrar o caminho de complemento clássico. ADCC e ADCP são iniciadas pela ligação da região Fc da IgG aos receptores Fc γ (Fc γ R) nas células efetoras.

[003] A hexamerização de IgG na ligação alvo na superfície celular foi mostrado para sustentar a ligação ávida de C1q. A hexamerização é mediada através de interações intermoleculares Fc-Fc não covalentes e as interações Fc-Fc podem ser realçadas pelas mutações pontuais no domínio CH3, incluindo E345R e E430G.

[004] A WO2013/004842 divulga anticorpos ou polipeptídeos

compreendendo regiões Fc variantes tendo uma ou mais modificações de aminoácido resultando em funções efetoras modificadas tais como citotoxicidade dependente de complemento (CDC).

[005] A WO2014/108198 divulga polipeptídeos tais como anticorpos compreendendo regiões Fc variantes tendo uma ou mais modificações de aminoácido resultando em citotoxicidade dependente de complemento (CDC) aumentada.

[006] A WO2012/130831 diz respeito a polipeptídeos contendo a região Fc que têm função efetora alterada como uma consequência de uma ou mais substituições de aminoácido na região Fc do polipeptídeo. Estes polipeptídeos exibem afinidade reduzida ao FcγRIIIa e/ou FcγRIIa e /ou FcγRI humanos comparados a um polipeptídeo compreendendo a região Fc da IgG tipo selvagem e exibem ADCC induzida pelo dito polipeptídeo reduzida para pelo menos 20% da ADCC induzida pelo polipeptídeo compreendendo uma região Fc da IgG humana tipo selvagem. A WO2012/130831 não divulga anticorpos que têm interações Fc-Fc realçadas e/ou capacidade realçada para formar hexâmeros.

[007] Como descrito acima, esforços anteriores em realçar as interações Fc-Fc entre anticorpos têm o efeito de realçar funções efetoras tais como CDC e/ou ADCC realçadas, que podem levar à morte celular da célula alvo à qual o anticorpo se liga.

[008] Entretanto, se o antígeno alvo é ubiquamente expresso no corpo tanto nas células saudáveis quanto nas células causadoras de doença, então o anticorpo pode se tornar tóxico matando as células saudáveis. Por exemplo, existe uma necessidade para realizar funções efetoras do anticorpo com funções efetoras realçadas dependentes de um outro anticorpo, a combinação das quais seja seletiva para as células causadoras de doença evitando deste modo a morte de células saudáveis.

OBJETIVOS DA INVENÇÃO

[009] Os anticorpos com funções efetoras realçadas atuando individualmente contam unicamente com a região de ligação a antígeno do anticorpo para alcançar especificidade para a sua célula alvo, que pode limitar alvos adequados para aqueles alvos que são de modo altamente seletivo expressos nas células doentes. As mutações diminuindo anticorpos com função efetora que atuam individualmente podem poupar as células saudáveis expressando o antígeno alvo destes anticorpos, mas a sua potência pode ser limitada pelas mutações diminuindo a função efetora. Por exemplo, existe uma necessidade evidente quanto à fabricação de combinações de anticorpos das quais cada anticorpo individual possa ligar tanto as células causadoras de doença quanto as células saudáveis, mas das quais as funções efetoras realçadas são apenas ou preferencialmente ativadas se ambos os anticorpos tenham se ligado à mesma célula causadora de doença. Este desacoplamento de ativação da ligação da função efetora do indivíduo alvo permite a criação de anticorpos que ligam alvos que até agora não puderam ser usados idealmente para a terapia de anticorpo devido à toxicidade indesejável sobre as células saudáveis ou devido a uma falta de potência sobre as células doentes, contanto que a ativação da função efetora seja seletiva para as células simultaneamente ligadas pelas combinações de anticorpos.

[0010] Consequentemente, é um objetivo da presente invenção prover um primeiro anticorpo e um segundo anticorpo que sejam engenheirados para prover atividade máxima nas células alvo ligadas por ambos anticorpos simultaneamente, em que o primeiro anticorpo não provê nenhuma ou atividade mínima nas células alvo ligadas apenas pelo primeiro anticorpo e em que o segundo anticorpo provê atividade mínima ou reduzida nas células alvo ligadas apenas pelo segundo anticorpo, comparada com a atividade nas células ligadas por ambos anticorpos simultaneamente.

[0011] É um objetivo adicional da presente invenção prover um primeiro anticorpo e um segundo anticorpo ambos compreendendo uma

região Fc de uma IgG humana e uma região de ligação a antígeno, que tenha tanto uma substituição que aumente as interações Fc-Fc, uma substituição inibidora da auto-oligomerização quanto o primeiro anticorpo tenha adicionalmente uma substituição para funções efetoras reduzidas tais como CDC e/ou ADCC, onde o primeiro anticorpo tenha funções efetoras reduzidas tais como CDC e/ou ADCC comparado a um primeiro anticorpo precursor sem a dita substituição para funções efetoras reduzidas, onde a combinação do primeiro e segundo anticorpos tem funções efetoras realçadas comparados ao primeiro e segundo anticorpos individualmente.

[0012] É um outro objetivo da presente invenção prover um primeiro anticorpo compreendendo uma região Fc de uma IgG humana e uma região de ligação a antígeno, cujo anticorpo tem uma substituição que aumenta as interações Fc-Fc, uma substituição inibidora da auto-oligomerização e uma substituição para funções efetoras reduzidas tais como CDC e/ou ADCC comparados a um primeiro anticorpo e um segundo anticorpo precursores compreendendo uma região Fc de uma IgG humana e uma região de ligação a antígeno, cujo segundo anticorpo tem uma substituição que aumenta as interações Fc-Fc, uma substituição inibidora da auto-oligomerização e uma substituição para funções efetoras realçadas tais como CDC e/ou ADCC comparado a um segundo anticorpo precursor, onde a atividade do primeiro anticorpo e do segundo anticorpo são feitas codependentes pelas substituições complementares inibidoras da auto-oligomerização.

[0013] É um objetivo adicional da presente invenção prover um primeiro anticorpo compreendendo uma região Fc de uma IgG humana e uma região de ligação a antígeno, cujo anticorpo tem uma substituição que aumenta as interações Fc-Fc, uma substituição inibidora da auto-oligomerização e uma substituição para funções efetoras reduzidas tais como CDC e/ou ADCC comparado a um primeiro anticorpo precursor e um segundo anticorpo compreendendo uma região Fc de uma IgG humana e uma

região de ligação a antígeno, cujo segundo anticorpo tem uma substituição que aumenta as interações Fc-Fc, uma substituição inibidora da auto-oligomerização e uma substituição indutora da atividade agonística, tal como a ativação aumentada de um receptor alvo na ligação, quando comparados a um segundo anticorpo precursor, onde a atividade do primeiro e do segundo anticorpos é feita codependente pelas substituições complementares inibidoras da auto-oligomerização.

[0014] É um objetivo adicional da presente invenção prover um primeiro anticorpo compreendendo uma região Fc de uma IgG humana e uma região de ligação a antígeno, cujo anticorpo tem uma substituição que aumenta as interações Fc-Fc, uma substituição inibidora da auto-oligomerização e uma substituição para atividade agonística reduzida, tal como ativação reduzida de um receptor alvo na ligação comparado a um primeiro anticorpo precursor e um segundo anticorpo compreendendo uma região Fc de uma IgG humana e uma região de ligação a antígeno, cujo segundo anticorpo tem uma substituição que aumenta as interações Fc-Fc, uma substituição inibidora da auto-oligomerização e uma substituição para atividade agonística reduzida, tal como ativação reduzida de um receptor alvo na ligação comparado a um segundo anticorpo precursor, onde o primeiro e o segundo anticorpos em combinação têm atividade agonística realçada feita codependente pelas substituições complementares inibidoras da auto-oligomerização.

[0015] É um objetivo adicional da presente invenção prover um primeiro anticorpo compreendendo uma região Fc de uma IgG humana e uma região de ligação a antígeno, cujo anticorpo tem uma substituição que aumentasse as interações Fc-Fc, uma substituição inibidora da auto-oligomerização e uma substituição que reduz as funções efetoras tais como CDC e/ou ADCC comparados a um primeiro anticorpo precursor e um segundo anticorpo compreendendo uma região Fc de uma IgG humana e uma

região de ligação a antígeno, cujo anticorpo tem uma substituição inibidora da auto-oligomerização, uma substituição que aumentasse as interações Fc-Fc e ativasse a sinalização, opcionalmente induz a sinalização realçada, quando a região de ligação a antígeno do anticorpo é ligada ao antígeno correspondente comparado a um segundo anticorpo precursor, onde a atividade do primeiro e do segundo anticorpos são feitas codependentes pelas substituições complementares inibidoras da auto-oligomerização.

Sumário da invenção

[0016] Como aqui descrito, a presente invenção se refere a uma combinação de um primeiro anticorpo tendo uma região Fc e uma região de ligação a antígeno, onde a região Fc tem uma substituição realçadora de Fc-Fc e uma ou mais substituições que reduzem as funções efetoras tais como CDC e/ou ADCC e um segundo anticorpo tendo uma região Fc e uma região de ligação a antígeno, onde a região Fc tem uma substituição realçadora de Fc-Fc e opcionalmente tem uma ou mais substituições que realçam funções efetoras Fc tais como CDC e/ou ADCC. O primeiro e o segundo anticorpos têm adicionalmente uma substituição complementar inibidora da auto-oligomerização que torna a hetero-oligomerização do primeiro e do segundo anticorpo codependente.

[0017] Sem estar limitado pela teoria, acredita-se que uma combinação de um primeiro anticorpo e um segundo anticorpo da invenção tendo substituições complementares que tornam as funções efetoras ou funções de sinalização por exemplo, a atividade agonística do primeiro e segundo anticorpos codependentes é capaz de reduzir a toxicidade da combinação e aumentar a janela terapêutica da combinação. Adicionalmente, uma combinação de um primeiro anticorpo e um segundo anticorpo da presente invenção pode ser usada para especificamente esgotar as populações de célula que expressam os antígenos reconhecidos pelo primeiro anticorpo e pelo segundo anticorpo. Assim, uma combinação de um primeiro anticorpo e

um segundo anticorpo da presente invenção pode ser usada para especificamente esgotar populações de célula de tumor expressando o primeiro e segundo antígenos reconhecidos pelo primeiro e segundo anticorpos, enquanto não esgota as populações saudáveis de célula ou tecido expressando apenas o primeiro ou o segundo antígenos reconhecidos pelo primeiro e segundo anticorpos.

[0018] Em um aspecto a presente invenção provê um primeiro anticorpo compreendendo uma primeira região Fc de uma IgG humana e uma primeira região de ligação a antígeno capaz de se ligar a um primeiro antígeno, para o uso como um medicamento em combinação com um segundo anticorpo compreendendo uma segunda região Fc de uma IgG humana e uma segunda região de ligação a antígeno capaz de se ligar a um segundo antígeno, em que a dita primeira região Fc compreende

a. uma substituição de um aminoácido em uma posição selecionada a partir do grupo consistindo em: E430, E345 e S440, com a condição de que a substituição em S440 seja S440Y ou S440W, e

b. uma substituição K439E ou S440K, com a condição de que a substituição não seja S440K se a substituição em (a) for S440Y ou S440W, e

c. uma substituição de aminoácido na posição G237 ou uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: G236R, G236K, K322A, E269K, K322E e P329R,;

e a dita segunda região Fc compreende

d. uma substituição de um aminoácido em uma posição selecionada a partir do grupo consistindo em: E430, E345 e S440, com a condição de que a substituição em S440 seja S440Y ou S440W e

e. uma substituição K439E ou S440K, com a condição de que a substituição não seja S440K se a substituição em (d) for S440Y ou S440W e

f. uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo

consistindo em: K326A, K326W, E333A e E333S se a primeira região Fc compreende uma substituição K322E ou P329R;

em que a primeira região Fc tem uma substituição K439E e a segunda região Fc tem uma substituição S440K ou a primeira região Fc tem uma substituição S440K e a segunda região Fc tem uma substituição K439E; em que as posições de aminoácido correspondem à IgG1 humana de acordo com o sistema de numeração EU (Edelman *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A. maio de 1969; 63(1): 78-85; Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edição. 1991 Publicação NIH No. 91-3242).

[0019] Em um aspecto a presente invenção provê um primeiro anticorpo compreendendo uma primeira região Fc de uma IgG humana e uma primeira região de ligação a antígeno capaz de se ligar a um primeiro antígeno, para o uso como um medicamento em combinação com um segundo anticorpo compreendendo uma segunda região Fc de uma IgG humana e uma segunda região de ligação a antígeno capaz de se ligar a um segundo antígeno, em que a dita primeira região Fc compreende

a. uma substituição de um aminoácido em uma posição selecionada a partir do grupo consistindo em: E430, E345 e S440, com a condição de que a substituição em S440 seja S440Y ou S440W, e

b. uma substituição K439E ou S440K, com a condição de que a substituição não seja S440K se a substituição em (a) for S440Y ou S440W, e

c. uma ou mais substituições de aminoácido selecionadas a partir do grupo consistindo em: L234, L235, G237, G236 ou uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: K322A e E269K; e a dita segunda região Fc compreende

d. uma substituição de um aminoácido em uma posição selecionada a partir do grupo consistindo em: E430, E345 e S440, com a condição de que a substituição em S440 seja S440Y ou S440W e

e. uma substituição K439E ou S440K, com a condição de que a substituição não seja S440K se a substituição em (d) for S440Y ou S440W;

em que a primeira região Fc tem uma substituição K439E e a segunda região Fc tem uma substituição S440K ou a primeira região Fc tem uma substituição S440K e a segunda região Fc tem uma substituição K439E; em que as posições de aminoácido correspondem à IgG1 humana de acordo com o sistema de numeração EU.

[0020] Em um aspecto a presente invenção provê um primeiro anticorpo compreendendo uma primeira região Fc de uma IgG humana e uma primeira região de ligação a antígeno capaz de se ligar a um primeiro antígeno, para o uso como um medicamento em combinação com um segundo anticorpo compreendendo uma segunda região Fc de uma IgG humana e uma segunda região de ligação a antígeno capaz de se ligar a um segundo antígeno, em que a dita primeira região Fc compreende

a. uma substituição de um aminoácido em uma posição selecionada a partir do grupo consistindo em: E430, E345 e S440, com a condição de que a substituição em S440 seja S440Y ou S440W, e

b. uma substituição K439E ou S440K, com a condição de que a substituição não seja S440K se a substituição em (a) for S440Y ou S440W, e

c. uma substituição de aminoácido na posição G237 ou uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: G236R, G236K, K322A, E269K, L234A, L234F, L235A, L235Q e L235E;

e a dita segunda região Fc compreende

d. uma substituição de um aminoácido em uma posição selecionada a partir do grupo consistindo em: E430, E345 e S440, com a condição de que a substituição em S440 seja S440Y ou S440W e

e. uma substituição K439E ou S440K, com a condição de que a substituição não seja S440K se a substituição em (d) for S440Y ou S440W;

em que a primeira região Fc tem uma substituição K439E e a segunda região Fc tem uma substituição S440K ou a primeira região Fc tem uma substituição S440K e a segunda região Fc tem uma substituição K439E; em que as posições de aminoácido correspondem à IgG1 humana de acordo com o sistema de numeração EU.

[0021] Em um aspecto a presente invenção provê um primeiro anticorpo compreendendo uma primeira região Fc de uma IgG humana e uma primeira região de ligação a antígeno capaz de se ligar a um primeiro antígeno, para o uso como um medicamento em combinação com um segundo anticorpo compreendendo uma segunda região Fc de uma IgG humana e uma segunda região de ligação a antígeno capaz de se ligar a um segundo antígeno, em que a dita primeira região Fc compreende

a. uma substituição de um aminoácido em uma posição selecionada a partir do grupo consistindo em: E430, E345 e S440, com a condição de que a substituição em S440 seja S440Y ou S440W, e

b. uma substituição K439E ou S440K, com a condição de que a substituição não seja S440K se a substituição em (a) for S440Y ou S440W, e

c. uma substituição de aminoácido na posição P329 ou uma substituição K322E;

e a dita segunda região Fc compreende

d. uma substituição de um aminoácido em uma posição selecionada a partir do grupo consistindo em: E430, E345 e S440, com a condição de que a substituição em S440 seja S440Y ou S440W e

e. uma substituição K439E ou S440K, com a condição de que a substituição não seja S440K se a substituição em (d) for S440Y ou S440W e

f. uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: K326A, K326W, E333A e E333S;

em que a primeira região Fc tem uma substituição K439E e a

segunda região Fc tem uma substituição S440K ou a primeira região Fc tem uma substituição S440K e a segunda região Fc tem uma substituição K439E; em que as posições de aminoácido correspondem à IgG1 humana de acordo com o sistema de numeração EU.

[0022] Em um outro aspecto a presente invenção provê um primeiro anticorpo compreendendo uma primeira região Fc de uma IgG humana e uma primeira região de ligação a antígeno capaz de se ligar a um primeiro antígeno, para o uso como um medicamento em combinação com um segundo anticorpo compreendendo uma segunda região Fc de uma IgG humana e uma segunda região de ligação a antígeno capaz de se ligar a um segundo antígeno, em que a dita primeira região Fc compreende

- a. uma substituição K248E e uma T437R, e
- b. uma substituição K439E ou S440K, e
- c. uma substituição de aminoácido na posição G237 ou P329

ou uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: G236R, G236K, K322A, K332E, E269K, L234A, L234F, L235A, L235Q e L235E;

e a dita segunda região Fc compreende

- d. uma substituição K248E e uma T437R e
- e. substituição aK439E ou S440K,

em que a primeira região Fc tem uma substituição K439E e a segunda região Fc tem uma substituição S440K ou a primeira região Fc tem uma substituição S440K e a segunda região Fc tem uma substituição K439E; em que as posições de aminoácido correspondem à IgG1 humana de acordo com o sistema de numeração EU.

[0023] Uma substituição em uma posição correspondendo a E430, E345 ou uma substituição S440Y ou S440W é considerada uma substituição realçadora de Fc-Fc de acordo com a presente invenção.

[0024] Uma substituição K439E ou uma S440K é considerada uma

substituição complementar inibidora da auto-oligomerização de acordo com a presente invenção. Isto é, um primeiro anticorpo tendo por exemplo, uma K439E pode não formar oligômeros com um outro anticorpo tendo uma substituição K439E, entretanto um anticorpo tendo uma substituição K439E pode formar oligômeros com um outro anticorpo tendo uma substituição S440K. Um anticorpo tendo uma substituição S440K pode não formar oligômeros com um outro anticorpo tendo uma substituição S440K.

[0025] Uma substituição de aminoácido na posição G237 ou uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: G236R, G236K, K322A, E269K, K322E, P329R, L234A, L234F, L235A, L235Q e L235E, são consideradas substituição(ões) de modulação do sítio de ligação de C1q de acordo com a presente invenção e funções efetoras reduzidas tais como CDC e/ou ADCC.

[0026] Uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: K326A, K326W, E333A e E333S são consideradas substituição(ões) da modulação do sítio de ligação de C1q de acordo com a presente invenção e funções efetoras aumentadas tais como CDC e/ou ADCC.

[0027] Em uma modalidade a segunda região Fc compreende uma substituição G237A.

[0028] Uma substituição G237A é considerada uma substituição de modulação do receptor Fc-gama de acordo com a presente invenção e diminui a ligação ao receptor de Fc-gama.

[0029] Isto é, os inventores da presente invenção em um primeiro aspecto da invenção verificaram que pela combinação de um primeiro anticorpo e um segundo anticorpo onde o primeiro anticorpo tem uma substituição realçadora de Fc-Fc, uma substituição inibidora da auto-oligomerização e uma ou mais substituições que reduzem as funções efetoras tais como CDC e/ou ADCC e o segundo anticorpo tem uma substituição realçadora de Fc-Fc, uma substituição inibidora da auto-oligomerização e

opcionalmente uma ou mais substituições que realçam funções efetoras tais como CDC e/ou ADCC, e onde o primeiro e o segundo anticorpos têm substituições complementares inibidoras da auto-oligomerização deste modo realizar a hetero-oligomerização do primeiro e do segundo anticorpos codependentes.

[0030] Pode ser possível melhorar a margem de segurança entre a atividade da função efetora nas células doentes versus a atividade da função efetora nas células saudáveis para a combinação de anticorpo, quando comparada a uma combinação de anticorpos com realçador de Fc-Fc e substituições inibidoras da auto-oligomerização mas sem substituições moduladoras de C1q.

[0031] Em um aspecto adicional a presente invenção provê um anticorpo compreendendo uma região Fc de uma IgG humana e uma região de ligação a antígeno capaz de se ligar a um antígeno, em que a dita região Fc compreende

a. uma substituição de um aminoácido em uma posição selecionada a partir do grupo consistindo em: E430, E345 e S440, com a condição de que a substituição em S440 seja S440Y ou S440W, e

b. uma substituição K439E ou S440K, com a condição de que a substituição não seja S440K se a substituição em (a) for S440Y ou S440W, e

c. uma substituição de aminoácido na posição G237 ou uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: G236R, G236K, K322A, E269K, L234A, L234F, L235A, L235Q e L235E.

[0032] Em um outro aspecto a presente invenção provê um anticorpo compreendendo uma região Fc de uma IgG humana e uma região de ligação a antígeno capaz de se ligar a um antígeno, em que a dita região Fc compreende

a. uma substituição K248E e uma T437R, e

b. uma substituição K439E ou S440K, e

c. uma substituição de aminoácido na posição G237 ou P329 ou uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: G236R, G236K, K322A, K332E, E269K, L234A, L234F, L235A, L235Q, L235E, K326A, K326W, E333A e E333S.

[0033] Em um aspecto a presente invenção provê uma composição compreendendo um primeiro e um segundo anticorpos em que o primeiro anticorpo compreende uma primeira região de ligação a antígeno e uma primeira região Fc de acordo com qualquer modalidade ou aspecto aqui descritos e o segundo anticorpo compreende uma segunda região de ligação a antígeno e uma segunda região Fc de acordo com qualquer modalidade ou aspecto aqui descritos.

[0034] Em um aspecto a presente invenção provê uma composição compreendendo um primeiro e um segundo anticorpos, em que o primeiro anticorpo compreende uma primeira região de ligação a antígeno capaz de se ligar a um primeiro antígeno e uma primeira região Fc de uma IgG humana e o segundo anticorpo compreende uma segunda região de ligação a antígeno capaz de se ligar a um segundo antígeno e uma segunda região Fc de uma IgG humana, em que a dita primeira região Fc compreende

a. uma substituição de um aminoácido em uma posição selecionada a partir do grupo consistindo em: E430, E345 e S440, com a condição de que a substituição em S440 seja S440Y ou S440W, e

b. uma substituição K439E ou S440K, com a condição de que a substituição não seja S440K se a substituição em (a) for S440Y ou S440W, e

c. uma substituição de aminoácido na posição G237 ou uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: G236R, G236K, K322A, E269K, K322E e P329R;

e a dita segunda região Fc compreende

d. uma substituição de um aminoácido em uma posição

selecionada a partir do grupo consistindo em: E430, E345 e S440, com a condição de que a substituição em S440 seja S440Y ou S440W e

e. uma substituição K439E ou S440K, com a condição de que a substituição não seja S440K se a substituição em (d) for S440Y ou S440W, e

f. uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: K326A, K326W, E333A e E333S se a primeira região Fc compreende uma substituição K322E ou P329R,

em que a primeira região Fc tem uma substituição K439E e a segunda região Fc tem uma substituição S440K ou a primeira região Fc tem uma substituição S440K e a segunda região Fc tem uma substituição K439E, em que as posições de aminoácido correspondem à IgG1 humana de acordo com o sistema de numeração EU.

[0035] Em um aspecto a presente invenção provê uma composição compreendendo um primeiro e um segundo anticorpos, em que o primeiro anticorpo compreende uma primeira região de ligação a antígeno capaz de se ligar a um primeiro antígeno e uma primeira região Fc de uma IgG humana e o segundo anticorpo compreende uma segunda região de ligação a antígeno capaz de se ligar a um segundo antígeno e uma segunda região Fc de uma IgG humana, em que a dita primeira região Fc compreende

a. uma substituição de um aminoácido em uma posição selecionada a partir do grupo consistindo em: E430, E345 e S440, com a condição de que a substituição em S440 seja S440Y ou S440W, e

b. uma substituição K439E ou S440K, com a condição de que a substituição não seja S440K se a substituição em (a) for S440Y ou S440W, e

c. uma substituição de aminoácido na posição G237 ou uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: G236R, G236K, K322A, E269K, L234A, L234F, L235A, L235Q e L235E;

e a dita segunda região Fc compreende

d. uma substituição de um aminoácido em uma posição selecionada a partir do grupo consistindo em: E430, E345 e S440, com a condição de que a substituição em S440 seja S440Y ou S440W e

e. uma substituição K439E ou S440K, com a condição de que a substituição não seja S440K se a substituição em (d) for S440Y ou S440W,

em que a primeira região Fc tem uma substituição K439E e a segunda região Fc tem uma substituição S440K ou a primeira região Fc tem uma substituição S440K e a segunda região Fc tem uma substituição K439E, em que as posições de aminoácido correspondem à IgG1 humana de acordo com o sistema de numeração EU.

[0036] Em um aspecto a presente invenção provê uma composição compreendendo um primeiro e um segundo anticorpos, em que o primeiro anticorpo compreende uma primeira região de ligação a antígeno capaz de se ligar a um primeiro antígeno e uma primeira região Fc de uma IgG humana e o segundo anticorpo compreende uma segunda região de ligação a antígeno capaz de se ligar a um segundo antígeno e uma segunda região Fc de uma IgG humana, em que a dita primeira região Fc compreende

a. uma substituição de um aminoácido em uma posição selecionada a partir do grupo consistindo em: E430, E345 e S440, com a condição de que a substituição em S440 seja S440Y ou S440W, e

b. uma substituição K439E ou S440K, com a condição de que a substituição não seja S440K se a substituição em (a) for S440Y ou S440W, e

c. uma substituição de aminoácido na posição P329 ou uma substituição K322E;

e a dita segunda região Fc compreende

d. uma substituição de um aminoácido em uma posição selecionada a partir do grupo consistindo em: E430, E345 e S440, com a

condição de que a substituição em S440 seja S440Y ou S440W e

e. uma substituição K439E ou S440K, com a condição de que a substituição não seja S440K se a substituição em (d) for S440Y ou S440W, e

d. uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: K326A, K326W, E333A e E333S,

em que a primeira região Fc tem uma substituição K439E e a segunda região Fc tem uma substituição S440K ou a primeira região Fc tem uma substituição S440K e a segunda região Fc tem uma substituição K439E, em que as posições de aminoácido correspondem à IgG1 humana de acordo com o sistema de numeração EU.

[0037] Em um outro aspecto a presente invenção provê uma composição compreendendo um primeiro e um segundo anticorpos, em que o primeiro anticorpo compreende uma primeira região de ligação a antígeno capaz de se ligar a um primeiro antígeno e uma primeira região Fc de uma IgG humana e o segundo anticorpo compreende uma segunda região de ligação a antígeno capaz de se ligar a um segundo antígeno e uma segunda região Fc de uma IgG humana, em que a dita primeira região Fc compreende

a. uma substituição K248E e uma T437R, e

b. uma substituição K439E ou S440K, e

c. uma substituição de aminoácido na posição G237 ou P329 ou uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: G236R, G236K, K322A, K332E, E269K, L234A, L234F, L235A, L235Q e L235E;

e a dita segunda região Fc compreende

d. uma substituição K248E e uma T437R e

e. uma substituição K439E ou S440K,

em que a primeira região Fc tem uma substituição K439E e a segunda região Fc tem uma substituição S440K ou a primeira região Fc tem

uma substituição S440K e a segunda região Fc tem uma substituição K439E; em que as posições de aminoácido correspondem à IgG1 humana de acordo com o sistema de numeração EU.

[0038] Em um outro aspecto a presente invenção se refere a um método de esgotar uma população de célula expressando um primeiro antígeno e um segundo antígeno, cujo método compreende contatar a dita população de célula com um primeiro e segundo anticorpos ou composição de acordo com qualquer um do primeiro e segundo anticorpos ou composição como aqui definida.

[0039] Em um outro aspecto a presente invenção se refere a um método de tratar um indivíduo tendo uma doença compreendendo administrar ao dito indivíduo uma quantidade eficaz de um primeiro e um segundo anticorpos de acordo com as reivindicações como aqui descritas ou uma quantidade eficaz de uma composição como aqui descrita.

[0040] Em um outro aspecto a presente invenção se refere a um kit compreendendo um primeiro recipiente compreendendo um primeiro anticorpo como aqui definido e um segundo recipiente compreendendo um segundo anticorpo como aqui definido.

[0041] Em um outro aspecto a presente invenção se refere a um primeiro e segundo anticorpos ou uma composição como aqui descritos para o uso no tratamento de câncer, doença autoimune, doença inflamatória ou doença infecciosa.

[0042] Em um outro aspecto a presente invenção se refere a um método de tratar um indivíduo tendo uma doença compreendendo administrar ao dito indivíduo uma quantidade eficaz de um primeiro e segundo anticorpos ou composição como aqui descritos.

[0043] Estes e outros aspectos da invenção, particularmente vários usos e aplicações terapêuticas para o primeiro e segundo anticorpos, são descritos em mais detalhes abaixo.

Breve Descrição dos Desenhos

[0044] A **Figura 1** mostra seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E + IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 pela introdução da mutação P329R. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de soro humano normal (NHS) reunido. A eficácia da CDC é apresentada como (A) porcentagem de lise determinada pela porcentagem de células positivas em iodeto de propídio (PI) e (B) a área sob as curvas de dose-resposta (AUC), normalizadas para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[0045] A **Figura 2** mostra a seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E + IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 pela introdução da mutação K322E. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como (A) porcentagem de lise determinada pela porcentagem de células positivas em PI e (B) a AUC normalizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[0046] A **Figura 3** mostra a seletividade da atividade da CDC pela introdução da mutação K322E em variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E + 11B8-E430G-S440K anti-CD20 nas linhagens de célula diferentes. os ensaios da CDC in vitro foram realizados com 30 µg/mL de anticorpo na presença de 20% de NHS usando linhagens de célula de linfoma de Burkitt Wien 133 (A), Daudi (B), Raji (C) e Ramos (D), linhagem de célula de linfoma linfoblástico agudo (ALL) REH (E), linhagem de célula de mieloma U266B1 (F) e linhagem de célula de linfoma de célula B U-698-M (G). A atividade da CDC é apresentada como a

porcentagem de lise determinada pela porcentagem de células positivas em PI normalizadas por linhagem de célula para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e IgG1-CAMPATH-1H-E430G (100%) para REH, U266B1 e Wien 133 ou IgG1-11B8-E430G (100%) para Daudi, Raji, Ramos e U-698-M.

[0047] A **Figura 4** mostra seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E com uma mutação da inibição da ligação de C1q (G236R, K322A, E269K, K322E ou P329R) + IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI. A normalização foi realizada para a mistura de anticorpo de controle IgG1-b12-K439E + IgG1-b12-S440K sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[0048] A **Figura 5** mostra seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E + IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 com uma mutação realçadora da ligação de C1q (E333S, K326W ou K326A/E333A). As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI. A normalização foi realizada para a mistura de anticorpo de controle IgG1-b12-K439E + IgG1-b12-S440K sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[0049] A **Figura 6** mostra seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E com a mutação inibidora da ligação de C1q G236R (A), K322A (B), E269K (C), K322E (D) ou P329R (E) + IgG1-11B8-E430G-

S440K anti-CD20 com uma mutação realçadora da ligação de C1q (E333S, K326W ou K326A/E333A). As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI. A normalização foi realizada para a mistura de anticorpo de controle IgG1-b12-K439E + IgG1-b12-S440K sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[0050] A **Figura 7** mostra a ligação de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E com a mutação inibidora da ligação de C1q G236R ou K322A (A, B) e variantes de anticorpo de IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 com a mutação realçadora da ligação de C1q E333S (C, D) às linhagens de célula de linfoma humano Wien 133 (A, C) e Raji (B, D). A ligação de anticorpo foi testada pela citometria de fluxo. A ligação é expressa como média geométrica da intensidade de fluorescência (MFI). Como um controle negativo para a ligação, uma amostra sem anticorpo primário ou anticorpo anti-gp120 sem ligação IgG1-b12 foi usado.

[0051] A **Figura 8** mostra a capacidade de ADCC de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E com a mutação inibidora da ligação de C1q G236R ou K322A (A, C) e variantes de anticorpo de IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 com a mutação realçadora da ligação de C1q E333S (B, D). (A, B) Um Bioensaio repórter de ADCC foi realizado, em que células Raji alvos foram coincubadas com séries de diluição de anticorpo e células T Jurkat humanas estavelmente expressando FcγRIIIa de alta afinidade (V158) e um elemento de resposta de NFAT dirigindo a expressão de luciferase de vagalume. A produção de luciferase foi quantificada pela leitura da luminescência. (C, D) Um ensaio de ADCC com Európio TDA (EuTDA) in vitro foi realizado, em que as células Wien 133 alvos foram coincubadas com séries de diluição de anticorpo e PBMC humana (E:T 100:1). A lise de célula foi determinada medindo-se o sinal do

quelato fluorescente EuTDA no sobrenadante.

[0052] A **Figura 9** mostra a seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas da interação Fc-Fc realçada IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-K439E com mutação inibidora da ligação de C1q G236R ou K322A + variantes da interação Fc-Fc realçada IgG1-11B8 anti-CD20-S440K com ou sem mutação realçadora da ligação de C1q E333S. As mutações realçadoras da interação Fc-Fc testadas foram E430G, E345K, E345R e E345R-E430G. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI e lise máxima. A normalização foi realizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[0053] A **Figura 10** mostra a seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E com mutações moduladoras da ligação de C1q na posição G236 (G236R ou G236K) ou posição G237 (G237A, G237T, G237Q ou G237R) ou a mutação dupla G237A-K322A + IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 com ou sem mutação moduladora da ligação de C1q E333S, E333A, K326A, K326W-E333S, G237A ou G237A-E333S. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI e lise máxima. A normalização foi realizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[0054] A **Figura 11** mostra a seletividade da atividade da CDC pelas variantes de isótipo de anticorpo misturadas (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 estabilizada na dobradiça) de CAMPATH-1H-E430G-K439E anti-CD52 com ou sem mutação inibidora da ligação de C1q G236R + 11B8-E430G-S440K

anti-CD20 com ou sem mutação realçadora da ligação de C1q E333S. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI. A normalização foi realizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[0055] A **Figura 12** mostra seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E com ou sem mutação inibidora da ligação de C1q G236R ou K322A + anti-CD37 IgG1-CD37-37.3-E430G-S440K com ou sem mutação realçadora da ligação de C1q E333S nas células (A) Daudi e (B) Wien 133. As células alvos foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI. A normalização foi realizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-CD37-37.3-E430G (100%).

[0056] A **Figura 13** mostra citotoxicidade mediada por DR5 de (A) variantes únicas de anticorpo ou (B) uma mistura agonista de variantes de anticorpo IgG1-DR5-01-G56T-E430G-K439E anti-DR5 com ou sem mutação inibidora da ligação de C1q G236R + IgG1-DR5-05-E430G-S440K com ou sem mutação realçadora da ligação de C1q E333S nas células de câncer pancreático humano BxPC-3. ensaio de viabilidade de três dias foi realizado e a viabilidade celular foi determinada usando o kit CellTiter-Glo.

[0057] A **Figura 14** mostra atividade da CDC pelas variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G com a mutação moduladora da ligação de C1q G237A, G236R, A327K, K322E ou P329R. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI. A normalização foi

realizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação-S440K (0%; não mostrado) e IgG1-CAMPATH-1H-E430G (100%).

[0058] A **Figura 15** mostra a ligação de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E com a mutação inibidora da ligação de C1q G236R ou K322A (A, B, C) e variantes de anticorpo de IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 com a mutação realçadora da ligação de C1q E333S (D, E, F) ao FcRn humano. Um ELISA de FcRn foi realizado com 5 µg/mL de domínio extracelular recombinante revestido de FcRn humano (FcRnhsECDHis-B2M-BIO) e séries de diluição de anticorpo. A quantidade de anticorpos ligados foi determinada com um anticorpo anti-IgG1 humana de cabra conjugado a HRP e o substrato quimioluminescente ABTS. A absorbância foi medida a 405 nm.

[0059] A **Figura 16** mostra a taxa de depuração de 500 µg de anticorpo intravenosamente administrados em camundongos SCID. (A-C) A IgG humana total em amostras de plasma foi determinada pelo ELISA e plotada em uma curva de concentração versus tempo para (A) variantes IgG1-CAMPATH-1H, (B) variantes IgG1-11B8 e (C) combinações de variantes IgG1-CAMPATH-1H + variantes IgG1-11B8. Cada ponto de dados representa a média +/- desvio padrão de amostras em triplicata. (D) A depuração até o dia 21 depois da administração do anticorpo foi determinada seguindo a fórmula $D \cdot 1.000 / AUC$ com D, dose injetada e AUC, área sob a curva da curva da concentração-tempo.

[0060] A **Figura 17** mostra a ligação de variantes de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E imobilizadas com as mutações de inibição da ligação de C1q G236R ou G237T e variantes IgG1-11B8-E430G-S440K com as mutações realçadoras da ligação de C1q K326A ou E333S aos ECD's biotinilados rotulados com His diméricos do alótipo FcγRIIA 131H (A), alótipo FcγRIIA 131R (B), FcγRIIB (C), alótipo FcγRIIIA 158V (D) e alótipo FcγRIIIA 158F (E) como testado nos ensaios de ELISA. a ligação é

apresentada para amostra de 20 µg/mL de anticorpo em relação ao controle sem anticorpo (fundo) e ligação a IgG1-11B8-E430G-S440K (100%). A detecção foi realizada usando Estreptavidina-poliHRP e ABTS.

[0061] A **Figura 18** mostra a seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E anti-CD52 com ou sem uma mutação inibidora da ligação de C1q (G236R ou G237T) + IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 com mutação inibidora da ligação de FcγR G237A com ou sem a mutação realçadora da ligação de C1q E333S. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI e como lise a 40 µg/mL de IgG. A normalização foi realizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[0062] A **Figura 19** mostra atividade seletiva de combinações de variantes de IgG1-CAMPATH-1H e IgG1-11B8 no sangue integral, determinada pela análise de citometria de fluxo de células sanguíneas. eixo Y: Fração de células B (positivas em CD19 / negativas em CD3) ou Fração de células T (negativas em CD19/ positivas em CD3) da população de linfócito total (negativos em CD66b), depois de incubação durante a noite na presença de células efectoras. eixos X: grupos de tratamento diferentes. Os símbolos representam células de cinco doadores saudáveis diferentes, testados e duas incubações separadas por doador. (A) Atividade seletiva de IgG1-CAMPATH-1H-G236R-E430G-K439E misturados com IgG1-11B8-G237A-E430G-S440K. (B) Atividade seletiva de variantes de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E contendo uma mutação G237 adicional, misturada com IgG1-11B8-G237A-E430G-S440K. (C) Atividade seletiva de variantes de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E contendo uma mutação G236R ou G237 adicional, misturados com IgG1-11B8-G237A-E430G-S440K contendo uma

mutação E333S realçadora da ligação de C1q adicional. (D) Profundidade de depleção de célula B pelos anticorpos alvejadores de célula B diferentes comparada com as combinações de anticorpo codependentes de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E com mutações adicionais G236R, G237Q ou G237R, misturados com IgG1-11B8-G237A-E430G-S440K. Eixo Y: representação na escala log da fração de células B determinada como acima.

[0063] A **Figura 20** mostra a seletividade da atividade da CDC nas linhagens de célula diferentes com diferentes níveis de expressão de CD20 e CD52 pela combinação de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E e variantes de anticorpo IgG1-11B8-E430G-S440K com uma mutação inibidora da ligação de C1q no componente anti-CD52 e uma mutação realçadora da ligação de C1q no componente anti-CD20. Ensaio da CDC in vitro foram realizados com 0,01 a 40 µg/mL de anticorpo na presença de 20% de NHS usando linhagens de célula de linfoma de Burkitt Daudi (A), Raji (B) e Ramos (C), linhagem de célula ALL REH (D) e linhagem de célula de linfoma de célula B U-698-M (E). A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI e como lise máxima. A normalização foi realizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[0064] A **Figura 21** mostra seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CD37-37.3-E430G-K439E anti-CD37 com ou sem uma mutação inibidora G236R C1q da ligação de + IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 com ou sem a mutação realçadora da ligação de C1q E333S. (A) células Daudi e (B) células WIL2-S foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI e como lise a 40 µg/mL de IgG. A normalização foi realizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-

CD37-37.3-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[0065] A **Figura 22** mostra (A) ligação de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 com as mutações realçadoras da interação Fc:Fc E430G ou E345R, mutação inibidora da auto-oligomerização K439E, em combinação com qualquer uma das mutações inibidoras da ligação de FcγR e moduladoras da ligação de C1q G236R, G237A ou G237T à linhagem de célula de linfoma humano Wien 133. A ligação de anticorpo foi testada pela citometria de fluxo e é apresentada normalizada em relação ao valor Bmax de IgG1-Campath-1H do tipo selvagem (100%). Como um controle negativo para a ligação, um anticorpo anti-gp120 sem ligação IgG1-b12 foi usado. (B) A ligação máxima (Bmax) às células Raji pelas variantes de anticorpo IgG1-Campath-1H com mutações E430G e K439E, em combinação com qualquer uma das mutações moduladoras da ligação de C1q G236R, G237A ou G237T é mostrada normalizada em relação à ligação de IgG1-Campath-1H do tipo selvagem (C) Valores Kd aparentes de variantes de anticorpo IgG1-Campath-1H com mutações E430G e S440K, em combinação com qualquer uma das mutações moduladoras da ligação de C1q G236R, G237A ou G237T às células Raji.

[0066] A **Figura 23** mostra a ligação de variantes de anticorpo de IgG1-11B8 anti-CD20 com a mutação realçadora da interação Fc-Fc E430G, mutação inibidora da auto-oligomerização S440K, em combinação com qualquer uma das mutações moduladoras da ligação de C1q K326A ou E333A (A) ou E333S, G237A ou G237A-E333S (B) à linhagem de célula de linfoma humano Raji. A ligação de anticorpo foi testada pela citometria de fluxo e é apresentada normalizada em relação ao valor Bmax de IgG1-11B8 tipo selvagem (100%). Como um controle negativo para a ligação, um anticorpo anti-gp120 sem ligação IgG1-b12 foi usado. (C, D) Ligação máxima (Bmax) às células Raji pelas variantes de anticorpo IgG1-11B8 com mutações E430G e S440K, em combinação com qualquer uma das mutações

moduladoras da ligação de C1q K326A ou E333A (C) ou E333S, G237A ou G237A-E333S (D) é mostrada normalizada em relação à ligação de IgG1-11B8 tipo selvagem (E, F) Valores Kd aparentes de variantes de anticorpo IgG1-11B8 com mutações E430G e S440K, em combinação com qualquer uma das mutações moduladoras da ligação de C1q K326A ou E333A (E) ou E333S, G237A ou G237A-E333S (F) ligação às células Raji.

[0067] A **Figura 24** mostra a ligação de FcRn de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 e variantes de anticorpo IgG1-11B8 anti-CD20. (A, C) Ligação ao FcRn humano é mostrada para as variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 com mutação realçadora da interação Fc-Fc E430G, mutação inibidora da auto-oligomerização K439E e mutações moduladoras da ligação de C1q G237A ou G237T usando uma concentração de anticorpo de 40 µg/mL no (A) pH 6,0 ou (C) pH 7,4. (B, D) Ligação ao FcRn humano pelas variantes de anticorpo IgG1-11B8 anti-CD20 com mutação realçadora da interação Fc-Fc E430G, mutação inibidora da auto-oligomerização S440K e mutações moduladoras da ligação de C1q K326A, E333A, G237A ou G237A-E333S usando uma concentração de 40 µg/mL de anticorpo no (B) pH 6,0 ou (D) pH 7,4. Um ELISA de FcRn foi realizado com 2 µg/mL de domínio extracelular recombinante revestido de FcRn humano (FcRnECDHis-B2M-BIO) e séries de diluição de anticorpo. A quantidade de anticorpos ligados foi determinada com um anticorpo anti-IgG1 humana de cabra conjugado a HRP e o substrato quimioluminescente ABTS. A absorbância foi medida a 405 nm.

[0068] A **Figura 25** mostra as concentrações da IgG humana total (hIgG) como medidas em amostras de sangue coletadas de camundongos injetados com IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 ou variantes de anticorpo anti-IgG1-11B8 ou misturas dos mesmos. (A) Concentração de hIgG total em amostras de sangue coletadas de camundongos injetados com IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G237Q ou IgG1-

CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R tipo selvagem. (B) Concentração de hIgG total em amostras de sangue coletadas de camundongos injetados com IgG1-11B8, IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A ou IgG1-11B8-E430G-S440K-E333S tipo selvagem. (C) Concentração de hIgG total em amostras de sangue coletadas de camundongos injetados com misturas de IgG1-CAMPATH-1H tipo selvagem + IgG1-11B8 ou misturas de IgG1-CAMPATH-1H e variantes de anticorpo IgG1-11B8 abrigando as mutações como em (A) e (B). Em todas as figuras, a linha pontilhada representa a concentração de IgG1 prognosticada no tempo para anticorpos de IgG1 do tipo selvagem nos camundongos SCID. (D) Depuração até dia 21 depois da administração do anticorpo foi determinada seguindo a fórmula $D \cdot 1000 / AUC$ com D, dose injetada e AUC, área sob a curva da curva da concentração-tempo.

[0069] A **Figura 26** mostra a concentração de C4d (em $\mu\text{g/ml}$) detectado em amostras incubadas com variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H, mutações que abrigam IgG1-11B8 e IgG1-b12 E430G, K439E ou S440K e G236R, G237A, G237Q ou G237R, depois da subtração da concentração de C4d média detectada em amostras de controle negativo sem conter nenhum dos anticorpos. As amostras de controle positivo incluem variantes de anticorpo abrigando as mutações realçadoras da interação Fc-Fc E345R, E430G e S440Y (RGY).

[0070] A **Figura 27** mostra a ligação de C1q às células Wien 133 incubadas em gelo com soro humano normal como uma fonte de complemento, depois da opsonização com mutações abrigando variantes de anticorpos IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-11B8 e IgG1-b12 E430G, K439E ou S440K e G236R, G237T, K326A ou E333S, detectadas pela citometria de fluxo. Os valores de intensidade de fluorescência média foram normalizados para controlar reações sem anticorpo (0%) e o nível de topo de uma mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%), estimado pelo

ajuste de um modelo de resposta agonista log. (A) ligação ao C1q de reações de controle. (B-D) Ligação ao C1q de (B) IgG1-CAMPATH-E430G-K439E, (C) IgG1-CAMPATH-E430G-K439E-G236R e (D) IgG1-CAMPATH-E430G-K439E-G237R, misturados com controle sem ligação IgG1-b12 ou variantes IgG1-11B8 diferentes.

[0071] A **Figura 28** mostra a ligação de FcγR pelas variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H-E430G e IgG1-11B8-E430G abrigando a mutação inibidora da auto-oligomerização K439E ou S440K e mutações moduladoras da ligação de C1q. (A-E) Ligação de variantes de anticorpo imobilizadas aos ECDs biotinilados diméricos rotulados com His como testado nos ensaios de ELISA, de (A) alótipo de alta afinidade FcγRIIA 131H, (B) alótipo de baixa afinidade FcγRIIA 131R, (C) FcγRIIB, (D) alótipo de alta afinidade FcγRIIA 158V ou (E) alótipo de baixa afinidade FcγRIIA 158F. (F) Ligação de FcγRIa imobilizado às variantes de anticorpo testadas no ELISA. A ligação é apresentada para amostras de 20 µg/mL de anticorpo e foi normalizada por experimento depois da subtração dos sinais em poços incubados sem anticorpo primário em relação ao sinal médio observado para IgG1-CAMPATH-1H tipo selvagem (100%). A detecção foi realizada usando Estreptavidina-poliHRP e ABTS.

[0072] A **Figura 29** mostra seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52, IgG1-11B8 anti-CD20 e IgG1-h2E8 anti-CD52 pela introdução de mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e modulem a ligação de C1q. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC foi medida em três experimentos independentes e é apresentada como (A) a AUC calculada em média normalizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%) e (B) a porcentagem calculada em média de lise determinada

pela positividade do cloreto de propídio em uma concentração de anticorpo de 40 µg/ml.

[0073] A **Figura 30** (A, B) mostra a eficácia na CDC de agente único e variantes de anticorpo combinadas IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G, IgG1-11B8 anti-CD20-E430G e IgG1-b12-E430G sem ligação a antígeno abrigo mutações inibidoras da auto-oligomerização e mutações moduladoras da ligação de C1q como indicadas. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia e CDC são apresentadas como a AUC normalizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[0074] A **Figura 31** mostra a ativação de linhagens de célula repórter Jurkat estavelmente expressando (A) FcγRIIa ou (B) FcγRIIIa, como medida pelo nível de luminescência (RLU), no cocultivo com células de linfoma Raji e concentrações diferentes das variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H e IgG1-11B8. os valores de luminescência foram normalizados por experimento em relação àqueles observados para a IgG1-b12 (0%) e IgG1-Campath-1H tipo selvagem + IgG1-11B8 tipo selvagem (100%), antes de calcular a média em relação a três réplicas experimentais (FcγRIIa) ou duas (FcγRIIIa).

[0075] A **Figura 32** mostra CDC codependente nas células Wien 133 induzida pelas misturas das variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H e IgG1-11B8 abrigo mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e modulem a ligação de C1q em razões não equimolares. (A) CDC codependente induzida pelas misturas contendo razões de concentração equimolares e não equimolares de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R e IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A. (B) CDC codependente induzida pelas misturas contendo razões de concentração equimolares e não equimolares de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G237Q e IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A.

[0076] A **Figura 33** mostra a seletividade da atividade da CDC pelas misturas de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 com variantes IgG1-HLA-DR-huL243 anti-HLA-DR (A) ou variantes IgG1-HLA-DR-1D09C3 anti-HLA-DR (B) pela introdução de mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e inibam a ligação de C1q. Células Oci-Ly17 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de (A) IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-HLA-DR-huL243-E430G (100%) ou (B) IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-HLA-DR-1D09C3-E430G (100%).

[0077] A **Figura 34** mostra a atividade codependente seletiva da CDC de variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 e IgG1-11B8 anti-CD20 pela introdução de mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e inibam a ligação de C1q. A eficácia da CDC é mostrada para variantes de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E com cada uma das mutações L234A, L234A-L235A, L234F, L234F-L235E, L235A, L235Q, G236R ou G237Q e misturas destas variantes com anticorpo IgG1-b12 de controle sem ligação ou IgG1-11B8-E430G-S440K. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[0078] A **Figura 35** mostra a atividade codependente seletiva da CDC de variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 e IgG1-11B8 anti-CD20 pela introdução de mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e inibam a ligação de C1q. (A) eficácia da CDC de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H e IgG1-11B8 como um agente único ou misturas dos mesmos abrigoando a interação de mutações realçadoras de Fc-Fc E430G, E430N, E430T, E430V, E430Y,

E345A, E345K, E345Q, E345R ou E345Y, mutações inibidoras da auto-oligomerização K439E ou S440K e mutações inibidoras da ligação de C1q G236R ou G237A. (B) eficácia da CDC de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H e IgG1-11B8 como um agente único ou misturas dos mesmos abrigoando a interação das mutações realçadoras de Fc-Fc E430G, E430N, E430T, E430V, E430Y, E345A, E345Q, E345V ou E345Y, mutações inibidoras da auto-oligomerização K439E ou S440K e mutações inibidoras da ligação de C1q G236R ou G237A. (C) Eficácia da CDC de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H e IgG1-11B8 como um agente único ou misturas dos mesmos abrigoando a interação combinada das mutações realçadoras de Fc-Fc E430G, E430N, E430T, E430V, E430Y, E345A, E345Q, E345V ou E345Y, as mutações inibidoras da auto-oligomerização K439E ou S440K e as mutações inibidoras da ligação de C1q G236R ou G237A. (D) Eficácia da CDC de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H e IgG1-11B8 como um agente único ou misturas dos mesmos abrigoando a interação das mutações realçadoras de Fc-Fc E430G ou K248E-T437R, mutações inibidoras da auto-oligomerização K439E ou S440K e mutações moduladoras da ligação de C1q G236R, G237A ou E333S. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[0079] A **Figura 36** mostra a CDC codependente nas células de linfoma Raji induzida pelas misturas das variantes de anticorpo IgG1-CD37-37-3 e IgG1-11B8 abrigoando mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e modulem a ligação de C1q. (A) As áreas-sob-a-curva (AUC) relativas, normalizadas para lise mínima (0% com IgG1-b12) e lise máxima (100% com a mistura de IgG1-CD37-37-3-E430G + IgG1-11B8-E430G), da lise de célula induzida pelas variantes de anticorpo indicadas em diluição ou misturas das mesmas. (B) Porcentagem máxima de

lise induzida pelas variantes de anticorpo indicadas e misturas das mesmas.

[0080] A **Figura 37** mostra a atividade codependente seletiva da CDC de variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 e IgG1-11B8 anti-CD20 pela introdução de mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e modulem a ligação de C1q. As amostras CLL de paciente foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a porcentagem de células B viáveis na incubação com as variantes de anticorpo. Os resultados usando amostras CLL dos pacientes 1 (A), 2 (B) e 3 (C) são mostrados.

[0081] A **Figura 38** mostra a fração de células B, células T CD4+ e células T CD8+ detectada pela citometria de fluxo depois da incubação de amostras de sangue integrais com misturas de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-huCLB-T3/4 e IgG1-CD5-INSERM abrigando mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e modulem a ligação de C1q. A porcentagem de (A) células B, (B) células T CD4+ e (C) células T CD8+ detectada em amostras de sangue integral de 4 doadores depois da incubação com as variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-huCLB-T3/4 e IgG1-b12 indicadas. A porcentagem de (D) células B, (E) células T CD4+ e (F) células T CD8+ detectada em amostras de sangue integral de 4 doadores depois da incubação com as variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-CD5-INSERM e IgG1-b12 indicadas. As frações foram calculadas como $[100\% \times (\text{contagem de célula na amostra} / \text{contagem de célula na 'amostra sem Ab'}) \times (\text{Contagem de granulócito 'amostra sem Ab'} / \text{Contagem de granulócito na amostra})]$.

[0082] A **Figura 39** mostra a ativação cooperativa da morte celular programada em células cancerosas pelas variantes de anticorpo anti-DR4 e anti-DR5 abrigando mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e inibam (G237T) ou realcem (K326W-E333S) a ligação de

C1q. (A) A viabilidade de células de câncer pancreático humano BxPC-3 depois de uma incubação de 72h com as variantes de anticorpo indicadas. (B) A viabilidade das células cancerosas de cólon humano COLO 205 depois de uma incubação de 72h com as variantes de anticorpo indicadas. A porcentagem das células viáveis foi calculada usando a seguinte fórmula: % de células viáveis = $[(\text{luminescência da amostra de anticorpo} - \text{luminescência da amostra de estaurosporina}) / (\text{luminescência na amostra de anticorpo} - \text{luminescência na amostra de estaurosporina})] * 100$.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0083] Na descrição das modalidades da invenção terminologia específica serão utilizadas em consideração à clareza. Entretanto, a invenção não é intencionada a ser limitada aos termos específicos assim selecionados e é entendido que cada termo específico inclui todos os equivalentes técnicos que operam em uma maneira similar para realizar um propósito similar.

Definições

[0084] O termo “anticorpo precursor”, deve ser entendido como um anticorpo, que é idêntico a um anticorpo de acordo com a invenção, mas onde o anticorpo precursor não tem uma substituição moduladora da ligação de C1q de acordo com a presente invenção. Assim um anticorpo precursor pode ter uma substituição realçadora de Fc-Fc e uma substituição inibidora da auto-oligomerização. O termo “substituição moduladora da ligação de C1q” deve ser entendida como uma substituição que possa inibir a ligação de C1q tal como uma substituição de aminoácido na posição G237 ou uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: G236R, G236K, K322A, E269K, K322E e P329R ou uma substituição que possa realçar a ligação C1q tal como uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: K326A, K326W, E333A e E333S.

[0085] O termo “polipeptídeo compreendendo uma região Fc de uma imunoglobulina e uma região de ligação” se refere no contexto da presente

invenção a um polipeptídeo que compreende uma região Fc de uma imunoglobulina e uma região de ligação que é uma capaz de se ligar a qualquer molécula, tal como um polipeptídeo, por exemplo, presente em uma célula, bactéria ou virion. A região Fc de uma imunoglobulina é definida como o fragmento de um anticorpo que seria tipicamente gerado depois da digestão de um anticorpo com papaína (que é conhecida por algumas pessoas versadas na técnica) que inclui as duas regiões CH2-CH3 de uma imunoglobulina e uma região de conexão, por exemplo, uma região de dobradiça. O domínio constante de uma cadeia pesada de anticorpo define o isótipo de anticorpo, por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM, IgD ou IgE. A região Fc medeia as funções efetoras de anticorpos com receptores de superfície celular chamados de receptores Fc e proteínas do sistema de complemento. A região de ligação pode ser uma sequência de polipeptídeo, tal como uma proteína, ligante de proteína, receptor, uma região de ligação a antígeno ou uma região de ligação a ligante capazes de se ligarem a uma célula, bactéria ou virion. Se a região de ligação é por exemplo, um receptor, o “polipeptídeo compreendendo uma região Fc de uma imunoglobulina e uma região de ligação” pode ter sido preparado como uma proteína de fusão da região Fc de uma imunoglobulina e a dita região de ligação. Se a região de ligação é uma região de ligação a antígeno o “polipeptídeo compreendendo uma região Fc de uma imunoglobulina e uma região de ligação” pode ser um anticorpo, como um anticorpo quimérico, humanizado ou humano ou um anticorpo apenas com cadeia pesada ou uma fusão de ScFv-Fc. O polipeptídeo compreendendo uma região Fc de uma imunoglobulina e uma região de ligação pode tipicamente compreender uma região conectora, por exemplo, uma região de dobradiça e duas regiões CH2-CH3 da cadeia pesada de uma imunoglobulina, assim o “polipeptídeo compreendendo uma região Fc de uma imunoglobulina e uma região de ligação” pode ser um “polipeptídeo compreendendo pelo menos uma região

Fc de uma imunoglobulina e uma região de ligação”. O termo “região Fc de uma imunoglobulina” significa no contexto da presente invenção que uma região conectora, por exemplo, dobradiça dependendo do subtipo de anticorpo e da região CH2 e CH3 de uma imunoglobulina que estiverem presentes, por exemplo, uma IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA1, IgGA2, IgM ou IgE humanas. O polipeptídeo não é limitado à origem humana, mas pode ser de qualquer origem, tal como por exemplo, origem de camundongo ou cinomolgo. O termo “região Fc tipo selvagem” significa no contexto da presente invenção uma região Fc da imunoglobulina com uma sequência de aminoácido como a mesma ocorre na natureza.

[0086] O termo “região de dobradiça” como aqui usada é intencionada a se referir à região de dobradiça de uma cadeia pesada da imunoglobulina. Assim, por exemplo a região de dobradiça de um anticorpo da IgG1 humana corresponde aos aminoácidos 216 a 230 de acordo com a numeração EU.

[0087] O termo “região CH2” ou “domínio CH2” como aqui usado é intencionado a se referir à região CH2 de uma cadeia pesada da imunoglobulina. Assim, por exemplo a região CH2 de um anticorpo da IgG1 humana corresponde aos aminoácidos 231 a 340 de acordo com a numeração EU. Entretanto, a região CH2 também pode ser qualquer um dos outros subtipos como aqui descritos.

[0088] O termo “região CH3” ou “domínio CH3” como aqui usado é intencionado a se referir à região CH3 de uma cadeia pesada da imunoglobulina. Assim, por exemplo a região CH3 de um anticorpo da IgG1 humana corresponde aos aminoácidos 341 a 447 de acordo com a numeração EU. Entretanto, a região CH3 também pode ser qualquer um dos outros subtipos como aqui descritos.

[0089] O termo “imunoglobulina” se refere a uma classe de glicoproteínas estruturalmente relacionadas consistindo em dois pares de

cadeias de polipeptídeo, um par de cadeias leves (L) de peso molecular baixo e um par de cadeias pesadas (H), todas as quatro potencialmente interconectadas pelas ligações de dissulfeto. A estrutura de imunoglobulinas foi bem caracterizada. Ver por exemplo *Fundamental Immunology* Ch. 7 (Paul, W., ed., 2a ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Em resumo, cada cadeia pesada tipicamente é compreendida de uma região variável de cadeia pesada (aqui abreviada como VH) e uma região constante de cadeia pesada. A região constante de cadeia pesada tipicamente é compreendida de três domínios, CH1, CH2 e CH3. As cadeias pesadas são interconectadas por intermédio de ligações de dissulfeto na chamada “região de dobradiça”. Cada cadeia leve tipicamente é compreendida de uma região variável de cadeia leve (aqui abreviada como VL) e uma região constante de cadeia leve. A região constante de cadeia leve tipicamente é compreendida de um domínio, CL. As regiões VH e VL podem ser subdivididas ainda em regiões de hipervariabilidade (ou regiões hipervariáveis que podem ser hipervariáveis na sequência e/ou forma de alças estruturalmente definidas), também chamadas de regiões determinantes de complementaridade (CDRs), intercaladas com regiões que são mais conservadas, chamadas de regiões estruturais (FRs). Cada VH e VL é tipicamente composta de três CDRs e quatro FRs, arranjadas a partir do terminal amino para o terminal carboxi na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (ver também Chothia e Lesk J. *Mol. Biol.* 196, 901-917 (1987)). A menos que de outro modo estabelecido ou contradito pelo contexto, as sequências de CDR aqui são identificadas de acordo com as regras do IMGT usando DomainGapAlign (Lefranc MP., *Nucleic Acids Research* 1999; 27: 209-212 e Ehrenmann F., Kaas Q. e Lefranc M.-P. *Nucleic Acids Res.*, 38, D301-307 (2010); ver também o endereço [http da internet www.imgt.org/](http://www.imgt.org/). A menos que de outro modo estabelecido ou contradito pelo contexto, referência às posições de aminoácido na região Fc/domínio Fc na presente invenção está de acordo com

a numeração EU (Edelman *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A. maio de 1969; 63(1): 78-85; Kabat *et al.*, Sequences of proteins of immunological interest. 5a Edição - 1991 Publicação NIH No. 91-3242).

[0090] O termo “anticorpo” (Ab) no contexto da presente invenção se refere a uma molécula de imunoglobulina, um fragmento de uma molécula de imunoglobulina ou um derivado de cada um dos mesmos, que tenha a capacidade para especificamente se ligar a um antígeno. O anticorpo da presente invenção compreende um domínio Fc de uma imunoglobulina e uma região de ligação a antígeno. Um anticorpo geralmente contém duas regiões CH2-CH3 e uma região conectora, por exemplo, uma região de dobradiça, por exemplo, pelo menos um domínio Fc. Assim, o anticorpo da presente invenção pode compreender uma região Fc e uma região de ligação a antígeno. As regiões variáveis das cadeias pesada e leve da molécula de imunoglobulina contêm um domínio de ligação que interage com um antígeno. As regiões constantes ou “Fc” dos anticorpos podem mediar a ligação da imunoglobulina aos tecidos ou fatores hospedeiros, incluindo várias células do sistema imune (tais como células efectoras) e componentes do sistema de complemento tais como C1q, o primeiro componente no caminho clássico de ativação de complemento. Um anticorpo também pode ser um anticorpo multiespecífico, tal como um anticorpo biespecífico ou molécula similar. O termo “anticorpo biespecífico” se refere a um anticorpo tendo especificidades para pelo menos dois epítomos diferentes, tipicamente epítomos sem sobreposição. Tais epítomos podem estar no mesmo ou em alvos diferentes. Se os epítomos estiverem em alvos diferentes, tais alvos podem estar na mesma célula ou células ou tipos de célula diferentes. Como indicado acima, a menos que de outro modo estabelecido ou claramente contradito pelo contexto, o termo anticorpo aqui inclui fragmentos de um anticorpo que compreende pelo menos uma porção de uma região Fc e que retém a capacidade para especificamente se ligar ao antígeno. Tais fragmentos podem

ser providos por qualquer técnica conhecida, tal como clivagem enzimática, síntese de peptídeo e técnicas de expressão recombinante. Foi mostrado que a função de ligação de antígeno de um anticorpo pode ser realizada pelos fragmentos de um anticorpo de comprimento completo. Os exemplos de fragmentos de ligação abrangidos dentro do termo “Ab” ou “anticorpo” incluem, sem limitação, anticorpos monovalentes (descritos na WO2007059782 pela Genmab); anticorpos de cadeia pesada, consistindo apenas de duas cadeias pesadas e ocorrendo naturalmente por exemplo, em camelídeos (por exemplo, Hamers-Casterman (1993) Nature 363: 446); ThioMabs (Roche, WO2011069104), domínio engenheirado pela troca de filamento (SEED ou Seed-body) que são moléculas tipo anticorpo assimétricas e biespecíficas (Merck, WO2007110205); Triomab (Pharma/Fresenius Biotech, Lindhofer *et al.* 1995 J Immunol 155: 219; WO2002020039); Fc Δ Adp (Regeneron, WO2010151792), Azymetric Scaffold (Zymeworks/Merck, WO2012/058768), mAb-Fv (Xencor, WO2011/028952), Xmab (Xencor), imunoglobulina de domínio variável dual (Abbott, DVD-Ig, Patente U.S. No. 7.612.181); anticorpos de cabeça dupla de domínio duplo (Unilever; Sanofi Aventis, WO20100226923), Di-diacorpo (ImClone/Eli Lilly), formatos de anticorpo *Knobs-into-holes* (Genentech, WO9850431); DuoBody (Genmab, WO 2011/131746); IgG1 e IgG2 Biespecíficas (Pfizer/ Rinat, WO11143545), DuetMab (MedImmune, US2014/0348839), formatos de anticorpo de direção eletrostática (Amgen, EP1870459 e WO 2009089004; Chugai, US201000155133; Oncomed, WO2010129304A2); IgG1 e IgG2 biespecíficas (Rinat neurosciences Corporation, WO11143545), CrossMAbs (Roche, WO2011117329), LUZ-Y (Genentech), Biclonic (Merus, WO2013157953), anticorpos de domínio de alvejamento dual (GSK/Domantis), Anticorpos dois em um ou Fabs de ação dual reconhecendo dois alvos (Genentech, NovImmune, Adimab), Mabs reticulados (Karmanos Cancer Center), mAbs covalentemente fundidos

(AIMM), CovX-body (CovX/Pfizer), FynomAbs (Covagen/Janssen ilag), DutaMab (Dutalys/Roche), iMab (MedImmune), Bispecíficos tipo IgG (ImClone/Eli Lilly, Shen, J., et al. J Immunol Methods, 2007. 318(1-2): p. 65-74), TIG-body, DIG-body e PIG-body (Pharmabcine), moléculas de realvejamento de afinidade dual (Fc-DART ou Ig-DART, pela Macrogenics, WO/2008/157379, WO/2010/080538), BEAT (Glenmark), Zybodies (Zyngenia), estratégias com cadeia leve comum (Crucell/ Merus, US7262028) ou cadeias pesadas common ($\kappa\lambda$ Bodies pela NovImmune, WO2012023053), assim como proteínas de fusão compreendendo uma sequência de polipeptídeo fundida a um fragmento de anticorpo contendo uma das fusões scFv semelhantes à região Fc, semelhante a BsAb pela ZymoGenetics/BMS, HERCULES pela Biogen Idec (US007951918), SCORPIONS pela Emergent BioSolutions/Trubion e Zymogenetics/BMS, Ts2Ab (MedImmune/AZ (Dimasi, N., *et al.* J Mol Biol, 2009. 393(3): p. 672-92), fusão de scFv pela Genetech/Roche, fusão de scFv pela Novartis, fusão de scFv pela Immunomedics, fusão de scFv pela Changzhou Adam Biotech Inc (CN 102250246), TvAb pela Roche (WO 2012025525, WO 2012025530), mAb² pela f-Star (WO2008/003116) e fusões de scFv duais. Também deve ser entendido que o termo anticorpo, a menos que de outro modo especificado, também inclui anticorpos policlonais, anticorpos monoclonais (tais como anticorpos monoclonais humanos), misturas de anticorpo (policlonais recombinantes) por exemplo gerados pelas tecnologias exploradas pela Symphogen and Merus (Oligoclonics), proteínas Fc multiméricas como descritas na WO2015/158867, proteínas como descritas na WO2014/031646 e polipeptídeos semelhantes a anticorpo, tais como anticorpos quiméricos e anticorpos humanizados. Um anticorpo como gerado pode potencialmente possuir qualquer isótipo.

[0091] O termo “anticorpo de comprimento completo” quando aqui usado, se refere a um anticorpo (por exemplo, um anticorpo precursor) que

contém todas as cadeias pesadas e leves constantes e domínios variáveis correspondendo àqueles que são normalmente encontrados em um anticorpo tipo selvagem deste isótipo.

[0092] O termo “anticorpo humano”, como aqui usado, é intencionado a incluir anticorpos tendo regiões variáveis e constantes derivadas das sequências de imunoglobulina da linha germinativa humana. Os anticorpos humanos da invenção podem incluir resíduos de aminoácido não codificados pelas sequências de imunoglobulina da linha germinativa humana (por exemplo, mutações, inserções ou deleções introduzidas pela mutagênese aleatória ou específica de sítio *in vitro* ou pela mutação somática *in vivo*). Entretanto, o termo “anticorpo humano”, como aqui usado, não é intencionado a incluir anticorpos em que as sequências de CDR derivadas da linha germinativa de uma outra espécie mamífera, tal como um camundongo, foram enxertadas nas sequências estruturais humanas.

[0093] O termo “anticorpo quimérico”, como aqui usado, se refere a um anticorpo em que ambos os tipos de cadeia isto é a cadeia pesada e a cadeia leve são quiméricas como um resultado de engenhejamento de anticorpo. Uma cadeia quimérica é uma cadeia que contém um domínio variável estranho (originando de uma espécie não humana ou sintética ou engenheirada a partir de qualquer espécie incluindo o ser humano) ligado a uma região constante de origem humana.

[0094] O termo “anticorpo humanizado, como aqui usado, se refere a um anticorpo em que ambos os tipos de cadeia são humanizados como um resultado de engenhejamento de anticorpo. Uma cadeia humanizada é tipicamente uma cadeia em que as regiões determinantes de complementaridade (CDR) dos domínios variáveis são estranhas (originando a partir de uma espécie outra que não a humana ou sintética) ao passo que o resto da cadeia é de origem humana. A avaliação da humanização está fundamentada na sequência de aminoácido resultante e não na metodologia

por si, que permite protocolos outros que não enxerto sejam usados.

[0095] Os termos “anticorpo monoclonal”, “Ab monoclonal”, “composição de anticorpo monoclonal”, “mAb” ou os semelhantes, como aqui usados se referem a uma preparação de moléculas Ab de composição molecular única. Uma composição de anticorpo monoclonal exibe uma especificidade e afinidade de ligação únicas para um epítipo particular. Consequentemente, o termo “anticorpo monoclonal humano” se refere a Abs demonstrando uma única especificidade de ligação que tenha regiões variáveis e constantes derivadas das sequências de imunoglobulina da linha germinativa humana. Os mAbs humanos podem ser gerados por um hibridoma que inclui uma célula B obtida a partir de um animal não humano transgênico ou transcromossômico, tal como um camundongo transgênico, tendo um genoma compreendendo um repertório de transgene da cadeia pesada e um repertório de transgene de cadeia leve humanos, rearranjados para produzir um anticorpo humano funcional e fundidos a uma célula imortalizada.

[0096] O termo “isótipo” como aqui usado, se refere à classe da imunoglobulina (por exemplo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA1, IgGA2, IgE ou IgM ou quaisquer alótipos da mesma tais como IgG1m(za) e IgG1m(f)) que são codificados pelos genes da região constante de cadeia pesada. Adicionalmente, cada isótipo de cadeia pesada pode ser combinado com uma cadeia leve capa (κ) ou lambda (λ). O termo “isótipo misto” aqui usado se refere à região Fc de uma imunoglobulina gerada pela combinação de traços estruturais de um isótipo com a região análoga de um outro isótipo gerando deste modo um isótipo híbrido. Um isótipo misto pode compreender uma região Fc tendo um sequência compreendida de dois ou mais isótipos selecionados a partir dos seguintes IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA1, IgGA2, IgE ou IgM gerando deste modo combinações tais como por exemplo, IgG1/IgG3, IgG1/IgG4, IgG2/IgG3, IgG2/IgG4 ou IgG1/IgA.

[0097] Os termos “região de ligação a antígeno”, “região de ligação a antígeno”, “região de ligação” ou domínio de ligação a antígeno, como aqui usados, se referem a uma região de um anticorpo que é capaz de se ligar ao antígeno. Esta região de ligação é tipicamente definida pelos domínios VH e VL do anticorpo que podem ser adicionalmente subdivididos em regiões de hipervariabilidade (ou regiões hipervariáveis que podem ser hipervariáveis na sequência e/ou forma de alças estruturalmente definidas), também chamadas de regiões determinantes de complementaridade (CDRs), intercaladas com regiões que são mais conservadas, chamadas de regiões de armação (FRs). O antígeno pode ser qualquer molécula, tal como um polipeptídeo, por exemplo, presente em uma célula, bactéria ou virion.

[0098] O termo “alvo”, como aqui usado, se refere a uma molécula à qual a região de ligação a antígeno do anticorpo se liga. O alvo inclui qualquer antígeno para o qual o anticorpo incitado é direcionado. Os termos “antígeno” e “alvo” podem em relação a um anticorpo ser usados intercambiavelmente e constituem o mesmo significado e propósito com respeito a qualquer aspecto ou modalidade da presente invenção.

[0099] O termo “epítopo” significa um determinante molecular capaz de ligação específica a um domínio variável de anticorpo. Os epítopos usualmente consistem de agrupamentos superficiais de moléculas tais como aminoácidos, cadeias laterais de açúcar ou uma combinação dos mesmos e usualmente têm características estruturais tridimensionais específicas, assim como características de carga específicas. Os epítopos conformacionais e não conformacionais são distinguidos em que a ligação ao primeiro, mas não ao último é perdida na presença de solventes desnaturantes. O epítopo pode compreender resíduos de aminoácido diretamente envolvidos na ligação (também chamados de componente imunodominante do epítopo) e outros resíduos de aminoácido, que não estejam diretamente envolvidos na ligação.

[00100] Um “anticorpo” ou “variante de anticorpo” ou uma “variante

de um anticorpo precursor” da presente invenção é uma molécula de anticorpo que compreende uma ou mais mutações quando comparado a um “anticorpo precursor”. Os termos diferentes podem ser usados intercambiavelmente e constituem o mesmo significado e propósito com respeito a qualquer aspecto ou modalidade da presente invenção. Os formatos de anticorpo precursor exemplares incluem, sem limitação, um anticorpo tipo selvagem, um anticorpo de comprimento completo ou fragmento de anticorpo contendo Fc, um anticorpo biespecífico, um anticorpo humano, anticorpo humanizado, anticorpo quimérico ou qualquer combinação dos mesmos. Os termos diferentes podem ser usados intercambiavelmente e constituem o mesmo significado ou propósito com respeito a qualquer aspecto ou modalidade da presente invenção. As substituições de aminoácido podem trocar um aminoácido nativo por um outro aminoácido de ocorrência natural ou por um derivado de aminoácido que não ocorra naturalmente. A substituição de aminoácido pode ser conservativa ou não conservativa. No contexto da presente invenção, as substituições conservativas podem ser definidas pelas substituições dentro das classes de aminoácidos refletidas em uma ou mais das seguintes três tabelas:

Classes de resíduo de aminoácido para substituições conservativas

Resíduos ácidos	Asp (D) e Glu (E)
Resíduos Básicos	Lys (K), Arg (R) e His (H)
Resíduos Hidrofílicos Não Carregados	Ser (S), Thr (T), Asn (N) e Gln (Q)
Resíduos Alifáticos Não Carregados	Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L) e Ile (I)
Resíduos Não Polares Não Carregados	Cys (C), Met (M) e Pro (P)
Resíduos Aromáticos	Phe (F), Tyr (Y) e Trp (W)

Classes de substituição de resíduo de aminoácido conservativo alternativo

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

Classificações Físicas e Funcionais Alternativas de Resíduos de Aminoácido

Resíduos contendo grupo álcool	S e T
Resíduos alifáticos	I, L, V e M
Resíduos associados com cicloalquenila	F, H, W e Y
Resíduos hidrofóbicos	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W e Y
Resíduos negativamente carregados	D e E
Resíduos polares	C, D, E, H, K, N, Q, R, S e T
Resíduos positivamente carregados	H, K e R
Resíduos pequenos	A, C, D, G, N, P, S, T e V
Resíduos muito pequenos	A, G e S
Resíduos envolvidos na formação de volta	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P e T
Resíduos flexíveis	Q, T, K, S, G, N, D, E e R

[00101] No contexto da presente invenção, uma substituição em uma variante é indicada como:

Aminoácido original – posição – aminoácido substituído;

[00102] O código de três letras ou código de uma letra, são usados, incluindo os códigos Xaa e X para indicar resíduo de aminoácido. Consequentemente, a notação “E345R” ou “Glu345Arg” significa que a variante compreende uma substituição de Ácido glutâmico com Arginina na posição de aminoácido variante correspondendo ao aminoácido na posição 345 no precursor de anticorpo.

[00103] Onde uma posição como tal não esteja presente em um anticorpo, mas a variante compreende uma inserção de um aminoácido, por exemplo:

[00104] Posição –aminoácido substituído; a notação, por exemplo, “448E” é usada.

[00105] Tal notação é particularmente relevante em conexão com modificação(ões) em uma série de polipeptídeos ou anticorpos homólogos.

[00106] Similarmente quando a identidade da substituição de resíduo(s) de aminoácido é imaterial:

Aminoácido original – posição; ou “E345”.

[00107] Para uma modificação onde o(s) aminoácido(s) original(is) e/ou aminoácido(s) substituído(s) pode(m) compreender mais do que um, mas não todos os aminoácidos, a substituição de Ácido glutâmico para Arginina, Lisina ou Triptofano na posição 345:

“Glu345Arg,Lys,Trp” ou “E345R,K,W” ou “E345R/K/W” ou

“E345 para R, K ou W” podem ser usados intercambiavelmente no contexto da invenção.

[00108] Além disso, o termo “uma substituição” abrange uma substituição em qualquer um dos outros dezenove aminoácidos naturais ou dentro dos outros aminoácidos, tais como aminoácidos não naturais. Por exemplo, uma substituição do aminoácido E na posição 345 inclui cada uma das seguintes substituições: 345A, 345C, 345D, 345G, 345H, 345F, 345I, 345K, 345L, 345M, 345N, 345P, 345Q, 345R, 345S, 345T, 345V, 345W e 345Y. Isto é equivalente à designação 345X, em que o X designa qualquer aminoácido. Estas substituições também podem ser designadas E345A, E345C, etc. ou E345A,C, etc. ou E345A/C/etc. O mesmo se aplica à analogia a cada e toda posição aqui mencionada, para especificamente incluir aqui qualquer uma de tais substituições.

[00109] Como aqui usado, o termo “célula efetora” se refere a uma célula imune que está envolvida na fase efetora de uma resposta imune, como oposto às fases de reconhecimento e ativação de uma resposta imune. As células imunes exemplares incluem uma célula de uma origem mielóide ou linfóide, por exemplo linfócitos (tais como células B e células T incluindo células T citolíticas (CTLs)), células exterminadoras, células exterminadoras naturais, macrófagos, monócitos, eosinófilos, células polimorfonucleares, tais como neutrófilos, granulócitos, mastóides e basófilos. Algumas células efetoras expressam receptores Fc (FcRs) ou receptores de complemento e realizam funções imunes específicas. Em algumas modalidades, uma célula efetora tal como, por exemplo, uma célula exterminadora natural, é capaz de induzir ADCC. Por exemplo, monócitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células de Kupffer que expressam FcRs, estão envolvidas no extermínio específico de células alvo e apresentando antígenos para outros componentes do sistema imune ou ligação às células que apresentam antígenos. Em algumas modalidades a ADCC pode ser realçada

adicionalmente pela ativação de complemento clássica dirigida ao anticorpo resultando na deposição de fragmentos C3 ativados na célula alvo. Os produtos de clivagem C3 são ligantes para receptores de complemento (CRs), tais como CR3, expressos nas células mielóides. O reconhecimento de fragmentos de complemento pelas CRs nas células efetoras pode promover ADCC realçada mediada por receptor Fc. Em algumas modalidades a ativação de complemento clássica dirigida a anticorpo leva a fragmentos C3 na célula alvo. Estes produtos de clivagem C3 podem promover citotoxicidade celular dependente de complemento direta (CDCC). Em algumas modalidades, uma célula efetora pode fagocitar um antígeno alvo, partícula alvo ou célula alvo. A expressão de um receptor FcR ou de complemento particular em uma célula efetora pode ser regulada pelos fatores humorais tais como citocinas. Por exemplo, a expressão de FcγRI foi verificada ser suprarregulada pelo interferon γ (IFN γ) e/ou G-CSF. Esta expressão realçada aumenta a atividade citotóxica de células carregando FcγRI contra alvos. Uma célula efetora pode fagocitar um antígeno alvo ou fagocitar ou lisar uma célula alvo. Em algumas modalidades a ativação de complemento clássica dirigida a anticorpo leva aos fragmentos C3 na célula alvo. Estes produtos de clivagem C3 podem promover a fagocitose direta pelas células efetoras ou indiretamente pelo realce da fagocitose mediada por anticorpo.

[00110] Os termos “funções efetoras Fc,” ou “funções efetoras mediadas por Fc,” como aqui usados, são intencionados a se referir às funções que são uma consequência da ligação de um polipeptídeo ou anticorpo ao seu alvo, tal como um antígeno, em uma membrana celular em que a função efetora Fc é atribuível à região Fc do polipeptídeo ou anticorpo. Os exemplos de funções efetoras Fc incluem (i) ligação de C1q, (ii) ativação de complemento, (iii) citotoxicidade dependente de complemento (CDC), (iv) citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC), (v)

ligação de receptor Fc-gama, (vi) fagocitose celular dependente de anticorpo (ADCP), (vii) citotoxicidade celular dependente de complemento (CDCC), (viii) citotoxicidade realçada por complemento, (ix) receptor de ligação a complemento de um anticorpo opsonizado mediada pelo anticorpo, (x) opsonização e (xi) uma combinação de qualquer um de (i) a (x).

[00111] O termo “funções dependente de agrupamento,” como aqui usado, é intencionado a se referir às funções que são uma consequência da formação de complexos antigênicos depois da oligomerização de polipeptídeos ou anticorpos ligados aos seus antígenos, opcionalmente em uma célula, em uma membrana celular, em um virion ou em uma outra partícula. Os exemplos de funções efetoras dependentes de agrupamento incluem (i) formação de oligômero de anticorpo, (ii) estabilidade de oligômero de anticorpo, (iii) formação de oligômero de antígeno, (iv) estabilidade de oligômero de antígeno, (v) indução de apoptose, (vi) modulação de proliferação, tal como redução, inibição ou estimulação de proliferação e (vii) uma combinação de qualquer um de (i) a (vi).

[00112] O termo “agonístico”, como aqui usado, é entendido como estimulação ou ativação de um receptor em uma membrana celular resultando em uma resposta biológica tal como, sinalização intracelular. Um tal efeito agonístico resultaria na indução de apoptose (morte celular programada) ou ativação de células imunes ou ativação de um caminho intracelular.

[00113] A atividade agonística ou atividade agonística aumentada podem ser determinadas em um ensaio de viabilidade para anticorpos direcionados aos alvos expressando um domínio de morte intracelular, como descrito no Exemplo 16 usando as seguintes etapas de:

(i) semear uma linhagem de célula expressando um alvo correspondendo a um anticorpo por exemplo, DR5 em placa de fundo chato de 96 poços de poliestireno durante a noite a 37°C,

(ii) adicionar uma diluição serial do anticorpo por exemplo,

um anticorpo anti-DR5 em uma faixa (0,0003 a 20.000 ng/mL) e incubar por 3 dias a 37°C,

(iii) determinar a viabilidade celular pela quantificação da presença de ATP por exemplo, pelo uso do ensaio de viabilidade celular luminescente CellTiter-Glo,

(iv) calcular as células viáveis usando a seguinte fórmula: % de células viáveis = [(amostra de anticorpo com luminescência – amostra de estaurosporina com luminescência)/(amostra de anticorpo sem luminescência – amostra de estaurosporina com luminescência)]*100.

[00114] A atividade agonística ou atividade agonística aumentada pode ser determinada em um ensaio repórter para anticorpos direcionados aos alvos ativando o caminho da sinalização intracelular, como descrito no Exemplo 29, 30, 31 e 32 usando as seguintes etapas de:

(i) semear células Jurkat estavelmente transfectadas com o alvo e um gene repórter da luciferase a jusante de um elemento de resposta NFAT expressando, as células são incubadas em uma placa de fundo chato de 96 poços durante a noite a 37°C,

(ii) adicionar uma diluição serial do anticorpo por exemplo, um anticorpo em uma faixa por exemplo, 19,5 a 5.000 ng/mL e incubar por 5 horas,

(iii) adicionar um substrato de luciferase de vagalume (5'-fluoroluciferina) às células e incubar por 5 a 10 minutos,

(iv) determinar a luminescência usando uma leitora Envision MultiLable Plate.

[00115] O termo “vetor,” como aqui usado, é intencionado a se referir a uma molécula de ácido nucléico capaz de induzir a transcrição de um segmento de ácido nucléico ligado dentro do vetor. Um tipo de vetor é um “plasmídeo”, que está na forma de uma alça de DNA de filamento duplo. Um outro tipo de vetor é um vetor viral, em que o segmento de ácido nucléico

pode ser ligado dentro do genoma viral. Certos vetores são capazes de replicação autônoma em uma célula hospedeira dentro da qual eles são introduzidos (por exemplo vetores bacterianos tendo uma origem bacteriana de replicação e vetores mamíferos epissômicos). Outros vetores (tais como vetores mamíferos não epissômicos) podem ser integrados dentro do genoma de uma célula hospedeira na introdução dentro da célula hospedeira e deste modo são replicados junto com o genoma hospedeiro. Além disso, certos vetores são capazes de direcionar a expressão de genes aos quais eles estão operativamente ligados. Tais vetores são aqui aludidos como “vetores de expressão recombinantes” (ou simplesmente, “vetores de expressão”). No geral, os vetores de expressão de utilidade nas técnicas de DNA recombinante estão frequentemente na forma de plasmídeos. No presente relatório descritivo, “plasmídeo” e “vetor” podem ser usados intercambiavelmente visto que o plasmídeo é a forma mais habitualmente usada de vetor. Entretanto, a presente invenção é intencionada a incluir tais outras formas de vetores de expressão, tais como vetores virais (tais como retrovírus defeituosos de replicação, adenovírus e vírus adenoassociado), que serve para funções equivalentes.

[00116] O termo “célula hospedeira recombinante” (ou simplesmente “célula hospedeira”), como aqui usado, é intencionado a se referir a uma célula dentro da qual um vetor de expressão foi introduzido. Deve ser entendido que tais termos são intencionados a se referir não apenas à célula objeto particular, mas também à progênie de uma tal célula. Porque certas modificações podem ocorrer nas gerações sucessoras devido à mutação ou influências ambientais, tal progênie, de fato, pode não ser idêntica à célula precursora, mas está ainda incluída dentro do escopo do termo “célula hospedeira” como aqui usado. As células hospedeiras recombinantes incluem, por exemplo, transfectomas, tais como células CHO, células HEK-293, PER.C6, células NS0 e células linfocíticas e células procarióticas tais como *E.*

coli e outros hospedeiros eucarióticos tais como células vegetais e fungos.

[00117] O termo “transfectoma”, como aqui usado, inclui células hospedeiras eucarióticas recombinantes expressando o Ab ou um antígeno alvo, tal como células CHO, PER.C6, células NS0, células HEK-293, células vegetais ou fungos, incluindo células de levedura.

[00118] O termo “preparação” se refere às preparações de variantes de anticorpo e misturas de variantes de anticorpo diferentes que podem ter uma capacidade aumentada para formar oligômeros quando da interação com antígeno associado com uma célula (por exemplo, um antígeno expresso na superfície da célula), uma membrana celular, um virion ou outra estrutura, que possa resultar na sinalização e/ou ativação realçadas pelo antígeno.

[00119] Como aqui usado, o termo “afinidade” é a força de ligação de uma molécula, por exemplo, um anticorpo, a uma outra, por exemplo, um alvo ou antígeno, em um único sítio, tal como a ligação monovalente de um sítio de ligação de antígeno individual de um anticorpo a um antígeno.

[00120] Como aqui usado, o termo “avidez” se refere à força combinada de sítios de ligação múltiplos entre duas estruturas, tal como entre sítios de ligação de antígeno múltiplos de anticorpos simultaneamente interagindo com um alvo ou por exemplo, entre anticorpo e C1q. Quando mais do que uma interação de ligação estão presentes, as duas estruturas apenas dissociar-se-ão quando todos os sítios de ligação se dissociarem e assim, a taxa de dissociação será mais lenta do que para os sítios de ligação individuais e deste modo prover uma força de ligação total eficaz (avidez) maior comparados com a força de ligação dos sítios de ligação individuais (afinidade).

[00121] Como aqui usado, o termo “oligômero” se refere a uma molécula que consiste em mais do que um mas um número limitado de unidades monoméricas (por exemplo, anticorpos) ao contrário de um polímero que, pelo menos em princípio, consiste em um número ilimitado de

monômeros. Os oligômeros exemplares são dímeros, trímeros, tetrâmeros, pentâmeros e hexâmeros. Prefixos gregos são frequentemente usados para designar o número de unidades monoméricas no oligômero, por exemplo um tetrâmero sendo composto de quatro unidades e um hexâmero de seis unidades.

[00122] O termo “oligomerização”, como aqui usado, é intencionado a se referir a um processo que converte monômeros a um grau finito de polimerização. Aqui, é observado, que, os anticorpos compreendendo regiões de ligação alvo de acordo com a invenção podem formar oligômeros, tais como hexâmeros, via associação não covalente de regiões Fc depois da ligação alvo, por exemplo, em uma superfície celular. No contexto do presente pedido, “própria oligomerização” ou “auto-oligomerização” é intencionado a se referir a um processo de oligomerização entre moléculas de anticorpo que têm sequências de proteína idênticas desconsiderando as modificações pós-traducionais. O termo “hetero-oligomerização”, como aqui usado, é intencionado a se referir a um processo de oligomerização entre moléculas de anticorpo que tenham sequências de proteína diferentes desconsiderando as modificações pós-traducionais. Anticorpos diferentes participando na hetero-oligomerização poderia por exemplo ligar antígenos diferentes, tais como proteínas alvo diferentes, glicoproteínas, glicanos ou glicolipídeos.

[00123] Os termos “substituição inibidora da auto-oligomerização” ou ““substituição inibidora da própria oligomerização”” são intencionados a se referir a uma substituição em um anticorpo compreendendo uma região Fc de uma imunoglobulina e uma região de ligação a antígeno, que iniba o processo de oligomerização entre as moléculas de anticorpo que tenham sequências de proteína idênticas desconsiderando as modificações pós-traducionais. A inibição da própria oligomerização pode por exemplo resultar em uma EC50 aumentada de atividade da CDC ou uma redução na atividade de lise de CDC

máxima do polipeptídeo, medida de acordo com os métodos descritos nos exemplos 2 e 15. Os exemplos de substituições inibidoras da auto-oligomerização são K439E e S440K.

[00124] O termo “agrupamento”, como aqui usado, é intencionado a se referir à oligomerização de anticorpos, polipeptídeos, antígenos ou outras proteínas através de interações não covalentes.

[00125] O termo “realçar Fc-Fc”, como aqui usado, é intencionado a se referir a aumentar a força de ligação entre ou estabilizar a interação entre, as regiões Fc de dois anticorpos ou polipeptídeos contendo região Fc de modo que os polipeptídeos formem oligômeros na ligação alvo.

[00126] As substituições realçadoras de Fc-Fc, como aqui usado se referem às substituições nas seguintes posições correspondendo à IgG1 humana de acordo com a numeração EU E430, E345 ou S440 com a condição de que as substituições na posição S440 é S440Y ou S440W. Assim, as substituições realçadoras de Fc-Fc como aqui usadas se referem às seguintes substituições de aminoácido E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440W e S440Y. Em uma modalidade preferida a substituição realçadora de Fc-Fc é E430G, E345K ou E345R.

[00127] Quando aqui usado no contexto de dois antígenos, o termo “colocado” ou variações gramaticais do mesmo, é intencionado a se referir, por um lado, às situações onde os dois antígenos são coexpressos na mesma célula. Os antígenos podem já ser adjacentes entre si na célula ou os antígenos podem ser levados juntos por intermédio da oligomerização dos polipeptídeos de ligação, por exemplo, anticorpos, da invenção. Além disso, o termo “colocado” também é intencionado a se referir às situações em que os dois antígenos são expressos em células diferentes, mas em que tais células estão localizadas em proximidade imediata entre si.

[00128] O termo “codependente”, como aqui usado, é intencionado a se referir a um efeito funcional que é dependente da ligação simultânea de

dois ou mais polipeptídeos contendo domínios Fc diferentes com substituições inibidoras da auto-oligomerização ao mesmo alvo, célula ou virion. No contexto da presente invenção, os efeitos funcionais que podem ser codependentes incluem funções dependentes de agrupamento, funções efetoras mediadas por Fc e a ligação de moléculas efetoras tais como FcγR ou C1, mas não necessariamente a ligação individual de polipeptídeos contendo o domínio Fc aos seus antígenos alvos. Como aqui usado, polipeptídeos diferentes contendo o domínio Fc com substituições inibidoras da auto-oligomerização podem cada um individualmente ligar diferentes alvos, células ou virions, mas o resultado cofuncional codependente é dependente da ligação simultânea de dois ou mais componentes diferentes ao mesmo alvo, célula ou virion. Como aqui usado, efeitos funcionais codependentes são recuperados especificamente pelos dois ou mais polipeptídeos diferentes contendo o domínio Fc com substituições inibidoras da auto-oligomerização em virtude da restauração de interações Fc-Fc não covalentes entre componentes diferentes na mistura de polipeptídeo contendo Fc codependente.

[00129] O termo “margem de segurança”, como aqui usado, é intencionado a se referir ao índice da eficácia e segurança do fármaco e é definida como a faixa entre a dose terapêutica mínima (eficácia sobre o tecido doente) e a dose tóxica mínima (eficácia sobre tecido saudável) do fármaco.

[00130] O termo “ligação de C1q” como aqui usado, é intencionado a se referir à interação direta entre C1q e anticorpo. A ligação de C1q direta pode ser avaliada por exemplo pelo uso de anticorpo imobilizado sobre superfície artificial. A interação multivalente resultando em ligação de alta avidéz de C1q a um oligômero de anticorpo pode ser avaliada quando ligada a um antígeno predeterminado em uma superfície celular ou de virion.

[00131] A ligação de C1q a um polipeptídeo ou um anticorpo pode ser determinada em um ensaio ELISA usando as seguintes etapas i) revestir uma

placa de ELISA de 96 poços Microlon com o 1 µg/mL de polipeptídeo ou anticorpo em 100 µl de PBS a 4°C durante a noite, ii) incubar a placa com 100 µL/poço de um série de diluição serial de C1q, faixa de concentração de C1q final 30 a 0,01 µg/mL em diluições de 3 vezes por 1 h a 37°C, iii) incubar a placa com 100 µl/poço de C1q anti-ser humano de coelho por 1 h na RT, iv) incubar a placa com 100 µl/poço de IgG-HRP anticoelho de suíno por 1 h na RT, v) incubar a placa com 100 µL/poço de substrato com 1 mg/mL de 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico) por 15 min na RT, vi) a reação é interrompida pela adição de 100 µL de ácido oxálico a 2%/poço. A absorbância é medida a 405 nm em uma leitora BioTek EL808 Microplate.

[00132] O termo substituição da ligação de C1q como aqui usado, é intencionado a se referir a uma substituição em um polipeptídeo compreendendo uma região Fc de uma imunoglobulina e uma região de ligação a antígeno, que realce a interação direta com C1q. A ligação de C1q realçada pode por exemplo resultar em uma EC50 diminuída da interação entre C1q e o polipeptídeo compreendendo uma região Fc de uma imunoglobulina e uma região de ligação a antígeno, medida de acordo com o Micro late método para determinar a ligação de C1q descrito acima.

[00133] Como aqui usado, o termo “ativação de complemento” se refere à ativação do caminho de complemento clássico, que é iniciada por um complexo macromolecular grande chamado de complexos de anticorpo-antígeno de ligação C1 em uma superfície. C1 é um complexo, que consiste em 6 proteínas de reconhecimento de C1q e um heterotetrâmero de serina proteases, C1r2C1s2. C1 é o primeiro complexo de proteína nos eventos precoces da cascata de complemento clássico que envolve uma série de reações de clivagem que começa com a clivagem de C4 em C4a e C4b e C2 em C2a e C2b. C4b é depositado e forma junto com C2a uma convertase enzimática ativa chamada de C3 convertase, que cliva o componente de complemento C3 em C3b e C3a, que forma uma C5 convertase. Esta C5

convertase divide C5 em C5a e C5b e o último componente é depositado sobre a membrana e que por sua vez deflagra os últimos eventos de ativação do complemento em que os componentes de complemento de terminal C5b, C6, C7, C8 e C9 se agregam no complexo de ataque à membrana (MAC). A cascata de complemento resulta na criação de poros na membrana celular que causa a lise da célula, também conhecida como citotoxicidade dependente de complemento (CDC). A ativação de complemento pode ser avaliada pelo uso da eficácia C1q, cinéticas de CDC ensaios de CDC (como descrito na WO2013/004842, WO2014/108198) ou pelo método da deposição celular de C3b e C4b descrito em Beurskens *et al.* no Journal of Immunology, 2012 vol. 188 no. 7, 1 de abril, 3532-3541.

[00134] O termo “citotoxicidade dependente de complemento” (“CDC”), como aqui usado, é intencionado a se referir ao processo de ativação de complemento mediada por anticorpo levando à lise da célula ou virion quando o anticorpo ligado ao seu alvo em uma célula ou virion como um resultado de poros na membrana que são criados pela montagem de MAC.

[00135] O termo “citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo” (“ADCC”) como aqui usado, é intencionado a se referir a um mecanismo de extermínio de células alvo ou virions revestidos com anticorpo de pelas células expressando receptores de Fc que reconhecem a região constante do anticorpo ligado. O termo “fagocitose celular dependente de anticorpo” (“ADCP”) como aqui usado é intencionado a se referir a um mecanismo de eliminação de células alvo ou virions revestidos com anticorpo pela internalização pelos fagócitos. As células alvo ou virions revestidos com anticorpo internalizados estão contidos em uma vesícula chamada um fagossoma, que depois funde com um ou mais lisossomos para formar um fagolisossoma. A ADCP pode ser avaliada pelo uso de um ensaio de citotoxicidade *in vitro* com macrófagos como células efectoras e microscopia com vídeo como descrito por van Bij *et al.* no Journal of Hepatology Volume

53, Edição 4, outubro de 2010, Páginas 677–685.

[00136] O termo “citotoxicidade celular dependente de complemento” (“CDCC”) como aqui usado é intencionado a se referir a um mecanismo do extermínio de células alvo ou virions pelas células expressando receptores de complemento que reconhecem produtos de clivagem do complemento 3 (C3) que são covalentemente ligados às células alvo ou virions como um resultado da ativação de complemento mediada por anticorpo. A CDCC pode ser avaliada em uma maneira similar como descrita para ADCC.

[00137] O termo “meia-vida plasmática” como aqui usado indica o tempo que leva para reduzir a concentração de polipeptídeo no plasma sanguíneo à metade da sua concentração inicial durante a eliminação (depois da fase de distribuição). Para anticorpos a fase de distribuição tipicamente será de 1 a 3 dias durante esta fase existe cerca de 50% de diminuição na concentração plasmática sanguínea devido à redistribuição entre plasma e tecidos. A meia-vida plasmática pode ser medida pelos métodos bem conhecidos na técnica.

[00138] O termo “taxa de depuração plasmática” como aqui usado é uma medida quantitativa da taxa na qual um polipeptídeo é removido do sangue na administração a um organismo vivo. A taxa de depuração plasmática pode ser calculada como a dose/AUC (mL/dia/kg), em que o valor AUC (área sob a curva) é determinado a partir de uma curva de concentração-tempo.

[00139] O termo “conjugado de anticorpo-fármaco”, como aqui usado se refere a um anticorpo ou polipeptídeo contendo Fc tendo especificidade para pelo menos um tipo de célula maligna, um fármaco e um ligador acoplando o fármaco por exemplo, ao anticorpo. O ligador é clivável ou não clivável na presença da célula maligna; em que o conjugado de anticorpo-fármaco extermina a célula maligna.

[00140] O termo “absorção de conjugado anticorpo-fármaco”, como

aqui usado se refere ao processo no qual os conjugados de anticorpo-fármaco são ligados a um alvo em uma célula seguido pela absorção/engolfamento pela membrana celular e deste modo são arrastados para dentro da célula. A absorção de conjugado de anticorpo-fármaco pode ser avaliada como “internalização e extermínio de célula mediados por anticorpo pelo ADC anti-TF em um ensaio de extermínio *in vitro*” como descrito na WO 2011/157741.

[00141] O termo “apoptose”, como aqui usado se refere ao processo de morte celular programada (PCD) que pode ocorrer em uma célula. Eventos bioquímicos levam a mudanças de célula características (morfologia) e morte. Estas mudanças incluem formação de bolhas, encolhimento da célula, fragmentação nuclear, condensação da cromatina e fragmentação do DNA cromossômico. A ligação de um anticorpo a um certo receptor pode induzir a apoptose.

[00142] O termo “morte de célula programada” ou “PCD”, como aqui usado se refere à morte de uma célula em qualquer forma mediada por um programa intracelular. Formas diferentes de PCD existem, os vários tipos de PCD têm em comum que elas são executadas pelos processos celulares ativos que podem ser interceptados pela interferência com a sinalização intracelular. Em uma modalidade particular, a ocorrência de qualquer forma de PCD em uma célula ou tecido pode ser determinada pelo tingimento da célula ou tecido com Anexina V conjugada, correlacionando-se com a exposição à fosfatidilserina.

[00143] O termo “Anexina V”, como aqui usado, se refere a uma proteína do grupo da anexina que liga fosfatidilserina (PS) na superfície celular.

[00144] O termo “FcRn”, como aqui usado é intencionado a se referir ao receptor Fc neonatal que é um receptor Fc. O mesmo foi primeiro verificado em roedores como um receptor único capaz de transportar IgG do leite materno através do epitélio intestinal de roedores recém nascidos para

dentro da corrente sanguínea do recém-nascido. Estudos adicionais revelaram um receptor similar nos seres humanos. Nos seres humanos, entretanto, o mesmo é encontrado na placenta para ajudar a facilitar o transporte de IgG da mãe para o feto em crescimento e também foi mostrado desempenhar um papel no monitoramento da metabolização de IgG. FcRn liga IgG no pH ácido de 6,0 a 6,5, mas não no pH neutro ou mais alto. Por exemplo, FcRn pode ligar IgG do lúmen intestinal (o lado de dentro do intestino) em um pH levemente ácido e garantir transporte eficiente unidirecional para o lado basolateral (dentro do corpo) onde o pH é de neutro para básico (pH 7,0 a 7,5). Este receptor também desempenha um papel na recuperação de IgG no adulto através da sua ocorrência no caminho da endocitose nas células endoteliais. Os receptores de FcRn nos endossomas ácidos se ligam ao IgG internalizado através da pinocitose, revelando os mesmos para a superfície celular, liberando os mesmos no pH básico do sangue, evitando deste modo que sofram a degradação lisossômica. Este mecanismo pode prover uma explicação para a meia-vida maior da IgG no sangue comparada a outros isótipos.

[00145] O termo “Proteína A”, como aqui usado é intencionado a se referir a uma proteína de superfície MSCRAMM de 56 kDa originalmente encontrada na parede celular da bactéria *Staphylococcus aureus*. A mesma é codificada pelo gene *spa* e a sua regulação é controlada pela topologia de DNA, osmolaridade celular e um sistema de dois componentes chamado de ArlS-ArlR. A mesma encontrou uso na pesquisa bioquímica por causa da sua capacidade para ligar imunoglobulinas. A mesma é composta de cinco domínios de ligação de Ig homólogos que duplicam em um feixe de três hélices. Cada domínio é capaz de ligar proteínas de muitas espécies de mamífero, mais notavelmente IgGs. A mesma liga a região Fc de cadeia pesada da maioria das imunoglobulinas (sobrepondo o sítio de ligação conservado de receptores FcRn) e também interage com a região Fab da

família de VH3 humana. Através destas interações no soro, as moléculas de IgG se ligam às bactérias por intermédio da sua região Fc ao invés de unicamente por intermédio das suas regiões Fab, pelas quais as bactérias rompem a opsonização, a ativação de complemento e a fagocitose.

[00146] O termo “Proteína G”, como aqui usado é intencionado a se referir a uma proteína de ligação de imunoglobulina expressa nas bactérias *Streptocócicas* do grupo C e G muito semelhantes à Proteína A mas com especificidades diferentes. A mesma é uma proteína de superfície celular de 65 kDa (proteína G G148) e uma de 58 kDa (proteína C40 G) que tem encontrado aplicação na purificação de anticorpos através da sua ligação à região Fc.

Modalidades específicas da invenção

[00147] Como aqui descrito, em um primeiro aspecto, a invenção se refere a um primeiro anticorpo para o uso como um medicamento em combinação com um segundo anticorpo, em que a atividade do primeiro e segundo anticorpos é codependente e o primeiro anticorpo tem uma região Fc tendo um realçador de Fc-Fc, uma substituição inibidora da auto-oligomerização e uma ou mais substituições que reduzem funções efectoras tais como CDC e/ou ADCC e o segundo anticorpo tem uma região Fc tendo um realçador de Fc-Fc, substituição inibidora da auto-oligomerização e opcionalmente uma ou mais substituições que realçam as funções efectoras Fc tais como CDC e/ou ADCC. Assim, uma tal combinação de um primeiro e um segundo anticorpos onde o efeito do primeiro anticorpo é dependente da presença do segundo anticorpo e o efeito do segundo anticorpo é dependente da presença do primeiro anticorpo pode aumentar a margem de segurança para o uso de uma tal combinação de um primeiro e segundo anticorpos.

[00148] Como mostrado pelos inventores da presente invenção um primeiro anticorpo que tenha uma região Fc tendo uma substituição realçadora de Fc-Fc e uma ou mais substituições que reduzam as funções

efetoras tais como CDC e/ou ADCC e uma substituição complementar inibidora da auto-oligomerização não mostram nenhuma ou apenas atividade da CDC muito limitada quando usadas como um único anticorpo. Similarmente um segundo anticorpo de acordo com a invenção que tenha uma região Fc tendo uma substituição realçadora de Fc-Fc e uma ou mais substituições que realcem as funções efetoras Fc tais como CDC e/ou ADCC e uma substituição complementar inibidora da auto-oligomerização mostra apenas uma atividade da CDC limitada quando usado como um único anticorpo. Entretanto, surpreendentemente a combinação de um primeiro e um segundo anticorpos de acordo com a invenção é capaz de restaurar o nível da CDC induzido enquanto os agentes únicos não mostrassem nenhuma ou capacidade limitada para induzir CDC.

[00149] Em um aspecto a presente invenção provê um primeiro anticorpo compreendendo uma primeira região Fc de uma IgG humana e uma primeira região de ligação a antígeno capaz de se ligar a um primeiro antígeno, para o uso como um medicamento em combinação com um segundo anticorpo compreendendo uma segunda região Fc de uma IgG humana e uma segunda região de ligação a antígeno capaz de se ligar a um segundo antígeno, em que a dita primeira região Fc compreende

a. uma substituição de um aminoácido em uma posição selecionada a partir do grupo consistindo em: E430, E345 e S440, com a condição de que a substituição em S440 seja S440Y ou S440W, e

b. uma substituição K439E ou S440K, com a condição de que a substituição não seja S440K se a substituição em (a) for S440Y ou S440W, e

c. uma ou mais substituições de aminoácido selecionadas a partir do grupo consistindo em: L234, L235, G237, G236 ou uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: K322A e E269K;

e a dita segunda região Fc compreende

d. uma substituição de um aminoácido em uma posição selecionada a partir do grupo consistindo em: E430, E345 e S440, com a condição de que a substituição em S440 seja S440Y ou S440W e

e. uma substituição K439E ou S440K, com a condição de que a substituição não seja S440K se a substituição em (d) for S440Y ou S440W;

em que a primeira região Fc tem uma substituição K439E e a segunda região Fc tem uma substituição S440K ou a primeira região Fc tem uma substituição S440K e a segunda região Fc tem uma substituição K439E; em que as posições de aminoácido correspondem à IgG1 humana de acordo com o sistema de numeração EU.

[00150] Em um outro aspecto a presente invenção provê um primeiro anticorpo compreendendo uma primeira região Fc de uma IgG humana e uma primeira região de ligação a antígeno capaz de se ligar a um primeiro antígeno, para o uso como um medicamento em combinação com um segundo anticorpo compreendendo uma segunda região Fc de uma IgG humana e uma segunda região de ligação a antígeno capaz de se ligar a um segundo antígeno, em que a dita primeira região Fc compreende

a. uma substituição de um aminoácido em uma posição selecionada a partir do grupo consistindo em: E430, E345 e S440, com a condição de que a substituição em S440 seja S440Y ou S440W, e

b. uma substituição K439E ou S440K, com a condição de que a substituição não seja S440K se a substituição em (a) for S440Y ou S440W, e

c. uma substituição de aminoácido na posição G237 ou uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: G236R, G236K, K322A, E269K, K322E, P329R, L234A, L234F, L235A, L235Q e L235E;

e a dita segunda região Fc compreende

d. uma substituição de um aminoácido em uma posição selecionada a partir do grupo consistindo em: E430, E345 e S440, com a condição de que a substituição em S440 seja S440Y ou S440W e

e. uma substituição K439E ou S440K, com a condição de que a substituição não seja S440K se a substituição em (d) for S440Y ou S440W e

f. uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: K326A, K326W, E333A e E333S se a primeira região Fc compreende uma substituição K322E ou P329R;

em que a primeira região Fc tem uma substituição K439E e a segunda região Fc tem uma substituição S440K ou a primeira região Fc tem uma substituição S440K e a segunda região Fc tem uma substituição K439E; em que as posições de aminoácido correspondem à IgG1 humana de acordo com o sistema de numeração EU (Edelman *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A. maio de 1969; 63(1): 78-85; Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edição. 1991 Publicação NIH No. 91-3242).

[00151] Em um aspecto a presente invenção provê um primeiro anticorpo compreendendo uma primeira região Fc de uma IgG humana e uma primeira região de ligação a antígeno capaz de se ligar a um primeiro antígeno, para o uso como um medicamento em combinação com um segundo anticorpo compreendendo uma segunda região Fc de uma IgG humana e uma segunda região de ligação a antígeno capaz de se ligar a um segundo antígeno, em que a dita primeira região Fc compreende

a. uma substituição de um aminoácido em uma posição selecionada a partir do grupo consistindo em: E430, E345 e S440, com a condição de que a substituição em S440 seja S440Y ou S440W, e

b. uma substituição K439E ou S440K, com a condição de que a substituição não seja S440K se a substituição em (a) for S440Y ou S440W, e

c. uma substituição de aminoácido na posição G237 ou uma ou

mais substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: G236R, G236K, K322A, E269K, L234A, L234F, L235A, L235Q e L235E;

e a dita segunda região Fc compreende

d. uma substituição de um aminoácido em uma posição selecionada a partir do grupo consistindo em: E430, E345 e S440, com a condição de que a substituição em S440 seja S440Y ou S440W e

e. uma substituição K439E ou S440K, com a condição de que a substituição não seja S440K se a substituição em (d) for S440Y ou S440W;

em que a primeira região Fc tem uma substituição K439E e a segunda região Fc tem uma substituição S440K ou a primeira região Fc tem uma substituição S440K e a segunda região Fc tem uma substituição K439E; em que as posições de aminoácido correspondem à IgG1 humana de acordo com o sistema de numeração EU.

[00152] Em um aspecto a presente invenção provê um primeiro anticorpo compreendendo uma primeira região Fc de uma IgG humana e uma primeira região de ligação a antígeno capaz de se ligar a um primeiro antígeno, para o uso como um medicamento em combinação com um segundo anticorpo compreendendo uma segunda região Fc de uma IgG humana e uma segunda região de ligação a antígeno capaz de se ligar a um segundo antígeno, em que a dita primeira região Fc compreende

a. uma substituição de um aminoácido em uma posição selecionada a partir do grupo consistindo em: E430, E345 e S440, com a condição de que a substituição em S440 seja S440Y ou S440W, e

b. uma substituição K439E ou S440K, com a condição de que a substituição não seja S440K se a substituição em (a) for S440Y ou S440W, e

c. uma substituição de aminoácido na posição P329 ou uma substituição K322E;

e a dita segunda região Fc compreende

d. uma substituição de um aminoácido em uma posição selecionada a partir do grupo consistindo em: E430, E345 e S440, com a condição de que a substituição em S440 seja S440Y ou S440W e

e. uma substituição K439E ou S440K, com a condição de que a substituição não seja S440K se a substituição em (d) for S440Y ou S440W e

f. uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: K326A, K326W, E333A e E333S;

em que a primeira região Fc tem uma substituição K439E e a segunda região Fc tem uma substituição S440K ou a primeira região Fc tem uma substituição S440K e a segunda região Fc tem uma substituição K439E; em que as posições de aminoácido correspondem à IgG1 humana de acordo com o sistema de numeração EU.

[00153] Uma substituição em uma posição correspondendo a E430, E345 ou uma substituição S440Y ou S440W é considerada uma substituição realçadora de Fc-Fc de acordo com a presente invenção, uma tal substituição introduz o efeito de interações Fc-Fc realçadas e oligomerização no polipeptídeo ou anticorpo. A oligomerização realçada ocorre quando a região de ligação a antígeno do anticorpo está ligada ao antígeno alvo correspondente. A oligomerização realçada gera oligômeros tais como por exemplo, hexâmeros. A geração de estruturas oligoméricas, tais como hexâmeros tem o efeito de aumentar funções efectoras Fc por exemplo, CDC pelo aumento da Avidéz de ligação a C1q do polipeptídeo.

[00154] Em uma modalidade o primeiro anticorpo compreende no máximo uma substituição em uma posição correspondendo a E430, E345 ou uma substituição S440Y ou S440W. Em uma modalidade o segundo anticorpo compreende no máximo uma substituição em uma posição correspondendo a E430, E345 ou uma substituição S440Y ou S440W. Assim, em uma modalidade a região Fc compreende no máximo uma substituição em uma posição correspondendo a E430, E345 ou uma substituição S440Y ou

S440W. Em uma modalidade da invenção a primeira região Fc e a segunda região Fc compreendem uma substituição selecionada a partir do grupo consistindo em: E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440W e S440Y. Assim, em uma modalidade a primeira região Fc pode ter uma substituição E430G e a segunda região Fc pode ter uma substituição E345K. Em uma outra modalidade a primeira região Fc pode ter uma substituição E345K e o segundo anticorpo pode ter uma substituição E430G. A substituição na primeira e na segunda regiões Fc pode ser selecionada independentemente das substituições do grupo de realçador de Fc-Fc.

[00155] Em uma modalidade da invenção a primeira e segunda regiões Fc compreendem uma substituição selecionada a partir do grupo consistindo em: E430G, E345K e E345R.

[00156] Em uma modalidade da invenção a primeira e segunda regiões Fc compreendem uma substituição E430G. Em uma modalidade da invenção a primeira e segunda regiões Fc compreendem uma substituição E345K. Em uma modalidade da invenção a primeira e segunda regiões Fc compreendem uma substituição E345R. Em uma modalidade da invenção a primeira e segunda regiões Fc compreendem uma substituição S440Y.

[00157] A primeira e a segunda regiões Fc compreendem adicionalmente uma substituição K439E ou uma S440K que são consideradas substituições complementares inibidoras da auto-oligomerização de acordo com a presente invenção. Isto é um primeiro anticorpo tendo por exemplo uma K439E pode não formar oligômeros com um outro anticorpo tendo uma substituição K439E, entretanto um anticorpo tendo uma substituição K439E pode formar oligômeros com um outro anticorpo tendo uma substituição S440K. Um anticorpo tendo uma substituição S440K pode não formar oligômeros com um outro anticorpo tendo uma substituição S440K, mas pode formar oligômeros com um anticorpo tendo uma substituição K439E. Assim,

em uma modalidade da invenção a primeira região Fc compreende uma substituição K439E e a segunda região Fc compreende uma substituição S440K. Em uma modalidade da invenção a primeira região Fc compreende uma substituição S440K e a segunda região Fc compreende uma substituição K439E. Quando uma região Fc compreende uma substituição de inibição da oligomerização S440K então a região Fc pode não compreender uma substituição S440Y ou S440W realçadora de Fc-Fc. Assim, uma região Fc tendo uma substituição de inibição da oligomerização S440K pode ter uma substituição realçadora de Fc-Fc em uma posição de aminoácido correspondendo a E430 ou E345.

[00158] Em um outro aspecto a presente invenção provê um primeiro anticorpo compreendendo uma primeira região Fc de uma IgG humana e uma primeira região de ligação a antígeno capaz de se ligar a um primeiro antígeno, para o uso como um medicamento em combinação com um segundo anticorpo compreendendo uma segunda região Fc de uma IgG humana e uma segunda região de ligação a antígeno capaz de se ligar a um segundo antígeno, em que a dita primeira região Fc compreende

- a. uma substituição K248E e uma T437R, e
- b. uma substituição K439E ou S440K, e
- c. uma substituição de aminoácido na posição G237 ou P329

ou uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: G236R, G236K, K322A, K332E, E269K, L234A, L234F, L235A, L235Q e L235E;

e a dita segunda região Fc compreende

- d. uma substituição K248E e uma T437R e
- e. uma substituição K439E ou S440K,

em que a primeira região Fc tem uma substituição K439E e a segunda região Fc tem uma substituição S440K ou a primeira região Fc tem uma substituição S440K e a segunda região Fc tem uma substituição K439E;

em que as posições de aminoácido correspondem à IgG1 humana de acordo com o sistema de numeração EU.

[00159] Uma substituição realçadora de Fc-Fc em uma posição correspondendo a E430, E345 ou uma substituição S440Y ou S440W de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui, podem ser substituídas no lugar das seguintes duas substituições T248E e T437R.

[00160] Em uma modalidade da invenção a primeira região Fc compreende uma substituição que reduz funções efectoras tais como CDC e/ou ADCC. Assim, em uma modalidade da invenção a primeira região Fc compreende uma substituição que reduz CDC. Em uma modalidade da invenção a primeira região Fc compreende uma substituição que reduz ADCC. Em uma modalidade da invenção a primeira região Fc compreende uma substituição que reduz CDC e ADCC.

[00161] Em uma modalidade da invenção a primeira região Fc compreende uma substituição de aminoácido na posição G237. Uma substituição na posição de aminoácido G237 pode ter o efeito de reduzir a capacidade dos anticorpos para induzir CDC. Por meio disto modalidades são providas em que a primeira região Fc compreende uma substituição que além de reduzir a atividade da CDC também pode reduzir a ligação ao receptor de Fc-gama e deste modo as funções efectoras mediadas pelo receptor de Fc-gama.

[00162] Em uma modalidade da invenção a primeira região Fc compreende uma substituição selecionada a partir do grupo consistindo em: G237A, G237T, G237Q, G237R, G237S, G237N, G237D, G237E, G237K, G237V, G237M, G237I, G237L, G237H, G237F, G237Y, G237W e G237P.

[00163] Os inventores verificaram que pela substituição da glicina na posição correspondendo a 237 na IgG1 humana, com aminoácido tal como alanina, treonina, glutamina ou arginina que representam as várias classes de aminoácidos de ocorrência natural a capacidade do anticorpo para induzir

CDC foi reduzida. Assim, acredita-se que qualquer substituição de G237 com um outro aminoácido natural reduzirá a capacidade dos anticorpos para induzir CDC. Uma substituição na posição de aminoácido G237 pode reduzir a capacidade de um anticorpo tendo uma substituição realçadora de Fc-Fc e uma substituição inibidora da auto-oligomerização para induzir CDC por si só.

[00164] Em uma modalidade da invenção a primeira região Fc compreende uma substituição selecionada a partir do grupo consistindo em: G237T, G237A, G237Q e G237R. Em uma modalidade a primeira região Fc compreende uma substituição G237T. Em uma modalidade da invenção a primeira região Fc compreende uma substituição G237A. Em uma modalidade da invenção a primeira região Fc compreende uma substituição G237S. Em uma modalidade da invenção a primeira região Fc compreende uma substituição G237Q. Em uma modalidade da invenção a primeira região Fc compreende uma substituição G237R.

[00165] Em uma modalidade da invenção a primeira região Fc compreende uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: G236R, G236K, E269K e P329R. Em uma modalidade da invenção a primeira região Fc compreende uma substituição L234F e uma L235E. Por meio disto modalidades são providas em que a primeira região Fc compreende uma substituição que além de reduzir a atividade da CDC também pode reduzir a ligação ao receptor de Fc-gama e deste modo as funções efetoras mediadas pelo receptor de Fc-gama.

[00166] Em uma modalidade da invenção a primeira região Fc compreende uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: G236R, G236K e E269K. Em uma modalidade da invenção a primeira região Fc compreende uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: G236R e E269K. Em uma modalidade da invenção a primeira região Fc compreende uma substituição G263R ou uma

G236K. Em uma modalidade da invenção a primeira região Fc compreende uma substituição G236R. Em uma modalidade da invenção a primeira região Fc compreende uma substituição G236K. Em uma modalidade da invenção a primeira região Fc compreende uma substituição G269K.

[00167] Em uma modalidade da invenção a primeira região Fc compreende uma substituição selecionada a partir do grupo consistindo em: K322A e K322E. Por meio disto modalidade é provida em que a primeira região Fc compreende uma substituição que pode reduzir a capacidade dos anticorpos para induzir a atividade da CDC enquanto retém a capacidade dos anticorpos para ligar receptores de Fc-gama.

[00168] Em uma modalidade da invenção a primeira região Fc compreende uma substituição K322A.

[00169] Em uma modalidade da invenção a primeira região Fc compreende uma substituição K322E.

[00170] Em uma modalidade da invenção a primeira região Fc compreende uma substituição de aminoácido na posição P329.

[00171] Em uma modalidade da invenção a primeira região Fc compreende uma substituição selecionada a partir do grupo consistindo em: P329R, P329K, P329E, P329D e P329A. Em uma modalidade da invenção a primeira região Fc compreende uma substituição P329R. Em uma modalidade da invenção a primeira região Fc compreende uma substituição P329R. Em uma modalidade da invenção a primeira região Fc compreende um P329K substituição. Em uma modalidade da invenção a primeira região Fc compreende um P329E substituição. Em uma modalidade da invenção a primeira região Fc compreende um P329D substituição. Em uma modalidade da invenção a primeira região Fc compreende um P329A substituição.

[00172] Por meio disto modalidades são providas em que o primeiro anticorpo compreende uma primeira região Fc que tem uma substituição realçadora de Fc-Fc que introduz o efeito de interações Fc-Fc realçadas e

oligomerização do anticorpo. A oligomerização realçada ocorre quando a região de ligação a antígeno do anticorpo é ligada ao antígeno alvo correspondente. A oligomerização realçada gera oligômeros tais como por exemplo, hexâmeros. A geração de estruturas oligoméricas, tais como hexâmeros tem o efeito de aumentar as funções efetoras Fc por exemplo, CDC pelo aumento da avidéz de ligação a C1q do anticorpo. Entretanto, pela introdução de uma substituição inibidora da auto-oligomerização e uma substituição que reduza as funções efetoras tais como CDC e/ou ADCC um anticorpo é gerado que tem funções efetoras diminuídas tais como CDC e/ou ADCC, o que pode permitir o controle melhorado do perfil tóxico do anticorpo em combinação com um segundo anticorpo. Que o primeiro anticorpo tem funções efetoras diminuídas tais como CDC e/ou ADCC deve ser entendido como quando o primeiro anticorpo é comparado a um anticorpo precursor tendo a mesma substituição realçadora de Fc-Fc e substituição inibidora da auto-oligomerização, mas não uma substituição que reduza as funções efetoras.

[00173] Em uma modalidade da invenção a segunda região Fc compreende uma substituição que aumenta as funções efetoras tais como CDC e/ou ADCC. Assim, em uma modalidade a segunda região Fc compreende uma substituição que aumenta CDC. Em uma modalidade a segunda região Fc compreende uma substituição que aumenta ADCC. Em uma modalidade a segunda região Fc compreende uma substituição que aumenta CDC e ADCC. Que o segundo anticorpo tem funções efetoras aumentadas tais como CDC e/ou ADCC deve ser entendido como quando o segundo anticorpo é comparado a um anticorpo precursor tendo a mesma substituição realçadora de Fc-Fc e substituição inibidora da auto-oligomerização, mas não uma substituição que realce as funções efetoras.

[00174] Em uma modalidade da invenção a segunda região Fc compreende uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo

consistindo em: G237A, K326A, K326W, E333A e E333S.

[00175] Em uma modalidade da invenção a segunda região Fc compreende uma substituição G237A. Em uma modalidade da invenção a segunda região Fc compreende uma substituição que reduziu a ligação do Receptor de Fc-gama, tal como G237A.

[00176] Em uma modalidade da invenção a segunda região Fc compreende uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: K326A, K326W, E333A e E333S.

[00177] Em uma modalidade da invenção a segunda região Fc compreende uma substituição selecionada a partir do grupo consistindo em: K326A, K326W, E333A e E333S.

[00178] Em uma modalidade da invenção a segunda região Fc compreende uma substituição selecionada a partir do grupo consistindo em: K326A, K326W, E333A e E333S. Em uma modalidade da invenção a segunda região Fc compreende uma substituição K326A. Em uma modalidade da invenção a segunda região Fc compreende uma substituição K326W. Em uma modalidade da invenção a segunda região Fc compreende uma substituição E333A. Em uma modalidade da invenção a segunda região Fc compreende uma substituição E333S.

[00179] Em uma modalidade da invenção a segunda região Fc compreende duas substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: K326A, K326W, E333A e E333S.

[00180] Em uma modalidade da invenção a segunda região Fc compreende uma substituição K326W e E333S. Em uma modalidade da invenção a segunda região Fc compreende uma substituição K326A e E333A.

[00181] Em uma modalidade da invenção a segunda região Fc compreende uma substituição G237A e uma E333S.

[00182] Em uma modalidade da invenção a segunda região Fc compreende uma substituição K326A.

[00183] Em uma modalidade da invenção a segunda região Fc compreende uma substituição E333S.

[00184] Por meio disto modalidades são providas em que o segundo anticorpo compreende uma segunda região Fc que tem uma substituição realçadora de Fc-Fc que introduz o efeito de interações Fc-Fc realçadas e oligomerização do anticorpo. A oligomerização realçada ocorre quando a região de ligação a antígeno do anticorpo é ligada ao antígeno alvo correspondente. A oligomerização realçada gera oligômeros tais como por exemplo, hexâmeros. A geração de estruturas oligoméricas, tais como hexâmeros tem o efeito de aumentar as funções efetoras Fc por exemplo, CDC pelo aumento da avidéz de ligação a C1q do anticorpo. Entretanto, pela introdução de uma substituição que aumenta as funções efetoras tais como CDC e/ou ADCC um anticorpo é gerado que tem oligomerização aumentada e funções efetoras aumentadas tais como CDC e/ou ADCC, o que pode permitir a potência melhorada do anticorpo em combinação com um primeiro anticorpo. Que o segundo anticorpo tem funções efetoras aumentadas tais como CDC e/ou ADCC deve ser entendido como quando o segundo anticorpo é comparado a um anticorpo precursor tendo a mesma substituição realçadora de Fc-Fc e substituição inibidora da auto-oligomerização, mas não uma substituição que aumente as funções efetoras.

[00185] A seguinte Tabela provê uma lista não limitante de modalidades, descrevendo combinações de um primeiro polipeptídeo e um segundo polipeptídeo com substituições específicas. Assim, por exemplo, a modalidade 1 da Tabela abaixo é uma combinação de um primeiro anticorpo compreendendo substituições nas posições correspondendo a E430G, K439E e G236R, respectivamente, na IgG humana, com um segundo anticorpo compreendendo as substituições E430G e S440K, respectivamente, na IgG humana. Como aqui descritos, o primeiro e segundo anticorpos de todas as modalidades 1 a 177 podem opcionalmente compreender substituições

adicionais.

Modalidade	Mutações de primeiro anticorpo	Mutações de segundo anticorpo
1	E430G K439E G236R	E430G S440K
2	E430G K439E G236K	E430G S440K
3	E430G K439E G237A	E430G S440K
4	E430G K439E G237T	E430G S440K
5	E430G K439E G237Q	E430G S440K
6	E430G K439E G237R	E430G S440K
7	E430G K439E G237S	E430G S440K
8	E430G K439E G237N	E430G S440K
9	E430G K439E G237D	E430G S440K
10	E430G K439E G237E	E430G S440K
11	E430G K439E G237K	E430G S440K
12	E430G K439E G237V	E430G S440K
13	E430G K439E G237M	E430G S440K
14	E430G K439E G237I	E430G S440K
15	E430G K439EG237L	E430G S440K
16	E430G K439E G237H	E430G S440K
17	E430G K439E G237F	E430G S440K
18	E430G K439EG237Y	E430G S440K
19	E430G K439EG237W	E430G S440K
20	E430G K439E G237P	E430G S440K
21	E430G K439E E269K	E430G S440K
22	E430G K439E K322A	E430G S440K
23	E430G K439E K322E	E430G S440K
24	E430G K439E L234F L235E	E430G S440K
25	E430G K439E L234F L235A	E430G S440K
26	E430G K439E L234F L235Q	E430G S440K
27	E430G K439E L234A L235E	E430G S440K
28	E430G K439E L234A L235A	E430G S440K
29	E430G K439E L234A L235Q	E430G S440K
30	E430G K439E	E430G S440K G236R
31	E430G K439E	E430G S440K G236K
32	E430G K439E	E430G S440K G237A
33	E430G K439E	E430G S440K G237T
34	E430G K439E	E430G S440K G237Q
35	E430G K439E	E430G S440K G237R
36	E430G K439E	E430G S440K G237S
37	E430G K439E	E430G S440K G237N
38	E430G K439E	E430G S440K G237D
39	E430G K439E	E430G S440K G237E
40	E430G K439E	E430G S440K G237K
41	E430G K439E	E430G S440K G237V
42	E430G K439E	E430G S440K G237M
43	E430G K439E	E430G S440K G237I
44	E430G K439E	E430G S440K G237L
45	E430G K439E	E430G S440K G237H
46	E430G K439E	E430G S440K G237F
47	E430G K439E	E430G S440K G237Y
48	E430G K439E	E430G S440K G237W
49	E430G K439E	E430G S440K G237P
50	E430G K439E	E430G S440K E269K
51	E430G K439E	E430G S440K K322A
52	E430G K439E	E430G S440K K322E
53	E430G K439E	E430G S440K L234F L235E
54	E430G K439E	E430G S440K L234F L235A
55	E430G K439E	E430G S440K L234F L235Q

Modalidade	Mutações de primeiro anticorpo	Mutações de segundo anticorpo
56	E430G K439E	E430G S440K L234A L235E
57	E430G K439E	E430G S440K L234A L235A
58	E430G K439E	E430G S440K L234A L235Q
59	E430G K439E G236R	E430G S440K G237A
60	E430G K439E G236R	E430G S440K K326A
61	E430G K439E G236R	E430G S440K K326W
62	E430G K439E G236R	E430G S440K E333A
63	E430G K439E G236R	E430G S440K E333S
64	E430G K439E G236R	E430G S440K G237A E333S
65	E430G K439E G236R	E430G S440K K326W E333S
66	E430G K439E G236R	E430G S440K K326W E333A
67	E430G K439E G237A	E430G S440K G236R
68	E430G K439E K326A	E430G S440K G236R
69	E430G K439E K326W	E430G S440K G236R
70	E430G K439E E333A	E430G S440K G236R
71	E430G K439E E333S	E430G S440K G236R
72	E430G K439E G237A E333S	E430G S440K G236R
73	E430G K439E K326W E333S	E430G S440K G236R
74	E430G K439E K326W E333A	E430G S440K G236R
75	E430G K439E G237T	E430G S440K G237A
76	E430G K439E G237T	E430G S440K K326A
77	E430G K439E G237T	E430G S440K K326W
78	E430G K439E G237T	E430G S440K E333A
79	E430G K439E G237T	E430G S440K E333S
80	E430G K439E G237T	E430G S440K G237A E333S
81	E430G K439E G237T	E430G S440K K326W E333S
82	E430G K439E G237T	E430G S440K K326W E333A
83	E430G K439E G237A	E430G S440K G237T
84	E430G K439E K326A	E430G S440K G237T
85	E430G K439E K326W	E430G S440K G237T
86	E430G K439E E333A	E430G S440K G237T
87	E430G K439E E333S	E430G S440K G237T
88	E430G K439E G237A E333S	E430G S440K G237T
89	E430G K439E K326W E333S	E430G S440K G237T
90	E430G K439E K326W E333A	E430G S440K G237T
91	E430G K439E G237A	E430G S440K G237A
92	E430G K439E G237A	E430G S440K K326A
93	E430G K439E G237A	E430G S440K K326W
94	E430G K439E G237A	E430G S440K E333A
95	E430G K439E G237A	E430G S440K E333S
96	E430G K439E G237A	E430G S440K G237A E333S
97	E430G K439E G237A	E430G S440K K326W E333S
98	E430G K439E G237A	E430G S440K K326W E333A
99	E430G K439E K326A	E430G S440K G237A
100	E430G K439E K326W	E430G S440K G237A
101	E430G K439E E333A	E430G S440K G237A
102	E430G K439E E333S	E430G S440K G237A
103	E430G K439E G237A E333S	E430G S440K G237A
104	E430G K439E K326W E333S	E430G S440K G237A
105	E430G K439E K326W E333A	E430G S440K G237A
106	E430G K439E G237Q	E430G S440K G237A
107	E430G K439E G237Q	E430G S440K K326A
108	E430G K439E G237Q	E430G S440K K326W
109	E430G K439E G237Q	E430G S440K E333A
110	E430G K439E G237Q	E430G S440K E333S
111	E430G K439E G237Q	E430G S440K G237A E333S
112	E430G K439E G237Q	E430G S440K K326W E333S
113	E430G K439E G237Q	E430G S440K K326W E333A

Modalidade	Mutações de primeiro anticorpo	Mutações de segundo anticorpo
114	E430G K439E G237A	E430G S440K G237Q
115	E430G K439E K326A	E430G S440K G237Q
116	E430G K439E K326W	E430G S440K G237Q
117	E430G K439E E333A	E430G S440K G237Q
118	E430G K439E E333S	E430G S440K G237Q
119	E430G K439E G237A E333S	E430G S440K G237Q
120	E430G K439E K326W E333S	E430G S440K G237Q
121	E430G K439E K326W E333A	E430G S440K G237Q
122	E430G K439E G237R	E430G S440K G237A
123	E430G K439E G237R	E430G S440K K326A
124	E430G K439E G237R	E430G S440K K326W
125	E430G K439E G237R	E430G S440K E333A
126	E430G K439E G237R	E430G S440K E333S
127	E430G K439E G237R	E430G S440K G237A E333S
128	E430G K439E G237R	E430G S440K K326W E333S
129	E430G K439E G237R	E430G S440K K326W E333A
130	E430G K439E G237A	E430G S440K G237R
131	E430G K439E K326A	E430G S440K G237R
132	E430G K439E K326W	E430G S440K G237R
133	E430G K439E E333A	E430G S440K G237R
134	E430G K439E E333S	E430G S440K G237R
135	E430G K439E G237A E333S	E430G S440K G237R
136	E430G K439E K326W E333S	E430G S440K G237R
137	E430G K439E K326W E333A	E430G S440K G237R
138	E430G K439E G237S	E430G S440K G237A
139	E430G K439E G237S	E430G S440K K326A
140	E430G K439E G237S	E430G S440K K326W
141	E430G K439E G237S	E430G S440K E333A
142	E430G K439E G237S	E430G S440K E333S
143	E430G K439E G237S	E430G S440K G237A E333S
144	E430G K439E G237S	E430G S440K K326W E333S
145	E430G K439E G237S	E430G S440K K326W E333A
146	E430G K439E G237A	E430G S440K G237S
147	E430G K439E K326A	E430G S440K G237S
148	E430G K439E K326W	E430G S440K G237S
149	E430G K439E E333A	E430G S440K G237S
150	E430G K439E E333S	E430G S440K G237S
151	E430G K439E G237A E333S	E430G S440K G237S
152	E430G K439E K326W E333S	E430G S440K G237S
153	E430G K439E K326W E333A	E430G S440K G237S
154	E345K K439E G236R	E345K S440K
155	E345K K439E G236R	E345K S440K G237A
156	E345K K439E G236R	E345K S440K E333S
157	E345K K439E G237Q	E345K S440K
158	E345K K439E G237Q	E345K S440K G237A
159	E345K K439E G237Q	E345K S440K E333S
160	E345R K439E G236R	E345K S440K
161	E345R K439E G236R	E345K S440K G237A
162	E345R K439E G236R	E345K S440K E333S
163	E345R K439E G237Q	E345K S440K
164	E345R K439E G237Q	E345K S440K G237A
165	E345R K439E G237Q	E345K S440K E333S
166	E345K K439E	E345K S440K G236R
167	E345K K439E G237A	E345K S440K G236R
168	E345K K439E E333S	E345K S440K G236R
169	E345K K439E	E345K S440K G237Q
170	E345K K439E G237A	E345K S440K G237Q
171	E345K K439E E333S	E345K S440K G237Q

Modalidade	Mutações de primeiro anticorpo	Mutações de segundo anticorpo
172	E345R K439E	E345R S440K G236R
173	E345R K439E G237A	E345R S440K G236R
174	E345R K439E E333S	E345R S440K G236R
175	E345R K439E	E345R S440K G237Q
176	E345R K439E G237A	E345R S440K G237Q
177	E345R K439E E333S	E345R S440K G237Q

[00186] A seguinte Tabela provê uma lista preferida de modalidades, descrevendo combinações de um primeiro anticorpo e um segundo anticorpo com substituições específicas, assim, por exemplo, a modalidade 1 da Tabela abaixo é uma combinação de um primeiro anticorpo compreendendo substituições nas posições correspondendo a E430G, K439E e G236R, respectivamente, na IgG humana, com um segundo anticorpo compreendendo as substituições E430G e S440K, respectivamente, na IgG humana. Como aqui descrito, o primeiro e segundo anticorpos de todas das modalidades 1 a 36 abaixo podem opcionalmente compreender substituições adicionais.

Modalidade	Mutações de primeiro anticorpo	Mutações de segundo anticorpo
1	E430G K439E G236R	E430G S440K
2	E430G K439E G237Q	E430G S440K
3	E430G K439E	E430G S440K G236R
4	E430G K439E	E430G S440K G237Q
5	E430G K439E G236R	E430G S440K G237A
6	E430G K439E G236R	E430G S440K E333S
7	E430G K439E G237A	E430G S440K G236R
8	E430G K439E E333S	E430G S440K G236R
9	E430G K439E G237Q	E430G S440K G237A
10	E430G K439E G237Q	E430G S440K E333S
11	E430G K439E G237A	E430G S440K G237Q
12	E430G K439E E333S	E430G S440K G237Q
13	E345K K439E G236R	E345K S440K
14	E345K K439E G236R	E345K S440K G237A
15	E345K K439E G236R	E345K S440K E333S
16	E345K K439E G237Q	E345K S440K
17	E345K K439E G237Q	E345K S440K G237A
18	E345K K439E G237Q	E345K S440K E333S
19	E345R K439E G236R	E345K S440K
20	E345R K439E G236R	E345K S440K G237A
21	E345R K439E G236R	E345K S440K E333S
22	E345R K439E G237Q	E345K S440K
23	E345R K439E G237Q	E345K S440K G237A
24	E345R K439E G237Q	E345K S440K E333S
25	E345K K439E	E345K S440K G236R
26	E345K K439E G237A	E345K S440K G236R
27	E345K K439E E333S	E345K S440K G236R
28	E345K K439E	E345K S440K G237Q
29	E345K K439E G237A	E345K S440K G237Q
30	E345K K439E E333S	E345K S440K G237Q
31	E345R K439E	E345R S440K G236R
32	E345R K439E G237A	E345R S440K G236R
33	E345R K439E E333S	E345R S440K G236R

Modalidade	Mutações de primeiro anticorpo	Mutações de segundo anticorpo
34	E345R K439E	E345R S440K G237Q
35	E345R K439E G237A	E345R S440K G237Q
36	E345R K439E E333S	E345R S440K G237Q

[00187] Em uma modalidade a primeira região Fc compreende uma substituição E430G, uma K439E e uma G236R e a segunda região Fc compreende uma substituição E430G e S440K. Em uma modalidade a primeira região Fc compreende uma substituição E430G, uma K439E e uma G237Q e a segunda região Fc compreende uma substituição E430G e S440K.

[00188] Em uma modalidade a primeira região Fc compreende uma substituição E430G e uma K439E e a segunda região Fc compreende uma substituição E430G, S440K e G236R. Em uma modalidade a primeira região Fc compreende uma substituição E430G e uma K439E e a segunda região Fc compreende uma substituição E430G, S440K e G237Q. Em uma modalidade a primeira região Fc compreende uma substituição E430G, uma K439E e uma G236R e a segunda região Fc compreende uma substituição E430G, S440K e G237A. Em uma modalidade a primeira região Fc compreende uma substituição E430G, uma K439E e uma G236R e a segunda região Fc compreende uma substituição E430G, S440K e E333S. Em uma modalidade a primeira região Fc compreende uma substituição E430G, uma K439E e uma G237A e a segunda região Fc compreende uma substituição E430G, S440K e G236R. Em uma modalidade a primeira região Fc compreende uma substituição E430G, uma K439E e uma E333S e a segunda região Fc compreende uma substituição E430G, S440K e G236R. Em uma modalidade a primeira região Fc compreende uma substituição E430G, uma K439E e uma G237Q e a segunda região Fc compreende uma substituição E430G, S440K e G237A. Em uma modalidade a primeira região Fc compreende uma substituição E430G, uma K439E e uma G237Q e a segunda região Fc compreende uma substituição E430G, S440K e E333S. Em uma modalidade a primeira região Fc compreende uma substituição E430G, uma K439E e uma G237A e a segunda região Fc compreende uma substituição E430G, S440K e

uma G237Q. Em uma modalidade a primeira região Fc compreende uma substituição E430G, uma K439E e uma E333S e a segunda região Fc compreende uma substituição E430G, S440K e uma G237Q. Em uma modalidade a primeira região Fc compreende uma substituição E345K, uma K439E e uma G236R e a segunda região Fc compreende uma substituição E345K, S440K e uma E333S. Em uma modalidade a primeira região Fc compreende uma substituição E345R, uma K439E e uma G236R e a segunda região Fc compreende uma substituição E345K, S440K e uma E333S. Em uma modalidade a primeira região Fc compreende uma substituição E345R, uma K439E e uma G237Q e a segunda região Fc compreende uma substituição E345K e S440K.

[00189] Em uma modalidade da invenção o primeiro e/ou segundo anticorpos são humanos, humanizados ou quiméricos. Em uma modalidade da invenção o primeiro e segundo anticorpos são humanos, humanizados ou quiméricos. Em uma modalidade da invenção o primeiro e segundo anticorpos são humanos. Em uma modalidade da invenção o primeiro e segundo anticorpos são humanizados. Em uma modalidade da invenção o primeiro anticorpo é humano e o segundo anticorpo é humanizado. Em uma modalidade da invenção o primeiro anticorpo é humanizado e o segundo anticorpo é humano.

[00190] Em uma modalidade da invenção o primeiro e/ou segundo anticorpos são um anticorpo monoclonal. Em uma modalidade da invenção o primeiro e segundo anticorpos são um anticorpo monoclonal. Em uma modalidade da invenção o primeiro e segundo anticorpos são um anticorpo biespecífico. Em uma modalidade o primeiro anticorpo é um anticorpo monoclonal e o segundo anticorpo é um anticorpo biespecífico. Em uma modalidade o primeiro anticorpo é um anticorpo biespecífico e o segundo anticorpo é um anticorpo monoclonal.

[00191] Deve ser entendido que as modalidades aqui descritas com

referência a um anticorpo se referem a um anticorpo compreendendo uma região Fc de uma imunoglobulina e uma região de ligação a antígeno, um anticorpo também pode ser um anticorpo multiespecífico tal como um anticorpo biespecífico tendo uma primeira região Fc de uma imunoglobulina e uma primeira região de ligação a antígeno e um segundo polipeptídeo ou anticorpo tendo uma segunda região Fc de uma imunoglobulina e uma segunda região de ligação a antígeno.

[00192] Em uma modalidade da invenção o primeiro e/ou segundo anticorpos são de um isótipo IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4. Em uma modalidade da invenção o primeiro e segundo anticorpos são de um isótipo IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4. Em uma modalidade da invenção o primeiro e segundo anticorpos são um isótipo de IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4 humano. Em uma modalidade da invenção o primeiro e segundo anticorpos são de um isótipo IgG1, IgG2 ou IgG4. Em uma modalidade da invenção o primeiro e segundo anticorpos são de um isótipo IgG1, IgG2 ou IgG4 humano. Em uma modalidade da invenção o primeiro e/ou segundo anticorpos são de um isótipo IgG1. Em uma modalidade da invenção o primeiro e/ou segundo anticorpos são de um isótipo IgG1 humano. Em uma modalidade da invenção o primeiro e segundo anticorpos são de um isótipo IgG1. Em uma modalidade da invenção o primeiro e segundo anticorpos são de um isótipo IgG2. Em uma modalidade da invenção o primeiro e segundo anticorpos são de um isótipo IgG4. Em uma modalidade da invenção o primeiro anticorpo é de um isótipo IgG1 e o segundo anticorpo é de um isótipo IgG2. Em uma modalidade da invenção o primeiro anticorpo é de um isótipo IgG2 e o segundo anticorpo é de um isótipo IgG1.

[00193] Em uma modalidade da invenção o primeiro anticorpo compreende uma cadeia pesada de um isótipo IgG1. Em uma modalidade da invenção o segundo anticorpo compreende uma cadeia pesada de um isótipo IgG1. Em uma modalidade da invenção o primeiro anticorpo compreende

uma cadeia pesada de um isótipo IgG2. Em uma modalidade da invenção o segundo anticorpo compreende uma cadeia pesada de um isótipo IgG2. Em uma modalidade da invenção o primeiro anticorpo compreende uma cadeia pesada de um isótipo IgG3. Em uma modalidade da invenção o segundo anticorpo compreende uma cadeia pesada de um isótipo IgG3. Em uma modalidade da invenção o primeiro anticorpo compreende uma cadeia pesada de um isótipo IgG4. Em uma modalidade da invenção o segundo anticorpo compreende uma cadeia pesada de um isótipo IgG4.

[00194] Em uma modalidade da invenção o primeiro anticorpo compreende uma cadeia pesada de um isótipo IgG1 e o segundo anticorpo compreende uma cadeia pesada de um isótipo IgG1.

[00195] Em uma modalidade preferida, o dito primeiro anticorpo compreende uma primeira região Fc de um isótipo de IgG1 humano e/ou o dito segundo anticorpo compreende uma segunda região Fc de um isótipo de IgG1 humano.

[00196] Em uma modalidade da invenção, o anticorpo ou o primeiro e/ou segundo anticorpos compreendem uma primeira e/ou segunda regiões constantes compreendendo uma sequência selecionada da Tabela 1.

[00197] Em uma modalidade da invenção, o anticorpo ou o primeiro e/ou segundo anticorpos compreendem uma primeira e/ou segunda regiões constantes compreendendo uma sequência selecionada a partir do grupo consistindo na SEQ ID NO: 63 a 122, 135 a 138, 140 a 145.

[00198] Em uma modalidade da invenção, o primeiro e/ou segundo anticorpos compreendem uma primeira e/ou segunda regiões constantes de cadeia pesada compreendendo uma sequência selecionada a partir do grupo consistindo na SEQ ID NO: 63 a 122, 135 a 138, 140 a 145, em que a primeira e segunda sequências de cadeia pesada são selecionadas independentemente do grupo.

[00199] Em uma modalidade da invenção, o anticorpo ou o primeiro

e/ou segundo anticorpos compreendem uma primeira e/ou segunda regiões constantes compreendendo uma sequência selecionada a partir do grupo consistindo na SEQ ID NO: 63 a 122, 135 a 138 e 140 a 145, em que no máximo 5 substituições adicionais são introduzidas, tais como no máximo 4 substituições adicionais, tais como no máximo 3 substituições adicionais, tais como no máximo 2 substituições adicionais, tais como no máximo 1 substituição adicional.

[00200] Em uma modalidade da invenção o anticorpo, por exemplo, o primeiro ou segundo anticorpo compreende uma região constante compreendendo uma sequência apresentada na SEQ ID NO: 84. Em uma modalidade da invenção o anticorpo, por exemplo, o primeiro ou segundo anticorpo compreende uma região constante compreendendo uma sequência apresentada na SEQ ID NO: 87. Em uma modalidade da invenção o anticorpo, por exemplo, o primeiro ou segundo anticorpo compreende uma região constante compreendendo uma sequência apresentada na SEQ ID NO: 101. Em uma modalidade da invenção o anticorpo, por exemplo, o primeiro ou segundo anticorpo compreende uma região constante compreendendo uma sequência apresentada na SEQ ID NO: 107. Em uma modalidade da invenção o anticorpo, por exemplo, o primeiro ou segundo anticorpo compreende uma região constante compreendendo uma sequência apresentada na SEQ ID NO: 105. Em uma modalidade da invenção o anticorpo, por exemplo, o primeiro ou segundo anticorpo compreende uma região constante compreendendo uma sequência apresentada na SEQ ID NO: 103. Em uma modalidade da invenção o anticorpo, por exemplo, o primeiro ou segundo anticorpo compreende uma região constante compreendendo uma sequência apresentada na SEQ ID NO: 85. Em uma modalidade da invenção o anticorpo, por exemplo, o primeiro ou segundo anticorpo compreende uma região constante compreendendo uma sequência apresentada na SEQ ID NO: 104. Em uma modalidade da invenção o anticorpo, por exemplo, o primeiro ou segundo anticorpo compreende uma

região constante compreendendo uma sequência apresentada na SEQ ID NO: 82. Em uma modalidade da invenção o anticorpo, por exemplo, o primeiro ou segundo anticorpo compreende uma região constante compreendendo uma sequência apresentada na SEQ ID NO: 66. Em uma modalidade da invenção o anticorpo, por exemplo, o primeiro ou segundo anticorpo compreende uma região constante compreendendo uma sequência apresentada na SEQ ID NO: 68. Em uma modalidade da invenção o anticorpo, por exemplo, o primeiro ou segundo anticorpo compreende uma região constante compreendendo uma sequência apresentada na SEQ ID NO: 73.

[00201] Em uma modalidade da invenção o primeiro e segundo antígenos são ambas moléculas expostas na superfície celular. Em uma modalidade o primeiro e segundo antígenos são expressos na mesma célula. Em uma modalidade o primeiro e segundo antígenos são expressos no mesmo tecido.

[00202] Em uma modalidade da invenção o primeiro e segundo antígenos estão colocalizados em células ou tecidos que são células alvos ou tecido alvo para a doença ou distúrbio a serem tratados. Em uma modalidade da invenção o primeiro e segundo antígenos não são idênticos.

[00203] Em uma modalidade da invenção o primeiro e segundo anticorpos esgotam uma população de célula expressando o primeiro e segundo antígenos.

[00204] Em uma modalidade da invenção a população de célula é uma célula de tumor.

[00205] Em uma modalidade da invenção a população de célula é uma célula de tumor hematológico ou uma célula de tumor sólido.

[00206] Em uma modalidade da invenção a população de célula é um leucócito, tal como uma população de célula leucocitária.

[00207] Em uma modalidade da invenção a população de célula é um linfócito, tal como uma população de célula linfocitária.

[00208] Em uma modalidade da invenção a população de célula é uma célula B, tal como uma população de célula B. Em uma modalidade da invenção a população de célula é um subconjunto de uma população de célula B.

[00209] Em uma modalidade da invenção a população de célula é uma célula T, tal como uma população de célula T. Em uma modalidade da invenção a população de célula é um subconjunto de uma população de célula T. Em uma modalidade da invenção a população de célula é uma célula T reguladora.

[00210] Em uma modalidade da invenção a população de célula é uma célula NK. Em uma modalidade da invenção a população de célula é uma célula supressora derivada de mielóide. Em uma modalidade da invenção a população de célula é um macrófago associado a tumor.

[00211] Por meio disto modalidades são descritas em que o primeiro anticorpo e segundo anticorpo de acordo com a invenção são usados como um medicamento para esgotar uma população de célula específica expressando um primeiro e segundo antígenos reconhecidos pelo primeiro e segundo anticorpos. Assim, um primeiro e segundo anticorpos de acordo com a presente invenção podem ser usados para esgotar células de tumor que expressem um primeiro e segundo antígenos reconhecidos pelo primeiro e segundo anticorpos, enquanto o primeiro e segundo anticorpos não podem esgotar o tecido saudável expressando apenas o primeiro ou o segundo antígeno. Um primeiro e segundo anticorpos de acordo com a presente invenção também podem ser particularmente úteis em esgotar populações de célula específicas do sistema imune, tais como subconjuntos específicos de linfócitos por exemplo, células B ou células T ou mesmo subconjuntos de células B ou subconjuntos de células T.

[00212] Em uma modalidade da invenção o anticorpo é um anticorpo monoespecífico, anticorpo biespecífico ou anticorpo multiespecífico. Em uma

modalidade da invenção o anticorpo é um anticorpo natural.

[00213] O anticorpo que tem um natural, por exemplo, um domínio Fc humano também pode ser um anticorpo tendo outras mutações além daquelas da presente invenção, tais como por exemplo, mutações que afetam a glicosilação ou permite que o anticorpo seja um anticorpo biespecífico. pelo termo “anticorpo natural” é intencionado qualquer anticorpo que não compreende nenhuma das mutações geneticamente introduzidas. Um anticorpo que compreende modificações que ocorram naturalmente, por exemplo, alótipos diferentes, é assim para ser entendido como um “anticorpo natural” no sentido da presente invenção e pode deste modo ser entendido como um anticorpo precursor. Um anticorpo natural pode servir como um padrão para as pelo menos três substituições no primeiro anticorpo ou as pelo menos duas substituições no segundo anticorpo de acordo com a presente invenção e deste modo prover o primeiro e segundo anticorpos da invenção. Um Exemplo de um anticorpo precursor compreendendo outras substituições além daquelas da presente invenção é o anticorpo biespecífico como descrito na WO2011/131746 (Genmab), utilizando condições redutoras para promover a troca de metade da molécula de dois anticorpos compreendendo regiões CH3 semelhantes à IgG4, formando assim anticorpos biespecíficos sem formação concomitante de agregados. Outros exemplos de anticorpos precursores incluem mas não são limitados aos anticorpos biespecíficos tais como biespecíficos heterodiméricos: Triomabs (Fresenius); IgG1 e IgG2 biespecíficos (Rinat Neurosciences Corporation); FcΔAdp (Regeneron); *Knobs-into-holes* (Genentech); Direção eletrostática (Amgen, Chugai, Oncomed); SEEDbodies (Merck); plataforma Azymetric (Zymeworks); mAb-Fv (Xencor); e LUZ-Y (Genentech). Outros formatos de anticorpo precursor exemplares incluem, sem limitação, um anticorpo tipo selvagem, um anticorpo completo ou fragmento de anticorpo contendo Fc, um anticorpo humano, anticorpo humanizado, anticorpo quimérico ou qualquer combinação

dos mesmos.

[00214] Em um aspecto da invenção o anticorpo compreende uma região Fc de uma IgG humana e uma região de ligação a antígeno capaz de se ligar a um antígeno, em que a dita região Fc compreende

a. uma substituição de um aminoácido em uma posição selecionada a partir do grupo consistindo em: E430, E345 e S440, com a condição de que a substituição em S440 seja S440Y ou S440W, e

b. uma substituição K439E ou S440K, com a condição de que a substituição não seja S440K se a substituição em (a) for S440Y ou S440W, e

c. uma substituição de aminoácido na posição G237 ou uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: G236R, G236K, K322A, E269K, L234A, L234F, L235A, L235Q e L235E.

[00215] Em um outro aspecto o anticorpo compreendendo uma região Fc de uma IgG humana e uma região de ligação a antígeno capaz de se ligar a um antígeno, em que a dita região Fc compreende

a. uma substituição K248E e uma T437R, e

b. uma substituição K439E ou S440K, e

c. uma substituição de aminoácido na posição G237 ou P329 ou uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: G236R, G236K, K322A, K332E, E269K, L234A, L234F, L235A, L235Q, L235E, K326A, K326W, E333A e E333S.

[00216] Em uma modalidade da invenção a região Fc compreende uma substituição selecionada a partir do grupo consistindo em: E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440W e S440Y.

[00217] Em uma modalidade da invenção a região Fc compreende uma substituição selecionada a partir do grupo consistindo em: E430G, E345K e E345R.

[00218] Em uma modalidade da invenção a região Fc compreende uma

substituição E430G.

[00219] Em uma modalidade da invenção a região Fc compreende no máximo uma substituição em uma posição selecionada a partir do grupo consistindo em: E430, E345 e S440, com a condição de que a substituição em S440 seja S440Y ou S440W.

[00220] Em uma modalidade da invenção a região Fc compreende uma substituição selecionada a partir do grupo consistindo em: G237A, G237T, G237Q, G237R, G237S, G237N, G237D, G237E, G237K, G237V, G237M, G237I, G237L, G237H, G237F, G237Y, G237W, G237P.

[00221] Em uma modalidade da invenção a região Fc compreende uma substituição selecionada a partir do grupo consistindo em: G237A, G237T, G237S, G237Q, G237R. Em uma modalidade da invenção a região Fc compreende uma substituição G237Q.

[00222] Em uma modalidade da invenção a região Fc compreende uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: G236R e E269K.

[00223] Em uma modalidade da invenção a região Fc compreende uma substituição G236R.

[00224] Em uma modalidade da invenção em que a região Fc compreende uma substituição E269K.

[00225] Em uma modalidade da invenção a região Fc compreende uma substituição K322A.

Alvos e método de uso

[00226] O primeiro e/ou segundo anticorpos de acordo com a presente invenção que podem ligar um alvo são expressos na mesma célula. Em uma modalidade o alvo é um alvo que ativa, inibe, modula e/ou regula um caminho da transdução de sinal.

[00227] Os exemplos de alvos que podem ser particularmente adequados como alvos de acordo com a presente invenção são receptores e

ligantes de superfície celular.

[00228] As seguintes classes de proteína também podem ser particularmente adequadas como alvo de ligação a antígeno para o primeiro e/ou segundo anticorpos de acordo com a invenção, a superfamília de receptores de necrose de tumor, proteínas ancoradas a GPI, Proteínas lipídicas, Hidrolases (EC 3.) e superfamílias de reguladores, proteína relacionada com a família B7, superfamília de imunoglobulina, família do receptor de interleucina, Integrinas, família do moléculas de adesão de célula semelhante à Ig, Proteína Tirosina Fosfatases tipo Receptor, lectinas tipo C, Tetraespaninas, 4-domínios transpondo membrana, receptores semelhantes à imunoglobulina ativadores de leucócito, receptores de quimiocina com motivo C-C, receptores ligados à proteína G, receptores semelhantes a Toll, Tirosina Cinases Receptoras. Em uma modalidade da invenção a primeira e segunda regiões de ligação a antígenos são capazes de ligar a um antígeno alvo da mesma classe de proteína. Em uma modalidade da invenção a primeira e segunda regiões de ligação a antígenos são capazes de ligar a um antígeno alvo de uma classe de proteína diferente.

[00229] Em uma modalidade da invenção a primeira região de ligação a antígeno é capaz de se ligar a um antígeno alvo da classe de proteína das proteínas ancoradas a GPI e a segunda região de ligação a antígeno é capaz de se ligar a um antígeno alvo da classe de proteína das Tetraespaninas. Em uma modalidade da invenção a primeira região de ligação a antígeno é capaz de se ligar a um antígeno alvo da classe de proteína das Tetraespaninas e a segunda região de ligação a antígeno é capaz de se ligar a um antígeno alvo da classe de proteína das proteínas ancoradas a GPI.

[00230] Em uma modalidade da invenção a primeira região de ligação a antígeno é capaz de se ligar a um antígeno alvo da classe de proteína das proteínas ancoradas a GPI e a segunda região de ligação a antígeno é capaz de se ligar a um antígeno alvo da classe de proteína dos 4-domínios que

transpõem membrana. Em uma modalidade da invenção a primeira região de ligação a antígeno é capaz de se ligar a um antígeno alvo da classe de proteína dos 4-domínios que transpõem membrana e a segunda região de ligação a antígeno é capaz de se ligar a um antígeno alvo da classe de proteína das proteínas ancoradas a GPI.

[00231] Em uma modalidade da invenção a primeira região de ligação a antígeno é capaz de se ligar a um antígeno alvo da classe de proteína da superfamília de receptores de necrose de tumor e a segunda região de ligação a antígeno é capaz de se ligar a um antígeno alvo da classe de proteína da superfamília de receptores de necrose de tumor.

[00232] Em uma modalidade da invenção a primeira região de ligação a antígeno é capaz de se ligar a um antígeno alvo da classe de proteína da superfamília de receptores de necrose de tumor e a segunda região de ligação a antígeno é capaz de se ligar a um antígeno alvo da classe de proteína da superfamília de imunoglobulina.

[00233] Os receptores de superfície celular incluem, por exemplo, receptores que pertencem às famílias de receptor tais como a família de receptor do fator hematopoiético, família do receptor de citocina, família do receptor de tirosina cinase, família do receptor da serina/treonina cinase, família de receptor de TNF, família de receptor acoplado à proteína G, família de receptor ancorado a GPI, família de receptor da tirosina fosfatase, família do fator de adesão e família de receptor hormonal. Várias referências que se referem aos receptores pertencentes a estas famílias de receptores e as suas características estão disponíveis e incluem, por exemplo, Cooke B A., King R J B., van der Molen H J. ed. New Comprehensive Biochemistry Vol. 18B “Hormones and their Actions Part II” pp. 1-46 (1988) Elsevier Science Publishers BV., Nova Iorque, USA; Patthy L. (1990) Cell, 61: 13-14; Ullrich A., *et al.* (1990) Cell, 61: 203-212; Massagul J. (1992) Cell, 69: 1067-1070; Miyajima A., *et al.* (1992) Annu. Rev. Immunol., 10: 295-331; Taga T. e

Kishimoto T. (1992) FASEB J., 7: 3387-3396; Fantl W I., *et al.* (1993) Annu. Rev. Biochem., 62: 453-481; Smith C A., *et al.* (1994) Cell, 76: 959-962; Flower D R. (1999) Biochim. Biophys. Acta, 1422: 207-234; e M. Miyasaka ed., Cell Technology, volume suplementar, Handbook series, “Handbook for Adhesion Factors” (1994) (Shujunsha, Tóquio, Japão).

[00234] Em uma modalidade da invenção o anticorpo compreende uma região de ligação a antígeno em que a região de ligação a antígeno se liga a um membro da super família do receptor do fator de necrose de tumor (TNFR-SF) ou superfamília (GPCR) do Receptor Acoplado à Proteína G.

[00235] Em uma modalidade da invenção o primeiro e/ou segundo anticorpos se ligam a um receptor de superfície celular, por exemplo, receptores hormonais e receptores de citocina. Os receptores de citocina exemplares incluem, por exemplo, receptor do fator hematopóietico, receptor de linfocina, receptor do fator de crescimento, receptor do fator de controle de diferenciação e os semelhantes. Os exemplos de receptores de citocina são receptor de eritropoietina (EPO), receptor de trombopoietina (TPO), receptor do fator estimulante de colônia de granulócito (G-CSF), fator estimulante de colônia de macrófago (M-CSF), receptor do fator estimulante de colônia de macrófago (GM-CSF) granular, receptor do fator de necrose de tumor (TNF), receptor de interleucina-1 (IL-1), receptor de interleucina-2 (IL-2), receptor de interleucina-3 (IL-3), receptor de interleucina-4 (IL- 4), receptor de interleucina-5 (IL-5), receptor de interleucina-6 (IL-6), receptor de interleucina-7 (IL-7), receptor de interleucina-9 (IL-9), receptor de interleucina-10 (IL-10), receptor de interleucina-11 (IL-11), receptor de interleucina-12 (IL-12), receptor de interleucina-13 (IL-13), receptor de interleucina-15 (IL- 15), receptor de interferon-alfa (IFN-alfa), receptor de interferon-beta (IFN-beta), receptor de interferon-gama (IFN-gama), receptor de hormônio do crescimento (GH), receptor de insulina, receptor do fator de proliferação de célula tronco do sangue (SCF), receptor do fator de

crescimento epidérmico vascular (VEGF), receptor do fator de crescimento de célula epidérmica (EGF), receptor do fator de crescimento de nervo (NGF), receptor do fator de crescimento de fibroblasto (FGF), receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), receptor do fator de crescimento transformador-beta (TGF-beta), receptor do fator inibidor de migração de leucócito (LIF), receptor do fator neurotrófico ciliar (CNTF), receptor de oncostatina M (OSM) e receptor da família Notch.

[00236] A superfamília de receptor do fator de necrose de tumor (TNFRSF) é um Grupo de receptores distinguidos pela capacidade para ligar ligantes da superfamília do fator de necrose de tumor (TNFSF) por intermédio de um Domínio extracelular rico em cisteína. Os receptores de TNF formam complexos triméricos na membrana plasmática. A TNFRSF inclui a seguinte lista de 29 proteínas; TNFR1 (Uniprot P19438), FAS (Uniprot P25445), DR3 (Uniprot Q93038), DR4 (Uniprot O00220), DR5 (Uniprot O14763), DR6 (Uniprot O75509), NGFR (Uniprot P08138), EDAR (Uniprot Q9UNE0), DcR1 (Uniprot O14798), DcR2 (Uniprot Q9UBN6), DcR3 (Uniprot O95407), OPG (Uniprot O00300), TROY (Uniprot Q9NS68), XEDAR (Uniprot Q9HAV5), LTbR (Uniprot P36941), HVEM (Uniprot Q92956), TWEAKR (Uniprot Q9NP84), CD120b (Uniprot P20333), OX40 (Uniprot P43489), CD40 (Uniprot P25942), CD27 (Uniprot P26842), CD30 (Uniprot P28908), 4-1BB (Uniprot Q07011), RANK (Uniprot Q9Y6Q6), TACI (Uniprot O14836), BLySR (Uniprot Q96RJ3), BCMA (Uniprot Q02223), GITR (Uniprot Q9Y5U5), RELT (Uniprot Q969Z4).

[00237] Em uma modalidade da invenção o anticorpo, o primeiro e/ou segundo anticorpos compreendem uma região de ligação a antígeno capaz de se ligar a um antígeno selecionado a partir do grupo consistindo em: DR4, DR5, CD20, CD37, CD52, HLA-DR, CD3 e CD5.

[00238] Em uma modalidade a região de ligação a antígeno é capaz de se ligar ao DR4. Em uma modalidade a região de ligação a antígeno é capaz

de se ligar ao DR5. Em uma modalidade a região de ligação a antígeno é capaz de se ligar ao CD20. Em uma modalidade a região de ligação a antígeno é capaz de se ligar ao CD37. Em uma modalidade a região de ligação a antígeno é capaz de se ligar ao CD52. Em uma modalidade a região de ligação a antígeno é capaz de se ligar ao HLA-DR. Em uma modalidade a região de ligação a antígeno é capaz de se ligar ao CD3. Em uma modalidade a região de ligação a antígeno é capaz de se ligar ao CD5.

[00239] Em uma modalidade da invenção o anticorpo ou o primeiro e/ou segundo anticorpos compreendem uma região de ligação a antígeno compreendendo:

uma região VH compreendendo uma sequência de CDR1 como apresentada na SEQ ID NO: 196, uma sequência de CDR2 como apresentada na SEQ ID NO: 196 e uma sequência de CDR3 como apresentada na SEQ ID NO: 198 e uma região VL compreendendo uma sequência de CDR1 como apresentada na SEQ ID NO: 200, uma sequência de CDR2 como apresentada em: AAT e uma sequência de CDR3 como apresentada na SEQ ID NO: 201 **[DR4]**;

uma região VH compreendendo uma sequência de CDR1 como apresentada na SEQ ID NO: 50, uma sequência de CDR2 como apresentada na SEQ ID NO: 51 e uma sequência de CDR3 como apresentada na SEQ ID NO: 52 e uma região VL compreendendo uma sequência de CDR1 como apresentada na SEQ ID NO: 54, uma sequência de CDR2 como apresentada em: FAS e uma sequência de CDR3 como apresentada na SEQ ID NO: 55 **[DR5-01-G56T]**;

uma região VH compreendendo uma sequência de CDR1 como apresentada na SEQ ID NO: 57, uma sequência de CDR2 como apresentada na SEQ ID NO: 58 e uma sequência de CDR3 como apresentada na SEQ ID NO: 59 e uma região VL compreendendo uma sequência de CDR1 como apresentada na SEQ ID NO: 61, uma sequência de CDR2 como

apresentada em: RTS e uma sequência de CDR3 como apresentada na SEQ ID NO: 62 [**DR5-05**];

uma região VH compreendendo uma sequência de CDR1 como apresentada na SEQ ID NO: 36, uma sequência de CDR2 como apresentada na SEQ ID NO: 37 e uma sequência de CDR3 como apresentada na SEQ ID NO: 38 e uma região VL compreendendo uma sequência de CDR1 como apresentada na SEQ ID NO: 40, uma sequência de CDR2 como apresentada em: DAS e uma sequência de CDR3 como apresentada na SEQ ID NO: 41 [**CD20, 7D8**];

uma região VH compreendendo uma sequência de CDR1 como apresentada na SEQ ID NO: 9, uma sequência de CDR2 como apresentada na SEQ ID NO: 10 e uma sequência de CDR3 como apresentada na SEQ ID NO: 11 e uma região VL compreendendo uma sequência de CDR1 como apresentada na SEQ ID NO: 13, uma sequência de CDR2 como apresentada em: DAS e uma sequência de CDR3 como apresentada na SEQ ID NO: 14 [**CD20, 11B8**];

uma região VH compreendendo uma sequência de CDR1 como apresentada na SEQ ID NO: 43, uma sequência de CDR2 como apresentada na SEQ ID NO: 44 e uma sequência de CDR3 como apresentada na SEQ ID NO: 45 e uma região VL compreendendo uma sequência de CDR1 como apresentada na SEQ ID NO: 47, uma sequência de CDR2 como apresentada em: VAT e uma sequência de CDR3 como apresentada na SEQ ID NO: 48 [**CD37**];

uma região VH compreendendo uma sequência de CDR1 como apresentada na SEQ ID NO: 2, uma sequência de CDR2 como apresentada na SEQ ID NO: 3 e uma sequência de CDR3 como apresentada na SEQ ID NO: 4 e uma região VL compreendendo uma sequência de CDR1 como apresentada na SEQ ID NO: 6, uma sequência de CDR2 como apresentada em: NTN e uma sequência de CDR3 como apresentada na SEQ

ID NO: 7 [**CD52, CAMPATH-1H**];

uma região VH compreendendo uma sequência de CDR1 como apresentada na SEQ ID NO: 161, uma sequência de CDR2 como apresentada na SEQ ID NO: 162 e uma sequência de CDR3 como apresentada na SEQ ID NO: 163 e uma região VL compreendendo uma sequência de CDR1 como apresentada na SEQ ID NO: 165, uma sequência de CDR2 como apresentada em LVS e uma sequência de CDR3 como apresentada na SEQ ID NO: 166 [**CD52, h2E8**];

uma região VH compreendendo uma sequência de CDR1 como apresentada na SEQ ID NO: 168, uma sequência de CDR2 como apresentada na SEQ ID NO: 169 e uma sequência de CDR3 como apresentada na SEQ ID NO: 170 e uma região VL compreendendo uma sequência de CDR1 como apresentada na SEQ ID NO: 172, uma sequência de CDR2 como apresentada na SEQ ID NO: AAS e uma sequência de CDR3 como apresentada na SEQ ID NO: 173 [**HLA-DR, hu1243**];

uma região VH compreendendo uma sequência de CDR1 como apresentada na SEQ ID NO: 175, uma sequência de CDR2 como apresentada na SEQ ID NO: 176 e uma sequência de CDR3 como apresentada na SEQ ID NO: 177 e uma região VL compreendendo uma sequência de CDR1 como apresentada na SEQ ID NO: 179, uma sequência de CDR2 como apresentada em: DNN e uma sequência de CDR3 como apresentada na SEQ ID NO: 180 [**HLA-DR, 1D09C3**];

uma região VH compreendendo uma sequência de CDR1 como apresentada na SEQ ID NO: 182, uma sequência de CDR2 como apresentada na SEQ ID NO: 183 e uma sequência de CDR3 como apresentada na SEQ ID NO: 184 e uma região VL compreendendo uma sequência de CDR1 como apresentada na SEQ ID NO: 186, uma sequência de CDR2 como apresentada na SEQ ID NO: DTS e uma sequência de CDR3 como apresentada na SEQ ID NO: 187 [**CD3, huCLB T3/4**];

uma região VH compreendendo uma sequência de CDR1 como apresentada na SEQ ID NO: 189, uma sequência de CDR2 como apresentada na SEQ ID NO: 190 e uma sequência de CDR3 como apresentada na SEQ ID NO: 191 e uma região VL compreendendo uma sequência de CDR1 como apresentada na SEQ ID NO: 193, uma sequência de CDR2 como apresentada em: ATS e uma sequência de CDR3 como apresentada na SEQ ID NO: 194 [CD5].

[00240] Em um aspecto a presente invenção se refere a uma composição compreendendo um primeiro e um segundo anticorpos em que o primeiro anticorpo compreende uma primeira região de ligação a antígeno e uma primeira região Fc de acordo com qualquer modalidade aqui divulgada e o segundo anticorpo compreende uma segunda região de ligação a antígeno e uma segunda região Fc de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui divulgados.

[00241] Em um outro aspecto a presente invenção se refere a uma composição compreendendo um primeiro e um segundo anticorpos, em que o primeiro anticorpo compreende uma primeira região de ligação a antígeno capaz de se ligar a um primeiro antígeno e uma primeira região Fc de uma IgG humana e o segundo anticorpo compreende uma segunda região de ligação a antígeno capaz de se ligar a um segundo antígeno e uma segunda região Fc de uma IgG humana, em que a dita primeira região Fc compreende

uma substituição de um aminoácido em uma posição selecionada a partir do grupo consistindo em: E430, E345 e S440, com a condição de que a substituição em S440 seja S440Y ou S440W, e

uma substituição K439E ou S440K, com a condição de que a substituição não seja S440K se a substituição em (a) for S440Y ou S440W, e

uma substituição de aminoácido na posição G237 ou uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: G236R, G236K, K322A, E269K, K322E, P329R, L234A, L234F, L235A, L235Q e

L235E;

e a dita segunda região Fc compreende

uma substituição de um aminoácido em uma posição selecionada a partir do grupo consistindo em: E430, E345 e S440, com a condição de que a substituição em S440 seja S440Y ou S440W e

uma substituição K439E ou S440K, com a condição de que a substituição não seja S440K se a substituição em (d) for S440Y ou S440W, e

uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: K326A, K326W, E333A e E333S se a primeira região Fc compreende uma substituição K322E ou P329R,

em que a primeira região Fc tem uma substituição K439E e a segunda região Fc tem uma substituição S440K ou a primeira região Fc tem uma substituição S440K e a segunda região Fc tem uma substituição K439E, em que as posições de aminoácido correspondem à IgG1 humana de acordo com o sistema de numeração EU.

[00242] Em um aspecto a presente invenção provê uma composição compreendendo um primeiro e um segundo anticorpos, em que o primeiro anticorpo compreende uma primeira região de ligação a antígeno capaz de se ligar a um primeiro antígeno e uma primeira região Fc de uma IgG humana e o segundo anticorpo compreende uma segunda região de ligação a antígeno capaz de se ligar a um segundo antígeno e uma segunda região Fc de uma IgG humana, em que a dita primeira região Fc compreende

uma substituição de um aminoácido em uma posição selecionada a partir do grupo consistindo em: E430, E345 e S440, com a condição de que a substituição em S440 seja S440Y ou S440W, e

uma substituição K439E ou S440K, com a condição de que a substituição não seja S440K se a substituição em (a) for S440Y ou S440W, e

uma substituição de aminoácido na posição G237 ou uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: G236R,

G236K, K322A, E269K, L234A, L234F, L235A, L235Q e L235E;

e a dita segunda região Fc compreende

uma substituição de um aminoácido em uma posição selecionada a partir do grupo consistindo em: E430, E345 e S440, com a condição de que a substituição em S440 seja S440Y ou S440W e

uma substituição K439E ou S440K, com a condição de que a substituição não seja S440K se a substituição em (d) for S440Y ou S440W,

em que a primeira região Fc tem uma substituição K439E e a segunda região Fc tem uma substituição S440K ou a primeira região Fc tem uma substituição S440K e a segunda região Fc tem uma substituição K439E,

em que as posições de aminoácido correspondem à IgG1 humana de acordo com o sistema de numeração EU.

[00243] Em um aspecto a presente invenção provê uma composição compreendendo um primeiro e um segundo anticorpos, em que o primeiro anticorpo compreende uma primeira região de ligação a antígeno capaz de se ligar a um primeiro antígeno e uma primeira região Fc de uma IgG humana e o segundo anticorpo compreende uma segunda região de ligação a antígeno capaz de se ligar a um segundo antígeno e uma segunda região Fc de uma IgG humana, em que a dita primeira região Fc compreende

uma substituição de um aminoácido em uma posição selecionada a partir do grupo consistindo em: E430, E345 e S440, com a condição de que a substituição em S440 seja S440Y ou S440W, e

uma substituição K439E ou S440K, com a condição de que a substituição não seja S440K se a substituição em (a) for S440Y ou S440W, e

uma substituição de aminoácido na posição P329 ou uma substituição K322E;

e a dita segunda região Fc compreende

uma substituição de um aminoácido em uma posição selecionada a partir do grupo consistindo em: E430, E345 e S440, com a

condição de que a substituição em S440 seja S440Y ou S440W e

uma substituição K439E ou S440K, com a condição de que a substituição não seja S440K se a substituição em (d) for S440Y ou S440W, e

uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: K326A, K326W, E333A e E333S,

em que a primeira região Fc tem uma substituição K439E e a segunda região Fc tem uma substituição S440K ou a primeira região Fc tem uma substituição S440K e a segunda região Fc tem uma substituição K439E,

em que as posições de aminoácido correspondem à IgG1 humana de acordo com o sistema de numeração EU.

[00244] Em uma modalidade da invenção a composição compreendendo uma primeira e segunda regiões Fc compreende uma substituição selecionada a partir do grupo consistindo em: E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440W e S440Y.

[00245] Em uma modalidade da invenção a composição compreendendo uma primeira e segunda regiões Fc compreende uma substituição selecionada a partir do grupo consistindo em: E430G, E345K e E345R.

[00246] Em uma modalidade da invenção a composição compreendendo uma primeira e segunda regiões Fc compreende uma substituição E430G.

[00247] Em uma modalidade da invenção a composição compreendendo uma primeira região Fc compreende uma substituição selecionada a partir do grupo consistindo em: G237A, G237T, G237Q, G237R, G237S, G237N, G237D, G237E, G237K, G237V, G237M, G237I, G237L, G237H, G237F, G237Y, G237W e G237P.

[00248] Em uma modalidade da invenção a composição compreendendo uma primeira região Fc compreende uma substituição selecionada a partir do grupo consistindo em: G237A, G237T, G237Q,

G237R e G237S.

[00249] Em uma modalidade da invenção a composição compreendendo uma primeira região Fc compreende uma substituição selecionada a partir do grupo consistindo em: G237A, G237T, G237Q e G237R.

[00250] A composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 43 a 50, em que a primeira região Fc compreende uma substituição G237Q.

[00251] A composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 43 a 50, em que a primeira região Fc compreende uma substituição G237T.

[00252] Em uma modalidade da invenção a composição compreendendo uma primeira região Fc compreende uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: G236R, e G236K.

[00253] Em uma modalidade da invenção a composição compreendendo uma primeira região Fc compreende uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: G236R, G236K e E269K. Em uma modalidade da invenção a composição compreendendo uma primeira região Fc compreende uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: G236R e E269K. Em uma modalidade da invenção a composição compreendendo uma primeira região Fc compreende uma substituição G263R ou uma G236K.

[00254] Em uma modalidade da invenção a composição compreendendo uma primeira região Fc compreende uma substituição selecionada a partir do grupo consistindo em: K322E e K322A.

[00255] Em uma modalidade da invenção a composição compreendendo uma primeira região Fc compreende uma substituição P329R.

[00256] Em uma modalidade da invenção a composição compreendendo uma primeira região Fc compreende uma G236R substituição.

[00257] Em uma modalidade da invenção a composição compreendendo uma primeira região Fc compreende uma substituição de aminoácido na posição P329.

[00258] Em uma modalidade da invenção a composição compreendendo uma primeira região Fc compreende uma substituição selecionada a partir do grupo consistindo em: P329R, P329A, P329T, P329Q, P329R, P329S, P329N, P329D, P329E, P329K, P329V, P329M, P329I, P329L, P329H, P329F, P329Y, P329W e P329P.

[00259] Em uma modalidade da invenção a composição compreendendo uma primeira região Fc compreende uma substituição selecionada a partir do grupo consistindo em: P329R, P329K, P329E, P329D e P329A.

[00260] Em uma modalidade da invenção a composição compreendendo uma primeira região Fc compreende uma substituição P329R.

[00261] Em uma modalidade da invenção a composição compreendendo uma primeira região Fc compreende uma substituição K322A.

[00262] Em uma modalidade da invenção a composição compreendendo uma primeira região Fc compreende uma substituição E269K.

[00263] Em uma modalidade da invenção a composição compreendendo uma segunda região Fc compreende uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: G237A, K326A, K326W, E333A e E333S.

[00264] Em uma modalidade da invenção a composição compreendendo uma segunda região Fc compreende uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: K326A, K326W, E333A e E333S.

[00265] Em uma modalidade da invenção a composição

compreendendo uma segunda região Fc compreende uma substituição selecionada a partir do grupo consistindo em: K326A, K326W, E333A e E333S.

[00266] Em uma modalidade da invenção a composição compreendendo uma segunda região Fc compreende uma substituição G237A.

[00267] Em uma modalidade da invenção a composição compreendendo uma segunda região Fc compreende uma substituição K326A.

[00268] Em uma modalidade da invenção a composição compreendendo uma segunda região Fc compreende uma substituição E333S.

[00269] Em uma modalidade da invenção a composição compreendendo uma segunda região Fc compreende duas substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: K326A, K326W, E333A e E333S.

[00270] Em uma modalidade da invenção a composição compreendendo uma segunda região Fc compreende uma substituição K326W e E333S.

[00271] Em uma modalidade da invenção a composição compreendendo uma segunda região Fc compreende uma substituição K326A e E333A.

[00272] Em uma modalidade da invenção a composição compreendendo uma segunda região Fc compreende uma substituição G237A e uma E333S.

[00273] Em uma modalidade da presente invenção a composição compreendendo um primeiro e segundo anticorpos está presente na composição em uma razão molar de 1:50 a 50:1, tal como uma razão molar de 1:1, uma razão molar de 1:2, uma razão molar de 1:3, uma razão molar de 1:4, uma razão molar de 1:5, uma razão molar de 1:6, uma razão molar de 1:7,

uma razão molar de 1:8, uma razão molar de 1:9, uma razão molar de 1:10, uma razão molar de 1:15, uma razão molar de 1:20, uma razão molar de 1:25, uma razão molar de 1:30, uma razão molar de 1:35, uma razão molar de 1:40, uma razão molar de 1:45, uma razão molar de 1:50, uma razão molar de 50:1, uma razão molar de 45:1, uma razão molar de 40:1, uma razão molar de 35:1, uma razão molar de 30:1, uma razão molar de 25:1, uma razão molar de 20:1, uma razão molar de 15:1, uma razão molar de 10:1, uma razão molar de 9:1, uma razão molar de 8:1, uma razão molar de 7:1, uma razão molar de 6:1, uma razão molar de 5:1, uma razão molar de 4:1, uma razão molar de 3:1, uma razão molar de 2:1.

[00274] Em uma modalidade da presente invenção a composição compreendendo um primeiro anticorpo e um segundo anticorpo está presente na composição em uma razão molar de cerca de 1:50 a 50:1, tal como uma razão molar de cerca de 1:40 a 40:1, tal como uma razão molar de cerca de 1:30 a 30:1, tal como uma razão molar de cerca de 1:20 a 20:1, tal como uma razão molar de cerca de 1:10 a 10:1, tal como uma razão molar de cerca de 1:9 a 9:1, tal como uma razão molar de cerca de 1:5 a 5:1.

[00275] Em uma modalidade da presente invenção a composição compreendendo um primeiro e um segundo anticorpos e/ou qualquer polipeptídeo adicional está presente na composição em uma Razão Equimolar.

[00276] Em uma modalidade da presente invenção a composição de acordo com qualquer aspecto ou modalidade é uma composição farmacêutica.

[00277] Em um aspecto a presente invenção se refere a um método de esgotar uma população de célula expressando um primeiro antígeno e um segundo antígeno, cujo método compreende contatar a dita população de célula com um primeiro e segundo anticorpos ou composição de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui divulgada.

[00278] Em uma modalidade da presente invenção a população de

célula é uma população de célula de tumor, tal como uma população de célula de tumor hematológico ou uma população de célula de tumor sólido.

[00279] Em uma modalidade da invenção a população de célula é uma presente no sangue.

[00280] Em uma modalidade da invenção a população de célula é um leucócito, tal como uma população de célula leucocitária.

[00281] Em uma modalidade da invenção a população de célula é um subconjunto de uma população de célula leucocitária.

[00282] Em uma modalidade da invenção a população de célula é uma população de célula linfocitária.

[00283] Em uma modalidade da invenção a população de célula é uma população de célula B. Em uma modalidade da invenção a população de célula é um subconjunto de uma população de célula B.

[00284] Em uma modalidade da invenção a população de célula é uma população de célula T. Em uma modalidade da invenção a população de célula é um subconjunto de uma população de célula T. Em uma modalidade da invenção a população de célula é uma célula T reguladora, tal como uma população de célula T reguladora.

[00285] Em uma modalidade da invenção a população de célula é uma população de célula NK.

[00286] Em uma modalidade da invenção a população de célula é célula supressora derivada de mielóide.

Aplicações terapêuticas

[00287] O primeiro e segundo anticorpos, anticorpos biespecíficos ou composições de acordo com qualquer aspecto ou modalidade da presente invenção podem ser usados como um medicamento, isto é para aplicações terapêuticas.

[00288] Em um aspecto a presente invenção provê um primeiro e segundo anticorpos ou uma composição de acordo com qualquer aspecto ou

modalidade aqui divulgados para o uso como um medicamento.

[00289] Em um outro aspecto a presente invenção provê um anticorpo ou uma composição de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui divulgada para o uso no tratamento de câncer, doença autoimune, doença inflamatória ou doença infecciosa.

[00290] Em um outro aspecto a presente invenção se refere a um método de tratar um indivíduo tendo uma doença compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um primeiro e segundo anticorpos ou composição de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui divulgados.

[00291] Em aspectos a invenção se refere a um método de tratar um indivíduo tendo uma doença compreendendo administrar ao dito indivíduo uma quantidade eficaz de um primeiro e um segundo anticorpos de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui descritos ou uma quantidade eficaz de uma composição de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui descritos.

[00292] Em uma modalidade da invenção a doença é selecionada a partir do grupo de: câncer, doença autoimune, doença inflamatória e doença infecciosa.

[00293] Em uma modalidade da invenção o método compreende administrar um agente terapêutico adicional.

[00294] Em uma modalidade da invenção o método de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui divulgada se refere a administrar adicionalmente um agente terapêutico adicional.

[00295] Em uma modalidade da invenção o agente terapêutico adicional é um ou mais agente(s) anticâncer selecionado(s) a partir do grupo consistindo em produtos quimioterapêuticos (incluindo mas não limitados a paclitaxel, temozolomida, cisplatina, carboplatina, oxaliplatina, irinotecano, doxorubicina, gencitabina, 5-fluorouracila, pemetrexed), inibidores de cinase (incluindo mas não limitados ao sorafenib, sunitinib ou everolimus), agentes

moduladores de apoptose (incluindo mas não limitados ao TRAIL humano recombinante ou birinapant), inibidores RAS, inibidores de proteassoma (incluindo mas não limitados a bortezomib), inibidores da histona desacetilase (incluindo mas não limitados ao vorinostat), produtos nutracêuticos, citocinas (incluindo mas não limitadas ao IFN- γ), anticorpos ou miméticos de anticorpo (incluindo mas não limitados aos anticorpos anti-EGFR, anti-IGF-1R, anti-VEGF, anti-CD20, anti-CD38, anti-HER2, anti-PD-1, anti-PD-L1, anti-CTLA4, anti-CD40, anti-CD137, anti-GITR e miméticos de anticorpo), conjugados de anticorpo-fármaco.

Kit-de-partes

[00296] Deve ser entendido que as modalidades descritas abaixo com referência a um primeiro e segundo anticorpos se referem aos anticorpos compreendendo uma região Fc de uma imunoglobulina e uma região de ligação a antígeno.

[00297] A invenção também se refere a kit-de-partes para o uso simultâneo, separado ou sequencial em terapia compreendendo um primeiro e segundo anticorpos como aqui descritos. Além disso, tais primeiro e segundo podem ser obtidos de acordo com qualquer método aqui descrito.

[00298] Em um aspecto a presente invenção se refere a um Kit de partes compreendendo um anticorpo ou composição de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui descritos, em que os ditos primeiro e segundo anticorpos ou composição estão em um ou mais recipientes tais como frascos.

[00299] Em uma modalidade da presente invenção o kit de partes compreende um primeiro e segundo anticorpos ou uma composição de acordo com qualquer aspecto ou modalidade aqui descritos, para uso simultâneo, separado ou sequencial em terapia.

[00300] Em um outro aspecto, a presente invenção se refere ao uso de um primeiro e segundo anticorpos, uma composição ou kit-de-partes de acordo com qualquer uma das modalidades aqui descritas para o uso em um

método de diagnóstico.

[00301] Em um outro aspecto, a presente invenção se refere a um método de diagnóstico compreendendo administrar um primeiro e segundo anticorpos, uma composição ou um Kit-de-partes de acordo com qualquer modalidade aqui descrita a pelo menos uma parte do corpo de um ser humano ou outros mamíferos.

[00302] Em um outro aspecto, a presente invenção se refere ao uso de um primeiro e segundo anticorpos, uma composição ou kit-de-partes de acordo com qualquer uma das modalidades aqui descritas no imageamento de pelo menos uma parte do corpo de um ser humano ou outros mamíferos.

[00303] Em um outro aspecto, a presente invenção se refere a um método para o imageamento de pelo menos uma parte do corpo de um ser humano ou outros mamíferos, compreendendo administrar um primeiro e segundo anticorpos, uma composição ou um Kit-de-partes de acordo com qualquer modalidade aqui descrita.

Usos Adicionais

[00304] Deve ser entendido que as modalidades descritas abaixo com referência a um primeiro e segundo anticorpos se referem a um primeiro e segundo anticorpos cada um compreendendo uma região Fc de uma imunoglobulina e uma região de ligação a antígeno.

[00305] Em um aspecto adicional, a invenção se refere a um primeiro e segundo anticorpos da invenção como descrito acima para o uso como um medicamento, em particular para o uso como um medicamento para o tratamento de doenças ou distúrbios. Os exemplos de tais doenças e distúrbios incluem, sem limitação, câncer, doenças autoimunes, doenças inflamatórias, doenças infecciosas, infecções bacterianas, virais ou fúngicas.

[00306] Em um outro aspecto, a presente invenção se refere a um primeiro e segundo anticorpos, anticorpos biespecíficos, composições e kit-de-partes aqui descritos, para o tratamento de uma doença, tal como câncer.

[00307] Em um outro aspecto, a presente invenção se refere a um método para o tratamento de uma doença humana, compreendendo a administração de um primeiro e segundo anticorpos, uma composição ou um Kit-de-partes aqui descritos.

[00308] Em um outro aspecto, a presente invenção se refere a um método para o tratamento de câncer em um ser humano compreendendo a administração de um primeiro e segundo anticorpos, uma composição ou um Kit-de-partes.

[00309] “Tratamento” se refere à administração de uma quantidade eficaz de um composto terapeuticamente ativo da presente invenção com o propósito de aliviar, melhorar, deter ou erradicar (curar) sintomas ou estados de doença.

[00310] Uma “quantidade eficaz” ou “quantidade terapeuticamente eficaz” se refere a uma quantidade eficaz, nas dosagens e por períodos de tempo necessários, para alcançar um resultado terapêutico desejado. Uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo pode variar de acordo com fatores tais como o estado de doença, idade, sexo e peso do indivíduo e a capacidade do anticorpo para evocar uma resposta desejada no indivíduo. Uma quantidade terapeuticamente eficaz também é uma na qual quaisquer efeitos tóxicos ou nocivos do anticorpo ou porção do anticorpo são superados pelos efeitos terapeuticamente benéficos.

Dosagens

[00311] Deve ser entendido que as modalidades descritas abaixo com referência a um anticorpo se refere a um anticorpo compreendendo uma região Fc de uma imunoglobulina e uma região de ligação a antígeno, um anticorpo também pode ser um anticorpo multiespecífico tal como um anticorpo biespecífico tendo uma primeira região Fc de uma imunoglobulina e uma primeira região de ligação a antígeno e um segundo polipeptídeo ou anticorpo tendo uma segunda região Fc de uma imunoglobulina e uma

segunda região de ligação a antígeno.

[00312] As dosagens e os regimes de dosagem eficientes para um anticorpo dependem da doença ou condição a serem tratadas e podem ser determinadas pelas pessoas versadas na técnica. Uma faixa exemplar, não limitante para uma quantidade terapêuticamente eficaz de um anticorpo da presente invenção é de cerca de 0,1 a 100 mg/kg, tal como de cerca de 0,1 a 50 mg/kg, por exemplo de cerca de 0,1 a 20 mg/kg, tal como de cerca de 0,1 a 10 mg/kg, por exemplo de cerca de 0,5, cerca de tal como 0,3, cerca de 1, cerca de 3, cerca de 5 ou cerca de 8 mg/kg.

[00313] Os anticorpos da presente invenção também podem ser administrados em terapia de combinação, isto é, combinados com outros agentes terapêuticos relevantes para a doença ou condição a serem tratados. Consequentemente, em uma modalidade, o medicamento contendo anticorpo é para combinação com um ou mais agentes terapêuticos adicionais, tais como um agente citotóxico, quimioterapêutico ou antiangiogênico. Tal administração combinada pode ser simultânea, separada ou sequencial.

[00314] Em uma modalidade adicional, a presente invenção provê um método para tratar ou prevenir doença, tal como câncer, cujo método compreende a administração a um sujeito em necessidade do mesmo de uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma variante ou composição farmacêutica da presente invenção, em combinação com radioterapia e/ou cirurgia.

Método de preparação

[00315] Deve ser entendido que as modalidades descritas abaixo com referência a um anticorpo se referem a um anticorpo compreendendo uma região Fc de uma imunoglobulina e uma região de ligação a antígeno, um anticorpo também pode ser um anticorpo multiespecífico tendo uma primeira região Fc de uma imunoglobulina e uma primeira região de ligação a antígeno e um segundo anticorpo tendo uma segunda região Fc de uma imunoglobulina

e uma segunda região de ligação a antígeno.

[00316] A invenção também provê ácidos nucleicos e vetores isolados codificando um anticorpo de acordo com qualquer um dos aspectos descritos acima, assim como vetores e sistemas de expressão codificando os anticorpos. As construções, vetores e sistemas de expressão de ácido nucleico adequados para anticorpos e variantes dos mesmos são conhecidos na técnica e descritos nos Exemplos. Em modalidades onde a variante de anticorpo compreende não apenas uma cadeia pesada (ou fragmento contendo Fc da mesma) mas também uma cadeia leve, as sequências de nucleotídeo codificando as porções de cadeia pesada e leve podem estar presentes nos mesmos ou ácidos nucleicos ou vetores diferentes.

[00317] A invenção também provê um método para produzir, em uma célula hospedeira, um anticorpo de acordo com qualquer um dos aspectos descritos acima, em que o dito polipeptídeo ou anticorpo compreende pelo menos a região Fc de uma cadeia pesada, o dito método compreendendo as seguintes etapas:

- a) prover uma construção de nucleotídeo codificando a dita região Fc da dita variante,
- b) expressar a dita construção de nucleotídeo em uma célula hospedeira, e
- c) recuperar a dita variante de anticorpo a partir de uma cultura de célula da dita célula hospedeira.

[00318] Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo de cadeia pesada. Na maioria das modalidades, entretanto, o anticorpo também conterá uma cadeia leve e assim a dita célula hospedeira expressa adicionalmente uma construção codificando cadeia leve, no mesmo ou em um vetor diferente.

[00319] As células hospedeiras adequadas para a expressão recombinante de anticorpos são bem conhecidas na técnica e incluem células

CHO, HEK-293, Expi293, PER-C6, NS/0 e Sp2/0. Em uma modalidade, a dita célula hospedeira é uma célula que é capaz da glicosilação ligada a Asn de proteínas, por exemplo, uma célula eucariótica, tal como uma célula de mamífero, por exemplo, uma célula humana. Em uma modalidade adicional, a dita célula hospedeira é uma célula não humana que é geneticamente engenheirada para produzir glicoproteínas tendo glicosilação semelhante à humana ou humana. Os exemplos de tais células são *Pichia pastoris* geneticamente modificada (Hamilton *et al.*, Science 301 (2003) 1244-1246; Potgieter *et al.*, J. Biotechnology 139 (2009) 318-325) e *Lemna minor* geneticamente modificada (Cox *et al.*, Nature Biotechnology 12 (2006) 1591-1597).

[00320] Em uma modalidade, a dita célula hospedeira é uma célula hospedeira que não seja capaz de remover eficientemente resíduos K447 de lisina de terminal C de cadeias pesadas de anticorpo. Por exemplo, a Tabela 2 em Liu *et al.* (2008) J Pharm Sci 97: 2426 (aqui incorporada por referência) lista vários de tais sistemas de produção de anticorpo, por exemplo, Sp2/0, NS/0 ou glândula mamária transgênica (cabra), em que apenas a remoção parcial de lisinas do terminal C é obtida. Em uma modalidade, a célula hospedeira é uma célula hospedeira com mecanismo de glicosilação alterado. Tais células foram descritas na técnica e podem ser usadas como células hospedeiras nas quais expressar variantes da invenção para deste modo produzir um anticorpo com glicosilação alterada. Ver, por exemplo, Shields, R.L. *et al.* (2002) J. Biol. Chem. 277: 26733-26740; Umana *et al.* (1999) Nat. Biotech. 17: 176-1, assim como EP1176195; WO03/035835; e WO99/54342. Métodos adicionais para gerar glicoformas engenheiradas são conhecidos na técnica e incluem mas não são limitados àqueles descritos em 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; tecnologia Potelligent® (Biowa, Inc. Princeton, N.J.); tecnologia de engenheiramento de glicosilação GlycoMAb® (GLYCART biotechnology AG, Zurich, Suíça); US 20030115614; Okazaki *et al.*, 2004, JMB, 336: 1239-49.

[00321] A invenção também se refere a um anticorpo obtido ou obtenível pelo método da invenção descrito acima.

[00322] Em um aspecto adicional, a invenção se refere a uma célula hospedeira capaz de produzir um anticorpo da invenção. Em uma modalidade, a célula hospedeira foi transformada ou transfectada com uma construção de nucleotídeo da invenção.

[00323] A presente invenção é adicionalmente ilustrada pelos seguintes exemplos que não devem ser interpretados como limitações adicionais.

Tabela 1 Listagem de Sequências

SEQ ID NO	Nome		Sequência
SEQ ID NO 1	VH CAMPATH-1H		QVQLQESGPGLVLRPSQTLSTCTVSG <u>GFTFTDFY</u> MNWVRQ PPGRGLEWIGF <u>IRDKAKGYTT</u> TEYNPSVKGRVTMLVDTSK NQFSLRLSSVTAADTAVYYC <u>AREGHTAAPFDY</u> WGQGS LTVSS
SEQ ID NO 2	VH CAMPATH-1H CDR1		GFTFTDFY
SEQ ID NO 3	VH CAMPATH-1H CDR2		IRDKAKGYTT
SEQ ID NO 4	VH CAMPATH-1H CDR3		AREGHTAAPFDY
SEQ ID NO 5	VL CAMPATH-1H		DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKAS <u>QNIDKY</u> LNWYQQKP GKAPKLLIYN <u>NTN</u> LQTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQPE DIATYYC <u>LQHISRPR</u> TFGQGTKVEIK
SEQ ID NO 6	VL CAMPATH-1H CDR1		QNIDKY
	VL CAMPATH-1H CDR2		NTN
SEQ ID NO 7	VL CAMPATH-1H CDR3		LQHISRPR
SEQ ID NO 8	VH CD20- 11B8		EVQLVQSGGGLVHPGGSLRLSCTGSG <u>GFTFSYHA</u> MHWVR QAPGKGLEWVS <u>IIGTGGVT</u> YYADSVKGRFTISRDNVKN SLYLQMNLSRAEDMAVYYC <u>ARDYYGAGSFYDGLYGM</u> <u>DVWGQGT</u> TVTVSS
SEQ ID NO 9	VH CD20- 11B8 CDR1		GFTFSYHA
SEQ ID NO 10	VH CD20- 11B8 CDR2		IIGTGGVT

SEQ ID NO	Nome		Sequência
SEQ ID NO 11	VH CD20-11B8 CDR3		ARDYYGAGSFYDGLYGMDV
SEQ ID NO 12	VL CD20-11B8		EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS <u>QSVSSY</u> LAWYQQKPG QAPRLLIY <u>DASN</u> RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDF AVYYC <u>QQRSDWPLT</u> FGGGTKVEIK
SEQ ID NO 13	VL CD20-11B8 CDR1		QSVSSY
	VL CD20-11B8 CDR2		DAS
SEQ ID NO 14	VL CD20-11B8 CDR3		QQRSDWPLT
SEQ ID NO 15	VH gp120-b12		QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQAS <u>GYRFSNFV</u> IHWVR QAPGQRFWMGW <u>INPYNGNK</u> EFSAKFQDRVTFADTSA NTAYMELRSLRSADTAVYYC <u>ARVGPYSWDDSPQDNYY MDV</u> WGKGTIVVSS
SEQ ID NO 16	VH gp120-b12 CDR1		GYRFSNFV
SEQ ID NO 17	VH gp120-b12 CDR2		INPYNGNK
SEQ ID NO 18	VH gp120-b12 CDR3		ARVGPYSWDDSPQDNYYMDV
SEQ ID NO 19	VL gp120-b12		EIVLTQSPGTLSPGERATFSCRSS <u>HSIRSRR</u> VAWYQHQP QAPRLVIH <u>GVS</u> NRASGISDRFSGSGSGTDFTLTITRVEPE DFALYYC <u>QVYGASSYT</u> FGQGTKLERK
SEQ ID NO 20	VL gp120-b12 CDR1		HSIRSRR
	VL gp120-b12 CDR2		GVS
SEQ ID NO 21	VL gp120-b12-CDR3		QVYGASSYT
SEQ ID NO 22	região constante de HC humana IgG1m(f)		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNH YTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO 23	região constante de HC humana IgG1m(z)		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDK <u>K</u> VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNH YTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO 24	região constante de HC humana IgG1m(a)		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE <u>EL</u> TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNH YTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO	Nome		Sequência
SEQ ID NO 25	região constante de HC humana IgG1m(x)		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEGLHNH YTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO 26	região constante de HC humana IgG1m(f)-E430G		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHGLHNH YHTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO 27	região constante de HC humana IgG1m(f)-E345K		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRKPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO 28	região constante de HC humana IgG1m(f)-E345R		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRRPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO 29	região constante de HC humana IgG1m(f)-K439E		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQESLSLSPGK
SEQ ID NO 30	região constante de HC humana IgG1m(f)-S440K		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO	Nome		Sequência
SEQ ID NO 31	região constante de HC humana IgG2		ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYT CNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPPCAPPVAGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNGKLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
SEQ ID NO 32	região constante de HC humana IgG3		ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQT YTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSC DTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV QFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNY NTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSCVMHEA LHNRFTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO 33	região constante de HC humana IgG4		ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTQTYT CNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCSCVMHEALHNHYTQK SLSLSLGK
SEQ ID NO 34	Região constante LC capa humana		RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC
SEQ ID NO 35	VH CD20-7D8		EVQLVESGGGLVQPDRSLRLSCAAS GFTFHDYA MHWVR QAPGKGLEWVST ISWNSGTIGY ADSVKGRFTISRDNANKN SLYLQMNSLR AEDTALYYCA AKDIQYGNYYYYGMDV WGQ GTTVTVSS
SEQ ID NO 36	VH CD20-7D8 CDR1		GFTFHDYA
SEQ ID NO 37	VH CD20-7D8 CDR2		ISWNSGTI
SEQ ID NO 38	VH CD20-7D8 CDR3		AKDIQYGNYYYYGMDV
SEQ ID NO 39	VL CD20-7D8		EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS QSVSSY LAWYQQKPG QAPRLLIY DAS NRATGIPARFSGSGGTDFLTISLEPEDF AVYYC QQRSNWPIT FGQGTRLEIK
SEQ ID NO 40	VL CD20-7D8 CDR1		QSVSSY
	VL CD20-7D8 CDR2		DAS
SEQ ID NO 41	VL CD20-7D8 CDR3		QQRSNWPIT
SEQ ID NO 42	VH CD37-37-3		QVQVKESGPGLVAPSQSL SITCTVSG GFSLTTSG VSWVRQP PGKGLEWLGVI IWGDGST NYHSALKSRLSIKKDHKSQVF LKLNSLQTD D TATYYCA AKGGYSLAH WGQGLTVTVSA
SEQ ID NO 43	VH CD37-37-3 CDR1		GFSLTTSG
SEQ ID NO 44	VH CD37-37-3 CDR2		IWGDGST
SEQ ID NO 45	VH CD37-37-3 CDR3		AKGGYSLAH

SEQ ID NO	Nome		Sequência
SEQ ID NO 46	VL CD37-37-3		DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASE <u>ENIRSN</u> LAWYQQKQGKSPQLLVN <u>VAT</u> NLADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLSQSEDFGTYYC <u>QHYWGTTWT</u> FGGGTKLEIK
SEQ ID NO 47	VL CD37-37-3 CDR1		ENIRSN
	VL CD37-37-3 CDR2		VAT
SEQ ID NO 48	VL CD37-37-3 CDR3		QHYWGTTWT
SEQ ID NO 49	VH hDR5-01-G56T		EVQLQQSGAEVVKPGASVKLSCKAS <u>GFNIKDTF</u> FIHWVKQAPGQGLEWIGRIDPANTNTKYDPKFQGKATITTTDSSNTAYMELSSLRSEDTAVYYC <u>VRGLYTYFFDY</u> WGQGTLLVTVSS
SEQ ID NO 50	VH hDR5-01-G56T CDR1		GFNIKDTF
SEQ ID NO 51	VH hDR5-01-G56T CDR2		IDPANTNT
SEQ ID NO 52	VH hDR5-01-G56T CDR3		VRGLYTYFFDY
SEQ ID NO 53	VL hDR5-01-G56T		EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRAS <u>QISISNN</u> LHWYQQKPGQAPRLLIK <u>FAS</u> QSITGIPARFSGSGSGTEFTLTISLSQSEDFAVYYC <u>QQGNSWPYT</u> TFGQGTKLEIK
SEQ ID NO 54	VL hDR5-01-G56T CDR1		QISISNN
	VL hDR5-01-G56T CDR2		FAS
SEQ ID NO 55	VL hDR5-01-G56T CDR3		QQGNSWPYT
SEQ ID NO 56	VH hDR5-05		QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKAS <u>GFNIKDTH</u> MHWVRQAPGQRLEWIGRIDPANGNTEYDQKFQGRVTITVDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYC <u>ARWGTNVYFAY</u> WGQGTLLTVSS
SEQ ID NO 57	VH hDR5-05 CDR1		GFNIKDTH
SEQ ID NO 58	VH hDR5-05 CDR2		IDPANGNT
SEQ ID NO 59	VH hDR5-05 CDR3		ARWGTNVYFAY
SEQ ID NO 60	VL hDR5-05		DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSAS <u>SSVSY</u> MYWYQQKPGKAPKPWIY <u>RTS</u> NLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC <u>QQYHSYPPT</u> TFGGGTKVEIK
SEQ ID NO 61	VL hDR5-05 CDR1		SSVSY
	VL hDR5-05 CDR2		RTS
SEQ ID NO 62	VL hDR5-05 CDR3		QQYHSYPPT
SEQ ID NO 63	região constante de HC humana IgG1m(f)-A327K-E430G	região constante de HC humana IgG1m(f)-A327K-E430G	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK <u>K</u> LPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHGALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO	Nome		Sequência
SEQ ID NO 64	região constante de HC humana IgG1m(f)-E345A-K439E-G236R	região constante de HC humana IgG1m(f)-G236R-E345A-K439E	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLRGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRAPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQESLSLSPGK
SEQ ID NO 65	região constante de HC humana IgG1m(f)-E345A-S440K-G237A	região constante de HC humana IgG1m(f)-G237A-E345A-S440K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRAPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKLSLSPGK
SEQ ID NO 66	região constante de HC humana IgG1m(f)-E345K-K439E-G236R	região constante de HC humana IgG1m(f)-G236R-E345K-K439E	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLRGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRKQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQESLSLSPGK
SEQ ID NO 67	região constante de HC humana IgG1m(f)-E345K-K439E-K322A	região constante de HC humana IgG1m(f)-K322A-E345K-K439E	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVS NKALPAPIEKTISKAKGQPRKQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQESLSLSPGK
SEQ ID NO 68	região constante de HC humana IgG1m(f)-E345K-S440K-E333S	região constante de HC humana IgG1m(f)-E333S-E345K-S440K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPISTISKAKGQPRKQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKLSLSPGK
SEQ ID NO 69	região constante de HC humana IgG1m(f)-E345Q-K439E-G236R	região constante de HC humana IgG1m(f)-G236R-E345Q-K439E	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLRGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQESLSLSPGK

SEQ ID NO	Nome		Sequência
SEQ ID NO 70	região constante de HC humana IgG1m(f)-E345Q-S440K-G237A	região constante de HC humana IgG1m(f)-G237A-E345Q-S440K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG <u>A</u> PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR <u>Q</u> PQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQK <u>K</u> LSLSPGK
SEQ ID NO 71	região constante de HC humana IgG1m(f)-E345R-E430G-K439E-G236R	região constante de HC humana IgG1m(f)-G236R-E345R-E430G-K439E	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL <u>R</u> G PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR <u>R</u> PQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH <u>G</u> ALHN HYTQ <u>E</u> SLSLSPGK
SEQ ID NO 72	região constante de HC humana IgG1m(f)-E345R-E430G-S440K-E333S	região constante de HC humana IgG1m(f)-E333S-E345R-E430G-S440K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPI <u>S</u> KTISKAKGQPR <u>R</u> PQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH <u>G</u> ALHN HYTQK <u>K</u> LSLSPGK
SEQ ID NO 73	região constante de HC humana IgG1m(f)-E345R-K439E-G236R	região constante de HC humana IgG1m(f)-G236R-E345R-K439E	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL <u>R</u> G PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR <u>R</u> PQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQ <u>E</u> SLSLSPGK
SEQ ID NO 74	região constante de HC humana IgG1m(f)-E345R-K439E-K322A	região constante de HC humana IgG1m(f)-K322A-E345R-K439E	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYK <u>C</u> AVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR <u>R</u> PQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQ <u>E</u> SLSLSPGK
SEQ ID NO 75	região constante de HC humana IgG1m(f)-E345V-K439E-G236R	região constante de HC humana IgG1m(f)-G236R-E345V-K439E	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL <u>R</u> G PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR <u>V</u> PQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQ <u>E</u> SLSLSPGK

SEQ ID NO	Nome		Sequência
SEQ ID NO 76	região constante de HC humana IgG1m(f)- E345V-S440K- G237A	região constante de HC humana IgG1m(f)- G237A- E345V- S440K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLG <u>A</u> PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR <u>Y</u> PQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQK <u>K</u> LSLSPGK
SEQ ID NO 77	região constante de HC humana IgG1m(f)- E345Y-K439E- G236R	região constante de HC humana IgG1m(f)- G236R- E345Y- K439E	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELL <u>R</u> G PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR <u>Y</u> PQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQ <u>E</u> LSLSPGK
SEQ ID NO 78	região constante de HC humana IgG1m(f)- E345Y-S440K- G237A	região constante de HC humana IgG1m(f)- G237A- E345Y- S440K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLG <u>A</u> PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR <u>Y</u> PQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQK <u>K</u> LSLSPGK
SEQ ID NO 79	região constante de HC humana IgG1m(f)- E430G	região constante de HC humana IgG1m(f)- E430G	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLG <u>G</u> PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH <u>G</u> ALHN HYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO 80	região constante de HC humana IgG1m(f)- E430G-K439E	região constante de HC humana IgG1m(f)- E430G- K439E	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLG <u>G</u> PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH <u>G</u> ALHN HYTQ <u>E</u> LSLSPGK
SEQ ID NO 81	região constante de HC humana IgG1m(f)- E430G-K439E- E269K	região constante de HC humana IgG1m(f)- E269K- E430G- K439E	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLG <u>G</u> PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH <u>K</u> DPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH <u>G</u> ALHN HYTQ <u>E</u> LSLSPGK

SEQ ID NO	Nome		Sequência
SEQ ID NO 82	região constante de HC humana IgG1m(f)-E430G-K439E-E333S	região constante de HC humana IgG1m(f)-E333S-E430G-K439E	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHGALHNHYTQESLSLSPGK
SEQ ID NO 83	região constante de HC humana IgG1m(f)-E430G-K439E-G236K	região constante de HC humana IgG1m(f)-G236K-E430G-K439E	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLKGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHGALHNHYTQESLSLSPGK
SEQ ID NO 84	região constante de HC humana IgG1m(f)-E430G-K439E-G236R	região constante de HC humana IgG1m(f)-G236R-E430G-K439E	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLRGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHGALHNHYTQESLSLSPGK
SEQ ID NO 85	região constante de HC humana IgG1m(f)-E430G-K439E-G237A	região constante de HC humana IgG1m(f)-G237A-E430G-K439E	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHGALHNHYTQESLSLSPGK
SEQ ID NO 86	região constante de HC humana IgG1m(f)-E430G-K439E-G237A-K322A	região constante de HC humana IgG1m(f)-G237A-K322A-E430G-K439E	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHGALHNHYTQESLSLSPGK
SEQ ID NO 87	região constante de HC humana IgG1m(f)-E430G-K439E-G237Q	região constante de HC humana IgG1m(f)-G237Q-E430G-K439E	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGQPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHGALHNHYTQESLSLSPGK

SEQ ID NO	Nome		Sequência
SEQ ID NO 88	região constante de HC humana IgG1m(f)-E430G-K439E-G237R	região constante de HC humana IgG1m(f)-G237R-E430G-K439E	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG <u>R</u> PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHG <u>A</u> LHNHYTQ <u>E</u> SLSLSPGK
SEQ ID NO 89	região constante de HC humana IgG1m(f)-E430G-K439E-G237T	região constante de HC humana IgG1m(f)-G237T-E430G-K439E	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG <u>T</u> PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHG <u>A</u> LHNHYTQ <u>E</u> SLSLSPGK
SEQ ID NO 90	região constante de HC humana IgG1m(f)-E430G-K439E-K322A	região constante de HC humana IgG1m(f)-K322A-E430G-K439E	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG <u>G</u> PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK <u>C</u> AVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHG <u>A</u> LHNHYTQ <u>E</u> SLSLSPGK
SEQ ID NO 91	região constante de HC humana IgG1m(f)-E430G-K439E-K322E	região constante de HC humana IgG1m(f)-K322E-E430G-K439E	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG <u>G</u> PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK <u>C</u> EVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHG <u>A</u> LHNHYTQ <u>E</u> SLSLSPGK
SEQ ID NO 92	região constante de HC humana IgG1m(f)-E430G-K439E-L234A	região constante de HC humana IgG1m(f)-L234A-E430G-K439E	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG <u>G</u> PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHG <u>A</u> LHNHYTQ <u>E</u> SLSLSPGK
SEQ ID NO 93	região constante de HC humana IgG1m(f)-L234A-E430G-K439E-L234A-L235A	região constante de HC humana IgG1m(f)-L234A-L235A-E430G-K439E	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG <u>G</u> PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHG <u>A</u> LHNHYTQ <u>E</u> SLSLSPGK

SEQ ID NO	Nome		Sequência
SEQ ID NO 94	região constante de HC humana IgG1m(f)-E430G-K439E-L234F	região constante de HC humana IgG1m(f)-L234F-E430G-K439E	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE <u>FL</u> GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMH <u>G</u> ALHNHYTQ <u>ES</u> LSLSPGK
SEQ ID NO 95	região constante de HC humana IgG1m(f)-E430G-K439E-L234F-L235E	região constante de HC humana IgG1m(f)-L234F-L235E-E430G-K439E	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE <u>FE</u> GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMH <u>G</u> ALHNHYTQ <u>ES</u> LSLSPGK
SEQ ID NO 96	região constante de HC humana IgG1m(f)-E430G-K439E-L235A	região constante de HC humana IgG1m(f)-L235A-E430G-K439E	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL <u>AG</u> GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMH <u>G</u> ALHNHYTQ <u>ES</u> LSLSPGK
SEQ ID NO 97	região constante de HC humana IgG1m(f)-E430G-K439E-L235E	região constante de HC humana IgG1m(f)-L235E-E430G-K439E	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL <u>EG</u> GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMH <u>G</u> ALHNHYTQ <u>ES</u> LSLSPGK
SEQ ID NO 98	região constante de HC humana IgG1m(f)-E430G-K439E-L235Q	região constante de HC humana IgG1m(f)-L235Q-E430G-K439E	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL <u>QG</u> GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMH <u>G</u> ALHNHYTQ <u>ES</u> LSLSPGK
SEQ ID NO 99	região constante de HC humana IgG1m(f)-E430G-K439E-N297Q	região constante de HC humana IgG1m(f)-N297Q-E430G-K439E	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY <u>Q</u> STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMH <u>G</u> ALHNHYTQ <u>ES</u> LSLSPGK

SEQ ID NO	Nome		Sequência
SEQ ID NO 100	região constante de HC humana IgG1m(f)-E430G-K439E-P329R	região constante de HC humana IgG1m(f)-P329R-E430G-K439E	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHGALHNHYTQESLSLSPGK
SEQ ID NO 101	região constante de HC humana IgG1m(f)-E430G-S440K	região constante de HC humana IgG1m(f)-E430G-S440K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHGALHNHYTQKLSLSPGK
SEQ ID NO 102	região constante de HC humana IgG1m(f)-E430G-S440K-E333A	região constante de HC humana IgG1m(f)-E333A-E430G-S440K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIAKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHGALHNHYTQKLSLSPGK
SEQ ID NO 103	região constante de HC humana IgG1m(f)-E430G-S440K-E333S	região constante de HC humana IgG1m(f)-E333S-E430G-S440K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPISTKISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHGALHNHYTQKLSLSPGK
SEQ ID NO 104	região constante de HC humana IgG1m(f)-E430G-S440K-G236R	região constante de HC humana IgG1m(f)-G236R-E430G-S440K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLRGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHGALHNHYTQKLSLSPGK
SEQ ID NO 105	região constante de HC humana IgG1m(f)-E430G-S440K-G237A	região constante de HC humana IgG1m(f)-G237A-E430G-S440K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHGALHNHYTQKLSLSPGK

SEQ ID NO	Nome		Sequência
SEQ ID NO 106	região constante de HC humana IgG1m(f)-E430G-S440K-G237A-E333S	região constante de HC humana IgG1m(f)-G237A-E333S-E430G-S440K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGAPS ~~V~~ FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI ~~S~~ KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS ~~D~~ GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV ~~F~~ SCSVMH ~~G~~ ALHNHYTQ ~~K~~ KLSLSPGK
SEQ ID NO 107	região constante de HC humana IgG1m(f)-E430G-S440K-G237Q	região constante de HC humana IgG1m(f)-G237Q-E430G-S440K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGQPS ~~V~~ FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS ~~D~~ GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV ~~F~~ SCSVMH ~~G~~ ALHNHYTQ ~~K~~ KLSLSPGK
SEQ ID NO 108	região constante de HC humana IgG1m(f)-E430G-S440K-G237R	região constante de HC humana IgG1m(f)-G237R-E430G-S440K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGRPS ~~V~~ FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS ~~D~~ GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV ~~F~~ SCSVMH ~~G~~ ALHNHYTQ ~~K~~ KLSLSPGK
SEQ ID NO 109	região constante de HC humana IgG1m(f)-E430G-S440K-K322E	região constante de HC humana IgG1m(f)-K322E-E430G-S440K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS ~~V~~ FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCE ~~V~~ SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS ~~D~~ GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV ~~F~~ SCSVMH ~~G~~ ALHNHYTQ ~~K~~ KLSLSPGK
SEQ ID NO 110	região constante de HC humana IgG1m(f)-E430G-S440K-K326A	região constante de HC humana IgG1m(f)-K326A-E430G-S440K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS ~~V~~ FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN ~~A~~ ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS ~~D~~ GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV ~~F~~ SCSVMH ~~G~~ ALHNHYTQ ~~K~~ KLSLSPGK
SEQ ID NO 111	região constante de HC humana IgG1m(f)-E430G-S440K-K326A-E333A	região constante de HC humana IgG1m(f)-K326A-E333A-E430G-S440K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS ~~V~~ FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN ~~A~~ ALPAPI ~~A~~ KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS ~~D~~ GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV ~~F~~ SCSVMH ~~G~~ ALHNHYTQ ~~K~~ KLSLSPGK

SEQ ID NO	Nome		Sequência
SEQ ID NO 112	região constante de HC humana IgG1m(f)-E430G-S440K-K326W	região constante de HC humana IgG1m(f)-K326W-E430G-S440K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNWALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHGALHNHYTQKKLSLSPGK
SEQ ID NO 113	região constante de HC humana IgG1m(f)-E430G-S440K	região constante de HC humana IgG1m(f)-N297Q-E430G-S440K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHGALHNHYTQKKLSLSPGK
SEQ ID NO 114	região constante de HC humana IgG1m(f)-E430G-S440K-P329R	região constante de HC humana IgG1m(f)-P329R-E430G-S440K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHGALHNHYTQKKLSLSPGK
SEQ ID NO 115	região constante de HC humana IgG1m(f)-E430N-K439E-G236R	região constante de HC humana IgG1m(f)-G236R-E430N-K439E	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLRGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHNALHNHYTQESLSLSPGK
SEQ ID NO 116	região constante de HC humana IgG1m(f)-E430N-S440K-G237A	região constante de HC humana IgG1m(f)-G237A-E430N-S440K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHNALHNHYTQKKLSLSPGK
SEQ ID NO 117	região constante de HC humana IgG1m(f)-E430T-K439E-G236R	região constante de HC humana IgG1m(f)-G236R-E430T-K439E	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLRGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHTALHNHYTQESLSLSPGK

SEQ ID NO	Nome		Sequência
SEQ ID NO 118	região constante de HC humana IgG1m(f)-E430T-S440K-G237A	região constante de HC humana IgG1m(f)-G237A-E430T-S440K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGA PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMH <u>T</u> ALHNNH YTQK <u>K</u> LSLSPGK
SEQ ID NO 119	região constante de HC humana IgG1m(f)-E430V-K439E-G236R	região constante de HC humana IgG1m(f)-G236R-E430V-K439E	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLRG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMH <u>V</u> ALHNNH YTQ <u>E</u> SLSLSPGK
SEQ ID NO 120	região constante de HC humana IgG1m(f)-E430V-S440K-G237A	região constante de HC humana IgG1m(f)-G237A-E430V-S440K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGA PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMH <u>V</u> ALHNNH YTQK <u>K</u> LSLSPGK
SEQ ID NO 121	região constante de HC humana IgG1m(f)-E430Y-K439E-G236R	região constante de HC humana IgG1m(f)-G236R-E430Y-K439E	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLRG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMH <u>Y</u> ALHNNH YTQ <u>E</u> SLSLSPGK
SEQ ID NO 122	região constante de HC humana IgG1m(f)-E430Y-S440K-G237A	região constante de HC humana IgG1m(f)-G237A-E430Y-S440K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGA PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMH <u>Y</u> ALHNNH YTQK <u>K</u> LSLSPGK
SEQ ID NO 123	região constante de HC humana IgG1m(f)-G236R-E430G	região constante de HC humana IgG1m(f)-G236R-E430G	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLRG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMH <u>G</u> ALHNNH HYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO	Nome		Sequência
SEQ ID NO 124	região constante de HC humana IgG1m(f)-G237A-E430G	região constante de HC humana IgG1m(f)-G237A-E430G	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG <u>A</u> PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHG <u>A</u> LHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO 125	região constante de HC humana IgG1m(f)-G237Q-E430G	região constante de HC humana IgG1m(f)-G237Q-E430G	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG <u>Q</u> PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHG <u>A</u> LHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO 126	região constante de HC humana IgG1m(f)-G237R-E430G	região constante de HC humana IgG1m(f)-G237R-E430G	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG <u>R</u> PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHG <u>A</u> LHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO 127	região constante de HC humana IgG1m(f)-G237T-E430G	região constante de HC humana IgG1m(f)-G237T-E430G	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG <u>T</u> PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHG <u>A</u> LHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO 128	região constante de HC humana IgG1m(f)-K248E-T437R-K439E-G236R	região constante de HC humana IgG1m(f)-G236R-K248E-T437R-K439E	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL <u>R</u> GPSVFLFPPKPK <u>E</u> DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMH <u>E</u> ALHNH <u>YRQES</u> LSLSPGK
SEQ ID NO 129	região constante de HC humana IgG1m(f)-K248E-T437R-K439E-G237Q	região constante de HC humana IgG1m(f)-G237Q-K248E-T437R-K439E	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG <u>Q</u> PSVFLFPPKPK <u>E</u> DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMH <u>E</u> ALHNH <u>YRQES</u> LSLSPGK

SEQ ID NO	Nome		Sequência
SEQ ID NO 130	região constante de HC humana IgG1m(f)-K248E-T437R-S440K-E333S	região constante de HC humana IgG1m(f)-K248E-E333S-T437R-S440K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGSPSVFLFPPKPEDTLNISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMH <u>E</u> ALHNHYRQK <u>K</u> LSLSPGK
SEQ ID NO 131	região constante de HC humana IgG1m(f)-K248E-T437R-S440K-G237A	região constante de HC humana IgG1m(f)-G237A-K248E-T437R-S440K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGAPSVFLFPPKPEDTLNISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMH <u>E</u> ALHNHYRQK <u>K</u> LSLSPGK
SEQ ID NO 132	região constante de HC humana IgG1m(f)-K322E-E430G	região constante de HC humana IgG1m(f)-K322E-E430G	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGSPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCEVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMH <u>G</u> ALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO 133	região constante de HC humana IgG1m(f)-P329R-E430G	região constante de HC humana IgG1m(f)-P329R-E430G	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGSPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMH <u>G</u> ALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO 134	região constante de HC humana IgG2-E430G	região constante de HC humana IgG2-E430G	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGLYSLSVVTVPSNFGTQTYT CNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMH <u>G</u> ALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO 135	região constante de HC humana IgG2-E430G-K439E	região constante de HC humana IgG2-E430G-K439E	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGLYSLSVVTVPSNFGTQTYT CNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMH <u>G</u> ALHNHYTQESLSLSPGK

SEQ ID NO	Nome		Sequência
SEQ ID NO 136	região constante de HC humana IgG2-E430G-K439E	região constante de HC humana IgG2-G236R-E430G-K439E	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYT CNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPPCAPPV <u>A</u> RPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNGKLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSGD SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMH <u>G</u> ALHNHYTQ <u>E</u> SL LSLSPGK
SEQ ID NO 137	região constante de HC humana IgG2-E430G-S440K	região constante de HC humana IgG2-E430G-S440K	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYT CNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPPCAPPVAGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNGKLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSGD SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMH <u>G</u> ALHNHYTQK <u>K</u> LSLSPGK
SEQ ID NO 138	região constante de HC humana IgG2-E430G-S440K-E333S	região constante de HC humana IgG2-E333S-E430G-S440K	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYT CNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPPCAPPVAGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNGKLPAPI <u>S</u> KTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSGD SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMH <u>G</u> ALHNHYTQK <u>K</u> LSLSPGK
SEQ ID NO 139	região constante de HC humana IgG3-E430G	região constante de HC humana IgG3-E430G	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSC DTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV QFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNY NTTPMLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSCVMH <u>G</u> ALHNRFTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO 140	região constante de HC humana IgG3-E430G-K439E	região constante de HC humana IgG3-E430G-K439E	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSC DTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV QFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNY NTTPMLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSCVMH <u>G</u> ALHNRFTQ <u>E</u> SLSLSPGK
SEQ ID NO 141	região constante de HC humana IgG3-E430G-K439E-G236R	região constante de HC humana IgG3-G236R-E430G-K439E	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSC DTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCAP ELL <u>R</u> GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV QFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNY NTTPMLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSCVMH <u>G</u> ALHNRFTQ <u>E</u> SLSLSPGK

SEQ ID NO	Nome		Sequência
SEQ ID NO 142	região constante de HC humana IgG3-E430G-S440K	região constante de HC humana IgG3-E430G-S440K	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSC DTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV QFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVS VLT VLVHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNY NTTPPMLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHG ALHNRFTQK <u>KLSL</u> SPGK
SEQ ID NO 143	região constante de HC humana IgG3-E430G-S440K-E333S	região constante de HC humana IgG3-E333S-E430G-S440K	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSC DTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV QFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVS VLT VLVHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPI <u>S</u> KTISKTKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNY NTTPPMLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHG ALHNRFTQK <u>KLSL</u> SPGK
SEQ ID NO 144	região constante de HC humana IgG4-E430G-S228P	região constante de HC humana IgG4-S228P-E430G	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT KTYT CNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCP <u>P</u> CPAPEFLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLT VLVHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHG <u>G</u> ALHNHYTQ KLSLSLGK
SEQ ID NO 145	região constante de HC humana IgG4-E430G-K439E-S228P	região constante de HC humana IgG4-S228P-E430G-K439E	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT KTYT CNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCP <u>P</u> CPAPEFLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLT VLVHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHG <u>G</u> ALHNHYTQ <u>E</u> SLSLSLGK
SEQ ID NO 146	região constante de HC humana IgG4-E430G-K439E-S228P-G236R	região constante de HC humana IgG4-S228P-G236R-E430G-K439E	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT KTYT CNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCP <u>P</u> CPAPEFL <u>R</u> GPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLT VLVHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHG <u>G</u> ALHNHYTQ <u>E</u> SLSLSLGK
SEQ ID NO 147	região constante de HC humana IgG4-E430G-S440K-S228P	região constante de HC humana IgG4-S228P-E430G-S440K	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT KTYT CNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCP <u>P</u> CPAPEFLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLT VLVHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHG <u>G</u> ALHNHYTQ <u>KKLSL</u> SLGK

SEQ ID NO	Nome		Sequência
SEQ ID NO 148	região constante de HC humana IgG4-E430G-S440K-S228P-E333S	região constante de HC humana IgG4-S228P-E333S-E430G-S440K	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTKTYT CNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCP P CPAPEFLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIS S KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH G ALHNHYTQ K KLSLSLGK
SEQ ID NO 149	FCGR1AECDFcHis		MWFLTTLLLVVPVDGQVDTTKAVITLQPPWVSVFQEETV TLHCEVLHLPSSSTQWFLNGTATQTSTPSYRITSASVND GEYRCQRLSGRSDPIQLEIHRGWLLLQVSSRVFTEGEPLA LRCHAWKDKLVYNVLYYRNGKAFKFFHWNSNLITLKTNI SHNGTYHCSGMGKHRYTSAGISVTVKELFPAPVLNASVTS PLLEGNLVTLSCETKLLLQRPGLQLYFSFYMGSKTLRGRN TSSEYQILTARREDSGLYWCEAATEDGNVLKRSPELELQV LGLQLPTPVWFHHHHHHH
SEQ ID NO 150	diFCGR2AH-HisBAP		METQMSQNVCPRNWLWLQPLTVLLLLASADSQAAAPPKA VLKLEPPWINVLQEDSVTLTCQGARSPESDSIQWFHNGNLI PTHTQPSYRFKANNNDSGEYTCQTGQTSLSDPVHLTVLSE WLVLQTPHLEFQEGETIMLRCHSWKDKPLVKVTFQNGK SQKFSHLDPTFSIPQANSHSHSGDYHCTGNIGYTLFSSKPV TITVQVPSMGSSSPVAPPKAVLKLEPPWINVLQEDSVTLTC QARSPESDSIQWFHNGNLIPTHTQPSYRFKANNNDSGEY TCQTGQTSLSDPVHLTVLSEWLVLQTPHLEFQEGETIMLR CHSWKDKPLVKVTFQNGKSQKFSHLDPTFSIPQANSHSH SGDYHCTGNIGYTLFSSKPVTTITVQVPSMGSSSHHHHH HPGGGLNDIFEAQKIEWHE
SEQ ID NO 151	diFCGR2AR-HisBAP		MVLSLLYLLTALPGILSAAPPKAVLKLEPPWINVLQEDSV TLTCQGARSPESDSIQWFHNGNLIPTHTQPSYRFKANNND GEYTCQTGQTSLSDPVHLTVLSEWLVLQTPHLEFQEGETI MLRCHSWKDKPLVKVTFQNGKSQKFSRLDPTFSIPQAN SHSGDYHCTGNIGYTLFSSKPVTTITVQVPSMGSSSPA APPKAVLKLEPPWINVLQEDSVTLTCQGARSPESDSIQW FHNGNLIPTHTQPSYRFKANNNDSGEYTCQTGQTSLSDP VHLTVLS EWLVLQTPHLEFQEGETIMLRCHSWKDKPLVKVTFQNG KSQKFSRLDPTFSIPQANSHSHSGDYHCTGNIGYTLFSS KPVTTITVQVPSMGSSSPGSSSHHHHHHPGGGLNDIFE AQKIEWHE
SEQ ID NO 152	diFCGR2B-HisBAP		MVLSLLYLLTALPGILSAAPPKAVLKLEPPWINVLQEDSV TLTCRGTHSPESDSIQWFHNGNLIPTHTQPSYRFKANNND GEYTCQTGQTSLSDPVHLTVLSEWLVLQTPHLEFQEGETI VLRCHSWKDKPLVKVTFQNGKSKKFSRSDPNFSIPQAN SHSGDYHCTGNIGYTLTYSSKPVTTITVQAPSSSPMGPA APPKAVLKLEPPWINVLQEDSVTLTCRGTHSPESDSIQW FHNGNLIPTHTQPSYRFKANNNDSGEYTCQTGQTSLSDP VHLTVLS EWLVLQTPHLEFQEGETIVLRCHSWKDKPLVKVTFQNG KSKKFSRSDPNFSIPQANSHSHSGDYHCTGNIGYTLTY SSKPVTTITVQAPSSSPMGPGSSSHHHHHHPGGGLNDI FEAQKIEWHE

SEQ ID NO	Nome		Sequência
SEQ ID NO 153	diFCGR3AF-HisBAP		MVLSLLYLLTALPGISTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSV TLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSD GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPI HLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHNSDFYIPKAT LKDSGSYFCRGLFGSKNVSSSETVNITITQGSPMGSSSPSED PKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFH NESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLE VHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYL QNGKGRKYFHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLFGSKNV SETVNITITQGSPMGSSSPGPGSSSHHHHHHPGGGLNDIFE AQKIEWHE
SEQ ID NO 154	diFCGR3AV-HisBAP		MVLSLLYLLTALPGISTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSV TLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSD GEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPI HLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHNSDFYIPKAT LKDSGSYFCRGLVGSKNVSSSETVNITITQGSPMGSSSPSED LPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWF HNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLE VHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYL QNGKGRKYFHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLVGSKN VSSETVNITITQGSPMGSSSPGPGSSSHHHHHHPGGGLNDI FEAQKIEWHE
SEQ ID NO 155	FcRnECDHis		AESHLSELLYHLTAVSSPAPGTPAFWVSGWLGPQQYLSYNS LRGEAEPCGAWVWENQVSWYWEKETDRLRIKEKLFLEAF KALGGKGPYTLQGLLGCELGPDNTSVPTAKFALNGEEFM NFDLKQGTWGGDWPEALAISQRWQQQDKAANKELTFL FSCPHRLREHLERGRGNLEWKEPPSMRLKARPSSPGFSVL TCSAFSFPPELQLRFLRNGLAAGTGQGDGFPNSDGSFHA SSSLTVKSGDEHHYCCIVQHAGLAQPLRVELESPAKSSHH HHHH
SEQ ID NO 156	Microglobulina Beta2 B2M		IQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLK NGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPEKDEYACR VNHVTLSPQKIVKWDRDM
SEQ ID NO 157	região constante de HC humana IgG1m(f)-K326W-E430G-S440K-K326W-E333S	região constante de HC humana IgG1m(f)-K326W-E333S-E430G-S440K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNWALPAPISKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHGHALH NHYTQKQLSLSPGK
SEQ ID NO 158	região constante de HC humana IgG1m(f)-E345R-E430G-S440Y	região constante de HC humana IgG1m(f)-E345R-E430G-S440Y	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTKISKAKGQPRRPQVYTLPPSR EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHGHALH NHYTQKQLSLSPGK

SEQ ID NO	Nome		Sequência
SEQ ID NO 159	Her2ECDHis (TX1014- Her2ECDHis)		MELAAALCRWGLLLALLPPGAASTQVCTGTDMKLRLPASP ETHLDMLRHLHYQGCQVVQGNLELTYPNTASLSFLQDIQE VQGYVLIAHNQVRQVPLQRLRIVRGTQLFEDNYALAVLD NGDPLNNTTPVTGASPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNP QLCYQDTILWKDIFHKNNQLALTIDTNRSRACHPCSPMC KGSRCWGESSEDCQSLTRTVCAAGGCARCKGPLPTDCHE QCAAGCTGPKHSDCLACLFHNSGICELHCPALVTYNTDT FESMPNPEGRTYTFGASCVTACPYNYLSTDVGSCTLVCPH NQEVTAEDGTQRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLREVRVAV TSANIQEFAGCKKIFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQL QVFETLEEITGYLYISAWPDSLPLSVFQNLQVIRGRILHN GAYSLTLQGLGISWLGLRSLRELGSGLALIHNNHLCFVH TVPWDQLFRNPHQALLHTANRPEDECVEGLACHQLCAR GHCWGPPTQCVCNCSQFLRGQECVEECRVLQGLPREYVN ARHCLPCHPECPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPFP CVARCPSGVKPDLSPYMPIWKFPDEEGACQPCPINCTHSCV DLDDKGCPAEQRHHHHHH
SEQ ID NO 160	VH h2E8 (CD52)		EVHVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFTFSRYG</u> MSWVRQ APGKGLELVAM <u>MKTKGGRT</u> YYPDSVKGRFTISRDNANK SLYLQMNSLRAEDTAIYYC <u>ASDGY</u> WVGQTTVTVSS
SEQ ID NO 161	VH h2E8 CDR1		GFTFSRYG
SEQ ID NO 162	VH h2E8 CDR2		MKTKGGRT
SEQ ID NO 163	VH h2E8 CDR3		ASDGY
SEQ ID NO 164	VL h2E8		DVVMVTQTPLSLSVTLGQPASISCKSS <u>QSLHSDGKTY</u> LN WLQQRPGQSPRRLIY <u>LVSK</u> LDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGIYYC <u>WQGTHLWT</u> FGGGTKVEIK
SEQ ID NO 165	VL h2E8 CDR1		QSLHSDGKTY
	VL h2E8 CDR2		LVS
SEQ ID NO 166	VL h2E8 CDR3		WQGTHLWT
SEQ ID NO 167	VH HLA-DR- hul243		QVQLQQSGSELKKPGASVKVSKAS <u>GFTFTNYG</u> GMNWVK QAPGQGLKWMGW <u>INTYTREPTY</u> ADDFKGRFAFLDTSV STAYLQISSLKADDTAVYFC <u>ARDITAVVPTGFDY</u> WGQGS LVTVSS
SEQ ID NO 168	VH HLA-DR- hul243 CDR1		GFTFTNYG
SEQ ID NO 169	VH HLA-DR- hul243 CDR2		INTYTREP
SEQ ID NO 170	VH HLA-DR- hul243 CDR3		ARDITAVVPTGFDY
SEQ ID NO 171	VL HLA-DR- hul243		DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASE <u>ENIYSN</u> LAWYRQKPG KAPKLLVF <u>AAS</u> NLADGVPSRFSGSGSGTDYFTISSLPED IATYYC <u>QHFWTTPWA</u> FGGGTKLQIK
SEQ ID NO 172	VL HLA-DR- hul243 CDR1		ENIYSN
	VL HLA-DR- hul243 CDR2		AAS
SEQ ID NO 173	VL HLA-DR- hul243 CDR3		QHFWTTPWA
SEQ ID NO 174	VH HLA-DR- ID09C3		QVQLKESGPALVKPTQTLTLCTFS <u>GFSLSTSGVG</u> VGVWIR QPPGKALEWLAL <u>IDWDDDK</u> YYSTSLKTRLTISKDTSKNQ VVLTMNMDPVDATATYYC <u>ARSPRYRGAFDY</u> WGQGLV TVSS
SEQ ID NO 175	VH HLA-DR- ID09C3 CDR1		GFSLSTSGVG

SEQ ID NO	Nome		Sequência
SEQ ID NO 176	VH HLA-DR-1D09C3 CDR2		IDWDDDK
SEQ ID NO 177	VH HLA-DR-1D09C3 CDR3		ARSPRYRGAFDY
SEQ ID NO 178	VL HLA-DR-1D09C3		DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGS ESNIGNNNY VQWYQQL PGTAPKLLIY DNN QRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQS EDEADYYC QSYDMNVHV VFGGGTKLTVL
SEQ ID NO 179	VL HLA-DR-1D09C3 CDR1		ESNIGNNY
	VL HLA-DR-1D09C3 CDR2		DNN
SEQ ID NO 180	VL HLA-DR-1D09C3 CDR3		QSYDMNVHV
SEQ ID NO 181	VH huCLB-T3/4		EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSSYGM FWVRQ APGKGLEWVAT ISRYSRYI YYPDSVKGRFTISRDNKNSL YLQMNSLRAEDTAVYYC ARRPLYGSSPDY WGQGLTVTVSS
SEQ ID NO 182	VH huCLB-T3/4 CDR1		GFTFSSYG
SEQ ID NO 183	VH huCLB-T3/4 CDR2		ISRYSRYI
SEQ ID NO 184	VH huCLB-T3/4 CDR3		ARRPLYGSSPDY
SEQ ID NO 185	VL huCLB-T3/4		EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCAS SSVTY VHWYQKPG QAPRLLIY DTS KLASGIPARFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDF AVYYC FOGSGYPLT FGSGTKLEMR
SEQ ID NO 186	VL huCLB-T3/4 CDR1		SSVTY
	VL huCLB-T3/4 CDR2		DTS
SEQ ID NO 187	VL huCLB-T3/4 CDR3		FOGSGYPLT
SEQ ID NO 188	VH CD5 INSERT		EVQLQESGPGLVKPSQTLSTCSVT GYSITSGYY WHWIRQ FPGNKLEWMGY ISYSGFT NYKTSLINRISITHDTSENQFFL NLNSVTTEDTATYYC AGDRTGSWFAY WGQGLTVTVSS
SEQ ID NO 189	VH CD5 INSERT CDR1		GYSITSGYY
SEQ ID NO 190	VH CD5 INSERT CDR2		ISYSGFT
SEQ ID NO 191	VH CD5 INSERT CDR3		AGDRTGSWFAY
SEQ ID NO 192	VL CD5 INSERT		DIQVTQSPSSLSASLGERISLTCRTS QDISNY LNWFQKPKD GTFKRLIY ATSS LDGVPKRFGSGSGSDYSLTSSLESEDF ADYYC LQYASYPFT FGSGTKLEIK
SEQ ID NO 193	VL CD5 INSERT CDR1		QDISNY
	VL CD5 INSERT CDR2		ATS
SEQ ID NO 194	VL CD5 INSERT CDR3		LQYASYPFT
SEQ ID NO 195	VH DR4- chCTB007		EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTAS GFNIKDTY MHWVK QRPEQGLEWIGR IDPANGNT KYDPKFQGKATITADTSSNT AYLQLSSLTSEDYAVYYC AYYYVSNAWFTY WGQGLTVTVSA

SEQ ID NO	Nome		Sequência
SEQ ID NO 196	VH DR4- chCTB007 CDR1		GFNIKDTY
SEQ ID NO 197	VH DR4- chCTB007 CDR2		IDPANGNT
SEQ ID NO 198	VH DR4- chCTB007 CDR3		AYYYVSNAWFTY
SEQ ID NO 199	VL DR4- chCTB007		DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASENIYSNLEWYQQKQ GKSPQLLVYAAATNLADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQS EDFGSYYCQHF ~~WGTWT~~ FGGGTKLEIK
SEQ ID NO 200	VL DR4- chCTB007 CDR1		ENIYSN
	VL DR4- chCTB007 CDR2		AAT
SEQ ID NO 201	VL DR4- chCTB007 CDR3		QHF ~~WGTWT~~

[00324] Tabela definindo as substituições que foram testadas nos exemplos 5 a 23.

Substituição	Propósito
G4-S228P	Substituição específica de IgG4 que estabiliza a região de dobradiça G4 (inibe redução)
K248E	Estimulação de auto-oligomerização
L234A	Inibição da ligação de FcGamaR; inibição branda da ligação de C1q
L234F	Inibição da ligação de FcGamaR; inibição fraca da ligação de C1q
L235A	Inibição da ligação de FcGamaR; inibição branda da ligação de C1q
L235Q	Inibição da ligação de FcGamaR; inibição branda da ligação de C1q
L234A-L235A	Inibição da ligação de FcGamaR; inibição branda da ligação de C1q
L234F-L235E	Inibição da ligação de FcGamaR; inibição branda da ligação de C1q
G236R	Inibição da ligação de FcGamaR; inibição branda da ligação de C1q
G236K	Inibição da ligação de FcGamaR; inibição branda da ligação de C1q
G237A	Inibição da ligação de FcGamaR; inibição fraca da ligação de C1q
G237T	Inibição da ligação de FcGamaR; inibição fraca da ligação de C1q
G237Q	Inibição da ligação de FcGamaR; inibição branda da ligação de C1q
G237R	Inibição da ligação de FcGamaR; inibição intermediária da ligação de C1q
K322A	Inibição branda da ligação de C1q
K322E	Inibição forte da ligação de C1q
K326A	Estimulação da ligação de C1q
K326W	Estimulação da ligação de C1q
K326A-E333A	Estimulação da ligação de C1q
K326W-E333S	Estimulação da ligação de C1q
A327K	Inibição da ligação de FcGamaR; inibição intermediária da ligação de C1q
P329R	Inibição da ligação de FcGamaR; Inibição forte da ligação de C1q
E333A	Estimulação da ligação de C1q
E333S	Estimulação da ligação de C1q
E345K	Estimulação de auto-oligomerização
E345R	Estimulação de auto-oligomerização
E345A	Estimulação de auto-oligomerização
E345Q	Estimulação de auto-oligomerização
E345V	Estimulação de auto-oligomerização
E345Y	Estimulação de auto-oligomerização
E430G	Estimulação de auto-oligomerização
E430N	Estimulação de auto-oligomerização

Substituição	Propósito
E430T	Estimulação de auto-oligomerização
E430V	Estimulação de auto-oligomerização
E430Y	Estimulação de auto-oligomerização
T437R	Estimulação de auto-oligomerização
K439E	Inibição de auto-oligomerização
S440K	Inibição de auto-oligomerização

[00325] Tabela definindo as substituições inibidoras da auto-oligomerização.

Poli-peptídeo contendo a primeira região Fc	Poli-peptídeo contendo a segunda região Fc
K439E	S440K
S440K	K439E

[00326] Tabela definindo as substituições inibidoras da ligação de FcGamaR e inibidoras da ligação de C1q.

Substituição	Propósito
L234A	Inibição da ligação de FcGamaR; inibição branda da ligação de C1q
L234F	Inibição da ligação de FcGamaR; inibição fraca da ligação de C1q
L235A	Inibição da ligação de FcGamaR; inibição branda da ligação de C1q
L235Q	Inibição da ligação de FcGamaR; inibição branda da ligação de C1q
L234A-L235A	Inibição da ligação de FcGamaR; inibição branda da ligação de C1q
L234F-L235E	Inibição da ligação de FcGamaR; inibição branda da ligação de C1q
G236R	Inibição da ligação de FcGamaR; inibição branda da ligação de C1q
G236K	Inibição da ligação de FcGamaR; inibição branda da ligação de C1q
G237A	Inibição da ligação de FcGamaR; inibição fraca da ligação de C1q
G237T	Inibição da ligação de FcGamaR; inibição fraca da ligação de C1q
G237Q	Inibição da ligação de FcGamaR; inibição branda da ligação de C1q
G237R	Inibição da ligação de FcGamaR; inibição intermediária da ligação de C1q
A327K	Inibição da ligação de FcGamaR; inibição intermediária da ligação de C1q
P329R	Inibição da ligação de FcGamaR; Inibição forte da ligação de C1q

EXEMPLOS

Exemplo 1

Construções de expressão de anticorpo

[00327] Para a expressão de anticorpos humanos e humanizados aqui usados, as sequências de cadeia pesada variável (VH) e de cadeia leve variável (VL) foram preparadas pela síntese gênica (GeneArt Gene Synthesis; ThermoFisher Scientific) e clonadas em vetores de expressão pcDNA3.3 (ThermoFisher Scientific) contendo uma região constante de uma Cadeia pesada (HC) da IgG humana (região constante de HC da IgG1m(f) humana: SEQ ID NO: 22; região constante de HC da IgG2 humana: SEQ ID NO: 31; região constante de HC da IgG3 humana: SEQ ID NO: 32; ou região constante de HC da IgG4 humana: SEQ ID NO: 33) e ou a região constante da cadeia leve (LC) capa humana: SEQ ID NO: 34. As mutações desejadas

foram introduzidas pela síntese gênica. As variantes de anticorpo CD20 neste pedido tiveram as sequências VH e VL derivadas do anticorpo CD20 IgG1-CD20 a 11B8 previamente descrito (WO2004/035607; VH: SEQ ID NO: 8; VL: SEQ ID NO: 12). As variantes de anticorpo CD52 neste pedido tiveram as sequências VH e VL derivadas do anticorpo CD52 CAMPATH-1H previamente descrito (Crowe *et al.*, 1992 Clin Exp Immunol. 87(1): 105 a 110; VH: SEQ ID NO: 1; VL: SEQ ID NO: 5) e do anticorpo CD52 h2E8 previamente descrito (US2014/0127236; VH: SEQ ID NO: 160; VL: SEQ ID NO: 164). As variantes de anticorpo CD37 neste pedido tiveram as sequências VH e VL derivadas do anticorpo CD37 IgG1-CD37-37.3 previamente descrito (WO2011/112978; VH: SEQ ID NO: 42; VL: SEQ ID NO: 46). As variantes de anticorpo DR4 neste pedido tiveram as sequências VH e VL derivadas do anticorpo DR4 DR4-chCTB007 previamente descrito (US2009/0136503A1; VH: SEQ ID NO: 200; VL: SEQ ID NO: 204). As variantes de anticorpo DR5 neste pedido tiveram as sequências VH e VL derivadas do anticorpo DR5 DR5-01-G56T previamente descrito (WO 2017/093447; VH: SEQ ID NO: 49; VL: SEQ ID NO: 53) e DR5-05 (WO2014/009358; VH: SEQ ID NO: 56; VL: SEQ ID NO: 60). As variantes de anticorpo HLA-DR neste pedido tiveram as sequências VH e VL derivadas do anticorpo HLA-DR HLA-DR-hul243 previamente descrito (US8722047B2; VH: SEQ ID NO: 168; VL: SEQ ID NO: 172) e do anticorpo HLA-DR HLA-DR-1D09C3 previamente descrito (US7521047B2; VH: SEQ ID NO: 176; VL: SEQ ID NO: 180). As variantes de anticorpo CD3 neste pedido tiveram as sequências VH e VL derivadas do anticorpo CD3 huCLB-T3/4 previamente descrito (Parren *et al.*, Res. Immunol Nov-Dez 1991; 142(9): 749-63; VH: SEQ ID NO: 184; VL: SEQ ID NO: 188). As variantes de anticorpo CD5 neste pedido tiveram as sequências VH e VL derivadas do anticorpo CD5 CD5-INSERM previamente descrito (WO2010145895; VH: SEQ ID NO: 192; VL: SEQ ID NO: 196). O anticorpo de IgG1 humana b12,

um anticorpo específico de gp120 do HIV foi usado como um controle negativo em alguns experimentos (Barbas *et al.*, J Mol Biol. 5 de abril de 1993; 230(3): 812-23; VH: SEQ ID NO: 15; VL: SEQ ID NO: 19).

Construções de anticorpo de expressão transitória

[00328] As misturas de DNA plasmídico codificando as cadeias tanto pesadas quanto leves de anticorpos foram transitoriamente transfectadas em células Expi293F (Gibco, Cat No A14635) usando 293fectina (Life Technologies) essencialmente como descrito por Vink *et al.* (Vink *et al.*, 2014 Methods 65(1): 5-10). As concentrações de anticorpo nos sobrenadantes foram medidas pela absorbância a 280 nm. Os sobrenadantes contendo anticorpo foram diretamente usados em ensaios *in vitro* ou os anticorpos foram purificados como descrito abaixo.

Purificação de anticorpo e avaliação de qualidade

[00329] Os anticorpos foram purificados pela cromatografia de afinidade em Proteína A. Os sobrenadantes de cultura foram filtrados sobre um filtro sem saída de 0,20 µm e carregados em colunas MabSelect SuRe de 5 mL (GE Healthcare), lavados e eluídos com citrato de sódio a 0,02 M-NaOH, pH 3. Os eluídos foram carregados em uma coluna HiPrep Desalting (GE Healthcare) imediatamente depois da purificação e os anticorpos foram trocados de tampão dentro de tampão de NaH₂PO₄ a 12,6 mM, NaCl a 140 mM, pH 7,4 (B. Braun ou Thermo Fisher). Depois da troca de tampão, as amostras foram filtradas estéril em filtros sem saída de 0,2 µm. As proteínas purificadas foram analisadas pelos vários ensaios bioanalíticos incluindo eletroforese capilar sobre géis de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (CE-SDS) e cromatografia de exclusão de tamanho de alto desempenho (HP-SEC). A concentração foi medida pela absorbância a 280 nm. Os anticorpos purificados foram armazenados de 2 a 8°C.

Exemplo 2: Seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misto pela introdução da mutação P329R em IgG1-

CAMPATH-1H anti-CD52-K439E + IgG1-11B8-S440K anti-CD20 com uma mutação realçadora de interação de Fc-Fc E430G

[00330] O efeito da mutação P329R sobre a eficácia da CDC *in vitro* foi testado usando misturas de variantes de anticorpo IgG1-11B8 anti-CD20 e anticorpo IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52. Concentrações diferentes de anticorpos purificados (concentrações finais na faixa de 0,001 a 60,0 µg/mL) foram testadas em um ensaio da CDC *in vitro* nas células Wien 133 com 20% de NHS. Mutações diferentes foram introduzidas nos anticorpos IgG1-11B8 e IgG1-CAMPATH-1H: E430G, que induz interações Fc-Fc realçadas; P329R, que inibe a ligação direta de C1q aos anticorpos; e cada uma das mutações K439E ou S440K, que inibem a formação de complexos de anticorpo homo-hexaméricos através da inibição das interações Fc-Fc intermoleculares e promovem a formação de complexos de anticorpo hetero-hexaméricos através de interações Fc-Fc complementares cruzadas. Como controles, anticorpos únicos também foram misturados 1:1 com anticorpos de controle do isótipo IgG1-b12 ou IgG1-b12-E430G sem ligação para permitir a comparação direta das concentrações de componentes individuais e misturas compostas dos mesmos. Para o ensaio da CDC, $0,1 \times 10^6$ células Wien 133 (gentilmente providas pelo Dr. Geoff Hale, BioAnaLab Limited, Oxford, UK) em RPMI (Lonza, Cat No. BE12-115F) com 0,2% de albumina sérica bovina (BSA; Roche, Cat No. 10735086001) foram pré-incubadas em placas de 96 poços de fundo redondo de poliestireno (Greiner bio-a Cat # 650101) com série de concentração de anticorpos purificados em um volume total de 80 µL por 15 min em um agitador na RT. Em seguida, 20 µL de soro humano normal (NHS; Sanquin, Referência No. M0008) foram adicionados como uma fonte de complemento e incubadas em um incubador a 37°C por 45 min (20% de concentração de NHS final; 0,001 a 10,0 µg/mL de concentrações finais de anticorpo em diluições de 3 vezes). A reação foi interrompida colocando-se as placas em gelo antes de peletizar as células pela centrifugação e substituindo

o sobrenadante substituído por 20 µL de solução a 2 µg/mL de iodeto de propídio (PI; Sigma Aldrich, Cat No. P4170). O número de células positivas em PI foi determinado pela citometria de fluxo em um peneirador Intellicyt iQue (Westburg) e a porcentagem de lise foi calculada como (número de células positivas em PI / número total de células) x 100%. Os dados foram analisados usando valores de melhor ajuste de um ajuste de dose-resposta não linear usando concentrações transformadas em log no GraphPad PRISM e a área sob as curvas de dose-resposta de três réplicas experimentais foi calculada. Os valores das áreas sob a curva (AUC) relativos representam a normalização para lise mínima (0% com IgG1-b12) e lise máxima (100% com a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G).

[00331] Uma mistura 1:1 de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G + IgG1-11B8-E430G anti-CD20 (ambos contendo a SEQ ID NO: 26) induziu lise de célula eficiente das células Wiens 133 (a Figura 1 mostra seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E + IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 pela introdução da mutação P329R. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de soro humano normal (NHS) reunido. A eficácia da CDC é apresentada como (A) porcentagem de lise determinada pela porcentagem de células positivas em iodeto de propídio (PI) e (B) a área sob as curvas de dose-resposta (AUC), normalizadas para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00332] A **Figura 2** mostra a seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E + IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 pela introdução da mutação K322E. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como (A) porcentagem de lise determinada pela porcentagem de

células positivas em PI e (B) a AUC normalizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1- CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00333] A **Figura 3** mostra a seletividade da atividade da CDC pela introdução da mutação K322E em variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E + 11B8-E430G-S440K anti-CD20 nas linhagens de célula diferentes. os ensaios da CDC in vitro foram realizados com 30 µg/mL de anticorpo na presença de 20% de NHS usando linhagens de célula de linfoma de Burkitt Wien 133 (A), Daudi (B), Raji (C) e Ramos (D), linhagem de célula de linfoma linfoblástico agudo (ALL) REH (E), linhagem de célula de mieloma U266B1 (F) e linhagem de célula de linfoma de célula B U-698-M (G). A atividade da CDC é apresentada como a porcentagem de lise determinada pela porcentagem de células positivas em PI normalizadas por linhagem de célula para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e IgG1-CAMPATH-1H-E430G (100%) para REH, U266B1 e Wien 133 ou IgG1-11B8-E430G (100%) para Daudi, Raji, Ramos e U-698-M.

[00334] A **Figura 4** mostra seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E com uma mutação da inibição da ligação de C1q (G236R, K322A, E269K, K322E ou P329R) + IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI. A normalização foi realizada para a mistura de anticorpo de controle IgG1-b12-K439E + IgG1-b12-S440K sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00335] A **Figura 5** mostra seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-

E430G-K439E + IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 com uma mutação realçadora da ligação de C1q (E333S, K326W ou K326A/E333A). As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI. A normalização foi realizada para a mistura de anticorpo de controle IgG1-b12-K439E + IgG1-b12-S440K sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00336] A **Figura 6** mostra seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E com a mutação inibidora da ligação de C1q G236R (A), K322A (B), E269K (C), K322E (D) ou P329R (E) + IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 com uma mutação realçadora da ligação de C1q (E333S, K326W ou K326A/E333A). As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI. A normalização foi realizada para a mistura de anticorpo de controle IgG1-b12-K439E + IgG1-b12-S440K sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00337] A **Figura 7** mostra a ligação de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E com a mutação inibidora da ligação de C1q G236R ou K322A (A, B) e variantes de anticorpo de IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 com a mutação realçadora da ligação de C1q E333S (C, D) às linhagens de célula de linfoma humano Wien 133 (A, C) e Raji (B, D). A ligação de anticorpo foi testada pela citometria de fluxo. A ligação é expressa como média geométrica da intensidade de fluorescência (MFI). Como um controle negativo para a ligação, uma amostra sem anticorpo primário ou anticorpo anti-gp120 sem ligação IgG1-b12 foi usado.

[00338] A **Figura 8** mostra a capacidade de ADCC de variantes de

anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E com a mutação inibidora da ligação de C1q G236R ou K322A (A, C) e variantes de anticorpo de IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 com a mutação realçadora da ligação de C1q E333S (B, D). (A, B) Um Bioensaio repórter de ADCC foi realizado, em que células Raji alvos foram coincubadas com séries de diluição de anticorpo e células T Jurkat humanas estavelmente expressando FcγRIIIa de alta afinidade (V158) e um elemento de resposta de NFAT dirigindo a expressão de luciferase de vagalume. A produção de luciferase foi quantificada pela leitura da luminescência. (C, D) Um ensaio de ADCC com Európio TDA (EuTDA) in vitro foi realizado, em que as células Wien 133 alvos foram coincubadas com séries de diluição de anticorpo e PBMC humana (E:T 100:1). A lise de célula foi determinada medindo-se o sinal do quelato fluorescente EuTDA no sobrenadante.

[00339] A **Figura 9** mostra a seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas da interação Fc-Fc realçada IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-K439E com mutação inibidora da ligação de C1q G236R ou K322A + variantes da interação Fc-Fc realçada IgG1-11B8 anti-CD20-S440K com ou sem mutação realçadora da ligação de C1q E333S. As mutações realçadoras da interação Fc-Fc testadas foram E430G, E345K, E345R e E345R-E430G. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI e lise máxima. A normalização foi realizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00340] A **Figura 10** mostra a seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E com mutações moduladoras da ligação de C1q na posição G236 (G236R ou G236K) ou posição G237 (G237A, G237T, G237Q ou

G237R) ou a mutação dupla G237A-K322A + IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 com ou sem mutação moduladora da ligação de C1q E333S, E333A, K326A, K326W-E333S, G237A ou G237A-E333S. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI e lise máxima. A normalização foi realizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00341] A **Figura 11** mostra a seletividade da atividade da CDC pelas variantes de isótipo de anticorpo misturadas (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 estabilizada na dobradiça) de CAMPATH-1H-E430G-K439E anti-CD52 com ou sem mutação inibidora da ligação de C1q G236R + 11B8-E430G-S440K anti-CD20 com ou sem mutação realçadora da ligação de C1q E333S. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI. A normalização foi realizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00342] A **Figura 12** mostra seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E com ou sem mutação inibidora da ligação de C1q G236R ou K322A + anti-CD37 IgG1-CD37-37.3-E430G-S440K com ou sem mutação realçadora da ligação de C1q E333S nas células (A) Daudi e (B) Wien 133. As células alvos foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI. A normalização foi realizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-CD37-37.3-E430G (100%).

[00343] A **Figura 13** mostra citotoxicidade mediada por DR5 de (A)

variantes únicas de anticorpo ou (B) uma mistura agonista de variantes de anticorpo IgG1-DR5-01-G56T-E430G-K439E anti-DR5 com ou sem mutação inibidora da ligação de C1q G236R + IgG1-DR5-05-E430G-S440K com ou sem mutação realçadora da ligação de C1q E333S nas células de câncer pancreático humano BxPC-3. ensaio de viabilidade de três dias foi realizado e a viabilidade celular foi determinada usando o kit CellTiter-Glo.

[00344] A **Figura 14** mostra atividade da CDC pelas variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G com a mutação moduladora da ligação de C1q G237A, G236R, A327K, K322E ou P329R. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI. A normalização foi realizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação-S440K (0%; não mostrado) e IgG1-CAMPATH-1H-E430G (100%).

[00345] A **Figura 15** mostra a ligação de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E com a mutação inibidora da ligação de C1q G236R ou K322A (A, B, C) e variantes de anticorpo de IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 com a mutação realçadora da ligação de C1q E333S (D, E, F) ao FcRn humano. Um ELISA de FcRn foi realizado com 5 µg/mL de domínio extracelular recombinante revestido de FcRn humano (FcRnhsECDHis-B2M-BIO) e séries de diluição de anticorpo. A quantidade de anticorpos ligados foi determinada com um anticorpo anti-IgG1 humana de cabra conjugado a HRP e o substrato quimioluminescente ABTS. A absorbância foi medida a 405 nm.

[00346] A **Figura 16** mostra a taxa de depuração de 500 µg de anticorpo intravenosamente administrados em camundongos SCID. (A-C) A IgG humana total em amostras de plasma foi determinada pelo ELISA e plotada em uma curva de concentração versus tempo para (A) variantes IgG1-CAMPATH-1H, (B) variantes IgG1-11B8 e (C) combinações de variantes

IgG1-CAMPATH-1H + variantes IgG1-11B8. Cada ponto de dados representa a média +/- desvio padrão de amostras em triplicata. (D) A depuração até o dia 21 depois da administração do anticorpo foi determinada seguindo a fórmula $D \times 1.000 / AUC$ com D, dose injetada e AUC, área sob a curva da curva da concentração-tempo.

[00347] A **Figura 17** mostra a ligação de variantes de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E imobilizadas com as mutações de inibição da ligação de C1q G236R ou G237T e variantes IgG1-11B8-E430G-S440K com as mutações realçadoras da ligação de C1q K326A ou E333S aos ECD's biotinilados rotulados com His diméricos do alótipo FcγRIIA 131H (A), alótipo FcγRIIA 131R (B), FcγRIIB (C), alótipo FcγRIIA 158V (D) e alótipo FcγRIIA 158F (E) como testado nos ensaios de ELISA. a ligação é apresentada para amostra de 20 µg/mL de anticorpo em relação ao controle sem anticorpo (fundo) e ligação a IgG1-11B8-E430G-S440K (100%). A detecção foi realizada usando Estreptavidina-poliHRP e ABTS.

[00348] A **Figura 18** mostra a seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E anti-CD52 com ou sem uma mutação inibidora da ligação de C1q (G236R ou G237T) + IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 com mutação inibidora da ligação de FcγR G237A com ou sem a mutação realçadora da ligação de C1q E333S. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI e como lise a 40 µg/mL de IgG. A normalização foi realizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00349] A **Figura 19** mostra atividade seletiva de combinações de variantes de IgG1-CAMPATH-1H e IgG1-11B8 no sangue integral, determinada pela análise de citometria de fluxo de células sanguíneas. eixo Y:

Fração de células B (positivas em CD19 / negativas em CD3) ou Fração de células T (negativas em CD19/ positivas em CD3) da população de linfócito total (negativos em CD66b), depois de incubação durante a noite na presença de células efectoras. eixos X: grupos de tratamento diferentes. Os símbolos representam células de cinco doadores saudáveis diferentes, testados e duas incubações separadas por doador. (A) Atividade seletiva de IgG1-CAMPATH-1H-G236R-E430G-K439E misturados com IgG1-11B8-G237A-E430G-S440K. (B) Atividade seletiva de variantes de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E contendo uma mutação G237 adicional, misturada com IgG1-11B8-G237A-E430G-S440K. (C) Atividade seletiva de variantes de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E contendo uma mutação G236R ou G237 adicional, misturados com IgG1-11B8-G237A-E430G-S440K contendo uma mutação E333S realçadora da ligação de C1q adicional. (D) Profundidade de depleção de célula B pelos anticorpos alvejadores de célula B diferentes comparada com as combinações de anticorpo codependentes de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E com mutações adicionais G236R, G237Q ou G237R, misturados com IgG1-11B8-G237A-E430G-S440K. Eixo Y: representação na escala log da fração de células B determinada como acima.

[00350] A **Figura 20** mostra a seletividade da atividade da CDC nas linhagens de célula diferentes com diferentes níveis de expressão de CD20 e CD52 pela combinação de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E e variantes de anticorpo IgG1-11B8-E430G-S440K com uma mutação inibidora da ligação de C1q no componente anti-CD52 e uma mutação realçadora da ligação de C1q no componente anti-CD20. Ensaios da CDC in vitro foram realizados com 0,01 a 40 µg/mL de anticorpo na presença de 20% de NHS usando linhagens de célula de linfoma de Burkitt Daudi (A), Raji (B) e Ramos (C), linhagem de célula ALL REH (D) e linhagem de célula de linfoma de célula B U-698-M (E). A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI e como lise máxima.

A normalização foi realizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00351] A **Figura 21** mostra seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CD37-37.3-E430G-K439E anti-CD37 com ou sem uma mutação inibidora G236R C1q da ligação de + IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 com ou sem a mutação realçadora da ligação de C1q E333S. (A) células Daudi e (B) células WIL2-S foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI e como lise a 40 µg/mL de IgG. A normalização foi realizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CD37-37.3-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00352] A **Figura 22** mostra (A) ligação de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 com as mutações realçadoras da interação Fc:Fc E430G ou E345R, mutação inibidora da auto-oligomerização K439E, em combinação com qualquer uma das mutações inibidoras da ligação de FcγR e moduladoras da ligação de C1q G236R, G237A ou G237T à linhagem de célula de linfoma humano Wien 133. A ligação de anticorpo foi testada pela citometria de fluxo e é apresentada normalizada em relação ao valor Bmax de IgG1-Campath-1H do tipo selvagem (100%). Como um controle negativo para a ligação, um anticorpo anti-gp120 sem ligação IgG1-b12 foi usado. (B) A ligação máxima (Bmax) às células Raji pelas variantes de anticorpo IgG1-Campath-1H com mutações E430G e K439E, em combinação com qualquer uma das mutações moduladoras da ligação de C1q G236R, G237A ou G237T é mostrada normalizada em relação à ligação de IgG1-Campath-1H do tipo selvagem (C) Valores Kd aparentes de variantes de anticorpo IgG1-Campath-1H com mutações E430G e S440K, em combinação com qualquer uma das mutações moduladoras da ligação de C1q G236R,

G237A ou G237T às células Raji.

[00353] A **Figura 23** mostra a ligação de variantes de anticorpo de IgG1-11B8 anti-CD20 com a mutação realçadora da interação Fc-Fc E430G, mutação inibidora da auto-oligomerização S440K, em combinação com qualquer uma das mutações moduladoras da ligação de C1q K326A ou E333A (A) ou E333S, G237A ou G237A-E333S (B) à linhagem de célula de linfoma humano Raji. A ligação de anticorpo foi testada pela citometria de fluxo e é apresentada normalizada em relação ao valor Bmax de IgG1-11B8 tipo selvagem (100%). Como um controle negativo para a ligação, um anticorpo anti-gp120 sem ligação IgG1-b12 foi usado. (C, D) Ligação máxima (Bmax) às células Raji pelas variantes de anticorpo IgG1-11B8 com mutações E430G e S440K, em combinação com qualquer uma das mutações moduladoras da ligação de C1q K326A ou E333A (C) ou E333S, G237A ou G237A-E333S (D) é mostrada normalizada em relação à ligação de IgG1-11B8 tipo selvagem (E, F) Valores Kd aparentes de variantes de anticorpo IgG1-11B8 com mutações E430G e S440K, em combinação com qualquer uma das mutações moduladoras da ligação de C1q K326A ou E333A (E) ou E333S, G237A ou G237A-E333S (F) ligação às células Raji.

[00354] A **Figura 24** mostra a ligação de FcRn de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 e variantes de anticorpo IgG1-11B8 anti-CD20. (A, C) Ligação ao FcRn humano é mostrada para as variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 com mutação realçadora da interação Fc-Fc E430G, mutação inibidora da auto-oligomerização K439E e mutações moduladoras da ligação de C1q G237A ou G237T usando uma concentração de anticorpo de 40 µg/mL no (A) pH 6,0 ou (C) pH 7,4. (B, D) Ligação ao FcRn humano pelas variantes de anticorpo IgG1-11B8 anti-CD20 com mutação realçadora da interação Fc-Fc E430G, mutação inibidora da auto-oligomerização S440K e mutações moduladoras da ligação de C1q K326A, E333A, G237A ou G237A-E333S usando uma concentração de 40 µg/mL de

anticorpo no (B) pH 6,0 ou (D) pH 7,4. Um ELISA de FcRn foi realizado com 2 µg/mL de domínio extracelular recombinante revestido de FcRn humano (FcRnECDHis-B2M-BIO) e séries de diluição de anticorpo. A quantidade de anticorpos ligados foi determinada com um anticorpo anti-IgG1 humana de cabra conjugado a HRP e o substrato quimioluminescente ABTS. A absorbância foi medida a 405 nm.

[00355] A **Figura 25** mostra as concentrações da IgG humana total (hIgG) como medidas em amostras de sangue coletadas de camundongos injetados com IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 ou variantes de anticorpo anti-IgG1-11B8 ou misturas dos mesmos. (A) Concentração de hIgG total em amostras de sangue coletadas de camundongos injetados com IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G237Q ou IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R tipo selvagem. (B) Concentração de hIgG total em amostras de sangue coletadas de camundongos injetados com IgG1-11B8, IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A ou IgG1-11B8-E430G-S440K-E333S tipo selvagem. (C) Concentração de hIgG total em amostras de sangue coletadas de camundongos injetados com misturas de IgG1-CAMPATH-1H tipo selvagem + IgG1-11B8 ou misturas de IgG1-CAMPATH-1H e variantes de anticorpo IgG1-11B8 abrigando as mutações como em (A) e (B). Em todas as figuras, a linha pontilhada representa a concentração de IgG1 prognosticada no tempo para anticorpos de IgG1 do tipo selvagem nos camundongos SCID. (D) Depuração até dia 21 depois da administração do anticorpo foi determinada seguindo a fórmula $D \cdot 1000 / AUC$ com D, dose injetada e AUC, área sob a curva da curva da concentração-tempo.

[00356] A **Figura 26** mostra a concentração de C4d (em µg/ml) detectado em amostras incubadas com variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H, mutações que abrigam IgG1-11B8 e IgG1-b12 E430G, K439E ou S440K e G236R, G237A, G237Q ou G237R, depois da subtração

da concentração de C4d média detectada em amostras de controle negativo sem conter nenhum dos anticorpos. As amostras de controle positivo incluem variantes de anticorpo abrigando as mutações realçadoras da interação Fc-Fc E345R, E430G e S440Y (RGY).

[00357] A **Figura 27** mostra a ligação de C1q às células Wien 133 incubadas em gelo com soro humano normal como uma fonte de complemento, depois da opsonização com mutações abrigando variantes de anticorpos IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-11B8 e IgG1-b12 E430G, K439E ou S440K e G236R, G237T, K326A ou E333S, detectadas pela citometria de fluxo. Os valores de intensidade de fluorescência média foram normalizados para controlar reações sem anticorpo (0%) e o nível de topo de uma mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%), estimado pelo ajuste de um modelo de resposta agonista log. (A) ligação ao C1q de reações de controle. (B-D) Ligação ao C1q de (B) IgG1-CAMPATH-E430G-K439E, (C) IgG1-CAMPATH-E430G-K439E-G236R e (D) IgG1-CAMPATH-E430G-K439E-G237R, misturados com controle sem ligação IgG1-b12 ou variantes IgG1-11B8 diferentes.

[00358] A **Figura 28** mostra a ligação de FcγR pelas variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H-E430G e IgG1-11B8-E430G abrigando a mutação inibidora da auto-oligomerização K439E ou S440K e mutações moduladoras da ligação de C1q. (A-E) Ligação de variantes de anticorpo imobilizadas aos ECDs biotinilados diméricos rotulados com His como testado nos ensaios de ELISA, de (A) alótipo de alta afinidade FcγRIIA 131H, (B) alótipo de baixa afinidade FcγRIIA 131R, (C) FcγRIIB, (D) alótipo de alta afinidade FcγRIIA 158V ou (E) alótipo de baixa afinidade FcγRIIA 158F. (F) Ligação de FcγRIa imobilizado às variantes de anticorpo testadas no ELISA. A ligação é apresentada para amostras de 20 µg/mL de anticorpo e foi normalizada por experimento depois da subtração dos sinais em poços incubados sem anticorpo primário em relação ao sinal médio observado para

IgG1-CAMPATH-1H tipo selvagem (100%). A detecção foi realizada usando Estreptavidina-poliHRP e ABTS.

[00359] A **Figura 29** mostra seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52, IgG1-11B8 anti-CD20 e IgG1-h2E8 anti-CD52 pela introdução de mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e modulem a ligação de C1q. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC foi medida em três experimentos independentes e é apresentada como (A) a AUC calculada em média normalizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%) e (B) a porcentagem calculada em média de lise determinada pela positividade do cloreto de propídio em uma concentração de anticorpo de 40 µg/ml.

[00360] A **Figura 30** (A, B) mostra a eficácia na CDC de agente único e variantes de anticorpo combinadas IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G, IgG1-11B8 anti-CD20-E430G e IgG1-b12-E430G sem ligação a antígeno abrigoando mutações inibidoras da auto-oligomerização e mutações moduladoras da ligação de C1q como indicadas. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia e CDC são apresentadas como a AUC normalizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00361] A **Figura 31** mostra a ativação de linhagens de célula repórter Jurkat estavelmente expressando (A) FcγRIIa ou (B) FcγRIIIa, como medida pelo nível de luminescência (RLU), no cocultivo com células de linfoma Raji e concentrações diferentes das variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H e IgG1-11B8. os valores de luminescência foram normalizados por experimento em relação àqueles observados para a IgG1-b12 (0%) e IgG1-Campath-1H

tipo selvagem + IgG1-11B8 tipo selvagem (100%), antes de calcular a média em relação a três réplicas experimentais (FcγRIIa) ou duas (FcγRIIIa).

[00362] A **Figura 32** mostra CDC codependente nas células Wien 133 induzida pelas misturas das variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H e IgG1-11B8 abrigando mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e modulem a ligação de C1q em razões não equimolares. (A) CDC codependente induzida pelas misturas contendo razões de concentração equimolares e não equimolares de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R e IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A. (B) CDC codependente induzida pelas misturas contendo razões de concentração equimolares e não equimolares de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G237Q e IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A.

[00363] A **Figura 33** mostra a seletividade da atividade da CDC pelas misturas de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 com variantes IgG1-HLA-DR-huL243 anti-HLA-DR (A) ou variantes IgG1-HLA-DR-1D09C3 anti-HLA-DR (B) pela introdução de mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e inibam a ligação de C1q. Células Oci-Ly17 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de (A) IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-HLA-DR-huL243-E430G (100%) ou (B) IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-HLA-DR-1D09C3-E430G (100%).

[00364] A **Figura 34** mostra a atividade codependente seletiva da CDC de variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 e IgG1-11B8 anti-CD20 pela introdução de mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e inibam a ligação de C1q. A eficácia da CDC é mostrada para variantes de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E com cada uma das mutações L234A, L234A-L235A, L234F, L234F-L235E,

L235A, L235Q, G236R ou G237Q e misturas destas variantes com anticorpo IgG1-b12 de controle sem ligação ou IgG1-11B8-E430G-S440K. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00365] A **Figura 35** mostra a atividade codependente seletiva da CDC de variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 e IgG1-11B8 anti-CD20 pela introdução de mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e inibam a ligação de C1q. (A) eficácia da CDC de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H e IgG1-11B8 como um agente único ou misturas dos mesmos abrigo a interação de mutações realçadoras de Fc-Fc E430G, E430N, E430T, E430V, E430Y, E345A, E345K, E345Q, E345R ou E345Y, mutações inibidoras da auto-oligomerização K439E ou S440K e mutações inibidoras da ligação de C1q G236R ou G237A. (B) eficácia da CDC de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H e IgG1-11B8 como um agente único ou misturas dos mesmos abrigo a interação das mutações realçadoras de Fc-Fc E430G, E430N, E430T, E430V, E430Y, E345A, E345Q, E345V ou E345Y, mutações inibidoras da auto-oligomerização K439E ou S440K e mutações inibidoras da ligação de C1q G236R ou G237A. (C) Eficácia da CDC de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H e IgG1-11B8 como um agente único ou misturas dos mesmos abrigo a interação combinada das mutações realçadoras de Fc-Fc E430G, E430N, E430T, E430V, E430Y, E345A, E345Q, E345V ou E345Y, as mutações inibidoras da auto-oligomerização K439E ou S440K e as mutações inibidoras da ligação de C1q G236R ou G237A. (D) Eficácia da CDC de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H e IgG1-11B8 como um agente único ou misturas dos mesmos abrigo a interação das mutações realçadoras de Fc-Fc E430G ou K248E-T437R, mutações inibidoras da auto-oligomerização K439E ou S440K e mutações

moduladoras da ligação de C1q G236R, G237A ou E333S. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00366] A **Figura 36** mostra a CDC codependente nas células de linfoma Raji induzida pelas misturas das variantes de anticorpo IgG1-CD37-37-3 e IgG1-11B8 abrigando mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e modulem a ligação de C1q. (A) As áreas-sob-a-curva (AUC) relativas, normalizadas para lise mínima (0% com IgG1-b12) e lise máxima (100% com a mistura de IgG1-CD37-37-3-E430G + IgG1-11B8-E430G), da lise de célula induzida pelas variantes de anticorpo indicadas em diluição ou misturas das mesmas. (B) Porcentagem máxima de lise induzida pelas variantes de anticorpo indicadas e misturas das mesmas.

[00367] A **Figura 37** mostra a atividade codependente seletiva da CDC de variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 e IgG1-11B8 anti-CD20 pela introdução de mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e modulem a ligação de C1q. As amostras CLL de paciente foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a porcentagem de células B viáveis na incubação com as variantes de anticorpo. Os resultados usando amostras CLL dos pacientes 1 (A), 2 (B) e 3 (C) são mostrados.

[00368] A **Figura 38** mostra a fração of células B, células T CD4+ e células T CD8+ detectada pela citometria de fluxo depois da incubação de amostras de sangue integrais com misturas de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-huCLB-T3/4 e IgG1-CD5-INSERM abrigando mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e modulem a ligação de C1q. A porcentagem de (A) células B, (B) células T CD4+ e (C) células T CD8+ detectada em amostras de sangue integral de 4

doadores depois da incubação com as variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-huCLB-T3/4 e IgG1-b12 indicadas. A porcentagem de (D) células B, (E) células T CD4+ e (F) células T CD8+ detectada em amostras de sangue integral de 4 doadores depois da incubação com as variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-CD5-INSERM e IgG1-b12 indicadas. As frações foram calculadas como $[100\% \times (\text{contagem de célula na amostra} / \text{contagem de célula na 'amostra sem Ab'}) \times (\text{Contagem de granulócito 'amostra sem Ab'} / \text{Contagem de granulócito na amostra})]$.

[00369] A **Figura 39** mostra a ativação cooperativa da morte celular programada em células cancerosas pelas variantes de anticorpo anti-DR4 e anti-DR5 abrindo mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e inibam (G237T) ou realcem (K326W-E333S) a ligação de C1q. (A) A viabilidade de células de câncer pancreático humano BxPC-3 depois de uma incubação de 72h com as variantes de anticorpo indicadas. (B) A viabilidade das células cancerosas de cólon humano COLO 205 depois de uma incubação de 72h com as variantes de anticorpo indicadas. A porcentagem das células viáveis foi calculada usando a seguinte fórmula: % de células viáveis = $[(\text{luminescência da amostra de anticorpo} - \text{luminescência da amostra de estaurosporina}) / (\text{luminescência na amostra de anticorpo} - \text{luminescência na amostra de estaurosporina})] \times 100$.

[00370] A; ajustado para 100% na Figura 1 mostra seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E + IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 pela introdução da mutação P329R. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de soro humano normal (NHS) reunido. A eficácia da CDC é apresentada como (A) porcentagem de lise determinada pela porcentagem de células positivas em iodeto de propídio (PI) e (B) a área sob as curvas de dose-resposta (AUC), normalizadas para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a

mistura de IgG1- CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00371] A **Figura 2** mostra a seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E + IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 pela introdução da mutação K322E. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como (A) porcentagem de lise determinada pela porcentagem de células positivas em PI e (B) a AUC normalizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1- CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00372] A **Figura 3** mostra a seletividade da atividade da CDC pela introdução da mutação K322E em variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E + 11B8-E430G-S440K anti-CD20 nas linhagens de célula diferentes. os ensaios da CDC in vitro foram realizados com 30 µg/mL de anticorpo na presença de 20% de NHS usando linhagens de célula de linfoma de Burkitt Wien 133 (A), Daudi (B), Raji (C) e Ramos (D), linhagem de célula de linfoma linfoblástico agudo (ALL) REH (E), linhagem de célula de mieloma U266B1 (F) e linhagem de célula de linfoma de célula B U-698-M (G). A atividade da CDC é apresentada como a porcentagem de lise determinada pela porcentagem de células positivas em PI normalizadas por linhagem de célula para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e IgG1-CAMPATH-1H-E430G (100%) para REH, U266B1 e Wien 133 ou IgG1-11B8-E430G (100%) para Daudi, Raji, Ramos e U-698-M.

[00373] A **Figura 4** mostra seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E com uma mutação da inibição da ligação de C1q (G236R, K322A, E269K, K322E ou P329R) + IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo

na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI. A normalização foi realizada para a mistura de anticorpo de controle IgG1-b12-K439E + IgG1-b12-S440K sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00374] A **Figura 5** mostra seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E + IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 com uma mutação realçadora da ligação de C1q (E333S, K326W ou K326A/E333A). As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI. A normalização foi realizada para a mistura de anticorpo de controle IgG1-b12-K439E + IgG1-b12-S440K sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00375] A **Figura 6** mostra seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E com a mutação inibidora da ligação de C1q G236R (A), K322A (B), E269K (C), K322E (D) ou P329R (E) + IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 com uma mutação realçadora da ligação de C1q (E333S, K326W ou K326A/E333A). As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI. A normalização foi realizada para a mistura de anticorpo de controle IgG1-b12-K439E + IgG1-b12-S440K sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00376] A **Figura 7** mostra a ligação de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E com a mutação inibidora da ligação de C1q G236R ou K322A (A, B) e variantes de anticorpo de IgG1-

11B8-E430G-S440K anti-CD20 com a mutação realçadora da ligação de C1q E333S (C, D) às linhagens de célula de linfoma humano Wien 133 (A, C) e Raji (B, D). A ligação de anticorpo foi testada pela citometria de fluxo. A ligação é expressa como média geométrica da intensidade de fluorescência (MFI). Como um controle negativo para a ligação, uma amostra sem anticorpo primário ou anticorpo anti-gp120 sem ligação IgG1-b12 foi usado.

[00377] A **Figura 8** mostra a capacidade de ADCC de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E com a mutação inibidora da ligação de C1q G236R ou K322A (A, C) e variantes de anticorpo de IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 com a mutação realçadora da ligação de C1q E333S (B, D). (A, B) Um Bioensaio repórter de ADCC foi realizado, em que células Raji alvos foram coincubadas com séries de diluição de anticorpo e células T Jurkat humanas estavelmente expressando FcγRIIIa de alta afinidade (V158) e um elemento de resposta de NFAT dirigindo a expressão de luciferase de vagalume. A produção de luciferase foi quantificada pela leitura da luminescência. (C, D) Um ensaio de ADCC com Európio TDA (EuTDA) in vitro foi realizado, em que as células Wien 133 alvos foram coincubadas com séries de diluição de anticorpo e PBMC humana (E:T 100:1). A lise de célula foi determinada medindo-se o sinal do quelato fluorescente EuTDA no sobrenadante.

[00378] A **Figura 9** mostra a seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas da interação Fc-Fc realçada IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-K439E com mutação inibidora da ligação de C1q G236R ou K322A + variantes da interação Fc-Fc realçada IgG1-11B8 anti-CD20-S440K com ou sem mutação realçadora da ligação de C1q E333S. As mutações realçadoras da interação Fc-Fc testadas foram E430G, E345K, E345R e E345R-E430G. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas

em PI e lise máxima. A normalização foi realizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00379] A **Figura 10** mostra a seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E com mutações moduladoras da ligação de C1q na posição G236 (G236R ou G236K) ou posição G237 (G237A, G237T, G237Q ou G237R) ou a mutação dupla G237A-K322A + IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 com ou sem mutação moduladora da ligação de C1q E333S, E333A, K326A, K326W-E333S, G237A ou G237A-E333S. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI e lise máxima. A normalização foi realizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00380] A **Figura 11** mostra a seletividade da atividade da CDC pelas variantes de isótipo de anticorpo misturadas (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 estabilizada na dobradiça) de CAMPATH-1H-E430G-K439E anti-CD52 com ou sem mutação inibidora da ligação de C1q G236R + 11B8-E430G-S440K anti-CD20 com ou sem mutação realçadora da ligação de C1q E333S. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI. A normalização foi realizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00381] A **Figura 12** mostra seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E com ou sem mutação inibidora da ligação de C1q G236R ou K322A + anti-CD37 IgG1-CD37-37.3-E430G-S440K com ou sem mutação

realçadora da ligação de C1q E333S nas células (A) Daudi e (B) Wien 133. As células alvos foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI. A normalização foi realizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-CD37-37.3-E430G (100%).

[00382] A **Figura 13** mostra citotoxicidade mediada por DR5 de (A) variantes únicas de anticorpo ou (B) uma mistura agonista de variantes de anticorpo IgG1-DR5-01-G56T-E430G-K439E anti-DR5 com ou sem mutação inibidora da ligação de C1q G236R + IgG1-DR5-05-E430G-S440K com ou sem mutação realçadora da ligação de C1q E333S nas células de câncer pancreático humano BxPC-3. ensaio de viabilidade de três dias foi realizado e a viabilidade celular foi determinada usando o kit CellTiter-Glo.

[00383] A **Figura 14** mostra atividade da CDC pelas variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G com a mutação moduladora da ligação de C1q G237A, G236R, A327K, K322E ou P329R. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI. A normalização foi realizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação-S440K (0%; não mostrado) e IgG1-CAMPATH-1H-E430G (100%).

[00384] A **Figura 15** mostra a ligação de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E com a mutação inibidora da ligação de C1q G236R ou K322A (A, B, C) e variantes de anticorpo de IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 com a mutação realçadora da ligação de C1q E333S (D, E, F) ao FcRn humano. Um ELISA de FcRn foi realizado com 5 µg/mL de domínio extracelular recombinante revestido de FcRn humano (FcRnhsECDHis-B2M-BIO) e séries de diluição de anticorpo. A quantidade de anticorpos ligados foi determinada com um anticorpo anti-IgG1 humana de

cabra conjugado a HRP e o substrato quimioluminescente ABTS. A absorbância foi medida a 405 nm.

[00385] A **Figura 16** mostra a taxa de depuração de 500 µg de anticorpo intravenosamente administrados em camundongos SCID. (A-C) A IgG humana total em amostras de plasma foi determinada pelo ELISA e plotada em uma curva de concentração versus tempo para (A) variantes IgG1-CAMPATH-1H, (B) variantes IgG1-11B8 e (C) combinações de variantes IgG1-CAMPATH-1H + variantes IgG1-11B8. Cada ponto de dados representa a média +/- desvio padrão de amostras em triplicata. (D) A depuração até o dia 21 depois da administração do anticorpo foi determinada seguindo a fórmula $D \cdot 1.000 / AUC$ com D, dose injetada e AUC, área sob a curva da curva da concentração-tempo.

[00386] A **Figura 17** mostra a ligação de variantes de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E imobilizadas com as mutações de inibição da ligação de C1q G236R ou G237T e variantes IgG1-11B8-E430G-S440K com as mutações realçadoras da ligação de C1q K326A ou E333S aos ECD's biotinilados rotulados com His diméricos do alótipo FcγRIIA 131H (A), alótipo FcγRIIA 131R (B), FcγRIIB (C), alótipo FcγRIIIA 158V (D) e alótipo FcγRIIIA 158F (E) como testado nos ensaios de ELISA. a ligação é apresentada para amostra de 20 µg/mL de anticorpo em relação ao controle sem anticorpo (fundo) e ligação a IgG1-11B8-E430G-S440K (100%). A detecção foi realizada usando Estreptavidina-poliHRP e ABTS.

[00387] A **Figura 18** mostra a seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E anti-CD52 com ou sem uma mutação inibidora da ligação de C1q (G236R ou G237T) + IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 com mutação inibidora da ligação de FcγR G237A com ou sem a mutação realçadora da ligação de C1q E333S. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada

como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI e como lise a 40 µg/mL de IgG. A normalização foi realizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00388] A **Figura 19** mostra atividade seletiva de combinações de variantes de IgG1-CAMPATH-1H e IgG1-11B8 no sangue integral, determinada pela análise de citometria de fluxo de células sanguíneas. eixo Y: Fração de células B (positivas em CD19 / negativas em CD3) ou Fração de células T (negativas em CD19/ positivas em CD3) da população de linfócito total (negativos em CD66b), depois de incubação durante a noite na presença de células efectoras. eixos X: grupos de tratamento diferentes. Os símbolos representam células de cinco doadores saudáveis diferentes, testados e duas incubações separadas por doador. (A) Atividade seletiva de IgG1-CAMPATH-1H-G236R-E430G-K439E misturados com IgG1-11B8-G237A-E430G-S440K. (B) Atividade seletiva de variantes de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E contendo uma mutação G237 adicional, misturada com IgG1-11B8-G237A-E430G-S440K. (C) Atividade seletiva de variantes de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E contendo uma mutação G236R ou G237 adicional, misturados com IgG1-11B8-G237A-E430G-S440K contendo uma mutação E333S realçadora da ligação de C1q adicional. (D) Profundidade de depleção de célula B pelos anticorpos alvejadores de célula B diferentes comparada com as combinações de anticorpo codependentes de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E com mutações adicionais G236R, G237Q ou G237R, misturados com IgG1-11B8-G237A-E430G-S440K. Eixo Y: representação na escala log da fração de células B determinada como acima.

[00389] A **Figura 20** mostra a seletividade da atividade da CDC nas linhagens de célula diferentes com diferentes níveis de expressão de CD20 e CD52 pela combinação de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E e variantes de anticorpo IgG1-11B8-E430G-S440K com uma mutação inibidora da

ligação de C1q no componente anti-CD52 e uma mutação realçadora da ligação de C1q no componente anti-CD20. Ensaio da CDC in vitro foram realizados com 0,01 a 40 µg/mL de anticorpo na presença de 20% de NHS usando linhagens de célula de linfoma de Burkitt Daudi (A), Raji (B) e Ramos (C), linhagem de célula ALL REH (D) e linhagem de célula de linfoma de célula B U-698-M (E). A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI e como lise máxima. A normalização foi realizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00390] A **Figura 21** mostra seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CD37-37.3-E430G-K439E anti-CD37 com ou sem uma mutação inibidora G236R C1q da ligação de + IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 com ou sem a mutação realçadora da ligação de C1q E333S. (A) células Daudi e (B) células WIL2-S foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI e como lise a 40 µg/mL de IgG. A normalização foi realizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CD37-37.3-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00391] A **Figura 22** mostra (A) ligação de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 com as mutações realçadoras da interação Fc:Fc E430G ou E345R, mutação inibidora da auto-oligomerização K439E, em combinação com qualquer uma das mutações inibidoras da ligação de FcγR e moduladoras da ligação de C1q G236R, G237A ou G237T à linhagem de célula de linfoma humano Wien 133. A ligação de anticorpo foi testada pela citometria de fluxo e é apresentada normalizada em relação ao valor Bmax de IgG1-Campath-1H do tipo selvagem (100%). Como um controle negativo para a ligação, um anticorpo anti-gp120 sem ligação IgG1-b12 foi

usado. (B) A ligação máxima (Bmax) às células Raji pelas variantes de anticorpo IgG1-Campath-1H com mutações E430G e K439E, em combinação com qualquer uma das mutações moduladoras da ligação de C1q G236R, G237A ou G237T é mostrada normalizada em relação à ligação de IgG1-Campath-1H do tipo selvagem (C) Valores Kd aparentes de variantes de anticorpo IgG1-Campath-1H com mutações E430G e S440K, em combinação com qualquer uma das mutações moduladoras da ligação de C1q G236R, G237A ou G237T às células Raji.

[00392] A **Figura 23** mostra a ligação de variantes de anticorpo de IgG1-11B8 anti-CD20 com a mutação realçadora da interação Fc-Fc E430G, mutação inibidora da auto-oligomerização S440K, em combinação com qualquer uma das mutações moduladoras da ligação de C1q K326A ou E333A (A) ou E333S, G237A ou G237A-E333S (B) à linhagem de célula de linfoma humano Raji. A ligação de anticorpo foi testada pela citometria de fluxo e é apresentada normalizada em relação ao valor Bmax de IgG1-11B8 tipo selvagem (100%). Como um controle negativo para a ligação, um anticorpo anti-gp120 sem ligação IgG1-b12 foi usado. (C, D) Ligação máxima (Bmax) às células Raji pelas variantes de anticorpo IgG1-11B8 com mutações E430G e S440K, em combinação com qualquer uma das mutações moduladoras da ligação de C1q K326A ou E333A (C) ou E333S, G237A ou G237A-E333S (D) é mostrada normalizada em relação à ligação de IgG1-11B8 tipo selvagem (E, F) Valores Kd aparentes de variantes de anticorpo IgG1-11B8 com mutações E430G e S440K, em combinação com qualquer uma das mutações moduladoras da ligação de C1q K326A ou E333A (E) ou E333S, G237A ou G237A-E333S (F) ligação às células Raji.

[00393] A **Figura 24** mostra a ligação de FcRn de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 e variantes de anticorpo IgG1-11B8 anti-CD20. (A, C) Ligação ao FcRn humano é mostrada para as variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 com mutação realçadora da interação Fc-Fc

E430G, mutação inibidora da auto-oligomerização K439E e mutações moduladoras da ligação de C1q G237A ou G237T usando uma concentração de anticorpo de 40 µg/mL no (A) pH 6,0 ou (C) pH 7,4. (B, D) Ligação ao FcRn humano pelas variantes de anticorpo IgG1-11B8 anti-CD20 com mutação realçadora da interação Fc-Fc E430G, mutação inibidora da auto-oligomerização S440K e mutações moduladoras da ligação de C1q K326A, E333A, G237A ou G237A-E333S usando uma concentração de 40 µg/mL de anticorpo no (B) pH 6,0 ou (D) pH 7,4. Um ELISA de FcRn foi realizado com 2 µg/mL de domínio extracelular recombinante revestido de FcRn humano (FcRnECDHis-B2M-BIO) e séries de diluição de anticorpo. A quantidade de anticorpos ligados foi determinada com um anticorpo anti-IgG1 humana de cabra conjugado a HRP e o substrato quimioluminescente ABTS. A absorbância foi medida a 405 nm.

[00394] A **Figura 25** mostra as concentrações da IgG humana total (hIgG) como medidas em amostras de sangue coletadas de camundongos injetados com IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 ou variantes de anticorpo anti-IgG1-11B8 ou misturas dos mesmos. (A) Concentração de hIgG total em amostras de sangue coletadas de camundongos injetados com IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G237Q ou IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R tipo selvagem. (B) Concentração de hIgG total em amostras de sangue coletadas de camundongos injetados com IgG1-11B8, IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A ou IgG1-11B8-E430G-S440K-E333S tipo selvagem. (C) Concentração de hIgG total em amostras de sangue coletadas de camundongos injetados com misturas de IgG1-CAMPATH-1H tipo selvagem + IgG1-11B8 ou misturas de IgG1-CAMPATH-1H e variantes de anticorpo IgG1-11B8 abrigando as mutações como em (A) e (B). Em todas as figuras, a linha pontilhada representa a concentração de IgG1 prognosticada no tempo para anticorpos de IgG1 do tipo selvagem nos camundongos SCID. (D) Depuração até dia 21 depois da

administração do anticorpo foi determinada seguindo a fórmula $D \cdot 1000 / AUC$ com D, dose injetada e AUC, área sob a curva da curva da concentração-tempo.

[00395] A **Figura 26** mostra a concentração de C4d (em $\mu\text{g/ml}$) detectado em amostras incubadas com variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H, mutações que abrigam IgG1-11B8 e IgG1-b12 E430G, K439E ou S440K e G236R, G237A, G237Q ou G237R, depois da subtração da concentração de C4d média detectada em amostras de controle negativo sem conter nenhum dos anticorpos. As amostras de controle positivo incluem variantes de anticorpo abrigando as mutações realçadoras da interação Fc-Fc E345R, E430G e S440Y (RGY).

[00396] A **Figura 27** mostra a ligação de C1q às células Wien 133 incubadas em gelo com soro humano normal como uma fonte de complemento, depois da opsonização com mutações abrigando variantes de anticorpos IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-11B8 e IgG1-b12 E430G, K439E ou S440K e G236R, G237T, K326A ou E333S, detectadas pela citometria de fluxo. Os valores de intensidade de fluorescência média foram normalizados para controlar reações sem anticorpo (0%) e o nível de topo de uma mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%), estimado pelo ajuste de um modelo de resposta agonista log. (A) ligação ao C1q de reações de controle. (B-D) Ligação ao C1q de (B) IgG1-CAMPATH-E430G-K439E, (C) IgG1-CAMPATH-E430G-K439E-G236R e (D) IgG1-CAMPATH-E430G-K439E-G237R, misturados com controle sem ligação IgG1-b12 ou variantes IgG1-11B8 diferentes.

[00397] A **Figura 28** mostra a ligação de Fc γ R pelas variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H-E430G e IgG1-11B8-E430G abrigando a mutação inibidora da auto-oligomerização K439E ou S440K e mutações moduladoras da ligação de C1q. (A-E) Ligação de variantes de anticorpo imobilizadas aos ECDs biotinilados diméricos rotulados com His como

testado nos ensaios de ELISA, de (A) alótipo de alta afinidade FcγRIIA 131H, (B) alótipo de baixa afinidade FcγRIIA 131R, (C) FcγRIIB, (D) alótipo de alta afinidade FcγRIIA 158V ou (E) alótipo de baixa afinidade FcγRIIA 158F. (F) Ligação de FcγRIa imobilizado às variantes de anticorpo testadas no ELISA. A ligação é apresentada para amostras de 20 µg/mL de anticorpo e foi normalizada por experimento depois da subtração dos sinais em poços incubados sem anticorpo primário em relação ao sinal médio observado para IgG1-CAMPATH-1H tipo selvagem (100%). A detecção foi realizada usando Estreptavidina-poliHRP e ABTS.

[00398] A **Figura 29** mostra seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52, IgG1-11B8 anti-CD20 e IgG1-h2E8 anti-CD52 pela introdução de mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e modulem a ligação de C1q. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC foi medida em três experimentos independentes e é apresentada como (A) a AUC calculada em média normalizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%) e (B) a porcentagem calculada em média de lise determinada pela positividade do cloreto de propídio em uma concentração de anticorpo de 40 µg/ml.

[00399] A **Figura 30** (A, B) mostra a eficácia na CDC de agente único e variantes de anticorpo combinadas IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G, IgG1-11B8 anti-CD20-E430G e IgG1-b12-E430G sem ligação a antígeno abrigoando mutações inibidoras da auto-oligomerização e mutações moduladoras da ligação de C1q como indicadas. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia e CDC são apresentadas como a AUC normalizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-

CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00400] A **Figura 31** mostra a ativação de linhagens de célula repórter Jurkat estavelmente expressando (A) FcγRIIa ou (B) FcγRIIIa, como medida pelo nível de luminescência (RLU), no cocultivo com células de linfoma Raji e concentrações diferentes das variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H e IgG1-11B8. os valores de luminescência foram normalizados por experimento em relação àqueles observados para a IgG1-b12 (0%) e IgG1-Campath-1H tipo selvagem + IgG1-11B8 tipo selvagem (100%), antes de calcular a média em relação a três réplicas experimentais (FcγRIIa) ou duas (FcγRIIIa).

[00401] A **Figura 32** mostra CDC codependente nas células Wien 133 induzida pelas misturas das variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H e IgG1-11B8 abrigando mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e modulem a ligação de C1q em razões não equimolares. (A) CDC codependente induzida pelas misturas contendo razões de concentração equimolares e não equimolares de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R e IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A. (B) CDC codependente induzida pelas misturas contendo razões de concentração equimolares e não equimolares de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G237Q e IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A.

[00402] A **Figura 33** mostra a seletividade da atividade da CDC pelas misturas de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 com variantes IgG1-HLA-DR-huL243 anti-HLA-DR (A) ou variantes IgG1-HLA-DR-1D09C3 anti-HLA-DR (B) pela introdução de mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e inibam a ligação de C1q. Células Oci-Ly17 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de (A) IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-HLA-DR-huL243-E430G (100%) ou (B) IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-HLA-DR-

1D09C3-E430G (100%).

[00403] A **Figura 34** mostra a atividade codependente seletiva da CDC de variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 e IgG1-11B8 anti-CD20 pela introdução de mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e inibam a ligação de C1q. A eficácia da CDC é mostrada para variantes de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E com cada uma das mutações L234A, L234A-L235A, L234F, L234F-L235E, L235A, L235Q, G236R ou G237Q e misturas destas variantes com anticorpo IgG1-b12 de controle sem ligação ou IgG1-11B8-E430G-S440K. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00404] A **Figura 35** mostra a atividade codependente seletiva da CDC de variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 e IgG1-11B8 anti-CD20 pela introdução de mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e inibam a ligação de C1q. (A) eficácia da CDC de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H e IgG1-11B8 como um agente único ou misturas dos mesmos abrigoando a interação de mutações realçadoras de Fc-Fc E430G, E430N, E430T, E430V, E430Y, E345A, E345K, E345Q, E345R ou E345Y, mutações inibidoras da auto-oligomerização K439E ou S440K e mutações inibidoras da ligação de C1q G236R ou G237A. (B) eficácia da CDC de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H e IgG1-11B8 como um agente único ou misturas dos mesmos abrigoando a interação das mutações realçadoras de Fc-Fc E430G, E430N, E430T, E430V, E430Y, E345A, E345Q, E345V ou E345Y, mutações inibidoras da auto-oligomerização K439E ou S440K e mutações inibidoras da ligação de C1q G236R ou G237A. (C) Eficácia da CDC de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H e IgG1-11B8 como um agente único ou misturas dos mesmos abrigoando a interação combinada das mutações

realçadoras de Fc-Fc E430G, E430N, E430T, E430V, E430Y, E345A, E345Q, E345V ou E345Y, as mutações inibidoras da auto-oligomerização K439E ou S440K e as mutações inibidoras da ligação de C1q G236R ou G237A. (D) Eficácia da CDC de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H e IgG1-11B8 como um agente único ou misturas dos mesmos abrigoando a interação das mutações realçadoras de Fc-Fc E430G ou K248E-T437R, mutações inibidoras da auto-oligomerização K439E ou S440K e mutações moduladoras da ligação de C1q G236R, G237A ou E333S. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00405] A **Figura 36** mostra a CDC codependente nas células de linfoma Raji induzida pelas misturas das variantes de anticorpo IgG1-CD37-37-3 e IgG1-11B8 abrigoando mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e modulem a ligação de C1q. (A) As áreas-sob-a-curva (AUC) relativas, normalizadas para lise mínima (0% com IgG1-b12) e lise máxima (100% com a mistura de IgG1-CD37-37-3-E430G + IgG1-11B8-E430G), da lise de célula induzida pelas variantes de anticorpo indicadas em diluição ou misturas das mesmas. (B) Porcentagem máxima de lise induzida pelas variantes de anticorpo indicadas e misturas das mesmas.

[00406] A **Figura 37** mostra a atividade codependente seletiva da CDC de variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 e IgG1-11B8 anti-CD20 pela introdução de mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e modulem a ligação de C1q. As amostras CLL de paciente foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a porcentagem de células B viáveis na incubação com as variantes de anticorpo. Os resultados usando amostras CLL dos pacientes 1 (A), 2 (B) e 3 (C) são mostrados.

[00407] A **Figura 38** mostra a fração de células B, células T CD4+ e células T CD8+ detectada pela citometria de fluxo depois da incubação de amostras de sangue integrais com misturas de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-huCLB-T3/4 e IgG1-CD5-INSERM abrigando mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e modulem a ligação de C1q. A porcentagem de (A) células B, (B) células T CD4+ e (C) células T CD8+ detectada em amostras de sangue integral de 4 doadores depois da incubação com as variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-huCLB-T3/4 e IgG1-b12 indicadas. A porcentagem de (D) células B, (E) células T CD4+ e (F) células T CD8+ detectada em amostras de sangue integral de 4 doadores depois da incubação com as variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-CD5-INSERM e IgG1-b12 indicadas. As frações foram calculadas como $[100\% \times (\text{contagem de célula na amostra} / \text{contagem de célula na 'amostra sem Ab'}) \times (\text{Contagem de granulócito 'amostra sem Ab'} / \text{Contagem de granulócito na amostra})]$.

[00408] A **Figura 39** mostra a ativação cooperativa da morte celular programada em células cancerosas pelas variantes de anticorpo anti-DR4 e anti-DR5 abrigando mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e inibam (G237T) ou realcem (K326W-E333S) a ligação de C1q. (A) A viabilidade de células de câncer pancreático humano BxPC-3 depois de uma incubação de 72h com as variantes de anticorpo indicadas. (B) A viabilidade das células cancerosas de cólon humano COLO 205 depois de uma incubação de 72h com as variantes de anticorpo indicadas. A porcentagem das células viáveis foi calculada usando a seguinte fórmula: $\% \text{ de células viáveis} = [(\text{luminescência da amostra de anticorpo} - \text{luminescência da amostra de estaurosporina}) / (\text{luminescência na amostra de anticorpo} - \text{luminescência na amostra de estaurosporina})] \times 100$.

[00409] B), que foi verificado ser mais eficiente do que os anticorpos únicos separadamente (a Figura 1 mostra seletividade da atividade da CDC

pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E + IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 pela introdução da mutação P329R. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de soro humano normal (NHS) reunido. A eficácia da CDC é apresentada como (A) porcentagem de lise determinada pela porcentagem de células positivas em iodeto de propídio (PI) e (B) a área sob as curvas de dose-resposta (AUC), normalizadas para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00410] A **Figura 2** mostra a seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E + IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 pela introdução da mutação K322E. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como (A) porcentagem de lise determinada pela porcentagem de células positivas em PI e (B) a AUC normalizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00411] A **Figura 3** mostra a seletividade da atividade da CDC pela introdução da mutação K322E em variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E + 11B8-E430G-S440K anti-CD20 nas linhagens de célula diferentes. os ensaios da CDC in vitro foram realizados com 30 µg/mL de anticorpo na presença de 20% de NHS usando linhagens de célula de linfoma de Burkitt Wien 133 (A), Daudi (B), Raji (C) e Ramos (D), linhagem de célula de linfoma linfoblástico agudo (ALL) REH (E), linhagem de célula de mieloma U266B1 (F) e linhagem de célula de linfoma de célula B U-698-M (G). A atividade da CDC é apresentada como a porcentagem de lise determinada pela porcentagem de células positivas em PI normalizadas por linhagem de célula para o anticorpo de controle IgG1-b12

sem ligação (0%) e IgG1-CAMPATH-1H-E430G (100%) para REH, U266B1 e Wien 133 ou IgG1-11B8-E430G (100%) para Daudi, Raji, Ramos e U-698-M.

[00412] A **Figura 4** mostra seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E com uma mutação da inibição da ligação de C1q (G236R, K322A, E269K, K322E ou P329R) + IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI. A normalização foi realizada para a mistura de anticorpo de controle IgG1-b12-K439E + IgG1-b12-S440K sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00413] A **Figura 5** mostra seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E + IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 com uma mutação realçadora da ligação de C1q (E333S, K326W ou K326A/E333A). As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI. A normalização foi realizada para a mistura de anticorpo de controle IgG1-b12-K439E + IgG1-b12-S440K sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00414] A **Figura 6** mostra seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E com a mutação inibidora da ligação de C1q G236R (A), K322A (B), E269K (C), K322E (D) ou P329R (E) + IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 com uma mutação realçadora da ligação de C1q (E333S, K326W ou K326A/E333A). As células Wien 133 foram incubadas com série

de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI. A normalização foi realizada para a mistura de anticorpo de controle IgG1-b12-K439E + IgG1-b12-S440K sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00415] A **Figura 7** mostra a ligação de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E com a mutação inibidora da ligação de C1q G236R ou K322A (A, B) e variantes de anticorpo de IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 com a mutação realçadora da ligação de C1q E333S (C, D) às linhagens de célula de linfoma humano Wien 133 (A, C) e Raji (B, D). A ligação de anticorpo foi testada pela citometria de fluxo. A ligação é expressa como média geométrica da intensidade de fluorescência (MFI). Como um controle negativo para a ligação, uma amostra sem anticorpo primário ou anticorpo anti-gp120 sem ligação IgG1-b12 foi usado.

[00416] A **Figura 8** mostra a capacidade de ADCC de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E com a mutação inibidora da ligação de C1q G236R ou K322A (A, C) e variantes de anticorpo de IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 com a mutação realçadora da ligação de C1q E333S (B, D). (A, B) Um Bioensaio repórter de ADCC foi realizado, em que células Raji alvos foram coincubadas com séries de diluição de anticorpo e células T Jurkat humanas estavelmente expressando FcγRIIIa de alta afinidade (V158) e um elemento de resposta de NFAT dirigindo a expressão de luciferase de vagalume. A produção de luciferase foi quantificada pela leitura da luminescência. (C, D) Um ensaio de ADCC com Európio TDA (EuTDA) in vitro foi realizado, em que as células Wien 133 alvos foram coincubadas com séries de diluição de anticorpo e PBMC humana (E:T 100:1). A lise de célula foi determinada medindo-se o sinal do quelato fluorescente EuTDA no sobrenadante.

[00417] A **Figura 9** mostra a seletividade da atividade da CDC pelas

variantes de anticorpo misturadas da interação Fc-Fc realçada IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-K439E com mutação inibidora da ligação de C1q G236R ou K322A + variantes da interação Fc-Fc realçada IgG1-11B8 anti-CD20-S440K com ou sem mutação realçadora da ligação de C1q E333S. As mutações realçadoras da interação Fc-Fc testadas foram E430G, E345K, E345R e E345R-E430G. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI e lise máxima. A normalização foi realizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00418] A **Figura 10** mostra a seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E com mutações moduladoras da ligação de C1q na posição G236 (G236R ou G236K) ou posição G237 (G237A, G237T, G237Q ou G237R) ou a mutação dupla G237A-K322A + IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 com ou sem mutação moduladora da ligação de C1q E333S, E333A, K326A, K326W-E333S, G237A ou G237A-E333S. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI e lise máxima. A normalização foi realizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00419] A **Figura 11** mostra a seletividade da atividade da CDC pelas variantes de isótipo de anticorpo misturadas (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 estabilizada na dobradiça) de CAMPATH-1H-E430G-K439E anti-CD52 com ou sem mutação inibidora da ligação de C1q G236R + 11B8-E430G-S440K anti-CD20 com ou sem mutação realçadora da ligação de C1q E333S. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na

presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI. A normalização foi realizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00420] A **Figura 12** mostra seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E com ou sem mutação inibidora da ligação de C1q G236R ou K322A + anti-CD37 IgG1-CD37-37.3-E430G-S440K com ou sem mutação realçadora da ligação de C1q E333S nas células (A) Daudi e (B) Wien 133. As células alvos foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI. A normalização foi realizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-CD37-37.3-E430G (100%).

[00421] A **Figura 13** mostra citotoxicidade mediada por DR5 de (A) variantes únicas de anticorpo ou (B) uma mistura agonista de variantes de anticorpo IgG1-DR5-01-G56T-E430G-K439E anti-DR5 com ou sem mutação inibidora da ligação de C1q G236R + IgG1-DR5-05-E430G-S440K com ou sem mutação realçadora da ligação de C1q E333S nas células de câncer pancreático humano BxPC-3. ensaio de viabilidade de três dias foi realizado e a viabilidade celular foi determinada usando o kit CellTiter-Glo.

[00422] A **Figura 14** mostra atividade da CDC pelas variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G com a mutação moduladora da ligação de C1q G237A, G236R, A327K, K322E ou P329R. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI. A normalização foi realizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação-S440K (0%; não mostrado) e IgG1-CAMPATH-1H-E430G (100%).

[00423] A **Figura 15** mostra a ligação de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E com a mutação inibidora da ligação de C1q G236R ou K322A (A, B, C) e variantes de anticorpo de IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 com a mutação realçadora da ligação de C1q E333S (D, E, F) ao FcRn humano. Um ELISA de FcRn foi realizado com 5 µg/mL de domínio extracelular recombinante revestido de FcRn humano (FcRnhsECDHis-B2M-BIO) e séries de diluição de anticorpo. A quantidade de anticorpos ligados foi determinada com um anticorpo anti-IgG1 humana de cabra conjugado a HRP e o substrato quimioluminescente ABTS. A absorbância foi medida a 405 nm.

[00424] A **Figura 16** mostra a taxa de depuração de 500 µg de anticorpo intravenosamente administrados em camundongos SCID. (A-C) A IgG humana total em amostras de plasma foi determinada pelo ELISA e plotada em uma curva de concentração versus tempo para (A) variantes IgG1-CAMPATH-1H, (B) variantes IgG1-11B8 e (C) combinações de variantes IgG1-CAMPATH-1H + variantes IgG1-11B8. Cada ponto de dados representa a média +/- desvio padrão de amostras em triplicata. (D) A depuração até o dia 21 depois da administração do anticorpo foi determinada seguindo a fórmula $D \cdot 1.000 / AUC$ com D, dose injetada e AUC, área sob a curva da curva da concentração-tempo.

[00425] A **Figura 17** mostra a ligação de variantes de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E imobilizadas com as mutações de inibição da ligação de C1q G236R ou G237T e variantes IgG1-11B8-E430G-S440K com as mutações realçadoras da ligação de C1q K326A ou E333S aos ECD's biotinilados rotulados com His diméricos do alótipo FcγRIIA 131H (A), alótipo FcγRIIA 131R (B), FcγRIIB (C), alótipo FcγRIIIA 158V (D) e alótipo FcγRIIIA 158F (E) como testado nos ensaios de ELISA. a ligação é apresentada para amostra de 20 µg/mL de anticorpo em relação ao controle sem anticorpo (fundo) e ligação a IgG1-11B8-E430G-S440K (100%). A

detecção foi realizada usando Estreptavidina-poliHRP e ABTS.

[00426] A **Figura 18** mostra a seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E anti-CD52 com ou sem uma mutação inibidora da ligação de C1q (G236R ou G237T) + IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 com mutação inibidora da ligação de FcγR G237A com ou sem a mutação realçadora da ligação de C1q E333S. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI e como lise a 40 µg/mL de IgG. A normalização foi realizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00427] A **Figura 19** mostra atividade seletiva de combinações de variantes de IgG1-CAMPATH-1H e IgG1-11B8 no sangue integral, determinada pela análise de citometria de fluxo de células sanguíneas. eixo Y: Fração de células B (positivas em CD19 / negativas em CD3) ou Fração de células T (negativas em CD19/ positivas em CD3) da população de linfócito total (negativos em CD66b), depois de incubação durante a noite na presença de células efectoras. eixos X: grupos de tratamento diferentes. Os símbolos representam células de cinco doadores saudáveis diferentes, testados e duas incubações separadas por doador. (A) Atividade seletiva de IgG1-CAMPATH-1H-G236R-E430G-K439E misturados com IgG1-11B8-G237A-E430G-S440K. (B) Atividade seletiva de variantes de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E contendo uma mutação G237 adicional, misturada com IgG1-11B8-G237A-E430G-S440K. (C) Atividade seletiva de variantes de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E contendo uma mutação G236R ou G237 adicional, misturados com IgG1-11B8-G237A-E430G-S440K contendo uma mutação E333S realçadora da ligação de C1q adicional. (D) Profundidade de depleção de célula B pelos anticorpos alvejadores de célula B diferentes

comparada com as combinações de anticorpo codependentes de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E com mutações adicionais G236R, G237Q ou G237R, misturados com IgG1-11B8-G237A-E430G-S440K. Eixo Y: representação na escala log da fração de células B determinada como acima.

[00428] A **Figura 20** mostra a seletividade da atividade da CDC nas linhagens de célula diferentes com diferentes níveis de expressão de CD20 e CD52 pela combinação de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E e variantes de anticorpo IgG1-11B8-E430G-S440K com uma mutação inibidora da ligação de C1q no componente anti-CD52 e uma mutação realçadora da ligação de C1q no componente anti-CD20. Ensaio da CDC in vitro foram realizados com 0,01 a 40 µg/mL de anticorpo na presença de 20% de NHS usando linhagens de célula de linfoma de Burkitt Daudi (A), Raji (B) e Ramos (C), linhagem de célula ALL REH (D) e linhagem de célula de linfoma de célula B U-698-M (E). A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI e como lise máxima. A normalização foi realizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00429] A **Figura 21** mostra seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CD37-37.3-E430G-K439E anti-CD37 com ou sem uma mutação inibidora G236R C1q da ligação de + IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 com ou sem a mutação realçadora da ligação de C1q E333S. (A) células Daudi e (B) células WIL2-S foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI e como lise a 40 µg/mL de IgG. A normalização foi realizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CD37-37.3-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00430] A **Figura 22** mostra (A) ligação de variantes de anticorpo de

IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 com as mutações realçadoras da interação Fc:Fc E430G ou E345R, mutação inibidora da auto-oligomerização K439E, em combinação com qualquer uma das mutações inibidoras da ligação de FcγR e moduladoras da ligação de C1q G236R, G237A ou G237T à linhagem de célula de linfoma humano Wien 133. A ligação de anticorpo foi testada pela citometria de fluxo e é apresentada normalizada em relação ao valor Bmax de IgG1-Campath-1H do tipo selvagem (100%). Como um controle negativo para a ligação, um anticorpo anti-gp120 sem ligação IgG1-b12 foi usado. (B) A ligação máxima (Bmax) às células Raji pelas variantes de anticorpo IgG1-Campath-1H com mutações E430G e K439E, em combinação com qualquer uma das mutações moduladoras da ligação de C1q G236R, G237A ou G237T é mostrada normalizada em relação à ligação de IgG1-Campath-1H do tipo selvagem (C) Valores Kd aparentes de variantes de anticorpo IgG1-Campath-1H com mutações E430G e S440K, em combinação com qualquer uma das mutações moduladoras da ligação de C1q G236R, G237A ou G237T às células Raji.

[00431] A **Figura 23** mostra a ligação de variantes de anticorpo de IgG1-11B8 anti-CD20 com a mutação realçadora da interação Fc-Fc E430G, mutação inibidora da auto-oligomerização S440K, em combinação com qualquer uma das mutações moduladoras da ligação de C1q K326A ou E333A (A) ou E333S, G237A ou G237A-E333S (B) à linhagem de célula de linfoma humano Raji. A ligação de anticorpo foi testada pela citometria de fluxo e é apresentada normalizada em relação ao valor Bmax de IgG1-11B8 tipo selvagem (100%). Como um controle negativo para a ligação, um anticorpo anti-gp120 sem ligação IgG1-b12 foi usado. (C, D) Ligação máxima (Bmax) às células Raji pelas variantes de anticorpo IgG1-11B8 com mutações E430G e S440K, em combinação com qualquer uma das mutações moduladoras da ligação de C1q K326A ou E333A (C) ou E333S, G237A ou G237A-E333S (D) é mostrada normalizada em relação à ligação de IgG1-

11B8 tipo selvagem (E, F) Valores Kd aparentes de variantes de anticorpo IgG1-11B8 com mutações E430G e S440K, em combinação com qualquer uma das mutações moduladoras da ligação de C1q K326A ou E333A (E) ou E333S, G237A ou G237A-E333S (F) ligação às células Raji.

[00432] A **Figura 24** mostra a ligação de FcRn de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 e variantes de anticorpo IgG1-11B8 anti-CD20. (A, C) Ligação ao FcRn humano é mostrada para as variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 com mutação realçadora da interação Fc-Fc E430G, mutação inibidora da auto-oligomerização K439E e mutações moduladoras da ligação de C1q G237A ou G237T usando uma concentração de anticorpo de 40 µg/mL no (A) pH 6,0 ou (C) pH 7,4. (B, D) Ligação ao FcRn humano pelas variantes de anticorpo IgG1-11B8 anti-CD20 com mutação realçadora da interação Fc-Fc E430G, mutação inibidora da auto-oligomerização S440K e mutações moduladoras da ligação de C1q K326A, E333A, G237A ou G237A-E333S usando uma concentração de 40 µg/mL de anticorpo no (B) pH 6,0 ou (D) pH 7,4. Um ELISA de FcRn foi realizado com 2 µg/mL de domínio extracelular recombinante revestido de FcRn humano (FcRnECDHis-B2M-BIO) e séries de diluição de anticorpo. A quantidade de anticorpos ligados foi determinada com um anticorpo anti-IgG1 humana de cabra conjugado a HRP e o substrato quimioluminescente ABTS. A absorbância foi medida a 405 nm.

[00433] A **Figura 25** mostra as concentrações da IgG humana total (hIgG) como medidas em amostras de sangue coletadas de camundongos injetados com IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 ou variantes de anticorpo anti-IgG1-11B8 ou misturas dos mesmos. (A) Concentração de hIgG total em amostras de sangue coletadas de camundongos injetados com IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G237Q ou IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R tipo selvagem. (B) Concentração de hIgG total em amostras de sangue coletadas de camundongos injetados com

IgG1-11B8, IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A ou IgG1-11B8-E430G-S440K-E333S tipo selvagem. (C) Concentração de hIgG total em amostras de sangue coletadas de camundongos injetados com misturas de IgG1-CAMPATH-1H tipo selvagem + IgG1-11B8 ou misturas de IgG1-CAMPATH-1H e variantes de anticorpo IgG1-11B8 abrigando as mutações como em (A) e (B). Em todas as figuras, a linha pontilhada representa a concentração de IgG1 prognosticada no tempo para anticorpos de IgG1 do tipo selvagem nos camundongos SCID. (D) Depuração até dia 21 depois da administração do anticorpo foi determinada seguindo a fórmula $D \cdot 1000 / AUC$ com D, dose injetada e AUC, área sob a curva da curva da concentração-tempo.

[00434] A **Figura 26** mostra a concentração de C4d (em $\mu\text{g/ml}$) detectado em amostras incubadas com variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H, mutações que abrigam IgG1-11B8 e IgG1-b12 E430G, K439E ou S440K e G236R, G237A, G237Q ou G237R, depois da subtração da concentração de C4d média detectada em amostras de controle negativo sem conter nenhum dos anticorpos. As amostras de controle positivo incluem variantes de anticorpo abrigando as mutações realçadoras da interação Fc-Fc E345R, E430G e S440Y (RGY).

[00435] A **Figura 27** mostra a ligação de C1q às células Wien 133 incubadas em gelo com soro humano normal como uma fonte de complemento, depois da opsonização com mutações abrigando variantes de anticorpos IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-11B8 e IgG1-b12 E430G, K439E ou S440K e G236R, G237T, K326A ou E333S, detectadas pela citometria de fluxo. Os valores de intensidade de fluorescência média foram normalizados para controlar reações sem anticorpo (0%) e o nível de topo de uma mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%), estimado pelo ajuste de um modelo de resposta agonista log. (A) ligação ao C1q de reações de controle. (B-D) Ligação ao C1q de (B) IgG1-CAMPATH-E430G-K439E,

(C) IgG1-CAMPATH-E430G-K439E-G236R e (D) IgG1-CAMPATH-E430G-K439E-G237R, misturados com controle sem ligação IgG1-b12 ou variantes IgG1-11B8 diferentes.

[00436] A **Figura 28** mostra a ligação de FcγR pelas variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H-E430G e IgG1-11B8-E430G abrigando a mutação inibidora da auto-oligomerização K439E ou S440K e mutações moduladoras da ligação de C1q. (A-E) Ligação de variantes de anticorpo imobilizadas aos ECDs biotinilados diméricos rotulados com His como testado nos ensaios de ELISA, de (A) alótipo de alta afinidade FcγRIIA 131H, (B) alótipo de baixa afinidade FcγRIIA 131R, (C) FcγRIIB, (D) alótipo de alta afinidade FcγRIIA 158V ou (E) alótipo de baixa afinidade FcγRIIA 158F. (F) Ligação de FcγRIa imobilizado às variantes de anticorpo testadas no ELISA. A ligação é apresentada para amostras de 20 µg/mL de anticorpo e foi normalizada por experimento depois da subtração dos sinais em poços incubados sem anticorpo primário em relação ao sinal médio observado para IgG1-CAMPATH-1H tipo selvagem (100%). A detecção foi realizada usando Estreptavidina-poliHRP e ABTS.

[00437] A **Figura 29** mostra seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52, IgG1-11B8 anti-CD20 e IgG1-h2E8 anti-CD52 pela introdução de mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e modulem a ligação de C1q. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC foi medida em três experimentos independentes e é apresentada como (A) a AUC calculada em média normalizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%) e (B) a porcentagem calculada em média de lise determinada pela positividade do cloreto de propídio em uma concentração de anticorpo de 40 µg/ml.

[00438] A **Figura 30** (A, B) mostra a eficácia na CDC de agente único e variantes de anticorpo combinadas IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G, IgG1-11B8 anti-CD20-E430G e IgG1-b12-E430G sem ligação a antígeno abrigando mutações inibidoras da auto-oligomerização e mutações moduladoras da ligação de C1q como indicadas. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia e CDC são apresentadas como a AUC normalizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00439] A **Figura 31** mostra a ativação de linhagens de célula repórter Jurkat estavelmente expressando (A) FcγRIIa ou (B) FcγRIIIa, como medida pelo nível de luminescência (RLU), no cocultivo com células de linfoma Raji e concentrações diferentes das variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H e IgG1-11B8. os valores de luminescência foram normalizados por experimento em relação àqueles observados para a IgG1-b12 (0%) e IgG1-Campath-1H tipo selvagem + IgG1-11B8 tipo selvagem (100%), antes de calcular a média em relação a três réplicas experimentais (FcγRIIa) ou duas (FcγRIIIa).

[00440] A **Figura 32** mostra CDC codependente nas células Wien 133 induzida pelas misturas das variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H e IgG1-11B8 abrigando mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e modulem a ligação de C1q em razões não equimolares. (A) CDC codependente induzida pelas misturas contendo razões de concentração equimolares e não equimolares de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R e IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A. (B) CDC codependente induzida pelas misturas contendo razões de concentração equimolares e não equimolares de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G237Q e IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A.

[00441] A **Figura 33** mostra a seletividade da atividade da CDC pelas misturas de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 com

variantes IgG1-HLA-DR-huL243 anti-HLA-DR (A) ou variantes IgG1-HLA-DR-1D09C3 anti-HLA-DR (B) pela introdução de mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e inibam a ligação de C1q. Células Oci-Ly17 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de (A) IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-HLA-DR-huL243-E430G (100%) ou (B) IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-HLA-DR-1D09C3-E430G (100%).

[00442] A **Figura 34** mostra a atividade codependente seletiva da CDC de variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 e IgG1-11B8 anti-CD20 pela introdução de mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e inibam a ligação de C1q. A eficácia da CDC é mostrada para variantes de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E com cada uma das mutações L234A, L234A-L235A, L234F, L234F-L235E, L235A, L235Q, G236R ou G237Q e misturas destas variantes com anticorpo IgG1-b12 de controle sem ligação ou IgG1-11B8-E430G-S440K. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00443] A **Figura 35** mostra a atividade codependente seletiva da CDC de variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 e IgG1-11B8 anti-CD20 pela introdução de mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e inibam a ligação de C1q. (A) eficácia da CDC de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H e IgG1-11B8 como um agente único ou misturas dos mesmos abrindo a interação de mutações realçadoras de Fc-Fc E430G, E430N, E430T, E430V, E430Y, E345A, E345K, E345Q, E345R ou E345Y, mutações inibidoras da auto-oligomerização K439E ou S440K e mutações inibidoras da ligação de C1q

G236R ou G237A. (B) eficácia da CDC de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H e IgG1-11B8 como um agente único ou misturas dos mesmos abrigoando a interação das mutações realçadoras de Fc-Fc E430G, E430N, E430T, E430V, E430Y, E345A, E345Q, E345V ou E345Y, mutações inibidoras da auto-oligomerização K439E ou S440K e mutações inibidoras da ligação de C1q G236R ou G237A. (C) Eficácia da CDC de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H e IgG1-11B8 como um agente único ou misturas dos mesmos abrigoando a interação combinada das mutações realçadoras de Fc-Fc E430G, E430N, E430T, E430V, E430Y, E345A, E345Q, E345V ou E345Y, as mutações inibidoras da auto-oligomerização K439E ou S440K e as mutações inibidoras da ligação de C1q G236R ou G237A. (D) Eficácia da CDC de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H e IgG1-11B8 como um agente único ou misturas dos mesmos abrigoando a interação das mutações realçadoras de Fc-Fc E430G ou K248E-T437R, mutações inibidoras da auto-oligomerização K439E ou S440K e mutações moduladoras da ligação de C1q G236R, G237A ou E333S. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00444] A **Figura 36** mostra a CDC codependente nas células de linfoma Raji induzida pelas misturas das variantes de anticorpo IgG1-CD37-37-3 e IgG1-11B8 abrigoando mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e modulem a ligação de C1q. (A) As áreas-sob-a-curva (AUC) relativas, normalizadas para lise mínima (0% com IgG1-b12) e lise máxima (100% com a mistura de IgG1-CD37-37-3-E430G + IgG1-11B8-E430G), da lise de célula induzida pelas variantes de anticorpo indicadas em diluição ou misturas das mesmas. (B) Porcentagem máxima de lise induzida pelas variantes de anticorpo indicadas e misturas das mesmas.

[00445] A **Figura 37** mostra a atividade codependente seletiva da CDC

de variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 e IgG1-11B8 anti-CD20 pela introdução de mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e modulem a ligação de C1q. As amostras CLL de paciente foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a porcentagem de células B viáveis na incubação com as variantes de anticorpo. Os resultados usando amostras CLL dos pacientes 1 (A), 2 (B) e 3 (C) são mostrados.

[00446] A **Figura 38** mostra a fração de células B, células T CD4+ e células T CD8+ detectada pela citometria de fluxo depois da incubação de amostras de sangue integrais com misturas de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-huCLB-T3/4 e IgG1-CD5-INSERM abrigando mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e modulem a ligação de C1q. A porcentagem de (A) células B, (B) células T CD4+ e (C) células T CD8+ detectada em amostras de sangue integral de 4 doadores depois da incubação com as variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-huCLB-T3/4 e IgG1-b12 indicadas. A porcentagem de (D) células B, (E) células T CD4+ e (F) células T CD8+ detectada em amostras de sangue integral de 4 doadores depois da incubação com as variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-CD5-INSERM e IgG1-b12 indicadas. As frações foram calculadas como $[100\% \times (\text{contagem de célula na amostra} / \text{contagem de célula na 'amostra sem Ab'}) \times (\text{Contagem de granulócito 'amostra sem Ab'} / \text{Contagem de granulócito na amostra})]$.

[00447] A **Figura 39** mostra a ativação cooperativa da morte celular programada em células cancerosas pelas variantes de anticorpo anti-DR4 e anti-DR5 abrigando mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e inibam (G237T) ou realcem (K326W-E333S) a ligação de C1q. (A) A viabilidade de células de câncer pancreático humano BxPC-3 depois de uma incubação de 72h com as variantes de anticorpo indicadas. (B)

A viabilidade das células cancerosas de cólon humano COLO 205 depois de uma incubação de 72h com as variantes de anticorpo indicadas. A porcentagem das células viáveis foi calculada usando a seguinte fórmula: % de células viáveis = $[(\text{luminescência da amostra de anticorpo} - \text{luminescência da amostra de estaurosporina}) / (\text{luminescência na amostra de anticorpo} - \text{luminescência na amostra de estaurosporina})] * 100$.

[00448] B). Quando IgG1-CAMPATH-1H-E430G foi testado como um agente único, a introdução da mutação K439E (SEQ ID NO: 80) resultou na eficácia diminuída da CDC e K439E-P329R (SEQ ID NO: 100) resultou na perda completa da atividade da CDC (a Figura 1 mostra seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E + IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 pela introdução da mutação P329R. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de soro humano normal (NHS) reunido. A eficácia da CDC é apresentada como (A) porcentagem de lise determinada pela porcentagem de células positivas em iodeto de propídio (PI) e (B) a área sob as curvas de dose-resposta (AUC), normalizadas para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1- CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00449] A **Figura 2** mostra a seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E + IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 pela introdução da mutação K322E. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como (A) porcentagem de lise determinada pela porcentagem de células positivas em PI e (B) a AUC normalizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1- CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00450] A **Figura 3** mostra a seletividade da atividade da CDC pela

introdução da mutação K322E em variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E + 11B8-E430G-S440K anti-CD20 nas linhagens de célula diferentes. os ensaios da CDC in vitro foram realizados com 30 µg/mL de anticorpo na presença de 20% de NHS usando linhagens de célula de linfoma de Burkitt Wien 133 (A), Daudi (B), Raji (C) e Ramos (D), linhagem de célula de linfoma linfoblástico agudo (ALL) REH (E), linhagem de célula de mieloma U266B1 (F) e linhagem de célula de linfoma de célula B U-698-M (G). A atividade da CDC é apresentada como a porcentagem de lise determinada pela porcentagem de células positivas em PI normalizadas por linhagem de célula para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e IgG1-CAMPATH-1H-E430G (100%) para REH, U266B1 e Wien 133 ou IgG1-11B8-E430G (100%) para Daudi, Raji, Ramos e U-698-M.

[00451] A **Figura 4** mostra seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E com uma mutação da inibição da ligação de C1q (G236R, K322A, E269K, K322E ou P329R) + IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI. A normalização foi realizada para a mistura de anticorpo de controle IgG1-b12-K439E + IgG1-b12-S440K sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00452] A **Figura 5** mostra seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E + IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 com uma mutação realçadora da ligação de C1q (E333S, K326W ou K326A/E333A). As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC

normalizada da porcentagem de células positivas em PI. A normalização foi realizada para a mistura de anticorpo de controle IgG1-b12-K439E + IgG1-b12-S440K sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00453] A **Figura 6** mostra seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E com a mutação inibidora da ligação de C1q G236R (A), K322A (B), E269K (C), K322E (D) ou P329R (E) + IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 com uma mutação realçadora da ligação de C1q (E333S, K326W ou K326A/E333A). As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI. A normalização foi realizada para a mistura de anticorpo de controle IgG1-b12-K439E + IgG1-b12-S440K sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00454] A **Figura 7** mostra a ligação de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E com a mutação inibidora da ligação de C1q G236R ou K322A (A, B) e variantes de anticorpo de IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 com a mutação realçadora da ligação de C1q E333S (C, D) às linhagens de célula de linfoma humano Wien 133 (A, C) e Raji (B, D). A ligação de anticorpo foi testada pela citometria de fluxo. A ligação é expressa como média geométrica da intensidade de fluorescência (MFI). Como um controle negativo para a ligação, uma amostra sem anticorpo primário ou anticorpo anti-gp120 sem ligação IgG1-b12 foi usado.

[00455] A **Figura 8** mostra a capacidade de ADCC de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E com a mutação inibidora da ligação de C1q G236R ou K322A (A, C) e variantes de anticorpo de IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 com a mutação realçadora da ligação de C1q E333S (B, D). (A, B) Um Bioensaio repórter de ADCC foi

realizado, em que células Raji alvos foram coincubadas com séries de diluição de anticorpo e células T Jurkat humanas estavelmente expressando FcγRIIIa de alta afinidade (V158) e um elemento de resposta de NFAT dirigindo a expressão de luciferase de vagalume. A produção de luciferase foi quantificada pela leitura da luminescência. (C, D) Um ensaio de ADCC com Európio TDA (EuTDA) in vitro foi realizado, em que as células Wien 133 alvos foram coincubadas com séries de diluição de anticorpo e PBMC humana (E:T 100:1). A lise de célula foi determinada medindo-se o sinal do quelato fluorescente EuTDA no sobrenadante.

[00456] A **Figura 9** mostra a seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas da interação Fc-Fc realçada IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-K439E com mutação inibidora da ligação de C1q G236R ou K322A + variantes da interação Fc-Fc realçada IgG1-11B8 anti-CD20-S440K com ou sem mutação realçadora da ligação de C1q E333S. As mutações realçadoras da interação Fc-Fc testadas foram E430G, E345K, E345R e E345R-E430G. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI e lise máxima. A normalização foi realizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00457] A **Figura 10** mostra a seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E com mutações moduladoras da ligação de C1q na posição G236 (G236R ou G236K) ou posição G237 (G237A, G237T, G237Q ou G237R) ou a mutação dupla G237A-K322A + IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 com ou sem mutação moduladora da ligação de C1q E333S, E333A, K326A, K326W-E333S, G237A ou G237A-E333S. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de

20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI e lise máxima. A normalização foi realizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00458] A **Figura 11** mostra a seletividade da atividade da CDC pelas variantes de isótipo de anticorpo misturadas (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 estabilizada na dobradiça) de CAMPATH-1H-E430G-K439E anti-CD52 com ou sem mutação inibidora da ligação de C1q G236R + 11B8-E430G-S440K anti-CD20 com ou sem mutação realçadora da ligação de C1q E333S. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI. A normalização foi realizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00459] A **Figura 12** mostra seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E com ou sem mutação inibidora da ligação de C1q G236R ou K322A + anti-CD37 IgG1-CD37-37.3-E430G-S440K com ou sem mutação realçadora da ligação de C1q E333S nas células (A) Daudi e (B) Wien 133. As células alvos foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI. A normalização foi realizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-CD37-37.3-E430G (100%).

[00460] A **Figura 13** mostra citotoxicidade mediada por DR5 de (A) variantes únicas de anticorpo ou (B) uma mistura agonista de variantes de anticorpo IgG1-DR5-01-G56T-E430G-K439E anti-DR5 com ou sem mutação inibidora da ligação de C1q G236R + IgG1-DR5-05-E430G-S440K com ou sem mutação realçadora da ligação de C1q E333S nas células de câncer

pancreático humano BxPC-3. ensaio de viabilidade de três dias foi realizado e a viabilidade celular foi determinada usando o kit CellTiter-Glo.

[00461] A **Figura 14** mostra atividade da CDC pelas variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G com a mutação moduladora da ligação de C1q G237A, G236R, A327K, K322E ou P329R. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI. A normalização foi realizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação-S440K (0%; não mostrado) e IgG1-CAMPATH-1H-E430G (100%).

[00462] A **Figura 15** mostra a ligação de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E com a mutação inibidora da ligação de C1q G236R ou K322A (A, B, C) e variantes de anticorpo de IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 com a mutação realçadora da ligação de C1q E333S (D, E, F) ao FcRn humano. Um ELISA de FcRn foi realizado com 5 µg/mL de domínio extracelular recombinante revestido de FcRn humano (FcRnhsECDHis-B2M-BIO) e séries de diluição de anticorpo. A quantidade de anticorpos ligados foi determinada com um anticorpo anti-IgG1 humana de cabra conjugado a HRP e o substrato quimioluminescente ABTS. A absorbância foi medida a 405 nm.

[00463] A **Figura 16** mostra a taxa de depuração de 500 µg de anticorpo intravenosamente administrados em camundongos SCID. (A-C) A IgG humana total em amostras de plasma foi determinada pelo ELISA e plotada em uma curva de concentração versus tempo para (A) variantes IgG1-CAMPATH-1H, (B) variantes IgG1-11B8 e (C) combinações de variantes IgG1-CAMPATH-1H + variantes IgG1-11B8. Cada ponto de dados representa a média +/- desvio padrão de amostras em triplicata. (D) A depuração até o dia 21 depois da administração do anticorpo foi determinada seguindo a fórmula $D \times 1.000 / AUC$ com D, dose injetada e AUC, área sob a

curva da curva da concentração-tempo.

[00464] A **Figura 17** mostra a ligação de variantes de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E imobilizadas com as mutações de inibição da ligação de C1q G236R ou G237T e variantes IgG1-11B8-E430G-S440K com as mutações realçadoras da ligação de C1q K326A ou E333S aos ECD's biotinilados rotulados com His diméricos do alótipo FcγRIIA 131H (A), alótipo FcγRIIA 131R (B), FcγRIIB (C), alótipo FcγRIIA 158V (D) e alótipo FcγRIIA 158F (E) como testado nos ensaios de ELISA. a ligação é apresentada para amostra de 20 µg/mL de anticorpo em relação ao controle sem anticorpo (fundo) e ligação a IgG1-11B8-E430G-S440K (100%). A detecção foi realizada usando Estreptavidina-poliHRP e ABTS.

[00465] A **Figura 18** mostra a seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E anti-CD52 com ou sem uma mutação inibidora da ligação de C1q (G236R ou G237T) + IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 com mutação inibidora da ligação de FcγR G237A com ou sem a mutação realçadora da ligação de C1q E333S. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI e como lise a 40 µg/mL de IgG. A normalização foi realizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00466] A **Figura 19** mostra atividade seletiva de combinações de variantes de IgG1-CAMPATH-1H e IgG1-11B8 no sangue integral, determinada pela análise de citometria de fluxo de células sanguíneas. eixo Y: Fração de células B (positivas em CD19 / negativas em CD3) ou Fração de células T (negativas em CD19/ positivas em CD3) da população de linfócito total (negativos em CD66b), depois de incubação durante a noite na presença de células efectoras. eixos X: grupos de tratamento diferentes. Os símbolos

representam células de cinco doadores saudáveis diferentes, testados e duas incubações separadas por doador. (A) Atividade seletiva de IgG1-CAMPATH-1H-G236R-E430G-K439E misturados com IgG1-11B8-G237A-E430G-S440K. (B) Atividade seletiva de variantes de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E contendo uma mutação G237 adicional, misturada com IgG1-11B8-G237A-E430G-S440K. (C) Atividade seletiva de variantes de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E contendo uma mutação G236R ou G237 adicional, misturados com IgG1-11B8-G237A-E430G-S440K contendo uma mutação E333S realçadora da ligação de C1q adicional. (D) Profundidade de depleção de célula B pelos anticorpos alvejadores de célula B diferentes comparada com as combinações de anticorpo codependentes de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E com mutações adicionais G236R, G237Q ou G237R, misturados com IgG1-11B8-G237A-E430G-S440K. Eixo Y: representação na escala log da fração de células B determinada como acima.

[00467] A **Figura 20** mostra a seletividade da atividade da CDC nas linhagens de célula diferentes com diferentes níveis de expressão de CD20 e CD52 pela combinação de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E e variantes de anticorpo IgG1-11B8-E430G-S440K com uma mutação inibidora da ligação de C1q no componente anti-CD52 e uma mutação realçadora da ligação de C1q no componente anti-CD20. Ensaio da CDC in vitro foram realizados com 0,01 a 40 µg/mL de anticorpo na presença de 20% de NHS usando linhagens de célula de linfoma de Burkitt Daudi (A), Raji (B) e Ramos (C), linhagem de célula ALL REH (D) e linhagem de célula de linfoma de célula B U-698-M (E). A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI e como lise máxima. A normalização foi realizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00468] A **Figura 21** mostra seletividade da atividade da CDC pelas

variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CD37-37.3-E430G-K439E anti-CD37 com ou sem uma mutação inibidora G236R C1q da ligação de + IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 com ou sem a mutação realçadora da ligação de C1q E333S. (A) células Daudi e (B) células WIL2-S foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI e como lise a 40 µg/mL de IgG. A normalização foi realizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CD37-37.3-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00469] A **Figura 22** mostra (A) ligação de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 com as mutações realçadoras da interação Fc:Fc E430G ou E345R, mutação inibidora da auto-oligomerização K439E, em combinação com qualquer uma das mutações inibidoras da ligação de FcγR e moduladoras da ligação de C1q G236R, G237A ou G237T à linhagem de célula de linfoma humano Wien 133. A ligação de anticorpo foi testada pela citometria de fluxo e é apresentada normalizada em relação ao valor Bmax de IgG1-Campath-1H do tipo selvagem (100%). Como um controle negativo para a ligação, um anticorpo anti-gp120 sem ligação IgG1-b12 foi usado. (B) A ligação máxima (Bmax) às células Raji pelas variantes de anticorpo IgG1-Campath-1H com mutações E430G e K439E, em combinação com qualquer uma das mutações moduladoras da ligação de C1q G236R, G237A ou G237T é mostrada normalizada em relação à ligação de IgG1-Campath-1H do tipo selvagem (C) Valores Kd aparentes de variantes de anticorpo IgG1-Campath-1H com mutações E430G e S440K, em combinação com qualquer uma das mutações moduladoras da ligação de C1q G236R, G237A ou G237T às células Raji.

[00470] A **Figura 23** mostra a ligação de variantes de anticorpo de IgG1-11B8 anti-CD20 com a mutação realçadora da interação Fc-Fc E430G, mutação inibidora da auto-oligomerização S440K, em combinação com

qualquer uma das mutações moduladoras da ligação de C1q K326A ou E333A (A) ou E333S, G237A ou G237A-E333S (B) à linhagem de célula de linfoma humano Raji. A ligação de anticorpo foi testada pela citometria de fluxo e é apresentada normalizada em relação ao valor Bmax de IgG1-11B8 tipo selvagem (100%). Como um controle negativo para a ligação, um anticorpo anti-gp120 sem ligação IgG1-b12 foi usado. (C, D) Ligação máxima (Bmax) às células Raji pelas variantes de anticorpo IgG1-11B8 com mutações E430G e S440K, em combinação com qualquer uma das mutações moduladoras da ligação de C1q K326A ou E333A (C) ou E333S, G237A ou G237A-E333S (D) é mostrada normalizada em relação à ligação de IgG1-11B8 tipo selvagem (E, F) Valores Kd aparentes de variantes de anticorpo IgG1-11B8 com mutações E430G e S440K, em combinação com qualquer uma das mutações moduladoras da ligação de C1q K326A ou E333A (E) ou E333S, G237A ou G237A-E333S (F) ligação às células Raji.

[00471] A **Figura 24** mostra a ligação de FcRn de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 e variantes de anticorpo IgG1-11B8 anti-CD20. (A, C) Ligação ao FcRn humano é mostrada para as variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 com mutação realçadora da interação Fc-Fc E430G, mutação inibidora da auto-oligomerização K439E e mutações moduladoras da ligação de C1q G237A ou G237T usando uma concentração de anticorpo de 40 µg/mL no (A) pH 6,0 ou (C) pH 7,4. (B, D) Ligação ao FcRn humano pelas variantes de anticorpo IgG1-11B8 anti-CD20 com mutação realçadora da interação Fc-Fc E430G, mutação inibidora da auto-oligomerização S440K e mutações moduladoras da ligação de C1q K326A, E333A, G237A ou G237A-E333S usando uma concentração de 40 µg/mL de anticorpo no (B) pH 6,0 ou (D) pH 7,4. Um ELISA de FcRn foi realizado com 2 µg/mL de domínio extracelular recombinante revestido de FcRn humano (FcRnECDHis-B2M-BIO) e séries de diluição de anticorpo. A quantidade de anticorpos ligados foi determinada com um anticorpo anti-IgG1

humana de cabra conjugado a HRP e o substrato quimioluminescente ABTS. A absorbância foi medida a 405 nm.

[00472] A **Figura 25** mostra as concentrações da IgG humana total (hIgG) como medidas em amostras de sangue coletadas de camundongos injetados com IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 ou variantes de anticorpo anti-IgG1-11B8 ou misturas dos mesmos. (A) Concentração de hIgG total em amostras de sangue coletadas de camundongos injetados com IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G237Q ou IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R tipo selvagem. (B) Concentração de hIgG total em amostras de sangue coletadas de camundongos injetados com IgG1-11B8, IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A ou IgG1-11B8-E430G-S440K-E333S tipo selvagem. (C) Concentração de hIgG total em amostras de sangue coletadas de camundongos injetados com misturas de IgG1-CAMPATH-1H tipo selvagem + IgG1-11B8 ou misturas de IgG1-CAMPATH-1H e variantes de anticorpo IgG1-11B8 abrigando as mutações como em (A) e (B). Em todas as figuras, a linha pontilhada representa a concentração de IgG1 prognosticada no tempo para anticorpos de IgG1 do tipo selvagem nos camundongos SCID. (D) Depuração até dia 21 depois da administração do anticorpo foi determinada seguindo a fórmula $D \cdot 1000 / AUC$ com D, dose injetada e AUC, área sob a curva da curva da concentração-tempo.

[00473] A **Figura 26** mostra a concentração de C4d (em µg/ml) detectado em amostras incubadas com variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H, mutações que abrigam IgG1-11B8 e IgG1-b12 E430G, K439E ou S440K e G236R, G237A, G237Q ou G237R, depois da subtração da concentração de C4d média detectada em amostras de controle negativo sem conter nenhum dos anticorpos. As amostras de controle positivo incluem variantes de anticorpo abrigando as mutações realçadoras da interação Fc-Fc E345R, E430G e S440Y (RGY).

[00474] A **Figura 27** mostra a ligação de C1q às células Wien 133 incubadas em gelo com soro humano normal como uma fonte de complemento, depois da opsonização com mutações abrigando variantes de anticorpos IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-11B8 e IgG1-b12 E430G, K439E ou S440K e G236R, G237T, K326A ou E333S, detectadas pela citometria de fluxo. Os valores de intensidade de fluorescência média foram normalizados para controlar reações sem anticorpo (0%) e o nível de topo de uma mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%), estimado pelo ajuste de um modelo de resposta agonista log. (A) ligação ao C1q de reações de controle. (B-D) Ligação ao C1q de (B) IgG1-CAMPATH-E430G-K439E, (C) IgG1-CAMPATH-E430G-K439E-G236R e (D) IgG1-CAMPATH-E430G-K439E-G237R, misturados com controle sem ligação IgG1-b12 ou variantes IgG1-11B8 diferentes.

[00475] A **Figura 28** mostra a ligação de FcγR pelas variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H-E430G e IgG1-11B8-E430G abrigando a mutação inibidora da auto-oligomerização K439E ou S440K e mutações moduladoras da ligação de C1q. (A-E) Ligação de variantes de anticorpo imobilizadas aos ECDs biotinilados diméricos rotulados com His como testado nos ensaios de ELISA, de (A) alótipo de alta afinidade FcγRIIA 131H, (B) alótipo de baixa afinidade FcγRIIA 131R, (C) FcγRIIB, (D) alótipo de alta afinidade FcγRIIA 158V ou (E) alótipo de baixa afinidade FcγRIIA 158F. (F) Ligação de FcγRIa imobilizado às variantes de anticorpo testadas no ELISA. A ligação é apresentada para amostras de 20 µg/mL de anticorpo e foi normalizada por experimento depois da subtração dos sinais em poços incubados sem anticorpo primário em relação ao sinal médio observado para IgG1-CAMPATH-1H tipo selvagem (100%). A detecção foi realizada usando Estreptavidina-poliHRP e ABTS.

[00476] A **Figura 29** mostra seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52, IgG1-

11B8 anti-CD20 e IgG1-h2E8 anti-CD52 pela introdução de mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e modulem a ligação de C1q. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC foi medida em três experimentos independentes e é apresentada como (A) a AUC calculada em média normalizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%) e (B) a porcentagem calculada em média de lise determinada pela positividade do cloreto de propídio em uma concentração de anticorpo de 40 µg/ml.

[00477] **A Figura 30** (A, B) mostra a eficácia na CDC de agente único e variantes de anticorpo combinadas IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G, IgG1-11B8 anti-CD20-E430G e IgG1-b12-E430G sem ligação a antígeno abrindo mutações inibidoras da auto-oligomerização e mutações moduladoras da ligação de C1q como indicadas. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia e CDC são apresentadas como a AUC normalizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00478] **A Figura 31** mostra a ativação de linhagens de célula repórter Jurkat estavelmente expressando (A) FcγRIIa ou (B) FcγRIIIa, como medida pelo nível de luminescência (RLU), no cocultivo com células de linfoma Raji e concentrações diferentes das variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H e IgG1-11B8. os valores de luminescência foram normalizados por experimento em relação àqueles observados para a IgG1-b12 (0%) e IgG1-Campath-1H tipo selvagem + IgG1-11B8 tipo selvagem (100%), antes de calcular a média em relação a três réplicas experimentais (FcγRIIa) ou duas (FcγRIIIa).

[00479] **A Figura 32** mostra CDC codependente nas células Wien 133 induzida pelas misturas das variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H e

IgG1-11B8 abrigando mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e modulem a ligação de C1q em razões não equimolares.

(A) CDC codependente induzida pelas misturas contendo razões de concentração equimolares e não equimolares de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R e IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A. (B) CDC codependente induzida pelas misturas contendo razões de concentração equimolares e não equimolares de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G237Q e IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A.

[00480] A **Figura 33** mostra a seletividade da atividade da CDC pelas misturas de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 com variantes IgG1-HLA-DR-huL243 anti-HLA-DR (A) ou variantes IgG1-HLA-DR-1D09C3 anti-HLA-DR (B) pela introdução de mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e inibam a ligação de C1q. Células Oci-Ly17 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de (A) IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-HLA-DR-huL243-E430G (100%) ou (B) IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-HLA-DR-1D09C3-E430G (100%).

[00481] A **Figura 34** mostra a atividade codependente seletiva da CDC de variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 e IgG1-11B8 anti-CD20 pela introdução de mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e inibam a ligação de C1q. A eficácia da CDC é mostrada para variantes de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E com cada uma das mutações L234A, L234A-L235A, L234F, L234F-L235E, L235A, L235Q, G236R ou G237Q e misturas destas variantes com anticorpo IgG1-b12 de controle sem ligação ou IgG1-11B8-E430G-S440K. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G +

IgG1-11B8-E430G (100%).

[00482] A **Figura 35** mostra a atividade codependente seletiva da CDC de variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 e IgG1-11B8 anti-CD20 pela introdução de mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e inibam a ligação de C1q. (A) eficácia da CDC de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H e IgG1-11B8 como um agente único ou misturas dos mesmos abrigoando a interação de mutações realçadoras de Fc-Fc E430G, E430N, E430T, E430V, E430Y, E345A, E345K, E345Q, E345R ou E345Y, mutações inibidoras da auto-oligomerização K439E ou S440K e mutações inibidoras da ligação de C1q G236R ou G237A. (B) eficácia da CDC de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H e IgG1-11B8 como um agente único ou misturas dos mesmos abrigoando a interação das mutações realçadoras de Fc-Fc E430G, E430N, E430T, E430V, E430Y, E345A, E345Q, E345V ou E345Y, mutações inibidoras da auto-oligomerização K439E ou S440K e mutações inibidoras da ligação de C1q G236R ou G237A. (C) Eficácia da CDC de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H e IgG1-11B8 como um agente único ou misturas dos mesmos abrigoando a interação combinada das mutações realçadoras de Fc-Fc E430G, E430N, E430T, E430V, E430Y, E345A, E345Q, E345V ou E345Y, as mutações inibidoras da auto-oligomerização K439E ou S440K e as mutações inibidoras da ligação de C1q G236R ou G237A. (D) Eficácia da CDC de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H e IgG1-11B8 como um agente único ou misturas dos mesmos abrigoando a interação das mutações realçadoras de Fc-Fc E430G ou K248E-T437R, mutações inibidoras da auto-oligomerização K439E ou S440K e mutações moduladoras da ligação de C1q G236R, G237A ou E333S. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00483] A **Figura 36** mostra a CDC codependente nas células de linfoma Raji induzida pelas misturas das variantes de anticorpo IgG1-CD37-37-3 e IgG1-11B8 abrigando mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e modulem a ligação de C1q. (A) As áreas-sob-a-curva (AUC) relativas, normalizadas para lise mínima (0% com IgG1-b12) e lise máxima (100% com a mistura de IgG1-CD37-37-3-E430G + IgG1-11B8-E430G), da lise de célula induzida pelas variantes de anticorpo indicadas em diluição ou misturas das mesmas. (B) Porcentagem máxima de lise induzida pelas variantes de anticorpo indicadas e misturas das mesmas.

[00484] A **Figura 37** mostra a atividade codependente seletiva da CDC de variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 e IgG1-11B8 anti-CD20 pela introdução de mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e modulem a ligação de C1q. As amostras CLL de paciente foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a porcentagem de células B viáveis na incubação com as variantes de anticorpo. Os resultados usando amostras CLL dos pacientes 1 (A), 2 (B) e 3 (C) são mostrados.

[00485] A **Figura 38** mostra a fração de células B, células T CD4+ e células T CD8+ detectada pela citometria de fluxo depois da incubação de amostras de sangue integrais com misturas de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-huCLB-T3/4 e IgG1-CD5-INSERM abrigando mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e modulem a ligação de C1q. A porcentagem de (A) células B, (B) células T CD4+ e (C) células T CD8+ detectada em amostras de sangue integral de 4 doadores depois da incubação com as variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-huCLB-T3/4 e IgG1-b12 indicadas. A porcentagem de (D) células B, (E) células T CD4+ e (F) células T CD8+ detectada em amostras de sangue integral de 4 doadores depois da incubação com as

variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-CD5-INSERM e IgG1-b12 indicadas. As frações foram calculadas como $[100\% \times (\text{contagem de célula na amostra} / \text{contagem de célula na 'amostra sem Ab'}) \times (\text{Contagem de granulócito 'amostra sem Ab'} / \text{Contagem de granulócito na amostra})]$.

[00486] A **Figura 39** mostra a ativação cooperativa da morte celular programada em células cancerosas pelas variantes de anticorpo anti-DR4 e anti-DR5 abrindo mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e inibam (G237T) ou realcem (K326W-E333S) a ligação de C1q. (A) A viabilidade de células de câncer pancreático humano BxPC-3 depois de uma incubação de 72h com as variantes de anticorpo indicadas. (B) A viabilidade das células cancerosas de cólon humano COLO 205 depois de uma incubação de 72h com as variantes de anticorpo indicadas. A porcentagem das células viáveis foi calculada usando a seguinte fórmula: % de células viáveis = $[(\text{luminescência da amostra de anticorpo} - \text{luminescência da amostra de estaurosporina}) / (\text{luminescência na amostra de anticorpo} - \text{luminescência na amostra de estaurosporina})] \times 100$.

[00487] A-B). Para a IgG1-11B8-E430G, a introdução da mutação S440K (SEQ ID NO: 101) ou S440K-P329R (SEQ ID NO: 114) resultou na perda de eficácia da CDC (a Figura 1 mostra seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E + IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 pela introdução da mutação P329R. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de soro humano normal (NHS) reunido. A eficácia da CDC é apresentada como (A) porcentagem de lise determinada pela porcentagem de células positivas em iodeto de propídio (PI) e (B) a área sob as curvas de dose-resposta (AUC), normalizadas para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1- CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00488] A **Figura 2** mostra a seletividade da atividade da CDC pelas

variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E + IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 pela introdução da mutação K322E. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como (A) porcentagem de lise determinada pela porcentagem de células positivas em PI e (B) a AUC normalizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1- CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00489] A **Figura 3** mostra a seletividade da atividade da CDC pela introdução da mutação K322E em variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E + 11B8-E430G-S440K anti-CD20 nas linhagens de célula diferentes. os ensaios da CDC in vitro foram realizados com 30 µg/mL de anticorpo na presença de 20% de NHS usando linhagens de célula de linfoma de Burkitt Wien 133 (A), Daudi (B), Raji (C) e Ramos (D), linhagem de célula de linfoma linfoblástico agudo (ALL) REH (E), linhagem de célula de mieloma U266B1 (F) e linhagem de célula de linfoma de célula B U-698-M (G). A atividade da CDC é apresentada como a porcentagem de lise determinada pela porcentagem de células positivas em PI normalizadas por linhagem de célula para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e IgG1-CAMPATH-1H-E430G (100%) para REH, U266B1 e Wien 133 ou IgG1-11B8-E430G (100%) para Daudi, Raji, Ramos e U-698-M.

[00490] A **Figura 4** mostra seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E com uma mutação da inibição da ligação de C1q (G236R, K322A, E269K, K322E ou P329R) + IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI. A normalização foi

realizada para a mistura de anticorpo de controle IgG1-b12-K439E + IgG1-b12-S440K sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00491] A **Figura 5** mostra seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E + IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 com uma mutação realçadora da ligação de C1q (E333S, K326W ou K326A/E333A). As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI. A normalização foi realizada para a mistura de anticorpo de controle IgG1-b12-K439E + IgG1-b12-S440K sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00492] A **Figura 6** mostra seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E com a mutação inibidora da ligação de C1q G236R (A), K322A (B), E269K (C), K322E (D) ou P329R (E) + IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 com uma mutação realçadora da ligação de C1q (E333S, K326W ou K326A/E333A). As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI. A normalização foi realizada para a mistura de anticorpo de controle IgG1-b12-K439E + IgG1-b12-S440K sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00493] A **Figura 7** mostra a ligação de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E com a mutação inibidora da ligação de C1q G236R ou K322A (A, B) e variantes de anticorpo de IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 com a mutação realçadora da ligação de C1q E333S (C, D) às linhagens de célula de linfoma humano Wien 133 (A, C) e

Raji (B, D). A ligação de anticorpo foi testada pela citometria de fluxo. A ligação é expressa como média geométrica da intensidade de fluorescência (MFI). Como um controle negativo para a ligação, uma amostra sem anticorpo primário ou anticorpo anti-gp120 sem ligação IgG1-b12 foi usado.

[00494] A **Figura 8** mostra a capacidade de ADCC de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E com a mutação inibidora da ligação de C1q G236R ou K322A (A, C) e variantes de anticorpo de IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 com a mutação realçadora da ligação de C1q E333S (B, D). (A, B) Um Bioensaio repórter de ADCC foi realizado, em que células Raji alvos foram coincubadas com séries de diluição de anticorpo e células T Jurkat humanas estavelmente expressando FcγRIIIa de alta afinidade (V158) e um elemento de resposta de NFAT dirigindo a expressão de luciferase de vagalume. A produção de luciferase foi quantificada pela leitura da luminescência. (C, D) Um ensaio de ADCC com Európio TDA (EuTDA) in vitro foi realizado, em que as células Wien 133 alvos foram coincubadas com séries de diluição de anticorpo e PBMC humana (E:T 100:1). A lise de célula foi determinada medindo-se o sinal do quelato fluorescente EuTDA no sobrenadante.

[00495] A **Figura 9** mostra a seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas da interação Fc-Fc realçada IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-K439E com mutação inibidora da ligação de C1q G236R ou K322A + variantes da interação Fc-Fc realçada IgG1-11B8 anti-CD20-S440K com ou sem mutação realçadora da ligação de C1q E333S. As mutações realçadoras da interação Fc-Fc testadas foram E430G, E345K, E345R e E345R-E430G. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI e lise máxima. A normalização foi realizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-

E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00496] A **Figura 10** mostra a seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E com mutações moduladoras da ligação de C1q na posição G236 (G236R ou G236K) ou posição G237 (G237A, G237T, G237Q ou G237R) ou a mutação dupla G237A-K322A + IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 com ou sem mutação moduladora da ligação de C1q E333S, E333A, K326A, K326W-E333S, G237A ou G237A-E333S. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI e lise máxima. A normalização foi realizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00497] A **Figura 11** mostra a seletividade da atividade da CDC pelas variantes de isótipo de anticorpo misturadas (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 estabilizada na dobradiça) de CAMPATH-1H-E430G-K439E anti-CD52 com ou sem mutação inibidora da ligação de C1q G236R + 11B8-E430G-S440K anti-CD20 com ou sem mutação realçadora da ligação de C1q E333S. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI. A normalização foi realizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00498] A **Figura 12** mostra seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E com ou sem mutação inibidora da ligação de C1q G236R ou K322A + anti-CD37 IgG1-CD37-37.3-E430G-S440K com ou sem mutação realçadora da ligação de C1q E333S nas células (A) Daudi e (B) Wien 133. As células alvos foram incubadas com série de concentração de anticorpo na

presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI. A normalização foi realizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-CD37-37.3-E430G (100%).

[00499] A **Figura 13** mostra citotoxicidade mediada por DR5 de (A) variantes únicas de anticorpo ou (B) uma mistura agonista de variantes de anticorpo IgG1-DR5-01-G56T-E430G-K439E anti-DR5 com ou sem mutação inibidora da ligação de C1q G236R + IgG1-DR5-05-E430G-S440K com ou sem mutação realçadora da ligação de C1q E333S nas células de câncer pancreático humano BxPC-3. ensaio de viabilidade de três dias foi realizado e a viabilidade celular foi determinada usando o kit CellTiter-Glo.

[00500] A **Figura 14** mostra atividade da CDC pelas variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G com a mutação moduladora da ligação de C1q G237A, G236R, A327K, K322E ou P329R. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI. A normalização foi realizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação-S440K (0%; não mostrado) e IgG1-CAMPATH-1H-E430G (100%).

[00501] A **Figura 15** mostra a ligação de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E com a mutação inibidora da ligação de C1q G236R ou K322A (A, B, C) e variantes de anticorpo de IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 com a mutação realçadora da ligação de C1q E333S (D, E, F) ao FcRn humano. Um ELISA de FcRn foi realizado com 5 µg/mL de domínio extracelular recombinante revestido de FcRn humano (FcRnhsECDHis-B2M-BIO) e séries de diluição de anticorpo. A quantidade de anticorpos ligados foi determinada com um anticorpo anti-IgG1 humana de cabra conjugado a HRP e o substrato quimioluminescente ABTS. A absorbância foi medida a 405 nm.

[00502] A **Figura 16** mostra a taxa de depuração de 500 µg de anticorpo intravenosamente administrados em camundongos SCID. (A-C) A IgG humana total em amostras de plasma foi determinada pelo ELISA e plotada em uma curva de concentração versus tempo para (A) variantes IgG1-CAMPATH-1H, (B) variantes IgG1-11B8 e (C) combinações de variantes IgG1-CAMPATH-1H + variantes IgG1-11B8. Cada ponto de dados representa a média +/- desvio padrão de amostras em triplicata. (D) A depuração até o dia 21 depois da administração do anticorpo foi determinada seguindo a fórmula $D \cdot 1.000 / AUC$ com D, dose injetada e AUC, área sob a curva da curva da concentração-tempo.

[00503] A **Figura 17** mostra a ligação de variantes de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E imobilizadas com as mutações de inibição da ligação de C1q G236R ou G237T e variantes IgG1-11B8-E430G-S440K com as mutações realçadoras da ligação de C1q K326A ou E333S aos ECD's biotinilados rotulados com His diméricos do alótipo FcγRIIA 131H (A), alótipo FcγRIIA 131R (B), FcγRIIB (C), alótipo FcγRIIIA 158V (D) e alótipo FcγRIIIA 158F (E) como testado nos ensaios de ELISA. a ligação é apresentada para amostra de 20 µg/mL de anticorpo em relação ao controle sem anticorpo (fundo) e ligação a IgG1-11B8-E430G-S440K (100%). A detecção foi realizada usando Estreptavidina-poliHRP e ABTS.

[00504] A **Figura 18** mostra a seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E anti-CD52 com ou sem uma mutação inibidora da ligação de C1q (G236R ou G237T) + IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 com mutação inibidora da ligação de FcγR G237A com ou sem a mutação realçadora da ligação de C1q E333S. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI e como lise a 40 µg/mL de IgG. A normalização foi realizada para o anticorpo de

controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00505] A **Figura 19** mostra atividade seletiva de combinações de variantes de IgG1-CAMPATH-1H e IgG1-11B8 no sangue integral, determinada pela análise de citometria de fluxo de células sanguíneas. eixo Y: Fração de células B (positivas em CD19 / negativas em CD3) ou Fração de células T (negativas em CD19/ positivas em CD3) da população de linfócito total (negativos em CD66b), depois de incubação durante a noite na presença de células efectoras. eixos X: grupos de tratamento diferentes. Os símbolos representam células de cinco doadores saudáveis diferentes, testados e duas incubações separadas por doador. (A) Atividade seletiva de IgG1-CAMPATH-1H-G236R-E430G-K439E misturados com IgG1-11B8-G237A-E430G-S440K. (B) Atividade seletiva de variantes de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E contendo uma mutação G237 adicional, misturada com IgG1-11B8-G237A-E430G-S440K. (C) Atividade seletiva de variantes de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E contendo uma mutação G236R ou G237 adicional, misturados com IgG1-11B8-G237A-E430G-S440K contendo uma mutação E333S realçadora da ligação de C1q adicional. (D) Profundidade de depleção de célula B pelos anticorpos alvejadores de célula B diferentes comparada com as combinações de anticorpo codependentes de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E com mutações adicionais G236R, G237Q ou G237R, misturados com IgG1-11B8-G237A-E430G-S440K. Eixo Y: representação na escala log da fração de células B determinada como acima.

[00506] A **Figura 20** mostra a seletividade da atividade da CDC nas linhagens de célula diferentes com diferentes níveis de expressão de CD20 e CD52 pela combinação de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E e variantes de anticorpo IgG1-11B8-E430G-S440K com uma mutação inibidora da ligação de C1q no componente anti-CD52 e uma mutação realçadora da ligação de C1q no componente anti-CD20. Ensaios da CDC in vitro foram

realizados com 0,01 a 40 µg/mL de anticorpo na presença de 20% de NHS usando linhagens de célula de linfoma de Burkitt Daudi (A), Raji (B) e Ramos (C), linhagem de célula ALL REH (D) e linhagem de célula de linfoma de célula B U-698-M (E). A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI e como lise máxima. A normalização foi realizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00507] A **Figura 21** mostra seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CD37-37.3-E430G-K439E anti-CD37 com ou sem uma mutação inibidora G236R C1q da ligação de + IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 com ou sem a mutação realçadora da ligação de C1q E333S. (A) células Daudi e (B) células WIL2-S foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada da porcentagem de células positivas em PI e como lise a 40 µg/mL de IgG. A normalização foi realizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CD37-37.3-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00508] A **Figura 22** mostra (A) ligação de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 com as mutações realçadoras da interação Fc:Fc E430G ou E345R, mutação inibidora da auto-oligomerização K439E, em combinação com qualquer uma das mutações inibidoras da ligação de FcγR e moduladoras da ligação de C1q G236R, G237A ou G237T à linhagem de célula de linfoma humano Wien 133. A ligação de anticorpo foi testada pela citometria de fluxo e é apresentada normalizada em relação ao valor Bmax de IgG1-Campath-1H do tipo selvagem (100%). Como um controle negativo para a ligação, um anticorpo anti-gp120 sem ligação IgG1-b12 foi usado. (B) A ligação máxima (Bmax) às células Raji pelas variantes de anticorpo IgG1-Campath-1H com mutações E430G e K439E, em combinação

com qualquer uma das mutações moduladoras da ligação de C1q G236R, G237A ou G237T é mostrada normalizada em relação à ligação de IgG1-Campath-1H do tipo selvagem (C) Valores Kd aparentes de variantes de anticorpo IgG1-Campath-1H com mutações E430G e S440K, em combinação com qualquer uma das mutações moduladoras da ligação de C1q G236R, G237A ou G237T às células Raji.

[00509] A **Figura 23** mostra a ligação de variantes de anticorpo de IgG1-11B8 anti-CD20 com a mutação realçadora da interação Fc-Fc E430G, mutação inibidora da auto-oligomerização S440K, em combinação com qualquer uma das mutações moduladoras da ligação de C1q K326A ou E333A (A) ou E333S, G237A ou G237A-E333S (B) à linhagem de célula de linfoma humano Raji. A ligação de anticorpo foi testada pela citometria de fluxo e é apresentada normalizada em relação ao valor Bmax de IgG1-11B8 tipo selvagem (100%). Como um controle negativo para a ligação, um anticorpo anti-gp120 sem ligação IgG1-b12 foi usado. (C, D) Ligação máxima (Bmax) às células Raji pelas variantes de anticorpo IgG1-11B8 com mutações E430G e S440K, em combinação com qualquer uma das mutações moduladoras da ligação de C1q K326A ou E333A (C) ou E333S, G237A ou G237A-E333S (D) é mostrada normalizada em relação à ligação de IgG1-11B8 tipo selvagem (E, F) Valores Kd aparentes de variantes de anticorpo IgG1-11B8 com mutações E430G e S440K, em combinação com qualquer uma das mutações moduladoras da ligação de C1q K326A ou E333A (E) ou E333S, G237A ou G237A-E333S (F) ligação às células Raji.

[00510] A **Figura 24** mostra a ligação de FcRn de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 e variantes de anticorpo IgG1-11B8 anti-CD20. (A, C) Ligação ao FcRn humano é mostrada para as variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 com mutação realçadora da interação Fc-Fc E430G, mutação inibidora da auto-oligomerização K439E e mutações moduladoras da ligação de C1q G237A ou G237T usando uma concentração

de anticorpo de 40 µg/mL no (A) pH 6,0 ou (C) pH 7,4. (B, D) Ligação ao FcRn humano pelas variantes de anticorpo IgG1-11B8 anti-CD20 com mutação realçadora da interação Fc-Fc E430G, mutação inibidora da auto-oligomerização S440K e mutações moduladoras da ligação de C1q K326A, E333A, G237A ou G237A-E333S usando uma concentração de 40 µg/mL de anticorpo no (B) pH 6,0 ou (D) pH 7,4. Um ELISA de FcRn foi realizado com 2 µg/mL de domínio extracelular recombinante revestido de FcRn humano (FcRnECDHis-B2M-BIO) e séries de diluição de anticorpo. A quantidade de anticorpos ligados foi determinada com um anticorpo anti-IgG1 humana de cabra conjugado a HRP e o substrato quimioluminescente ABTS. A absorbância foi medida a 405 nm.

[00511] A **Figura 25** mostra as concentrações da IgG humana total (hIgG) como medidas em amostras de sangue coletadas de camundongos injetados com IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 ou variantes de anticorpo anti-IgG1-11B8 ou misturas dos mesmos. (A) Concentração de hIgG total em amostras de sangue coletadas de camundongos injetados com IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G237Q ou IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R tipo selvagem. (B) Concentração de hIgG total em amostras de sangue coletadas de camundongos injetados com IgG1-11B8, IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A ou IgG1-11B8-E430G-S440K-E333S tipo selvagem. (C) Concentração de hIgG total em amostras de sangue coletadas de camundongos injetados com misturas de IgG1-CAMPATH-1H tipo selvagem + IgG1-11B8 ou misturas de IgG1-CAMPATH-1H e variantes de anticorpo IgG1-11B8 abrigando as mutações como em (A) e (B). Em todas as figuras, a linha pontilhada representa a concentração de IgG1 prognosticada no tempo para anticorpos de IgG1 do tipo selvagem nos camundongos SCID. (D) Depuração até dia 21 depois da administração do anticorpo foi determinada seguindo a fórmula $D \cdot 1000 / AUC$ com D, dose injetada e AUC, área sob a curva da curva da concentração-

tempo.

[00512] A **Figura 26** mostra a concentração de C4d (em µg/ml) detectado em amostras incubadas com variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H, mutações que abrigam IgG1-11B8 e IgG1-b12 E430G, K439E ou S440K e G236R, G237A, G237Q ou G237R, depois da subtração da concentração de C4d média detectada em amostras de controle negativo sem conter nenhum dos anticorpos. As amostras de controle positivo incluem variantes de anticorpo abrigando as mutações realçadoras da interação Fc-Fc E345R, E430G e S440Y (RGY).

[00513] A **Figura 27** mostra a ligação de C1q às células Wien 133 incubadas em gelo com soro humano normal como uma fonte de complemento, depois da opsonização com mutações abrigando variantes de anticorpos IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-11B8 e IgG1-b12 E430G, K439E ou S440K e G236R, G237T, K326A ou E333S, detectadas pela citometria de fluxo. Os valores de intensidade de fluorescência média foram normalizados para controlar reações sem anticorpo (0%) e o nível de topo de uma mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%), estimado pelo ajuste de um modelo de resposta agonista log. (A) ligação ao C1q de reações de controle. (B-D) Ligação ao C1q de (B) IgG1-CAMPATH-E430G-K439E, (C) IgG1-CAMPATH-E430G-K439E-G236R e (D) IgG1-CAMPATH-E430G-K439E-G237R, misturados com controle sem ligação IgG1-b12 ou variantes IgG1-11B8 diferentes.

[00514] A **Figura 28** mostra a ligação de FcγR pelas variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H-E430G e IgG1-11B8-E430G abrigando a mutação inibidora da auto-oligomerização K439E ou S440K e mutações moduladoras da ligação de C1q. (A-E) Ligação de variantes de anticorpo imobilizadas aos ECDs biotinilados diméricos rotulados com His como testado nos ensaios de ELISA, de (A) alótipo de alta afinidade FcγRIIA 131H, (B) alótipo de baixa afinidade FcγRIIA 131R, (C) FcγRIIB, (D) alótipo de

alta afinidade Fc γ RIIIA 158V ou (E) alótipo de baixa afinidade Fc γ RIIIA 158F. (F) Ligação de Fc γ RIa imobilizado às variantes de anticorpo testadas no ELISA. A ligação é apresentada para amostras de 20 μ g/mL de anticorpo e foi normalizada por experimento depois da subtração dos sinais em poços incubados sem anticorpo primário em relação ao sinal médio observado para IgG1-CAMPATH-1H tipo selvagem (100%). A detecção foi realizada usando Estreptavidina-poliHRP e ABTS.

[00515] A **Figura 29** mostra seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52, IgG1-11B8 anti-CD20 e IgG1-h2E8 anti-CD52 pela introdução de mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e modulem a ligação de C1q. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC foi medida em três experimentos independentes e é apresentada como (A) a AUC calculada em média normalizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%) e (B) a porcentagem calculada em média de lise determinada pela positividade do cloreto de propídio em uma concentração de anticorpo de 40 μ g/ml.

[00516] A **Figura 30** (A, B) mostra a eficácia na CDC de agente único e variantes de anticorpo combinadas IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G, IgG1-11B8 anti-CD20-E430G e IgG1-b12-E430G sem ligação a antígeno abrigando mutações inibidoras da auto-oligomerização e mutações moduladoras da ligação de C1q como indicadas. As células Wien 133 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia e CDC são apresentadas como a AUC normalizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00517] A **Figura 31** mostra a ativação de linhagens de célula repórter

Jurkat estavelmente expressando (A) FcγRIIa ou (B) FcγRIIIa, como medida pelo nível de luminescência (RLU), no cocultivo com células de linfoma Raji e concentrações diferentes das variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H e IgG1-11B8. os valores de luminescência foram normalizados por experimento em relação àqueles observados para a IgG1-b12 (0%) e IgG1-Campath-1H tipo selvagem + IgG1-11B8 tipo selvagem (100%), antes de calcular a média em relação a três réplicas experimentais (FcγRIIa) ou duas (FcγRIIIa).

[00518] A **Figura 32** mostra CDC codependente nas células Wien 133 induzida pelas misturas das variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H e IgG1-11B8 abrigando mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e modulem a ligação de C1q em razões não equimolares. (A) CDC codependente induzida pelas misturas contendo razões de concentração equimolares e não equimolares de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R e IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A. (B) CDC codependente induzida pelas misturas contendo razões de concentração equimolares e não equimolares de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G237Q e IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A.

[00519] A **Figura 33** mostra a seletividade da atividade da CDC pelas misturas de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 com variantes IgG1-HLA-DR-huL243 anti-HLA-DR (A) ou variantes IgG1-HLA-DR-1D09C3 anti-HLA-DR (B) pela introdução de mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e inibam a ligação de C1q. Células Oci-Ly17 foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de (A) IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-HLA-DR-huL243-E430G (100%) ou (B) IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-HLA-DR-1D09C3-E430G (100%).

[00520] A **Figura 34** mostra a atividade codependente seletiva da CDC

de variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 e IgG1-11B8 anti-CD20 pela introdução de mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e inibam a ligação de C1q. A eficácia da CDC é mostrada para variantes de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E com cada uma das mutações L234A, L234A-L235A, L234F, L234F-L235E, L235A, L235Q, G236R ou G237Q e misturas destas variantes com anticorpo IgG1-b12 de controle sem ligação ou IgG1-11B8-E430G-S440K. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00521] A **Figura 35** mostra a atividade codependente seletiva da CDC de variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 e IgG1-11B8 anti-CD20 pela introdução de mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e inibam a ligação de C1q. (A) eficácia da CDC de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H e IgG1-11B8 como um agente único ou misturas dos mesmos abrigoando a interação de mutações realçadoras de Fc-Fc E430G, E430N, E430T, E430V, E430Y, E345A, E345K, E345Q, E345R ou E345Y, mutações inibidoras da auto-oligomerização K439E ou S440K e mutações inibidoras da ligação de C1q G236R ou G237A. (B) eficácia da CDC de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H e IgG1-11B8 como um agente único ou misturas dos mesmos abrigoando a interação das mutações realçadoras de Fc-Fc E430G, E430N, E430T, E430V, E430Y, E345A, E345Q, E345V ou E345Y, mutações inibidoras da auto-oligomerização K439E ou S440K e mutações inibidoras da ligação de C1q G236R ou G237A. (C) Eficácia da CDC de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H e IgG1-11B8 como um agente único ou misturas dos mesmos abrigoando a interação combinada das mutações realçadoras de Fc-Fc E430G, E430N, E430T, E430V, E430Y, E345A, E345Q, E345V ou E345Y, as mutações inibidoras da auto-oligomerização

K439E ou S440K e as mutações inibidoras da ligação de C1q G236R ou G237A. (D) Eficácia da CDC de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H e IgG1-11B8 como um agente único ou misturas dos mesmos abrigo a interação das mutações realçadoras de Fc-Fc E430G ou K248E-T437R, mutações inibidoras da auto-oligomerização K439E ou S440K e mutações moduladoras da ligação de C1q G236R, G237A ou E333S. A eficácia da CDC é apresentada como a AUC normalizada para o anticorpo de controle IgG1-b12 sem ligação (0%) e a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00522] A **Figura 36** mostra a CDC codependente nas células de linfoma Raji induzida pelas misturas das variantes de anticorpo IgG1-CD37-37-3 e IgG1-11B8 abrigo mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e modulem a ligação de C1q. (A) As áreas-sob-a-curva (AUC) relativas, normalizadas para lise mínima (0% com IgG1-b12) e lise máxima (100% com a mistura de IgG1-CD37-37-3-E430G + IgG1-11B8-E430G), da lise de célula induzida pelas variantes de anticorpo indicadas em diluição ou misturas das mesmas. (B) Porcentagem máxima de lise induzida pelas variantes de anticorpo indicadas e misturas das mesmas.

[00523] A **Figura 37** mostra a atividade codependente seletiva da CDC de variantes de anticorpo misturadas de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 e IgG1-11B8 anti-CD20 pela introdução de mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e modulem a ligação de C1q. As amostras CLL de paciente foram incubadas com série de concentração de anticorpo na presença de 20% de NHS. A eficácia da CDC é apresentada como a porcentagem de células B viáveis na incubação com as variantes de anticorpo. Os resultados usando amostras CLL dos pacientes 1 (A), 2 (B) e 3 (C) são mostrados.

[00524] A **Figura 38** mostra a fração de células B, células T CD4+ e células T CD8+ detectada pela citometria de fluxo depois da incubação de

amostras de sangue integrais com misturas de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-huCLB-T3/4 e IgG1-CD5-INSERM abrigando mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e modulem a ligação de C1q. A porcentagem de (A) células B, (B) células T CD4+ e (C) células T CD8+ detectada em amostras de sangue integral de 4 doadores depois da incubação com as variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-huCLB-T3/4 e IgG1-b12 indicadas. A porcentagem de (D) células B, (E) células T CD4+ e (F) células T CD8+ detectada em amostras de sangue integral de 4 doadores depois da incubação com as variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-CD5-INSERM e IgG1-b12 indicadas. As frações foram calculadas como $[100\% \times (\text{contagem de célula na amostra} / \text{contagem de célula na 'amostra sem Ab'}) \times (\text{Contagem de granulócito 'amostra sem Ab'} / \text{Contagem de granulócito na amostra})]$.

[00525] A **Figura 39** mostra a ativação cooperativa da morte celular programada em células cancerosas pelas variantes de anticorpo anti-DR4 e anti-DR5 abrigando mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e inibam (G237T) ou realcem (K326W-E333S) a ligação de C1q. (A) A viabilidade de células de câncer pancreático humano BxPC-3 depois de uma incubação de 72h com as variantes de anticorpo indicadas. (B) A viabilidade das células cancerosas de cólon humano COLO 205 depois de uma incubação de 72h com as variantes de anticorpo indicadas. A porcentagem das células viáveis foi calculada usando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de células viáveis} = [(\text{luminescência da amostra de anticorpo} - \text{luminescência da amostra de estaurosporina}) / (\text{luminescência na amostra de anticorpo} - \text{luminescência na amostra de estaurosporina})] \times 100.$$

A-B).

[00526] A mistura de IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 (nenhuma atividade de CDC de agente único) + IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E (atividade de CDC de agente único parcial) restaurou

completamente a atividade máxima da CDC sobre Wien 133, similar ao nível da mistura alvejadora de CD20 e CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (dose-resposta similar na Figura 1A; 100% na Figura 1B). A adição de IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 (nenhuma atividade de CDC de agente único) ao IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-P329R-E430G-K439E (nenhuma atividade de CDC de agente único), parcialmente recuperou a lise de célula nas Wien 133 (56% na ligação de saturação alvo na Figura 1A; 28% na Figura 1B).

[00527] A adição de IgG1-11B8 anti-CD20-P329R-E430G-S440K (nenhuma atividade de CDC de agente único) ao IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E (atividade de CDC de agente único parcial), parcialmente restaurou a atividade da CDC na Wien 133 a um nível mais baixo do que a mistura IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (EC50 mais alto e extermínio máximo mais baixo na Figura 1A; 47% na Figura 1B), mas moderadamente mais alto do que a mistura de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E + anticorpo de controle (IgG1-b12), que tem um extermínio máximo similar mas EC50 mais alto (Figura 1A) e AUC relativa mais baixo (36% na Figura 1B). Ao contrário, a adição de IgG1-11B8 anti-CD20-P329R-E430G-S440K (nenhuma atividade de CDC de agente único) ao IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-P329R-E430G-K439E (nenhuma atividade de CDC de agente único) não restaurou nenhuma atividade da CDC (Figura 1A-B).

[00528] Estes dados ilustram que a introdução da mutação P329R, que inibe a ligação direta de C1q, suprimiria adicionalmente a atividade da CDC de componentes individuais em misturas de anticorpo K439E + S440K com interações Fc-Fc realçadas (E430G). Surpreendentemente, foi observado que para dois anticorpos contra dois alvos diferentes os quais ambos não mostraram atividade detectável da CDC como um agente único, a atividade da CDC poderia ser parcialmente restaurada para misturas em que apenas um

dos dois anticorpos contivessem a mutação P329R inibidora da ligação de C1q. Estes dados indicam que uma mistura de anticorpos IgG-E430G-S440K anti-CD20 + IgG-E430G-K439E anti-CD52 seria aplicada para criar seletividade da atividade da CDC nas células simultaneamente expressando os dois alvos diferentes pela introdução da mutação inibidora da ligação de C1q P329R para diminuir ou inibir a atividade do agente único. Sem estar limitado pela teoria, a avidéz de C1q para sítios de ligação de C1q em três dos anticorpos em montagens de IgG hetero-hexaméricas podem ser suficientemente altas para recuperar a atividade parcial da CDC. Ao contrário, a perda de todos os seis sítios de ligação de C1q em todos os seis anticorpos, por exemplo, em misturas de dois anticorpos que ambos contiveram a mutação P329R, resultou na perda da atividade da CDC.

Exemplo 3: Seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas pela introdução da mutação K322E em IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-K439E + IgG1-11B8 anti-CD20-S440K com uma mutação E430G realçadora da interação Fc-Fc

[00529] O efeito de mutação K322E sobre a eficácia da CDC *in vitro* foi testado usando misturas de variantes de anticorpo IgG1-11B8 anti-CD20 e anticorpo IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52. Concentrações diferentes de anticorpos purificados (faixa de 0,001 a 30,0 µg/mL de concentrações finais) foram testadas em um ensaio de CDC *in vitro* nas células Wien 133 com 20% de NHS, essencialmente como descrito no Exemplo 2. Mutações diferentes foram introduzidas nos anticorpos IgG1-11B8 e IgG1-CAMPATH-1H: E430G, que induzem interações Fc-Fc realçadas; K322E, que inibe a ligação direta de C1q aos anticorpos; e cada uma das mutações K439E ou S440K, que inibem a formação de complexos de anticorpo homo-hexaméricos através da inibição das interações Fc-Fc intermoleculares e promovem a formação de complexos de anticorpo hetero-hexaméricos através de interações Fc-Fc complementares cruzadas. A porcentagem de lise foi calculada a partir do

número de células positivas em PI. Os dados foram analisados usando valores de melhor ajuste de um ajuste de dose-resposta não linear usando concentrações transformadas em log e a área sob as curvas de dose-resposta de três réplicas experimentais foi calculada. Os valores relativos das áreas sob a curva (AUC) representam a normalização para lise mínima (0% com IgG1-b12) e lise máxima (100% com a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G).

[00530] Uma mistura 1:1 de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G + IgG1-11B8 anti-CD20-E430G induziu a lise de célula eficiente das células Wien 133 (**Erro! Fonte de referência não encontrada. A**; ajustado para 100% em **Erro! Fonte de referência não encontrada. B**). Quando IgG1-CAMPATH-1H-E430G foi testado como um agente único, a introdução da mutação K439E resultou em eficácia diminuída da CDC e K439E-K322E (SEQ ID NO: 91) resultou na perda completa da atividade da CDC (**Erro! Fonte de referência não encontrada. A-B**). Para a IgG1-11B8-E430G, a introdução da mutação S440K ou S440K-K322E (SEQ ID NO: 109) resultou na perda de eficácia da CDC (**Fonte de referência não encontrada. A-B**).

[00531] A mistura de IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 (nenhuma atividade de CDC de agente único) + IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E (atividade de CDC de agente único parcial) restaurou a atividade alta da CDC nas células Wien 133, comparável ao nível da mistura alvejando CD20 e CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (dose-resposta comparável na Figura 2A; 87% na Figura 2B). Adicionando IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 (nenhuma atividade de CDC de agente único) ao IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-K322E-E430G-K439E (nenhuma atividade de CDC de agente único), parcialmente recuperou a lise de célula nas Wien 133 (EC50 mais alto do que a mistura IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G na Figura 2A; 60% na Figura 2B).

[00532] Adicionar IgG1-11B8 anti-CD20-K322E-E430G-S440K

(nenhuma atividade de CDC de agente único) ao IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E (atividade de CDC de agente único parcial), parcialmente restaurou a atividade da CDC nas Wien 133 (EC50 mais alto do que a mistura IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G na Figura 2A; 66% na Figura 2B). Ao contrário, adicionar IgG1-11B8 anti-CD20-K322E-E430G-S440K (nenhuma atividade de CDC de agente único) ao IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-K322E-E430G-K439E (nenhuma atividade de CDC de agente único) apenas restaurou atividade mínima da CDC (EC50 alta e extermínio máximo de aproximadamente 31% na Figura 2A; 10% na Figura 2B).

[00533] Estes dados ilustram que a introdução da mutação K322E, que inibe a ligação direta de C1q, suprimiria adicionalmente a atividade da CDC de componentes individuais nas misturas de anticorpo K439E + S440K com interações Fc-Fc realçadas (E430G). Surpreendentemente, foi observado que para dois anticorpos contra dois alvos diferentes que ambos não mostraram atividade detectável da CDC como um agente único, a atividade da CDC pode ser restaurada até quase a lise de célula máxima para misturas em que apenas um dos dois anticorpos conteve a mutação K322E inibidora da ligação de C1q. Estes dados indicam que uma mistura dos anticorpos IgG-E430G-S440K anti-CD20 + IgG-E430G-K439E anti-CD52 seria aplicada para criar seletividade da atividade da CDC nas células simultaneamente expressando os dois alvos diferentes pela introdução da mutação inibidora da ligação de C1q K322E para diminuir ou inibir a atividade do agente único.

Exemplo 4: Seletividade da atividade da CDC nas linhagens de célula diferentes pelas variantes de anticorpo misturadas pela introdução da mutação K322E nos anticorpos anti-CD20 + anti-CD52 com uma mutação E430G realçadora da interação Fc-Fc

[00534] O Exemplo 2 e o Exemplo 3 descrevem que combinações específicas dos anticorpos anti-CD20 e anti-CD52 realçadores da interação

Fc-Fc mostram atividade da CDC mais eficiente nas células Wien 133 se ambos os componentes estiverem simultaneamente presentes, contanto que cada um dos anticorpos contivesse uma mutação K439E ou uma S440K que bloqueasse a homo-oligomerização por intermédio das interações Fc-Fc. A atividade seletiva da mistura comparada aos seus componentes individuais foi melhorada pela introdução da mutação inibidora da ligação de C1q P329R (Exemplo 2) ou K322E (Exemplo 3) no anticorpo anti-CD52 IgG1-CAPMATH-1H-E430G-S440K para suprimir a sua atividade da CDC residual como um componente único. Aqui, a seletividade da atividade da CDC pelas misturas das variantes IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 + IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E anti-CD52 de anticorpo com uma mutação K322E para as células expressando níveis suficientes tanto de CD20 quanto de CD52 na superfície celular foi testada em sete linhagens de célula humana diferentes: linhagens de célula de linfoma de Burkitt Wien 133, Daudi (ATCC, Cat No. CCL-213), Raji (ATCC, Cat No. CCL-86) e Ramos (ATCC, Cat No. CRL-1596), linhagem de célula de linfoma linfoblástico agudo (ALL) REH (DSMZ, Cat No. ACC-22), linhagem de célula de mieloma U266B1 (ATCC, Cat No. TIB-196) e linhagem de célula de linfoma de célula B U-698-M (DSMZ, Cat No. ACC-4). Os ensaios da CDC *in vitro* foram realizados com 20% de NHS e concentrações finais de anticorpo de 30,0 µg/mL, essencialmente como descrito no Exemplo 2. A lise de célula foi calculada a partir do número de células positivas em PI, calculadas em média a partir de três réplicas experimentais e normalizadas por linhagem de célula em relação à lise de célula medida para o anticorpo de controle negativo IgG1-b12 (0%) e para o IgG1-CAMPATH-1H-E430G (100%, para REH, U266B1 e Wien 133) ou IgG1-11B8-E430G (100%, para Daudi, Raji, Ramos e U-698-M), dependendo de qual anticorpo induziu a lise mais alta.

[00535] Os níveis de expressão de superfície celular de CD52 e CD20 foram determinados pela imunofluorescência indireta usando o Kit Human

IgG Calibrator (Biocytex, Cat No. CP010). 100.000 células por poço foram semeadas em placas de poliestireno de 96 poços de fundo redondo (Greiner Bio-A, Cat No. 650101). As seguintes etapas foram realizadas a 4°C. As células foram peletizadas pela centrifugação por 3 minutos a 300xg e recolocadas em suspensão em 50 µL de PBS (B Braun, Cat No. 3623140) contendo concentrações saturantes de 10 µg/mL de IgG1-CAMPATH-1H (anti-CD52) ou IgG1-11B8 (anti-CD20). Depois de uma incubação de 30 minutos a 4°C, as células foram peletizadas pela centrifugação a 300xg por 3 minutos e recolocadas em suspensão em 150 µL de tampão FACS (PBS + 0,1% (p/v) de albumina sérica bovina (BSA) + 0,02% (p/v) de azida de sódio). Grânulos de Configuração e Calibração foram adicionados à placa de acordo com as instruções do fabricante. As células e grânulos em paralelo foram lavados duas vezes mais com 150 µL de tampão FACS, recolocados em suspensão em 50 µL de anti-IgG humana de cabra absorvida em IgG de camundongo conjugado a FITC (BioCytex) e incubados por 30 minutos a 4°C. As células e grânulos foram lavados duas vezes e recolocados em suspensão em 150 µL de tampão FACS. As células foram recolocadas em suspensão em Fixative (BioCytex) e incubadas entre 5 e 60 minutos a 4°C protegidas da luz. A imunofluorescência foi medida pela citometria de fluxo em um FACS Canto II (BD Biosciences) pelo registro de 10.000 eventos dentro da população de células viáveis. A Média Geométrica da intensidade de fluorescência dos Grânulos de Calibração foi usada para calcular a calibração curve que foi forçada ir através da intensidade zero e concentração zero usando o software GraphPad Prism. Para cada linhagem de célula, as capacidades de ligação do anticorpo (ABC) de IgG1-CAMPATH-1H e IgG1-11B8, representativos da expressão de superfície celular de CD52 e CD20, respectivamente, foram calculadas usando a Média geométrica da intensidade de fluorescência, com base na equação da curva de calibração (interpolação de desconhecidos a partir da curva padrão) usando o Software GraphPad,

seguido pela subtração do fundo determinado para os poços incubados sem anticorpo primário. Os valores ABC foram calculados em média a partir dos dois experimentos independentes e (resumido na Tabela 2).

[00536] A Figura 3 mostra que a atividade da CDC na saturação alvo de IgG1-CAMPATH-1H-E430G e IgG1-11B8-E430G variou com os níveis de expressão alvos: as células U266B1 (CD20 ABC < 20.000; CD52 ABC > 1×10^6) e REH (CD20 ABC < 20.000; CD52 ABC > 100.000) foram resilientes à lise pelo anticorpo IgG1-11B8-E430G anti-CD20, mas sensíveis ao anticorpo IgG1-CAMPATH-1H-E430G anti-CD52. Vice e versa, as células Daudi (CD52 ABC < 75.000; CD20 ABC > 100.000) foram resilientes ao IgG1-CAMPATH-1H-E430G, mas sensível ao IgG1-11B8-E430G. As outras quatro linhagens de célula testadas foram sensíveis tanto ao IgG1-CAMPATH-1H-E430G quanto ao IgG1-11B8-E430G: Wien 133 (CD20 ABC > 100.000; CD52 ABC > 300.000), Raji (CD20 ABC > 100.000; CD52 ABC > 85.000), U-698-M (CD20 ABC > 70.000; CD52: ABC > 90.000) e Ramos (CD20 ABC > 80.000; CD52 ABC > 175.000).

[00537] Para o IgG1-CAMPATH-1H-E430G, a introdução da mutação K439E resultou em atividade de agente único reduzida da CDC nas células U-698-M e Raji (CD52 ABC < 100.000), mas não teve nenhum efeito significativo sobre as células das linhagens de célula U266B1 (CD52 ABC > 1×10^6), células Wien 133 (CD52 ABC > 300.000), Ramos (CD52 ABC > 175.000) e REH (CD52 ABC > 135.000). A inibição da ligação de C1q pela introdução da K322E em IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E eliminou adicionalmente a atividade de agente único da CDC em todas as linhagens de célula testadas que foram responsivas ao IgG1-CAMPATH-1H-E430G. Para o IgG1-11B8-E430G, a introdução apenas da mutação S440K ou a introdução tanto da mutação S440K quanto da K322E resultaram na inibição completa da atividade de agente único da CDC em todas as linhagens de célula testadas que foram sensíveis ao IgG1-11B8-E430G: Daudi (CD20 ABC < 115.000),

Wien 133 (CD20 ABC < 110.000), Raji (CD20 ABC < 120.000), U-698-M (CD20 ABC < 75.000) e Ramos (CD20 ABC < 85.000).

[00538] A mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E + IgG1-11B8-E430G-S440K mostrou atividade da CDC em todas as linhagens de célula testadas, independente dos níveis de expressão superficial de CD20 e CD52 (Figura 3). Em grande contraste, uma mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-K322E + IgG1-11B8-E430G-S440K mostrou lise seletiva apenas daquelas linhagens de célula que demonstraram níveis de expressão de superfície suficientes tanto de CD20 quanto de CD52: Wien 133 (CD20 ABC > 100.000; CD52 ABC > 300.000), Ramos (CD20 ABC > 80.000; CD52 ABC > 175.000), U-698-M (CD20 ABC > 70.000; CD52 ABC > 90.000) e Raji (CD20 ABC > 100.000; CD52 ABC > 85.000).

[00539] Quando CD20 ou CD52 foi apenas expresso em níveis muito baixos, nenhuma atividade da CDC foi observada com a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-K322E + IgG1-11B8-E430G-S440K: Daudi (CD52 ABC < 75.000), U266B1 U266B1 (CD20 ABC < 20.000) e REH (CD20 ABC < 20.000). Quando a mutação inibidora da ligação de C1q K322E foi introduzida em ambos os anticorpos (IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-K322E + IgG1-11B8-E430G-S440K-K322E), nenhuma atividade da CDC foi observada. Juntos, estes dados sugerem que o recrutamento de C1q e a eficácia da CDC pelo IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-K322E é dependente da sua hetero-oligomerização com IgG1-11B8-E430G-S440K.

[00540] Em conclusão, o extermínio seletivo de células expressando níveis suficientes tanto de CD20 quanto de CD52 seria obtido usando uma mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-K322E + IgG1-11B8-E430G-S440K; ao contrário, esta mistura exibiu níveis de lise de fundo nas linhagens de célula que expressam tais níveis baixos de expressão de CD20 ou CD52 de modo que as mesmas não seriam exterminadas pela atividade de

agente único da CDC de IgG1-11B8-E430G-S440K e IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-K322E, respectivamente.

Tabela 2: Superfície celular expressão de CD52 e CD20 nas linhagens de célula de câncer hematológico.

Alvo	ABC ¹						
	U266B1	Wien 133	Ramos	REH	U-698-M	Raji	Daudi
CD52 IgG1-CAMPATH-1H	1.455.918	332.343	178.794	135.088	93.651	85.514	7.275
CD20 IgG1-11B8	18.544	101.937	81.198	13.031	70.047	115.310	110.004

[00541] ¹A expressão de superfície celular é expressa como o número de capacidades de ligação do anticorpo (ABC) específicas por célula, determinada usando o Kit Human IgG Calibrator (Biocytex).

Exemplo 5: Análise do efeito de mutações de inibição da ligação de C1q diferentes no anticorpo IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E anti-CD52 sobre a atividade seletiva da CDC de misturas de anticorpo com o anticorpo IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20

[00542] Foi descrito acima que a introdução da mutação P329R (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**) ou K322E (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**) inibidora da ligação de C1q resultou na inibição da atividade residual da CDC de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E nas células Wien 133, enquanto a atividade da CDC foi completamente, parcialmente ou de modo algum recuperada quando misturada com IgG1-11B8-E430G-S440K, dependendo da linhagem de célula testada (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**). Aqui, os efeitos das mutações de inibição da ligação de C1q diferentes foram comparados nos ensaios da CDC *in vitro* usando as células Wien 133 com variantes de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E contendo a mutação inibidora da ligação de C1q G236R (SEQ ID NO: 84), K322A (SEQ ID NO: 90), E269K (SEQ ID NO: 81), K322E ou P329R (aqui listado pela diminuição esperada da afinidade de ligação de C1q) em uma mistura com IgG1-11B8-E430G-S440K. O ensaio de CDC *in vitro* usando células Wien 33 foi realizado com 20% de NHS e concentrações de

diluição em série de anticorpo (faixa de 0,002 a 40,0 µg/mL de concentrações finais em diluições de 4 vezes), essencialmente como descrito em **(Erro! Fonte de referência não encontrada.)**. A lise de célula foi calculada a partir do número de células positivas em PI como medido pela citometria de fluxo em um peneirador Intellicyt iQue®, calculados em média a partir de três réplicas experimentais. Os valores relativos das áreas sob a curva (AUC) representam a normalização para a lise mínima (0% com controle negativo IgG1-b12-K439E + IgG1-b12-S440K) e lise máxima (100% com a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G). **(Erro! Fonte de referência não encontrada.)** mostra diagramas de barra para os valores AUC da atividade de dose-resposta das curvas de CDC nas células Wien 133. A introdução de cada uma das mutações de inibição da ligação de C1q (G236R, K322A, E269K, K322E ou P329R) resultou na inibição completa da atividade residual de agente único da CDC pelo IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E nas Wien 133. Em uma mistura com IgG1-11B8-E430G-S440K, níveis crescentes da recuperação da atividade da CDC foram observados com variantes de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E contendo a mutação inibidora da ligação de C1q única P329R, K322E, E269K, K322A ou G236R. Estes dados sugerem que houve uma correlação direta entre a afinidade de ligação de C1q das variantes de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E (P329R, K322E, E269K, K322A ou G236R) e a recuperação da atividade da CDC para as misturas com IgG1-11B8-E430G-S440K.

Exemplo 6: Análise do efeito de mutações realçadoras da ligação de C1q diferentes no anticorpo IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 sobre a atividade seletiva da CDC de misturas de anticorpo com o anticorpo IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E anti-CD52

[00543] Os efeitos de mutações realçadoras da ligação de C1q diferentes foram comparados em ensaios da CDC *in vitro* usando as células Wien 133 com variantes IgG1-11B8-E430G-S440K contendo as mutações

realçadoras da ligação de C1q E333S (SEQ ID NO: 103), K326W (SEQ ID NO: 112) ou K326A/E333A (SEQ ID NO: 111; aqui listadas pelo aumento esperado da afinidade de ligação de C1q) em uma mistura com IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E. O ensaio de CDC *in vitro* usando as células Wien 133 foi realizado com 20% de NHS e concentrações de diluição em série de anticorpo (faixa de 0,002-40,0 µg/mL de concentrações finais em diluições de 4 vezes), essencialmente como descrito em **Erro! Fonte de referência não encontrada..** lise de célula foi calculada a partir do número de células positivas em PI como medido pela citometria de fluxo em um peneirador Intellicyt iQue®, calculado em média de três réplicas experimentais. Os valores relativos das áreas sob a curva (AUC) representam a normalização para lise mínima (0% com controle negativo IgG1-b12-K439E + IgG1-b12-S440K) e lise máxima (100% com a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G). **Erro! Fonte de referência não encontrada.** mostra diagramas de barra para os valores AUC da atividade de dose-resposta das curvas de CDC sobre as células Wien 133. A introdução das mutações realçadoras da ligação de C1q E333S, K326W ou K326A/E333A resultou em atividade aumentada de agente único da CDC pelo IgG1-11B8-E430G-S440K sobre as Wien 133 (7% para E333S; 18% para K326W; 25% para K326A/E333A comparada a 1% sem uma mutação realçadora da ligação de C1q). Em uma mistura com IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E, níveis crescentes da atividade da CDC foram observados com as variantes IgG1-11B8-E430G-S440K contendo as mutações realçadoras da ligação de C1q K326A/E333A, K326W ou E333S. Estes dados sugerem que houve uma correlação direta entre a afinidade de ligação de C1q das variantes IgG1-11B8-E430G-S440K (K326A/E333A, K326W ou E333S) e a atividade da CDC para as misturas com IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E.

Exemplo 7: Análise do efeito de mutações de inibição da ligação de C1q diferentes em anticorpo IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E anti-CD52

e mutações realçadoras da ligação de C1q em anticorpo IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 sobre a atividade seletiva da CDC de misturas de anticorpo das variantes de anticorpo anti-CD52 e anti-CD20

[00544] Os efeitos de mutações diferentes que afetam a afinidade de ligação de C1q foram comparados nos ensaios da CDC *in vitro* usando as células Wien 133 com uma variante IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E contendo a mutação inibidora da ligação de C1q (descrita no Exemplo 5) G236R, K322A, E269K, K322E ou P329R em misturas com uma variante IgG1-11B8-E430G-S440K contendo as mutações realçadoras da ligação de C1q E333S, K326W ou K326A/E333A (descrita no Exemplo 6). O ensaio de CDC *in vitro* usando as células Wien 133 foi realizado com 20% de NHS e concentrações de diluição em série de anticorpo (faixa de 0,002 a 40,0 µg/mL de concentrações finais em diluições de 4 vezes), essencialmente como descrito no Exemplo 2. A lise de célula foi calculada a partir do número de células positivas em PI como medido pela citometria de fluxo em um Peneirador Intellicyt iQue®, calculada em média de três réplicas experimentais. Os valores relativos das áreas sob a curva (AUC) representam a normalização para lise mínima (0% com controle negativo IgG1-b12-K439E + IgG1-b12-S440K) e lise máxima (100% com a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G). A Figura 6 mostra diagramas de barra para os valores AUC da atividade de dose-resposta das curvas de CDC nas células Wien 133. As misturas de IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 com uma mutação realçadora da ligação de C1q em um mistura com variantes de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E anti-CD52 de anticorpo com uma mutação da inibição da ligação de C1q G236R ou K322A mostrou recuperação melhorada da atividade da CDC nas células Wien 133 comparadas com as misturas com IgG1-11B8-E430G-S440K sem uma mutação realçadora da ligação de C1q. Houve uma correlação entre a força esperada da afinidade de ligação de C1q na variante de IgG1-11B8-E430G-

S440K (K326A/E333A>K326W>E333S) e a recuperação do nível da atividade da CDC quando misturados com uma variante IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E contendo uma mutação da inibição da ligação de C1q, com recuperação da lise máxima levemente realçada para G236R (Figura 6A; Tabela 3), recuperação da lise máxima com valores EC50 aumentados para K322A (Figura 6B; Tabela 3), E269K (Figura 6C; Tabela 3), K322E (Figura 6D; Tabela 3) ou a lise máxima permaneceu reduzida com valores de EC50 aumentados para P329R (Figura 6E; Tabela 3).

Tabela 3

IgG1-CAMPATH-1H----IgG1-11B8-----IgG1-b12-----	Média	Desvio padrão	n=
E430G-----E430G-----	96,7	0,14	2
-----K439E+S440K--	4,81	0,56	3
-----E430G-S440K-----K439E-----	6,01	1,13	3
-----E430G-S440K-K326W-----K439E-----	44,1	2,42	3
-----E430G-S440K-E333S-----K439E-----	23,3	2,50	3
-----E430G-S440K-K326A-E333A--K439E-----	59,5	1,50	3
E430G-K439E-K322E-----S440K-----	7,03	0,71	3
E430G-K439E-K322E--E430G-S440K-----	89,3	1,22	3
E430G-K439E-K322E--E430G-S440K-K326W-----	95,9	0,81	3
E430G-K439E-K322E--E430G-S440K-E333S-----	95,4	0,92	3
E430G-K439E-K322E--E430G-S440K-K326A-E333A-----	96,6	1,05	3
E430G-----E430G-----	95,9	0,92	2
E430G-K439E-P329R-----S440K-----	5,47	1,83	3
E430G-K439E-P329R--E430G-S440K-----	27,5	13,6	3
E430G-K439E-P329R--E430G-S440K-K326W-----	77,2	5,80	3
E430G-K439E-P329R--E430G-S440K-E333S-----	75,0	5,61	3
E430G-K439E-P329R--E430G-S440K-K326A-E333A-----	86,6	2,87	3
E430G-K439E-K322A-----S440K-----	5,95	1,38	3
E430G-K439E-K322A--E430G-S440K-----	90,4	1,07	3
E430G-K439E-K322A--E430G-S440K-K326W-----	95,5	1,32	3
E430G-K439E-K322A--E430G-S440K-E333S-----	95,8	1,16	3
E430G-K439E-K322A--E430G-S440K-K326A-E333A-----	96,4	1,46	3
E430G-----E430G-----	95,1	0,28	2
E430G-K439E-G236R-----S440K-----	5,52	1,42	3
E430G-K439E-G236R--E430G-S440K-----	91,4	1,93	3
E430G-K439E-G236R--E430G-S440K-K326W-----	95,6	1,12	3
E430G-K439E-G236R--E430G-S440K-E333S-----	95,3	1,00	3
E430G-K439E-G236R--E430G-S440K-K326A-E333A-----	96,4	0,95	3
E430G-K439E-E269K-----S440K-----	4,93	1,44	3
E430G-K439E-E269K--E430G-S440K-----	89,3	1,00	3
E430G-K439E-E269K--E430G-S440K-K326W-----	95,6	1,45	3
E430G-K439E-E269K--E430G-S440K-E333S-----	95,0	1,19	3
E430G-K439E-E269K--E430G-S440K-K326A-E333A-----	95,7	1,35	3
E430G-----E430G-----	96,2	0,92	2
E430G-----	90,9	0,42	3
E430G-K439E-----	75,1	1,98	2
E430G-K439E-----S440K-----	69,9	1,06	2
E430G-K439E-----E430G-S440K-----	93,7	1,06	2
E430G-K439E-----E430G-S440K-K326W-----	96,4	0,78	2

IgG1-CAMPATH-1H----IgG1-11B8-----IgG1-b12-----	Média	Desvio padrão	n=
E430G-K439E-----E430G-S440K-E333S-----	96,3	0,92	2
E430G-K439E-----E430G-S440K-K326A-E333A-----	96,3	0,85	2
-----E430G-----	76,8	2,95	3

Exemplo 8: Ligação alvo de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 e variantes de anticorpo IgG1-11B8 anti-CD20 nas células

[00545] A ligação às células Wien 133 e de linfoma Raji foi analisada pela citometria de fluxo para IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 com E430G, K439E e mutações inibidoras da ligação de C1q G236R ou K322A e IgG1-11B8 anti-CD20 com E430G, S440K e mutação realçadora da ligação de C1q E333S. As suspensões de célula foram lavadas com tampão FACS e recolocadas em suspensão em tampão FACS [PBS + 0,1% (p/v) de albumina sérica bovina (BSA) + 0,02% (p/v) de azida de sódio] em uma concentração de $2,5 \times 10^6$ células/mL. 40 µL de amostras de suspensão de células (100.000 células por poço) foram semeadas em placas de poliestireno de 96 poços de fundo redondo (Greiner Bio-A; Cat nº 650101) e incubadas com 40 µL de amostras de anticorpo (concentrações finais 0,001 a 30 µg/mL em diluições de 3 vezes) por 30 minutos a 4°C. As células foram peletizadas pela centrifugação a 300x g por 3 minutos a 4°C e lavadas duas vezes com 150 µL de tampão FACS. As células foram incubadas com 50 µL de anticorpo secundário F(ab')₂ anti-IgG humana de cabra conjugado à R-ficoeritrina (R-PE) (Jackson ImmunoResearch, Cat No. 109-116-098, 1:100) por 30 minutos a 4°C, protegidas da luz. As células foram lavadas duas vezes com 150 µL de tampão FACS, recolocadas em suspensão em 150 µL de tampão FACS e a ligação do anticorpo foi analisada pela citometria de fluxo em um peneirador Intellicyt iQue[®]. As curvas de ligação foram analisadas usando a análise de regressão não linear (dose-resposta sigmoideal com inclinação variável) usando o software GraphPad Prism.

[00546] A Figura 7 mostra que para o IgG1-CAMPATH-1H, todas as variantes de anticorpo testadas mostraram ligação dependente da dose similar tanto para as Wien 133 (Figura 7A) quanto para as células Raji (Figura 7B).

Estes dados indicam que a introdução das mutações únicas E430G e K439E e da mutação dupla E430G-K439E não teve nenhum efeito sobre a ligação alvo na superfície celular. Também a introdução de uma mutação adicional G236R ou K322A não teve nenhum efeito sobre a ligação alvo de CD52 na superfície celular.

[00547] A Figura 7 mostra que para a IgG1-11B8, todas as variantes de anticorpo testadas mostraram ligação dependente da dose similar tanto para as Wien 133 (Figura 7C) quanto para as células Raji (Figura 7D). Estes dados indicam que a introdução das mutações únicas E430G e S440K e da mutação dupla E430G-S440K não teve nenhum efeito sobre a ligação alvo na superfície celular. Também a introdução de uma mutação adicional E333S não teve nenhum efeito sobre a ligação alvo CD20 na superfície celular.

Exemplo 9: Análise do efeito da ligação de mutações de inibição de C1q em anticorpo anti-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E e uma mutação realçadora da ligação de C1q no anticorpo IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 sobre as funções efectoras mediadas por FcγR usando misturas das variantes de anticorpo anti-CD52 e anti-CD20

[00548] Os efeitos da introdução das mutações inibidoras da ligação de C1q G236R ou K322A nas variantes de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E e da mutação realçadora da ligação de C1q E333S em IgG1-11B-E430G-S440K sobre a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) foram testados em um bioensaio repórter ADCC sobre as células Raji e em um ensaio de ADCC com Európio TDA (EuTDA) *in vitro* com células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC) sobre as células Wien 133.

[00549] Para o bioensaio repórter de ADCC, variantes de IgG1-CAMPATH-1H (WT, E430G, K439E (SEQ ID NO: 29), E430G-K439E, E430G-K439E-G236R e E430G-K439E-K322A) e IgG1-11B8 (WT, E430G, S440K (SEQ ID NO: 30), E430G-S440K, E430G-S440K-E333S) foram

testadas usando o Sistema de Ensaio da Luciferase Bio-Glo (Promega, Cat No. G7940) sobre células Raji. Como células efectoras, o kit conteve Células T Jurkat humanas que são engenheiradas para expressar estavelmente FcγRIIIa de alta afinidade (V158) e um fator nuclear de elemento de resposta de células T ativadas (NFAT) dirigindo a expressão da luciferase de vagalume. Resumidamente, as células Raji (5.000 células/poço) foram semeadas em OptiPlates brancas de 384 Poços (Perkin Elmer Cat No. 6007290) em Tampão de Ensaio ADCC [meio RPMI-1640 (Lonza, Cat No. BE12-115F) suplementado com 4% de Soro de IgG Baixo (Promega, Cat No. G711A)] e incubadas por 6 horas a 37°C/5% de CO₂ em um volume total de 30 µL contendo série de concentração de anticorpo (0,4 a 10.000 ng/mL de concentrações finais em diluições de 3,5 vezes) e Células Efectoras de Bioensaio ADCC descongeladas (Promega, Cat No. G701A). Depois de incubar as placas por 15 minutos na temperatura ambiente (RT), 30 µL de Reagente de Luciferase do Ensaio Bio Glo [Substrato de Ensaio de Luciferase Bio-Glo (Promega Cat No. G720A) em Tampão de Ensaio de Luciferase Bio-Glo (Promega, Cat No. G719A)] foram adicionados e incubados por 5 minutos na RT. A produção de luciferase foi quantificada pela leitura da luminescência em uma Leitora de Rótulo Múltiplo EnVision (Perkin Elmer).

[00550] A introdução da mutação inibidora da ligação de C1q G236R em IgG1-CAMPATH-E430G-K439E resultou na inibição completa da ativação de FcγRIIIa nas células efectoras depois da ligação do anticorpo anti-CD52 único nas células Raji, ao passo que a mutação inibidora da ligação de C1q K322A resultou na ativação parcial da ativação de FcγRIIIa no bioensaio repórter ADCC (Figura 8A). Todas as variantes de anticorpo IgG1-11B8 testadas mostraram ativação considerável de FcγRIIIa nas células efectoras depois da ligação dos anticorpos anti-CD20 únicos nas células Raji, sem nenhuma diferença significativa entre as variantes IgG1-11B8 contendo as mutações S440K e/ou E430G e/ou E333S (Figura 8B).

[00551] O ensaio de EuTDA ADCC *in vitro* (Ensaio de Citotoxicidade DELFIA EuTDA, Perkin Elmer, Cat No. AD0116) foi realizado nas células Wien 133 com PBMCs recém isoladas a partir de três doadores saudáveis diferentes como células efetoras para testar a atividade de ADCC das variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H (WT, K439E, E430G-K439E, G236R-E430G-K439E e K322A-E430G-K439E) e variantes de anticorpo de IgG1-11B8 (WT, S440K, E430G-S440K e E333S-E430G-S440K) como agentes únicos ou em combinações (IgG1-CAMPATH-1H-G236R-E430G-K439E ou -K322A-E430G-K439E com IgG1-11B8-E333S-E430G-S440K). As PBMC foram isoladas da camada leucoplaquetária (Sanquin, Amsterdam, países Baixos) usando meio de Separação de Linfócito (Lonza, Cat No. 17-829E) para centrifugação de densidade Ficoll padrão, de acordo com as instruções do fabricante. Depois da recolocação em suspensão das células em meio RPMI-1640 (Lonza, Cat No. BE12-115F) suplementada com 10% de Soro Bovino Doador com Ferro (DBSI, ThermoFischer, Cat No. 10371029) e Penicilina/Estreptomicina (Pen/Estrep, Lonza, Cat No. DE17-603E), as células foram contadas pela exclusão com azul de tripan (Sigma Aldrich, Cat No. T8154) e concentradas para 2×10^7 células/mL.

[00552] As células Wien 133 foram colhidas, lavadas (duas vezes em PBS, 1.200 rpm, 5 min), coletada em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de DBSI e Pen/Estrep em uma concentração de 1×10^6 células/mL, às quais 15 µL de Reagente DELFIA BATDA (Perkin Elmer, Cat No. C136-100, 5 µL/ 3×10^6 células) foram adicionados. A mistura foi incubada em um banho de água por 20 minutos a 37°C. Depois da lavagem das células (cinco vezes em 50 mL de PBS, 1.200 rpm, 5 min), as células foram recolocadas em suspensão em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de DBSI e Pen/Estrep, contadas pela exclusão em pelo azul de tripan e diluídas a uma concentração de 2×10^5 células/mL.

[00553] Para o experimento de ADCC, 50 µL de células Wien 133

rotuladas com BATDA (10.000 células/poço) foram pré-incubadas com uma série de concentração (0,01 a 10.000 ng/mL de concentrações finais em diluições de 10 vezes) das variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H e/ou IgG1-11B8 em um volume total de 150 µL de meio RPMI-1640 suplementado com 10% de DBSI e Pen/Estrep em placas de microtítulo com fundo em V de 96 poços (Greiner Bio-A; Cat No. 651101). Depois de 15 min na RT, 50 µL de PBMC (1×10^6 células) foram adicionados, resultando em uma razão de efector para alvo (E:T) de 100:1 e incubados por 2 horas a 37°C/5% de CO₂. Para determinar a quantidade máxima da lise de célula, 50 µL de células Wien 133 rotuladas com BATDA (10.000 células/poço) foram incubadas com 150 µL de meio RPMI-1640 suplementados com 10% de DBSI, Pen/Estrep e Tampão de Lise DELFIA (0,03% de Digitonina e 19% de DMSO, Perkin Elmer, Cat No. AD0116-UM) de acordo com as recomendações do fabricante. para determinar a quantidade de lise espontânea, 50 µL de células Wien 133 rotuladas com BATDA (10.000 células/poço) foram incubadas em 150 µL de meio sem qualquer anticorpo ou células efectoras.

[00554] Para medir a quantidade de Reagente BATDA liberado, as placas foram centrifugadas (500xg, 10 min), 20 µL de sobrenadante foram transferidos para uma placa de Micotitulação DELFIA e 200 µL de Solução de DELFIA Európio (Perkin Elmer, Cat No. AD0116-B) foram adicionados. Subsequentemente, as placas foram incubadas na RT por 15 minutos sob agitação. Európio-BATDA (EuTDA) foi medido em um fluorímetro resolvido com o tempo (Perkin Elmer EnVision 2104 Multi Detection Microplate Reader) e usado para calcular a porcentagem de lise mediada por anticorpo como segue: $(\text{liberação amostra} - \text{liberação espontânea}) / (\text{liberação máxima} - \text{liberação espontânea}) \times 100\%$.

[00555] A introdução da mutação E430G e/ou da K439E no IgG1-CAMPATH-1H WT não teve nenhum efeito sobre o extermínio mediado por

ADCC responsivo pela dose das células Wien 133 quando testadas como agentes únicos (Figura 8C). A introdução da mutação inibidora da ligação de C1q G236R em IgG1-CAMPATH-E430G-K439E resultou na inibição completa da atividade de ADCC do agente único, ao passo que a mutação inibidora da ligação de C1q K322A não teve nenhum efeito sobre a atividade de ADCC de IgG1-CAMPATH-E430G-K439E de agente único sobre as células Wien 133 (Figura 8C). Todas as variantes de anticorpo IgG1-11B8 testadas mostraram eficácia de ADCC considerável nas células Wien 133 quando testadas como agentes únicos, sem nenhuma diferença significativa entre as variantes IgG1-11B8 contendo as mutações S440K e/ou E430G e/ou E333S (Figura 8D). As misturas de IgG1-11B8-E333S-E430G-S440K com IgG1-CAMPATH-1H-G236R-E430G-K439E ou IgG1-CAMPATH-1H-K322A-E430G-K439E ambas mostraram eficácia de ADCC considerável sobre as células Wien 133 (Figura 8D).

[00556] Em conclusão, a mutação G236R fortemente inibiu a atividade de ADCC de IgG-CAMPATH-E430G-K439E tanto no bioensaio repórter ADCC de luminescência quanto no ensaio de ADCC com EuTDA *in vitro*. IgG-CAMPATH-E430G-K439E com a mutação K322A mostrou atividade reduzida no bioensaio repórter ADCC de luminescência, mas mostrou atividade de ADCC substancial retida no ensaio de ADCC com EuTDA *in vitro*.

Exemplo 10: Análise da interação diferente das mutações realçadoras de Fc-Fc quanto à atividade seletiva da CDC de misturas de variantes de IgG1-CAMPATH-K439E com uma mutação da inibição da ligação de C1q e variantes IgG1-11B8-S440K com ou sem uma mutação realçadora da ligação de C1q nas células Wien 133

[00557] Foi descrito no Exemplo 5 que a introdução de uma mutação da inibição da ligação de C1q (G236R, K322A, E269K, K322E ou P329R) em IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E resultou na inibição completa de

atividade de agente único da CDC nas Wien 133 e recuperação da atividade da CDC quando em uma mistura com IgG1-11B8-E430G-S440K. Foi descrito no Exemplo 6 que um IgG1-11B8-E430G-S440K contendo uma mutação realçadora da ligação de C1q, tal como E333S, mostrou atividade da CDC muito limitada quando testado como um agente único em um ensaio de CDC *in vitro* usando as células Wien 133, mas mostrou recuperação da atividade da CDC em uma mistura com IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E. Foi descrito no Exemplo 7 que as combinações de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E anti-CD52 contendo a mutação inibidora da ligação de C1q G236R ou K322A com anticorpo IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 contendo a mutação realçadora da ligação de C1q E333S mostrou atividade seletiva da CDC sobre as células Wien 133, enquanto nenhuma atividade da CDC foi observada para os agente únicos. Aqui, este princípio de indução seletiva da atividade da CDC pela mistura de uma variante de IgG1-CAMPATH-1H com uma mutação realçadora de Fc-Fc (tal como E430G), a mutação K439E e uma mutação realçadora da ligação de C1q (tal como G236R ou K322A) com uma variante de anticorpo IgG1-11B8 com uma mutação realçadora de Fc-Fc (tal como E430G), a mutação S440K e opcionalmente uma mutação realçadora da ligação de C1q (tal como E333S) foi analisado para outras mutações realçadoras de Fc-Fc tais como E345K, E345R e E345R-E430G em um ensaio de CDC *in vitro* nas células Wien 133. O ensaio de CDC *in vitro* usando as células Wien 133 foi realizado com 20% de NHS e série de concentração de anticorpo (faixa de concentração final de 0,003 a 10,0 µg/mL em diluições de 3 vezes), essencialmente como descrito no Exemplo 2. A lise de célula e valores relativos da área sob a curva (AUC) foram calculados a partir do número de células positivas em PI como descrito no Exemplo 2, a partir das duas réplicas experimentais. A AUC foi normalizada para os valores para anticorpo de controle negativo IgG1-b12 (0%) e para IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G de controle

positivo (100%), enquanto os dados de lise máxima apresentados reflitam lise de célula não normalizada a 10 µg/mL de IgG.

[00558] **Erro! Fonte de referência não encontrada.** mostra diagramas de barra para os valores AUC da atividade de dose-resposta das curvas de CDC e da lise máxima nas células Wien 133. Introdução da mutação inibidora da ligação de C1q G236R (**Erro! Fonte de referência não encontrada.** A) ou K322A (**Erro! Fonte de referência não encontrada.** B) em IgG1-CAMPATH-1H-K439E com uma das interações das mutações realçadoras de Fc-Fc E430G, E345K (SEQ ID NO: 66 ou 67, respectivamente) ou E345R (SEQ ID NO: 74 ou 73, respectivamente) resultou na perda da atividade da CDC quando testada como um agente de alveamento único nas células Wien 133. Ao contrário, a variante IgG1-CAMPATH-1H-K439E com as duas interações das mutações realçadoras de Fc-Fc E345R-E430G e a mutação inibidora da ligação de C1q G236R (SEQ ID NO: 71) mostrou atividade de agente único residual da CDC nas células Wien 133 (**Erro! Fonte de referência não encontrada.** A). As misturas de IgG1-CAMPATH-1H-K439E-G236R (**Erro! Fonte de referência não encontrada.** A) ou IgG1-CAMPATH-1H-K439E-K322A (**Erro! Fonte de referência não encontrada.** B) contendo as mutações realçadoras da interação de Fc-Fc E430G, E345K ou E345R com IgG1-11B8-E430G-S440K ou IgG1-11B8-E430G-S440K-E333S mostrou recuperação da atividade da CDC nas células Wien 133, ao passo que todas estas variantes não induziram nenhuma CDC como agentes únicos. As variantes de anticorpo IgG1-11B8-S440K-E333S contendo a mutação realçadora da interação de Fc-Fc E430G ou E345K (SEQ ID NO: 68) não induziram atividade significativa da CDC quando testadas como agentes únicos em um ensaio de CDC *in vitro* usando as células Wien 133, ao passo que atividade de agente único foi observada com IgG1-11B8-E345R-E430G-S440K-E333S (SEQ ID NO: 72) contendo duas interações das mutações realçadoras de Fc-Fc E345R-E430G (**Erro!**

Fonte de referência não encontrada. C). A misturas de IgG1-11B8-S440K-E333S contendo a mutação realçadora da interação de Fc-Fc E345K ou E430G com IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R mostrou recuperação da atividade da CDC nas células Wien 133, ao passo que todas estas variantes não induziram qualquer CDC como agentes únicos (**Erro! Fonte de referência não encontrada. C).** Similarmente, as misturas de IgG1-11B8-E345K-S440K-E333S com IgG1-CAMPATH-1H-E345K-K439E-G236R ou IgG1-CAMPATH-1H-E345K-K439E-K322A, todas contendo a mutação realçadora da interação de Fc-Fc E345K, mostraram recuperação da atividade da CDC nas células Wien 133, ao passo que os agentes únicos não induziram CDC (**Erro! Fonte de referência não encontrada. C).**

[00559] Juntos, estes dados indicam que a atividade seletiva da CDC sobre as células Wien 133 positivas em CD52/positivas em CD20 podem ser obtidas pelas composições de uma variante IgG1-CAMPATH-1H-K439E contendo uma das interações das mutações realçadoras de Fc-Fc tais como E430G, E345K ou E345R e uma mutação inibidora da ligação de C1q G236R ou K322A, misturados com uma variante IgG1-11B8-S440K contendo uma das interações das mutações realçadoras de Fc-Fc com ou sem uma mutação realçadora da ligação de C1q tal como E333S. Em conclusão, a atividade da CDC de anticorpos individuais com interação diferente das mutações realçadoras de Fc-Fc pode ser controlada pela introdução de uma mutação inibidora da auto-oligomerização combinada com a modulação da força da ligação de C1q. A atividade de complemento é restaurada depois de misturar dois de tais anticorpos com mutações inibidoras da auto-oligomerização complementar, que permite a hetero-oligomerização seletiva nas células ligadas por ambos anticorpos simultaneamente.

Exemplo 11: Análise de mutações moduladoras diferentes da ligação de C1q para a atividade seletiva da CDC de misturas de IgG1-CAMPATH-E430G-K439E anti-CD52 e variantes de anticorpo de IgG1-11B8-E430G-

S440K anti-CD20 sobre as células Wien 133

[00560] Foi descrito no Exemplo 7 que as combinações de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E anti-CD52 contendo uma mutação da inibição da ligação de C1q tal como G236R ou K322A com anticorpo IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 contendo mutações realçadoras da ligação de C1q tal como E333S, K326W ou K326A-E333A mostrou a atividade seletiva da CDC nas células Wien 133, enquanto pouca a nenhuma atividade da CDC foi observada para os agentes únicos. Aqui, as mutações moduladoras da ligação de C1q alternativas foram testadas em combinações diferentes de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E e variantes de anticorpo IgG1-11B8-E430G-S440K, com o objetivo de suprimir a atividade da CDC dos agentes únicos e permitir a recuperação máxima de atividade seletiva da CDC pelas misturas de variantes de anticorpo anti-CD52 e anti-CD20. o ensaio de CDC *in vitro* usando as células Wien 133 foi realizado com 20% de NHS e série de concentração de anticorpo (faixa de concentração final de 0,003 a 10,0 µg/mL em diluições de 3 vezes), essencialmente como descrito no Exemplo 2. A lise de célula e valor de AUC relativos foram calculados a partir do número de células positivas em PI como descrito no Exemplo 2, a partir de duas réplicas experimentais. A AUC foi normalizada para os valores para anticorpo IgG1-b12 de controle negativo (0%) e para IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G de controle positivo (100%), enquanto os dados de lise máxima apresentados reflitam a lise de célula não normalizada a 10 µg/mL de IgG.

[00561] Primeiro, as variantes de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E de anticorpo contendo uma substituição na posição de aminoácido G236 (G236R ou G236K (SEQ ID NO: 83)) ou posição G237 (G237A (SEQ ID NO: 85), G237T (SEQ ID NO: 89), G237Q (SEQ ID NO: 87) ou G237R (SEQ ID NO: 88)) ou a mutação dupla G237A-K322A (SEQ ID NO: 86) foram combinadas com IgG1-11B8-E430G-S440K com ou sem a mutação realçadora da ligação de C1q E333S. Como mostrado no **(Erro! Fonte de**

referência não encontrada. A, todas as mutações moduladoras da ligação de C1q testadas na posição G236 ou G237 em IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E resultaram na atividade seletiva da CDC nas misturas com IgG1-11B8-E430G-S440K com ou sem a mutação realçadora da ligação de C1q E333S, enquanto mostra pouca a nenhuma atividade da CDC como agentes únicos nas células Wien 133. Ao contrário, a mistura da variante IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E contendo a mutação dupla G237A-K322A não mostrou recuperação da atividade da CDC quando combinada com a IgG1-11B8-E430G-S440K com ou sem a mutação realçadora da ligação de C1q E333S.

[00562] Em seguida, as variantes de anticorpo IgG1-11B8-E430G-S440K contendo a mutação realçadora da ligação de C1q(s) K326A (SEQ ID NO: 110), E333A (SEQ ID NO: 102), E333S ou K236W-E333S (SEQ ID NO: 157) foi combinada com IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E contendo a mutação inibidora da ligação de C1q G236R ou K322A. Como mostrado na **(Erro! Fonte de referência não encontrada.** B, variantes de anticorpo IgG1-11B8-E430G-S440K contendo a mutação realçadora única da ligação de C1q K326A, E333A ou E333S retiveram a falta da atividade da CDC como agentes únicos nas células Wien 133, ao passo que a variante de IgG1-11B8-E430G-S440K contendo a mutação dupla K236W-E333S mostrou significativamente mais atividade da CDC como um agente único. Todas as combinações testadas de variantes de anticorpo IgG1-11B8-E430G-S440K contendo a mutação realçadora única da ligação de C1q K326A, E333A ou E333S com as variantes de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E contendo a mutação inibidora da ligação de C1q G236R ou K322A mostrou recuperação da atividade da CDC, enquanto mostrou pouca a nenhuma atividade da CDC como agentes únicos nas células Wien 133.

[00563] As variantes de anticorpo IgG1-11B8-E430G-S440K contendo a mutação realçadora da ligação de C1q K326A ou E333A também foram

combinadas com IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E contendo uma mutação moduladora da ligação de C1q na posição G237 (G237A, G237T, G237Q ou G237R). Como mostrada na Figura 10B, todas as combinações de IgG1-11B8-E430G-S440K-K326A ou IgG1-11B8-E430G-S440K-E333A testadas com variantes de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E de anticorpo contendo uma das mutações testadas na posição G237 resultaram na atividade seletiva da CDC, enquanto que todos os agentes únicos mostraram pouca a nenhuma atividade da CDC nas células Wien 133.

[00564] A mutação G237A foi introduzida nas variantes de anticorpo IgG1-11B8-E430G-S440K para suprimir as funções efetoras mediadas por FcγR no componente S440K (SEQ ID NO: 105). Para compensar quanto à ligação de C1q potencialmente diminuída, G237A foi testado em combinação com a mutação realçadora da ligação de C1q E333S (SEQ ID NO: 106). As variantes de IgG1-11B8 foram combinadas com IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R. Como mostrado na **(Erro! Fonte de referência não encontrada. B**, estas combinações também mostraram a atividade seletiva da CDC, enquanto que os agentes únicos mostraram de pouca a nenhuma atividade da CDC nas células Wien 133.

[00565] Em conclusão, a atividade da CDC de anticorpos individuais com mutação realçadora da interação de Fc-Fc E430G puderam ser controlados pela introdução de uma mutação inibidora da auto-oligomerização combinada com mutações diferentes inibindo a ligação de C1q. A recuperação máxima da atividade de complemento usando tais anticorpos foi obtida pela mistura com anticorpos contendo diferentes mutações realçadoras da ligação de C1q e mutações inibidoras da auto-oligomerização complementares, que permitiram a hetero-oligomerização seletiva nas células ligadas por ambos anticorpos simultaneamente.

Exemplo 12: Análise da atividade seletiva da CDC nas células Wien 133 para misturas de variantes de anticorpo anti-CD52 e de anticorpo anti-

CD20 em diferentes cadeias principais do isótipo de IgG humana

[00566] As sequências VH de CAMPATH-1H anti-CD52 foram clonadas na IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas estabilizadas nas cadeias principais de dobradiça (S228P) de Fc contendo as mutações E430G-K439E-G236R e as sequências VH de 11B8 anti-CD20 foram clonadas em IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas estabilizadas nas cadeias principais da dobradiça (S228P) de Fc contendo as mutações E430G-S440K-E333S. Diferentes combinações destas variantes de isótipos anti-CD52 e anti-CD20 foram testadas quanto à atividade seletiva da CDC. Um ensaio de CDC *in vitro* usando as células Wien 133 foi realizado com 20% de NHS e série de concentração de anticorpo (faixa de concentração final de 0,003 a 10,0 µg/mL em diluições de 3 vezes), essencialmente como descrito no Exemplo 2. A lise de célula e valores de AUC relativos foram calculados a partir do número de células positivas em PI como descrito no Exemplo 2, a partir de duas réplicas experimentais. A AUC foi normalizada para os valores para anticorpo de controle negativo IgG1-b12 (0%) e para controle positivo IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%), enquanto os dados de lise máxima apresentados refletiram a lise de célula não normalizada a 10 µg/mL de IgG.

[00567] As misturas de IgG2-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R e IgG2-11B8-E430G-S440K ou IgG2-11B8-E430G-S440K-E333S mostraram a recuperação da atividade da CDC, entretanto, com potência de CDC reduzida (AUC) comparada com a mistura das variantes de anticorpo de IgG1 correspondentes (Figura 11). IgG2-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R e IgG2-11B8-E430G-S440K não mostraram nenhuma atividade de CDC de agente único, enquanto que a introdução da mutação realçadora da ligação de C1q E333S na IgG2-11B8-E430G-S440K-E333S resultou na indução de alguma atividade da CDC pelo agente único nas células Wien 133 (Figura 11).

[00568] Nenhuma atividade da CDC foi observada para qualquer um

dos agentes únicos testados ou misturas de variantes isótipos de IgG3 (Figura 11). Também para os agentes únicos testados ou misturas de variantes de isótipos de IgG4, nenhuma atividade da CDC foi observada (Figura 11).

[00569] Surpreendentemente, as misturas de IgG2-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R com IgG1-11B8-E430G-S440K-E333S e misturas de IgG4 estabilizadas na dobradiça-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R (SEQ ID NO: 146) com IgG1-11B8-E430G-S440K-E333S mostraram recuperação parcial da potência de CDC, enquanto que os respectivos agentes únicos não induziram CDC nas células Wien 133 (Figura 11).

[00570] Em conclusão, a atividade da CDC de anticorpos individuais com diferentes cadeias principais de IgG contendo mutação realçadora da interação de Fc-Fc E430G pode ser controlada pela introdução de uma mutação inibidora da auto-oligomerização combinada com mutações moduladoras da ligação de C1q. Misturando-se tais anticorpos contendo mutações inibidoras complementares da auto-oligomerização, a atividade da CDC de tais anticorpos puderam ser restauradas pela hetero-oligomerização seletiva nas células ligadas por ambos anticorpos simultaneamente.

Exemplo 13: Seletividade da atividade da CDC pelas misturas das variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 e variantes de anticorpo IgG1-CD37-37.3 anti-CD37 nas linhagens de célula com diferentes níveis de expressão alvo

[00571] Como descrito no Exemplo 4, a atividade seletiva da CDC pela mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-K322E + IgG1-11B8-E430G-S440K puderam apenas ser obtidas nas células expressando níveis suficientes de ambos os alvos, isto é, CD20 e CD52. Além disso, no Exemplo 7 está descrito que o extermínio máximo das células Wien 133 com seletividade preservada para a combinação de anticorpo foi alcançada usando IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E contendo uma mutação da inibição da ligação de C1q, tal como G236R ou K322A e IgG1-11B8-E430G-S440K

contendo uma mutação realçadora da ligação de C1q, tal como E333S. Aqui, a atividade seletiva da CDC foi testada para uma combinação de variantes de anticorpo anti-CD52 e variantes de anticorpo anti-CD37 nos ensaios da CDC *in vitro* usando as células Daudi e Wien 133. os ensaios da CDC *in vitro* usando as células Daudi e Wien 133 foram realizados com 20% de NHS e série de concentração de anticorpo (faixa de concentração final de 0,003 a 10,0 µg/mL em diluições de 3 vezes), essencialmente como descrito no Exemplo 2. A lise de célula e os valores de AUC relativos foram calculados a partir do número de células positivas em PI como descrito no Exemplo 2, a partir de duas réplicas experimentais (Daudi) e um Experimento (Wien 133). A AUC foi normalizada aos valores para anticorpo de controle negativo IgG1-b12 (0%) e para controle positivo IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00572] As células Daudi, expressando níveis de CD52 baixos (Tabela 2), foram verificadas ser resilientes à indução de CDC por todas as variantes de IgG1-CAMPATH-1H (WT, E430G, E430G-K439E, E430G-K439E-G236R e E430G-K439E-K322A) quando testadas como agentes únicos (Figura 12A). a atividade da CDC pelo IgG1-CD37-37.3-E430G nas células Daudi (expressando altos níveis de CD37, dados não mostrados) foi inibida pela introdução da mutação S440K e parcialmente recuperada pela introdução adicional da mutação realçadora da ligação de C1q E333S. IgG1-CD37-37.3 WT não induziu a atividade da CDC nas células Daudi. Para as misturas de IgG1-CD37-37.3-E430G-S440K com variantes de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E contendo G236R ou K322A, a atividade da CDC observada foi similar àquela do agente único IgG1-CD37-37.3-E430G-S440K, demonstrando uma falta de cooperatividade com as variantes de IgG1-CAMPATH-1H em baixa expressão de CD52. A cooperatividade baixa foi observada para misturas de IgG1-CD37-37.3-E430G-S440K-E333S com variantes das variantes de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E contendo a

mutação inibidora de C1q G236R ou K322A. Estes dados demonstraram que a mutação inibidora da ligação de C1q G236R no IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E suprimiu a coativação espúria nas células expressando níveis baixos de CD52.

[00573] As células Wien 133, expressando níveis modestos de CD37 (dados não mostrados), foram verificados ser resilientes à indução de CDC por todas as variantes de IgG1-CD37-37.3 (WT, E430G, E430G-S440K, E430G-S440K-E333S) quando testados como agentes únicos (Figura 12B). A atividade da CDC pelo IgG1-CAMPATH-1H-E430G nas células Wien 133, expressando altos níveis de CD52 (ABC > 300.000; Tabela 2), foi reduzida aos níveis do IgG1-CAMPATH-1H WT pela introdução da mutação K439E. A introdução adicional de uma mutação da inibição da ligação de C1q (IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R e IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-K322A) resultou na inibição completa de atividade da CDC para os agentes únicos nas células Wien 133. Para as misturas de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R ou IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-K322A com IgG1-CD37-37.3-E430G-S440K ou IgG1-CD37-37.3-E430G-S440K-E333S, a recuperação da atividade da CDC foi observada para níveis superiores àquele de IgG1-CAMPATH-1H WT, enquanto todas estas variantes não mostraram atividade da CDC nas células Wien 133 como agentes únicos.

[00574] Em conclusão, a recuperação seletiva de eficácia da CDC para misturas das variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H-E430G e IgG1-CD37-37.3-E430G puderam ser estabelecidas nas células Wien 133 expressando níveis apreciáveis tanto de CD37 quanto de CD52, enquanto que as células Daudi expressando níveis baixos de CD52 puderam ser protegidas da presença das variantes de IgG1-CAMPATH-1H-E430G contendo tanto uma mutação inibidora da auto-oligomerização quanto a mutação inibidora da ligação de C1q G236R ou K322A.

Exemplo 14: Atividade agonista de DR5 seletiva de uma mistura de dois anticorpos anti-DR5 sem bloqueio cruzado sobre as células BxPC-3

[00575] A mistura dos dois anticorpos anti-receptor de extermínio 5 (DR5) sem bloqueio cruzado IgG1-DR5-01-G56T-E430G + IgG1-DR5-05-E430G atua como um agonista de DR5 para induzir o extermínio de células cancerosas positivas em DR5 (WO17093447). Aqui, um ensaio de viabilidade foi realizado para estudar a capacidade das combinações das variantes de anticorpo de IgG1-DR5-01-G56T-E430G (K439E, K439E-G236R) com as variantes de anticorpo de IgG1-DR5-05-E430G (S440K, S440K-E333S) para induzir o extermínio de células cancerosas pancreáticas BxPC-3 humanas (ATCC, Cat No. CRL-1687), que expressam níveis baixos de DR5 (dados não mostrados). As células BxPC-3 foram colhidas pela tripsinização e passadas através de uma peneira de células. As células foram peletizadas pela centrifugação por 5 minutos a 1.200 rpm e recolocadas em suspensão em meio de cultura em uma concentração de $0,5 \times 10^5$ células/mL (RPMI 1640 com 25 mM de Hepes e L-Glutamina (Lonza) + 10% de DBSI (Life Technologies Cat No. 10371-029) + Pen/Estrep). 100 µL das suspensões de célula única (5.000 células/poço) foram semeadas em placas de poliestireno com 96 poços de fundo chato (Greiner Bio-A, Cat No. 655182) e deixada aderir durante a noite a 37°C. No dia seguinte, 50 µL de amostras de uma série de diluição de anticorpo (faixa de concentração final de 0,003 a 20 µg/mL em diluições de 3 vezes) e 10 µL de solução de estoque de C1q humano purificado (Quidel, Cat No. A400, 2,5 µg/mL de concentração final) foram adicionados e incubados por 3 dias a 37°C. Como um controle positivo, as células foram incubadas com 5 µM de estaurosporina (Sigma Aldrich, Cat No. S6942). A viabilidade da cultura de células foi determinada em um ensaio de viabilidade celular luminescente CellTiter-Glo (Promega, Cat No. G7571) que quantifica o ATP presente, que é um indicador de células metabolicamente ativas. A partir do kit, 15 µL de Reagente de Solução de

Luciferina foram adicionados por poço e misturados agitando-se a placa por 2 minutos a 500 rpm. Em seguida, as placas foram incubadas por 1,5 hora a 37°C. 100 µL de sobrenadante foram transferidos para uma OptiPlate-96 branca (Perkin Elmer, Cat No. 6005299) e a luminescência foi medida em uma EnVision Multilabel Reader (PerkinElmer). Os dados foram analisados e plotados usando regressão não linear (dose-resposta sigmoideal com inclinação variável) usando o software GraphPad Prism. A porcentagem de células viáveis foi calculada usando a seguinte fórmula: % de células viáveis = $[(\text{luminescência da amostra de anticorpo} - \text{luminescência da amostra de estaurosporina}) / (\text{luminescência na amostra de anticorpo} - \text{luminescência na amostra de estaurosporina})] * 100$.

[00576] Nenhum dos agentes únicos testados induziu o extermínio de células BxPC-3 (Figura 13A), ao passo que a combinação de IgG1-DR5-01-G56T-E430G + IgG1-DR5-05-E430G induziu o extermínio dependente da dose de células BxPC-3 (Figura 13B). Este extermínio seletivo foi retido na combinação de IgG1-DR5-01-G56T-E430G-K439E + IgG1-DR5-05-E430G-S440K, indicando que ambos os anticorpos formam hetero-hexâmeros. Pela modulação dos sítios de ligação C1q, foi observado que a indução do extermínio de células BxPc-3 pela atividade agonista de DR5 foi mais eficiente com a combinação de IgG1-DR5-01-G56T-E430G-K439E (nenhuma mutação inibidora da ligação de C1q) + IgG1-DR5-05-E430G-S440K-E333S (com mutação realçadora da ligação de C1q E333S) e reduzida um pouco com a combinação de IgG1-DR5-01-G56T-E430G-K439E-G236R (com a mutação inibidora da ligação de C1q G236R) + IgG1-DR5-05-E430G+S440K (nenhuma mutação realçadora da ligação de C1q). As outras combinações testadas de IgG1-DR5-01-G56T-E430G-K439E-E333S (com mutação inibidora da ligação de C1q) + IgG1-DR5-05-E430G-S440K-E333S (com mutação realçadora da ligação de C1q E333S) mostraram eficácia similar como IgG1-DR5-01-G56T-E430G + IgG1-DR5-05-E430G.

[00577] Em conclusão, a introdução de mutações moduladoras de C1q não comprometeu o extermínio seletivo de células BxPC-3 pelas misturas de hetero-oligomerização de anticorpos anti-DR5. Ao invés, a potência da mistura foi proporcional àquela da avidéz de ligação a C1q combinada esperada da estrutura de anticorpo hetero-oligomérica formada nas células BxPC-3 depois da ligação ao DR5.

Exemplo 15: Análise do efeito das mutações de inibição da ligação de C1q diferentes no anticorpo anti-CD52 IgG1-CAMPATH-1H-E430G sobre a atividade da CDC

[00578] Os efeitos de introdução das mutações de inibição da ligação de C1q diferentes em IgG1-CAMPATH-1H-E430G (G237A, G236R, A327K, K322E ou P329R) foram comparados nos ensaios da CDC *in vitro* usando as células Wien 133. O ensaio de CDC *in vitro* usando as células Wien 133 foi realizado com 20% de NHS e concentrações de diluição em série de anticorpo (faixa de 0,002 a 40,0 µg/mL de concentrações finais em diluições de 4 vezes), essencialmente como descrito em **Erro! Fonte de referência não encontrada..** A lise de célula foi calculada a partir do número de células positivas em PI como medidas pela citometria de fluxo em um Peneirador Intellicyt iQue®, calculado em média a partir de três réplicas experimentais. Os valores relativos das áreas sob a curva (AUC) representam a normalização para lise mínima (0% com controle negativo IgG1-b12-K439E+ IgG1-b12-S440K (não mostrado)) e lise máxima (100% com IgG1-CAMPATH-1H-E430G). **Erro! Fonte de referência não encontrada. Erro! Fonte de referência não encontrada.** mostra que a mutação G237A (SEQ ID NO: 124) não teve nenhum efeito sobre a potência da CDC de IgG1-CAMPATH-1H-E430G nas células Wien 133. A introdução da mutação G236R (SEQ ID NO: 123) ou A327K (SEQ ID NO: 63) resultou na atividade da CDC parcialmente diminuída, enquanto a mutação K322E (SEQ ID NO: 132) resultou na atividade da CDC diminuída a um nível residual abaixo

daquele para IgG1-CAMPATH-1H WT. Apenas a mutação P329R (SEQ ID NO: 133) resultou na inibição completa de atividade da CDC pelo IgG1-CAMPATH-1H-E430G-P329R nas células Wien 133.

Exemplo 16: Ligação de FcRn de variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 e variantes de anticorpo IgG1-11B8 anti-CD20

[00579] O receptor de Fc neonatal (FcRn) é responsável pela meia-vida plasmática longa da IgG pela proteção da IgG da degradação. Depois da internalização do anticorpo, FcRn se liga às regiões de anticorpo Fc nos endossomas, onde a interação é estável no ambiente brandamente ácido (pH 6,0). Na reciclagem para a membrana plasmática, onde o ambiente é neutro (pH 7,4), a interação é perdida e o anticorpo é liberado de volta dentro da circulação. Isto influencia a meia-vida plasmática de IgG.

[00580] Um ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA) da ligação de FcRn foi realizado para avaliar a ligação de FcRn humano ao IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 com as mutações inibidoras de ligação de E430G, K439E e C1q G236R ou K322A e IgG1-11B8 anti-CD20 com E430G, a mutação realçadora da ligação de S440K e C1q E333S. Placas Streptawell de 96 poços (Roche, Cat No. 1734776001) foram revestidas com 5 µg/mL (100 µL/poço) de domínio extracelular biotilado recombinantemente produzido de FcRn humano [FcRnhsECDHis-B2M-BIO, isto é o domínio extracelular de FcRn humano com um rótulo His de terminal C (FcRnhsECDHis; SEQ ID NO: 155) como dímero com beta2microglobulina (B2M; SEQ ID NO: 156)], diluído em PBS suplementado com 0,05% de Tween 20 (PBST) mais 0,2% de BSA por 2 horas sob agitação na temperatura ambiente (RT). As placas foram lavadas três vezes com PBST. As amostras de anticorpo serialmente diluídas (Faixa de 0,0005 a 40 µg/mL de concentrações finais em diluições de 5 vezes em PBST/0,2% de BSA, pH 6,0 ou pH 7,4) foram adicionados e incubadas por 1

hora na RT sob agitação. As placas foram lavadas com PBST/0,2% de BSA, pH 6,0 ou pH 7,4. Cadeia leve capa anti-ser humano de cabra policlonal conjugado a Peroxidase de Rábano (HRP) (1:5.000; Sigma, Cat No. A-7164) diluída em PBST/0,2% de BSA, pH 6,0 ou pH 7,4 foi adicionada e as placas foram incubadas por 1 hora na RT sob agitação. Depois de lavar com PBST/0,2% de BSA, pH 6,0 ou pH 7,4, 100 µL de ácido 2,2'-Azino-bis(3-etilbenztiazolina-6-sulfônico (ABTS; 1 mg/mL; Roche Cat No. 11112422001 e 11112597001) foram adicionados como substrato e as placas foram incubadas por 10 minutos na RT protegidas da luz. A reação foi interrompida usando 100 µL de ácido oxálico a 2% (Riedel de Haen, Cat No. 33506), incubadas por 10 minutos na RT e a absorbância foi medida a 405 nm usando uma leitora de ELISA. Os dados transformados em log foram analisados ajustando-se as curvas sigmóides de dose-resposta com inclinação variável usando o software GraphPad Prism.

[00581] Todas as variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H testadas não mostraram nenhuma ligação ao FcRn humano no pH 7,4 (Figura 15A) e ligação de FcRn eficiente no pH 6,0 (Figura 15B). As diferenças aparentes na ligação entre as variantes de IgG1-CAMPATH-1H testadas foram interpretadas como insignificantes, dada a disseminação entre as curvas de ligação das variantes de IgG1-CAMPATH-1H K439E (extremidade inferior aparente) e variante E430G-K439E (extremidade de topo aparente) e a disseminação entre a ligação de FcRn máxima de IgG1-b12 e IgG1-CAMPATH-1H com domínios Fc tipo selvagem abrigando o sítio de ligação de FcRn (Figura 15B,C). Todas as variantes de anticorpo IgG1-11B8 testadas não mostraram nenhuma ligação ao FcRn humano no pH 7,4 (Figura 15D) e ligação de FcRn eficiente no pH 6,0 (Figura 15E). A introdução da mutação realçadora da ligação de C1q E333S em IgG1-11B8-E430G-S440K não teve nenhum efeito sobre a ligação ao FcRn humano (Figura 15E,F). Juntos, estes dados mostraram que IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 com as mutações

inibidoras da ligação de E430G, K439E e C1q G236R ou K322A e IgG1-11B8 anti-CD20 com a mutação realçadora da ligação de E430G, S440K e C1q E333S mostraram ligação normal ao FcRn humano.

Exemplo 17: Análise farmacocinética (PK) das variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H e IgG1-11B8 contendo as mutações E430G, K439E, S440K e/ou K322E e combinações das mesmas

[00582] O efeito da mutação K439E, S440K, E430G e K322E sobre a taxa de depuração de IgG1-CAMPATH-1H e/ou IgG1-11B8 foi estudada em um experimento de PK em camundongos SCID.

[00583] A taxa de depuração de IgG1-CAMPATH-1H-E430G, -K439E, -E430G-K439E e -K322-E430G-K439E foi comparada com aquela de IgG1-CAMPATH-1H WT e a taxa de depuração de IgG1-11B8-E430G, -S440K, -E430G-S440K e -K322-E430G-S440K foi comparada com aquela de IgG1-11B8 WT. Além disso, a taxa de depuração das combinações das variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H com as variantes de anticorpo de IgG1-11B8 como indicadas na Figura 16C e Figura 16D também foi determinada e comparada com a depuração da combinação de IgG1-CAMPATH-1H WT com IgG1-11B8 WT.

[00584] Os camundongos neste estudo foram alojados na Instalação Animal do Laboratório Central (Utrecht, Países Baixos) e manuseados de acordo com a boa prática animal como definida pela FELASA, em uma instalação animal certificada (GDL) AAALAC e ISO 9001:2000. Todos os experimentos foram realizados de acordo com a lei de proteção animal dos Países Baixos (WoD) traduzida das diretrizes (2010/63/EU) e aprovada pelos comitês de ética animal dos Países Baixos (CCD) e pelo Animal Welfare Body local. Camundongos SCID fêmeas com 11 a 12 semanas de idade (C.B-17/IcrHan®Hsd-Prkdc^{scid}, Envigo) (3 camundongos por grupo) foram injetados intravenosamente com 500 µg de anticorpo (500 µg para um único agente; 250 µg + 250 µg para uma mistura de anticorpo) (25 mg/kg) em um

volume de injeção de 200 µL. Amostras de sangue de 50 µL foram coletadas da veia safena alternando com a punção da veia das bochechas em 10 minutos, 4 horas, 1 dia, 2 dias, 7 dias, 14 dias e 21 dias depois da administração do anticorpo. O sangue foi coletado dentro de frascos contendo heparina e centrifugados por 10 minutos a 14.000xg. 20 µL de amostras de plasma foram diluídos com 380 µL de PBS e armazenados a -20°C até a determinação das concentrações de anticorpo. As concentrações de IgG humana total foram determinadas usando um ELISA sanduichado. O clone MH16 do mAb anti-IgG humana-capa de camundongo (CLB Sanquin, Cat No. M1268) foi usado como anticorpo de captura e revestido em 100 µL durante a noite a 4°C nas microplacas de ELISA de 96 poços (Greiner, Cat No. 655092) em uma concentração de 2 µg/mL em PBS. As placas foram bloqueadas incubando-se em um agitador de placa por 1 h na RT com PBS suplementada com 0,2% de BSA. Depois da lavagem, 100 µL das amostras de plasma diluídas foram adicionados e incubados sobre um agitador de placa por 1 h na RT. As placas foram lavadas três vezes com 300 µL de PBST e subsequentemente incubadas sobre um agitador de placa por 1 h na RT com 100 µL de imunoglobulina humana anti-IgG de cabra rotulado com peroxidase (Jackson, Cat No. 109-035-098; 1:10.000 em PBST suplementado com 0,2% de BSA). As placas foram novamente lavadas três vezes com 300 µL de PBST antes da incubação por 15 minutos na RT com 100 µL de substrato ABTS protegidas da luz. A reação foi interrompida pela adição de 100 µL de ácido oxálico a 2% e incubação por 10 minutos na RT. A absorbância foi medida em uma leitora de microplaca (Biotek, Winooski, VT) a 405 nm. A concentração foi calculada usando-se o material injetado como uma curva de referência. Como um controle de placa a proteína de mieloma humano contendo IgG1 capa (The Binding Site, Cat No. BP078) foi incluída. As concentrações de IgG humana (em µg/mL) foram plotadas (Figura 16A para as variantes IgG1-CAMPATH-1H, Figura 16B para as variantes IgG1-

11B8 e Figura 16C para as combinações) e a área sob a curva (AUC) foi calculada usando o software Graphpad Prism. As taxas de depuração até o último dia de amostragem de sangue (dia 21) foram determinadas pela fórmula $D \cdot 1.000 / AUC$, em que D é a dose de injeção (25 mg/kg) (Figura 16D).

[00585] A taxa de depuração de todas as variantes IgG1-CAMPATH-1, incluindo WT, foi um pouco mais rápida do que a depuração das variantes de IgG1-11B8 e a curva de IgG1 prognosticada (com base no modelo de 2 compartimentos).

[00586] A introdução da mutação E430G tanto em IgG1-CAMPATH-1H quanto em IgG1-11B8 resultou em um aumento pequeno na taxa de depuração destes anticorpos. A introdução das mutações K439E ou S440K e/ou K322E no IgG1-CAMPATH-1H-E430G e IgG1-11B8-E430G levou a uma taxa de depuração comparável com aquela do IgG1-CAMPATH-1H WT e IgG1-11B8 WT, respectivamente (Figura 16D). Todas as combinações testadas de variantes de IgG1-CAMPATH-1H com variantes de IgG1-11B8 mostraram taxas de depuração que foram comparáveis com aquelas da combinação dos anticorpos IgG1-CAMPATH-1H WT + IgG1-11B8.

[00587] Juntos, estes dados indicaram que IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 com mutações E430G, K439E, E430G-K439E ou E430G-K439E-K322E e IgG1-11B8 anti-CD20 com mutações E430G, S440K, E430G-S440K ou E430G-S440K-K322E e misturas dos mesmos, mostraram taxas de depuração similares àquela dos anticorpos IgG1 WT.

Exemplo 18: O efeito das mutações G236R, G237T, K326A ou E333S sobre a ligação de FcγR *in vitro* de anticorpos anti-CD52 ou anti-CD20 com uma mutação realçadora da hexamerização e K439E ou S440K

[00588] Usando anticorpos purificados, a ligação das variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H ou IgG1-11B8 aos ECD's diméricos de FcγRIIA alótipo 131H, FcγRIIA alótipo 131R, FcγRIIB, FcγRIIIA alótipo

158F e FcγRIIIA alótipo 158V foi testada em ensaios ELISA. Para detectar a ligação às variantes de FcγR diméricas, placas de ELISA Microlon de 96 poços (Greiner, Alemanha) foram revestidas durante a noite a 4 °C com F(ab')₂ anti-IgG- humano-F(ab')₂ de cabra (Jackson Laboratory, 109-006-097, 1 µg/mL) em PBS, lavados e bloqueados com 200 µL/poço de PBS/0,2% de BSA por 1 h na temperatura ambiente (RT). Com lavagens entre as incubações, as placas foram sequencialmente incubadas com 100 µL/poço de uma série de diluição de variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H ou IgG1-11B8 (0,0013 a 20 µg/mL em etapas de cinco vezes) em PBST/0,2% de BSA por 1 h na RT, 100 µL/poço de variantes ECD de FcγR diméricas, rotuladas com His, de terminal C biotiniladas (1 µg/mL) em PBST/0,2% de BSA por 1 h na RT e com 100 µL/poço de Estreptavidina-poliHRP (CLB, M2032, 1:10.000) em PBST/0,2% de BSA como anticorpo de detecção por 30 min na RT. O desenvolvimento foi realizado por cerca de 20 (IIA-131H) ou 30 (IIA-131R, IIB, IIIA-158V, IIIA-158F) min com 1 mg/mL de ABTS (Roche, Mannheim, Alemanha). Para interromper as reações, 100 µL de ácido oxálico a 2% foram adicionados. As absorbâncias foram medidas a 405 nm em uma leitora de microplaca (BioTek, Winooski, VT). A ligação de FcγR a 20 µg/mL de concentração de anticorpo foi plotada. Os dados estão fundamentados em três réplicas independentes, normalizadas por experimento em relação ao sinal de fundo no ELISA (controle de nenhum anticorpo, 0%) e um padrão interno, IgG1-11B8-E430G-S440K, ajustado para 100%.

[00589] Porque as funções efetoras mediadas por FcγR podem ser menos sensíveis à regulação pela hexamerização de IgG do que a CDC, a seletividade completa da citotoxicidade para misturas codependentes reguladas pela hexamerização pode requerer a supressão da ligação de FcγR a cada anticorpo individual na mistura, particularmente na presença de células efetoras expressando receptores de FcγR. Quando as mutações G236R ou G237T inibindo a ligação de C1q foram introduzidas dentro do anticorpo

IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E, a ligação às variantes de FcγR IIA, IIB e IIIA foi fortemente inibida, como detectado pelo ELISA (Figura 17). Quando as mutações K326A ou E333S realçando a ligação de C1q foram introduzidas dentro do IgG1-11B8-E430G-S440K, a mutação K326A resultou na ligação aumentada para todas as variantes de FcγR testadas, enquanto a mutação E333S reduziu a ligação às variantes de FcγR IIA/B e IIIA em ~50 e ~20% respectivamente (Figura 17). Uma supressão adicional da ligação de FcγR ao IgG1-11B8-E430G-S440K, IgG1-11B8-K326A-E430G-S440K ou IgG1-11B8-E333S-E430G-S440K pode requerer mutações adicionais, tais como a mutação G237A testada no Exemplo 19.

[00590] Em conclusão, ao passo que variantes IgG1-11B8-E430G-S440K com mutações K326A ou E333S retêm a ligação de FcγR, as variantes de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E contendo as mutações G236R ou G237T não mostraram ligação detectável às variantes de FcγR IIA, IIB e IIIA.

Exemplo 19: Análise de mutações moduladoras da ligação de C1q diferentes para a atividade seletiva da CDC de misturas das variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-K439E e IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20-G237A nas células Wien 133

[00591] No Exemplo 11, foi mostrado que a introdução da mutação inibidora da ligação de FcγR G237A nas variantes IgG1-11B8-E430G-S440K com ou sem a mutação realçadora da ligação de C1q E333S não comprometeu a atividade da CDC a 10 µg/mL de IgG quando combinada com a variante IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E contendo a mutação inibidora da ligação de C1q G236R. Aqui, uma outra mutação inibidora da ligação de C1q (G237T) foi introduzida no IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E e testada em combinação com IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A e IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A-E333S. O ensaio de CDC *in vitro* usando as células Wien 133 foi realizado com 20% de NHS e série de concentração de anticorpo (faixa de concentração final de 0,01 a 40,0 µg/mL em diluições de

3,3 vezes), essencialmente como descrito no Exemplo 2. A lise de célula e os valores de AUC relativos foram calculados a partir do número de células positivas em PI como descrito no Exemplo 2, a partir de três réplicas experimentais. A AUC foi normalizada aos valores para o anticorpo de controle negativo IgG1-b12 (0%) e para o controle positivo IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%), enquanto que os dados da lise máxima apresentados refletem a lise de célula não normalizada a 40 µg/mL de IgG.

[00592] Porque as funções efetoras mediadas por FcγR podem ser menos sensíveis à regulação pela hexamerização de IgG do que a CDC, a seletividade completa da citotoxicidade para misturas codependentes reguladas pela hexamerização pode requerer a supressão da ligação de FcγR a cada anticorpo individual na mistura, particularmente na presença de células efetoras expressando receptores de FcγR. A introdução da mutação G236R e G237T dentro do IgG1-Campath-E430G-K439E fortemente suprimiu a ligação de FcγR (Exemplo 18), mas IgG1-11B8-E430G-S440K mostrou ligação de FcγR regular. Para suprimir a ligação de FcγR do componente 11B8 nas misturas testadas, a mutação G237A foi introduzida dentro do anticorpo IgG1-11B8-E430G-S440K com ou sem a mutação E333S adicional. Como mostrado na Figura 18, a introdução da mutação inibidora da ligação de C1q G237R ou G237T reduziu a atividade de agente único do componente IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E eficientemente, enquanto retém a atividade completa da CDC em combinação com IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A ou IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A-E333S nas células Wien 133.

[00593] Em conclusão, a seletividade da atividade da CDC das variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 + IgG1-11B8 anti-CD20-G237A com mutação realçadora da interação de Fc-Fc E430G e a mutação inibidora da auto-oligomerização K439E ou S440K, respectivamente, foi aumentada pela introdução da mutação inibidora da

ligação de C1q G236R ou G237T no componente anti-CD52 K439E. A introdução da mutação realçadora da ligação de C1q E333S na variante 11B8 não aumentou a recuperação da atividade da CDC nas combinações, visto que a recuperação máxima da atividade de complemento já foi alcançada com IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A (com G237A para a inibição da ligação de Fc γ R).

Exemplo 20: Depleção de um subconjunto de células hematológicas pelas combinações de anticorpo codependentes

[00594] No Exemplo 19, a atividade da CDC foi mostrada nas células Wien 133 para as misturas de variantes de anticorpo anti-CD52 e anti-CD20 planejadas para funcionar na maneira codependente. A especificidade das misturas de anticorpo codependentes foi testada nos ensaios de citotoxicidade em sangue integral. CD52 é expresso tanto nas células T quanto nas células B, enquanto CD20 é expresso nas células B, mas não substancialmente nas células T. Uma mistura de anticorpos alvejadores CD52 e CD20 de atuando independentemente por exemplo seria esperado eliminar tanto as células T quanto as células B, enquanto que uma mistura de Ab estritamente codependente seria esperado esgotar exclusivamente as células B, visto que elas expressam tanto CD52 quanto CD20. O objetivo do experimento foi por exemplo testar quais misturas de variantes de anticorpo anti-CD52 e anti-CD20 esgotariam as células B sem afetar a população de célula T.

[00595] Amostras de sangue anônimas tratadas com hirudina foram obtidas na University Medical Center Utrecht. Durante o primeiro dia, misturas de anticorpos direcionados CD52, CD20 e gp120 foram preparados em meio RPMI 1640 suplementado com 0,2% de BSA. Os anticorpos foram transferidos para placas contendo 30 μ L de sangue tratado com hirudina em RPMI/0,2% de BSA em um volume final de 100 μ L, em uma concentração final de anticorpo de 10 μ g/mL e incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 18 horas. No segundo dia, um volume igual de tampão de lise de células

sanguíneas vermelhas (RBC) foi adicionado às misturas, depois do que as células foram coletadas pela centrifugação (3 minutos a 300 rcf). Esta etapa foi repetida até que todas as células sanguíneas vermelhas fossem lisadas, o que foi avaliado pela transparência da mistura.

[00596] Subsequentemente, uma mistura de anticorpos de detecção direcionados contra subconjuntos hematológicos diferentes rotulados com corantes fluorescentes foi adicionada e a mistura foi incubada por 30 minutos a 4°C. Depois de três etapas de lavagem realizadas com tampão FACS, as células foram recolocadas em suspensão em tampão FACS e as abundâncias relativas de populações de célula remanescentes foram determinadas pela citometria de fluxo usando um LSR Fortessa X20 FACS (BD). Em paralelo, os procedimentos para o tingimento de grânulos de controle de compensação (UltraComp eBeads, Thermo Scientific cat. nº 01-2222) usando reagentes de imunodetecção individuais ou mancha de viabilidade fixável (FVS) foram realizados e detectados pela citometria de fluxo. Todas as etapas foram realizadas em gelo. Os reagentes de detecção usados foram anti-CD3 rotulado com efluor 450 (e-biosciences cat. nº 48-0037), CD19 rotulado com BV711 (Biolegend cat. nº 302245), CD66b rotulado com PE-Cy7 (Biolegend cat. nº 305115) e mancha de viabilidade FVS BV510 (BD cat. nº 564406). Em resumo, as células viáveis foram bloqueadas pela exclusão de células positivas em FVS e dubletos. Dentro da população de célula viável, células mielóides foram bloqueadas pela expressão de CD66b^{alto}, enquanto que as células linfóides foram separadas em células T pela expressão de CD3^{alto}/CD19^{baixo}/CD66b^{baixo} e as células B pela expressão de CD3^{baixo}/CD19^{alto}/CD66b^{baixo}; as células linfóides remanescentes CD3^{baixo}/CD19^{baixo}/CD66b^{baixo} podem conter células NK, mas não foram adicionalmente distinguidas nestes experimentos. As amostras de sangue de cinco doadores saudáveis diferentes foram testadas em três experimentos independentes.

[00597] Ao contrário dos ensaios CDC sobre as linhagens de célula de tumor, ensaios de sangue integral são realizados na presença de células efectoras expressando FcγR que pode mediar ADCC e ADCP, de modo que a depleção de células sanguíneas possa ser mediada pelos mecanismos efetores diferentes além de CDC. Porque as funções efectoras mediadas por FcγR podem ser menos sensíveis à hexamerização de IgG do que a CDC, supressão adicional de funções efectoras mediadas por FcγR podem ser requeridas para tornar a citotoxicidade codependente da ligação de dois reagentes de anticorpo formando hetero-hexâmero em proximidade imediata. A abundância relativa de células B e células T dentro da população de linfócito variou de aproximadamente 1,5 a 6% e 20 a 40% respectivamente, em doadores diferentes (Figura 19A). Na verdade, uma mistura de IgG1-Campath-1H-E430G direcionado a CD52 e IgG1-11B8-E430G direcionado a CD20 esgotou todas as células T (expressando CD52) e células B (expressando CD52 e CD20). Uma mistura de IgG1-Campath-1H-E430G-K439E + IgG1-11B8-E430G-S440K, com base nas mutações divulgadas na WO2013004842 não foi codependente nesta configuração de ensaio (Figura 19A). IgG1-Campath-1H-E430G-K439E exibiu atividade de agente único substancial tanto nas células B quanto nas células T, o que pode ser explicado tanto pela atividade mediada por FcγR e pela atividade residual da CDC como observado nas linhagens de célula de tumor em altas concentrações de IgG (Exemplo 4). IgG1-11B8-E430G-S440K exibiu atividade de agente único sobre as células B, igualmente explicado pela atividade mediada por FcγR. Na verdade, a mistura de IgG1-Campath-1H-E430G-K439E + IgG1-11B8-E430G-S440K causou depleção substancial tanto de células B quanto de células T. Em forte contraste, uma mistura de IgG1-Campath-1H-G236R-E430G-K439E + IgG1-11B8-G237A-E430G-S440K mostrou depleção seletiva apenas de células B, não de células T, em uma maneira estritamente codependente (Figura 19A). Na verdade, IgG1-Campath-1H-G236R-E430G-

K439E não mostrou atividade de agente único apreciável sobre as células B ou T, demonstrando que a introdução da mutação G236R eliminou de ambas a atividade mediada por FcγR, como esperado a partir do exemplo 18, além de suprimir a atividade de agente único da CDC como observado por exemplo, nos exemplos anteriores 5, 7 e 19. A introdução da mutação G237A presente em IgG1-11B8-G237A-E430G-S440K eliminou a atividade de agente único residual nas células B, mais provavelmente por uma supressão de atividade mediada por FcγR residual.

[00598] Variantes de IgG1-CD52-Campath-E430G-K439E contendo mutações adicionais na posição G237, isto é, G237A, G237T, G237Q ou G237R, exibiram níveis variáveis de atividade de agente único (Figura 19B). Variantes IgG1-CD52-Campath-G237A-E430G-K439E e IgG1-CD52-Campath-G237T-E430G-K439E induziram uma redução do número de células T como agentes únicos. Ao contrário, variantes IgG1-CD52-Campath-G237Q-E430G-K439E e IgG1-CD52-Campath-G237R-E430G-K439E não mostraram atividade de agente único apreciável, nem nas células B, nem nas células T. Quando IgG1-11B8-G237A-E430G-S440K, destituído de atividade de agente único, foi misturado com IgG1-CD52-Campath-G237Q-E430G-K439E ou com IgG1-CD52-Campath-G237R-E430G-K439E, uma depleção potente e seletiva de células B, não de células T foi observada (Figura 19B).

[00599] Resultados similares foram obtidos na presença de IgG1-11B8-G237A-E333S-E430G-S440K contendo mutação E333S realçadora da afinidade de C1q: este componente não mostrou atividade de agente único apreciável sobre as células B nem sobre as células T, enquanto em mistura com IgG1-CD52-Campath-G236R-E430G-K439E, IgG1-CD52-Campath-G237Q-E430G-K439E ou IgG1-CD52-Campath-G237R-E430G-K439E resultou em uma depleção potente e seletiva de células B, não de células T (Figura 19C). Ao contrário, quando IgG1-11B8-G237A-E333S-E430G-S440K foi misturado com IgG1-CD52-Campath-G237A-E430G-K439E ou

IgG1-CD52-Campath-G237T-E430G-K439E, depleção de célula T detectável foi observada (Figura 19C), compatível com os resultados na Figura 19B.

[00600] A potência de misturas de anticorpo codependentes alvejando células B expressando tanto CD52 quanto CD20 também foi comparada com anticorpos alvejando célula B independentemente rituximab, obinutuzumab, IgG1-11B8 e IgG1-11B8-E430G. Interessantemente, a profundidade de depleção de célula B de misturas de anticorpo estritamente codependentes alvejando tanto CD52 quanto CD20 excedeu aquela pelo rituximab, obinutuzumab, IgG1-11B8 e IgG1-11B8-E430G (Figura 19D). Isto foi verdadeiro para as misturas de IgG1-11B8-G237A-E430G-S440K com IgG1-CD52-Campath-G236R-E430G-K439E, IgG1-CD52-Campath-G237Q-E430G-K439E ou IgG1-CD52-Campath-G237R-E430G-K439E, todos dos quais mostraram depleção seletiva de células B, não de células T (Figuras 19A/B).

[00601] Em conclusão, estes dados demonstraram que as combinações de dois anticorpos alvejando dois alvos de superfície celular diferentes seriam forçados a trabalhar em uma maneira estritamente codependente. Como uma consequência, a depleção seletiva de um subconjunto hematológico, aqui células B expressando CD20, foi alcançada a partir da população total de células expressando CD52. Estas combinações de anticorpo estritamente codependentes foram compostas de um anticorpo com mutações de domínio Fc E430G e K439E além da mutação de G236R, G237Q ou G237T e um anticorpo com mutações de domínio Fc G237A, E430G e S440K, com mutação E333S adicional opcional.

Exemplo 21: Seletividade realçada da atividade da CDC nas linhagens múltiplas de célula pelas variantes de anticorpo misturadas pela introdução das mutações de inibição da ligação de C1q G236R ou G237T em IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G K439E quando combinadas com uma variante IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20

[00602] Nos exemplos anteriores, a seletividade realçada da atividade da CDC foi mostrada pela introdução das mutações inibidoras da ligação de C1q em IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E (K322E no Exemplo 3, G236R ou G237T no Exemplo 19) na combinação com variantes de anticorpo IgG1-11B8-E430G-S440K com ou sem mutação realçadora da ligação de C1q(s) E333S e/ou mutação inibidora da ligação de FcγR G237A. Aqui, a seletividade da atividade da CDC sobre as células positivas duplas CD20/CD52 depois da introdução das mutações inibidoras da ligação de C1q G236R ou G237T dentro do IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E foi testada nas linhagens de célula de tumor humano com diferentes níveis de expressão de CD52 e CD20 (ver a Tabela 4 abaixo). Os ensaios da CDC *in vitro* usando as linhagens de célula Daudi, Raji, Ramos, REH e U-698-M foram realizados com 20% de NHS e série de concentração de anticorpo (faixa de concentração final de 0,01 a 40,0 µg/mL em diluições de 3,3 vezes), essencialmente como descrito no Exemplo 2. A lise de célula e os valores de AUC relativos foram calculados a partir do número de células positivas em PI como descrito no Exemplo 2, a partir de três réplicas experimentais. A AUC foi normalizada aos valores para anticorpo de controle negativo IgG1-b12 (0%) e para IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G de controle positivo (100%), enquanto que os dados de lise máxima apresentados refletem a lise de célula não normalizada a 40 µg/mL de IgG.

Tabela 4: Níveis de expressão de CD20 e CD52 nas diferentes linhagens de célula

Anticorpo (alvo)	ABC*				
	Daudi	Raji	Ramos	REH	U-698-M
IgG1-CAMPATH-1H (CD52)	$1,0 \times 10^4$	$1,3 \times 10^5$	$2,7 \times 10^5$	$1,9 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5$
IgG1-11B8 (CD20)	$1,7 \times 10^5$	$1,7 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	$1,9 \times 10^4$	$1,0 \times 10^5$

*ABC Capacidade de Ligação de Anticorpo como determinada pela análise QIFIKIT (dados não mostrados)

[00603] As variantes de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E com a mutação inibidora da ligação de C1q G237R ou G237T não mostraram nenhuma atividade de agente único (comparável aos níveis de fundo) em

todas as linhagens de célula testadas com níveis diferentes de expressão de CD52: Daudi (Figura 20A), Raji (Figura 20B), Ramos (Figura 20C), REH (Figura 20D) e U-698-M (Figura 20E). Para as linhagens de célula Daudi, Ramos, Raji e U-698-M, a recuperação aumentada da atividade da CDC foi observada quando combinadas com as variantes de anticorpo IgG1-11B8-E430G-S440K com a mutação realçadora da ligação de C1q testada E333S (com ou sem mutação de inibição de FcγR G237A) ou K326A. O efeito das mutações realçadoras de C1q K326A ou E333S no CD20 alvejado 11B8 foi menos proeminente quando os níveis de expressão de CD20 foram mais baixos (REH: 19.000 ABC CD20). Compatível com os níveis de expressão altos, a CDC de linhagem de célula REH expressando CD20 baixo foi altamente dependente da presença de um agente alvejador de CD52, enquanto a CDC da linhagem de célula Daudi expressando CD52 baixo foi altamente dependente da presença de um agente alvejador de CD20. Na verdade, a AUC de CDC e a lise máxima induzida pelo IgG1-G236R-E430G-K439E + IgG1-11B8-E430G-S440K sobre as linhagens de célula REH e Daudi foram substancialmente mais baixas do que aquela induzida pela combinação de IgG1-Campath-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G, ilustrando a seletividade relativa desta mistura para linhagens de célula Ramos, Raji e U-698-M duplamente positivas em CD20/CD52. A sensibilidade da CDC de células Daudi expressando CD52 baixo foi modulada pela presença da mutação realçadora de C1q K326A, E333S ou G237A-E333S introduzidas no agente alvejador CD20.

[00604] Em conclusão, a seletividade da atividade da CDC para a combinação de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E e IgG1-11B8-E430G-S440K pôde ser estabelecida independente dos níveis de expressão altos em linhagens de célula diferentes pela introdução de uma mutação inibidora da ligação de C1q tal como G236R ou G237T no componente E430G-K439E anti-CD52; a potência da mistura foi modulada pela introdução de uma

mutação realçadora da ligação de C1q tal como E333S ou K326A no componente E430G-S440K anti-CD20.

Exemplo 22: Exemplo 15: Seletividade da atividade da CDC pelas misturas das variantes de anticorpo IgG1-CD37-37.3 anti-CD37 e variantes de anticorpo IgG1-11B8 anti-CD20 sobre as linhagens de célula com diferentes níveis de expressão alvos

[00605] Nos exemplos anteriores, a atividade seletiva da CDC foi mostrada para combinações de variantes de anticorpo anti-CD52 com anti-CD20 (**Erro! Fonte de referência não encontrada. Erro! Fonte de referência não encontrada. Erro! Fonte de referência não encontrada.**) e anti-CD52 com variantes de anticorpo anti-CD37 (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**). Aqui, a atividade seletiva da CDC foi testada quanto a uma combinação de variantes de anticorpo anti-CD37 com variantes de anticorpo anti-CD20 em ensaios da CDC *in vitro* usando células Daudi e WIL2-S. Os ensaios da CDC *in vitro* usando células Daudi e de linfoblasto B WIL2-S (ATCC, CRL-8885) foram realizados com 20% de NHS e série de concentração de anticorpo (faixa de concentração final de 0,005 a 10,0 µg/mL em diluições de 3 vezes), essencialmente como descrito em **Erro! Fonte de referência não encontrada..** O meio de cultura para as células WIL2-S foi composto de RPMI 1640 com 25 mM de Hepes e L-Glutamina (Lonza, Cat No BE12-115F) suplementada com + 10% de DBSI inativado por calor, 1 mM de Piruvato de Sódio (Lonza, Cat No. BE13-115E) e 50 U/mL de Pen/Estrep. A lise de célula foi calculada a partir do número de células positivas em PI, calculado em média a partir de três réplicas experimentais e normalizadas para a lise de célula medida para anticorpo IgG1-b12 de controle negativo (0%) e para 10 µg/mL de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00606] As células Daudi foram resilientes à indução de CDC pelo anticorpo anti-CD37 WT IgG1-CD37-37.3 e anticorpo WT Tipo II anti-CD20

IgG1-11B8 quando testado como agentes únicos, enquanto alguma atividade da CDC foi observada para a mistura dos dois anticorpos WT (Figura 21A). A introdução da mutação realçadora da interação de Fc-Fc resultou na indução da atividade da CDC para ambos os anticorpos quando testados como agentes únicos e atividade forte da CDC quando testados como uma mistura. A atividade de agente único da CDC pelo IgG1-CD37-37.3-E430G foi fortemente inibida pela introdução da mutação K439E e completamente inibida pela introdução adicional da mutação inibidora da ligação de C1q G236R. A atividade de agente único da CDC pelo IgG1-11B8-E430G foi inibida pela introdução da mutação S440K, também na presença da mutação realçadora da ligação de C1q adicional E333S. Para todas as misturas testadas de mutantes de anticorpo IgG1-CD37-37.3 (contendo E430G, E430G-K439E ou E430G-K439E-G326R) com mutantes de anticorpo IgG1-11B8 (contendo E430G, E430G-S440K ou E430G-S440K-E333S), atividade forte da CDC foi observada nas células Daudi.

[00607] Nas células WIL2-S, a atividade da CDC foi muito baixa para todas as variantes de anticorpo de IgG1-CD37-37.3 (WT, E430G, E430G-K439E e E430G-K439E-E333S) quando testadas como agentes únicos (Figura 21B). A introdução da mutação E430G no anticorpo Tipo II anti-CD20 IgG1-11B8 resultou na indução da atividade da CDC nas células WIL2-S. A atividade de agente único da CDC pelo IgG1-11B8-E430G foi fortemente inibida pela introdução da mutação S440K, enquanto que a introdução da mutação realçadora da ligação de C1q adicional E333S resultou em atividade baixa da CDC pelo IgG1-11B8-E430G-S440K-E333S (Figura 21B). Para todas as misturas testadas de mutantes de anticorpo IgG1-CD37-37.3 (contendo E430G, E430G-K439E ou E430G-K439E-G326R) com mutantes de anticorpo IgG1-11B8 (contendo E430G, E430G-S440K ou E430G-S440K-E333S), a atividade forte da CDC foi observada nas células WIL2-S.

[00608] Em conclusão, estes dados demonstraram a atividade seletiva da CDC nas células Daudi e WIL2-S pelas misturas das variantes de anticorpo IgG1-CD37-37.3-E430G (K439E e K439E-G236R) com as variantes de anticorpo IgG1-11B8-E430G (S440K e S440K-E333S) testadas, enquanto pouca a nenhuma atividade da CDC foi observada pelos anticorpos individuais quando testados como agentes únicos.

Exemplo 23: Atividade da CDC nas células Daudi pelas composições de variantes de anticorpo IgG1-CD37-37.3 anti-CD37 e variantes de anticorpo IgG1-11B8 anti-CD20 misturadas em razões diferentes

[00609] No Exemplo 22, a atividade seletiva da CDC foi mostrada para variantes de anticorpo anti-CD37 misturados com variantes de anticorpo anti-CD20 nas razões de 1:1, nos ensaios da CDC *in vitro* usando células Daudi. Aqui, o efeito de variar a razão entre dois componentes de anticorpo codependentes presentes em uma mistura foi examinado. As composições contendo IgG1-CD37-37.3-G236R-E430G-K439E em concentrações variando de 0,0005 a 10 µg/mL e IgG1-11B8-E430G-S440K em concentrações variando de 0,013 a 10 µg/mL foram geradas em modelo fatorial completo e testado em ensaios da CDC *in vitro*. Os ensaios da CDC *in vitro* usando células Daudi foram realizados com 20% de NHS, essencialmente como descrito no Exemplo 2. A lise de célula foi calculada a partir do número de células positivas em PI.

[00610] As células Daudi foram lisadas pelas misturas de IgG1-CD37-37.3-G236R-E430G-K439E e IgG1-11B8-E430G-S440K em uma maneira codependente. Os agentes únicos mostraram atividade: maximamente 8% de lise foram induzidos por até 10 µg/mL de IgG1-CD37-37.3-G236R-E430G-K439E misturados com controle sem anticorpo de ligação IgG1-b12 e maximamente 7% de lise foram induzidas por até 10 µg/mL de IgG1-11B8-E430G-S440K misturados com IgG1-b12. Ao contrário, misturas de IgG1-CD37-37.3-G236R-E430G-K439E e IgG1-11B8-E430G-S440K induziram

lise eficiente de células Daudi para composições representando uma ampla faixa de razões de anticorpo diferentes (Tabela 5).

[00611] Notavelmente, quando a ligação de CD20 foi saturada pela provisão de IgG1-11B8-E430G-S440K a 10 µg/mL, a adição de $\geq 0,12$ µg/mL de IgG1-CD37-37.3-G236R-E430G-K439E resultou na lise de $\geq 70\%$ das células Daudi. A lise detectável foi observada para composições contendo 10 µg/mL de IgG1-11B8-E430G-S440K e $\geq 0,013$ µg/mL de IgG1-CD37-37.3-G236R-E430G-K439E. Similarmente, quando a ligação de CD37 foi saturada usando 10 µg/mL de IgG1-CD37-37.3-G236R-E430G-K439E, $\geq 1,1$ µg/mL de IgG1-11B8-E430G-S440K induziu a lise de $\geq 69\%$ das células Daudi. A lise detectável foi observada para as composições contendo 10 µg/mL de IgG1-CD37-37.3-G236R-E430G-K439E e $\geq 0,12$ µg/mL de IgG1-11B8-E430G-S440K.

[00612] Isto implicou que as composições de anticorpo contendo IgG1-CD37-37.3-G236R-E430G-K439E e IgG1-11B8-E430G-S440K nas razões variando de aproximadamente 1:1000 a 1:1 ou 1:1 a 1:100, produziram a lise detectável de células Daudi, contanto que a ligação de pelo menos um dos dois alvos CD37 e CD20 fosse saturada. As composições de anticorpo contendo IgG1-CD37-37.3-G236R-E430G-K439E e IgG1-11B8-E430G-S440K em razões variando de aproximadamente 1:100 a 1:1 ou 1:1 a 1:10, produziram a lise de $>69\%$ das células Daudi, contanto que a ligação de pelo menos um dos dois alvos fosse saturada.

[00613] Em conclusão, estes dados demonstraram que as composições de anticorpo com razões amplamente diferentes produziram lise de detectável a eficiente de células Daudi pela CDC, especialmente quando a ligação de pelo menos um dos dois alvos foi saturada, enquanto que nenhuma lise detectável foi observada quando o segundo componente foi ausente ou presente em baixa abundância.

[00614] A Tabela 5 mostra a atividade da CDC para composições

contendo IgG1-CD37-37.3-G236R-E430G-K439E nas concentrações variando de 0,0005 a 10 µg/mL e IgG1-11B8-E430G-S440K nas concentrações variando de 0,013 a 10 µg/mL, misturados no modelo fatorial completo. As células Daudi foram incubadas com misturas de anticorpo na presença de 20% de NHS. A lise de células Daudi foi calculada a partir da fração de células positivas em PI.

Lise (%)		IgG1-CD37-37.3-G236R-E430G-K439E									
	IgG µg/mL	10	3,3	1,1	0,37	0,12	0,041	0,013	0,0045	0,0015	0,0005
IgG1-11B8-E430G-S440K	10	93	92	92	87	70	39	14	6	7	6
	3,3	83	87	86	78	50	28	12	8	6	7
	1,1	69	63	61	52	35	16	6	6	6	6
	0,37	36	26	22	18	13	8	5	5	6	6
	0,12	12	10	9	9	7	6	5	5	4	5
	0,041	6	6	7	6	5	5	5	6	4	4
	0,013	5	5	6	6	6	5	5	4	5	5

Exemplo 24: A ligação alvo nas células Wien 133 de variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52

[00615] A ligação às células de linfoma Wien 133 foi analisada pela citometria de fluxo para variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 com mutação realçadora da interação de Fc-Fc E430G ou E345R, mutação inibidora da auto-oligomerização K439E e cada uma das mutações inibidoras da ligação de FcγR e moduladoras da ligação de C1q G236R, G237A ou G237T. As suspensões de célula foram lavadas com PBS e recolocadas em suspensão em tampão de FACS [PBS + 0,1% (p/v) de albumina sérica bovina (BSA) + 0,02% (p/v) azida de sódio] em uma concentração de 2×10^6 células/mL. 50 µL de amostras de suspensão de célula (100.000 células por poço) foram semeados em placas de poliestireno de 96 poços de fundo redondo (Greiner Bio-A; Cat nº 650261) e incubadas com 50 µL de amostras de anticorpo (de concentrações finais 0,0002 a 10 µg/mL em diluições de 3 vezes) por 30 minutos a 4°C. As células foram peletizadas pela centrifugação a 300x g por 3 minutos a 4°C e lavadas três vezes com 150 µL de tampão FACS. As células foram incubadas com 50 µL de anticorpo secundário F(ab')₂ anti-IgG humana de cabra conjugado a R-

ficoeritrina (R-PE) (Jackson ImmunoResearch, Cat No. 109-116-098, 1:200) por 30 minutos a 4°C, protegidas da luz. As células foram lavadas duas vezes com 150 µL de tampão FACS, recolocadas em suspensão em 30 µL de tampão FACS e a ligação do anticorpo foi analisada pela citometria de fluxo em um peneirador Intellicyt iQue. O nível de ligação máxima (Bmax) e Kd aparente foram determinados pela análise de regressão não linear das curvas de ligação com a ligação específica com o modelo da inclinação de Hill suprido no software GraphPad Prism versão 8, depois da subtração do sinal de fundo observado para as células incubadas apenas com anticorpo secundário. Os dados da ligação foram normalizados por experimento em relação ao nível de ligação máxima (Bmax) calculado para IgG1-11B8 tipo selvagem.

[00616] A Figura 22A mostra a ligação observada para as variantes de IgG1-CAMPATH-1H em um experimento representativo, em que todas as variantes de anticorpo testadas mostraram ligação dependente da dose similar às células Wien 133. Estes dados indicam que a introdução das mutações E430G e K439E não teve nenhum efeito sobre a ligação alvo na superfície celular. Ligação alvo comparável foi observada quando a mutação E345R foi introduzida ao invés da mutação E430G. Também a introdução de cada uma das mutações adicionais G236R, G237A ou G237T em IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E não teve nenhum efeito sobre a ligação alvo de CD52 na superfície celular. Quando comparando dados coletados de três experimentos independentes, nenhuma diferença na ligação máxima calculada em média (Bmax; Figura 22B) foi observada e nenhuma diferença no Kd aparente calculado em média (Figura 22C) foi observada para as variantes de anticorpo quando comparadas aos anticorpos tipo selvagem.

Exemplo 25: A ligação alvo nas células Raji de variantes de anticorpo de IgG1-11B8 anti-CD20 contendo as mutações E430G-S440K

[00617] A ligação de variantes de anticorpo IgG1-11B8 anti-CD20 com a mutação realçadora da interação de Fc:Fc E430G, mutação inibidora da

auto-oligomerização S440K e mutações moduladoras da ligação de C1q às células de linfoma Raji foi analisada pela citometria de fluxo. O ensaio de ligação *in vitro* usando células Raji foi realizado com concentrações de diluição em série de anticorpo (faixa de 0,0007 a 40 µg/ml de concentrações finais em diluições de 3 vezes), essencialmente como descrito no Exemplo 24. A ligação de anticorpo foi analisada pela citometria de fluxo em um peneirador Intellicyt iQue. Nível de ligação máxima (B_{max}) e K_d aparente foram determinadas pela análise de regressão não linear das curvas de ligação com a ligação específica com o modelo da inclinação de Hill suprido no software GraphPad Prism versão 8, depois da subtração do sinal de fundo observado para células incubadas apenas com anticorpo secundário. Os dados de ligação foram normalizados por experimento em relação ao nível de ligação máxima (B_{max}) calculado para IgG1-11B8 tipo selvagem.

[00618] A Figura 23A e B mostram um experimento de ligação representativo, demonstrando que todas as variantes de anticorpo IgG1-11B8 testadas mostraram ligação dependente da dose similar às células Raji. Quando calculados em média sobre três experimentos independentes, os valores de ligação máxima (B_{max}) e os valores de K_d aparente calculados em média de variantes de anticorpo IgG1-11B8 abrigando qualquer uma das mutações mencionadas acima foram similares àqueles do IgG1-11B8 tipo selvagem (Figura 23C-F). Estes dados indicam que a introdução das mutações E430G e S440K únicas ou combinadas não teve nenhum efeito sobre a ligação alvo na superfície celular. A introdução de cada uma das mutações realçadoras da ligação de C1q adicionais K326A, E333A ou E333S, a mutação inibidora da ligação de C1q G237A ou a combinação das mutações moduladoras da ligação de C1q G237A-E333S em IgG1-11B8-E430G-S440K não teve nenhum efeito sobre a ligação alvo CD20 na superfície celular.

Exemplo 26: Ligação a FcRn de variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 e IgG1-11B8 anti-CD20 contendo as mutações

E430G e K439E ou S440K

[00619] O receptor de Fc neonatal (FcRn) é responsável pela meia-vida plasmática longa de IgG pela proteção da IgG da degradação. Depois da internalização do anticorpo, FcRn liga às regiões Fcs do anticorpo nos endossomas, onde a interação é estável no ambiente brandamente ácido (pH 6,0). Na reciclagem para a membrana plasmática, onde o ambiente é neutro (pH 7,4), a interação é perdida e o anticorpo é liberado de volta dentro da circulação. Isto influencia a meia-vida plasmática de IgG.

[00620] Um ensaio imunossorvente ligado à enzima da ligação de FcRn (ELISA) foi realizado para avaliar a ligação de FcRn humano ao IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 ou IgG1-11B8 anti-CD20 com mutação realçadora da interação de Fc-Fc E430G, mutação inibidora da auto-oligomerização K439E (no caso de IgG1-CAMPATH-1H) ou S440K (no caso de IgG1-11B8) e cada uma das mutações moduladoras da ligação de C1q G237A, G237T, K326A, E333A ou G237A-E333S. Placas Streptawell de 96 poços (Roche, Cat No. 1734776001) foram revestidas com 2 µg/mL (100 µL/poço) de domínio extracelular biotinizado recombinantemente produzido de FcRn humano [FcRnECDHis-B2M-BIO, isto é o domínio extracelular de FcRn humano com um rótulo His no terminal C (FcRnECDHis; SEQ ID 155) como dímero com beta2microglobulina (B2M; SEQ ID 156)], diluído em PBS por 2 horas sob agitação na temperatura ambiente (RT). As placas foram lavadas três vezes com PBST. As amostras de anticorpo foram adicionadas a 40 µg/mL de concentração final em PBST/0,2% de BSA pH 6,0 ou pH 7,4 e incubadas por 1 hora na RT sob agitação. As placas foram lavadas três vezes com PBST/0,2% de BSA, pH 6,0 ou pH 7,4. Cadeia leve anti-Ser humano capa de Cabra policlonal conjugada à Peroxidase de Rábano (HRP) (1:5.000; Sigma, Cat No. A-7164) diluída em PBST/0,2% de BSA, pH 6,0 ou pH 7,4 foi adicionada e as placas foram incubadas por 1 hora na RT sob agitação. Depois de lavar três vezes com PBST/0,2% de BSA, pH 6,0 ou pH 7,4., 100

μL de ácido 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico (ABTS; 1 mg/mL; Roche Cat No. 11112422001) foram adicionados como substrato e as placas foram incubadas por 10 minutos na RT protegidas da luz. A reação foi interrompida usando 100 μL de ácido oxálico a 2% (Riedel de Haen, Cat No. 33506), incubada por 10 minutos na RT e a absorbância foi medida a 405 nm usando uma leitora de ELISA.

[00621] No pH 6,0, ligação de FcRn altamente similar foi observada pelo IgG1-CAMPATH-1H tipo selvagem e variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H abrigando mutações E430G ou E430G-K439E, assim como pelas variantes de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E de anticorpo abrigando mutações moduladoras da ligação de C1q G237A ou G237T (Figura 24A). Também, IgG1-11B8 tipo selvagem, variantes de anticorpo IgG1-11B8 abrigando mutações E430G ou E430G-S440K e variantes de anticorpo IgG1-11B8-E430G-S440K abrigando mutações moduladoras da ligação de C1q K326A, E333A, G237A ou G237A-E333S mostraram ligação a FcRn similar no pH 6,0 (Figura 24B). IgG1-b12 mostrou ligação residual baixa a FcRn no pH 7,4, ao contrário dos outros anticorpos testados, que todos mostraram ligação essencialmente similar ao sinal de fundo registrado para poços incubados sem anticorpo (Figura 24C, D). Quando juntos, estes resultados mostraram que IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 e IgG1-11B8 anti-CD20 com mutação realçadora da hexamerização E430G, mutações inibidoras da auto-oligomerização K439E ou S440K e mutações moduladoras da ligação de C1q K326A, G237A, G237T, E333A ou G237A-E333S mostraram ligação normal a FcRn humano.

Exemplo 27: Análise farmacocinética (PK) de variantes de anticorpo abrigando mutações que realçam as interações Fc-Fc, inibem a auto-oligomerização e modulam a ligação de C1q

[00622] As propriedades farmacocinéticas das variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 e IgG1-11B8 anti-CD20 abrigando uma

mutação realçadora da interação de Fc-Fc, uma mutação inibidora da auto-oligomerização e uma mutação moduladora da ligação de C1q foram analisadas em um estudo em camundongo. As variantes de anticorpo foram testadas tanto como anticorpos únicos quanto como uma mistura.

[00623] Os camundongos neste estudo foram alojados na Instalação de Animais do Laboratório Central (Utrecht, Países Baixos) e mantidos em gaiolas individualmente ventiladas com água e alimento providos *ad libitum*. Todos os experimentos estiveram de acordo com a lei de proteção de animal dos Países Baixos (WoD) traduzidos a partir das diretrizes (2010/63/EU) e foram aprovados pela Comissão Central dos Países Baixos para experimentos com animal e pelo comitê de ética local). Os camundongos SCID (C.B-17/IcrHan@Hsd-Prkdc<scid, Envigo) foram injetados intravenosamente com 500 µg de anticorpo (IgG1-CAMPATH-1H tipo selvagem, variantes dos mesmos abrigando as mutações E430G e K439E e cada uma das mutações G237Q ou G236R, IgG1-11B8 tipo selvagem, variantes dos mesmos abrigando as mutações E430G e S440K e cada uma das mutações G237A ou E333S ou combinações de um IgG1-CAMPATH-1H e variante de anticorpo IgG1-11B8) usando 3 camundongos por grupo. 50 µL de amostras de sangue foram coletadas da veia facial em 10 minutos, 4 horas, 1 dia, 2 dias, 7 dias, 14 dias e 21 dias depois da administração do anticorpo. O sangue foi coletado em frascos contendo heparina e centrifugado por 5 minutos a 10.000g. O plasma foi armazenado a -20°C até a determinação das concentrações de anticorpo.

[00624] Concentrações específicas de IgG humana foram determinadas usando um ELISA de hIgG total. IgG2amm-1015-6A05-Fab anti-IgG humana de Camundongo (anticorpo gerado internamente, lote 3233-025-EP, Genmab, Países Baixos), revestido nas placas de ELISA Microlon de 96 poços (Greiner, Alemanha) em uma concentração de 2 µg/mL, foi usada como anticorpo de captura. Depois de bloquear as placas com PBS suplementado com 0,2% de albumina sérica bovina, as amostras foram adicionadas, diluídas

em série em tampão de ELISA (PBS suplementado com 0,05% de Tween 20 e 0,2% de albumina sérica bovina) e incubadas sobre um agitador de placas por 1 h na temperatura ambiente (RT). As placas foram subsequentemente incubadas com imunoglobulina anti-IgG humana de cabra (#109-035-098, Jackson, West Grace, PA) e desenvolvidas com ácido 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzotiazolino-6-sulfônico) (ABTS; Roche, Mannheim, Alemanha). Os respectivos materiais usados para injeção foram usados como a curva de referência. A absorbância foi medida em uma leitora de microplaca (Biotek, Winooski, VT) a 405 nm.

[00625] A depuração do anticorpo IgG1-CAMPATH-1H tipo selvagem e as variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R e IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G237Q foi comparável, embora as concentrações de IgG observadas de todas as variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H injetadas nos camundongos fossem mais baixas do que a curva de concentração esperada, com base no modelo de 2 compartimentos, para os anticorpos IgG1 tipo selvagem nos camundongos SCID (Figura 25A). A depuração de anticorpo IgG1-11B8 tipo selvagem e variantes dos mesmos, IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A e IgG1-11B8-E430G-S440K-E333S, foi comparável (Figura 25B) entre si. No caso de IgG1-11B8 e suas variantes, a curva da concentração de IgG1 total foi similar à curva da concentração prevista para a IgG1 tipo selvagem nos camundongos SCID. Compatível com as observações para anticorpos únicos, a introdução de mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização ou modulem a ligação de C1q não impactaram as farmacocinéticas das misturas dos anticorpos de IgG1-CAMPATH-1H e IgG1-11B8 (Figura 25C). A curva da concentração de IgG total das misturas foi similar, embora levemente mais baixa do que, à curva da concentração prevista para IgG1 tipo selvagem nos camundongos SCID.

[00626] As variantes de IgG1-11B8 com mutações E430G-S440K-

G237A mostraram uma taxa de depuração similar ao IgG1-11B8 tipo selvagem (Figura 25D). As variantes de IgG1-CAMPATH-1H com mutações E430G-K439E-G236R ou E430G-K439E-G237Q exibiram taxas de depuração similares às daquelas de IgG1-CAMPATH-1H tipo selvagem (Figura 25D), enquanto que a depuração de todas as variantes de IgG1-CAMPATH-1H testadas fossem mais altas do que aquelas das variantes de IgG1-11B8 testadas. Todas as combinações de variantes de IgG1-CAMPATH-1H com variantes de IgG1-11B8 testadas mostraram taxas de depuração que foram comparáveis com aquela da combinação dos anticorpos IgG1-CAMPATH-1H WT + IgG1-11B8. Em conclusão, a introdução de mutações que modulassem as interações Fc-Fc, auto-oligomerização e ligação de C1q não impactaram o perfil farmacocinético dos anticorpos IgG1-CAMPATH-1H e IgG1-11B8 ou misturas dos mesmos nos camundongos.

Exemplo 28: Ativação de complemento de fase fluída pelas variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H e IgG1-11B8 abrigando uma mutação realçadora da interação de Fc-Fc, mutações inibidoras da auto-oligomerização e mutações moduladoras da ligação de C1q

[00627] Na oligomerização de anticorpos, o fator de complemento C1 pode se ligar aos multímeros de anticorpo iniciando a ativação adicional da cascata de complemento. Depois da ativação do caminho de complemento clássico, C1s ativados clivam C4 nos fragmentos C4a e C4b, que são adicionalmente processados pelo Fator I em C4d. Por exemplo, a concentração sérica de C4d pode ser usada como uma medida da ativação do caminho de complemento clássico. Aqui, as concentrações séricas de C4d foram medidas depois da incubação das variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 e IgG1-11B8 anti-CD20 em soro humano com complemento intacto (não inativados por calor) para determinar se a introdução de mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e modulem a ligação de C1q induzem a ativação do caminho

de complemento clássico independente da ligação alvo.

[00628] Anticorpos únicos foram misturados com 90% de soro AB humano normal (NHS) em uma concentração de IgG recombinante final total de 100 µg/ml. Os anticorpos foram depois incubados por 60 min a 37°C e subsequentemente mantidos em gelo. Em seguida, as amostras foram diluídas 100 vezes usando diluente de espécime (da Quidel, kit MicroVue Complement C4d Fragment EIA). De acordo com as instruções do fabricante, amostras e padrões providos no kit foram aplicados a uma placa microtituladora de 96 poços que foi pré-tratada com 3 etapas de lavagem de placa usando 250 a 300 µl de tampão de lavagem e secando depois de cada etapa. As placas foram incubadas por 30 minutos na RT sobre um agitador. Em seguida, as placas microtituladoras foram esvaziadas e lavadas 5 vezes usando tampão de lavagem e secadas depois de cada etapa. Por poço, 50 µl de Conjugado C4d provido com o kit foram adicionados e incubados por 30 minutos na RT. Mais uma vez, todos os poços foram lavados 5 vezes usando tampão de lavagem e secos depois de cada etapa. Por poço, 100 µl de substrato provido com o kit foram depois adicionados e incubados por 30 minutos na RT. Para interromper a reação enzimática, 50 µl de solução de interrupção provida com o kit foram adicionados a todos os poços e a absorbância foi determinada no comprimento de onda de 405 nm usando uma leitora ELISA (Biotek, Winooski, VT). Os níveis de C4d de fundo de aproximadamente 11 a 13 µg/ml foram detectados no soro usado para estes ensaios. Por exemplo, duas amostras não contendo nenhum dos anticorpos foram usadas como controles negativos e a concentração média de C4d medida nestas amostras foi subtraída das concentrações de C4d medidas nas amostras incubadas com variantes de anticorpo. As médias e desvios padrão da amostra foram calculados em relação a todos os valores registrados em três experimentos independentes.

[00629] A ativação de complemento como determinado pelas

concentrações de C4d no soro foi detectada para as variantes de anticorpo contendo as mutações E345R, E430G, S440Y (RGY) (Figura 26). A ativação de complemento mais forte foi detectada na incubação de Her2ECDHis recombinante (SEQ ID NO: 159) e variante de anticorpo específica de Her2 IgG1-1014-005-E345R-E430G-S440Y (IgG1-1014-005-RGY; SEQ ID NO: 158) enquanto que Her2ECDHis recombinante não induziu a ativação de complemento. Nenhuma das concentrações de C4d diferindo significativamente dos níveis de C4d de fundo foi detectada para qualquer uma das variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-11B8 ou IgG1-b12 ou misturas das mesmas.

[00630] Em conclusão, a introdução da mutação realçadora da interação de Fc-Fc E430G, mutação inibidora da auto-oligomerização K439E ou S440K e mutações moduladoras da ligação de C1q G236R, G237A, G237Q ou G237R nas variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-11B8 ou IgG1-b12 não resultaram na ativação de complemento em solução.

Exemplo 29: Ligação de C1q nas células pelas variantes de anticorpo contendo as mutações E430G e K439E ou S440K

[00631] A análise citométrica de fluxo foi realizada para analisar a ligação de C1q às células Wien 133 incubadas com as variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 e IgG1-11B8 anti-CD20 abrigando mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização ou modulem a ligação de C1q. Por amostra, $0,1 \times 10^6$ das células Wien 133 foram incubadas por 15 minutos a 37°C com diluições das variantes de anticorpo em uma faixa de concentração de 20 a 0,033 µg/ml em etapas de diluição de 2,5 vezes. Em seguida, as placas foram resfriadas em gelo a 0°C por 30 min. Soro AB humano normal (NHS) frio foi adicionado a uma concentração final de 20% e as placas foram incubadas por 10 a 20 minutos em gelo a 0°C. As células foram lavadas duas vezes com tampão de FACS gelado (PBS + 0,1% de BSA + 0,02% de NaN₃) e subsequentemente

incubadas com 20 µg/ml de C1q-FITC anti-ser humano de coelho (Dako; cat nº F0254) por 30 minutos a 4°C. Depois de lavar as células duas vezes em tampão de FACS, as células foram colocadas em suspensão em 30 µl de tampão de FACS e analisados em um citômetro de fluxo iQue (Intellicyt). A ligação de C1q medida como valores médios de intensidade de fluorescência foram ajustados com um modelo de resposta agonista em log depois da transformação em log do eixo da concentração e normalizados em relação ao MFI médio de poços incubados sem anticorpo (0%) e o valor de topo ajustado da curva de dose-resposta de controle positivo IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%), usando GraphPad Prism versão 8.

[00632] A ligação de C1q eficiente foi observada depois de incubar as células Wien 133 com uma mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G e IgG1-11B8-E430G (Figura 27A). A atividade de ligação de C1q do agente único de IgG1-CAMPATH-1H-E430G foi próxima ao nível induzido pela mistura de controle positivo, enquanto IgG1-11B8-E430G demonstrou baixa atividade de ligação de C1q de agente único.

[00633] A introdução da mutação inibidora da auto-oligomerização K439E em IgG1-CAMPATH-1H-E430G resultou em uma anulação parcial da eficiência de ligação de C1q, enquanto que a introdução da mutação inibidora da auto-oligomerização S440K em IgG1-11B8-E430G resultou em uma perda completa de ligação de C1q (Figura 27B). A capacidade para ligar C1q foi restaurada aos níveis intermediários, quando comparada com a mistura de controle positivo, pela mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E e IgG1-11B8-E430G-S440K. Uma recuperação branda da ligação de agente único de C1q foi alcançada pela introdução da mutação realçadora da ligação de C1q K326A ou E333S em IgG1-11B8-E430G-S440K. A mistura de cada uma das duas últimas variantes de anticorpo com IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E resultou na restauração da ligação de C1q similar ao nível de uma mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E + IgG1-11B8-

E430G-S440K.

[00634] A ligação de C1q foi completamente anulada pela introdução de cada uma das mutações inibidoras da ligação de C1q G236R (Figura 27C) ou G237T (Figura 27D) em IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E. Uma restauração parcial da ligação de C1q foi observada depois de misturar IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R com as variantes de anticorpo de IgG1-11B8-E430G abrigando cada uma das mutações S440K, S440K-K326A ou S440K-E333S (Figura 27C). Igualmente, uma restauração parcial da ligação de C1q foi observada pela mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G237T com variantes de anticorpo de IgG1-11B8-E430G abrigando cada uma das mutações S440K, S440K-K326A ou S440K-E333S (Figura 27D).

[00635] Em conclusão, embora a introdução de mutações inibidoras da auto-oligomerização K439E ou S440K parcialmente anulasse a capacidade de ligação de C1q dos anticorpos abrigando a mutação realçadora de Fc-Fc E430G, a anulação completa da ligação de C1q pôde ser alcançada pela introdução de mutações inibidoras da ligação de C1q adicionais. A ligação de C1q foi recuperada em níveis diferentes pela mistura de anticorpos com mutações complementares K439E e S440K, dependendo das mutações moduladoras de C1q introduzidas nos anticorpos individuais.

Exemplo 30: O efeito de mutações moduladoras da ligação de C1q sobre a ligação de FcγR *in vitro* de anticorpos anti-CD52 e anti-CD20 com uma mutação realçadora da hexamerização e uma mutação inibidora da auto-oligomerização

[00636] Usando anticorpos purificados, a ligação de IgG1-CAMPATH-1H e variantes de anticorpo IgG1-11B8 ao domínio extracelular monomérico (ECD) de FcγRIA (FCGR1AECDDHis; SEQ ID NO: 149) e aos domínios extracelulares diméricos de FcγRIIA alótipo 131H (diFCGR2AH-HisBAP; SEQ ID NO: 150), FcγRIIA alótipo 131R (diFCGR2AR-HisBAP;

SEQ ID NO: 151), FcγRIIB (diFCGR2B-HisBAP; SEQ ID NO: 152), FcγRIIIA alótipo 158F (diFCGR3AF-HisBAP; SEQ ID NO: 153) e FcγRIIIA alótipo 158V (diFCGR3AV-HisBAP; SEQ ID NO: 154) foi testada nos ensaios de ELISA. Para detectar a ligação às variantes FcγR diméricas, placas de ELISA de 96 poços Microlon (Greiner, Alemanha) foram revestidas durante a noite a 4 °C com F(ab')₂-anti-ser humano-IgG-F(ab')₂ de cabra (Jackson Laboratory, 109-006-097, 1 µg/mL) em PBS, lavados e bloqueados com 200 µL/poço PBS/0,2% de BSA por 1 h na temperatura ambiente (RT). Com lavagens entre as incubações, as placas foram sequencialmente incubadas com 100 µL/poço de 20 µg/ml de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H em PBST/0,2% de BSA por 1 hora na RT sob agitação, 100 µL/poço de variantes ECD de FcγR diméricas, rotuladas com His, biotiniladas no terminal C (1 µg/mL) em PBST/0,2% de BSA por 1 hora na RT sob agitação e com 100 µL/poço de Estreptavidina-poliHRP (CLB, M2032, 1:10.000) em PBST/0,2% de BSA como anticorpo de detecção por 30 min na RT sob agitação. O desenvolvimento foi realizado por cerca de 10 (IIAH, IIAR, IIIAV), 20 (III AF) ou 30 (IIB) minutos com 1 mg/mL de ABTS (Roche, Mannheim, Alemanha). Para interromper as reações, 100 µL/poço de ácido oxálico a 2% foram adicionados. A absorbância foi medida a 405 nm em uma leitora de microplaca (BioTek, Winooski, VT). Para detectar a ligação a FcγRIa, placas de ELISA Microlon de 96 poços (Greiner, Alemanha) foram revestidas durante a noite a 4 °C com FCGR1AECD-His (1 µg/mL) em PBS, lavados e bloqueados com 200 µL/poço de PBS/0,2% de BSA por 1 h na temperatura ambiente (RT). Com lavagens entre as incubações, as placas foram sequencialmente incubadas com 100 µL/poço de 20 µg/ml de variantes de IgG1-CAMPATH-1H de anticorpo em PBST/0,2% de BSA por 1 h na RT sob agitação e 100 µL/poço de anti-ser humano-capra de cabra LC-HRP (1:5000) em PBST/0,2% de BSA por 30 minutos na RT sob agitação. O desenvolvimento foi realizado por cerca de 10 minutos com 1

mg/mL de ABTS (Roche, Mannheim, Alemanha). Para interromper as reações, 100 µL/poço de ácido oxálico a 2% foram adicionados. A absorbância foi medida a 405 nm em uma leitora de microplaca (BioTek, Winooski, VT).

[00637] Dados a partir de três (FcγRI, FcγRIIB, FcγRIIIA) ou duas (FcγRIIA) réplicas independentes foram combinadas pela normalização por placa em relação ao sinal de fundo no ELISA (nenhum controle de anticorpo, 0%) e um padrão interno, IgG1-CAMPATH-1H, ajuste para 100% e depois calculados em média em relação a todos os experimentos. As mutações introduzidas para modular a ligação de variantes de anticorpo de C1q também foram esperadas afetar a ligação de FcγR. A avaliação da ligação de IgG1-CAMPATH-1H e variantes de anticorpo IgG1-11B8 com mutação realçadora da interação de Fc-Fc E430G, mutação inibidora da auto-oligomerização K439E ou S440K e cada uma das mutações moduladoras da ligação de C1q G236R, G237A, K322A, G237T, G237Q, G237R ou G237A-E333S ao FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIIA e FcγRIa pelo ELISA revelou que a introdução de mutações G236R, G237A, G237T, G237Q ou G237R no IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E fortemente suprimiu a ligação a todas as variantes de FcγR testadas (Figura 28A-F). A ligação residual baixa foi observada para a IgG1-CAMPATH-1H-E430G-G237A ao FcγRIIB e a afinidade baixa aos receptores de FcγRIIA e FcγRIIIA. A ligação residual baixa a FcγRIa também foi observada para as variantes de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E com as mutações G236R, G237T, G237Q e G237R. IgG1-11B8 e IgG1-11B8-E430G-S440K tipo selvagem mostrou ligação forte similar a todos os FcγR testados, que foi suprimido pela introdução de G237A ou G237A-E333S em IgG1-11B8-E430G-S440K. As últimas duas variantes de anticorpo mostraram ligação residual baixa a FcγRIa, FcγRIIB e a afinidade baixa aos receptores de FcγRIIA. A introdução da mutação K322A brandamente suprimiu a ligação de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E a todos os FcγR testados.

[00638] Em conclusão, a ligação de FcγR foi fortemente inibida pela introdução de mutações moduladoras da ligação de C1q G236R, G237A, G237T, G237Q e G237R em IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E. Similarmente, a introdução da mutação G237A ou G237A-E333S no IgG1-11B8-E430G-S440K fortemente suprimiu a ligação de FcγR.

Exemplo 31: Seletividade da atividade da CDC pelas variantes de anticorpo misturadas pela introdução de mutações moduladoras da ligação de C1q nas variantes de anticorpo IgG1-h2E8 anti-CD52, IgG1-CAMPATH-1H e IgG1-11B8 anti-CD20 com uma mutação realçadora da interação de Fc-Fc E430G

[00639] Semelhante a IgG1-CAMPATH-1H, o anticorpo humanizado IgG1-h2E8 alveja CD52 humano. Aqui, o efeito sobre a eficácia da CDC da introdução de mutações moduladoras da ligação de C1q nas variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-h2E8, IgG1-11B8 abrigando uma mutação realçadora da interação de Fc-Fc e uma mutação inibidora da auto-oligomerização foi estudada usando células de linfoma Wien 133.

[00640] Mutações diferentes foram introduzidas nos anticorpos IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-h2E8, IgG1-11B8 e IgG1-b12: E430G, que induz interações Fc-Fc realçadas; cada uma das mutações K439E ou S440K, que inibem a formação de complexos de anticorpo homo-hexaméricos através da inibição das interações Fc-Fc intermoleculares e promovem a formação de complexos de anticorpo hetero-hexaméricos através de interações Fc-Fc complementares cruzadas; G236R, G237A, G237R, G237T ou G237Q, que suprimem a ligação de C1q ao complexo de anticorpo hetero-hexamérico e suprimem a ligação aos receptores Fcγ. Como controles, anticorpos únicos também foram misturados 1:1 com anticorpo de controle de isótipo sem ligação IgG1-b12 ou com IgG1-b12-E430G-S440K para permitir comparação direta das concentrações de componentes individuais e misturas compostas dos mesmos. Uma faixa de concentrações de anticorpos purificados (faixa de

0,009 a 40,0 µg/mL de concentrações finais; diluições de 3,3 vezes) foi testada em um ensaio de CDC *in vitro* nas células Wien 133 com 20% de NHS, essencialmente como descrito no Exemplo 2. A porcentagem da lise de célula foi calculada como (número de células positivas em PI / número total de células) x 100%. Os dados foram analisados usando valores de melhor ajuste de um modelo de resposta agonista não linear usando concentrações transformadas em log em GraphPad PRISM e a área sob as curvas de dose-resposta de três réplicas experimentais foi calculada. Os valores relativos das áreas sob a curva (AUC) representam a normalização para lise mínima (0% com IgG1-b12) e lise máxima (100% com a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G).

[00641] A eficácia do agente único intermediário da CDC induzida pelo IgG1-11B8-E430G foi anulada pela introdução da mutação S440K ou mutação dupla S440K-G237A (Figura 29A). Comparada com IgG1-11B8-E430G, a eficácia do agente único mais forte da CDC foi induzida pelo IgG1-CAMPATH-1H-E430G, que seria totalmente anulada pela introdução de mutações K439E-G236R. A eficácia da CDC seria parcialmente restaurada pela mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R com IgG1-11B8-E430G-S440K a aproximadamente 80% da potência (AUC relativa) da mistura de controle positivo IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G.

[00642] Similar ao IgG1-CAMPATH-1H tipo selvagem, IgG1-h2E8 tipo selvagem induziu CDC nas células Wien 133 com eficácia intermediária, que seria potenciada pela introdução de mutação realçadora da interação de Fc-Fc E430G ao mesmo nível induzido pelo IgG1-CAMPATH-1H-E430G. A mistura de IgG1-h2E8-E430G com IgG1-11B8-E430G induziu CDC com uma eficiência comparável a uma mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G e IgG1-11B8-E430G. A atividade de agente único da CDC de IgG1-h2E8-E430G seria parcialmente suprimida pela introdução da mutação inibidora da

auto-oligomerização K439E. A lise máxima induzida pelo agente único IgG1-h2E8-E430G-K439E a 40 µg/ml foi próxima ao nível de uma mistura de IgG1-h2E8-E430G + IgG1-11B8-E430G (Figura 29B). A eficácia da CDC foi restaurada pela mistura de IgG1-h2E8-E430G-K439E com IgG1-11B8-E430G-S440K (recuperando aproximadamente 90% da potência da mistura de controle positivo IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G), mas não pela mistura com ligação sem antígeno de IgG1-b12-E430G-S440K. A introdução da mutação G237A em IgG1-11B8-E430G-S440K na última mistura não afetou a eficácia da CDC da mistura, medida como AUC ou como lise máxima a 40 µg/ml (Figura 29B).

[00643] A introdução da mutação G236R em IgG1-h2E8-E430G-K439E anulou totalmente a atividade residual de agente único da CDC, enquanto aproximadamente 79% da potência da CDC comparada com a mistura de controle pôde ser recuperada pela mistura com IgG1-11B8-E430G-S440K. A introdução da mutação G237A em IgG1-11B8-E430G-S440K brandamente suprimiu a eficácia da CDC recuperada depois da mistura com IgG1-h2E8-E430G-K439E-G236R. A introdução da mutação G237T em IgG1-h2E8-E430G-K439E suprimiu, mas não anulou completamente, a eficácia de agente único da CDC. Similar à mistura de IgG1-h2E8-E430G-K439E-G236R e variantes de anticorpo IgG1-11B8-E430G-S440K, a eficácia da CDC de IgG1-h2E8-E430G-K439E-G237T pôde ser restaurada pela mistura com IgG1-11B8-E430G-S440K até aproximadamente 88% da potência da mistura de controle ou com IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A (até aproximadamente 79%). Semelhante à introdução da mutação G236R, a introdução de G237Q em IgG1-h2E8-E430G-K439E anulou completamente a atividade residual de agente único da CDC. A eficácia da CDC pôde ser restaurada até aproximadamente 84% da potência da mistura de controle pela mistura com IgG1-11B8-E430G-S440K. A introdução da mutação G237A em IgG1-11B8-E430G-S440K na última

mistura induziu uma supressão branda da eficácia da CDC até aproximadamente 74% da potência da mistura de controle. A lise máxima induzida a 40 µg/ml por todas as misturas de anticorpo de variantes de anticorpo IgG1-h2E8-E430G-K439E com qualquer uma das mutações moduladoras da ligação de C1q G236R, G237T ou G237Q e IgG1-11B8-E430G-S440K ou IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A foi comparável à lise máxima induzida por uma mistura de IgG1-h2E8-E430G-K439E e IgG1-11B8-E430G-S440K (Figura 29B).

[00644] Em conclusão, variantes do anticorpo IgG1-h2E8 anti-CD52 abrigando a mutação E430G, mutação inibidora da auto-oligomerização K439E e uma mutação moduladora da ligação de C1q mostraram eficácia codependente seletiva comparável da CDC nas células Wien 133 como variantes de IgG1-CAMPATH-1H de anticorpo abrigando as mesmas mutações, quando misturados com variantes de anticorpo de IgG1-11B8 anti-CD20, mostrando que os efeitos induzidos pelas mutações observadas não foram específicas para a IgG1-CAMPATH-1H, mas também foram aplicáveis aos outros anticorpos alvejados com CD52.

Exemplo 32: Recrutamento independente da ligação alvo de variantes de anticorpo contendo mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e modulem a ligação de C1q

[00645] Nos Exemplos anteriores, foi demonstrado que a atividade de agente único da CDC de variantes de ligação a antígeno de anticorpo abrigando uma mutação realçadora da interação de Fc-Fc e uma mutação inibidora da auto-oligomerização pôde ser reduzida adicionalmente pela introdução de mutações inibidoras da ligação de C1q. A recuperação da eficácia da CDC foi observada depois de misturar variantes de anticorpo com atividade de agente único reduzida com variantes de ligação a antígeno complementares de anticorpo abrigando mutações moduladoras da ligação de C1q. Aqui, nós testamos se a hexamerização codependente e CDC também

poderiam ser induzidas pela mistura de variantes de ligação a antígeno de anticorpo com variantes de anticorpo sem ligação abrigando as ditas mutações.

[00646] Mutações diferentes foram introduzidas no anticorpo IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52, anticorpo IgG1-11B8 anti-CD20 e anticorpo de controle sem ligação IgG1-b12: E430G, que induz interações Fc-Fc realçadas; cada uma das mutações K439E ou S440K, que inibem a formação de complexos de anticorpo homo-hexaméricos através da inibição das interações Fc-Fc intermoleculares e promovem a formação de complexos de anticorpo hetero-hexaméricos através de interações Fc-Fc complementares cruzadas; G236R ou G237A, que suprime a ligação de C1q ao complexo de anticorpo hetero-hexamérico. Uma faixa de concentrações de anticorpos purificados (faixa de 0,009 a 40,0 µg/mL de concentrações finais; diluições de 3,3 vezes) foi testado em um ensaio de CDC *in vitro* nas células Wien 133 com 20% de NHS, essencialmente como descrito no Exemplo 2. A porcentagem da lise de célula foi calculada como (número de células positivas em PI / número total de células) x 100%. Os dados foram analisados usando valores de melhor ajuste de um modelo de dose-resposta agonista não linear usando concentrações transformadas em log em GraphPad PRISM e a área sob as curvas de dose-resposta de três réplicas experimentais foi calculada. Os valores relativos das áreas sob a curva (AUC) representam valores normalizados para o valor da AUC observado para o anticorpo de controle de isótipo IgG1-b12 (0%) e o valor AUC da mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G (100%).

[00647] A Figura 30A, B mostra que nenhuma atividade de agente único foi observada para uma mistura de variantes de anticorpo do anticorpo de controle sem ligação IgG1-b12 abrigando a mutação E430G em combinação com cada uma das mutações K439E ou S440K. Além disso, como descrito nos exemplos anteriores, nenhuma atividade de agente único

foi observada para os anticorpos IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R, IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G237Q, IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G237R ou IgG1-11B8-E430G-S440K. Quando IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G237T foi misturado com a ligação sem antígeno de IgG1-b12-E430G-S440K, a CDC foi detectada com 9% da potência daquela da mistura de controle positivo (IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G). Quando IgG1-11B8-E430G-S440K foi incubado com IgG1-b12-E430G-K439E sem ligação, CDC modesta pôde ser detectada. Ao contrário, todas as quatro variantes CAMPATH testadas puderam recuperar potentemente a CDC na mistura com ligação a antígeno CD20 de IgG1-11B8-E430G-S440K.

[00648] O recrutamento potencial de anticorpos sem célula ligados pelas variantes de IgG1-11B8 direcionadas a CD20 foi analisado em mais detalhes em experimentos separados pela comparação da eficácia da CDC depois de misturar com variantes do anticorpo de ligação de CD52 IgG1-CAMPATH-1H ou anticorpo de controle sem ligação IgG1-b12, ambos contendo as mutações E430G, K439E e G236R (Figura 30C, D). Nenhuma atividade de agente único foi observada para as variantes de anticorpo do anticorpo de controle sem ligação IgG1-b12 abrigando a mutação E430G em combinação com cada uma das mutações K439E ou S440K e cada uma das mutações G236R ou G237A. Na mistura de duas poderão variantes de anticorpo de ligação sem antígeno IgG1-b12 que abriga tanto a mutação E430G, cada uma das mutações K439E ou S440K quanto cada uma das mutações G236R ou G237A, nenhuma eficácia da CDC foi observada. A recuperação parcial da eficácia da CDC até aproximadamente 15% e 19% da potência de CDC da mistura de controle positivo foi observada depois de misturar anticorpo de ligação sem antígeno IgG1-b12-E430G-K439E-G236R com IgG1-11B8-E430G-S440K ou IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A, respectivamente. A atividade da CDC seria recuperada até aproximadamente

65% e 71% do nível induzido pela mistura de controle positivo IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R com IgG1-11B8-E430G-S440K ou IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A, respectivamente. Esta recuperação não foi induzida na mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R com cada um dos anticorpos sem ligação alvo IgG1-b12-E430G-S440K ou IgG1-b12-E430G-S440K-G237A.

[00649] Estes dados indicam que as variantes de anticorpo de ligação a antígeno abrigando a mutação realçadora da interação de Fc-Fc E430G, mutação inibidora da auto-oligomerização S440K e opcionalmente mutação inibidora da ligação de C1q G237A pode recrutar variantes de anticorpo não ligadas a antígeno abrigando as mutações complementares E430G, K439E e G236R, resultando por fim na indução de CDC. O recrutamento independente da ligação a antígeno do anticorpo complementar E430G-S440K foi fortemente suprimido se o anticorpo ligado a antígeno conteve além de E430G-K439E também cada uma das mutações inibidoras da ligação de C1q G236R, G237Q ou G237R, ao passo que G237T falhou em bloquear o recrutamento independente da ligação a antígeno do anticorpo complementar.

Exemplo 33: Capacidade para ativar FcγRIIa e FcγRIIIa pelas variantes de anticorpo abrigando mutações que realçam a interação de Fc-Fc, inibem a auto-oligomerização e modulam a ligação de C1q

[00650] No Exemplo 31, a ligação de variantes de anticorpo abrigando mutação realçadora da interação de Fc-Fc E430G, cada uma das mutações inibidoras da auto-oligomerização K439E ou S440K e cada uma das mutações moduladoras da ligação de C1q G236R, G237A, G237T, G237Q, G237R ou K322A ao FcγRIa, FcγRIIa, FcγRIIb e FcγRIIIa foi estudada. A introdução das mutações moduladoras da ligação de C1q nas posições G236 ou G237 resultou na supressão da ligação de FcγR. Aqui, nós estudamos se a introdução de mutações moduladoras da ligação de C1q G236R, G237A, G237A-E333S ou G237Q em IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52-E430G-

K439E e IgG1-11B8-E430G-S440K anti-CD20 afetou a indução de ADCC pela determinação da ativação mediada por FcγRIIa e FcγRIIIa em um ensaio repórter Promega usando células Raji expressando o alvo e uma linhagem de célula repórter Jurkat expressando as variantes de alótipo de alta afinidade de FcγRIIa humano ou FcγRIIIa humano.

[00651] A ativação da sinalização mediada por FcγR pelo IgG1-CAMPATH-1H e variantes de anticorpo IgG1-11B8 mencionados acima foi quantificada usando ADCC Reporter BioAssays (Promega, FcγRIIa: Cat # G9995; FcγRIIIa: Cat # G7018) nas células Raji, de acordo com as recomendações do fabricante. Como células efectoras, o kit contém Células T Jurkat humanas que são engenheiradas para expressar estavelmente FcγRIIa (FcγRII-H) ou FcγRIIIa (V158) de alta afinidade e um elemento de resposta do fator nuclear de células T ativadas (NFAT) dirigindo a expressão da luciferase de vagalume. Em resumo, as células Raji (5.000 células/poço) foram semeadas em OptiPlates brancas de 384 poços (Perkin Elmer Cat # 6007290) em Tampão de Ensaio de ADCC (Promega, Cat # G719A) suplementado com 12% de Soro com IgG Baixa (Promega; Cat # G711A) e incubadas por 6 horas a 37°C/5% de CO₂ em um volume total de 30 µL contendo a série de concentração de anticorpo (0,0002 a 40 µg/mL de concentrações finais em diluições de 4 vezes) e Células Efectoras de Bioensaio ADCC descongeladas. Depois de incubar as placas por 15 minutos na temperatura ambiente (RT), 30 µL de Bio Glo Assay Luciferase Reagent foram adicionados e incubados por 5 minutos na RT. A produção de luciferase foi quantificada pela leitura da luminescência em uma EnVision Multilabel Reader (Perkin Elmer). Os sinais de luminescência foram normalizados pela subtração do sinal de luminescência de fundo determinado a partir de amostras com apenas meio (nenhuma célula Raji, nenhum anticorpo, nenhuma célula efectora). Os dados foram analisados usando valores de melhor ajuste de um modelo de dose-resposta agonista não linear

usando concentrações transformadas em log no GraphPad PRISM e a área sob as curvas de dose-resposta de três réplicas experimentais (FcγRIIa) ou duas (FcγRIIIa) foi calculada. Os valores AUC foram normalizados por experimento em relação à atividade de repórter observada para as células incubadas com controle sem ligação IgG1-b12 (0%) e a atividade da mistura de IgG1-Campath-1H tipo selvagem + IgG1-11B8 tipo selvagem (100%) e subsequentemente calculados em média em relação a réplicas experimentais.

[00652] Como um agente único, a variante de anticorpo IgG1-11B8-E430G-S440K induziu a ativação mediada por FcγRIIa (Figura 31A), que está em linha com os resultados no Exemplo 31 mostrando a ligação de FcγRIIa por esta variante. Ao contrário, nenhuma ativação mediada por FcγRIIa pelas variantes de anticorpo de agente único foi observada na introdução de mutações moduladoras da ligação de C1q G236R ou G237Q no IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E ou mutações G237A ou G237A-E333S no IgG1-11B8-E430G-S440K. Também misturas de variantes de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E abrigando mutação G236R ou G237Q e variantes IgG1-11B8-E430G-S440K abrigando mutações G237A ou G237A-E333S não induziram a ativação mediada por FcγRIIa. Entretanto, uma mistura de IgG1-11B8-E430G-S440K e IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R ou IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G237Q induziu a ativação mediada por FcγRIIa. As mesmas variantes de anticorpo foram testadas quanto à capacidade para induzir a ativação mediada por FcγRIIIa (Figura 31B). Aqui, a ativação mediada por FcγRIIIa foi observada por IgG1-11B8-E430G-S440K sozinho ou quando misturados com variantes de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E abrigando a mutação G236R ou G237Q. IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E com ou sem a mutação G236R induziu ativação mediada por FcγRIIIa baixa ou intermediária, respectivamente. Quando IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R ou IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G237Q foram misturados com cada uma das variantes de

IgG1-11B8-E430G-S440K G237A ou G237A-E333S, a ativação mediada por FcγRIIIa não pôde ser detectada.

[00653] Em conclusão, a capacidade para induzir a atividade mediada por FcγRIIa ou FcγRIIIa, usada como uma medida substituta para ADCC, por IgG1-CAMPATH-1H e variantes de anticorpo IgG1-11B8 abrigando uma interação de mutação realçadora de Fc-Fc e inibidora da auto-oligomerização foi eficientemente anulada pela introdução de mutações moduladoras da ligação de C1q G236R, G237A, G237A-E333S ou G237Q.

Exemplo 34: Seletividade da atividade da CDC nas células Wien 133 depois de titular os componentes de uma mistura de variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 e IgG1-11B8 anti-CD20 com mutações que realçam as interações Fc-Fc, inibem a auto-oligomerização e modulam a ligação de C1q

[00654] Nos Exemplos anteriores, as variantes de anticorpo abrigando uma mutação que realce as interações Fc-Fc, assim como uma mutação que iniba a auto-oligomerização e uma mutação que module a ligação de C1q foram misturados em uma razão 1:1. Aqui, nós testamos se a atividade codependente seletiva da CDC também foi atingida pela mistura das duas variantes de anticorpo em razões não equimolares.

[00655] Um ensaio de CDC *in vitro* usando as células Wien 133 foi realizado com 20% de NHS, essencialmente como descrito no Exemplo 2. Anticorpos únicos foram titulados em diluições de 3,3 vezes (faixa de concentração final de 0,005 a 20,0 µg/mL). Quando misturas de anticorpo foram aplicadas, um componente foi titulado (faixa de concentração final de 0.0003 a 20,0 µg/mL em diluições de 5 vezes) e o outro componente foi usado em uma concentração fixa de 20 µg/mL. A lise de célula foi calculada a partir do número de células positivas em PI como descrito no Exemplo 2.

[00656] A atividade eficiente da CDC nas células Wien 133 foi induzida por uma mistura titulada (razão 1:1) de IgG1-CAMPATH-1H-

E430G-K439E-G236R e IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A (Figura 32A). a CDC foi induzida ainda mais eficientemente na incubação das células Wien 133 com uma mistura de variantes de anticorpo em que uma variante de anticorpo foi titulada enquanto que a outra variante de anticorpo foi aplicada em uma concentração fixa de 20 µg/mL. Nenhuma atividade da CDC foi detectada no IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R titulado misturado com 20 µg/mL de anticorpo de ligação não alvo IgG1-b12 ou uma variante do mesmo abrigo as mutações E430G-S440K-G237A, indicando que a hetero-hexamerização permaneceu dependente da ligação alvo mesmo nas concentrações de IgG saturando a ligação de CD20. Também, nenhuma CDC foi observada no IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R e IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A misturados na ausência de soro, indicando que C1q é requerida para a estabilização do complexo hexamérico. Resultados altamente similares foram obtidos para as misturas de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G237Q e IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A (Figura 32B). A CDC foi induzida apenas pelas misturas de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G237Q e IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A, nas misturas em que ambas as variantes de anticorpo foram tituladas ou nas misturas em as quais uma variante de anticorpo foi titulada e a outra variante de anticorpo foi aplicada em uma concentração fixa de 20 µg/mL. Misturas de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G237Q e anticorpo de ligação não alvo IgG1-b12 ou uma variante do mesmo abrigo as mutações E430G-S440K-G237A não induziram a CDC.

[00657] Em conclusão, CDC eficiente nas células Wien 133 seria induzida codependentemente pelas variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H e IgG1-11B8 abrigo a mutação realçadora da interação de Fc-Fc E430G, cada uma das mutações inibidoras da auto-oligomerização K439E ou S440K e cada uma das mutações moduladoras da ligação de C1q G236R, G237A ou G237Q em uma ampla faixa de razões não equimolares:

>50% de lise foi observada nas razões CAMPATH:11B8 variando de 100:3 até 1:100, a ligação provida a pelo menos um dos dois alvos foi saturada.

Exemplo 35: Seletividade de variantes de anticorpo anti-CD52 e anti-HLA-DR abrigando mutação realçadora da interação de Fc-Fc E430G, cada uma das mutações inibidoras da auto-oligomerização K439E ou S440K e mutações moduladoras da ligação de C1q P329R ou G236R

[00658] Aqui, a eficácia codependente seletiva da CDC pelas variantes de anticorpo anti-CD52 e anti-HLA-DR abrigando uma mutação realçadora da interação de Fc-Fc, mutações inibidoras da auto-oligomerização e mutações moduladoras da ligação de C1q foi estudada nas células de linfoma Oci-Ly17.

[00659] Mutações diferentes foram introduzidas no anticorpo anti-CD52 IgG1-CAMPATH-1H e anticorpos anti-HLA-DR IgG1-HLA-DR-huL243 e IgG1-HLA-DR-1D09C3: E430G, que induz interações Fc-Fc realçadas, cada uma das mutações inibidoras da auto-oligomerização K439E ou S440K e cada uma das mutações G236 ou P329R, que suprime a ligação de C1q. Como controles, anticorpos únicos também foram misturados 1:1 com anticorpos de controle de isótipo sem ligação IgG1-b12 ou IgG1-b12-E430G-S440K para permitir a comparação direta das concentrações de componentes individuais e misturas compostas dos mesmos. Uma faixa de concentrações de anticorpos purificados (faixa de 0,009 a 40,0 µg/mL de concentrações finais; diluições de 3,3 vezes) foi testada em um ensaio de CDC *in vitro* em 30.000 células de linfoma Oci-Ly17 per condição com 20% de NHS, essencialmente como descrito adicionalmente no nas células Exemplo 2. A porcentagem da lise de célula foi calculada como (número de células positivas em PI / número total de células) x 100%. Os dados foram analisados usando valores de melhor ajuste de um modelo de dose-resposta agonista não linear usando concentrações transformadas em log no GraphPad PRISM e a área sob as curvas de dose-resposta de três réplicas experimentais

foi calculada. Os valores relativos das áreas sob a curva (AUC) representam a normalização para lise mínima (0% com IgG1-b12) e lise máxima (100% com a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-HLA-DR-huL243-E430G na Figura 33A; ou 100% com a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-HLA-DR-1D09C3-E430G na Figura 33B).

[00660] Uma mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G e IgG1-HLA-DR-huL243-E430G induziu CDC eficiente das células de Oci-Ly17 (mistura de controle positivo; ajustada a 100%, Figura 33A). Os agentes únicos da última mistura induziram CDC até aproximadamente 83% (IgG1-CAMPATH-1H-E430G) e 80% (IgG1-HLA-DR-huL243-E430G) da potência da mistura de controle positivo. A introdução da mutação S440K em IgG1-CAMPATH-1H-E430G reduziu a capacidade para induzir CDC até aproximadamente 24% da potência da mistura de controle, enquanto a introdução de mutação dupla K439E-P329R em IgG1-HLA-DR-huL243-E430G reduziu a capacidade para induzir CDC até aproximadamente 8,5% da potência da mistura de controle. Pela mistura IgG1-HLA-DR-huL243-E430G-K439E-P329R e IgG1-CAMPATH-1H-E430G-S440K, a capacidade para induzir CDC foi restaurada até aproximadamente 38% da potência da mistura de controle. A eficácia de agente único da CDC de IgG1-HLA-DR-huL243-E430G foi anulada pela introdução da mutação dupla K439E-G236R. A restauração da eficácia da CDC pôde ser atingida pela mistura IgG1-HLA-DR-huL243-E430G-K439E-G236R com IgG1-CAMPATH-1H-E430G-S440K até aproximadamente 75% da potência da mistura de controle, mas não com a variante de anticorpo sem ligação alvo IgG1-b12-E430G-S440K.

[00661] Resultados comparáveis foram observados quando testando-se variantes de anticorpo anti-HLA-DR IgG1-HLA-DR-1D09C3 ao invés de IgG1-HLA-DR-huL243 (Figura 33B). Uma mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G e IgG1-HLA-DR-1D09C3-E430G induziu CDC eficiente de células de Oci-Ly17 (mistura de controle positivo; ajustada a 100%, Figura 33B). Os

agentes únicos da última mistura induziram CDC até aproximadamente 70% (IgG1-CAMPATH-1H-E430G) e 95% (IgG1-HLA-DR-1D09C3-E430G) da potência da mistura de controle. A introdução da mutação S440K em IgG1-CAMPATH-1H-E430G reduziu a capacidade para induzir CDC até aproximadamente 20% da potência da mistura de controle, enquanto a introdução de mutação dupla K439E-P329R em IgG1-HLA-DR-1D09C3-E430G reduziu a capacidade para induzir CDC até aproximadamente 7% da potência da mistura de controle. Pela mistura IgG1-HLA-DR-huL243-E430G-K439E-P329R e IgG1-CAMPATH-1H-E430G-S440K, a capacidade para induzir CDC foi restaurada até aproximadamente 35% do nível induzido pela potência da mistura de controle. A eficácia de agente único da CDC de IgG1-HLA-DR-1D09C3-E430G foi anulada pela introdução da mutação dupla K439E-G236R. A restauração da eficácia da CDC pôde ser atingida pela mistura IgG1-HLA-DR-1D09C3-E430G-K439E-G236R com IgG1-CAMPATH-1H-E430G-S440K até aproximadamente 50% da potência da mistura de controle, mas não com a variante de anticorpo sem ligação alvo IgG1-b12-E430G-S440K.

[00662] Em conclusão, estes dados mostram que a CDC seletiva, codependente de células de linfoma Oci-Ly17 seria induzida pela mistura de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 com variantes de anticorpo de IgG1-HLA-DR-huL243 anti-HLA-DR ou IgG1-HLA-DR-1D09C3 pela introdução de mutação realçadora da interação de Fc-Fc E430G, mutações inibidoras da auto-oligomerização K439E ou S440K e mutações inibidoras da ligação de C1q P329R ou G236R.

Exemplo 36: Seletividade de variantes de anticorpo contendo mutações nas posições L234 e L235 que suprimem a ligação de FcγR e ligação de C1q

[00663] Nos Exemplos 5 e 12, o efeito sobre a eficácia da CDC na introdução de mutações que modulam a ligação de C1q nas variantes de

anticorpo foi descrito. A introdução das mutações G236R e G237Q em IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E resultou na anulação da atividade de agente único da CDC nas células Wien 133. Aqui, os efeitos sobre a eficácia da CDC nas células Wien 133 foram estudados para as variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E e IgG1-11B8-E430G-S440K na introdução de mutações moduladoras da ligação de C1q nas posições L234 e L235.

[00664] Mutações diferentes foram introduzidas nos anticorpos IgG1-CAMPATH-1H e IgG1-11B8: E430G, que induzem interações Fc-Fc realçadas; cada uma das mutações inibidoras da auto-oligomerização K439E ou S440K; e L234A, L234A-L235A, L234F, L234F-L235E, L235A, L235Q, G236R ou G237Q que suprimem a ligação de C1q ao complexo de anticorpo hetero-hexamérico. Como controles, os anticorpos únicos também foram misturados 1:1 com anticorpos de controle do isótipo IgG1-b12 sem ligação para permitir comparação direta das concentrações de componentes individuais e misturas compostas dos mesmos. Aqui, sobrenadantes não purificados de sobrenadantes de EXPI293 transitoriamente transfectados foram usados como fonte de IgG para as variantes de IgG1-CAMPATH-1H contendo substituições em L234, L235 ou combinações dos mesmos. Uma faixa de concentrações de anticorpos (faixa de 0,009 a 40,0 µg/mL de concentrações finais; diluições 3,3 vezes) foi testada em um ensaio de CDC *in vitro* nas células Wien 133 com 20% de NHS, essencialmente como descrito no Exemplo 2. A porcentagem de lise de célula foi calculada como (número de células positivas em PI / número total de células) x 100%. Os dados foram analisados usando valores de melhor ajuste de um modelo de dose-resposta agonista não linear usando concentrações transformadas em log no GraphPad PRISM e a área sob as curvas de dose-resposta de três réplicas experimentais foi calculada. Os valores relativos das áreas sob a curva (AUC) representam a normalização para lise mínima (0% com IgG1-b12) e lise máxima (100% com a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G).

[00665] O sobrenadante de EXPI293 simuladamente transfectado não induziu a lise das células Wien 133, descartando uma contribuição pelas substâncias nos sobrenadantes não purificados usados. A eficácia do agente único da CDC de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E nas células Wien 133 foi anulado completamente na introdução de cada uma das mutações L234A, L234A-L235A, L234F-L235E, L235A, L235Q, G236R ou G237Q, enquanto atividade residual baixa da CDC foi observada para a IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-L234F (Figura 34). Para todas estas variantes de anticorpo, a eficácia da CDC pôde ser parcialmente restaurada na mistura com IgG1-11B8-E430G-S440K. A eficiência da recuperação de CDC variou de aproximadamente 70% (IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R + IgG1-11B8-E430G-S440K) até aproximadamente 84% (IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-L234F + IgG1-11B8-E430G-S440K) da potência definida pela AUC da mistura de controle positivo IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G.

[00666] Em conclusão, a atividade de agente único de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E nas células Wien 133 puderam ser anuladas pela introdução de mutações inibidoras da ligação de C1q L234A, L234A-L235A, L234F, L234F-L235E, L235A e L235Q, comparável aos efeitos de introdução das mutações G236R ou G237Q. A recuperação da eficácia da CDC pôde ser atingida pela mistura destas variantes de anticorpo com IgG1-11B8-E430G-S440K. Assim, foi observado que qualquer uma das ligações de C1q inibiram as substituições testadas nos exemplos anteriores e neste exemplo puderam melhorar a seletividade dos anticorpos da presente invenção atuando codependentemente. Dentro deste grupo grande, as substituições G236K/R, G237, L234 e L235 são substituições preferidas visto que elas modulam a ligação de C1q de modo relativamente brando, enquanto simultaneamente inibem as funções efectoras mediadas por FcγR. Sem estar limitado pela teoria, isto pode tornar possível recuperar a atividade potente

dependente de oligomerização, tal como CDC, se o complexo hetero-hexamérico formado entre os dois anticorpos da presente invenção nas células ligadas por ambos anticorpos tiver avidez de ligação de C1q suficiente, exibindo seletivamente deste modo a atividade máxima nas células ligadas por ambos anticorpos.

Exemplo 37: Seletividade de variantes de anticorpo com interação alternativa das mutações realçadoras de Fc-Fc nas posições E345 e E430, além de mutações que inibem a auto-oligomerização e modulam a ligação de C1q

[00667] Nos exemplos anteriores, a interação das mutações realçadoras de Fc-Fc E345K, E345R e E430G foram introduzidas em variantes de anticorpo codependentes. Aqui, nós estudamos se a introdução de substituições alternativas nas posições E430 e E345 nas variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H e IgG1-11B8 abrigando mutações que inibissem a auto-oligomerização e modulassem a ligação de C1q resultou na indução codependente de CDC nas células Wien 133.

[00668] Mutações diferentes foram introduzidas nos anticorpos IgG1-CAMPATH-1H e IgG1-11B8. As substituições E430, E430G, E430N, E430T, E430V e E430Y foram escolhidas para representar substituições amplamente diferentes, tais como mutações pequenas, hidrofílicas, hidrofóbicas e grandes/aromáticas. Igualmente, as mutações E345A, E345K, E345Q, E345R, E345V, E345Y introduzidas em E345 foram escolhidas para representar mutações pequenas, básicas/carregadas, hidrofílicas, hidrofóbicas e grandes/aromáticas. A combinação de mutação K248E-T437R foi previamente sugerida modular a oligomerização de IgG por intermédio das interações Fc-Fc (WO2018031258). Além disso, os anticorpos contiveram as mutações inibidoras da auto-oligomerização K439E ou S440K, e/ou mutações moduladoras de C1q G236R, G237A ou E333S. Como controles, anticorpos únicos também foram misturados 1:1 com anticorpos de controle do isótipo

IgG1-b12 sem ligação para permitir comparação direta das concentrações de componentes individuais e misturas compostas dos mesmos. Aqui, os sobrenadantes não purificados de sobrenadantes de EXPI293 transitoriamente transfectadas foram usados como fonte de IgG para variantes de anticorpo que não contiveram uma substituição de E430G, E345K ou E345R. Uma faixa de concentrações de anticorpos (faixa de 0,009 a 40,0 µg/mL de concentrações finais; diluições 3,3 vezes) foi testada em um ensaio de CDC *in vitro* nas células Wien 133 com 20% de NHS, essencialmente como descrito no Exemplo 2. A porcentagem da lise de célula foi calculada como (número de células positivas em PI / número total de células) x 100%. Os dados foram analisados usando valores de melhor ajuste de um modelo de dose-resposta agonista não linear usando concentrações transformadas em log no GraphPad PRISM e a área sob as curvas de dose-resposta de duas réplicas experimentais foi calculada. A potência/eficiência da CDC apresentada como valores relativos das áreas sob a curva (AUC) representam valores normalizados por placa em relação à lise mínima (0% com IgG1-b12) e lise máxima (100% com a mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G), que foram subsequentemente calculadas em média em relação às duas réplicas experimentais independentes.

[00669] O sobrenadante de EXPI293 simuladamente transfectado não induziu a lise das células Wien 133, descartando uma contribuição pelas substâncias nos sobrenadantes não purificados usados. Como descrito nos exemplos anteriores, a introdução de mutações E430G-S440K ou E430G-S440K-G237A em IgG1-11B8 anulou a eficácia de agente único da CDC (Figura 35A), enquanto a atividade de agente único da CDC de IgG1-CAMPATH-1H pôde ser anulada pela introdução de mutações E430G-K439E-G236R. A eficácia da CDC foi restaurada pela mistura IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R com variantes de anticorpo IgG1-11B8 com as mutações E430G-S440K ou E430G-S440K-G237A até

aproximadamente 82% e 91%, respectivamente, das medidas de potência para a mistura de controle positivo IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G.

[00670] Quando cada uma das mutações E430N (resultando na SEQ ID NO: 115), E430T (resultando na SEQ ID NO: 117), E430V (resultando na SEQ ID NO: 119), E345A (resultando na SEQ ID NO: 64), E345K (resultando na SEQ ID NO: 66), E345Q (resultando na SEQ ID NO: 69), E345R (resultando na SEQ ID NO: 73) ou E345Y (resultando na SEQ ID NO: 77) foi introduzida em IgG1-CAMPATH-1H-K439E-G236R ao invés de E430G, resultados comparáveis àqueles observados para E430G foram alcançados: a atividade de agente único da CDC de variantes de IgG1-CAMPATH-1H de anticorpo abrigando qualquer uma das substituições E430 mencionadas foi em nível de fundo, enquanto a recuperação da atividade da CDC foi alcançada pela mistura das variantes de IgG1-CAMPATH-1H com IgG1-11B8-E430G-S440K ou IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A. A recuperação de eficácia da CDC pelas misturas variou de aproximadamente 78% (IgG1-CAMPATH-1H-E345Q-K439E-G236R + IgG1-11B8-E430G-S440K) até aproximadamente 92% (IgG1-CAMPATH-1H-E345R-K439E-G236R + IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A) da potência da mistura de controle. A variante de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H-E430Y-K439E-G236R (SEQ ID NO: 121) induziu aproximadamente 44% da atividade residual de agente único da CDC da potência da mistura de controle. A eficácia da CDC foi restaurada até aproximadamente 94% do nível induzido pela mistura de controle positivo misturando-se IgG1-CAMPATH-1H-E430Y-K439E-G236R com IgG1-11B8-S440K-G237A.

[00671] Na substituição da mutação E430G em IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A com cada uma das mutações E430N (resultando na SEQ ID NO: 116), E430T (resultando na SEQ ID NO: 118), E430V (resultando na SEQ ID NO: 120), E345A (resultando na SEQ ID NO: 65), E345Q

(resultando na SEQ ID NO: 70), E345V (resultando na SEQ ID NO: 76) ou E345Y (resultando na SEQ ID NO: 78), resultados comparáveis com aqueles observados para E430G foram alcançados: a atividade de agente único da CDC de variantes de anticorpo IgG1-11B8 abrigo qualquer uma das substituições E430 mencionadas foi em nível de fundo, enquanto a recuperação da atividade da CDC foi alcançada pela mistura das variantes IgG1-11B8 com IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R (Figura 35B). A recuperação de eficácia da CDC pelas misturas variou de aproximadamente 80% (IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R + IgG1-11B8-E430V-S440K-G237A) até aproximadamente 86% (IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R + IgG1-11B8-E345Q-S440K-G237A) da potência da mistura de controle. Aproximadamente 21% de atividade de agente único residual da CDC do nível induzido pela mistura de controle positivo foram observados para a variante de anticorpo IgG1-11B8-E430Y-S440K-G237A (SEQ ID NO: 122), enquanto a eficácia da CDC pôde ser restaurada até aproximadamente 91% do nível induzido pela mistura de controle positivo pela mistura de IgG1-11B8-E430Y-S440K-G237A com IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R.

[00672] Recuperação potente de eficácia da CDC também foi observada na mistura de uma variante de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H-K439E-G236R e IgG1-11B8-S440K-G237A em que uma interação idêntica de mutação moduladora de Fc-Fc foi introduzida em ambos anticorpos, selecionadas dentre as seguintes mutações: E430N, E430T, E430V, E345A, E345Q, E345V, E345Y (Figura 35C). Como mostrado na Figura 35A e B, a atividade de agente único destas variantes de anticorpo foi em níveis de fundo. A recuperação de eficácia da CDC variou de aproximadamente 70% (IgG1-CAMPATH-1H-E430V-K439E-G236R + IgG1-11B8-E430V-S440K-G237A) até aproximadamente 89% (IgG1-CAMPATH-1H-E430T-K439E-G236R + IgG1-11B8-E430T-S440-G237A) do nível induzido pela mistura de

controle positivo. A recuperação mais alta de eficácia da CDC foi alcançada por uma mistura das variantes de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H-K439E-G236R e IgG1-11B8-S440K-G237A em que a mutação E430Y foi introduzida (aproximadamente 97% do nível induzido pela mistura de controle positivo), enquanto ambas as variantes de anticorpo induziram atividade de agente único residual da CDC, como descrito acima.

[00673] A introdução da mutação dupla K248E-T437R nas variantes de anticorpo foi descrita promover interações Fc-Fc. Como mostrado na Figura 35D, a introdução de mutações S440K-G237A em IgG1-11B8-K248E-T437R (resultando na SEQ ID NO: 131) anulou a eficácia de agente único da CDC nas células Wien 133. Uma inibição parcial de atividade de agente único da CDC foi observada na introdução de mutações S440K-E333S em IgG1-11B8-K248E-T437R (resultando na SEQ ID NO: 130). A recuperação potente de eficácia da CDC foi observada quando misturando IgG1-11B8-K248E-T437R-S440K-G237A com IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R até aproximadamente 87% da potência da mistura de controle. Além disso, a introdução de mutações K248E-T437R em uma variante de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H que também abriga as mutações K439E-G236R (resultando na SEQ ID NO: 128) resultou em uma variante de anticorpo carecendo de qualquer atividade de agente único da CDC. A eficácia da CDC pôde ser potentemente restaurado pela mistura IgG1-CAMPATH-1H-K248E-T437R-K439E-G236R com cada uma das variantes de anticorpo IgG1-11B8 abrigando as mutações E430G-S440K-G237A, K248E-T437R-S440K-G237A ou K248E-T437R-S440K-E333S, até aproximadamente 87%, 84% e 97% da potência da mistura de controle, respectivamente. Igualmente, a introdução de mutações K248E-T437R em uma variante de anticorpo IgG1-CAMPATH-1H que também abriga as mutações K439E-G237Q (resultando na SEQ ID NO: 129) resultou em uma variante de anticorpo carecendo de qualquer atividade de agente único da CDC. A recuperação da eficácia da

CDC pôde ser alcançada pela mistura IgG1-CAMPATH-1H-K248E-T437R-K439E-G237Q com variantes de anticorpo IgG1-11B8 abrigando as mutações K248E-T437R-S440K-G237A ou K248E-T437R-S440K-E333S até aproximadamente 86% e 98% da potência da mistura de controle, respectivamente.

[00674] Em conclusão, a eficácia codependente seletiva da CDC nas células Wien 133 puderam ser alcançadas pela mistura de IgG1-CAMPATH-1H e variantes de anticorpo IgG1-11B8 abrigando diferentes mutações moduladoras da interação de Fc-Fc incluindo todas as substituições E430 testadas (E430G, E430N, E430T, E430V, E430Y), todas as substituições E345 (E345A, E345K, E345Q, E345R, E345V, E345Y) e K248E-T437R testadas, além de mutações que inibem a auto-oligomerização e modulam a ligação de C1q. Além disso, a atividade codependente foi observada quando os anticorpos misturados contiveram interação não idêntica das mutações realçadoras de Fc-Fc.

[00675] Assim, pode ser esperado que qualquer substituição E430 ou qualquer E345 possa ser aplicada nos anticorpos da invenção atuando codependentemente, contanto que eles também contenham uma mutação inibidora da auto-oligomerização K439E ou S440K e contanto que um anticorpo também contenha uma mutação moduladora da ligação de C1q, exemplificada por G236R, G237Q ou G237A. As substituições realçadoras da interação de Fc-Fc E430Y e E430F podem ser substituições menos preferidas para os anticorpos da presente invenção, devido à sua atividade residual de agente único.

Exemplo 38: Seletividade da atividade da CDC nas células de linfoma Raji pelas misturas consistindo em uma variante de anticorpo abrigando as mutações E430G-S440K e uma mutação inibidora da ligação de C1q e uma variante de anticorpo abrigando as mutações E430G-K439E e uma mutação realçadora da ligação de C1q

[00676] Nos exemplos anteriores, a capacidade para induzir CDC foi medida para misturas codependentes contendo duas variantes de anticorpo das quais uma foi uma variante de anticorpo abrigando uma mutação realçadora da interação de Fc-Fc e mutação inibidora da auto-oligomerização K439E em combinação com uma mutação inibidora da ligação de C1q e a outra foi uma variante de anticorpo abrigando uma mutação realçadora da interação de Fc-Fc e mutação inibidora da auto-oligomerização S440K, opcionalmente em combinação com uma mutação realçadora da ligação de C1q. Aqui, nós estamos se a indução de CDC codependente seletiva nas células Raji também seria inversamente induzida, isto é pela mistura de variantes de anticorpo IgG1-CD37-37-3-E430G-K439E abrigando uma ligação de C1q brandamente inibindo ou realçando a mutação com variantes de anticorpo IgG1-11B8-E430G-S440K abrigando um mutação inibidora da ligação de C1q.

[00677] Mutações diferentes foram introduzidas nos anticorpos IgG1-CD37-37-3 e IgG1-11B8: E430G, que induz interações Fc-Fc realçadas; cada uma das mutações inibidoras da auto-oligomerização K439E ou S440K, G236R, G237A, G237Q, que suprimem a ligação de C1q para o complexo de anticorpo hetero-hexamérico; E333S, que realça a ligação de C1q para o complexo de anticorpo hetero-hexamérico. Como controles, anticorpos únicos também foram misturados 1:1 com anticorpos de controle do isótipo IgG1-b12 sem ligação para permitir comparação direta das concentrações de componentes individuais e misturas compostas dos mesmos. Aqui, também sobrenadantes não purificados de sobrenadantes EXPI293 transitoriamente transfectadas foram usadas como fonte de IgG. Uma faixa de concentrações de anticorpos purificados (faixa de 0,009 a 40,0 µg/mL de concentrações finais; diluições 3,3 vezes) foi testada em um ensaio de CDC *in vitro* nas células Raji com 20% de NHS, essencialmente como descrito no Exemplo 2. A porcentagem da lise de célula foi calculada como (número de células positivas em PI / número total de células) x 100%. os dados foram analisados

usando valores de melhor ajuste de um ajuste de dose-resposta não linear usando concentrações transformadas em log em GraphPad PRISM e a área sob as curvas de dose-resposta de três réplicas experimentais foi calculada. A eficácia da CDC apresentada como valores relativos das áreas sob a curva (AUC) representam valores normalizados por placa em relação à lise mínima (0% com IgG1-b12) e lise máxima (100% para a mistura de IgG1-CD37-37-3-E430G + IgG1-11B8-E430G), que foram subsequentemente calculadas em média em relação a duas réplicas experimentais independentes. Uma mistura de controles positivos de IgG1-CD37-37-3-E430G e IgG1-11B8-E430G induziu CDC eficiente nas células Raji (Figura 36A). A atividade de agente único de variantes de anticorpo de IgG1-11B8-E430G pôde ser fortemente suprimida pela introdução da mutação K439E, que não foi afetada adicionalmente pela introdução adicional das mutações inibidoras da ligação de C1q (G237A) ou realçadoras ligação de C1q (E333S). A eficácia da CDC também pôde ser fortemente suprimida pela introdução da mutação S440K, com ou sem a mutação G237A inibidora da ligação de C1q. Embora a introdução das mutações K439E-G236R em IgG1-CD37-37-3-E430G também anulou a eficácia de agente único da CDC, a eficácia da CDC pôde ser restaurada pela mistura IgG1-CD37-37-3-E430G-K439E-G236R com IgG1-11B8-E430G-S440K ou IgG1-11B8-E430G-S440K-G237A até aproximadamente 72% e 62%, respectivamente, do nível induzido pela mistura de controle positivo. Igualmente, a introdução de mutações K439E-G237A, K439E-E333S (SEQ ID NO: 82), S440K-G236R (SEQ ID NO: 104), S440K-G237A ou S440K-G237Q (SEQ ID NO: 107) em IgG1-CD37-37-3-E430G não produziu atividade de agente único, enquanto misturas destes anticorpos com variantes de anticorpo IgG1-11B8 abrigando uma mutação complementar inibidora da auto-oligomerização e cada uma das ligação de mutações inibidoras (G237A) ou realçadoras (E333S) de C1q parcialmente restaurou a eficácia da CDC (variando de aproximadamente 43% a 94% da

potência da mistura de controle). A lise máxima na concentração de 40 µg/mL induzida pelas misturas codependentes das variantes de anticorpo IgG1-CD37-37-3 e IgG1-11B8 foi forte, variando de 76% a 93% da potência da mistura de controle (Figura 36B).

[00678] Em conclusão, embora a atividade de agente único da CDC das variantes de anticorpo IgG1-C37-37-3 e IgG1-11B8 abrigando a mutação E430G pudesse ser anulada pela introdução de cada uma das mutações K439E ou S440K e cada uma das mutações moduladoras da ligação de C1q G236R, G237A, G237Q, E333S, as misturas de tais variantes de anticorpo restauraram a eficácia da CDC independente de qual combinação de mutação inibidora da auto-oligomerização e mutações inibidoras ou realçadoras da ligação de C1q foi introduzida em cada um dos dois anticorpos.

Exemplo 39: Citotoxicidade seletiva dependente de complemento de células CLL de paciente pelas combinações codependentes de variantes de anticorpo anti-CD52 e anti-CD20 abrigando mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e modulem a ligação de C1q

[00679] Nos exemplos anteriores, a eficácia da CDC de combinações de variantes de anticorpo foi testada usando linhagens de célula de tumor cultivadas *in vitro*. Aqui, a indução seletiva codependente de CDC foi estudada usando células de tumor de pacientes com leucemia linfática crônica (CLL) pela mistura das variantes de anticorpo IgG1-11B8 anti-CD20 e IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52 que abrigam a mutação realçadora da interação de Fc-Fc E430G, cada uma das mutações inibidoras da auto-oligomerização K439E ou S440K e cada uma das mutações moduladoras da ligação de C1q G236R ou E333S. Como controles, anticorpos únicos também foram misturados 1:1 com anticorpos de controle do isótipo IgG1-b12 sem ligação para permitir comparação direta das concentrações de componentes individuais e misturas compostas dos mesmos. Uma faixa de concentrações

de anticorpos purificados (faixa de 0,003 a 10,0 µg/mL de concentrações finais; diluições 3,3 vezes) foi testada em um ensaio de CDC *in vitro* nas células de tumor derivadas de três pacientes com CLL com 20% de NHS. Células mononucleares do sangue periférico (PBMC; ConversantBio) de três pacientes com CLL foram descongeladas a 37°C, lavadas em RPMI 1640 (Life technologies) suplementadas com 10% de soro Bovino Doador com ferro (DBSI; Life Technologies, cat. no. 20371) e levadas a uma concentração de $3,33 \times 10^6$ PBMC/mL em RPMI + 0,2% de BSA. A cada poço de uma placa de 96 poços, 30 µL (correspondendo a 100.000 células/poço) foram adicionados assim como 50 µL de uma concentração 2X da série de diluição de anticorpo. Depois de 15 minutos de incubação na RT sobre um agitador, 20 µL de soro não humano foram adicionados a cada poço e incubados por 45 minutos a 37°C. As células foram depois centrifugadas e lavadas com tampão FACS (PBS + 0,1% de BSA + 0,02% de azida de sódio). Cinquenta µL de mistura de tingimento foram adicionados a cada poço e incubados por 30 minutos a 4°C. Depois de lavar as placas duas vezes usando tampão FACS, a porcentagem de células viáveis foi medida em um citômetro de fluxo Fortessa (BD).

[00680] Os níveis de expressão alvo de CD20 e CD52 foram determinados pelo procedimento citométrico de fluxo quantitativo usando um kit QIFI (DAKO; cat. nº K0078). PBMC de paciente com CLL de três pacientes foram semeadas a 100.000 células/poço em uma placa de fundo redondo de 96 poços e centrifugado até peletizar as células. Depois de descartar o sobrenadante, anticorpos primários de camundongo anti-CD20 humana (IgG1-mm-IgG1-7D8-K409R) e -CD52 (Tebu Bio; cat. nº MAB0944) ou um anticorpo de controle de isótipo foram adicionados a cada poço e incubados por 30 a 45 minutos a 4°C. Em poços separados, 50 µL de Grânulos de Configuração e Calibração providos no kit foram adicionados. Depois de centrifugar as células e descartar o sobrenadante, as células foram

lavadas duas vezes em tampão FACS. Depois, as células foram recolocadas em suspensão em 50 µL/poço de conjugado de IgG anticamundongo de cabra secundário-FITC (DAKO; cat. nº F0479) e incubadas por 30 a 45 minutos a 4°C no escuro. As células foram lavadas duas vezes e eventualmente recolocadas em suspensão em tampão FACS para análise em um citômetro de fluxo Fortessa. A quantidade de antígeno foi determinada calculando-se a capacidade de ligação do anticorpo com base na curva de calibração, de acordo com o as diretrizes do fabricante.

[00681] A eficácia mais forte da CDC nas amostras de todos os três pacientes com CLL foi induzida por uma mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G e IgG1-11B8-E430G (Figura 37A-C). A atividade de agente único da CDC de IgG1-CAMPATH-1H-E430G foi próxima ao (pacientes 1, 2) ou comparável (paciente 3) ao nível induzido pela mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G + IgG1-11B8-E430G. A capacidade para induzir CDC pela IgG1-11B8-E430G como um agente único variou por paciente, variando de nenhuma atividade da CDC (paciente 3) e eficácia intermediária (paciente 1) até eficiência de CDC próxima ao nível induzido pelo agente único IgG1-CAMPATH-1H-E430G (paciente 2). A atividade de agente único das variantes de anticorpo IgG1-11B8 correlacionou-se com os níveis de expressão de CD20 das amostras diferentes (paciente 1: 48E+03; paciente 2: 172E+03; paciente 3: 39E+03). A atividade de agente único foi anulada completamente na introdução das mutações K439E-G236R em IgG1-CAMPATH-1H-E430G e mutações S440K ou S440K-E333S em IgG1-11B8-E430G. Entretanto, a eficácia da CDC pôde ser restaurada pela mistura IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R com IgG1-11B8-E430G-S440K ou IgG1-11B8-E430G-S440K-E333S. O grau de restauração da eficácia da CDC variou por amostra de paciente.

[00682] Em conclusão, as misturas de variantes de anticorpo anti-CD20 e anti-CD52 abrigando mutações E430G, K439E ou S440K e G236R

ou E333S puderam induzir CDC nas amostras CLL de paciente em uma maneira codependente.

Exemplo 40: Depleção seletiva de populações de célula T dentro das amostras de célula mononuclear de sangue periférico

[00683] A geração de misturas de anticorpo codependente permite o esgotamento seletivo de subconjuntos hematológicos específicos de amostras de sangue integral, como foi demonstrado no Exemplo 20 para as células B, enquanto deixa as células T intocadas. Aqui, nos testamos se as misturas de variantes de anticorpo codependentes abrigando uma mutação realçadora da interação de Fc-Fc, uma mutação inibidora da auto-oligomerização e mutação moduladora da ligação de C1q seletivamente esgotariam as células T de amostras de sangue integral, enquanto deixa a fração de célula B intocada.

[00684] Amostras de trinta μL de sangue integral derivadas de quatro doadores humanos saudáveis (UMC Utrecht), preservadas com hirudina para impedir a coagulação, foram aliquotadas em uma placa de fundo redondo de 96 poços (Greiner Bio-A; Cat # 650101) e suplementada com 50 μL de RPMI + 0/2% de BSA (Lonza; Cat # BE12-115F/U1). A cada poço, 20 μL foram adicionados de uma mistura de duas variantes de anticorpo (concentração final 10 $\mu\text{g/mL}$) dos anticorpos IgG1-CAMPATH-1H, IgG1-huCLB-T3/4 e IgG1-CD5-INSERM com as seguintes mutações: E430G, que induz interações Fc-Fc realçadas; cada uma das mutações inibidoras da auto-oligomerização K439E ou S440K; e as mutações moduladoras de C1q G236R, G237A ou K326A. Como controles, anticorpos únicos foram misturados 1:1 com variantes de anticorpo de controle de isótipo sem ligação IgG1-b12 abrigando as mutações E430G, K439E, S440K, G236R ou G237A para permitir comparação direta das concentrações de componentes individuais e misturas compostas dos mesmos. Depois de uma incubação durante a noite a 37°C e 5% de CO_2 , as placas foram centrifugadas e as células foram lavadas uma vez com 150 μL de PBS (B. Braun; Cat #

A220/12257874/1110). Em seguida, as células foram recolocadas em suspensão em 80 uL de corante de viabilidade reativo em amina (Invitrogen; Cat # A10346A), 1:1000 diluído em PBS e incubado no escuro por 30 minutos a 4°C. As células foram depois centrifugadas e a pelota foi recolocada em suspensão em 80 µL de uma mistura de anticorpos fluorescentemente rotulados direcionados contra CD3 (eBioscience; Cat # 48-0037), CD4 (eBioscience; Cat # 47-0048), CD8 (BioLegend; Cat # 301028), CD19 (BioLegend, Cat # 302245), CD45 (BioLegend; Cat # 368505), CD56 (BD; Cat # 564849) e CD66b (BioLegend; Cat # 305115), além de cortante de Viabilidade Fixável 510 (FVS510, BD; Cat # 564406). As células foram incubadas por 30 minutos a 4°C no escuro e subsequentemente centrifugadas antes que as células sanguíneas vermelhas fossem lisadas usando tampão de lise RBC frio. As células foram lavadas e recolhidas em tampão FACS (PBS + 0,1% de BSA + 0,02% de NaN₃) antes de serem analisadas em amostras de volume fixo de 75 µL em um citômetro de fluxo (BD Fortessa). A fração de células B, células T CD4+ e células T CD8+ foi calculada usando a seguinte fórmula: Fração recuperada (pop alvo, %) = 100% * (contagem de célula alvo (amostra) / contagem de célula alvo (controle sem Ab)) * (contagem de granulócito (controle sem Ab)/ contagem de granulócito (amostra). Aqui, nós medimos a recuperação relativa de células alvejadas pela comparação com a contagem de célula nas amostras de controle incubadas sem anticorpos indutores de lise, corrigidos para a variação interamostra induzida pelo método usando a população de granulócito como um controle interno, porque o mesmo não é alvejado pelos anticorpos indutores de lise.

[00685] Variantes de anticorpo anti-CD52 IgG1-CAMPATH-1H e anticorpo anti-CD3 IgG1-huCLB-T3/4 foram usadas para seletivamente esgotar células T de amostras de sangue integrais sem afetar as células B. Quando aplicado como um agente único, IgG1-CAMPATH-1H-E430G fortemente esgotou as células B, células T CD4+ e células T CD8+ enquanto

o agente único IgG1-huCLB-T3/4-E430G parcialmente esgotou as células T CD4+ (Figura 38A, B, C). Nenhum esgotamento de subconjuntos linfocíticos foi observado por uma mistura de variantes de anticorpo sem ligação alvo IgG1-b12-E430G-K439E-G236R e IgG1-b12-E430G-S440K-G237A. Também, nenhum esgotamento foi observado quando cada uma das últimas variantes de anticorpo foi misturada com IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R ou IgG1-huCLB-T3/4-E430G-S440K-K326A complementar. Ao contrário, uma mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R e IgG1-huCLB-T3/4-E430G-S440K-K326A fortemente esgotou as células T CD4+ e a um grau menor as células T CD8+ em maneira codependente, sem afetar a célula B contada nestas amostras.

[00686] Além disso, as variantes de anticorpo anti-CD52 IgG1-CAMPATH-1H e anticorpo anti-CD5 IgG1-CD5-INSERM foram usadas para seletivamente esgotar as células T de amostras de sangue integral sem afetar as células B. Mais uma vez, a depleção forte de células B, células T CD4+ e células T CD8+ foi induzida pelo agente único IgG1-CAMPATH-1H-E430G, enquanto o agente único IgG1-CD5-INSERM-E430G não esgotou nenhuma das populações linfocíticas analisadas (Figura 38D, E, F). Nenhuma depleção de subconjuntos linfocíticos foi observada por uma mistura de variantes de anticorpo sem ligação alvo IgG1-b12-E430G-K439E-G236R e IgG1-b12-E430G-S440K-G237A. Também, nenhuma depleção foi observada quando cada uma das últimas variantes de anticorpo foi misturada com IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R ou IgG1-CD5-INSERM-E430G-S440K-K326A complementar. Ao contrário, uma mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-G236R e IgG1-CD5-INSERM-E430G-S440K-K326A fortemente e seletivamente esgotou as células T CD4+, mas não as células B, em maneira codependente. Os efeitos sobre as células T CD8+ pela mistura de IgG1-CAMPATH-1H-E430G-K439E-K326A e IgG1-CD5-INSERM-E430G-S440K-G237A variou por doador.

[00687] Em conclusão, misturas de variantes de anticorpo de IgG1-CAMPATH-1H anti-CD52, IgG1-huCLB-T3/4 e IgG1-CD5-INSERM abrigando mutação realçadora da interação de Fc-Fc E430G, mutações inibidoras da auto-oligomerização K439E ou S440K e mutações moduladoras da ligação de C1q G236R ou G237A puderam ser aplicadas para seletivamente e codependentemente esgotar populações de célula T a partir de amostras de sangue integral de doador saudável enquanto deixa a população de célula B ilesa.

[00688] Em combinação com os resultados no Exemplo 20, isto demonstra que as combinações de anticorpo contendo domínios Fc abrigando as mutações divulgadas na presente invenção podem ser usadas para esgotar seletivamente subconjuntos hematológicos diferentes além das células B, células T CD8+ ou células T CD4+, usando combinações alvos das quais a coexpressão é uma marca seletiva do subconjunto hematológico alvejado.

Exemplo 41: Indução codependente da morte celular programada pelas misturas de variantes anti-DR4 e anti-DR5 de anticorpo abrigando mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e modulem a ligação de C1q

[00689] Um ensaio de viabilidade foi realizado para estudar se as misturas de variantes de anticorpo anti-DR4 e anti-DR5 abrigando mutações que realcem as interações Fc-Fc, inibam a auto-oligomerização e modulem a ligação de C1q podem codependentemente induzir a morte celular programada (PCD) de células de câncer pancreático humano BxPC-3 e células cancerosas colônicas COLO 205.

[00690] Mutações diferentes foram introduzidas no anticorpo anti-DR4 IgG1-DR4-chCTB007 e anticorpo anti-DR5 IgG1-DR5-01: E430G, que induz interações Fc-Fc realçadas; cada uma das mutações inibidoras da auto-oligomerização K439E ou S440K; mutações moduladoras da ligação de C1q G237T, K326W ou E333S, que suprimem (G237T) ou realçam (K326W,

E333S) a ligação de C1q. Como controles, anticorpos únicos também foram misturados 1:1 com variantes de anticorpos de controle do isótipo IgG1-b12 sem ligação abrigoando as mutações E430G-K439E ou E430G-S440K para permitir comparação direta das concentrações de componentes individuais e misturas compostas dos mesmos. O ensaio de viabilidade foi realizado essencialmente como descrito no Exemplo 14. Em resumo, 90 µL de suspensões de célula única (5.000 células por poço) foram semeadas em placas de poliestireno com 96 poços de fundo chato (Greiner Bio-A, Cat nº 655182) e incubadas durante a noite a 37°C. Uma série de diluições seriadas de misturas de 20 µL de anticorpo (faixa de 0,0003 a 20 µg/mL de concentrações finais em diluições de 5 vezes) e 10 µL de C1q (Quidel; concentração final 2,5 µg/mL) foi adicionada e incubada por 3 dias a 37°C. Como um controle negativo e positivo na indução de morte celular, as células foram incubadas sem anticorpo ou com 5 µM de estaurosporina, respectivamente. A viabilidade das células cultivadas foi determinada em um ensaio de viabilidade celular por luminescência CellTiter-Glo como descrito no Exemplo 14. Os dados foram analisados e plotados usando regressão não linear (dose-resposta sigmoidal com inclinação variável) usando o software GraphPad Prism. A porcentagem de células viáveis foi calculada usando a seguinte fórmula: % de células viáveis = [(luminescência na amostra de anticorpo - luminescência na amostra de estaurosporina)/(luminescência na amostra de anticorpo - luminescência na amostra de estaurosporina)]*100.

[00691] Nenhuma morte celular programada foi observada nas células BxPC-3 ou COLO 205 pelo IgG1-DR5-01-E430G-K439E-G237T quando aplicado como um agente único (Figura 39A, B). O IgG1-DR4-chCTB007-E430G-S440K-K326W-E333S não induz a morte celular programada quando aplicado como um agente único, como refletido pelos aproximadamente 67% e 60% de células viáveis deixadas nos ensaios de BxPC-3 e COLO 205, respectivamente, nas concentrações mais altas usadas. A capacidade de IgG1-

DR4-chCTB007-E430G-S440K-K326W-E333S para induzir a morte celular programada pôde ser realçada pela mistura do mesmo com IgG1-DR5-01-E430G-K439E-G237T, um efeito que foi observada usando ambas as linhagens de célula.

[00692] Conjuntamente, a ativação codependente de morte celular programada nas células cancerosas BxPC-3 e COLO 205 pôde ser alcançada pelas misturas de variantes de anticorpo anti-DR4 e -DR5 abrigando mutações que realçam as interações Fc-Fc, inibem a auto-oligomerização e inibem (G237T) ou realçam (K326W-E333S) a ligação de C1q.

REIVINDICAÇÕES

1. Primeiro anticorpo compreendendo uma primeira região Fc de uma IgG humana e uma primeira região de ligação de antígeno capaz de ligar a um primeiro antígeno, caracterizado pelo fato de ser para o uso como um medicamento em combinação com um segundo anticorpo compreendendo uma segunda região Fc de uma IgG humana e uma segunda região de ligação de antígeno capaz de ligar a um segundo antígeno, em que a dita primeira região Fc compreende

a. uma substituição de um aminoácido em uma posição selecionada a partir do grupo consistindo em: E430, E345 e S440, com a condição de que a substituição em S440 seja S440Y ou S440W, e

b. uma substituição K439E ou S440K, com a condição de que a substituição não seja S440K se a substituição em (a) for S440Y ou S440W, e

c. uma substituição do aminoácido na posição G237 ou uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: G236R, G236K, K322A, E269K, L234A, L234F, L235A, L235Q e L235E;

e a dita segunda região Fc compreende

d. uma substituição de um aminoácido em uma posição selecionada a partir do grupo consistindo em: E430, E345 e S440, com a condição de que a substituição em S440 seja S440Y ou S440W e

e. uma substituição K439E ou S440K, com a condição de que a substituição não seja S440K se a substituição em (d) for S440Y ou S440W,

em que a primeira região Fc tem uma substituição K439E e a segunda região Fc tem uma substituição S440K ou a primeira região Fc tem uma substituição S440K e a segunda região Fc tem uma substituição K439E; em que as posições de aminoácido correspondem à IgG1 humana de acordo com o sistema de numeração EU.

2. Primeiro anticorpo compreendendo uma primeira região Fc

de uma IgG humana e uma primeira região de ligação de antígeno capaz de ligar a um primeiro antígeno, caracterizado pelo fato de para o uso como um medicamento em combinação com um segundo anticorpo compreendendo uma segunda região Fc de uma IgG humana e uma segunda região de ligação de antígeno capaz de ligar a um segundo antígeno, em que a dita primeira região Fc compreende

a. uma substituição de um aminoácido em uma posição selecionada a partir do grupo consistindo em: E430, E345 e S440, com a condição de que a substituição em S440 seja S440Y ou S440W, e

b. uma substituição K439E ou S440K, com a condição de que a substituição não seja S440K se a substituição em (a) for S440Y ou S440W, e

c. uma substituição do aminoácido na posição P329 ou uma substituição K322E;

e a dita segunda região Fc compreende

d. uma substituição de um aminoácido em uma posição selecionada a partir do grupo consistindo em: E430, E345 e S440, com a condição de que a substituição em S440 seja S440Y ou S440W e

e. uma substituição K439E ou S440K, com a condição de que a substituição não seja S440K se a substituição em (d) for S440Y ou S440W e

f. uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: K326A, K326W, E333A e E333S;

em que a primeira região Fc tem uma substituição K439E e a segunda região Fc tem uma substituição S440K ou a primeira região Fc tem uma substituição S440K e a segunda região Fc tem uma substituição K439E; em que as posições de aminoácido correspondem à IgG1 humana de acordo com o sistema de numeração EU.

3. Primeiro anticorpo compreendendo uma primeira região Fc de uma IgG humana e uma primeira região de ligação de antígeno capaz de

ligar a um primeiro antígeno, caracterizado pelo fato de ser para o uso como um medicamento em combinação com um segundo anticorpo compreendendo uma segunda região Fc de uma IgG humana e uma segunda região de ligação de antígeno capaz de ligar a um segundo antígeno, em que a dita primeira região Fc compreende

- a. uma substituição K248E e uma T437R, e
- b. uma substituição K439E ou S440K, e
- c. uma substituição do aminoácido na posição G237 ou P329, ou uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: G236R, G236K, K322A, K332E, E269K, L234A, L234F, L235A, L235Q e L235E;

e a dita segunda região Fc compreende

- d. uma substituição K248E e uma T437R e
- e. substituição K439E ou S440K,

em que a primeira região Fc tem uma substituição K439E e a segunda região Fc tem uma substituição S440K ou a primeira região Fc tem uma substituição S440K e a segunda região Fc tem uma substituição K439E; em que as posições de aminoácido correspondem à IgG1 humana de acordo com o sistema de numeração EU.

4. Primeiro anticorpo, caracterizado pelo fato de ser para o uso como um medicamento em combinação com um segundo anticorpo como definido na reivindicação 1 ou 2, em que a primeira Fc e a segunda região Fc compreendem uma substituição selecionada a partir do grupo consistindo em: E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440W e S440Y.

5. Primeiro anticorpo, caracterizado pelo fato de ser para o uso como um medicamento em combinação com um segundo anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, 4, em que a primeira e segunda regiões Fc compreendem uma substituição selecionada a partir do

grupo consistindo em: E430G, E345K e E345R.

6. Primeiro anticorpo, caracterizado pelo fato de ser para o uso como um medicamento em combinação com um segundo anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, 4 ou 5, em que a primeira e segunda regiões Fc compreendem uma substituição E430G.

7. Primeiro anticorpo, caracterizado pelo fato de ser para o uso como um medicamento em combinação com um segundo anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1, 3 a 6, em que a primeira região Fc compreende uma substituição selecionada a partir do grupo consistindo em: G237A, G237T, G237Q, G237R, G237S, G237N, G237D, G237E, G237K, G237V, G237M, G237I, G237L, G237H, G237F, G237Y, G237W, G237P.

8. Primeiro anticorpo, caracterizado pelo fato de ser para o uso como um medicamento em combinação com um segundo anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1, 3 a 7, em que a primeira região Fc compreende uma substituição selecionada a partir do grupo consistindo em: G237A, G237T, G237S, G237Q, G237R.

9. Primeiro anticorpo, caracterizado pelo fato de ser para o uso como um medicamento em combinação com um segundo anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1, 3 a 8, em que a primeira região Fc compreende uma substituição G237Q.

10. Primeiro anticorpo, caracterizado pelo fato de ser para o uso como um medicamento em combinação com um segundo anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1, 3 a 6 em que a primeira região Fc compreende uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: G236R e E269K.

11. Primeiro anticorpo, caracterizado pelo fato de ser para o uso como um medicamento em combinação com um segundo anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1, 3 a 6, 10, em que a primeira

região Fc compreende uma substituição G236R.

12. Primeiro anticorpo, caracterizado pelo fato de ser para o uso como um medicamento em combinação com um segundo anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1, 3 a 6, 10, em que a primeira região Fc compreende uma substituição E269K.

13. Primeiro anticorpo, caracterizado pelo fato de ser para o uso como um medicamento em combinação com um segundo anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1, 3 a 6, em que a primeira região Fc compreende uma substituição K322A.

14. Primeiro anticorpo, caracterizado pelo fato de ser para o uso como um medicamento em combinação com um segundo anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 2 a 6, em que a primeira região Fc compreende uma substituição P329R.

15. Primeiro anticorpo, caracterizado pelo fato de ser para o uso como um medicamento em combinação com um segundo anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 2 a 6, em que a primeira região Fc compreende uma substituição K322E.

16. Primeiro anticorpo, caracterizado pelo fato de ser para o uso como um medicamento em combinação com um segundo anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1, 3 a 13, em que a segunda região Fc compreende uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: G237A, K326A, K326W, E333A e E333S.

17. Primeiro anticorpo, caracterizado pelo fato de ser para o uso como um medicamento em combinação com um segundo anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1, 3 a 13, 16, em que a segunda região Fc compreende uma substituição G237A.

18. Primeiro anticorpo, caracterizado pelo fato de ser para o uso como um medicamento em combinação com um segundo anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 15, em que a segunda região

Fc compreende uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: K326A, K326W, E333A e E333S.

19. Primeiro anticorpo, caracterizado pelo fato de ser para o uso como um medicamento em combinação com um segundo anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 15, 18, em que a segunda região Fc compreende uma substituição selecionada a partir do grupo consistindo em: K326A, K326W, E333A e E333S.

20. Primeiro anticorpo, caracterizado pelo fato de ser para o uso como um medicamento em combinação com um segundo anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1, 3 a 13, 16 ou 17, em que a segunda região Fc compreende uma substituição G237A e uma E333S.

21. Primeiro anticorpo, caracterizado pelo fato de ser para o uso como um medicamento em combinação com um segundo anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 19, em que a segunda região Fc compreende uma substituição K326A.

22. Primeiro anticorpo, caracterizado pelo fato de ser para o uso como um medicamento em combinação com um segundo anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 19, em que a segunda região Fc compreende uma substituição E333S.

23. Primeiro anticorpo, caracterizado pelo fato de ser para o uso como um medicamento em combinação com um segundo anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 16, 18, em que a segunda região Fc compreende duas substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: K326A, K326W, E333A e E333S.

24. Primeiro anticorpo, caracterizado pelo fato de ser para o uso como um medicamento em combinação com um segundo anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 16, 18, 23, em que a segunda região Fc compreende uma substituição K326W e uma E333S.

25. Primeiro anticorpo, caracterizado pelo fato de ser para o

uso como um medicamento em combinação com um segundo anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 16, 18, 23, em que a segunda região Fc compreende uma substituição K326A e uma E333A.

26. Primeiro anticorpo, caracterizado pelo fato de ser para o uso como um medicamento em combinação com um segundo anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o primeiro e/ou segundo anticorpos são humanos, humanizados ou quiméricos.

27. Primeiro anticorpo, caracterizado pelo fato de ser para o uso como um medicamento em combinação com um segundo anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o primeiro e/ou segundo anticorpos é um anticorpo monoclonal.

28. Primeiro anticorpo, caracterizado pelo fato de ser para o uso como um medicamento em combinação com um segundo anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o primeiro e/ou segundo anticorpos é um isótipo da IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4 humanas.

29. Primeiro anticorpo, caracterizado pelo fato de ser para o uso como um medicamento em combinação com um segundo anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o primeiro e/ou segundo anticorpos é um isótipo da IgG1 humana.

30. Primeiro anticorpo, caracterizado pelo fato de ser para o uso como um medicamento em combinação com um segundo anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o primeiro e segundo antígenos são ambos moléculas expostas na superfície celular.

31. Primeiro anticorpo, caracterizado pelo fato de ser para o uso como um medicamento em combinação com um segundo anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o primeiro e segundo antígenos estão colocalizados em células ou tecidos que são células alvo ou tecidos alvo para a doença ou distúrbio a serem tratados.

32. Primeiro anticorpo, caracterizado pelo fato de ser para o

uso como um medicamento em combinação com um segundo anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o primeiro e segundo antígenos não são idênticos.

33. Primeiro anticorpo, caracterizado pelo fato de ser para o uso como um medicamento em combinação com um segundo anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o medicamento esgota uma população de célula expressando o primeiro e segundo antígenos.

34. Primeiro anticorpo, caracterizado pelo fato de ser para o uso como um medicamento em combinação com um segundo anticorpo como definido na reivindicação 33, em que a população de célula é uma célula de tumor.

35. Primeiro anticorpo, caracterizado pelo fato de ser para o uso como um medicamento em combinação com um segundo anticorpo como definido na reivindicação 33 ou 34 em que a população de célula é uma célula de tumor hematológico ou uma célula de tumor sólido.

36. Primeiro anticorpo, caracterizado pelo fato de ser para uso como um medicamento em combinação com um segundo anticorpo como definido na reivindicação 33 ou 34, em que a população de célula é um leucócito, linfócito, célula B, célula T, célula T reguladora, célula NK, célula supressora derivada de mielóide, população de célula de macrófago associado a tumor.

37. Anticorpo, caracterizado pelo fato de que compreende uma região Fc de uma IgG humana e uma região de ligação de antígeno capaz de ligar a um antígeno, em que a dita região Fc compreende

a. uma substituição de um aminoácido em uma posição selecionada a partir do grupo consistindo em: E430, E345 e S440, com a condição de que a substituição em S440 seja S440Y ou S440W, e

b. uma substituição K439E ou S440K, com a condição de que

a substituição não seja S440K se a substituição em (a) for S440Y ou S440W, e

c. uma substituição do aminoácido na posição G237 ou uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: G236R, G236K, K322A, E269K, L234A, L234F, L235A, L235Q e L235E.

38. Anticorpo, caracterizado pelo fato de que compreende uma região Fc de uma IgG humana e uma região de ligação de antígeno capaz de ligar a um antígeno, em que a dita região Fc compreende

a. uma substituição K248E e uma T437R, e

b. uma substituição K439E ou S440K, e

c. uma substituição de aminoácido na posição G237 ou P329, ou uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: G236R, G236K, K322A,

d. K332E, E269K, L234A, L234F, L235A, L235Q, L235E, K326A, K326W, E333A e E333S.

39. Anticorpo de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato de que a região Fc compreende uma substituição selecionada a partir do grupo consistindo em: E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440W e S440Y.

40. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 37, 39, caracterizado pelo fato de que a região Fc compreende uma substituição selecionada a partir do grupo consistindo em: E430G, E345K e E345R.

41. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 37 e 39 a 41, caracterizado pelo fato de que a região Fc compreende uma substituição E430G.

42. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 37 a 41, caracterizado pelo fato de que a região Fc compreende uma substituição selecionada a partir do grupo consistindo em: G237A, G237T,

G237Q, G237R, G237S, G237N, G237D, G237E, G237K, G237V, G237M, G237I, G237L, G237H, G237F, G237Y, G237W, G237P.

43. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 37 a 42, caracterizado pelo fato de que a região Fc compreende uma substituição selecionada a partir do grupo consistindo em: G237A, G237T, G237S, G237Q, G237R.

44. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 37 a 43, caracterizado pelo fato de que a região Fc compreende uma substituição G237Q ou G237A.

45. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 37 a 41, caracterizado pelo fato de que a região Fc compreende uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: G236R e E269K.

46. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 37 a 41, 45, caracterizado pelo fato de que a região Fc compreende uma substituição G236R.

47. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 37 a 41, 45, caracterizado pelo fato de que a região Fc compreende uma substituição E269K.

48. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 37 a 41, caracterizado pelo fato de que a região Fc compreende uma substituição K322A.

49. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 37 a 48, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um isótipo de IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4 humanas.

50. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 37 a 49, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um isótipo de IgG1 humana.

51. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende um primeiro e um segundo anticorpos em que o primeiro anticorpo

compreende uma primeira região de ligação de antígeno e uma primeira região Fc como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 15, 26 a 36 e o segundo anticorpo compreende uma segunda região de ligação de antígeno e uma segunda região Fc como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, 16 a 36.

52. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende um primeiro e um segundo anticorpos, em que o primeiro anticorpo compreende uma primeira região de ligação de antígeno capaz de ligar a um primeiro antígeno e uma primeira região Fc de uma IgG humana e o segundo anticorpo compreende uma segunda região de ligação de antígeno capaz de ligar a um segundo antígeno e uma segunda região Fc de uma IgG humana, em que a dita primeira região Fc compreende

a. uma substituição de um aminoácido em uma posição selecionada a partir do grupo consistindo em: E430, E345 e S440, com a condição de que a substituição em S440 seja S440Y ou S440W, e

b. uma substituição K439E ou S440K, com a condição de que a substituição não seja S440K se a substituição em (a) for S440Y ou S440W, e

c. uma substituição de aminoácido na posição G237 ou uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: G236R, G236K, K322A, E269K, L234A, L234F, L235A, L235Q e L235E;

e a dita segunda região Fc compreende

d. uma substituição de um aminoácido em uma posição selecionada a partir do grupo consistindo em: E430, E345 e S440, com a condição de que a substituição em S440 seja S440Y ou S440W e

e. uma substituição K439E ou S440K, com a condição de que a substituição não seja S440K se a substituição em (d) for S440Y ou S440W,

em que a primeira região Fc tem uma substituição K439E e a segunda região Fc tem uma substituição S440K ou a primeira região Fc tem

uma substituição S440K e a segunda região Fc tem uma substituição K439E, em que as posições de aminoácido correspondem à IgG1 humana de acordo com o sistema de numeração EU.

53. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende um primeiro e um segundo anticorpo, em que o primeiro anticorpo compreende uma primeira região de ligação de antígeno capaz de ligar a um primeiro antígeno e uma primeira região Fc de uma IgG humana e o segundo anticorpo compreende uma segunda região de ligação de antígeno capaz de ligar a um segundo antígeno e uma segunda região Fc de uma IgG humana, em que a dita primeira região Fc compreende

a. uma substituição de um aminoácido em uma posição selecionada a partir do grupo consistindo em: E430, E345 e S440, com a condição de que a substituição em S440 seja S440Y ou S440W, e

b. uma substituição K439E ou S440K, com a condição de que a substituição não seja S440K se a substituição em (a) for S440Y ou S440W, e

c. uma substituição do aminoácido na posição P329 ou uma substituição K322E;

e a dita segunda região Fc compreende

d. uma substituição de um aminoácido em uma posição selecionada a partir do grupo consistindo em: E430, E345 e S440, com a condição de que a substituição em S440 seja S440Y ou S440W e

e. uma substituição K439E ou S440K, com a condição de que a substituição não seja S440K se a substituição em (d) for S440Y ou S440W, e

f. uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: K326A, K326W, E333A e E333S,

em que a primeira região Fc tem uma substituição K439E e a segunda região Fc tem uma substituição S440K ou a primeira região Fc tem

uma substituição S440K e a segunda região Fc tem uma substituição K439E, em que as posições de aminoácido correspondem à IgG1 humana de acordo com o sistema de numeração EU.

54. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende um primeiro e um segundo anticorpos, em que o primeiro anticorpo compreende uma primeira região de ligação de antígeno capaz de ligar a um primeiro antígeno e uma primeira região Fc de uma IgG humana e o segundo anticorpo compreende uma segunda região de ligação de antígeno capaz de ligar a um segundo antígeno e uma segunda região Fc de uma IgG humana, em que a dita primeira região Fc compreende

- a. uma substituição K248E e uma T437R, e
- b. uma substituição K439E ou S440K, e
- c. uma substituição de aminoácido na posição G237 ou P329, ou uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: G236R, G236K, K322A, K332E, E269K, L234A, L234F, L235A, L235Q e L235E;

e a dita segunda região Fc compreende

- d. uma substituição K248E e uma T437R e
- e. uma substituição K439E ou S440K,

em que a primeira região Fc tem uma substituição K439E e a segunda região Fc tem uma substituição S440K ou a primeira região Fc tem uma substituição S440K e a segunda região Fc tem uma substituição K439E; em que as posições de aminoácido correspondem à IgG1 humana de acordo com o sistema de numeração EU.

55. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 52 a 53, caracterizada pelo fato de que a primeira e segunda regiões Fc compreendem uma substituição selecionada a partir do grupo consistindo em: E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440W e S440Y.

56. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 52 a 53, 55, caracterizada pelo fato de que a primeira e segunda regiões Fc compreendem uma substituição selecionada a partir do grupo consistindo em: E430G, E345K e E345R.

57. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 52 a 53, 55 a 56, caracterizada pelo fato de que a primeira e segunda regiões Fc compreendem uma substituição E430G.

58. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 52 a 57, caracterizada pelo fato de que a primeira região Fc compreende uma substituição selecionada a partir do grupo consistindo em: G237A, G237T, G237Q, G237R, G237S, G237N, G237D, G237E, G237K, G237V, G237M, G237I, G237L, G237H, G237F, G237Y, G237W, G237P.

59. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 52 a 58, caracterizada pelo fato de que a primeira região Fc compreende uma substituição selecionada a partir do grupo consistindo em: G237A, G237T, G237Q, G237R e G237S.

60. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 52 a 59, caracterizada pelo fato de que a primeira região Fc compreende uma substituição G237Q.

61. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 52 a 57, caracterizada pelo fato de que a primeira região Fc compreende uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: G236R e E269K.

62. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 52 a 57 e 61, caracterizada pelo fato de que a primeira região Fc compreende uma substituição G236R.

63. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 52 a 57, 61, caracterizada pelo fato de que a primeira região Fc compreende uma substituição E269K.

64. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 52, 54 a 57, caracterizada pelo fato de que a primeira região Fc compreende uma substituição K322A.

65. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 53 a 57, caracterizada pelo fato de que a primeira região Fc compreende uma substituição P329R.

66. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 53 a 57, caracterizada pelo fato de que a primeira região Fc compreende uma substituição K322E.

67. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 52, 54 a 64, caracterizada pelo fato de que a segunda região Fc compreende uma ou mais substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: G237A, K326A, K326W, E333A e E333S.

68. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 52, 54 a 64, 67, caracterizada pelo fato de que a segunda região Fc compreende uma substituição G237A.

69. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 52 a 67, caracterizada pelo fato de que a segunda região Fc compreende uma substituição selecionada a partir do grupo consistindo em: K326A, K326W, E333A e E333S.

70. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 52 a 67, 69, caracterizada pelo fato de que a segunda região Fc compreende duas substituições selecionadas a partir do grupo consistindo em: K326A, K326W, E333A e E333S.

71. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 52 a 67, 69 a 70, caracterizada pelo fato de que a segunda região Fc compreende uma substituição K326W e uma E333S.

72. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 52 a 67, 69 a 70, caracterizada pelo fato de que a segunda

região Fc compreende uma substituição K326A e uma E333A.

73. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 52 a 67, 69, caracterizada pelo fato de que a segunda região Fc compreende uma substituição E333S.

74. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 52, 54 a 67, caracterizada pelo fato de que a segunda região Fc compreende uma substituição G237A e uma E333S.

75. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 51 a 74, caracterizada pelo fato de que o primeiro e segundo antígenos são ambas moléculas expostas na superfície celular.

76. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 51 a 75, caracterizada pelo fato de que o primeiro e segundo antígenos não são idênticos.

77. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 51 a 76, caracterizada pelo fato de que o primeiro anticorpo e o segundo anticorpo estão presentes na composição em razão molar de cerca de 1:50 a 50:1, tal como uma razão molar de cerca de 1:1, uma razão molar de cerca de 1:2, uma razão molar de cerca de 1:3, uma razão molar de cerca de 1:4, uma razão molar de cerca de 1:5, uma razão molar de cerca de 1:6, uma razão molar de cerca de 1:7, razão molar de cerca de um 1:8, uma razão molar de cerca de 1:9, uma razão molar de cerca de 1:10, uma razão molar de cerca de 1:15, uma razão molar de cerca de 1:20, uma razão molar de cerca de 1:25, uma razão molar de cerca de 1:30, uma razão molar de cerca de 1:35, uma razão molar de cerca de 1:40, uma razão molar de cerca de 1:45, uma razão molar de cerca de 1:50, uma razão molar de cerca de 50:1, uma razão molar de cerca de 45:1, uma razão molar de cerca de 40:1, uma razão molar de cerca de 35:1, uma razão molar de cerca de 30:1, uma razão molar de 25:1, uma razão molar de 20:1, uma razão molar de 15:1, uma razão molar de 10:1, uma razão molar de 9:1, uma razão molar de 8:1, uma razão molar de 7:1, uma

razão molar de 6:1, uma razão molar de 5:1, uma razão molar de 4:1, uma razão molar de 3:1, uma razão molar de 2:1.

78. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 51 a 77, caracterizada pelo fato de que o primeiro anticorpo e o segundo anticorpo estão presentes na composição em razão molar de cerca de um 1:50 a 50:1, tal como uma razão molar de cerca de 1:40 a 40:1, tal como uma razão molar de cerca de 1:30 a 30:1, tal como uma razão molar de cerca de 1:20 a 20:1, tal como uma razão molar de cerca de 1:10 a 10:1, tal como uma razão molar de cerca de 1:9 a 9:1, tal como uma razão molar de cerca de 1:5 a 5:1.

79. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores 51 a 78, caracterizada pelo fato de que o primeiro anticorpo e o segundo anticorpo estão presentes na composição em uma razão molar de 1:1.

80. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores 51 a 79, caracterizada pelo fato de que a composição compreende adicionalmente um carreador ou excipiente farmacêuticos.

81. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores 51 a 80, caracterizada pelo fato de que a composição é uma composição farmacêutica.

82. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de ser para o uso como um medicamento.

83. Primeiro ou segundo anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 36, um anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 37 a 50, ou uma composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 51 a 82, caracterizados pelo fato de que a região de ligação de antígeno é capaz de ligar a um antígeno selecionado a partir do grupo consistindo em: DR4, DR5, CD20, CD37, CD52, HLA-DR, CD3, CD5, 4-

1BB, PD1.

84. Primeiro ou segundo anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 36, 83, um anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 37 a 50, 83, ou uma composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 51 a 83, caracterizados pelo fato de que a região de ligação de antígeno compreende:

a. uma região VH compreendendo uma sequência de CDR1 como apresentada na SEQ ID NO: 196, uma sequência de CDR2 como apresentada na SEQ ID NO: 196 e uma sequência de CDR3 como apresentada SEQ ID NO: 198 e uma região VL compreendendo uma sequência de CDR1 como apresentada na SEQ ID NO: 200, uma sequência de CDR2 como apresentada em: AAT e uma sequência de CDR3 como apresentada na SEQ ID NO: 201 **[DR4]**;

b. uma região VH compreendendo uma sequência de CDR1 como apresentada na SEQ ID NO: 50, uma sequência de CDR2 como apresentada na SEQ ID NO: 51 e uma sequência de CDR3 como apresentada na SEQ ID NO: 52 e uma região VL compreendendo uma sequência de CDR1 como apresentada na SEQ ID NO: 54, uma sequência de CDR2 como apresentada em: FAS e uma sequência de CDR3 como apresentada na SEQ ID NO: 55 **[DR5-01-G56T]**;

c. uma região VH compreendendo uma sequência de CDR1 como apresentada na SEQ ID NO: 57, uma sequência de CDR2 como apresentada na SEQ ID NO: 58 e uma sequência de CDR3 como apresentada na SEQ ID NO: 59 e uma região VL compreendendo uma sequência de CDR1 como apresentada na SEQ ID NO: 61, uma sequência de CDR2 como apresentada em: RTS e uma sequência de CDR3 como apresentada na SEQ ID NO: 62 **[DR5-05]**;

d. uma região VH compreendendo uma sequência de CDR1 como apresentada na SEQ ID NO: 36, uma sequência de CDR2 como

apresentada na SEQ ID NO: 37 e uma sequência de CDR3 como apresentada na SEQ ID NO: 38 e uma região VL compreendendo uma sequência de CDR1 como apresentada na SEQ ID NO: 40, uma sequência de CDR2 como apresentada em: DAS e uma sequência de CDR3 como apresentada na SEQ ID NO: 41 [**CD20, 7D8**];

e. uma região VH compreendendo uma sequência de CDR1 como apresentada na SEQ ID NO: 9, uma sequência de CDR2 como apresentada na SEQ ID NO: 10 e uma sequência de CDR3 como apresentada na SEQ ID NO: 11 e uma região VL compreendendo uma sequência de CDR1 como apresentada na SEQ ID NO: 13, uma sequência de CDR2 como apresentada em: DAS e uma sequência de CDR3 como apresentada na SEQ ID NO: 14 [**CD20, 11B8**];

f. uma região VH compreendendo uma sequência de CDR1 como apresentada na SEQ ID NO: 43, uma sequência de CDR2 como apresentada na SEQ ID NO: 44 e uma sequência de CDR3 como apresentada na SEQ ID NO: 45 e uma região VL compreendendo uma sequência de CDR1 como apresentada na SEQ ID NO: 47, uma sequência de CDR2 como apresentada em: VAT e uma sequência de CDR3 como apresentada na SEQ ID NO: 48 [**CD37**];

g. uma região VH compreendendo uma sequência de CDR1 como apresentada na SEQ ID NO: 2, uma sequência de CDR2 como apresentada na SEQ ID NO: 3 e uma sequência de CDR3 como apresentada na SEQ ID NO: 4 e uma região VL compreendendo uma sequência de CDR1 como apresentada na SEQ ID NO: 6, uma sequência de CDR2 como apresentada em: NTN e uma sequência de CDR3 como apresentada na SEQ ID NO: 7 [**CD52, CAMPATH-1H**];

h. uma região VH compreendendo uma sequência de CDR1 como apresentada na SEQ ID NO: 161, uma sequência de CDR2 como apresentada na SEQ ID NO: 162 e uma sequência de CDR3 como apresentada

na SEQ ID NO: 163 e uma região VL compreendendo uma sequência de CDR1 como apresentada na SEQ ID NO: 165, uma sequência de CDR2 como apresentada em: LVS e uma sequência de CDR3 como apresentada na SEQ ID NO: 166 [**CD52, h2E8**];

i. uma região VH compreendendo uma sequência de CDR1 como apresentada na SEQ ID NO: 168, uma sequência de CDR2 como apresentada na SEQ ID NO: 169 e uma sequência de CDR3 como apresentada na SEQ ID NO: 170 e uma região VL compreendendo uma sequência de CDR1 como apresentada na SEQ ID NO: 172, uma sequência de CDR2 como apresentada na SEQ ID NO: AAS e uma sequência de CDR3 como apresentada na SEQ ID NO: 173 [**HLA-DR, hul243**];

j. uma região VH compreendendo uma sequência de CDR1 como apresentada na SEQ ID NO: 175, uma sequência de CDR2 como apresentada na SEQ ID NO: 176 e uma sequência de CDR3 como apresentada na SEQ ID NO: 177 e uma região VL compreendendo uma sequência de CDR1 como apresentada na SEQ ID NO: 179, uma sequência de CDR2 como apresentada em: DNN e uma sequência de CDR3 como apresentada na SEQ ID NO: 180 [**HLA-DR, 1D09C3**];

k. uma região VH compreendendo uma sequência de CDR1 como apresentada na SEQ ID NO: 182, uma sequência de CDR2 como apresentada na SEQ ID NO: 183 e uma sequência de CDR3 como apresentada na SEQ ID NO: 184 e uma região VL compreendendo uma sequência de CDR1 como apresentada na SEQ ID NO: 186, uma sequência de CDR2 como apresentada na SEQ ID NO: DTS e uma sequência de CDR3 como apresentada na SEQ ID NO: 187 [**CD3, huCLB T3/4**]; ou

l. uma região VH compreendendo uma sequência de CDR1 como apresentada na SEQ ID NO: 189, uma sequência de CDR2 como apresentada na SEQ ID NO: 190 e uma sequência de CDR3 como apresentada na SEQ ID NO: 191 e uma região VL compreendendo uma sequência de

CDR1 como apresentada na SEQ ID NO: 193, uma sequência de CDR2 como apresentada em: ATS e uma sequência de CDR3 como apresentada na SEQ ID NO: 194 [CD5].

85. Método para tratar um indivíduo tendo uma doença, caracterizado pelo fato de que compreende administrar ao dito indivíduo uma quantidade eficaz de um primeiro e um segundo anticorpo como definidos em qualquer uma das reivindicações 1 a 37, 83 ou 84, um anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 37 a 50, 83 ou 84, ou uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações 51 a 84.

86. Método de acordo com a reivindicação 85, caracterizado pelo fato de que a doença é selecionada a partir do grupo de: câncer, doença autoimune, doença inflamatória e doença infecciosa.

87. Método de acordo com a reivindicação 85 a 86, caracterizado pelo fato de que o método compreende administrar um agente terapêutico adicional.

88. Método para esgotar uma população de célula expressando um primeiro antígeno e um segundo antígeno, caracterizado pelo fato de que o método compreende entrar em contato a dita população de célula com um primeiro e segundo anticorpos, um anticorpo ou composição como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 84.

89. Método de acordo com a reivindicação 88, caracterizado pelo fato de que a população de célula é uma população de célula de tumor, tal como uma população de célula de tumor hematológico ou uma população de um célula de tumor sólido.

90. Método para induzir a proliferação em uma população de célula expressando um primeiro antígeno e um segundo antígeno, caracterizado pelo fato de que o método compreende entrar em contato com a dita população de célula com um primeiro e segundo anticorpos, um anticorpo ou composição como definida nas reivindicações 1 a 84.

91. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 88 a 90, caracterizado pelo fato de que a população de célula é uma presente no sangue.

92. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 88 a 91, caracterizado pelo fato de que a população de célula é um leucócito.

93. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 88 a 92, caracterizado pelo fato de que a população de célula é um subconjunto de uma população de célula leucocitária.

94. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 88 a 93, caracterizado pelo fato de que a população de célula é uma população de célula linfocitária.

95. Método de acordo com a reivindicação 94, caracterizado pelo fato de que a população de célula é uma população de célula B, uma população de célula T, uma população de célula NK, uma população de célula T regulatória, população de célula supressora derivada de mielóide.

96. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 85 a 95, caracterizado pelo fato de que o primeiro e/ou segundo antígenos é um membro do TNFR-SF.

97. Kit, caracterizado pelo fato de que compreende um primeiro recipiente compreendendo um primeiro anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 15, 26 a 36, 83 ou 84 e um segundo recipiente compreendendo um segundo anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, 16 a 36, 83 ou 84.

Figura 1

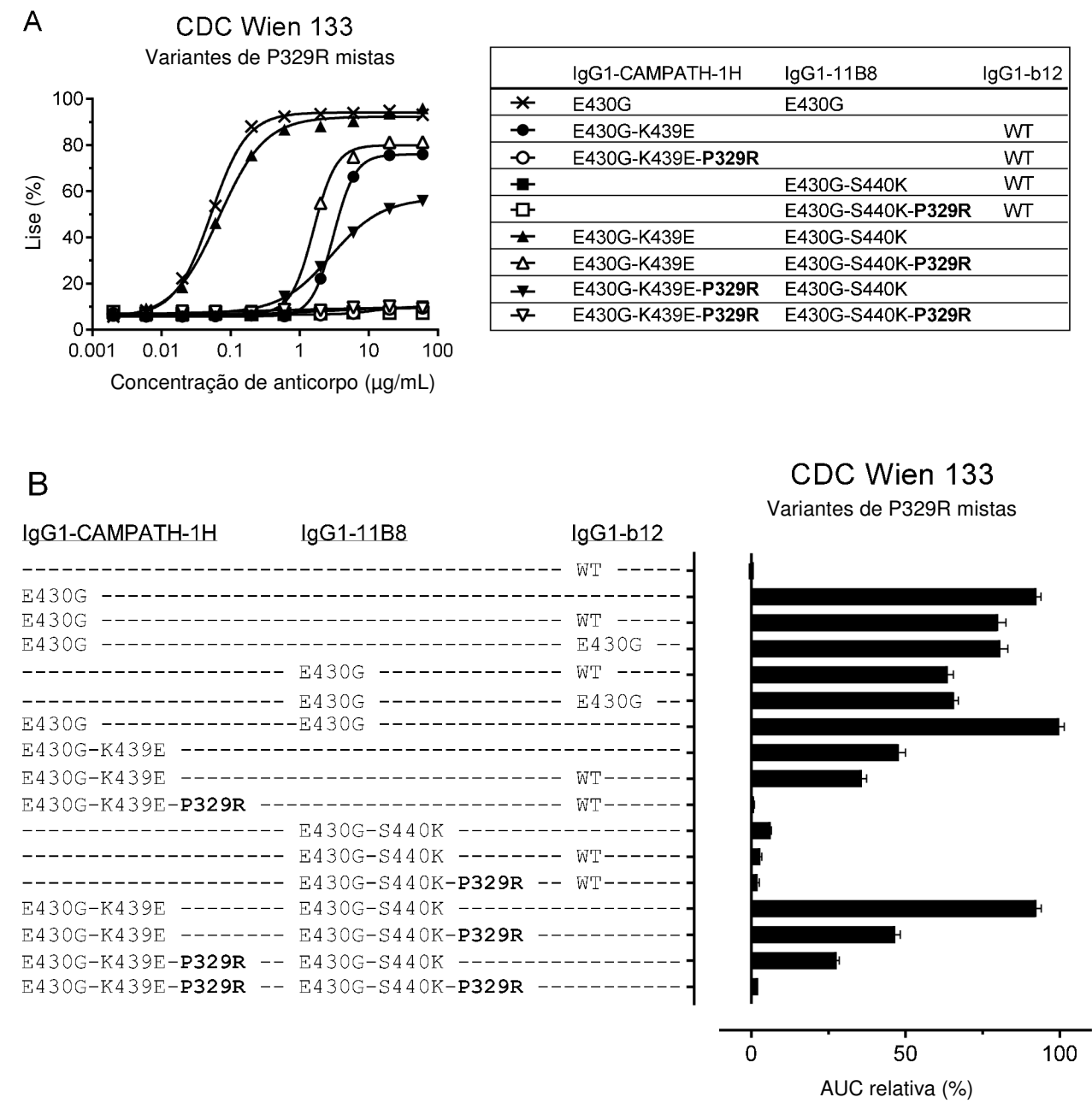


Figura 2

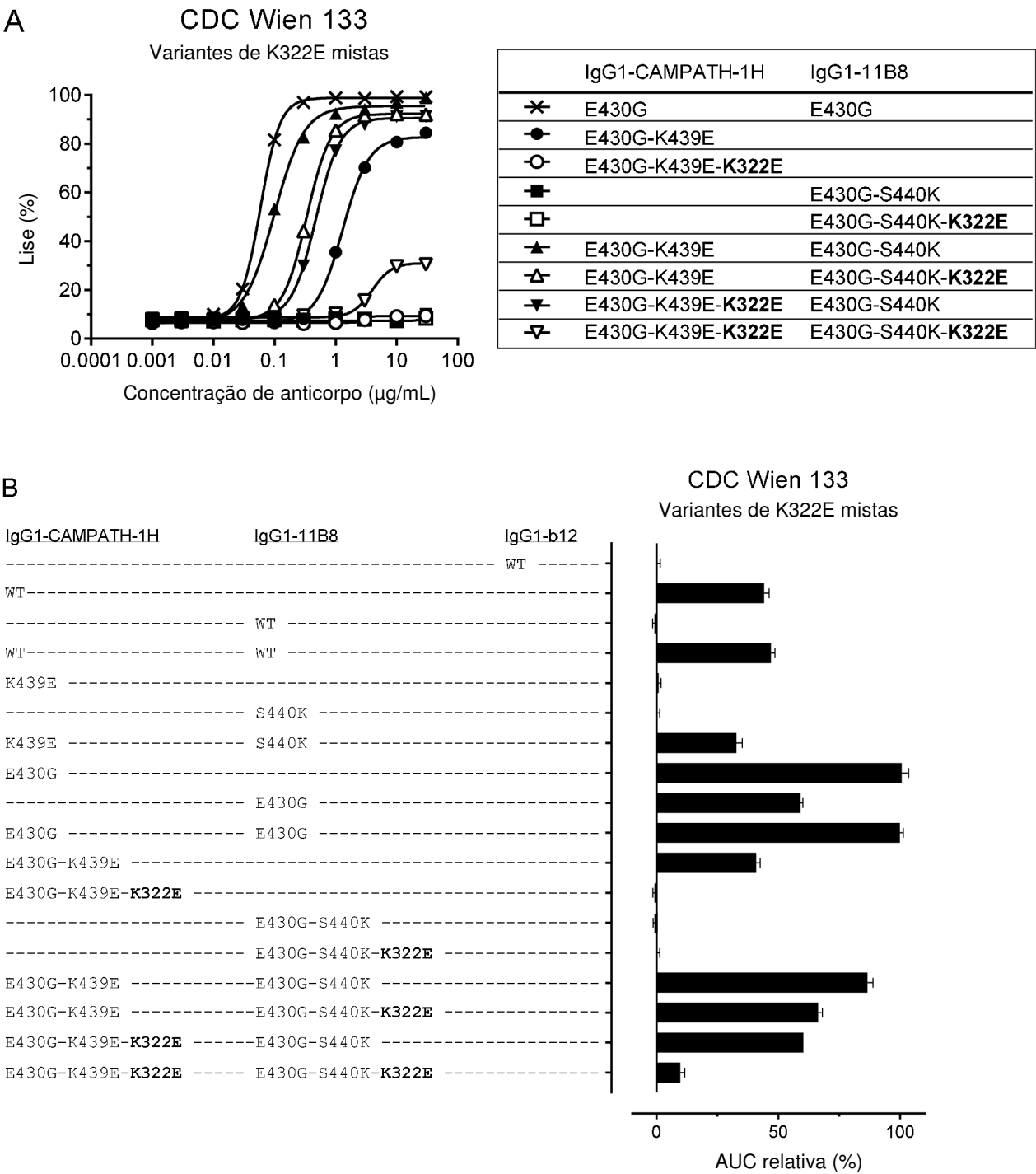


Figura 3

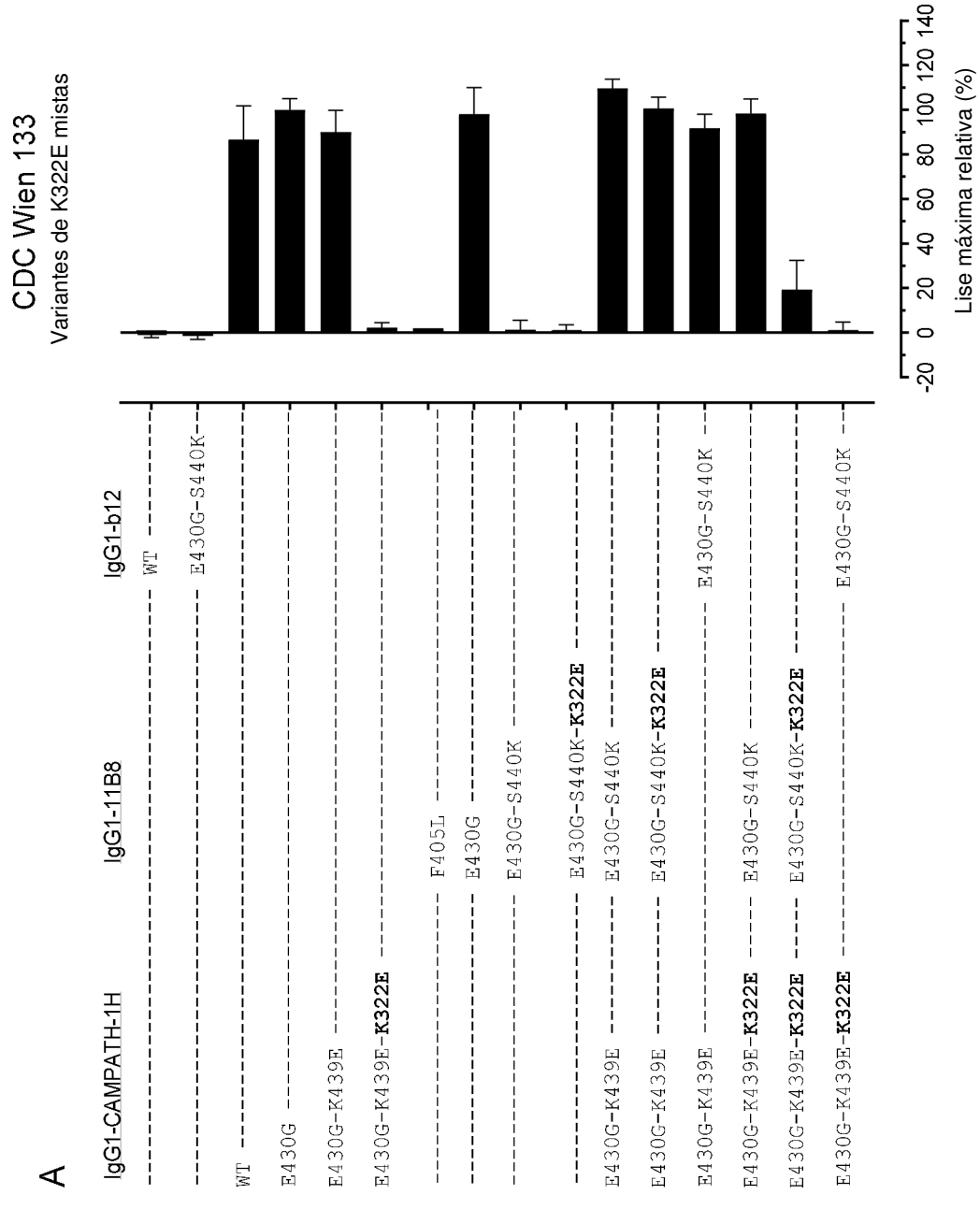


Figura 3 Continuação

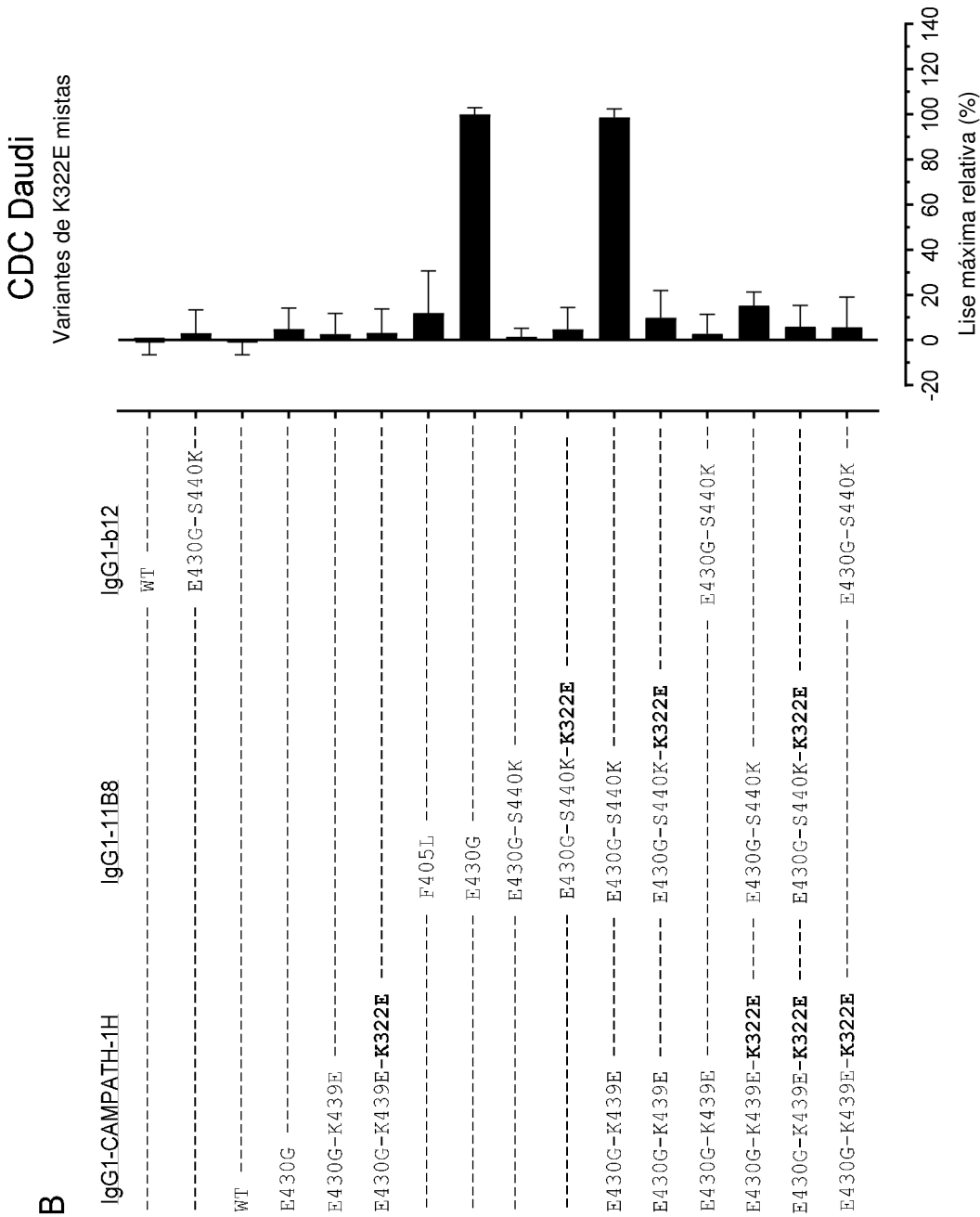


Figura 3 Continuação

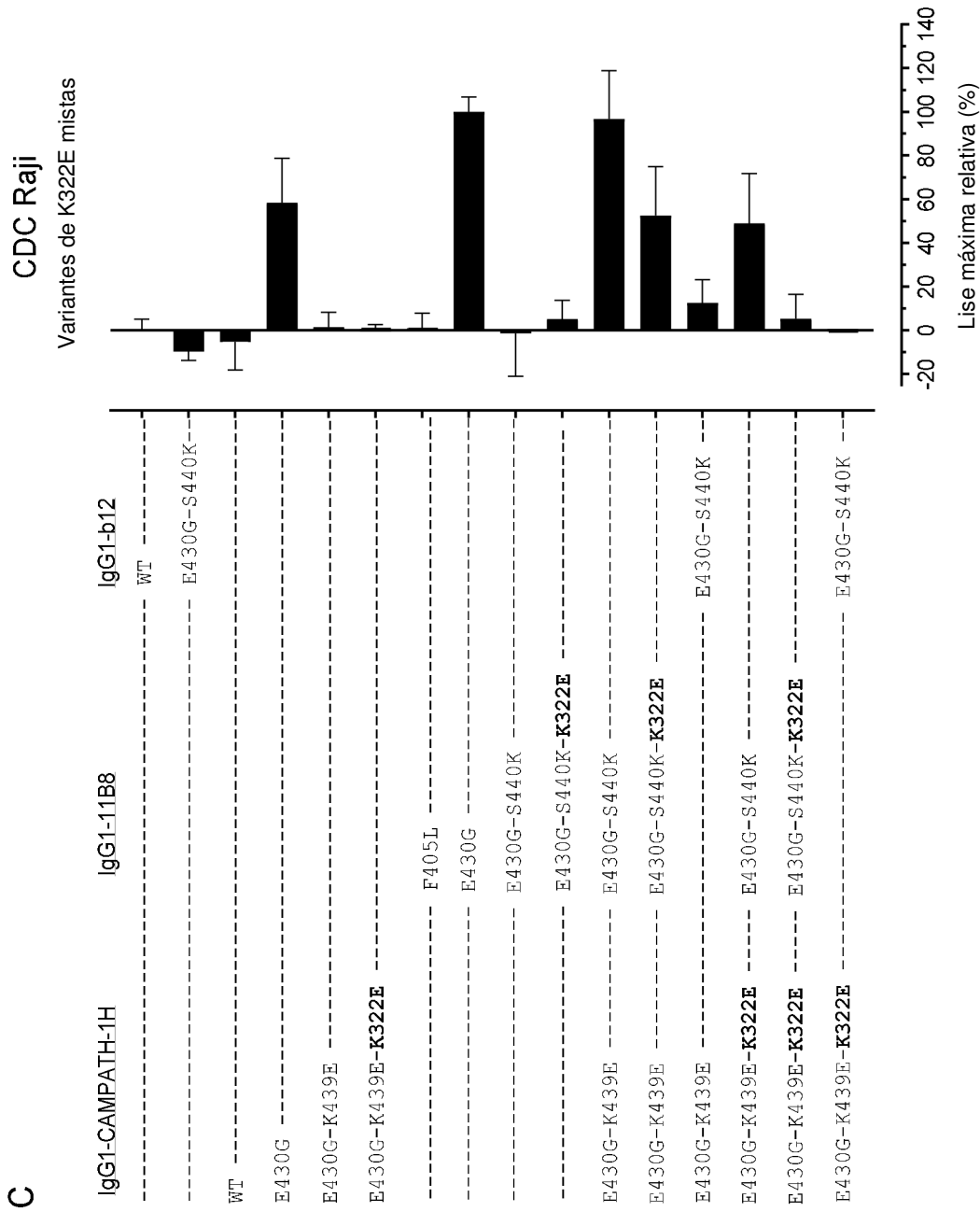


Figura 3 Continue

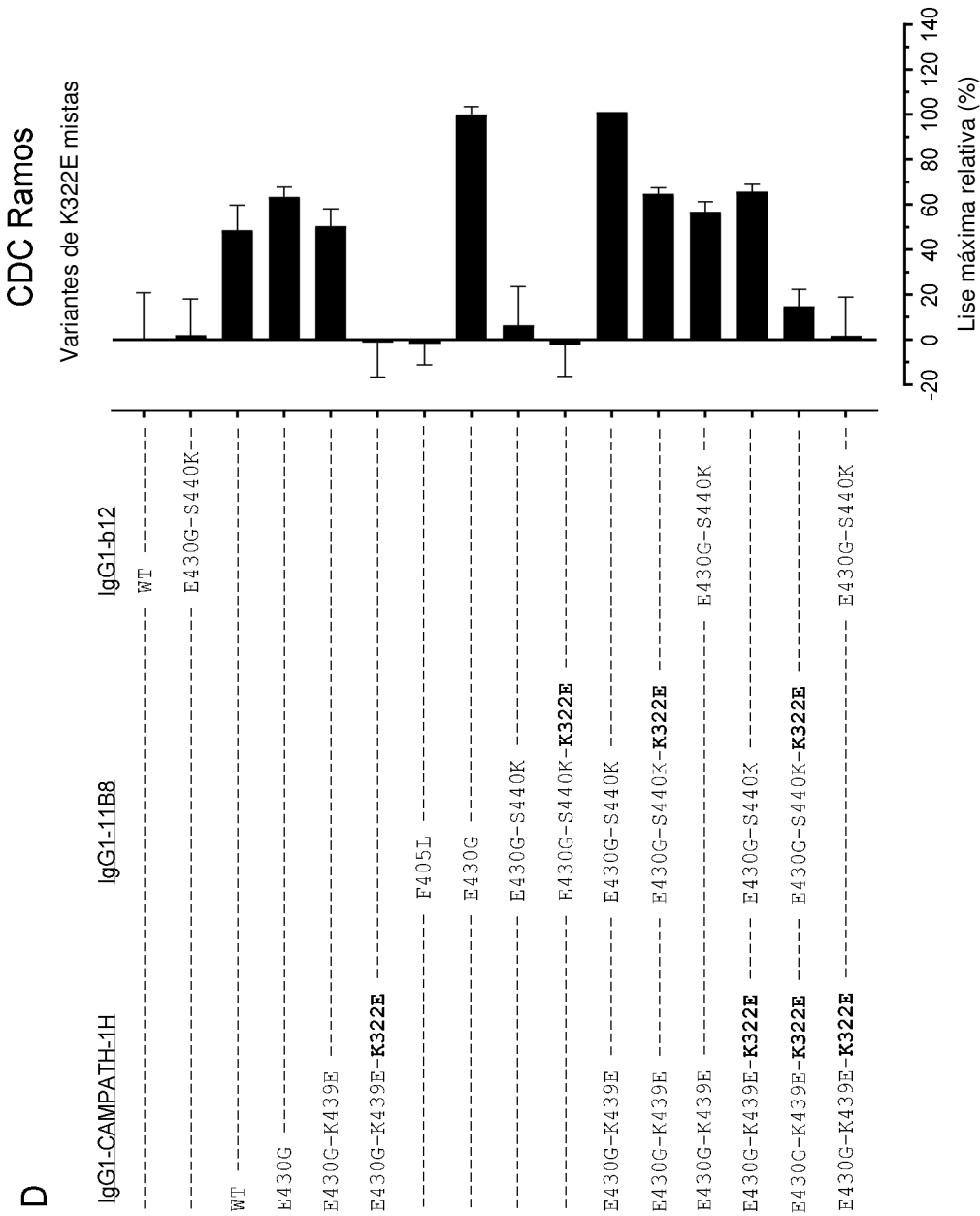


Figura 3 Continuação

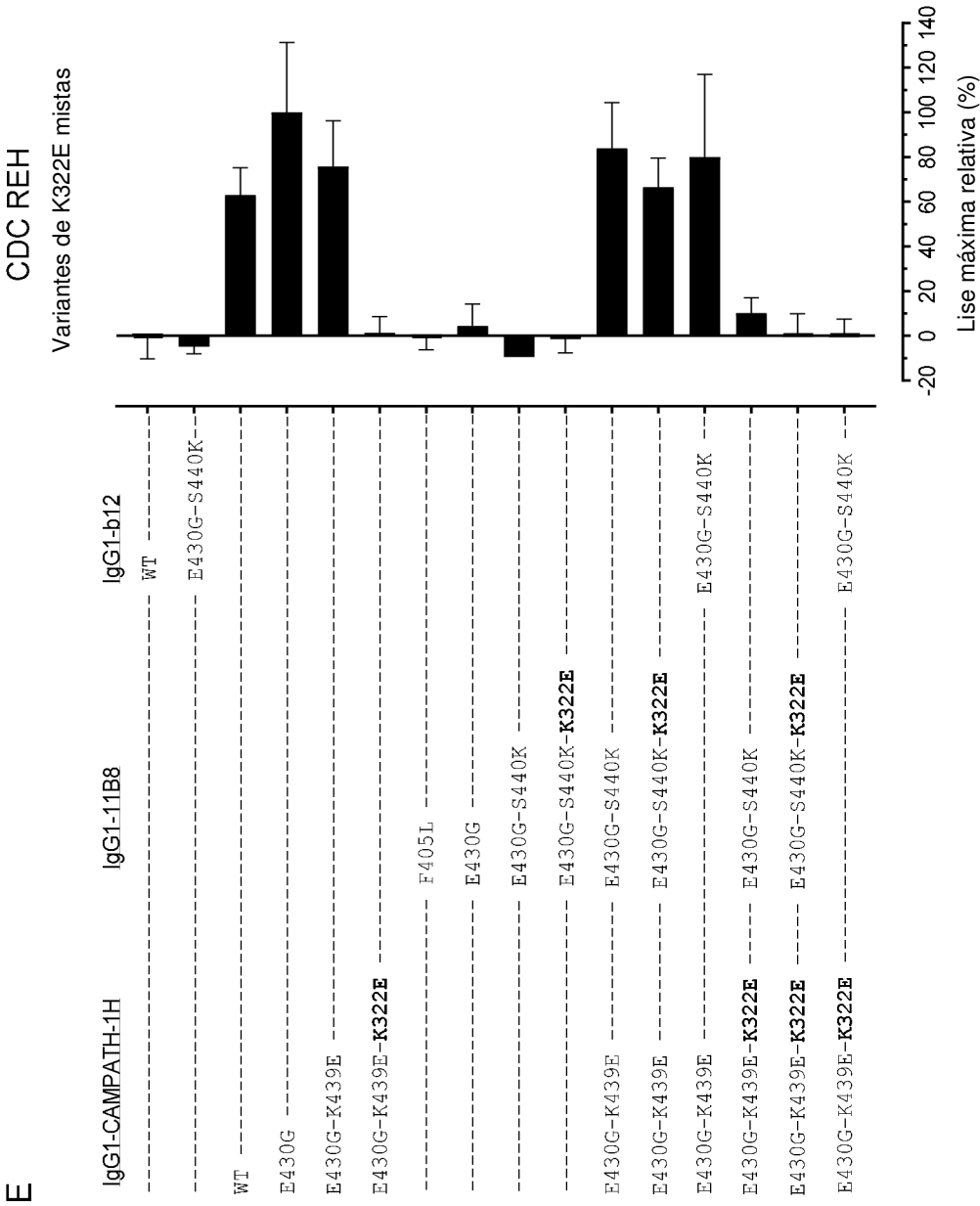


Figura 3 Continuação

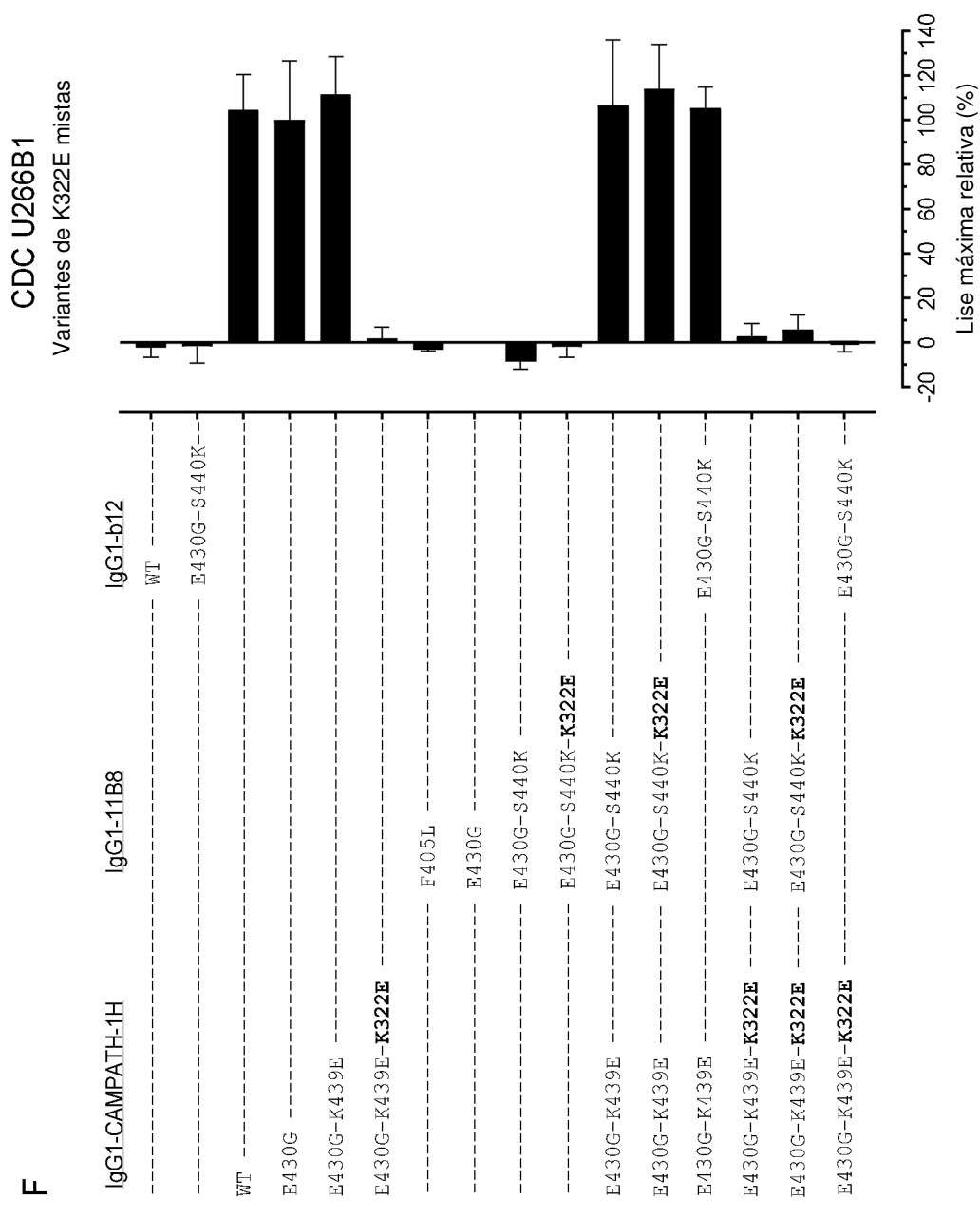


Figura 3 Continuação

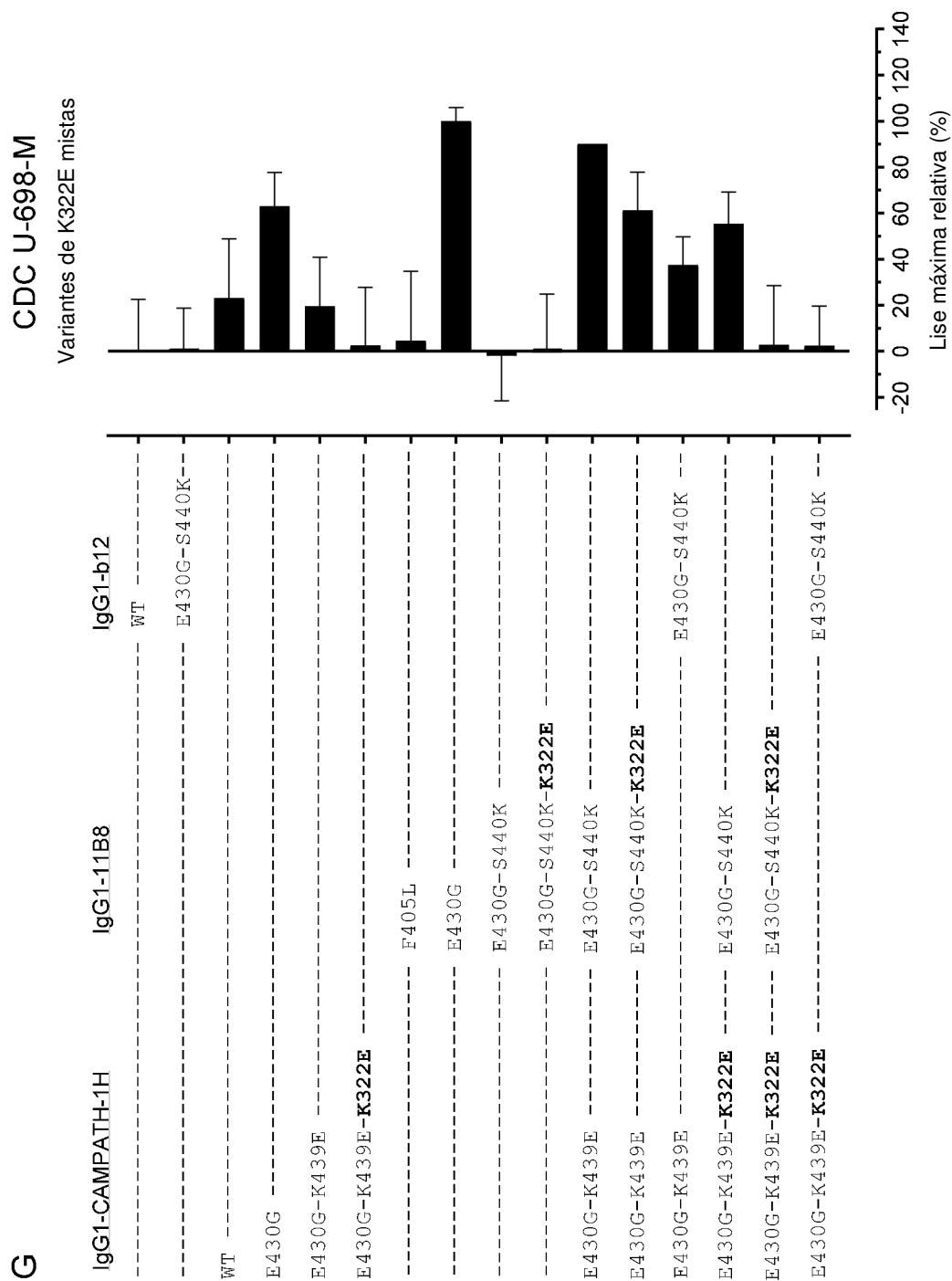


Figura 4

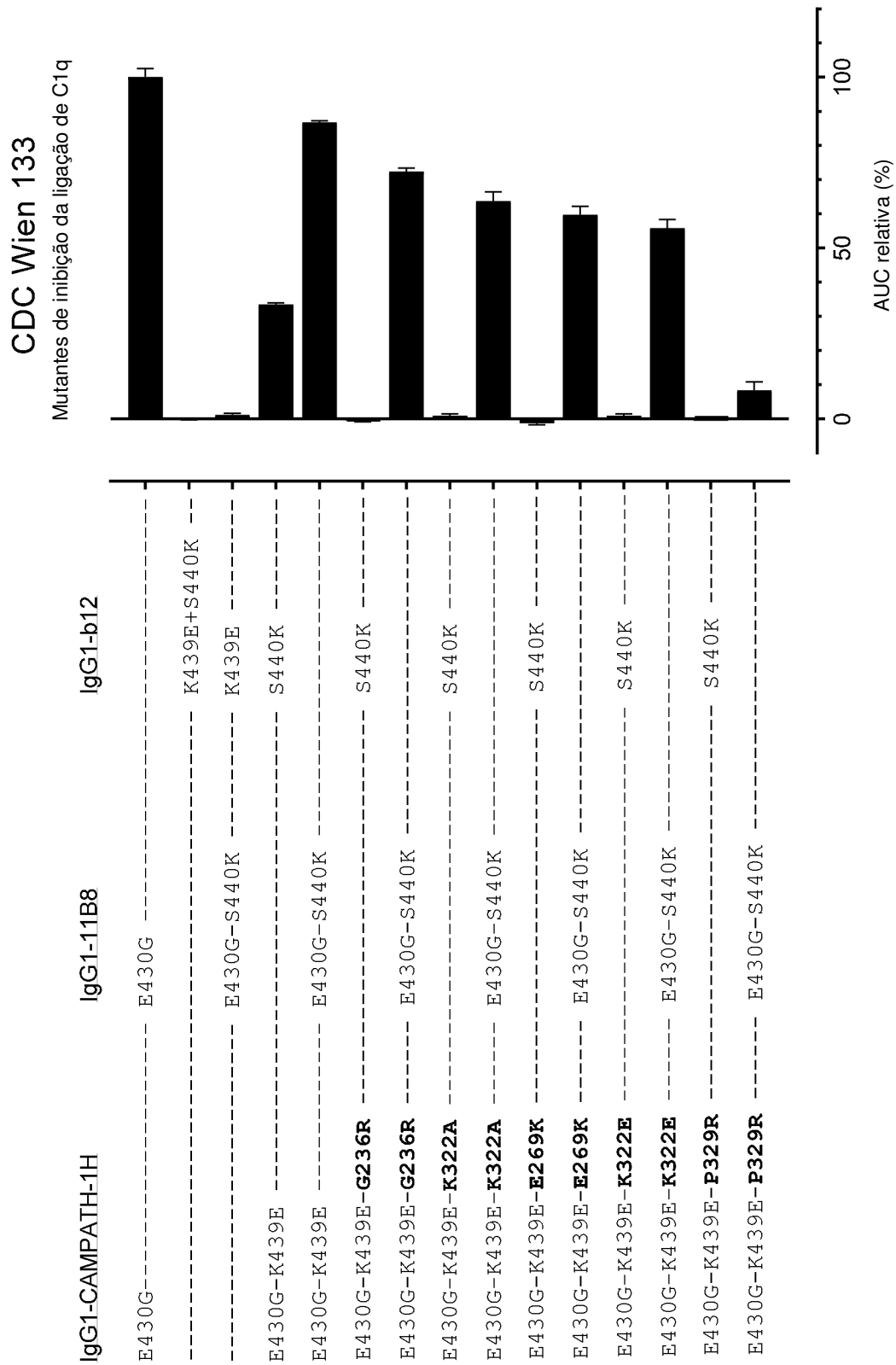
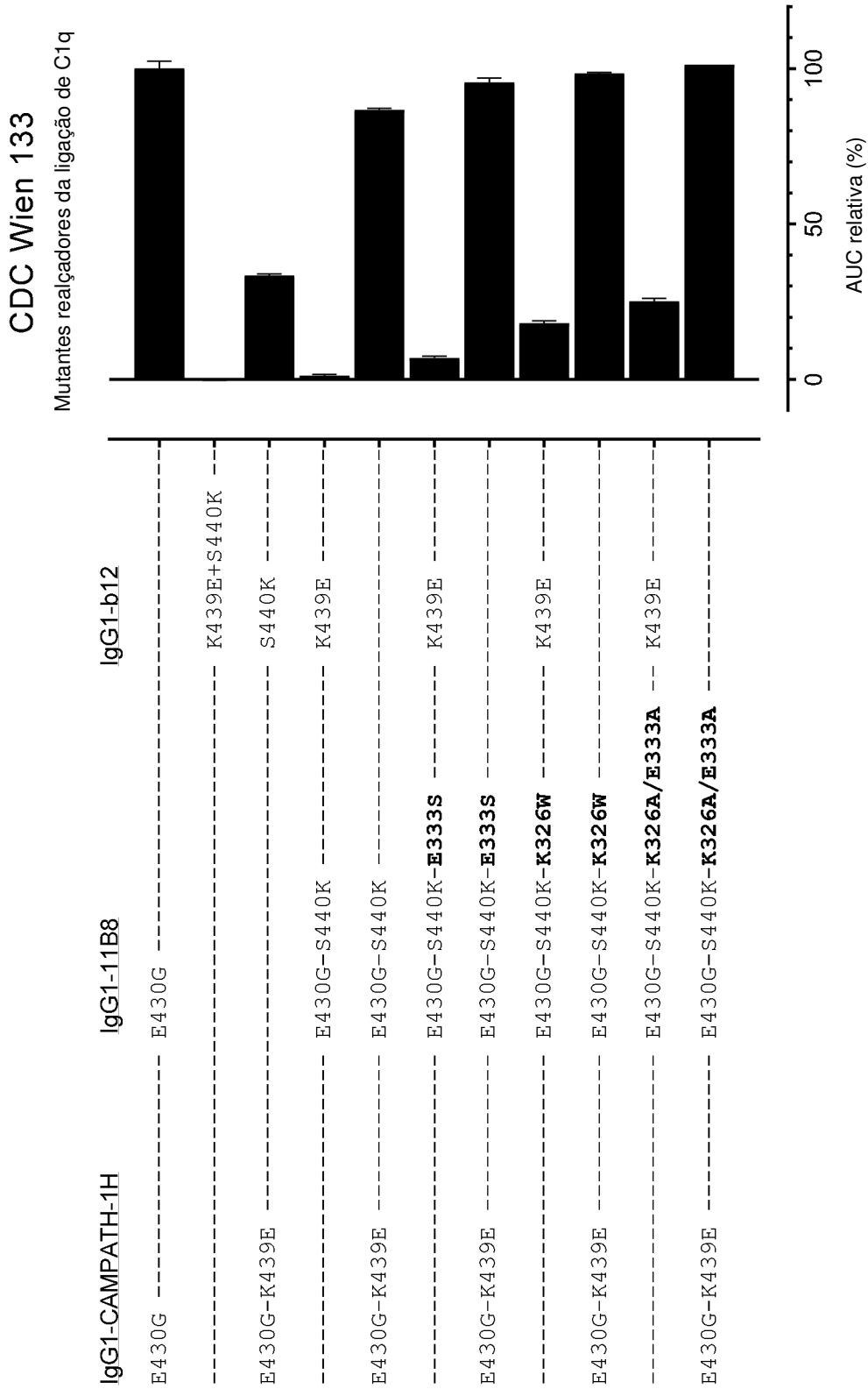


Figura 5



762, de 09/12/2020, pág. 360/442

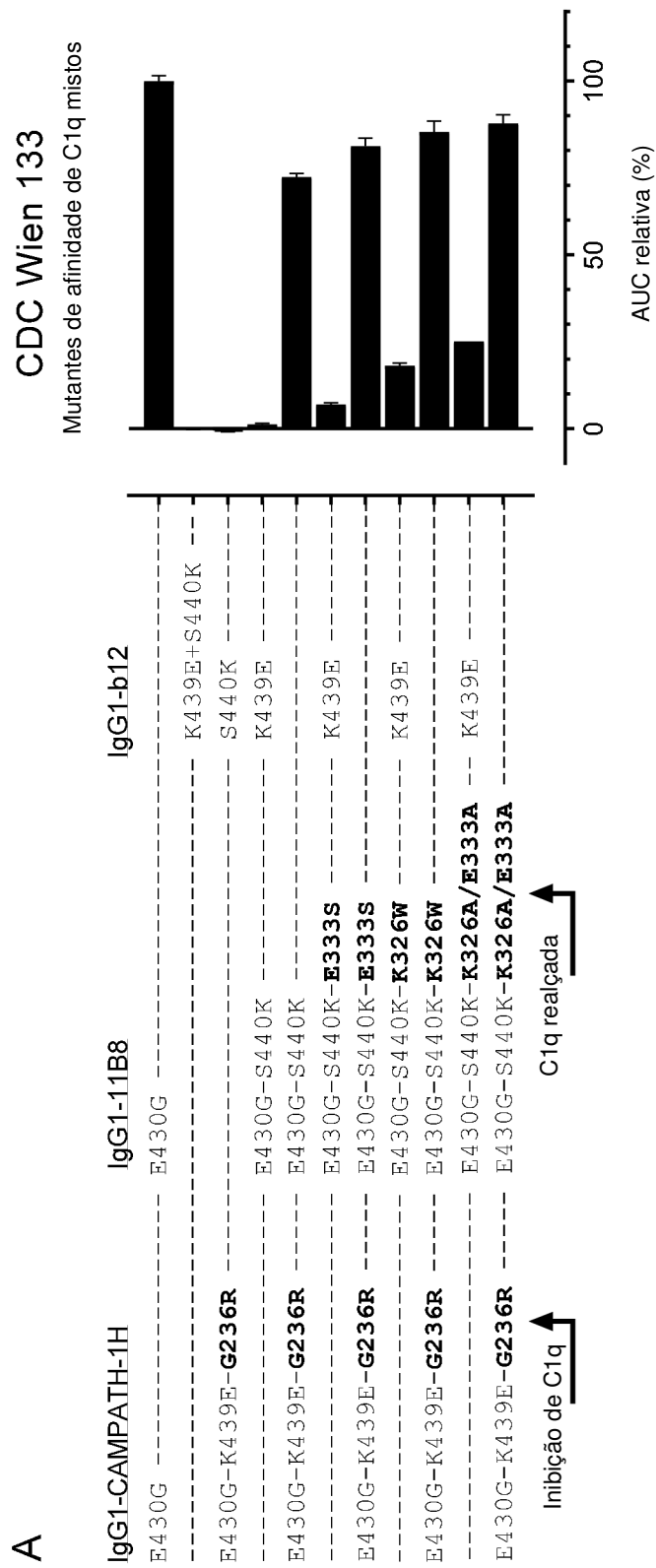


Figura 6 Continuação

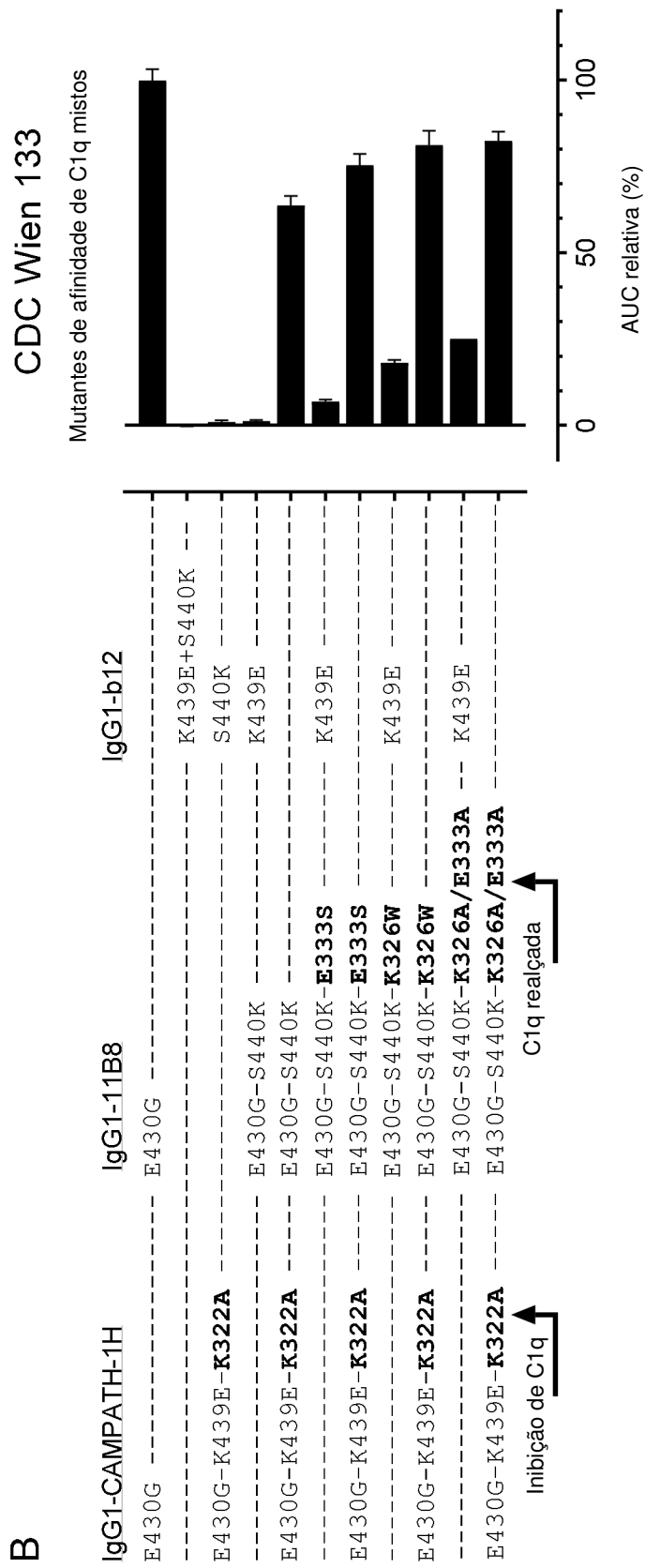


Figura 6 Continuação

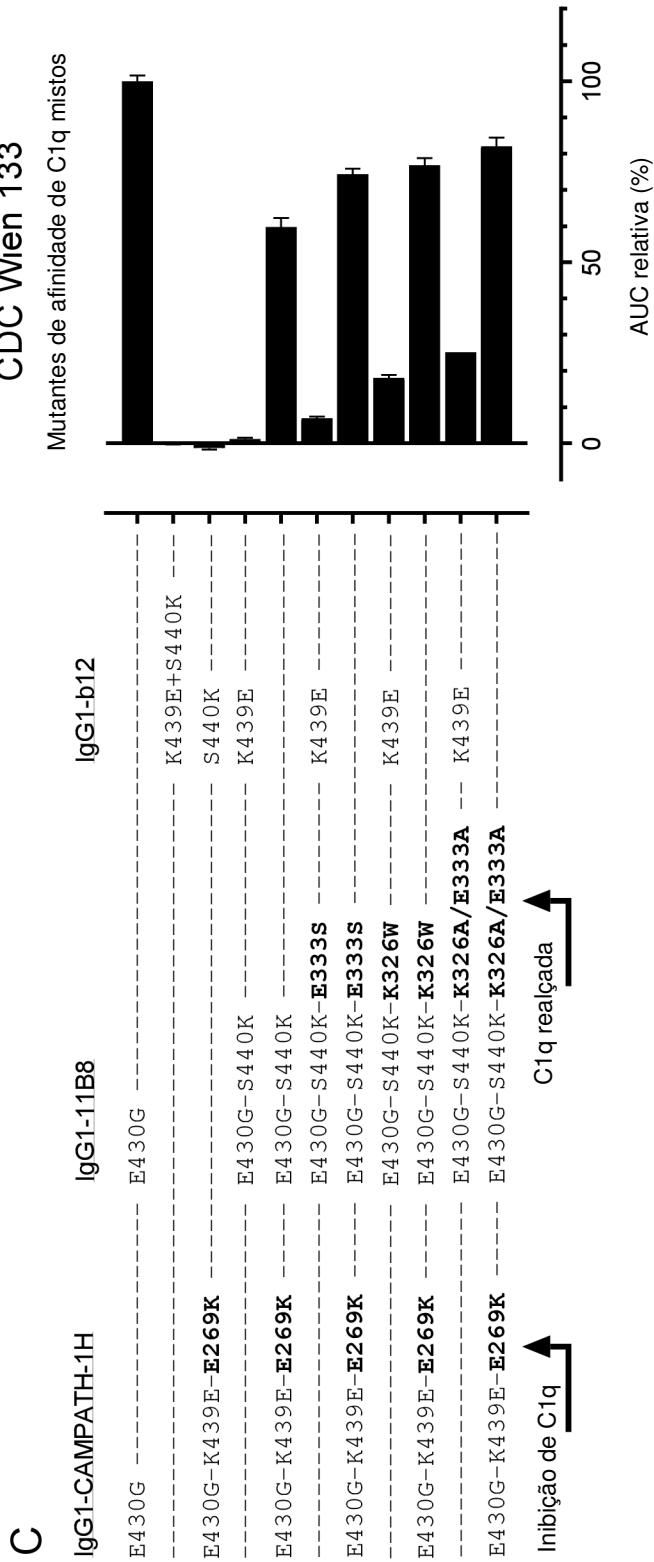


Figura 6 Continuação

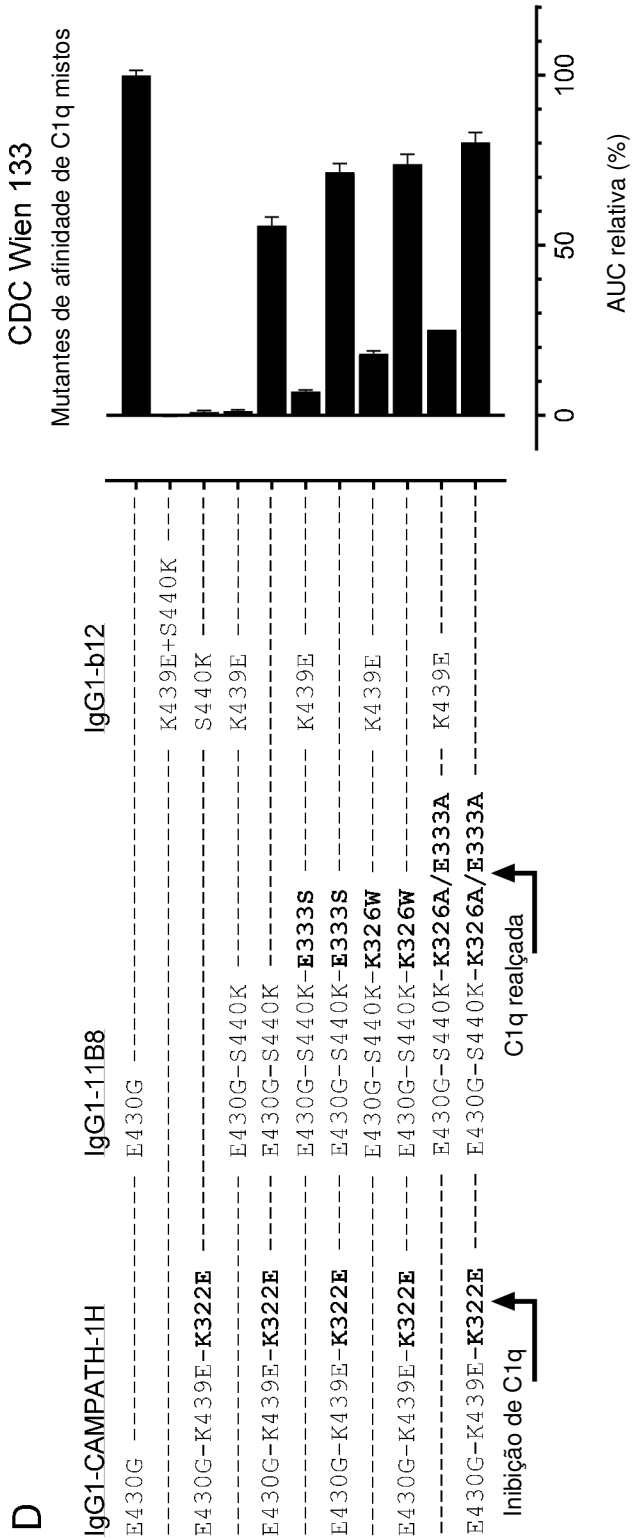


Figura 6 Continuação

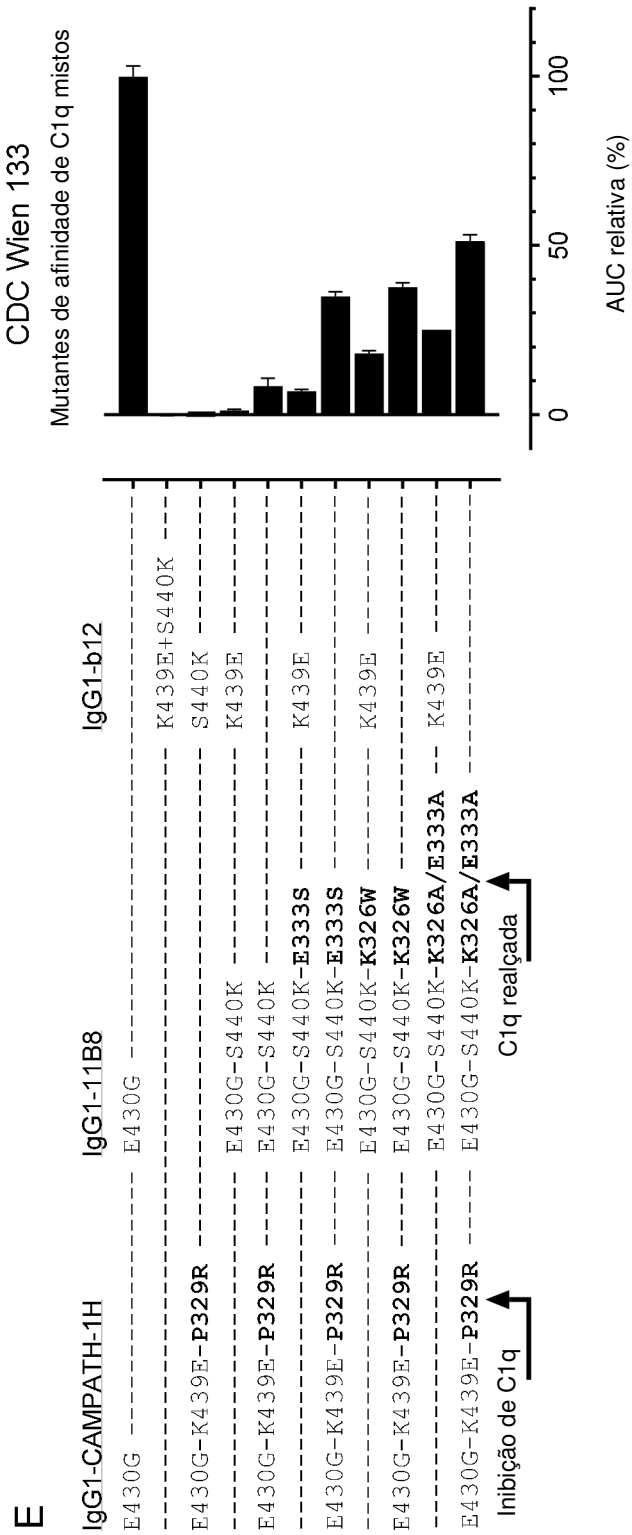


Figura 7

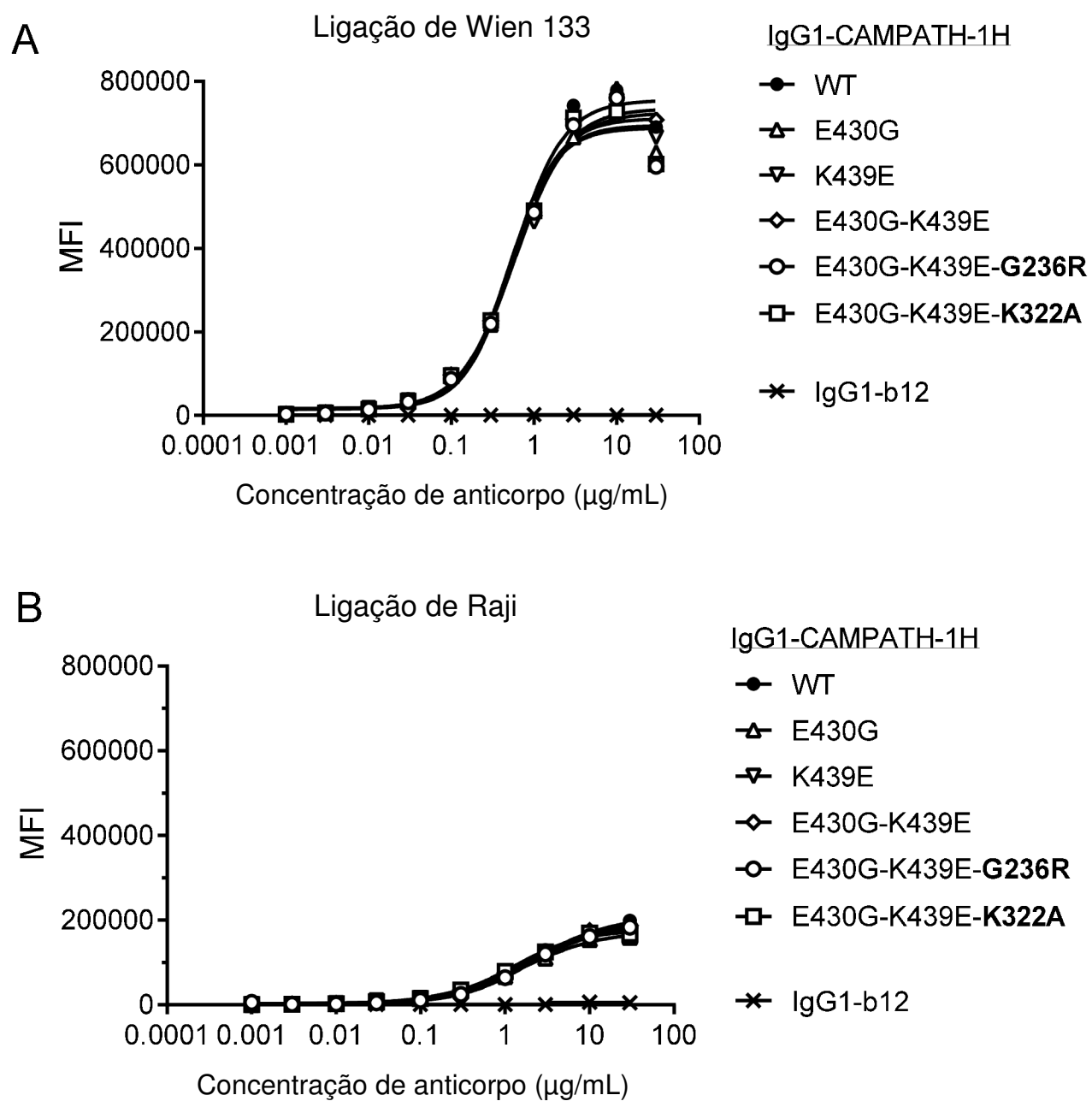


Figura 7 Continuação

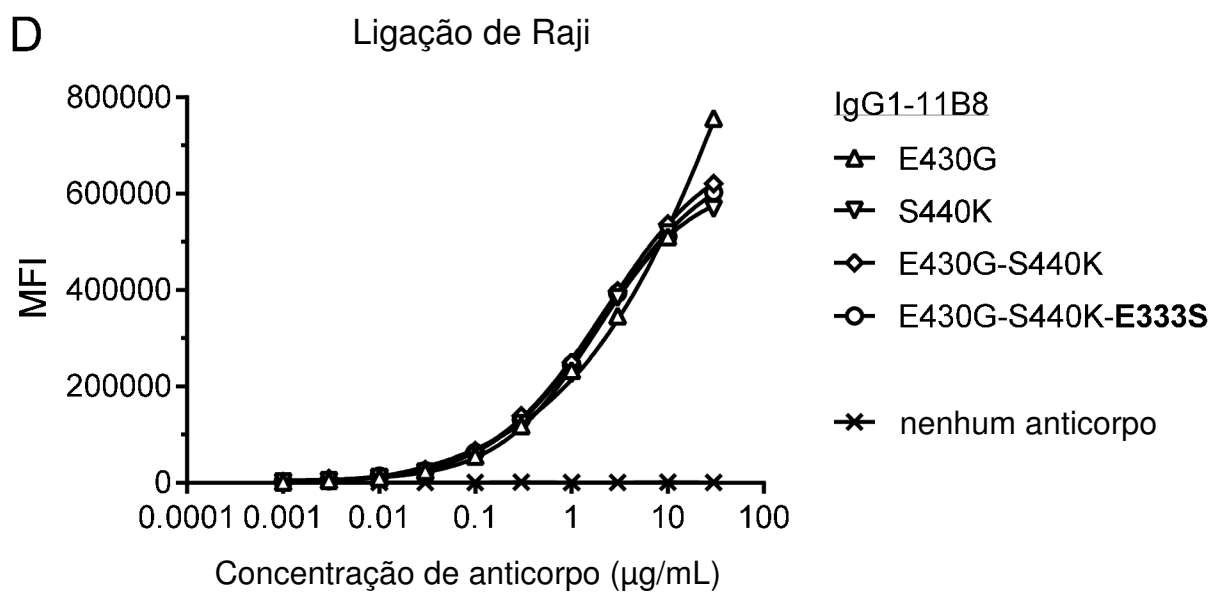
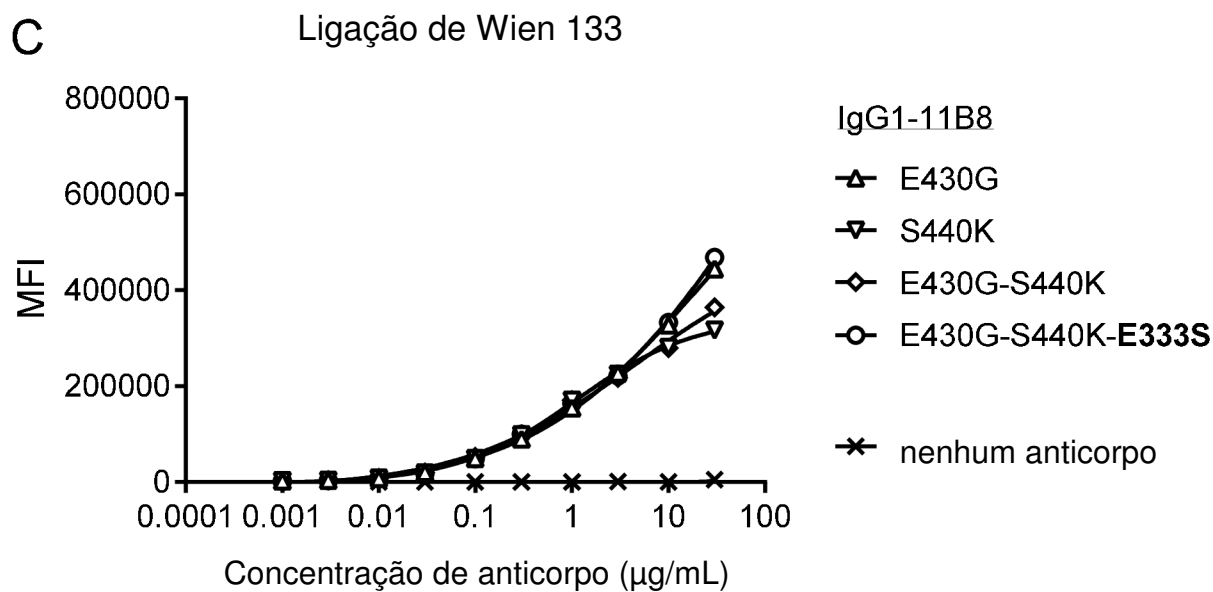


Figura 8

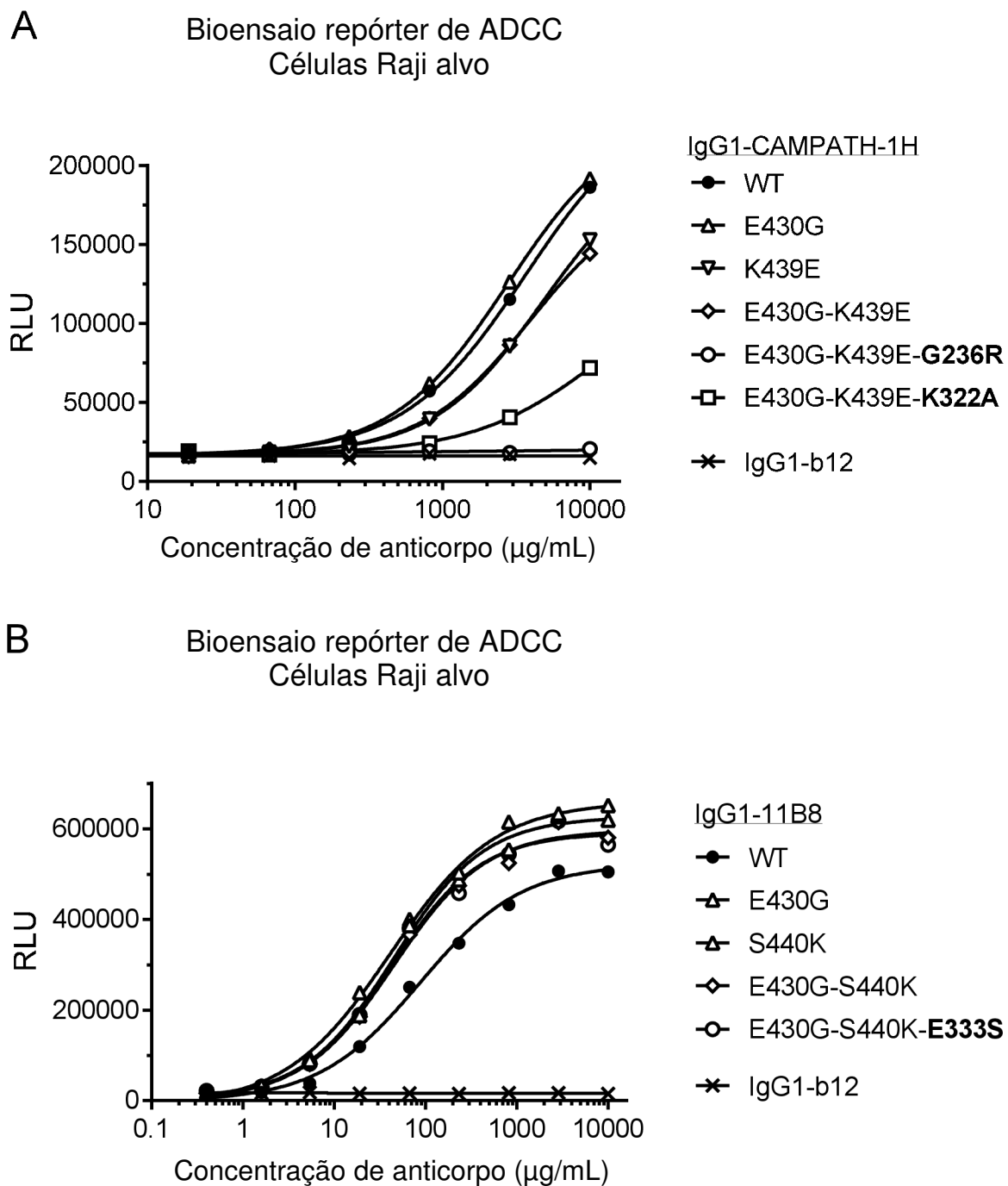
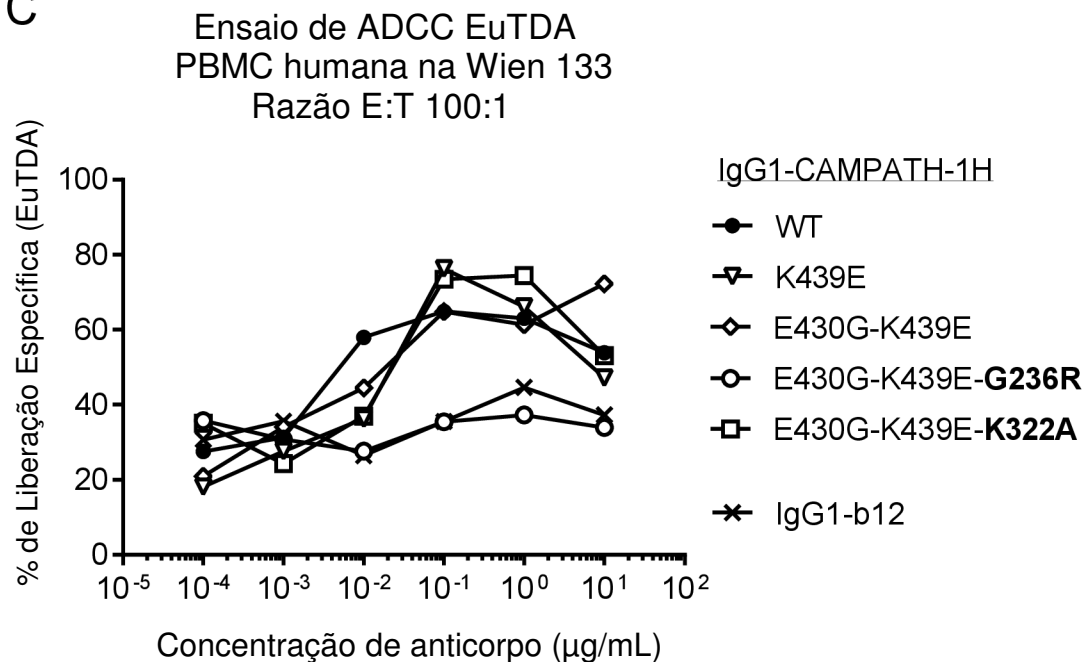


Figura 8 continuação

C



D

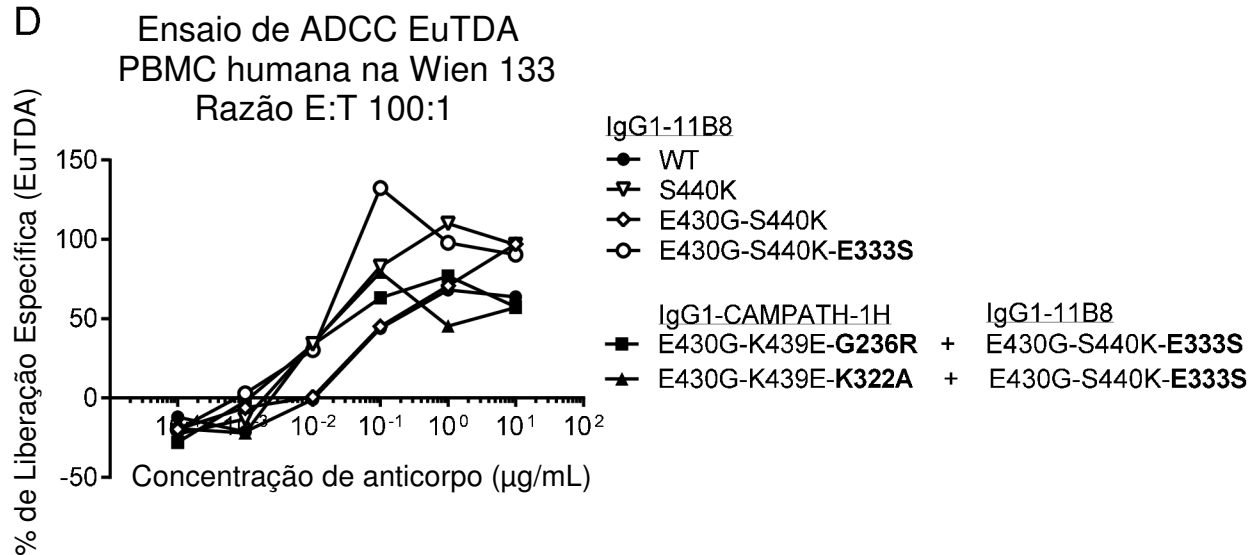
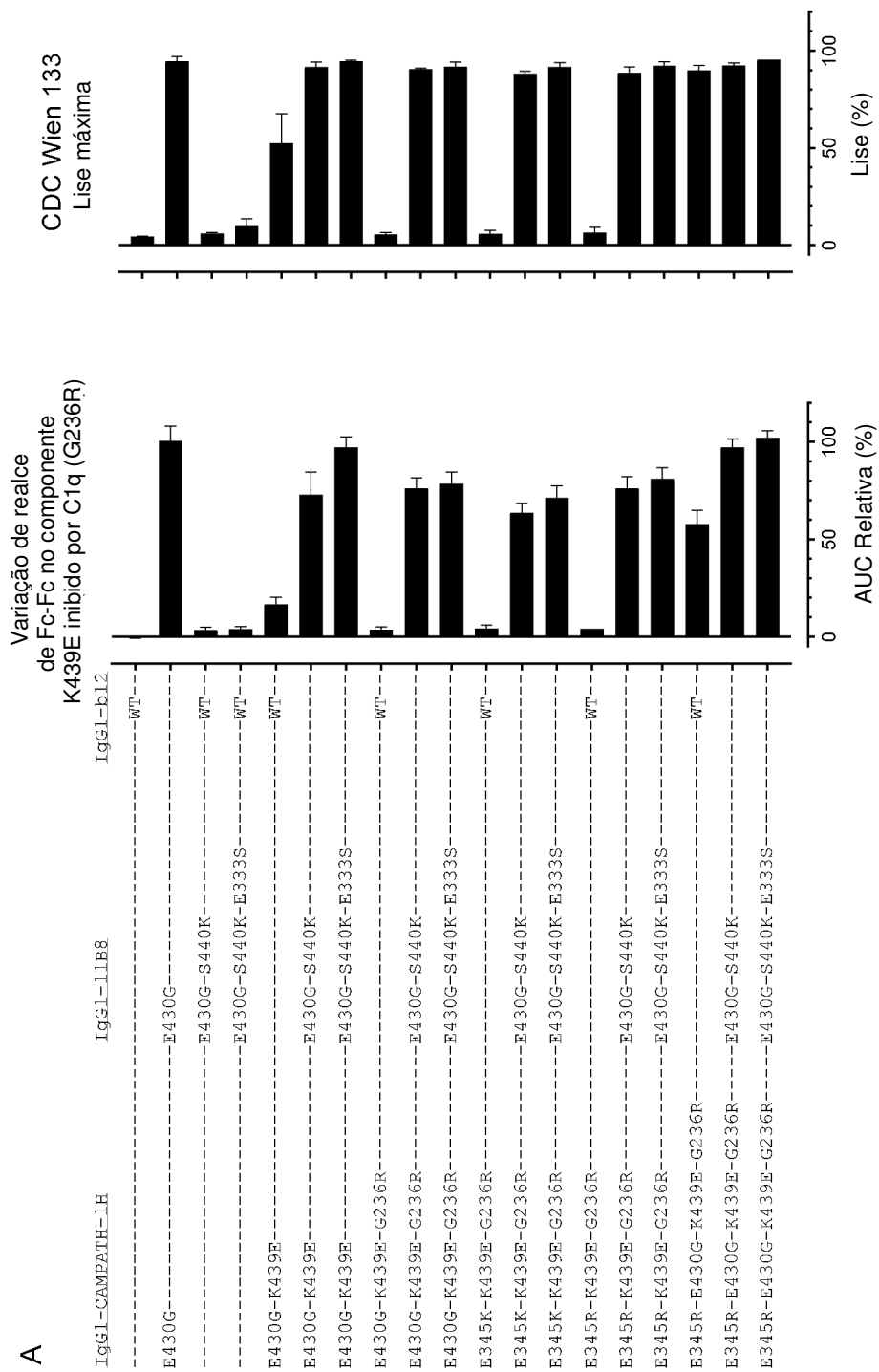


Figura 9



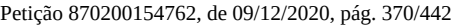
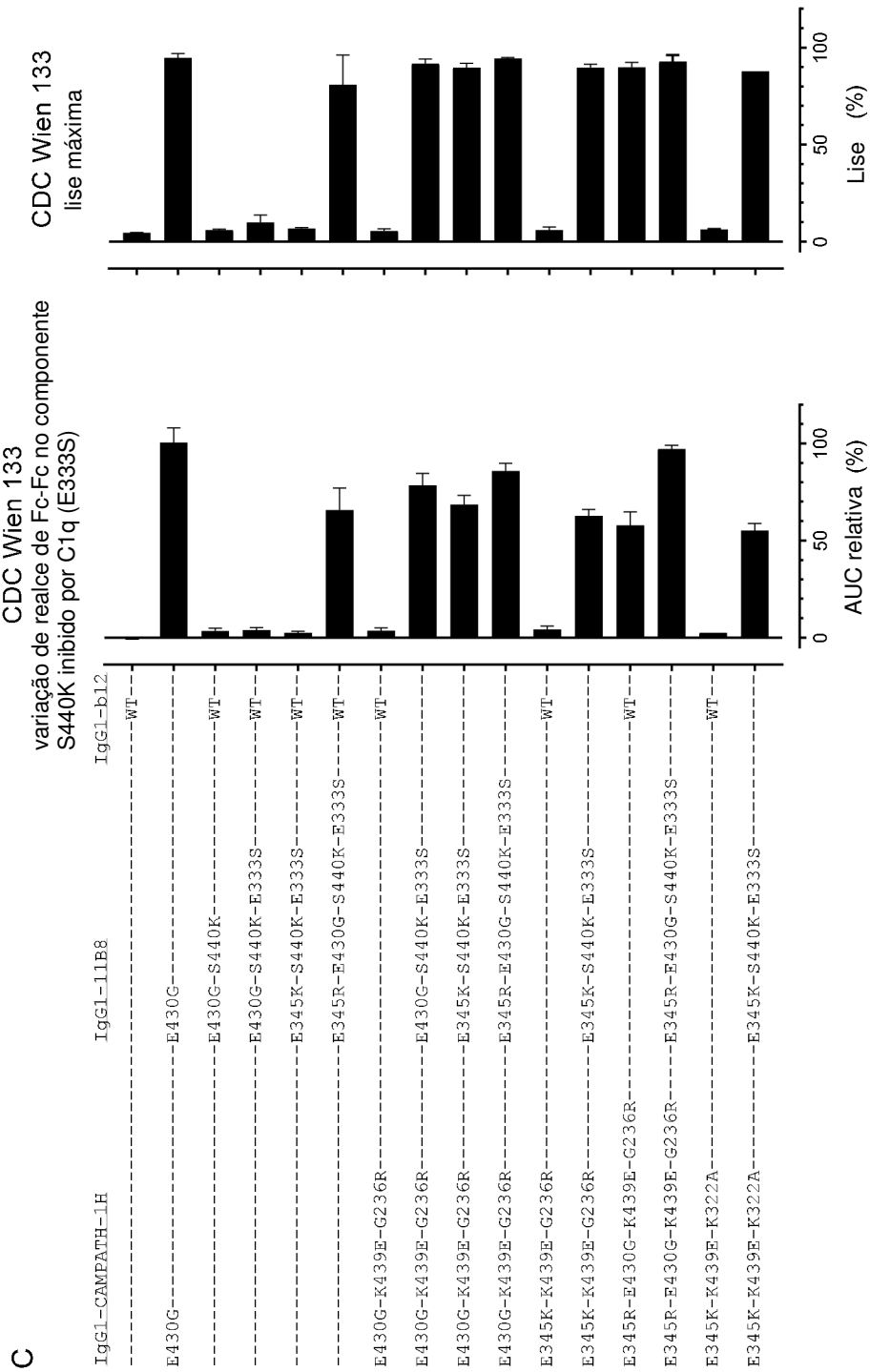


Figura 9 continuação



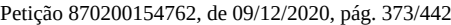


Figura 11

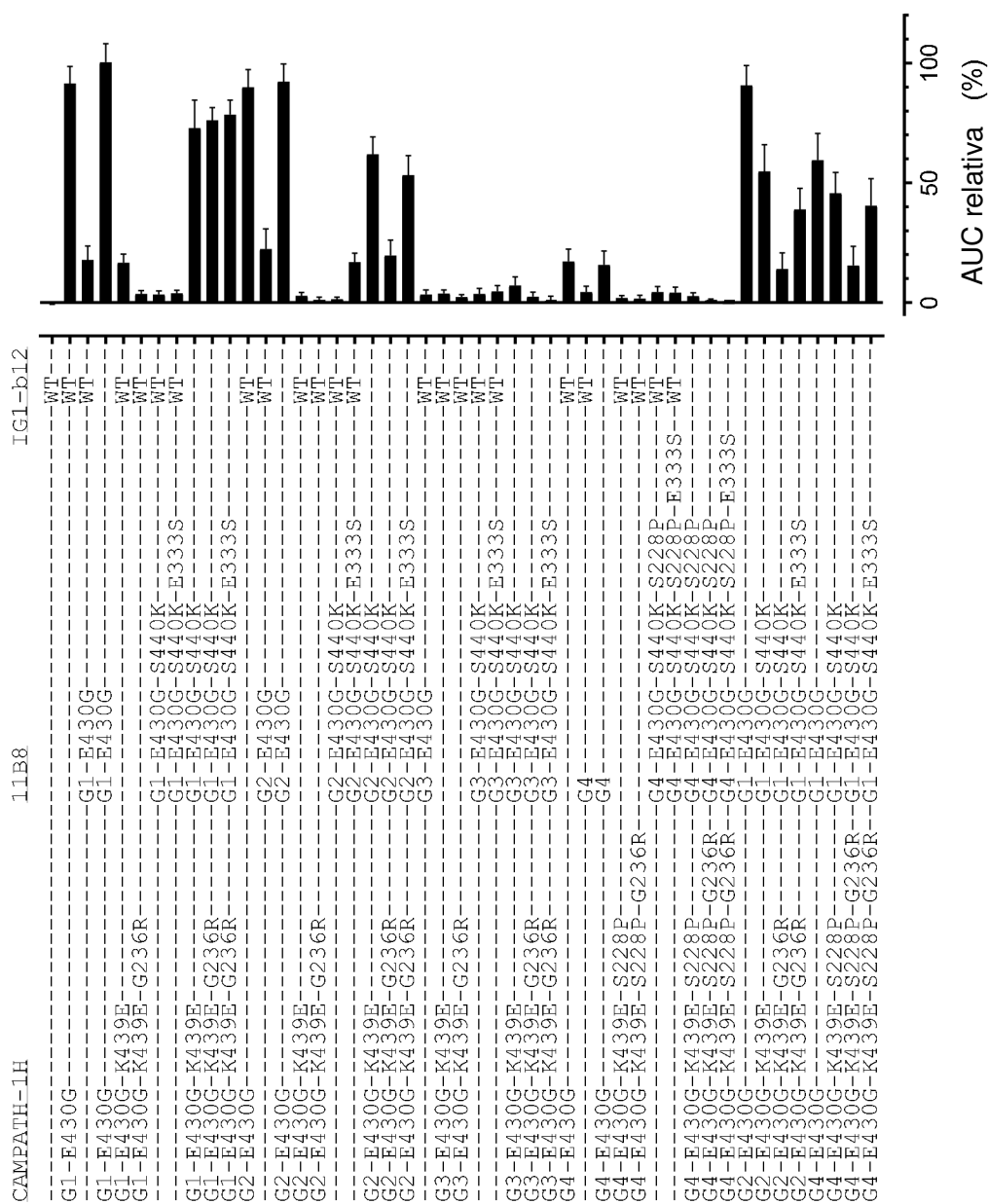


Figura 12

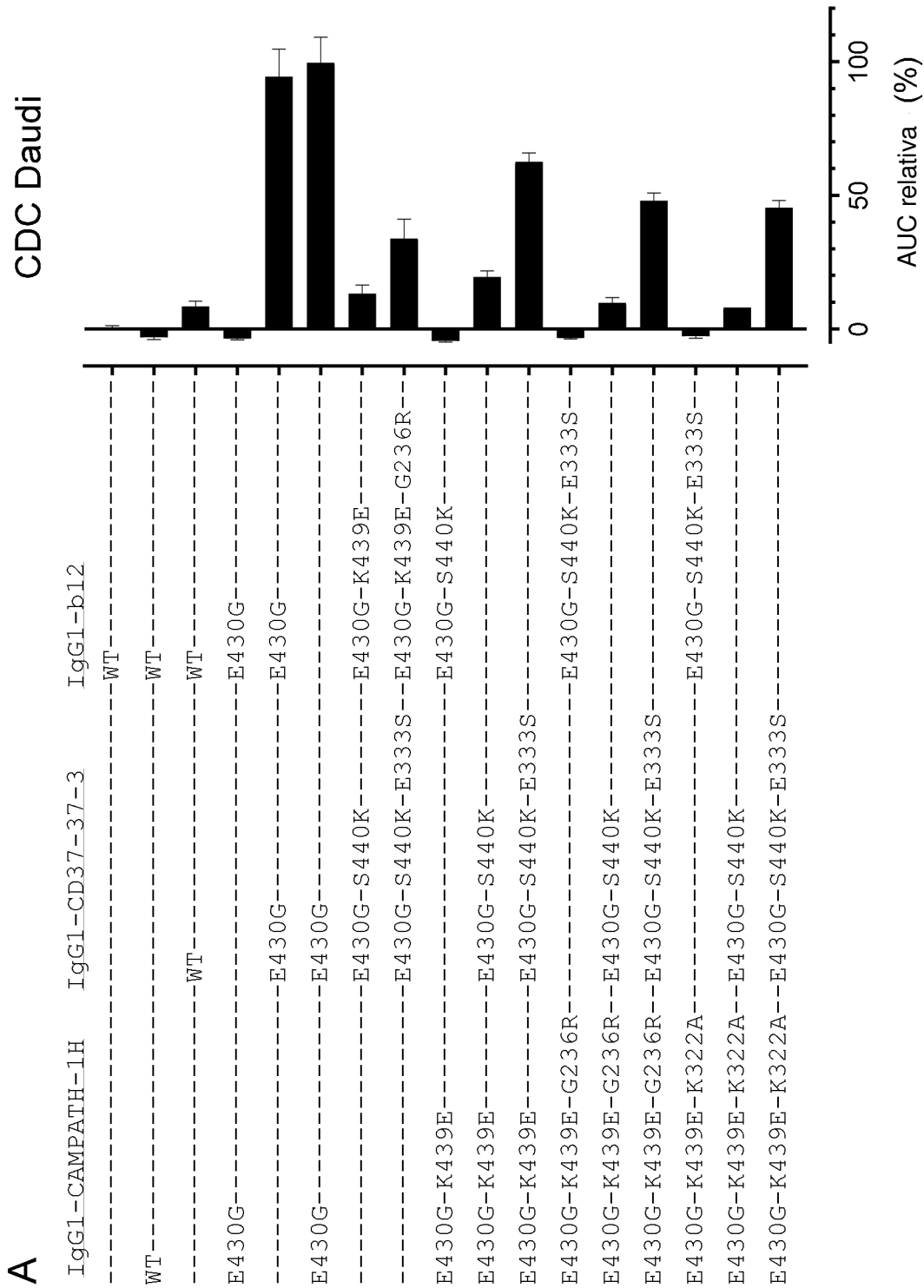


Figura 12 continuação

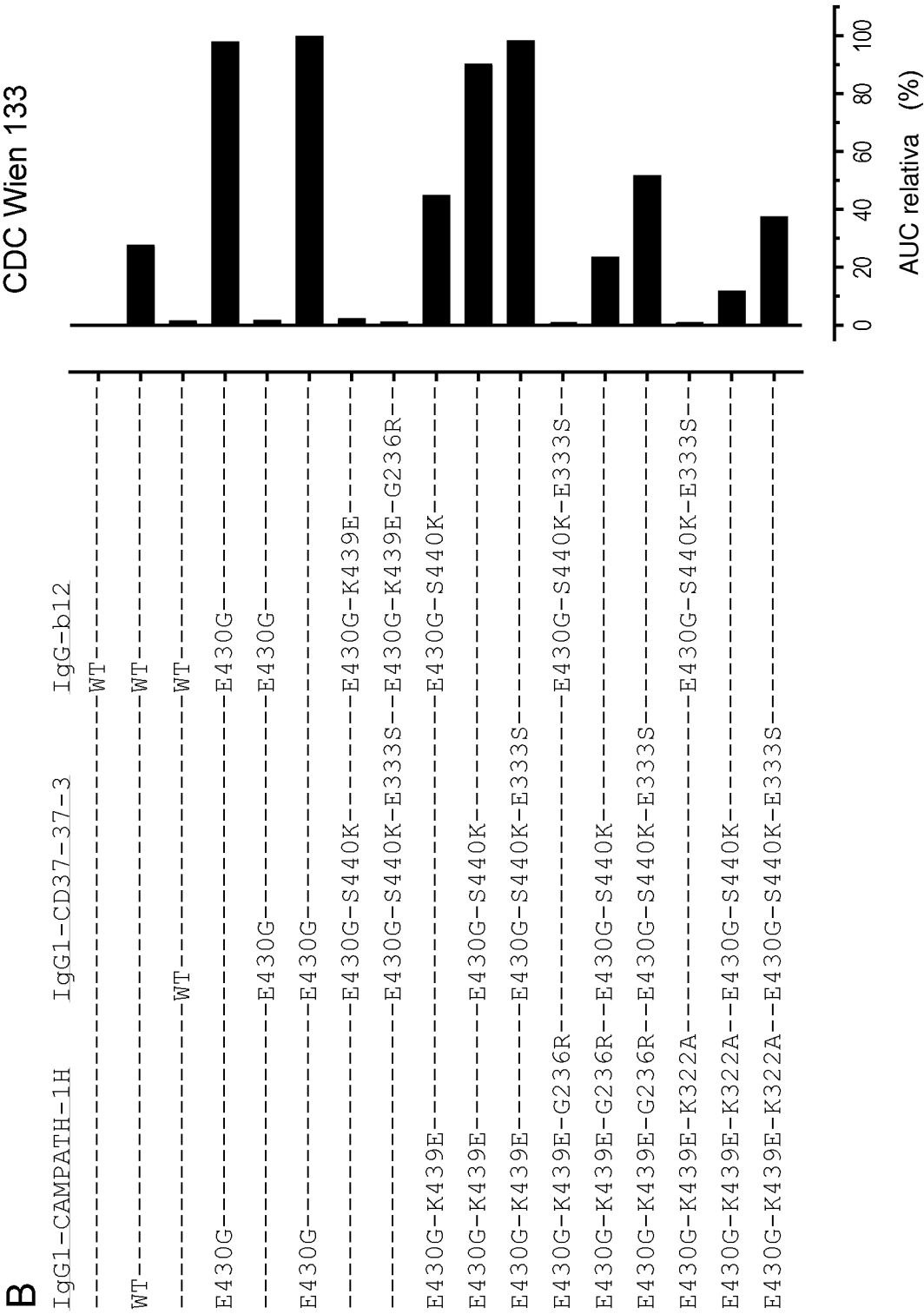


Figura 13

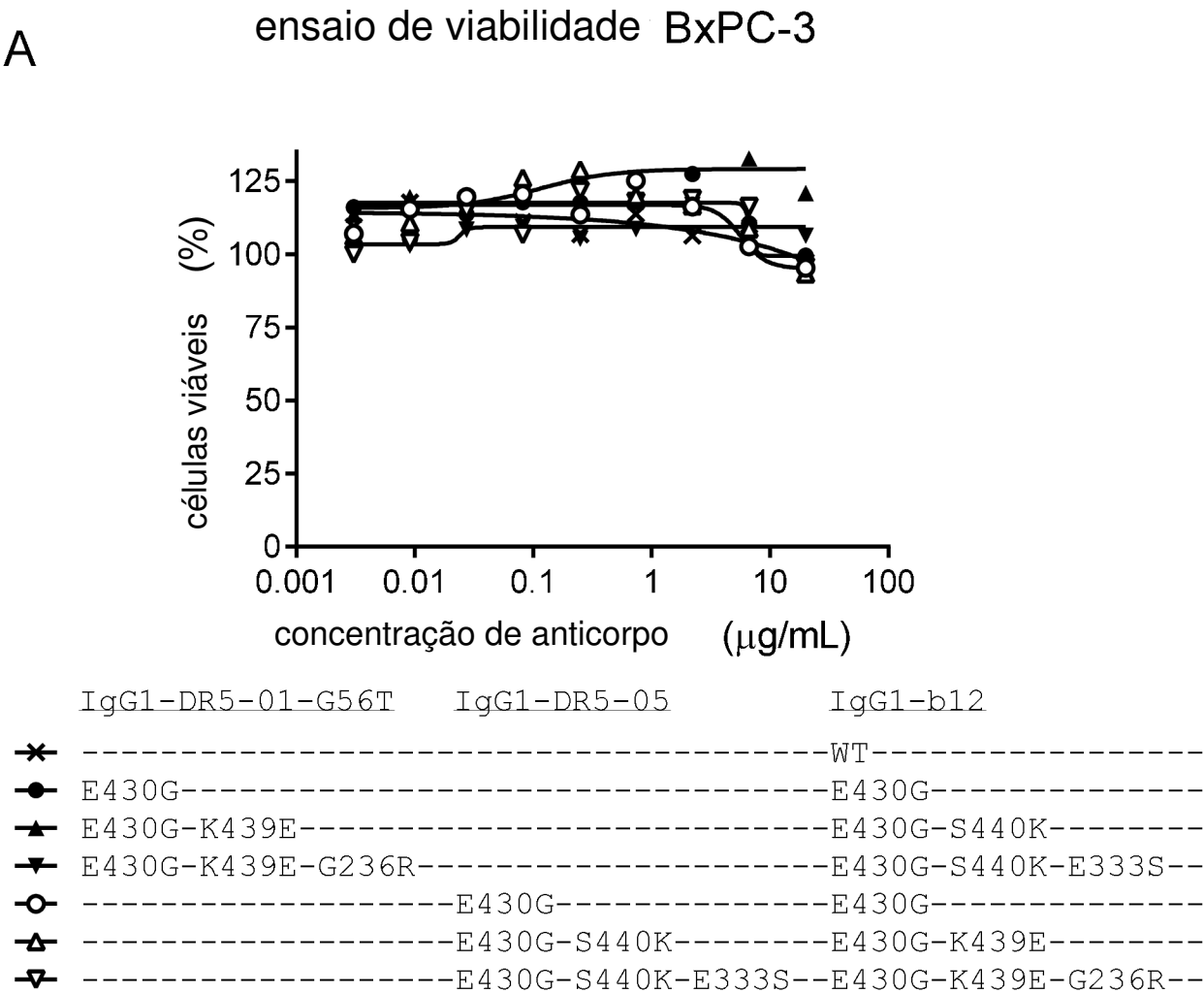
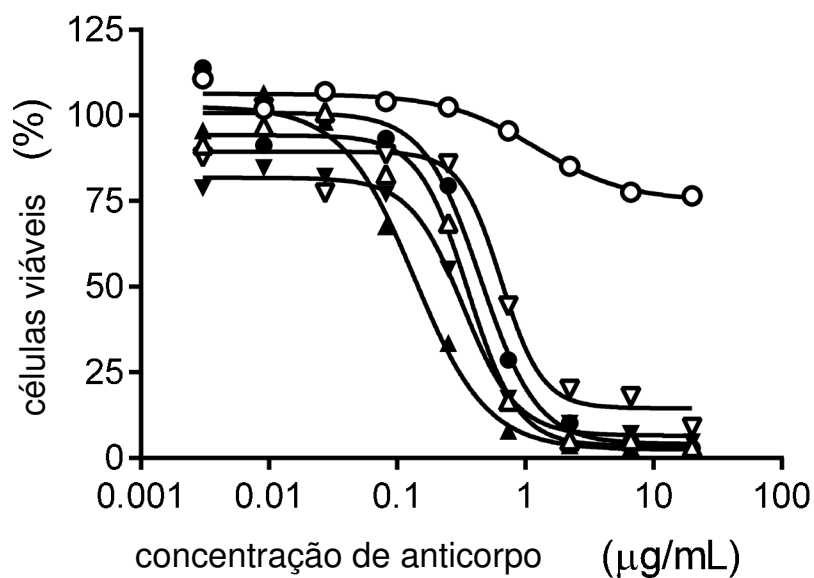


Figura 13 continuação

B ensaio de viabilidade BxPC-3



IgG1-DR5-01-G56T		IgG1-DR5-05	
○	WT	+	WT
●	E430G	+	E430G
△	E430G-K439E	+	E430G-S440K
▲	E430G-K439E	+	E430G-S440K-E333S
▽	E430G-K439E-G236R	+	E430G-S440K
▼	E430G-K439E-G236R	+	E430G-S440K-E333S

Figura 14

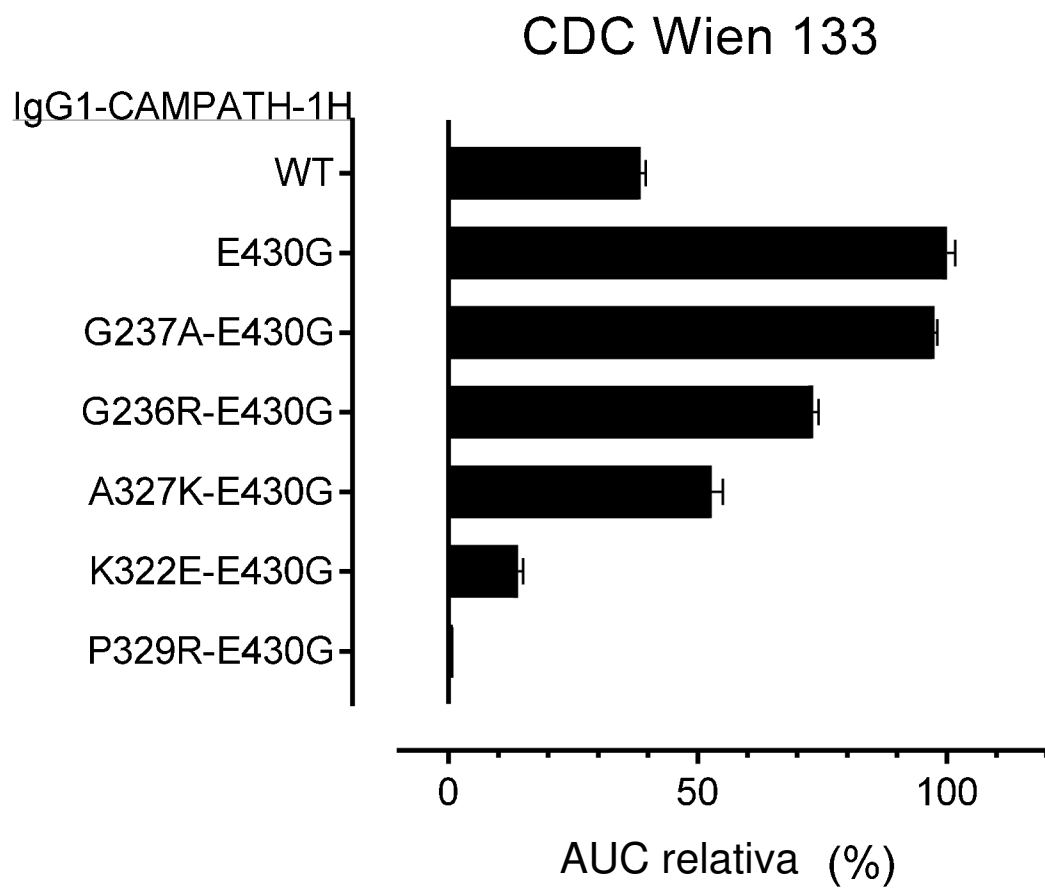
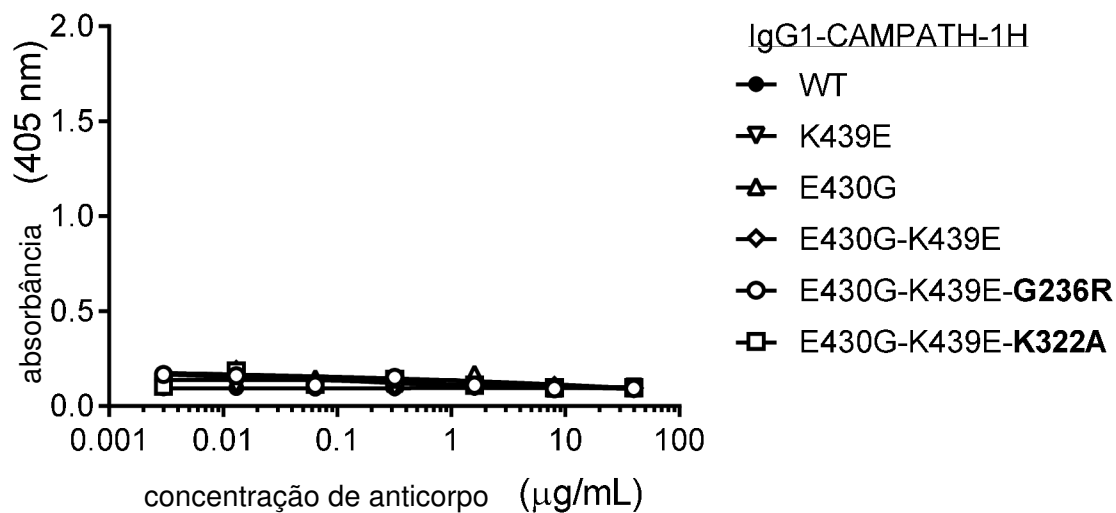


Figura 15

A ligação de FcRn pH 7.4



B ligação de FcRn pH 6

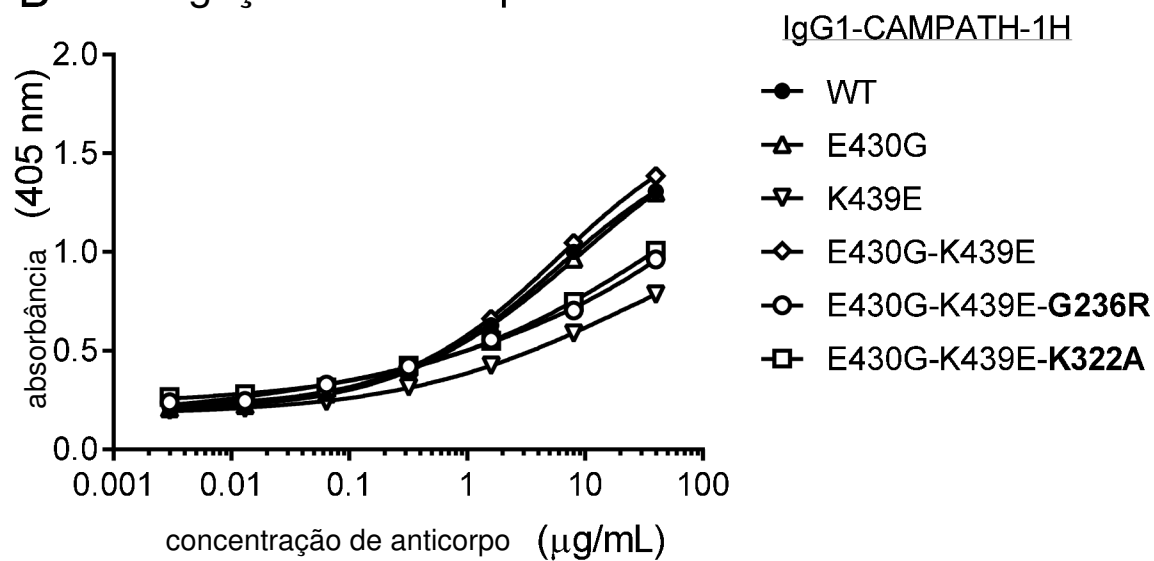
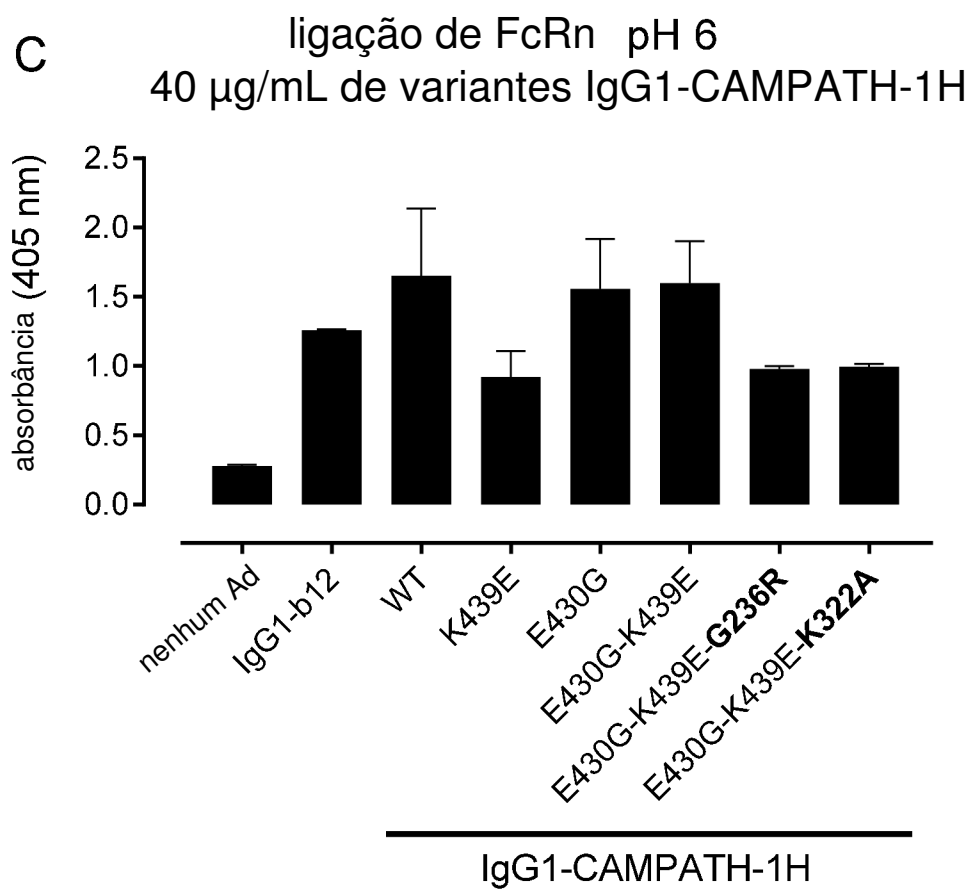


Figura 15 continuação



D ligação de FcRn pH 7.4

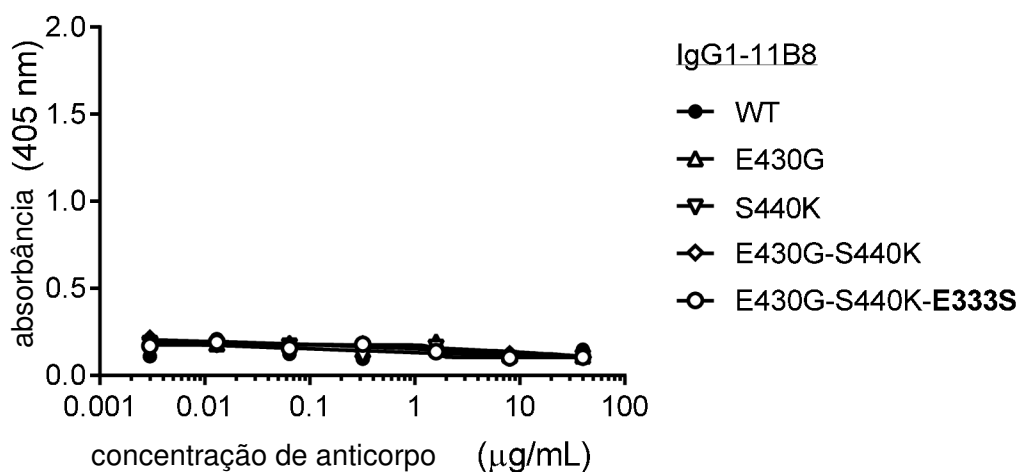
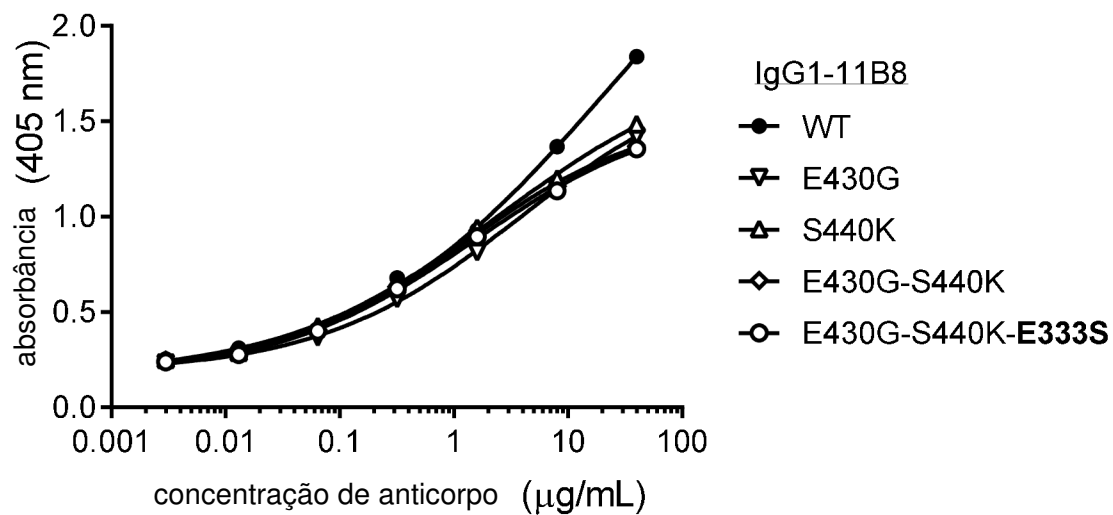


Figura 15 continuação

E ligação de FcRn pH 6



F ligação de FcRn pH 6 40 $\mu\text{g/mL}$ de variantes IgG1-11B8

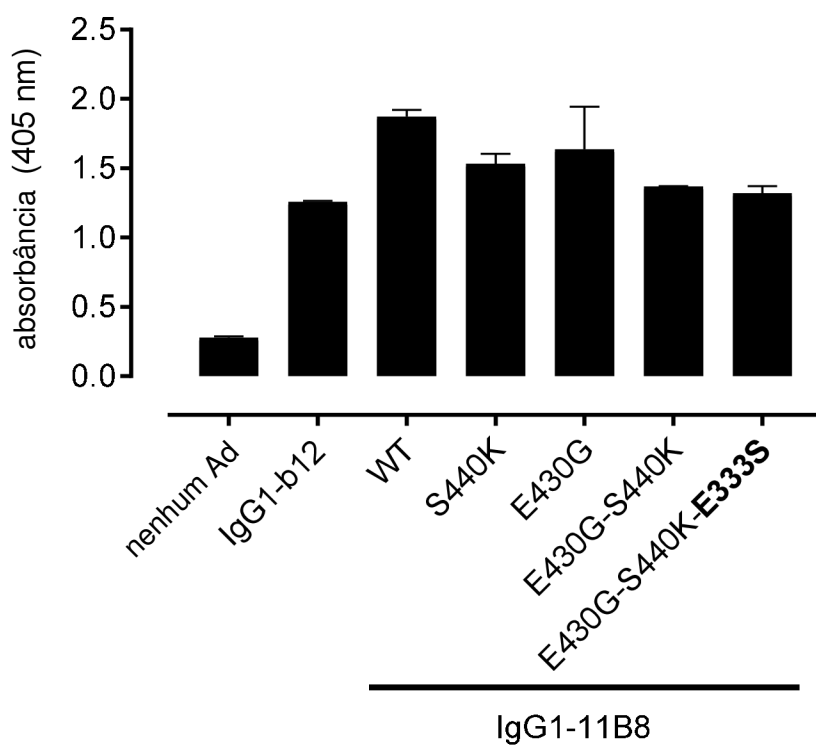


Figura 16

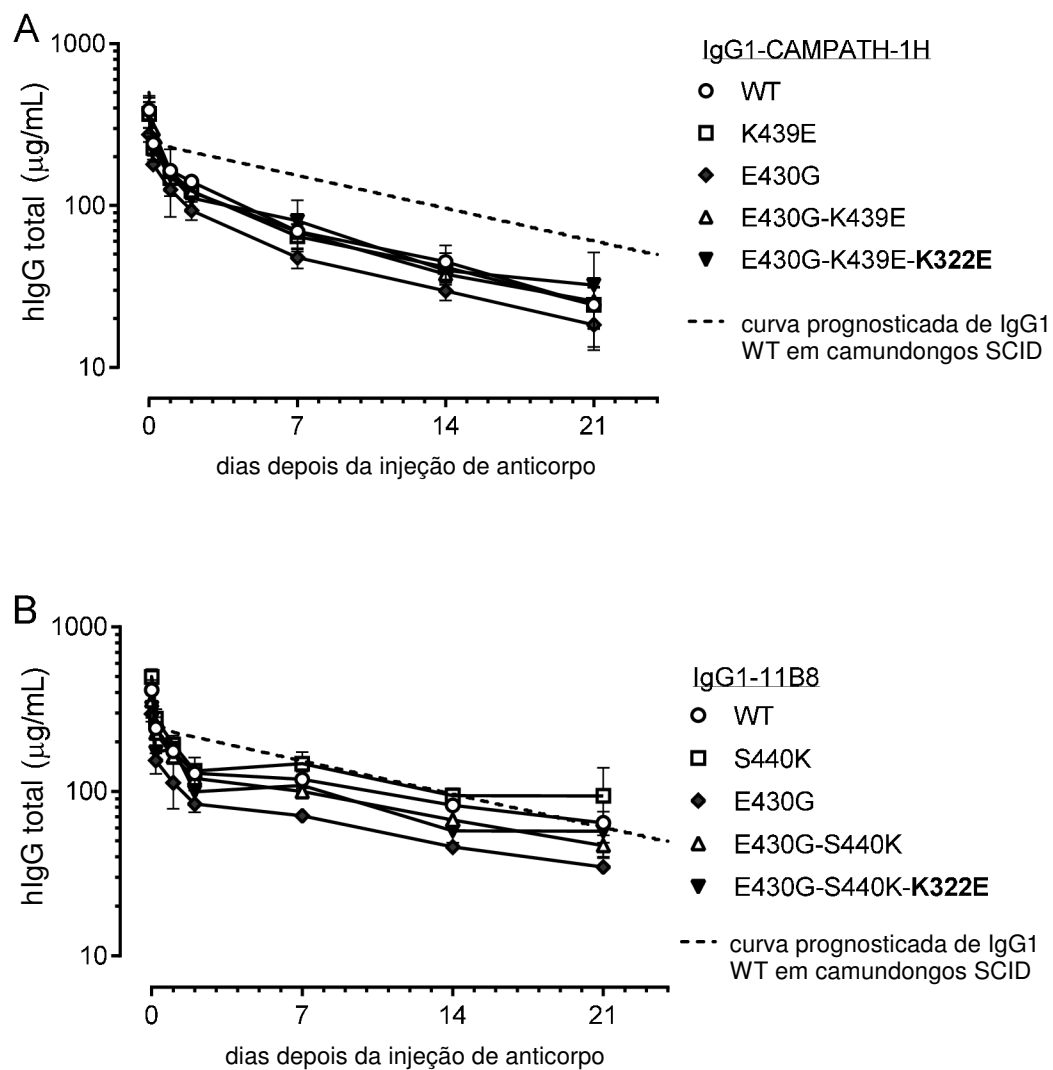


Figura 16 continuação

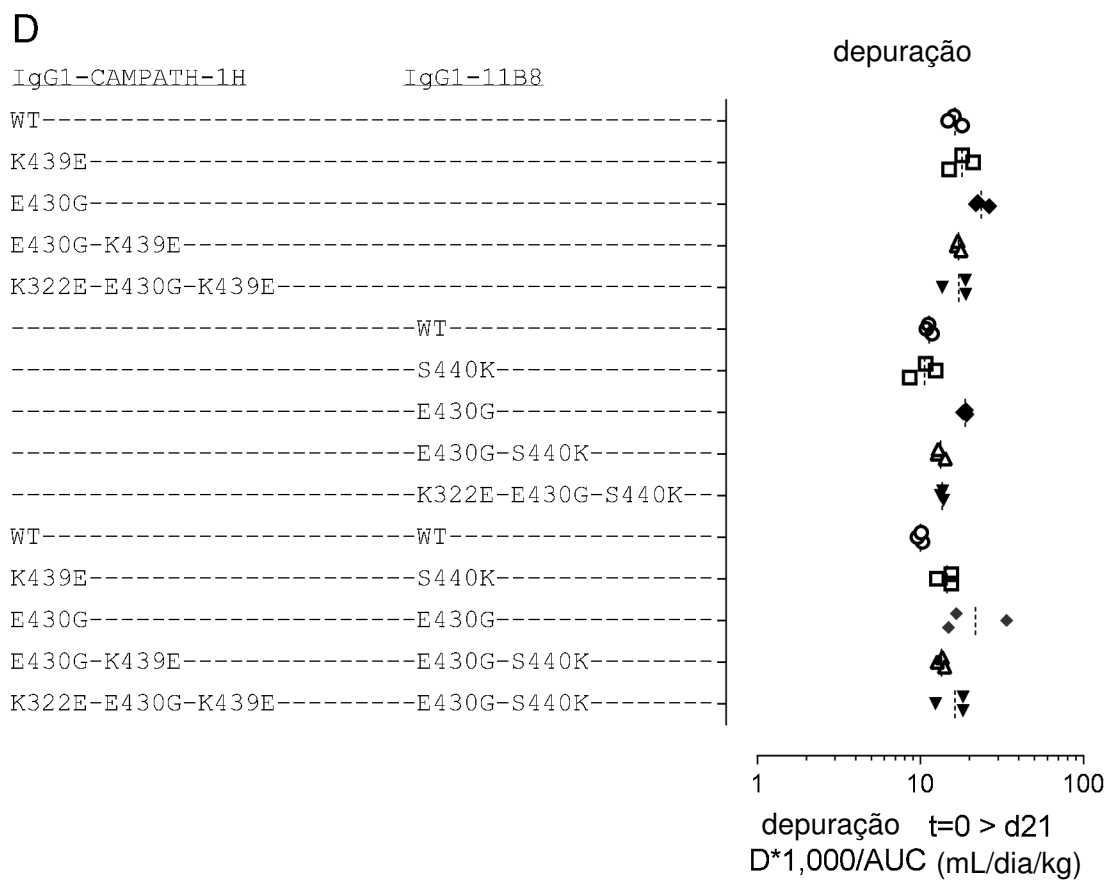
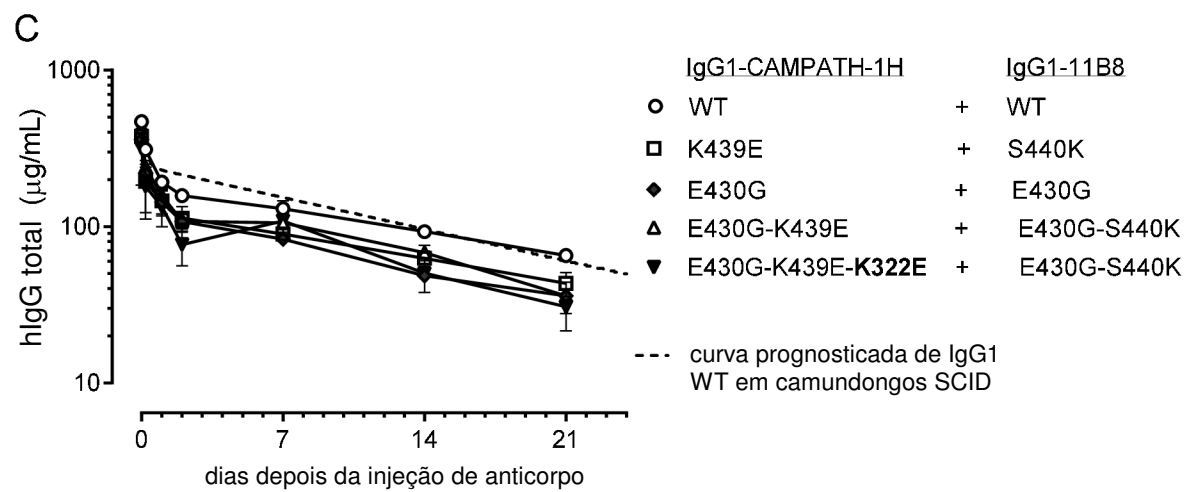


Figura 17

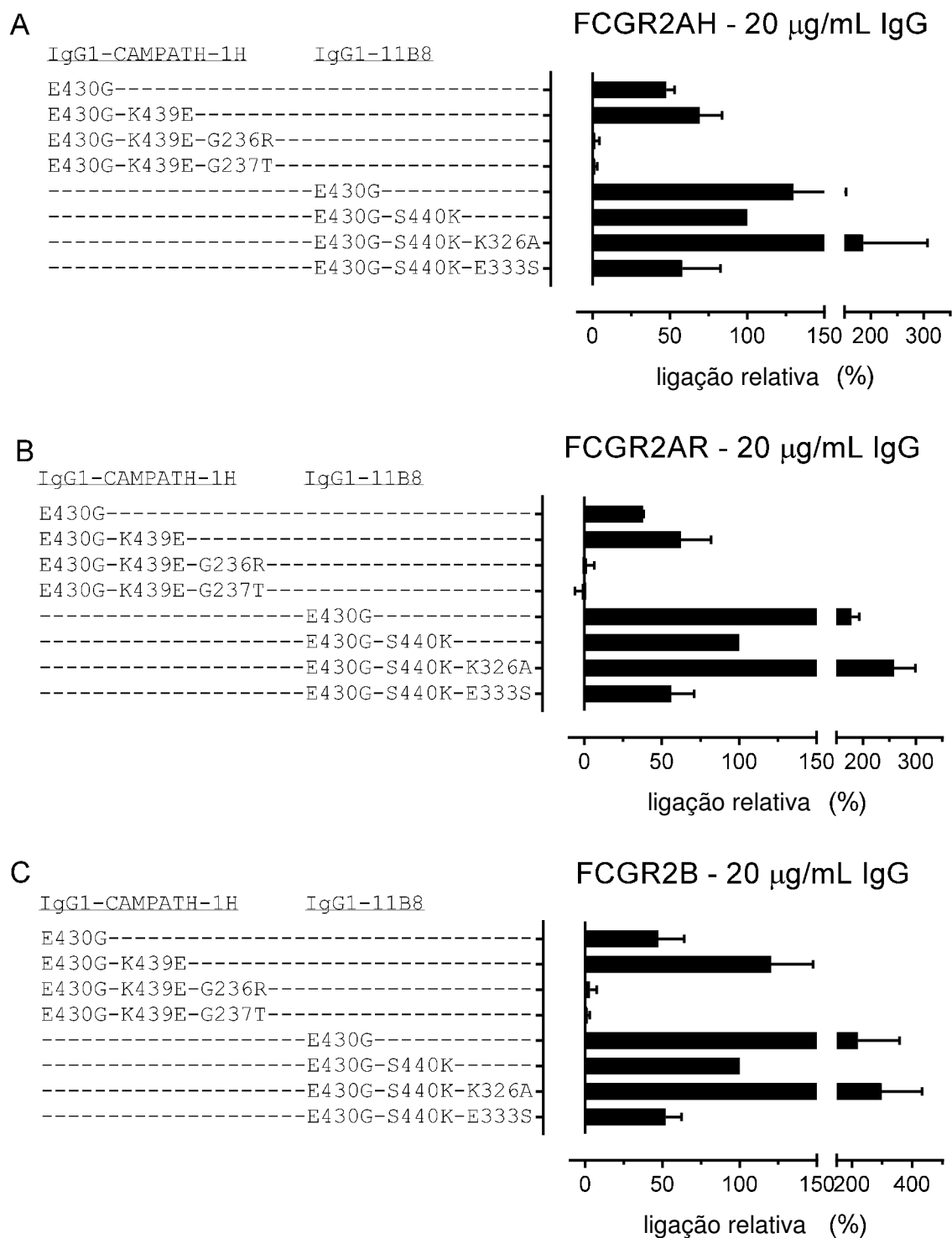


Figura 17 Continuação

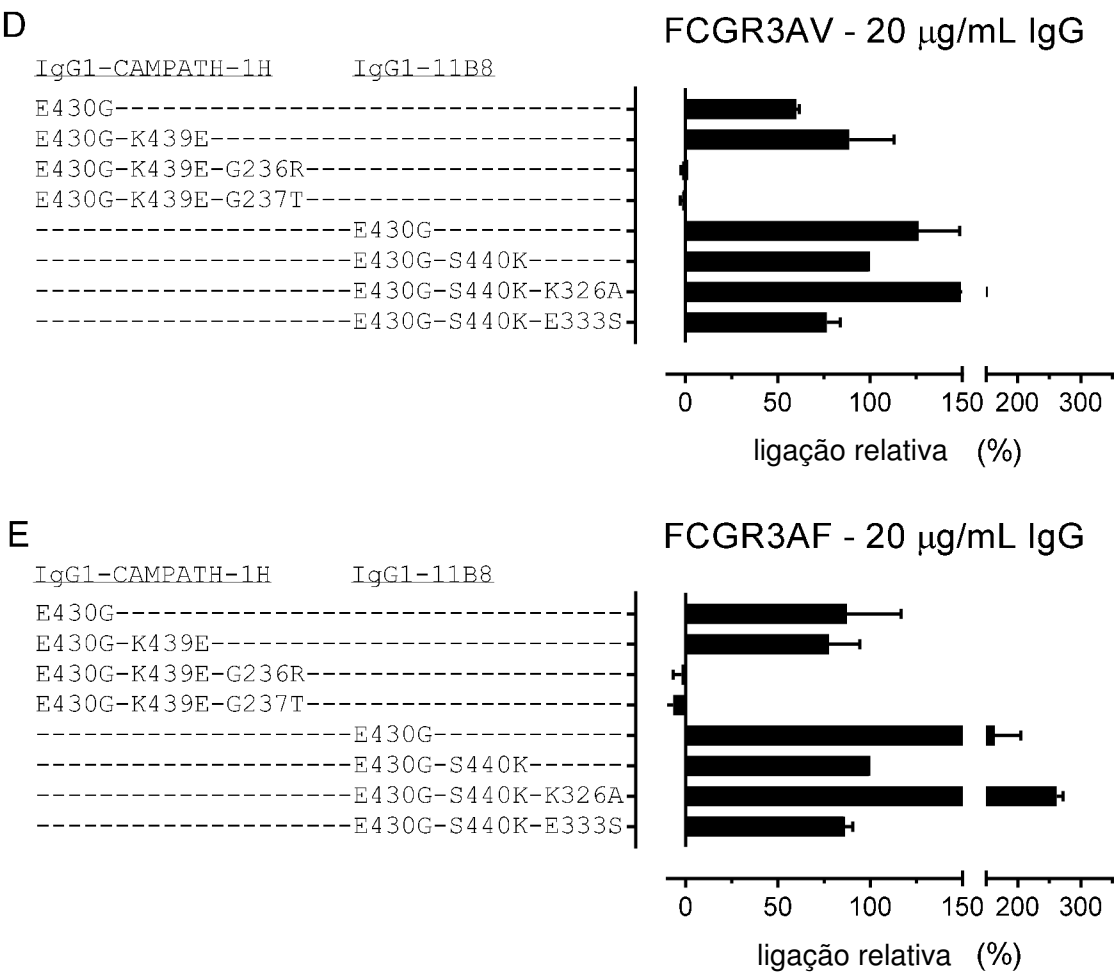


Figura 18

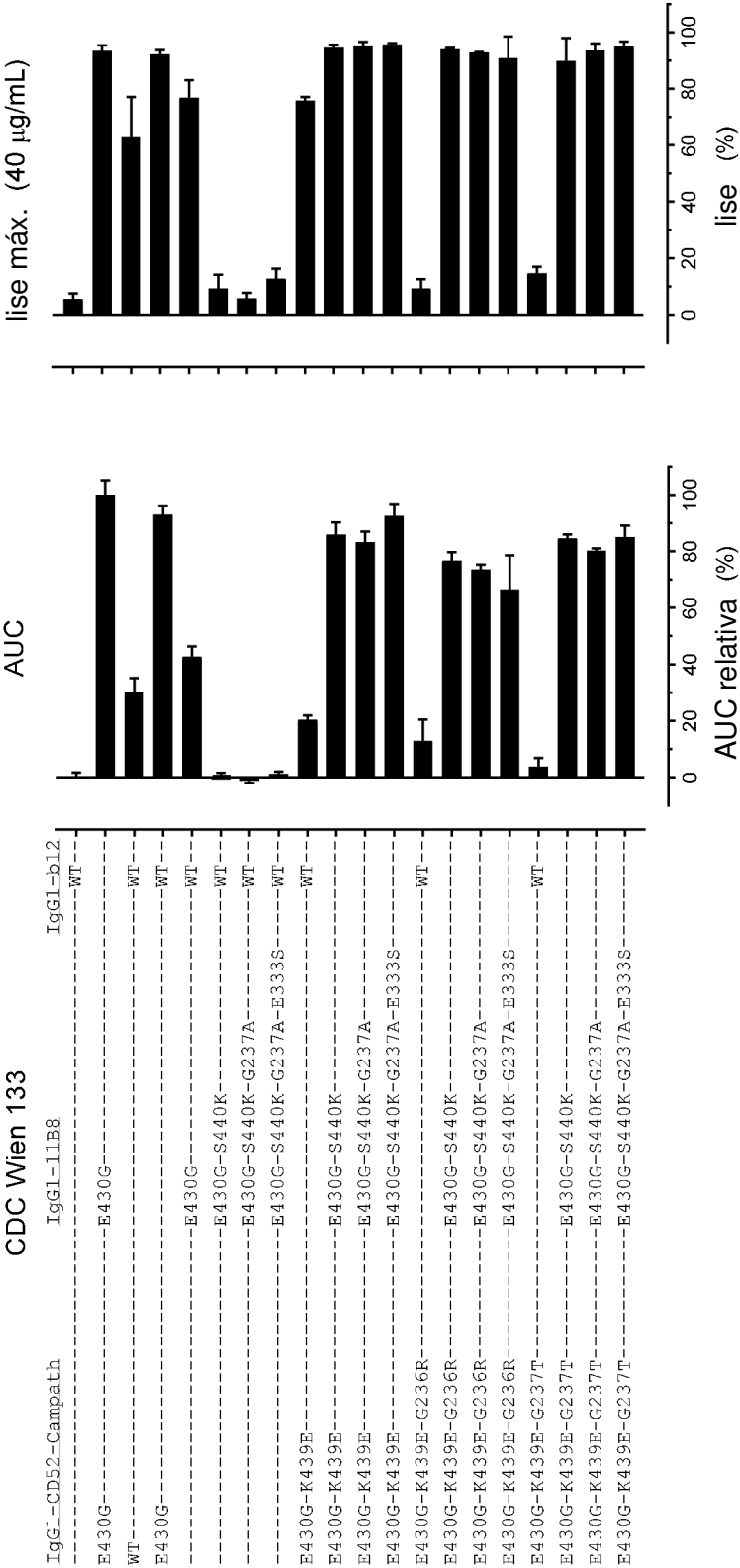


Figura 19
A

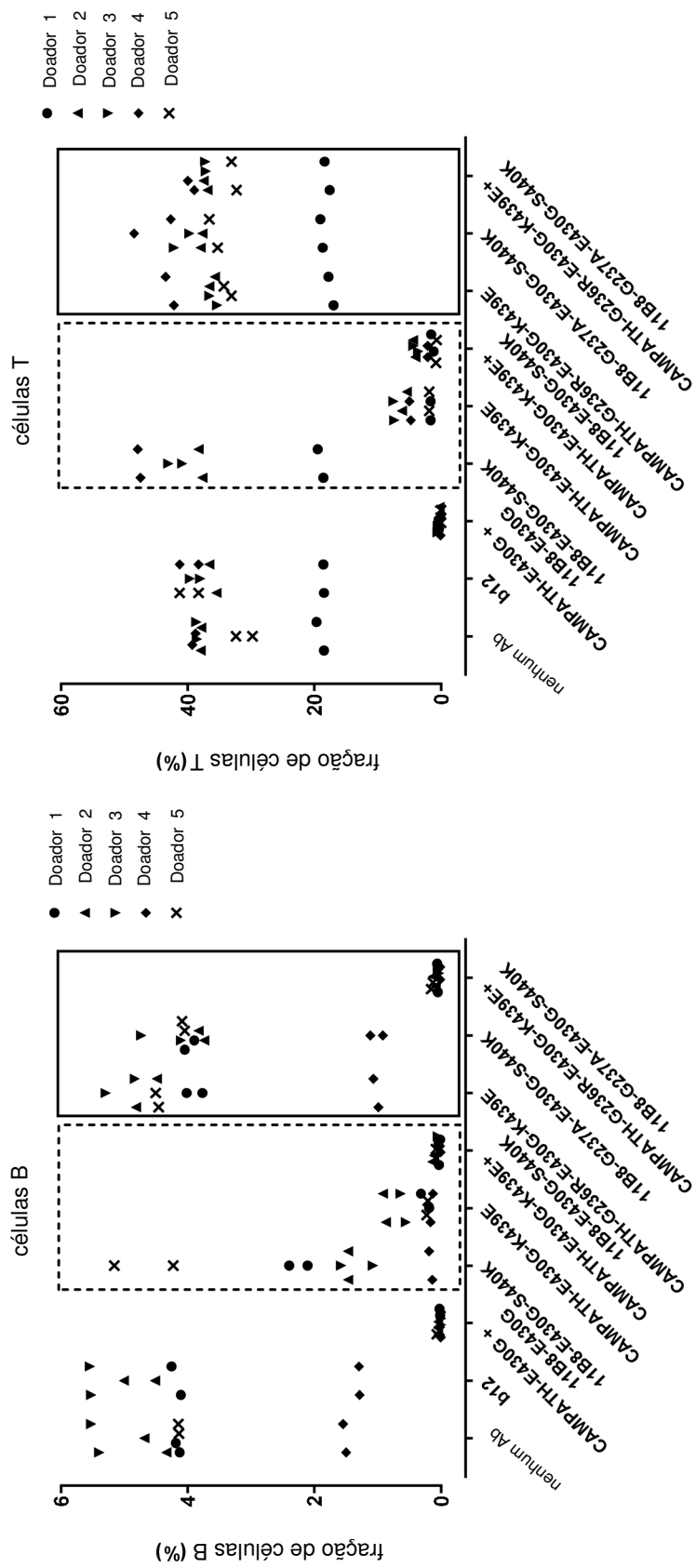


Figura 19 Continuação

B

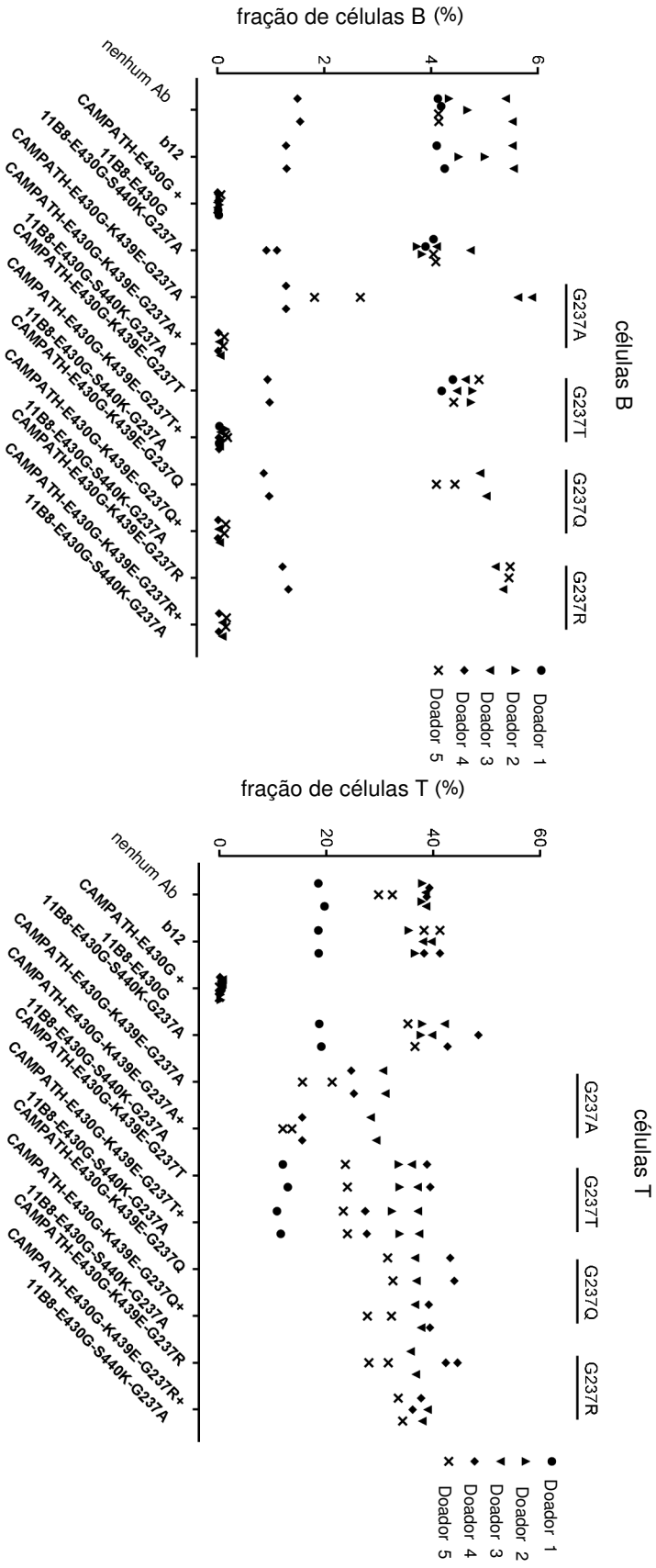


Figura 19 Continuação

C

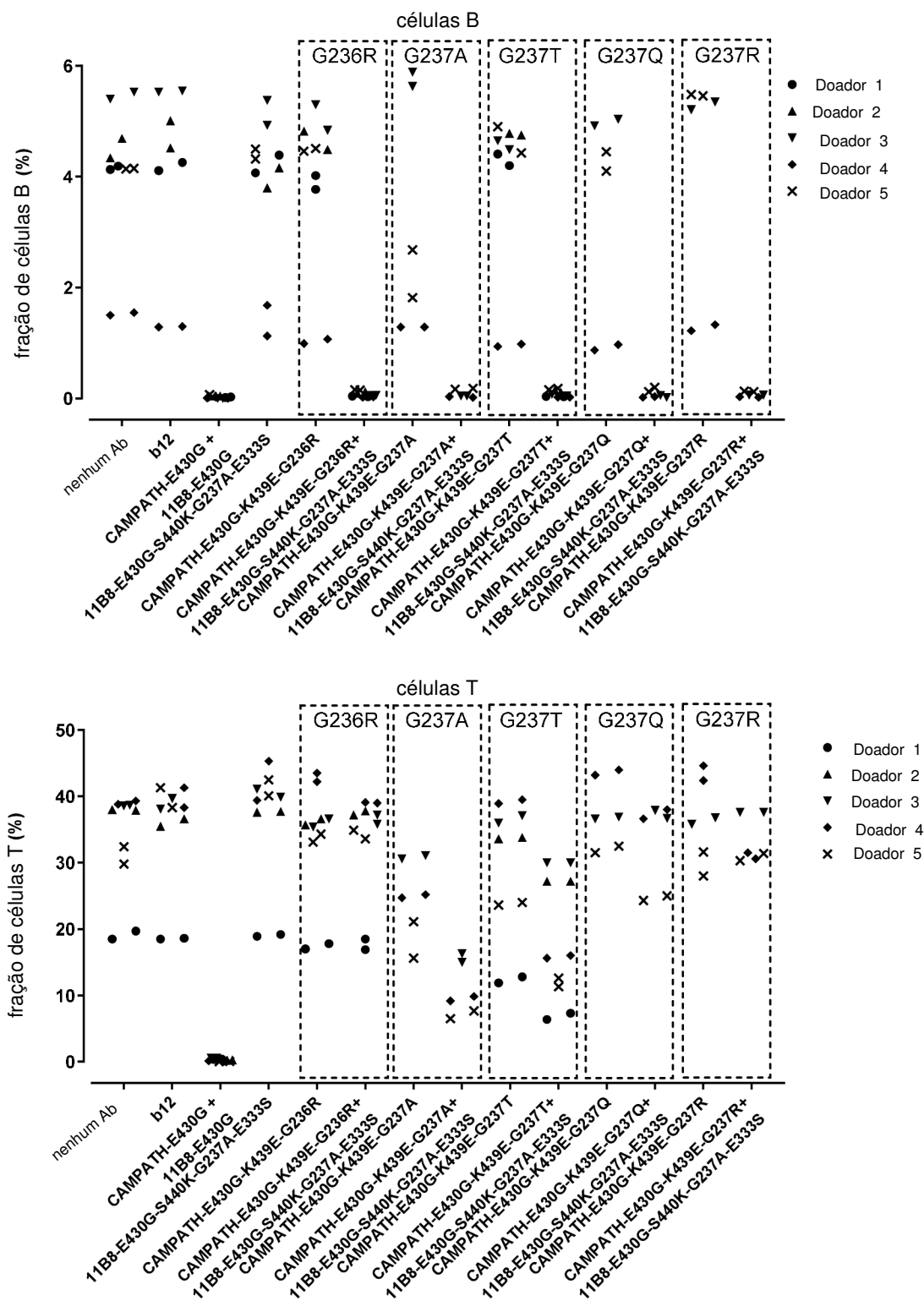


Figura 20

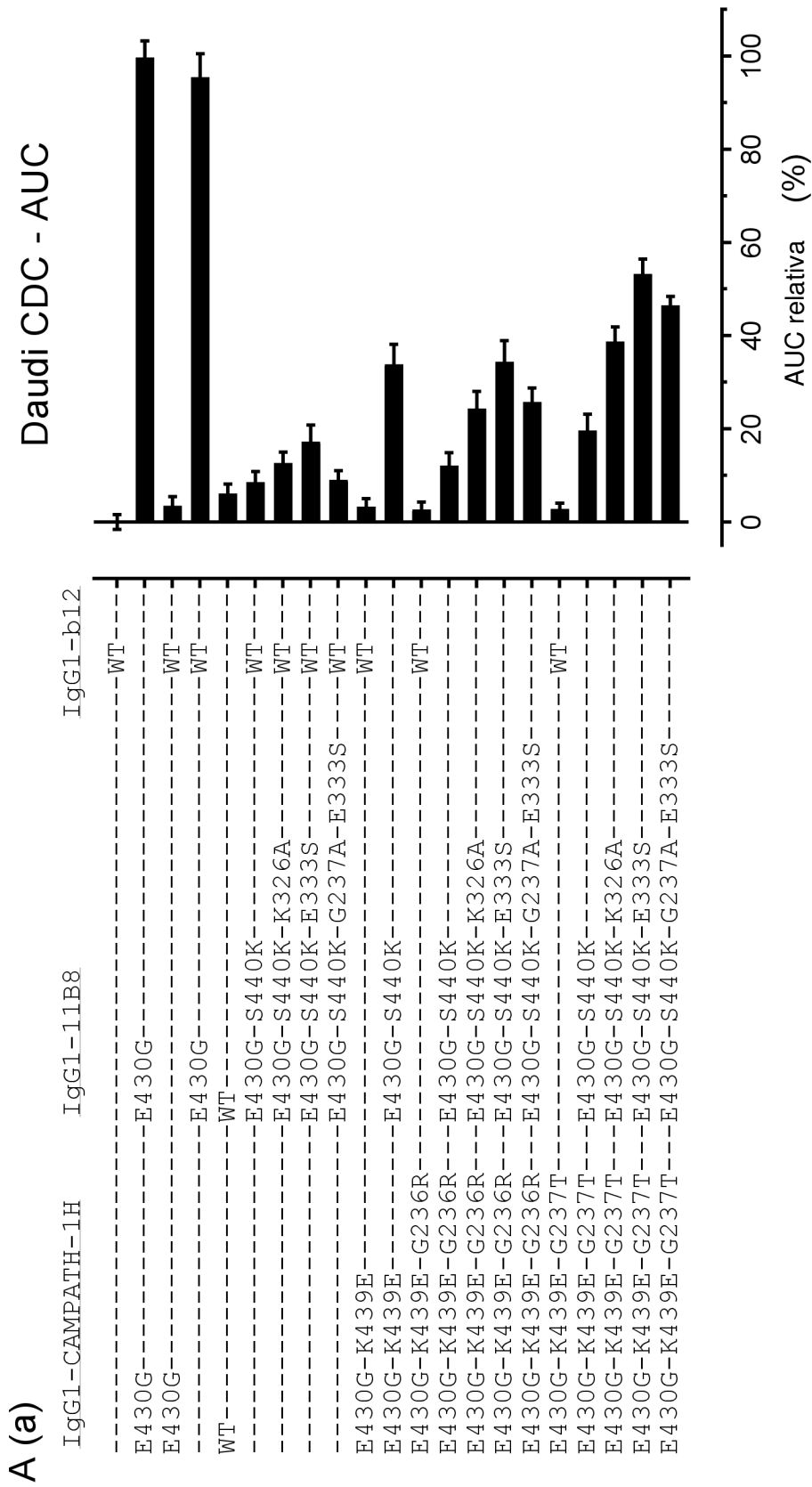




Figura 20 Continuação

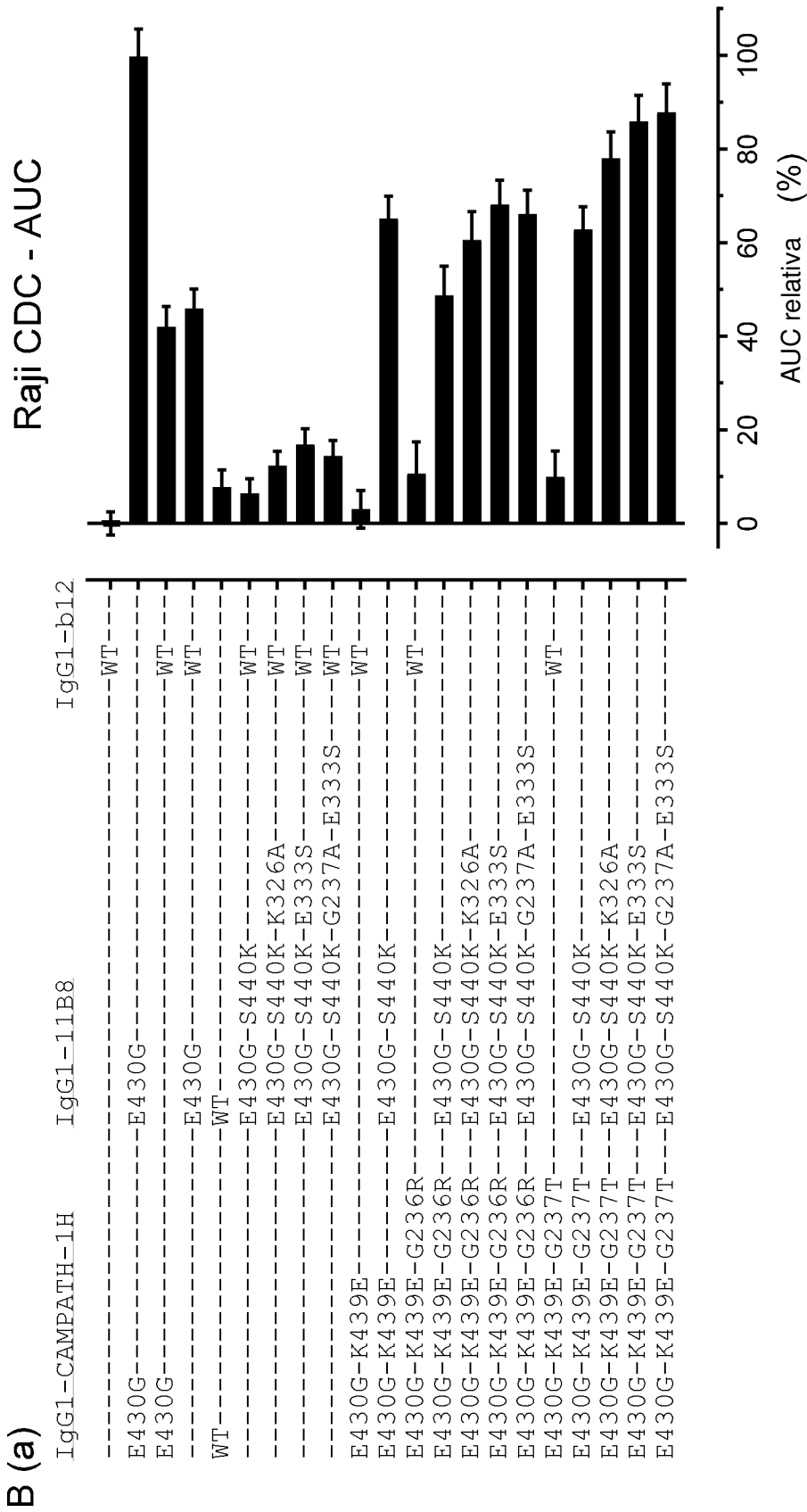


Figura 20 Continuação

B (b)

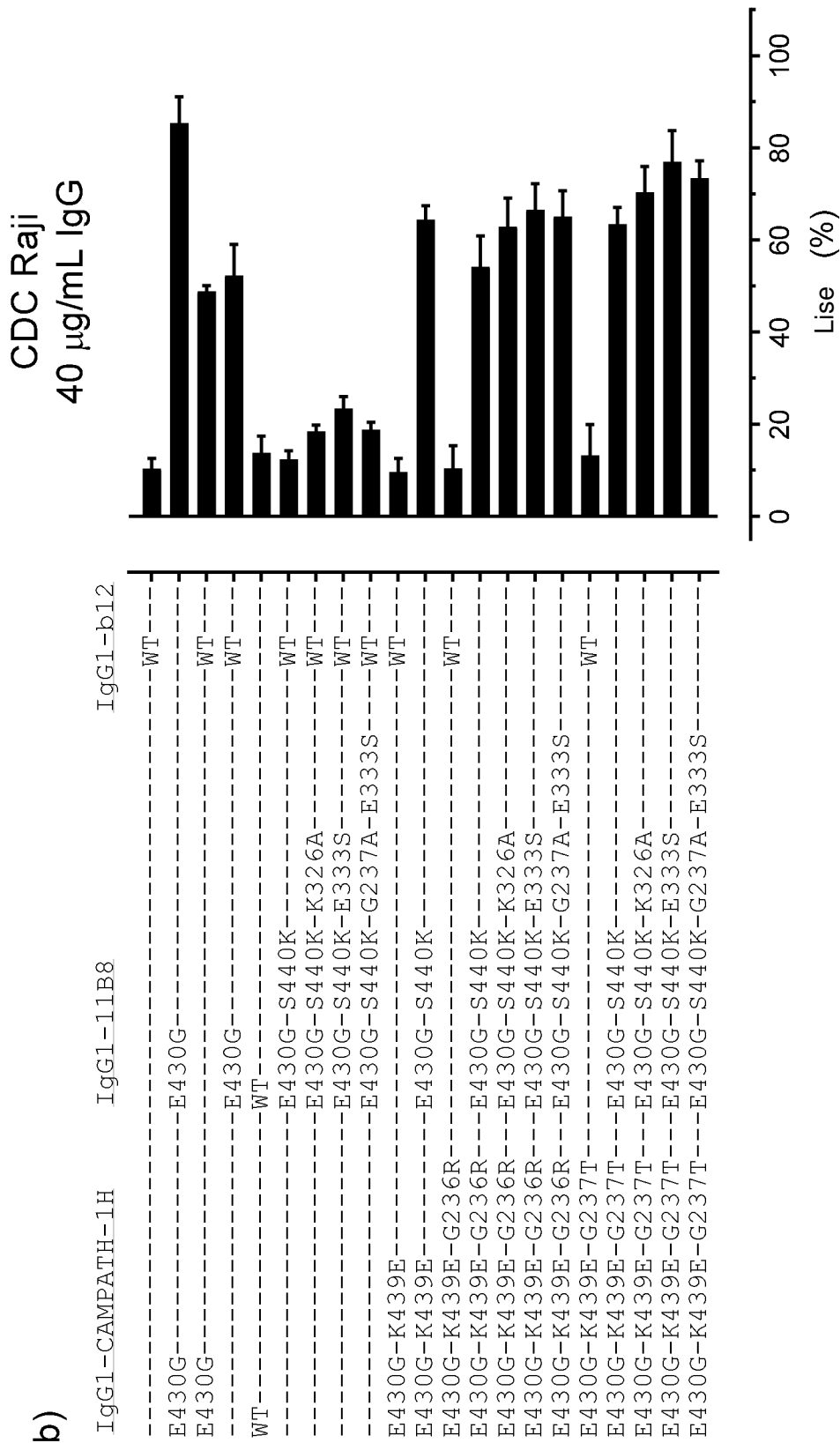


Figura 20 Continuação

C (a)

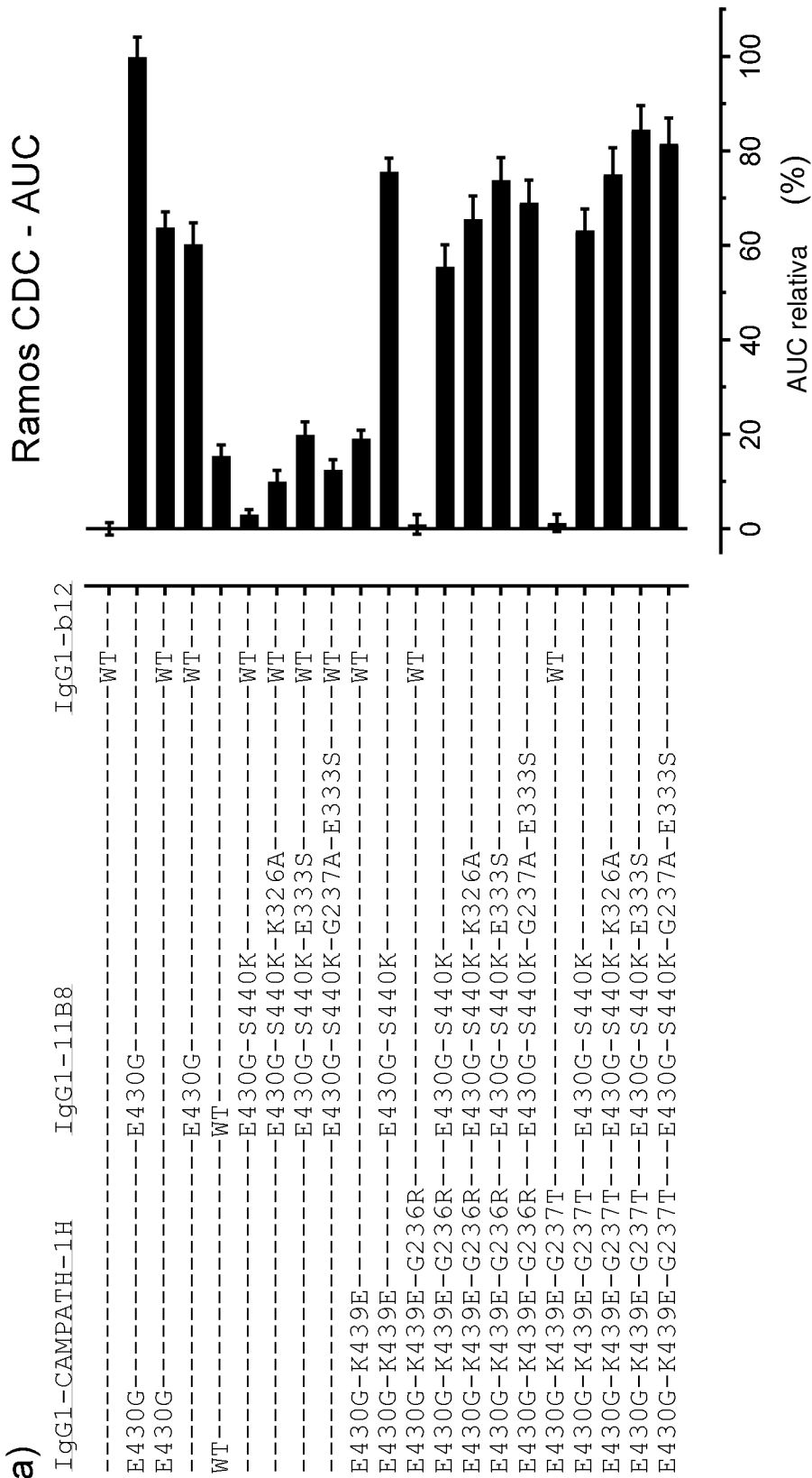


Figura 20 Continuação

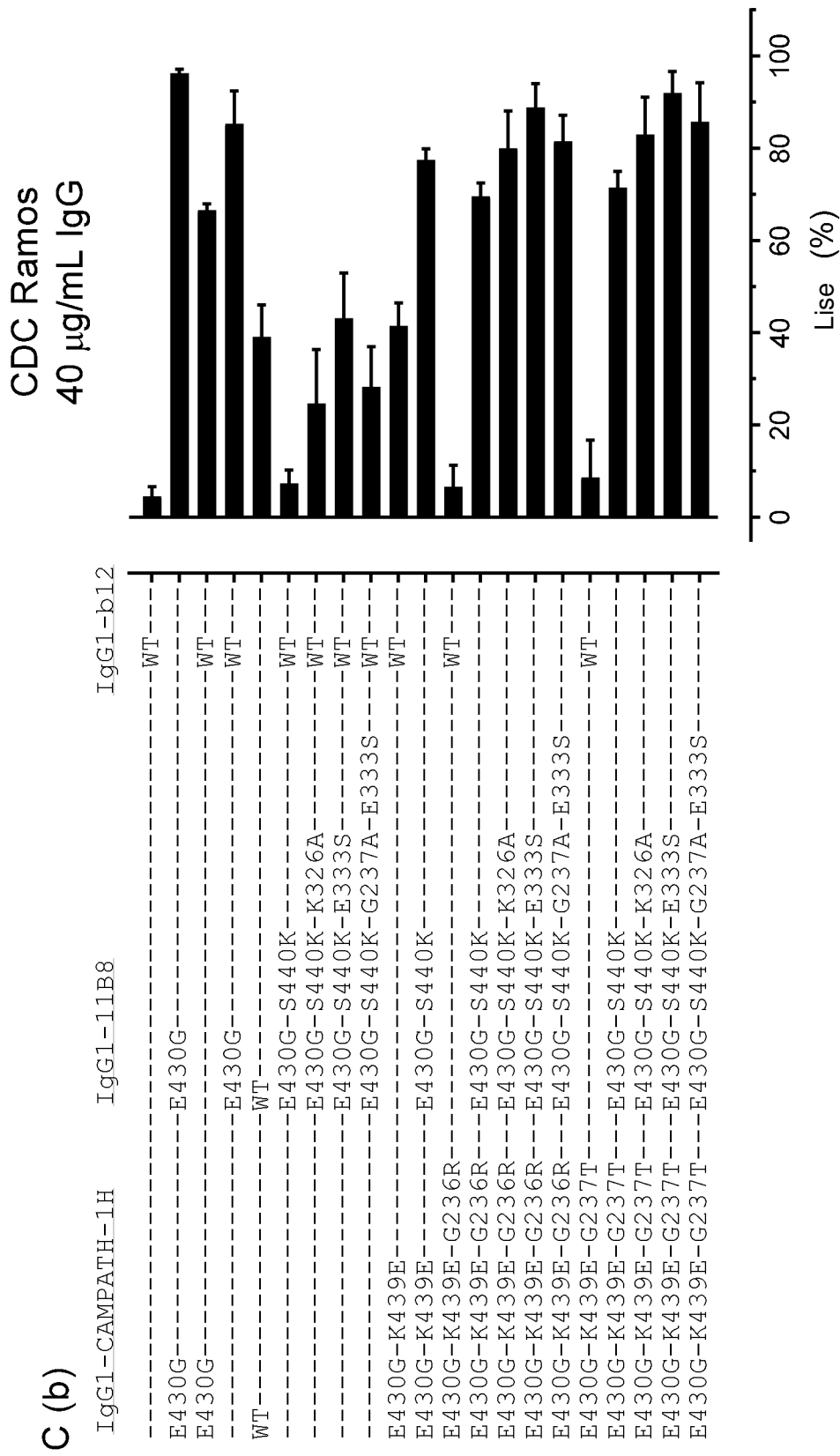


Figura 20 Continuação

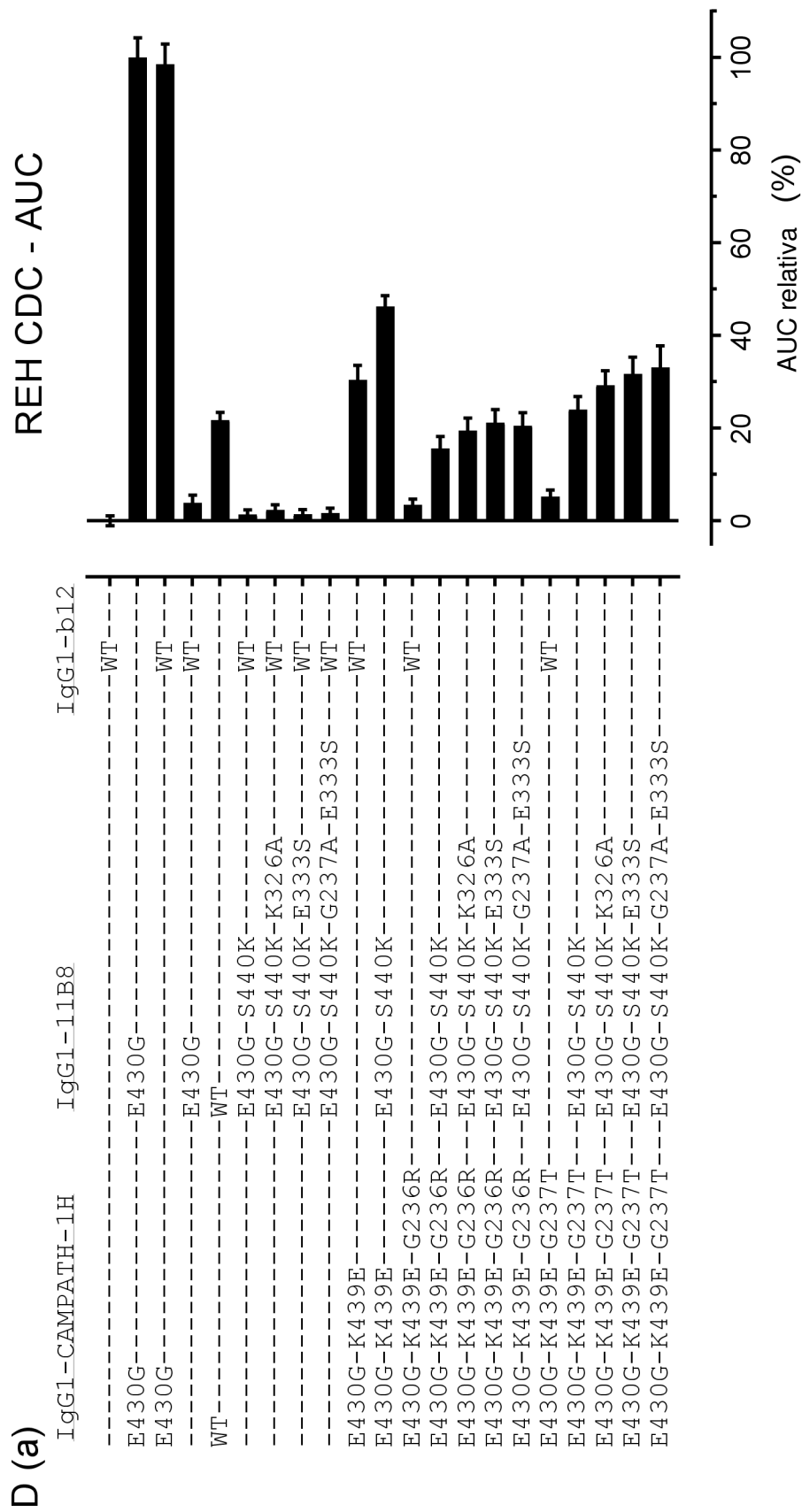


Figura 20 Continuação

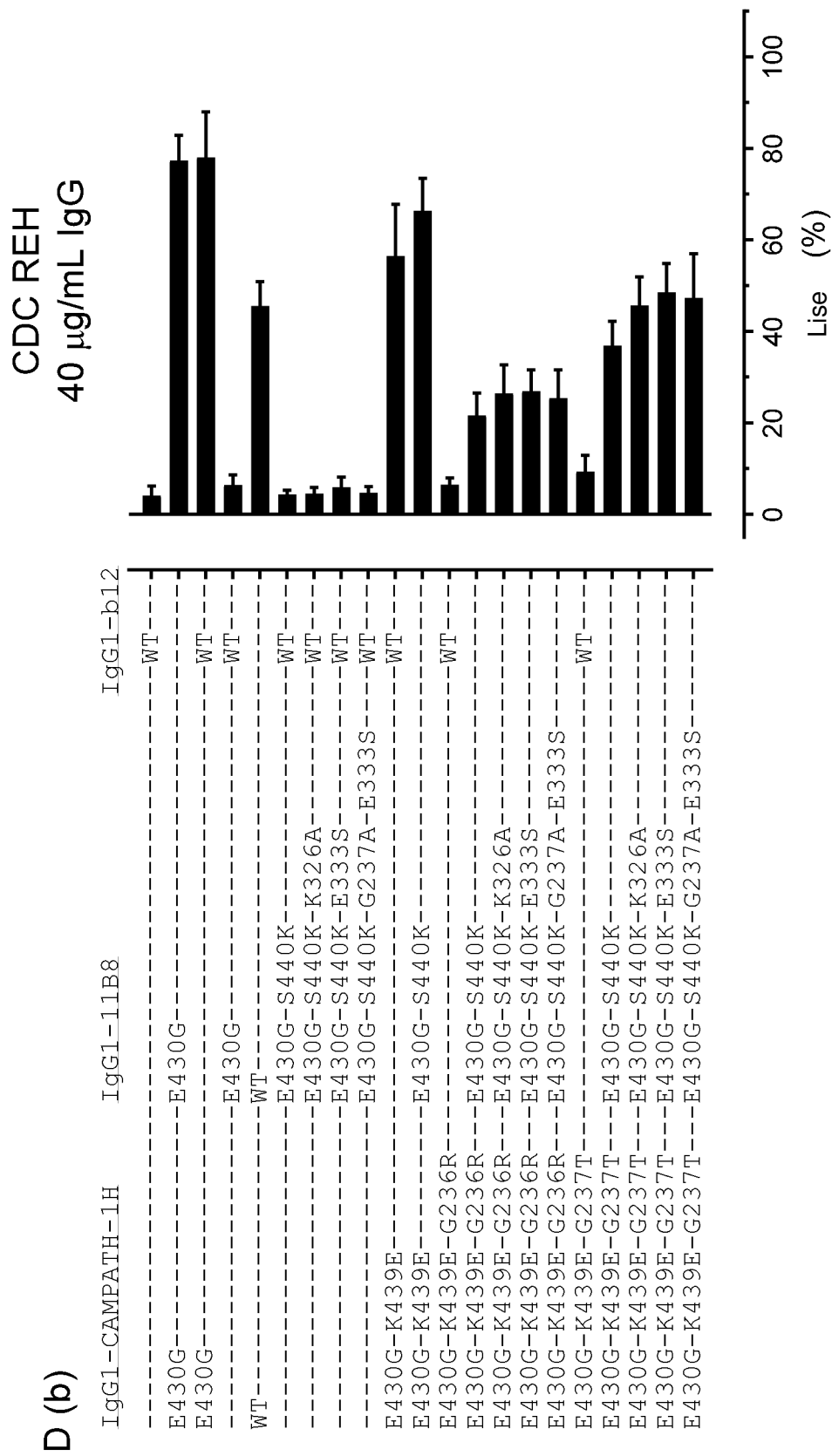


Figura 20 Continuação

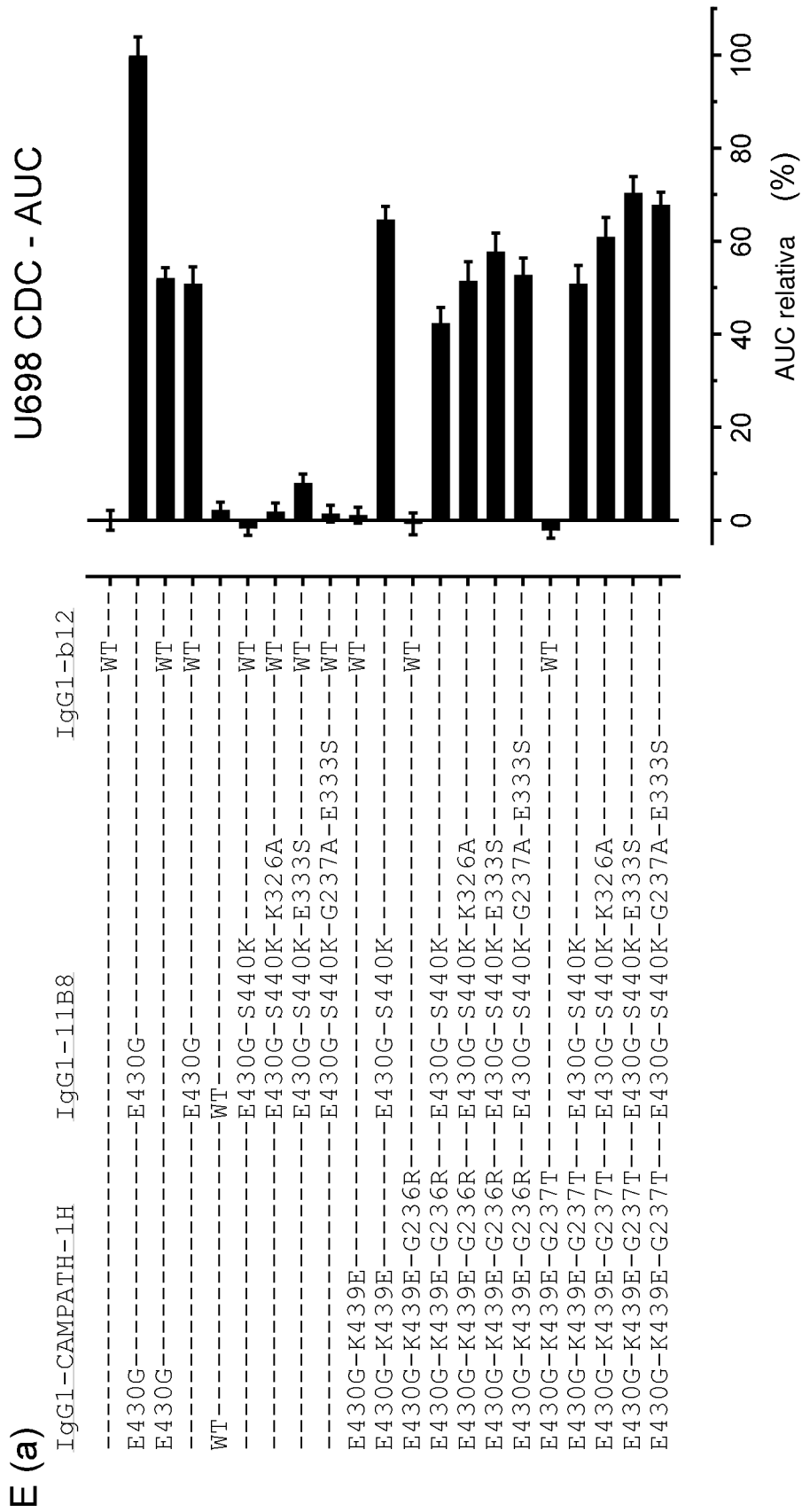


Figura 20 Continuação

E (b)

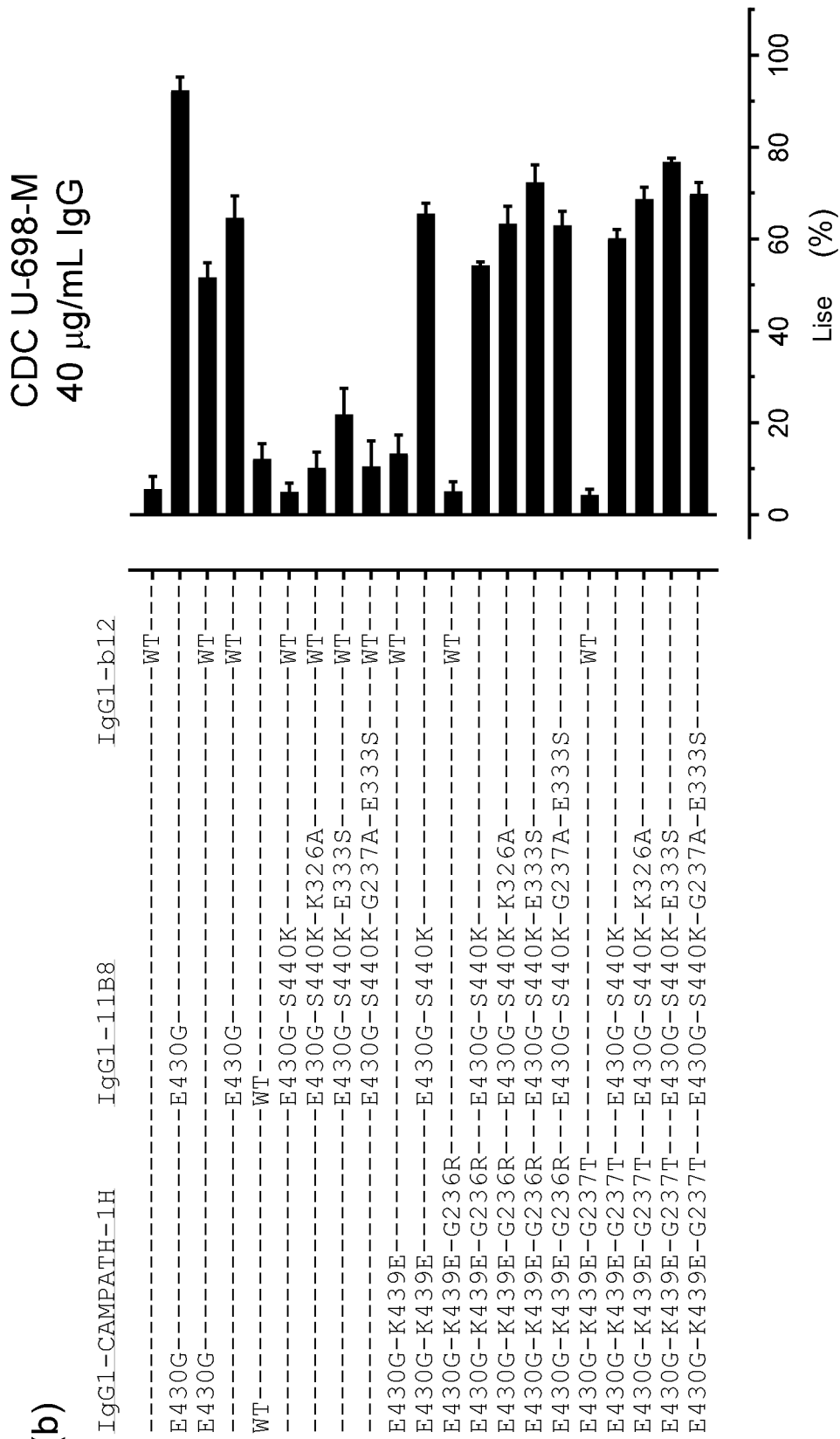


Figura 21

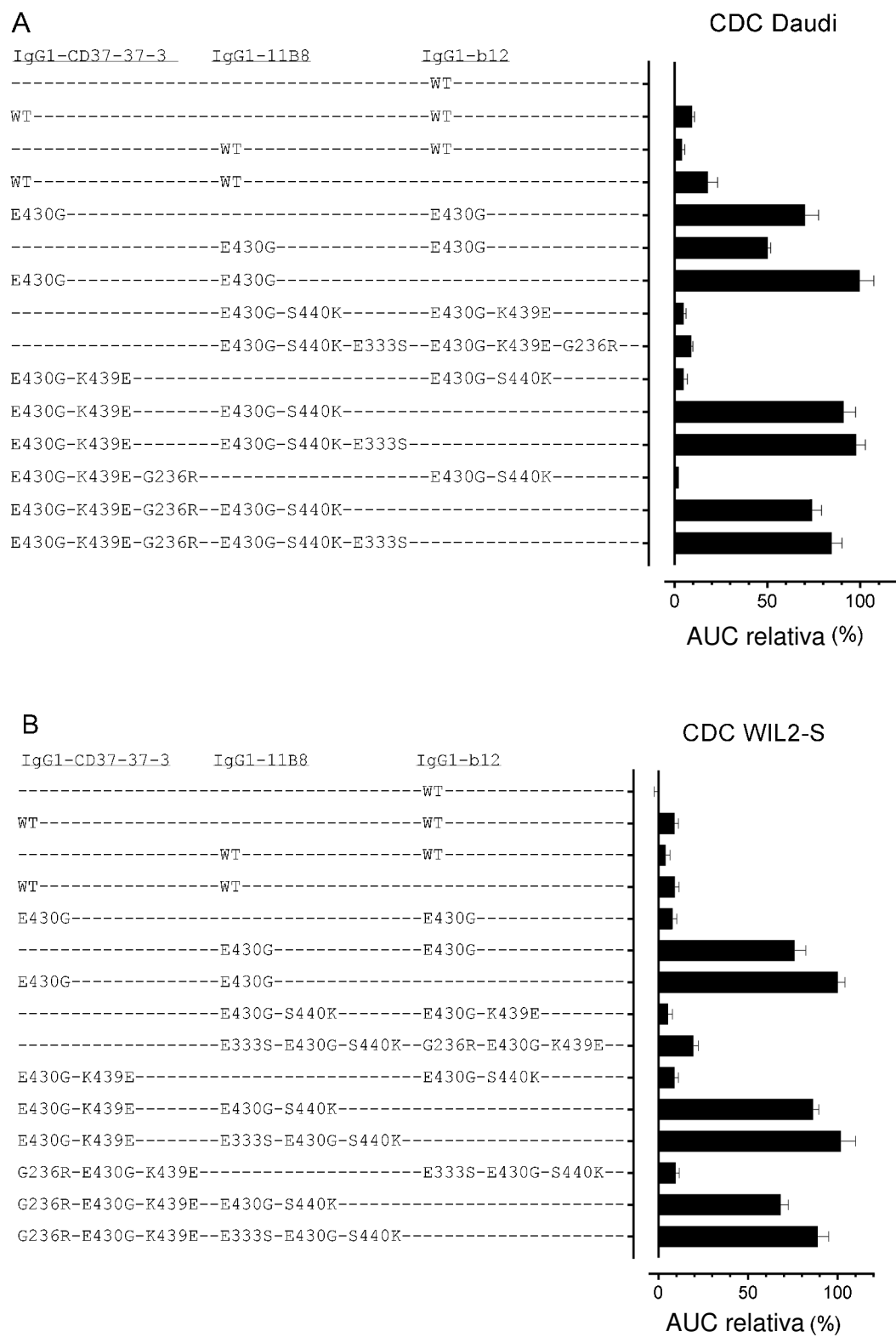
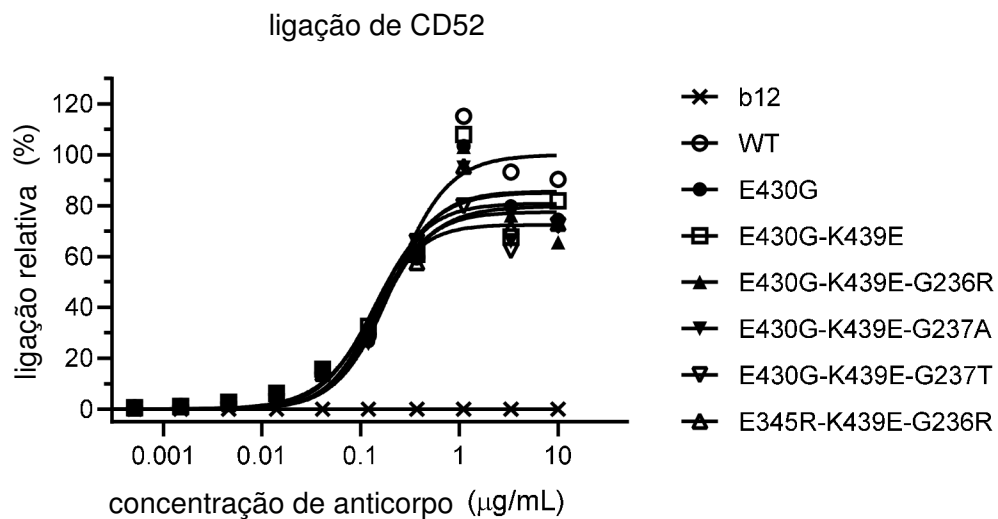
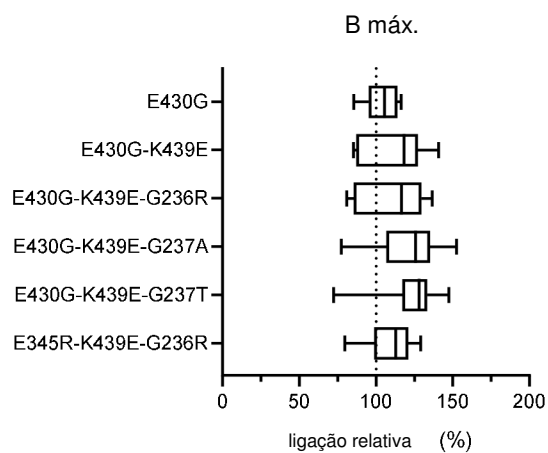


Figura 22

A



B



C

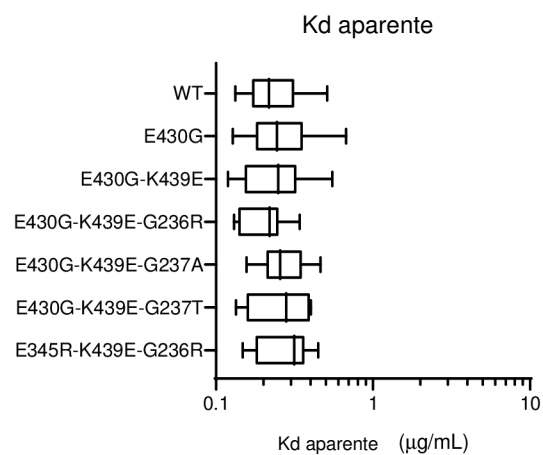
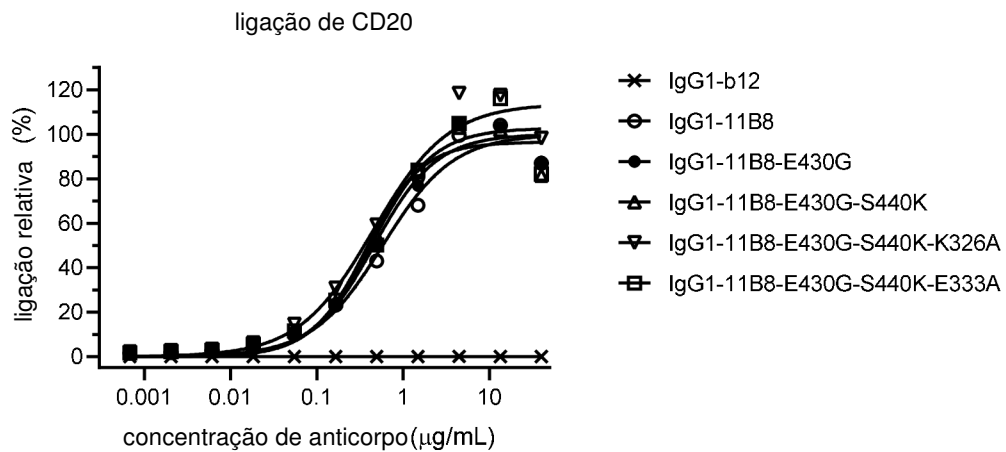


Figura 23

A



B

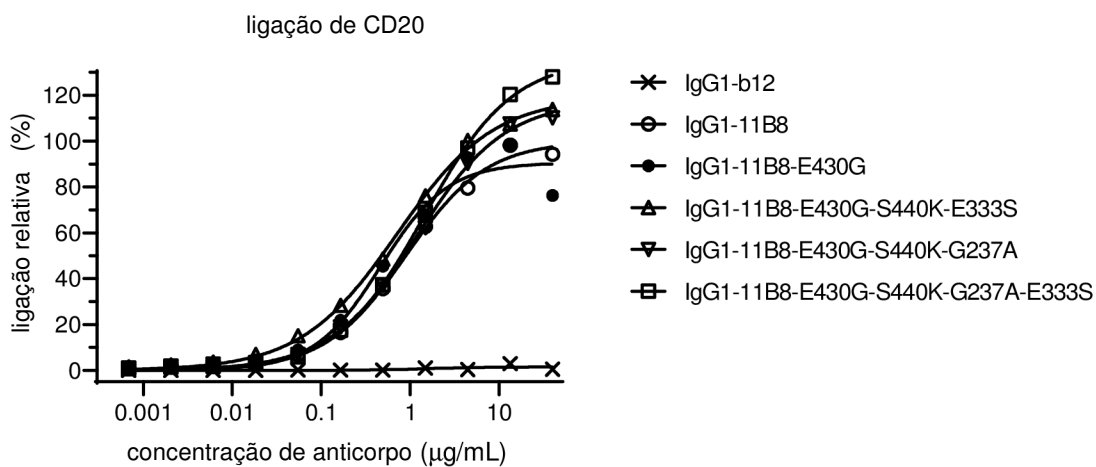
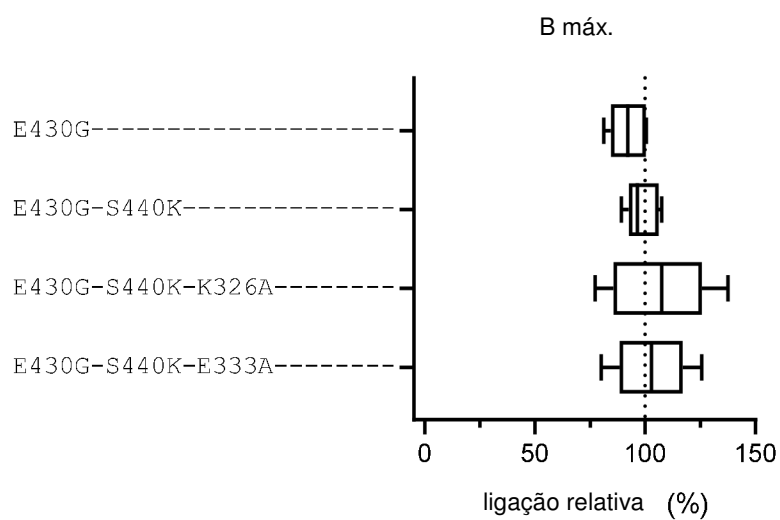


Figura 23 continuação

C



D

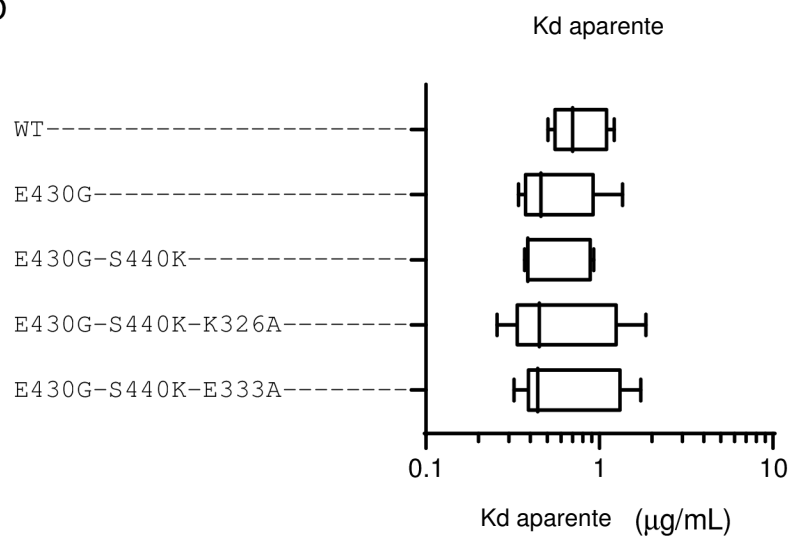
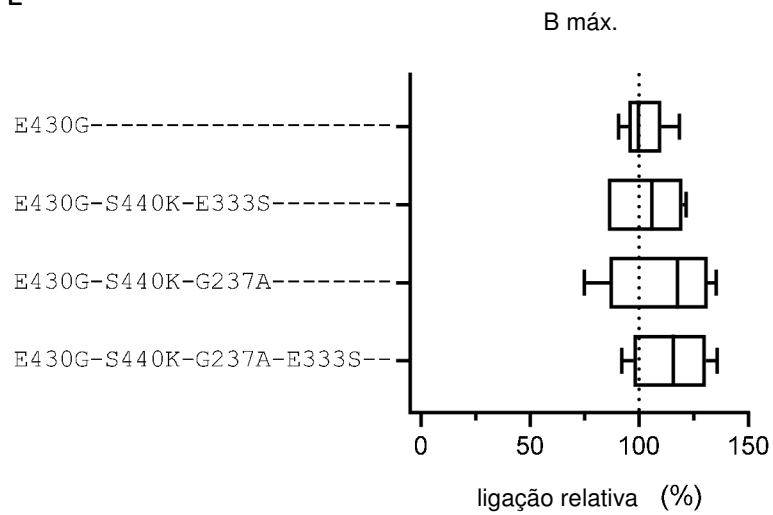


Figura 23 continuação

E



F

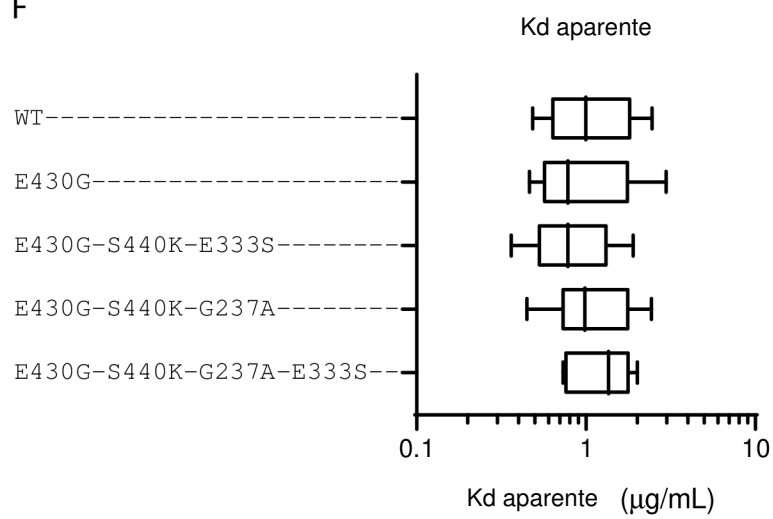
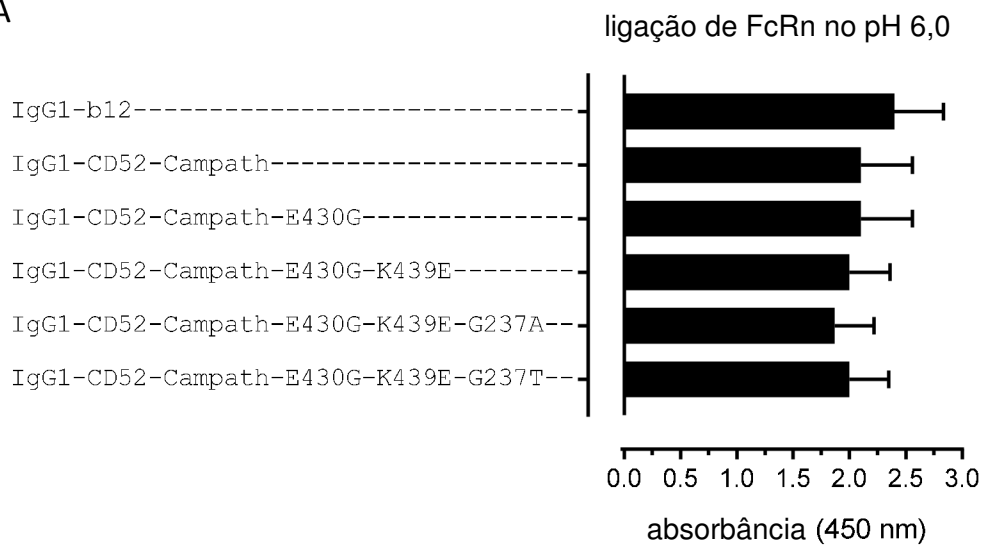


Figura 24

A



B

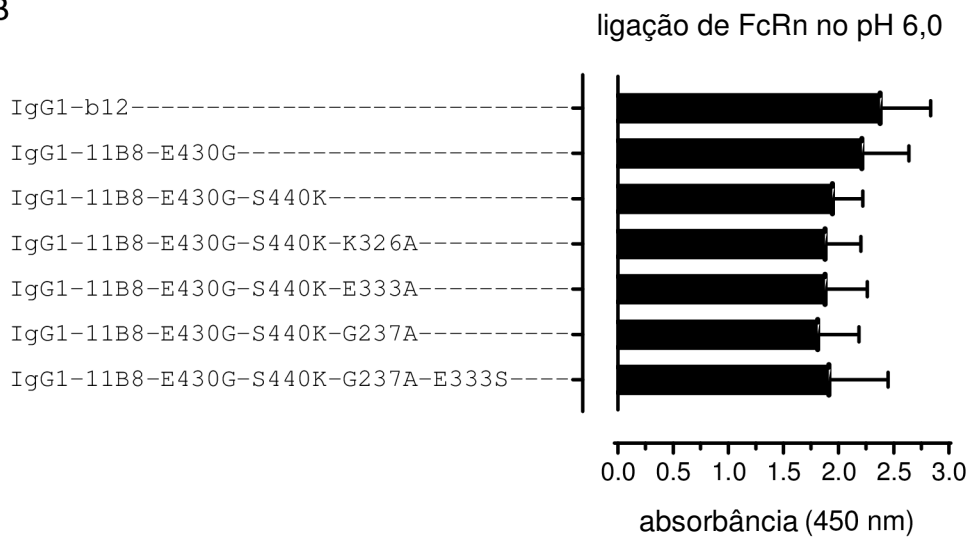
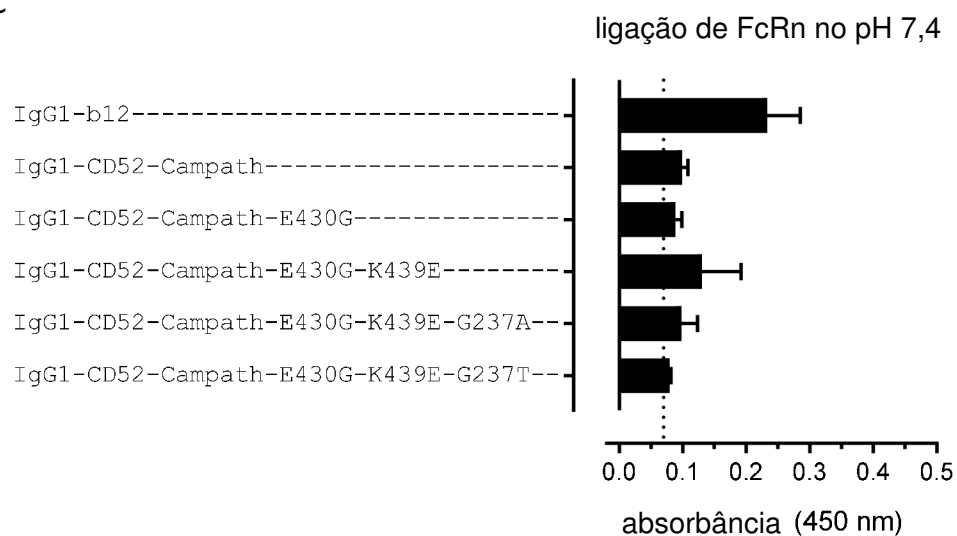


Figura 24 continuação

C



D

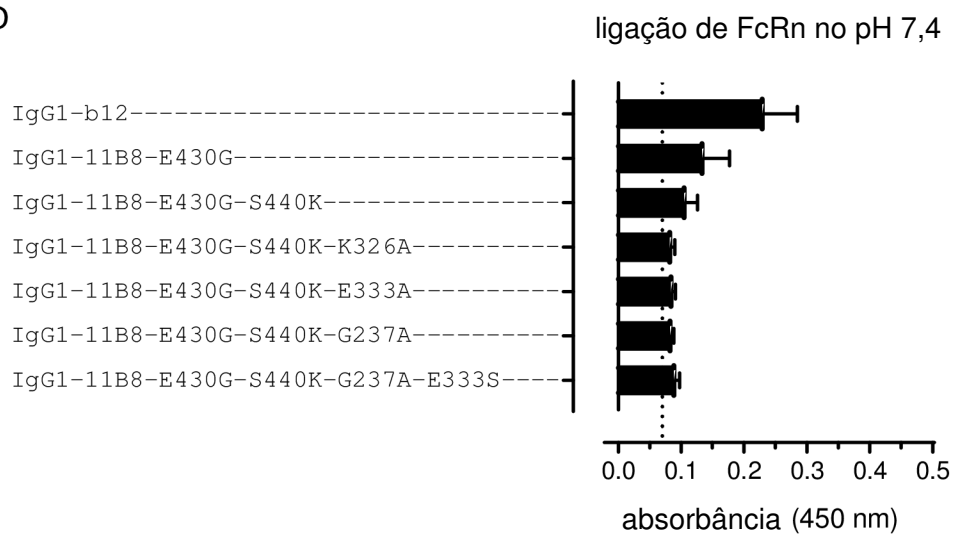
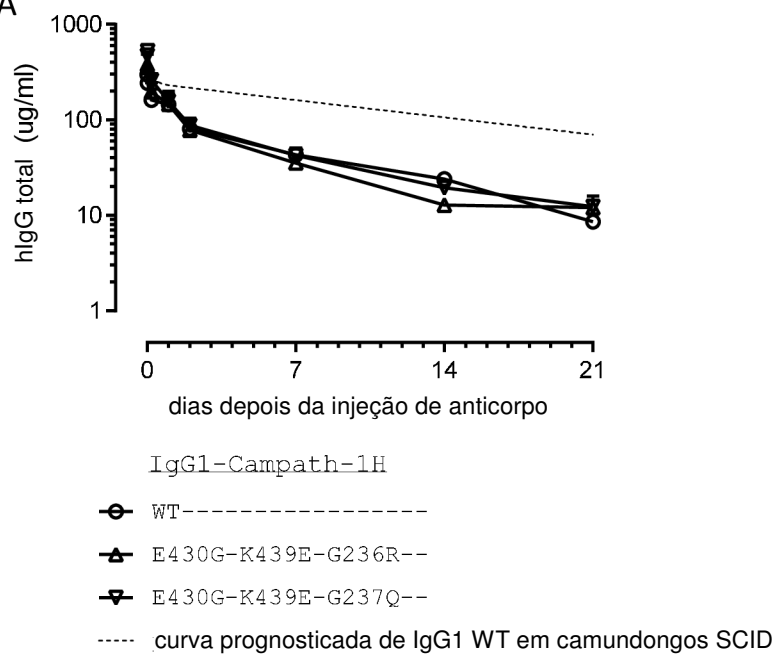


Figura 25

A



B

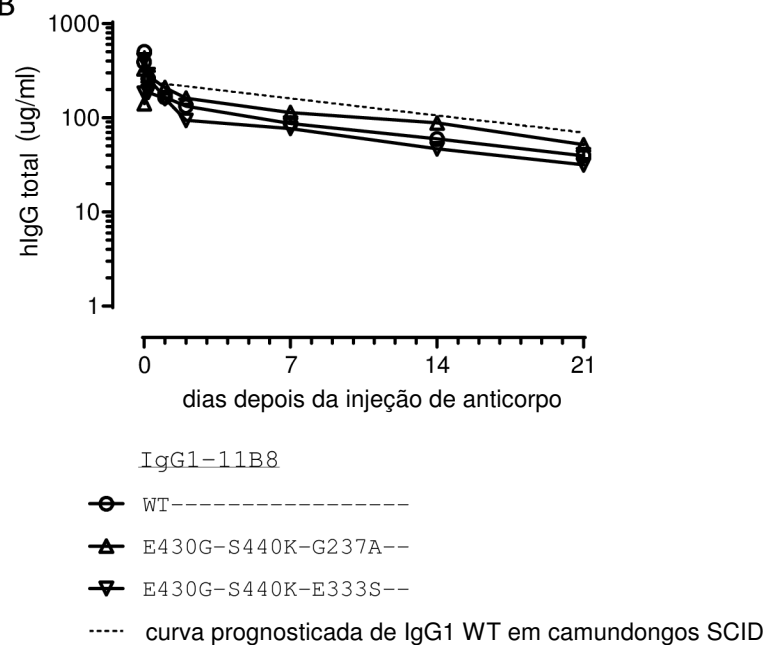


Figura 25 continuação

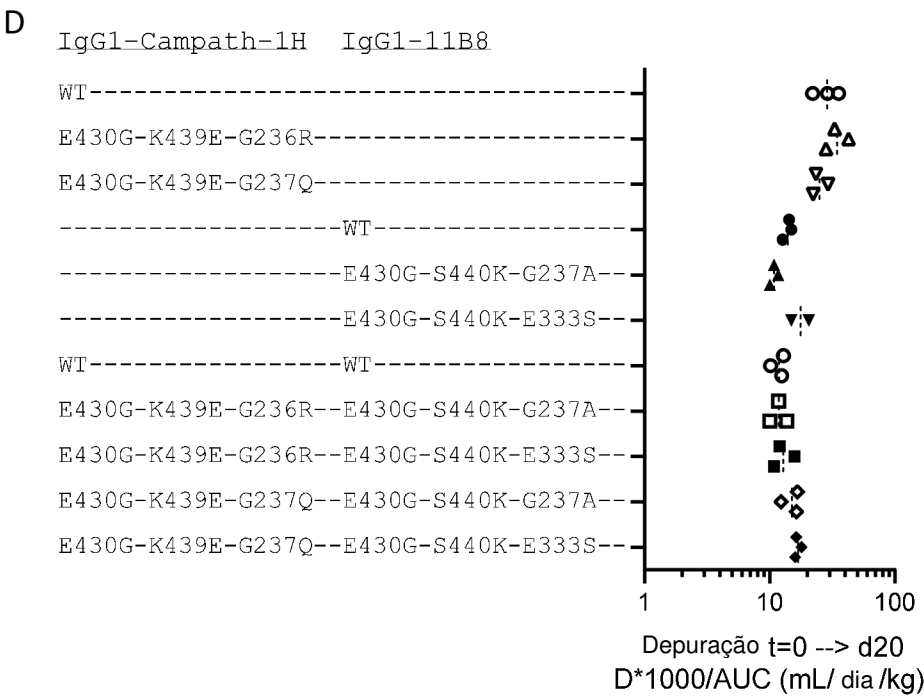
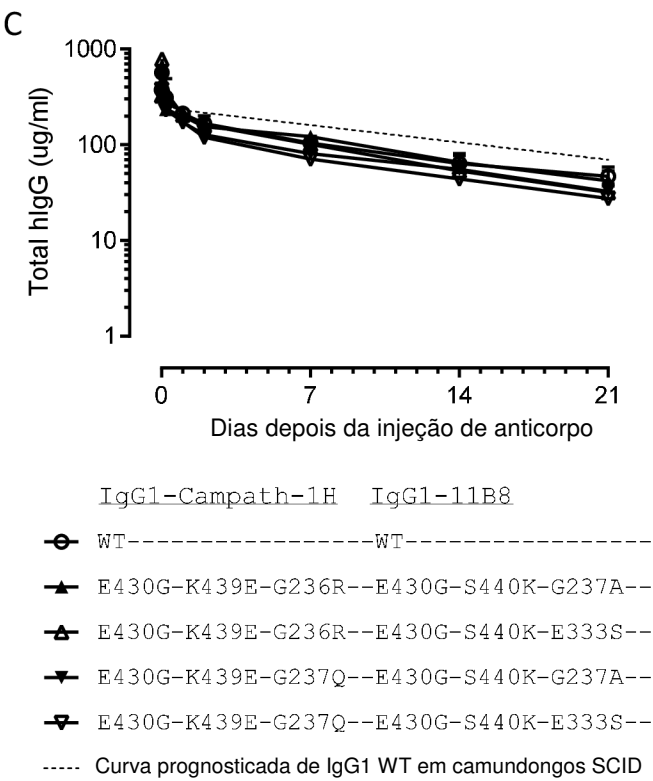


Figura 26

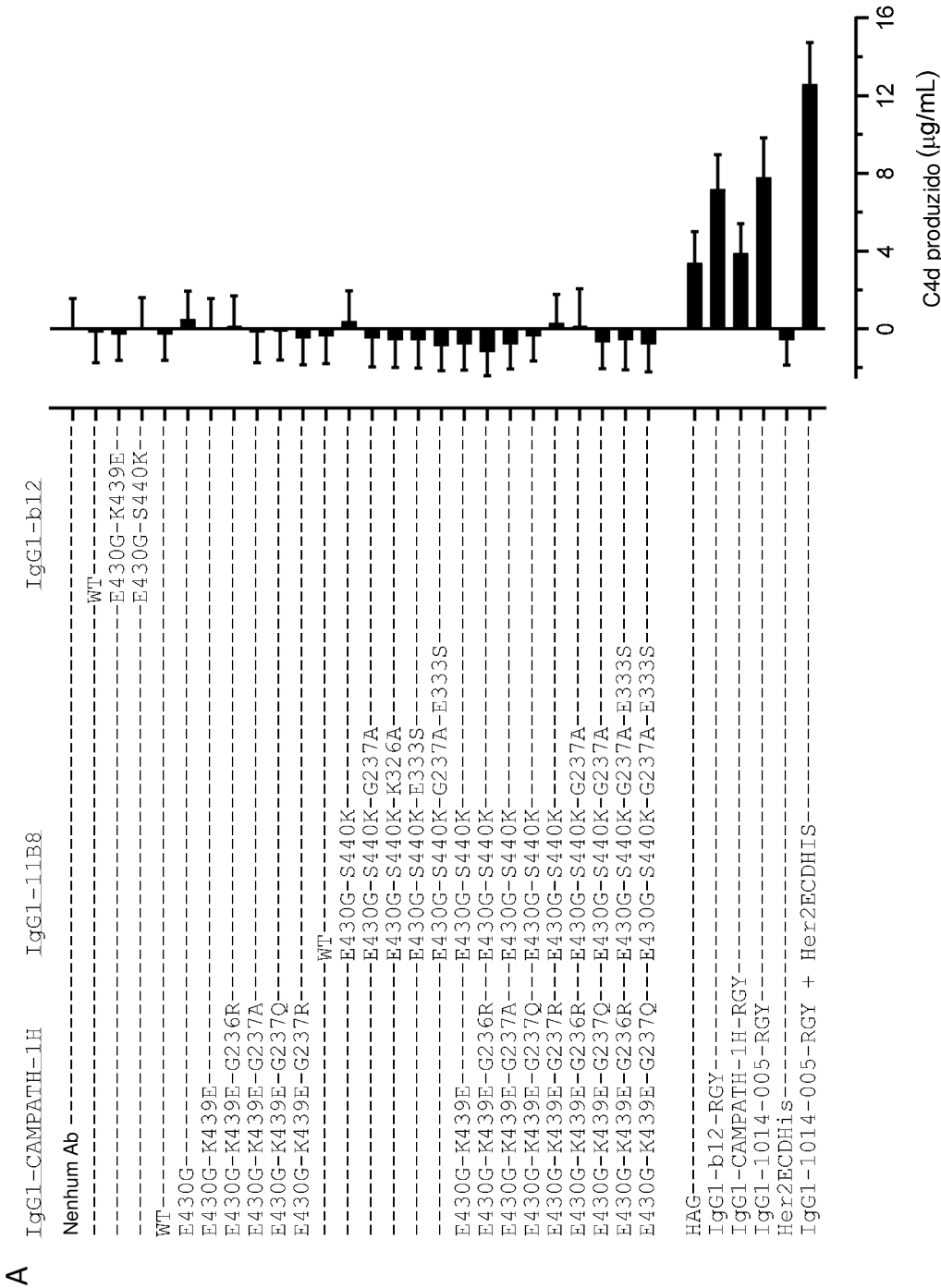


Figura 26 continuação

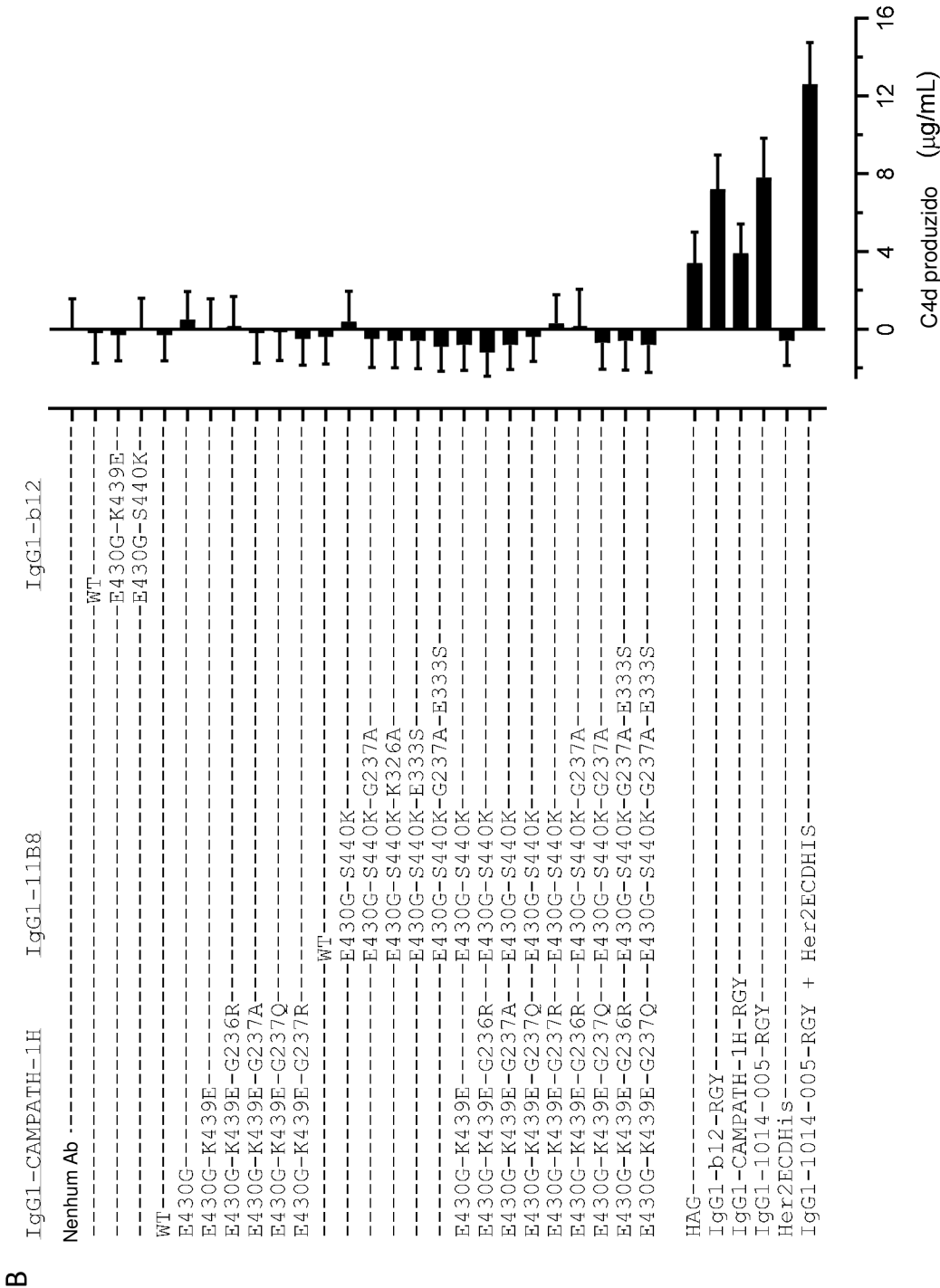


Figura 27

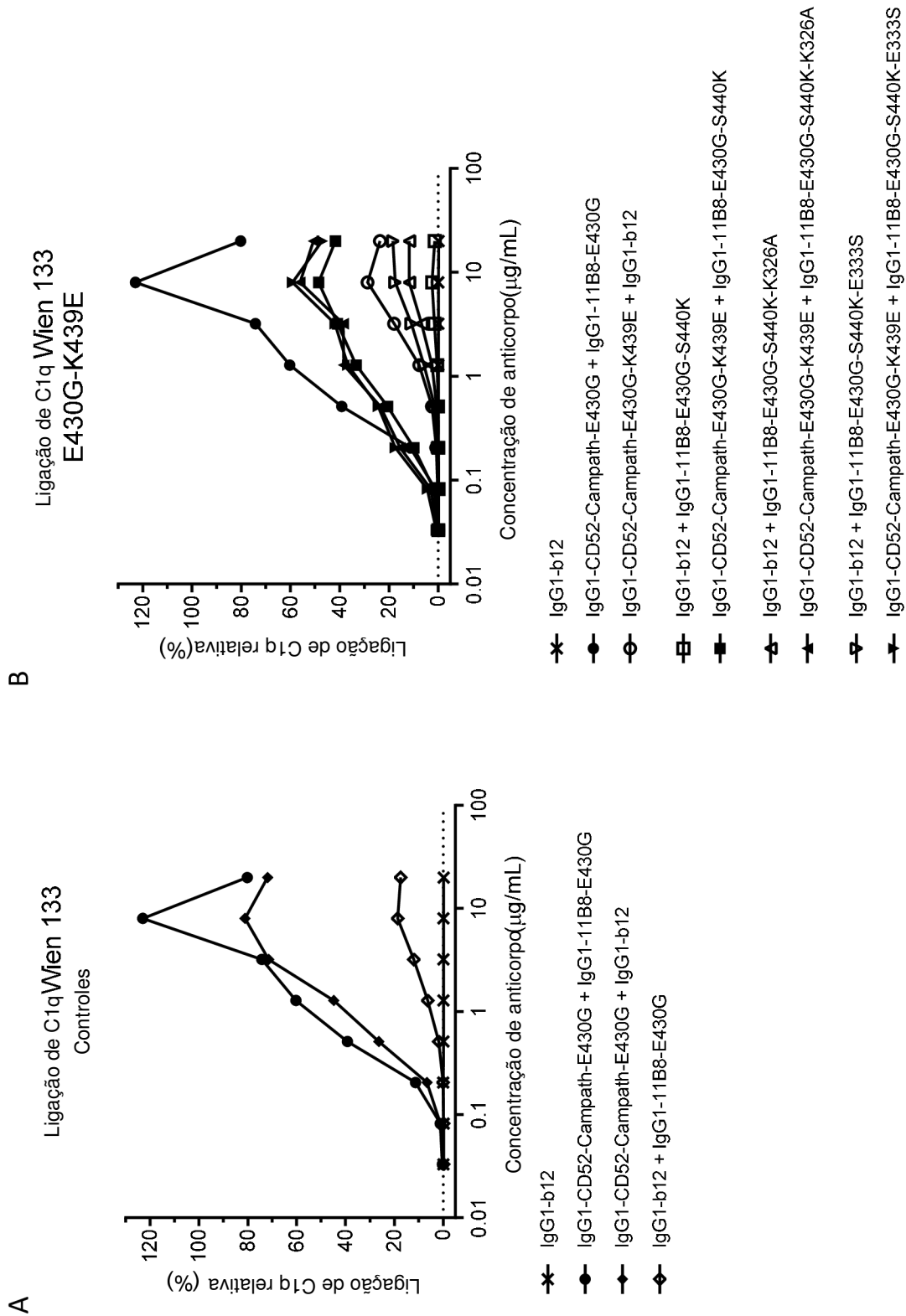


Figura 27 continuação

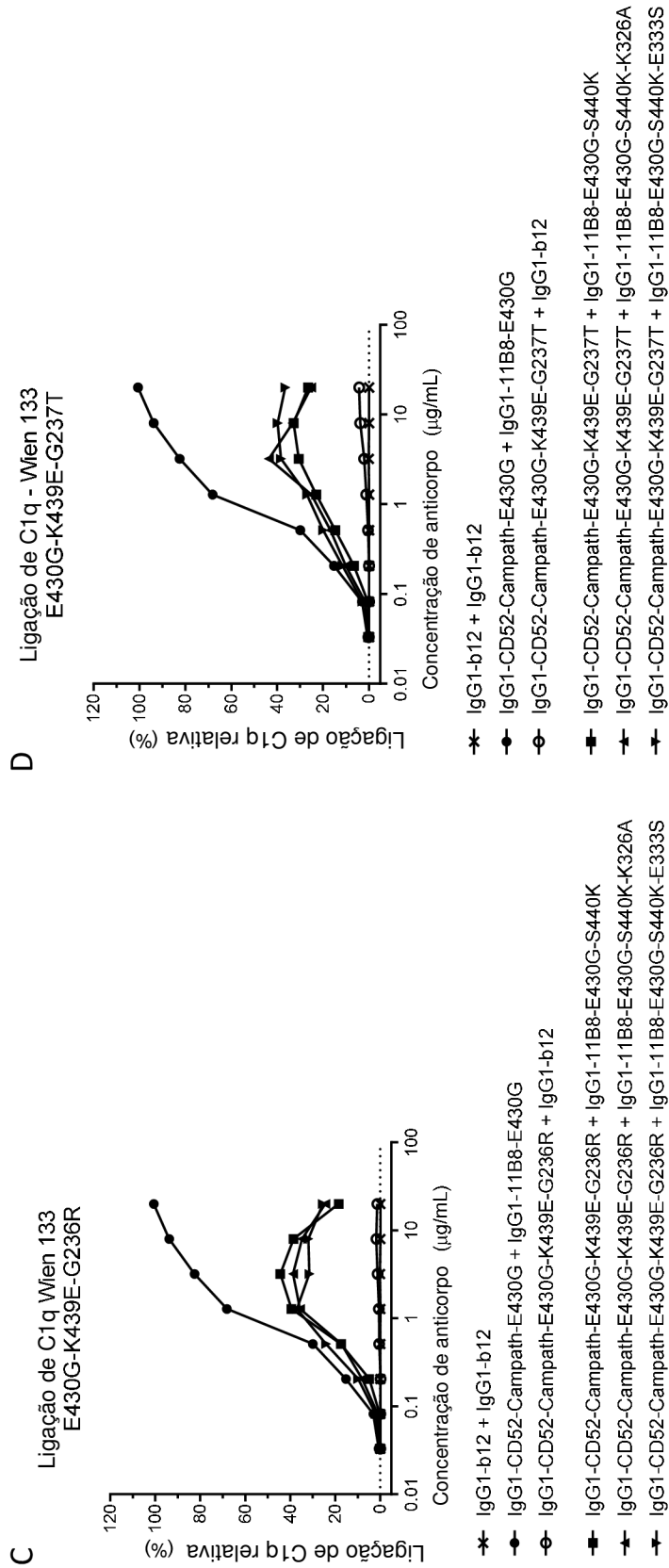
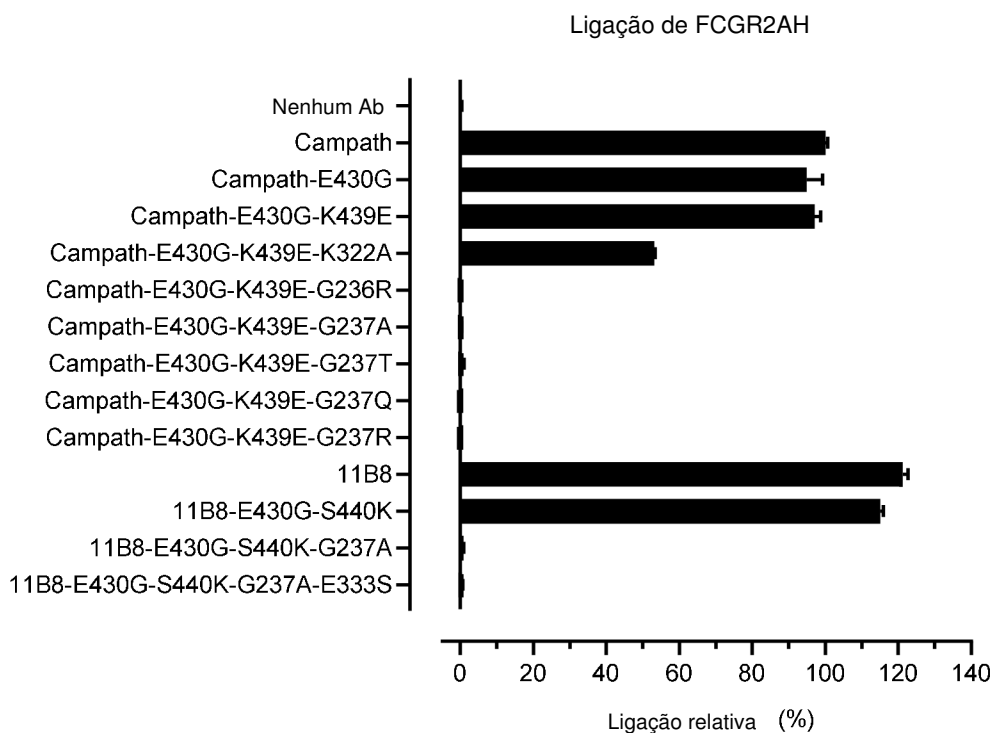


Figura 28

A



B

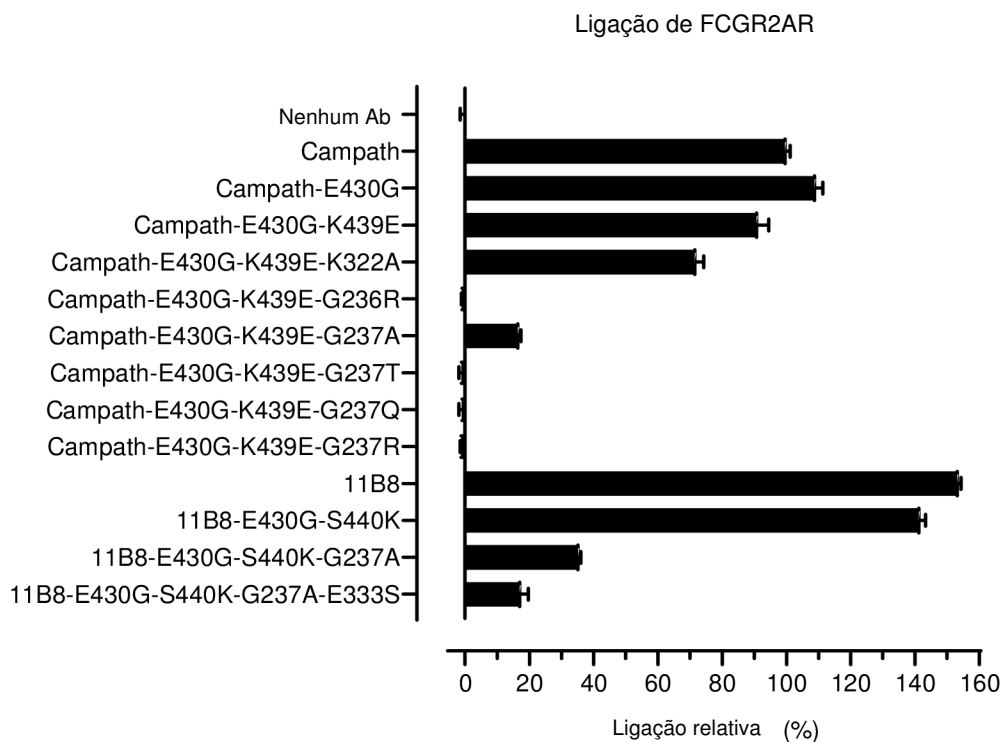
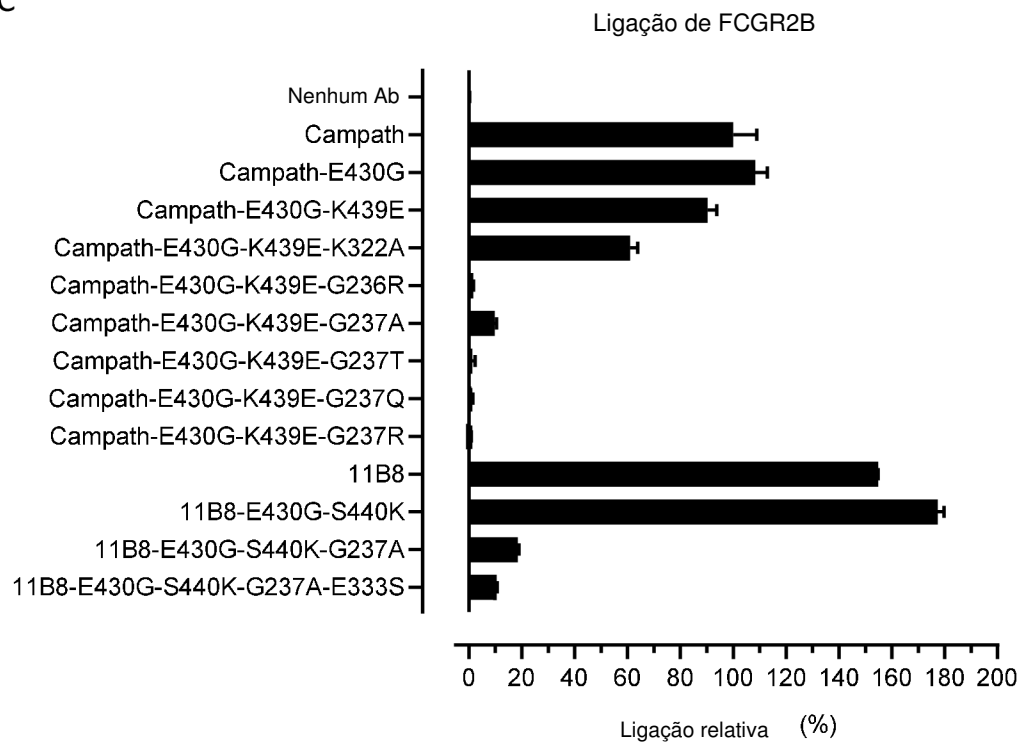
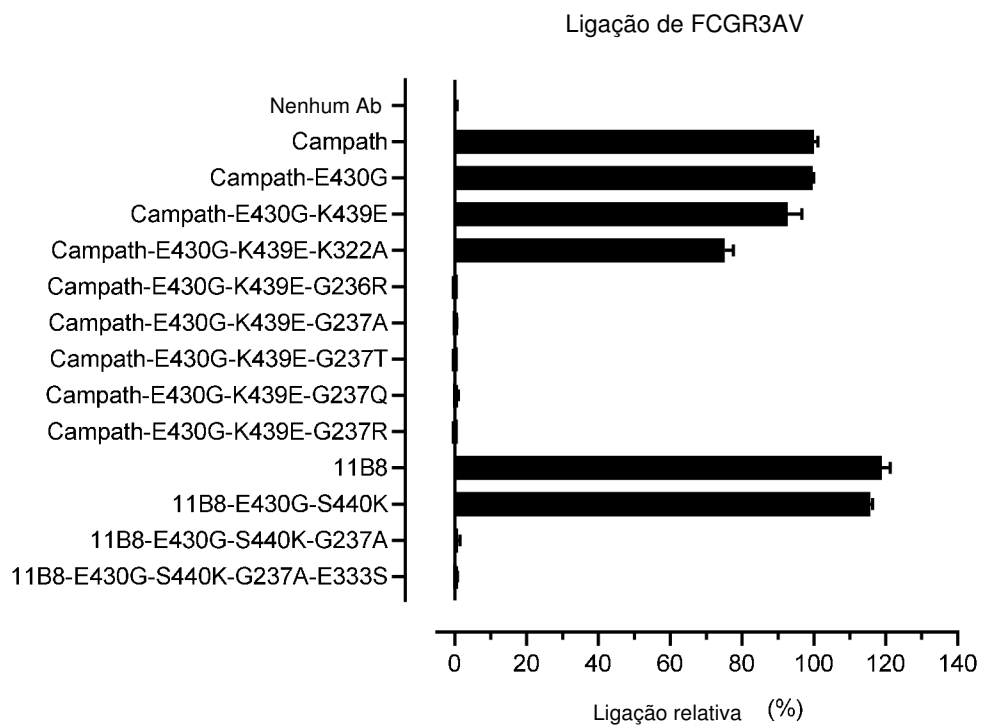


Figura 28 continuação

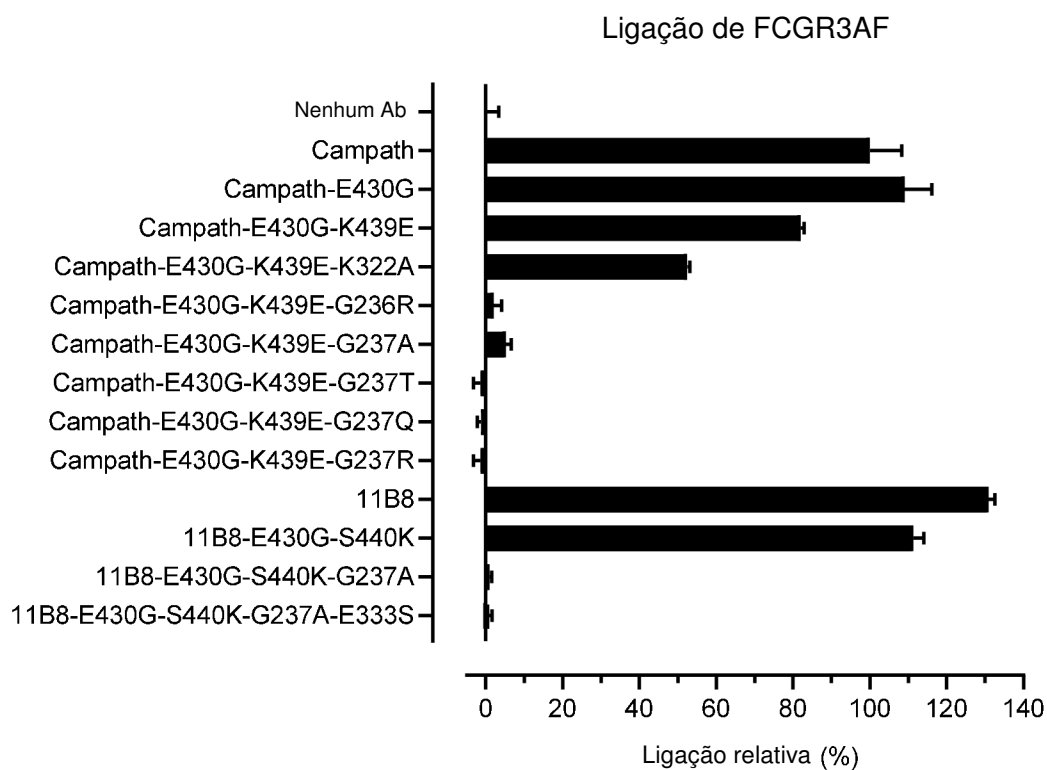
C



D



E



F

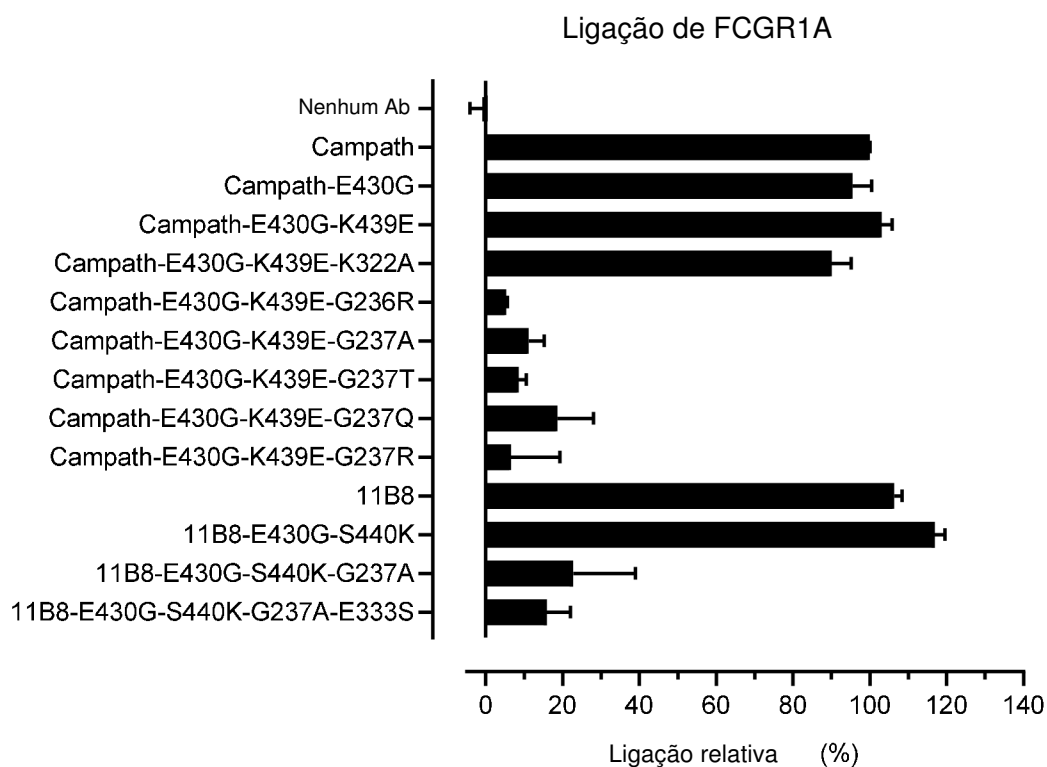


Figura 29

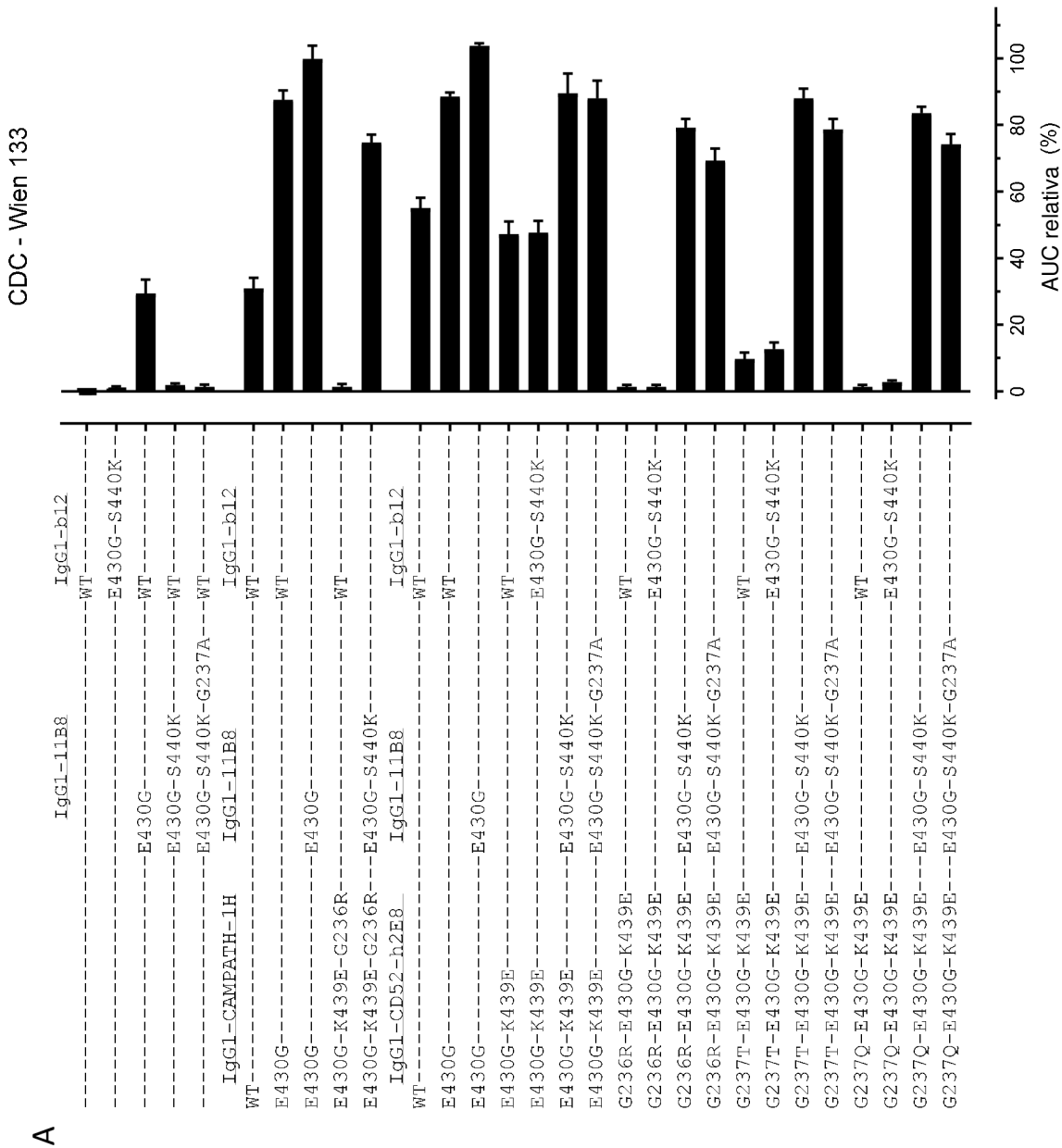


Figura 29 continuação

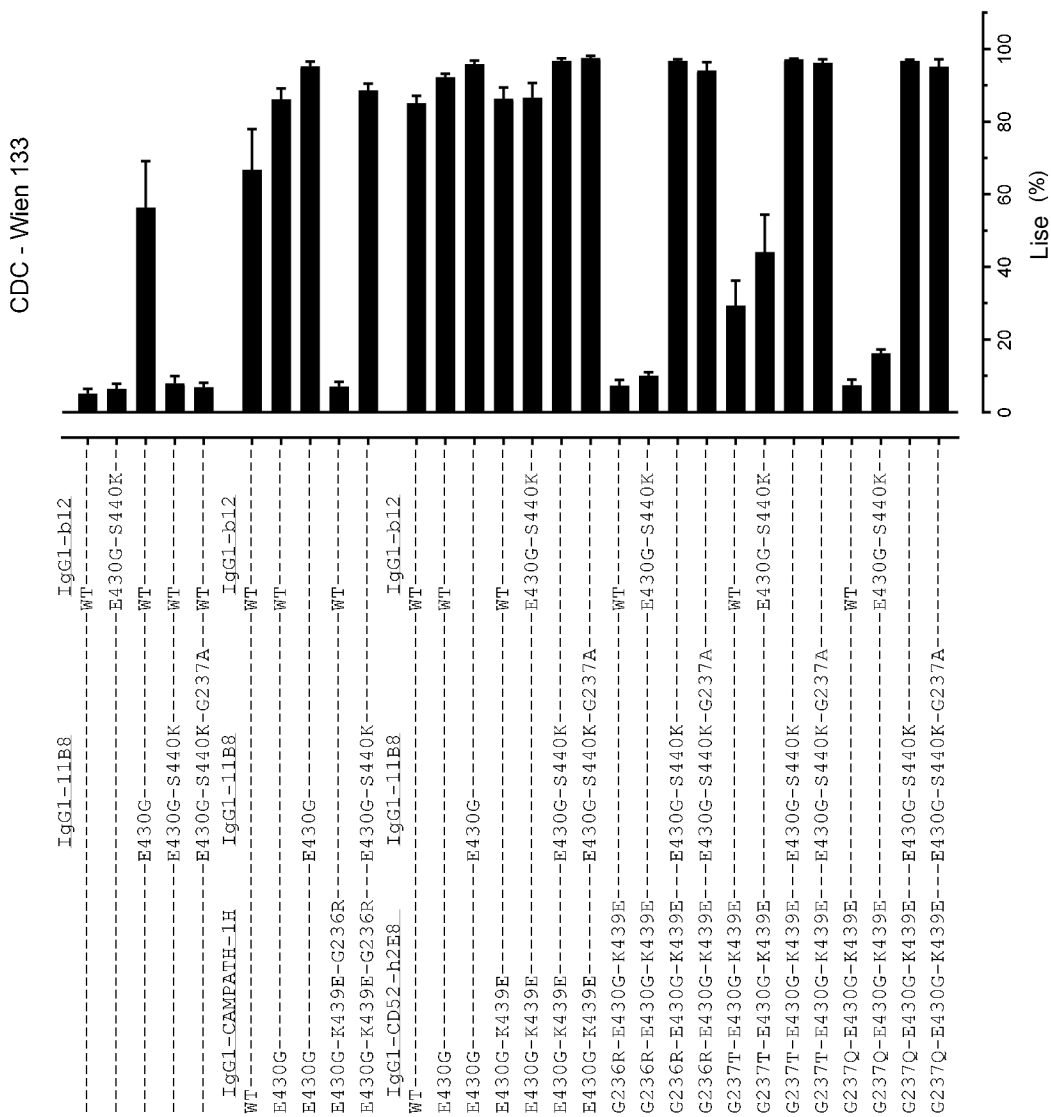
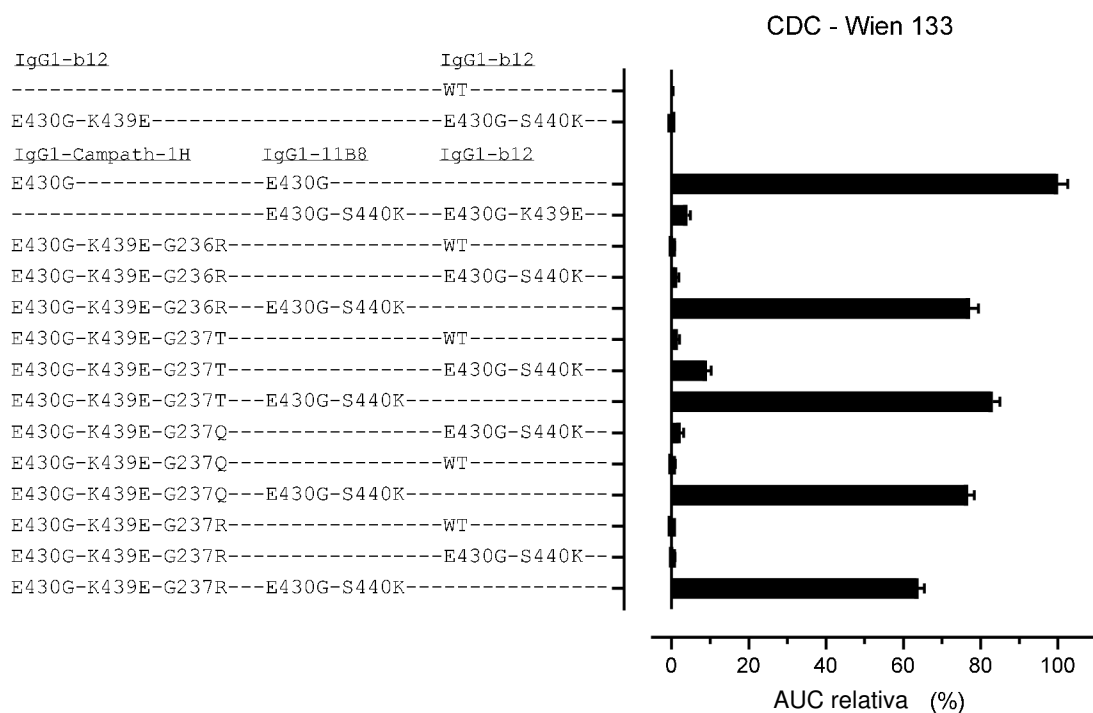


Figura 30

A



B

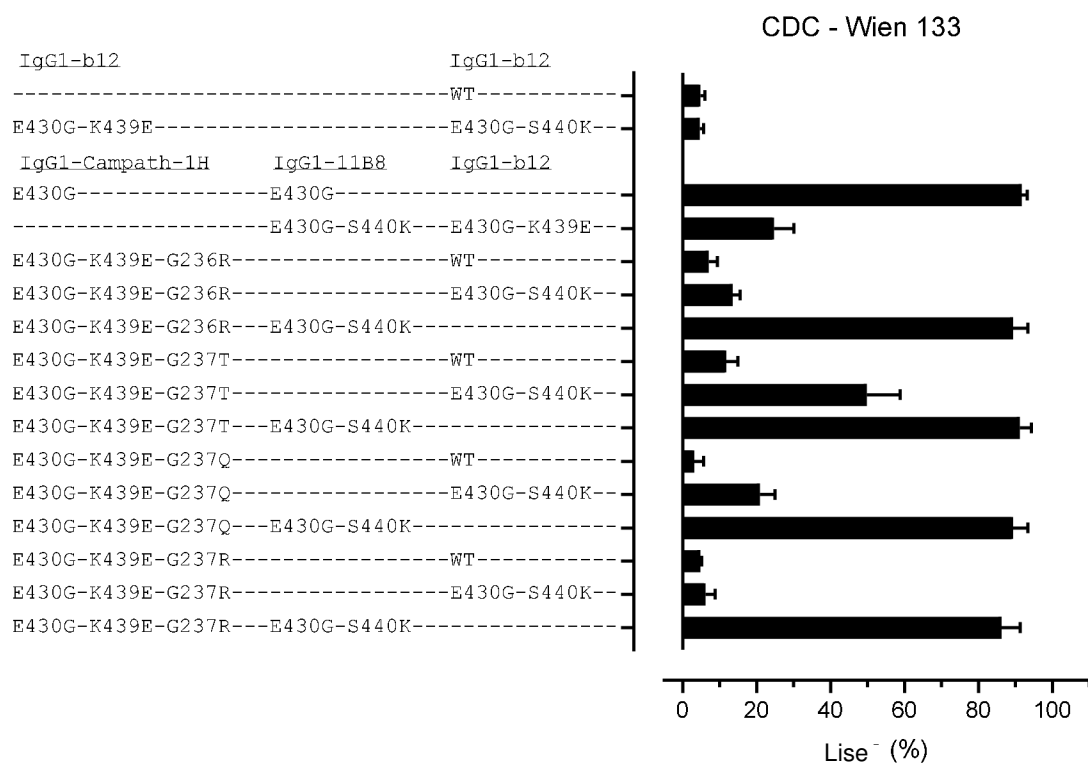
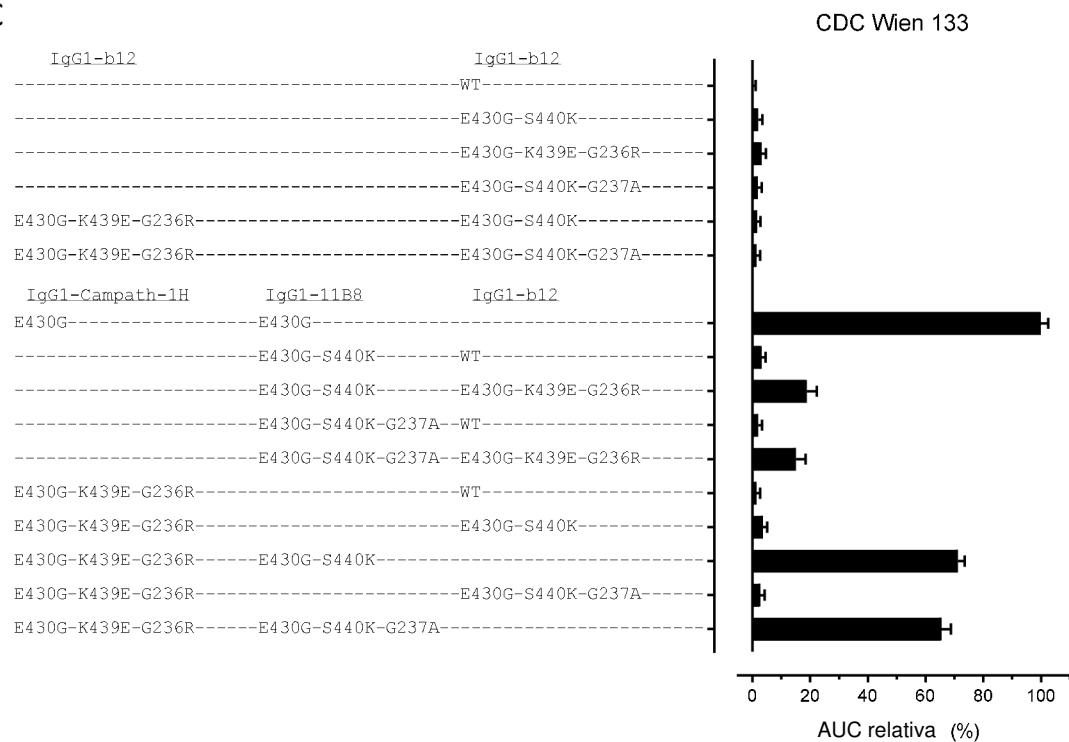


Figura 30 continuação

C



D

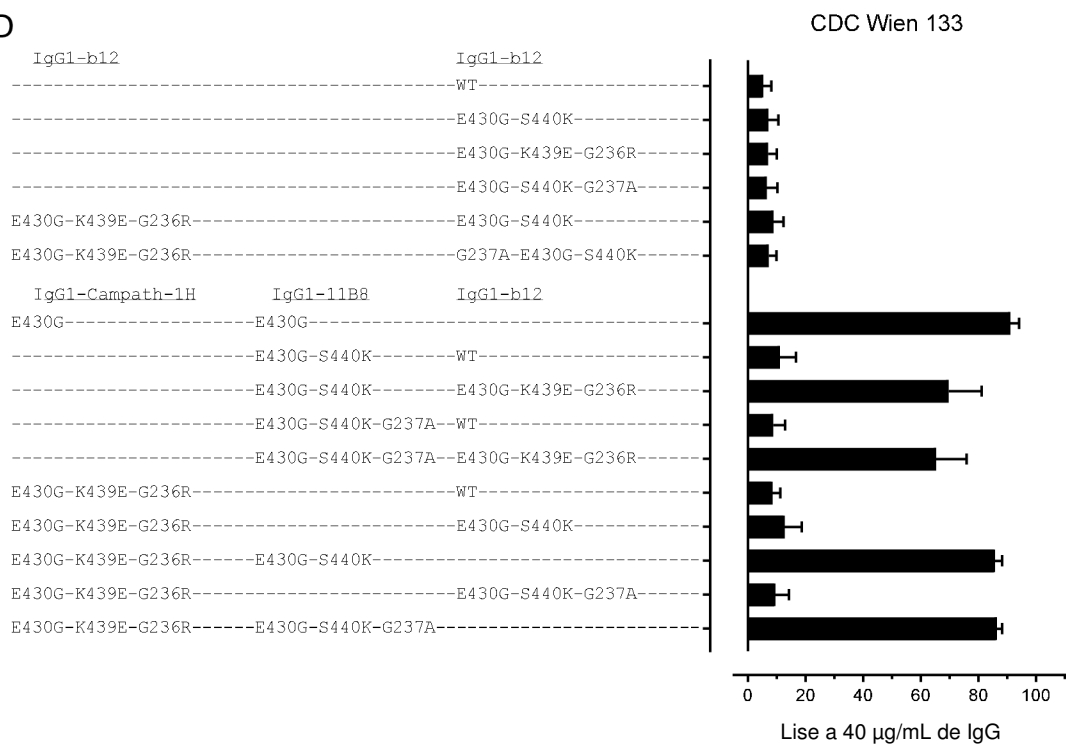


Figura 31

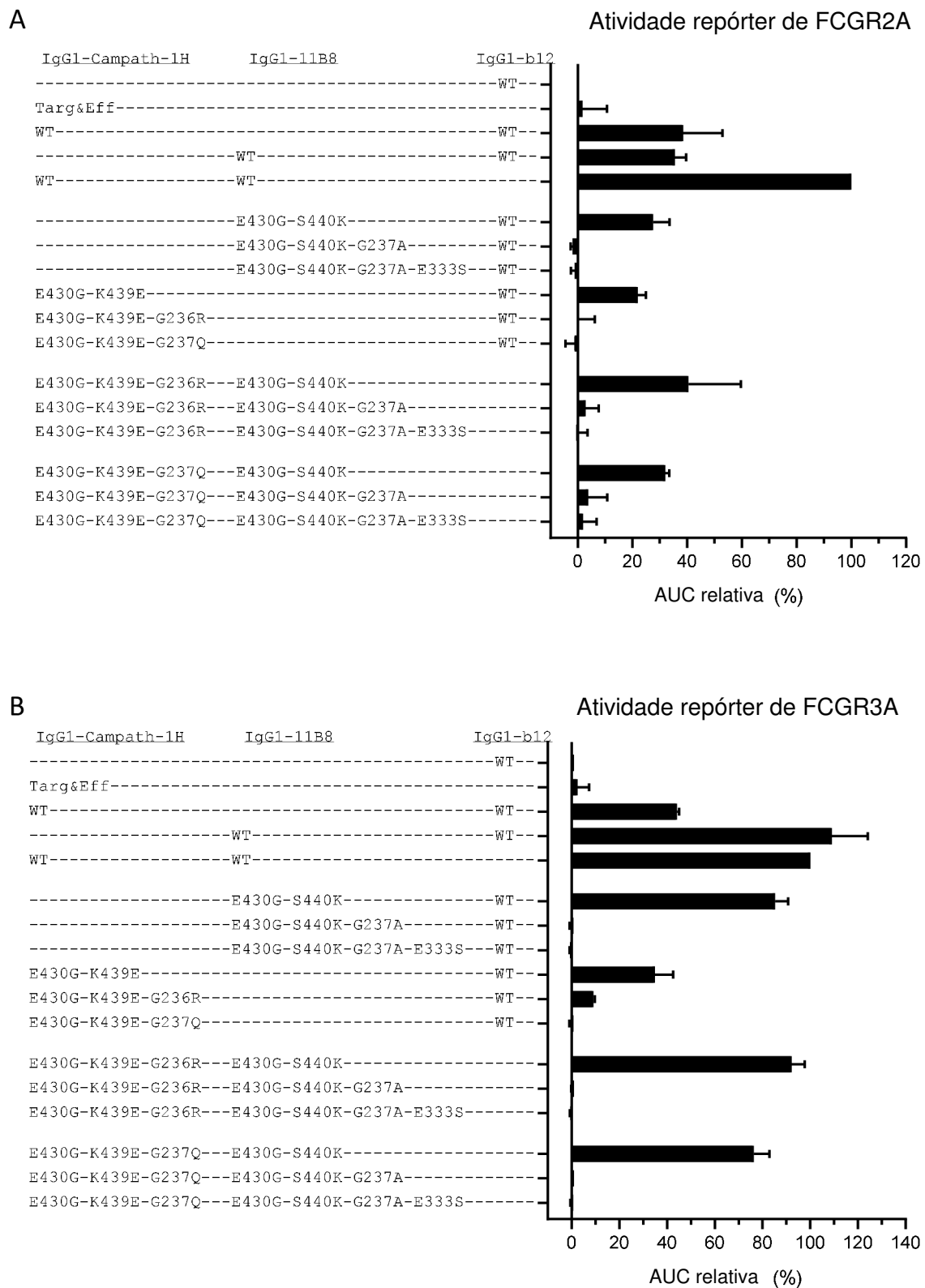


Figura 32

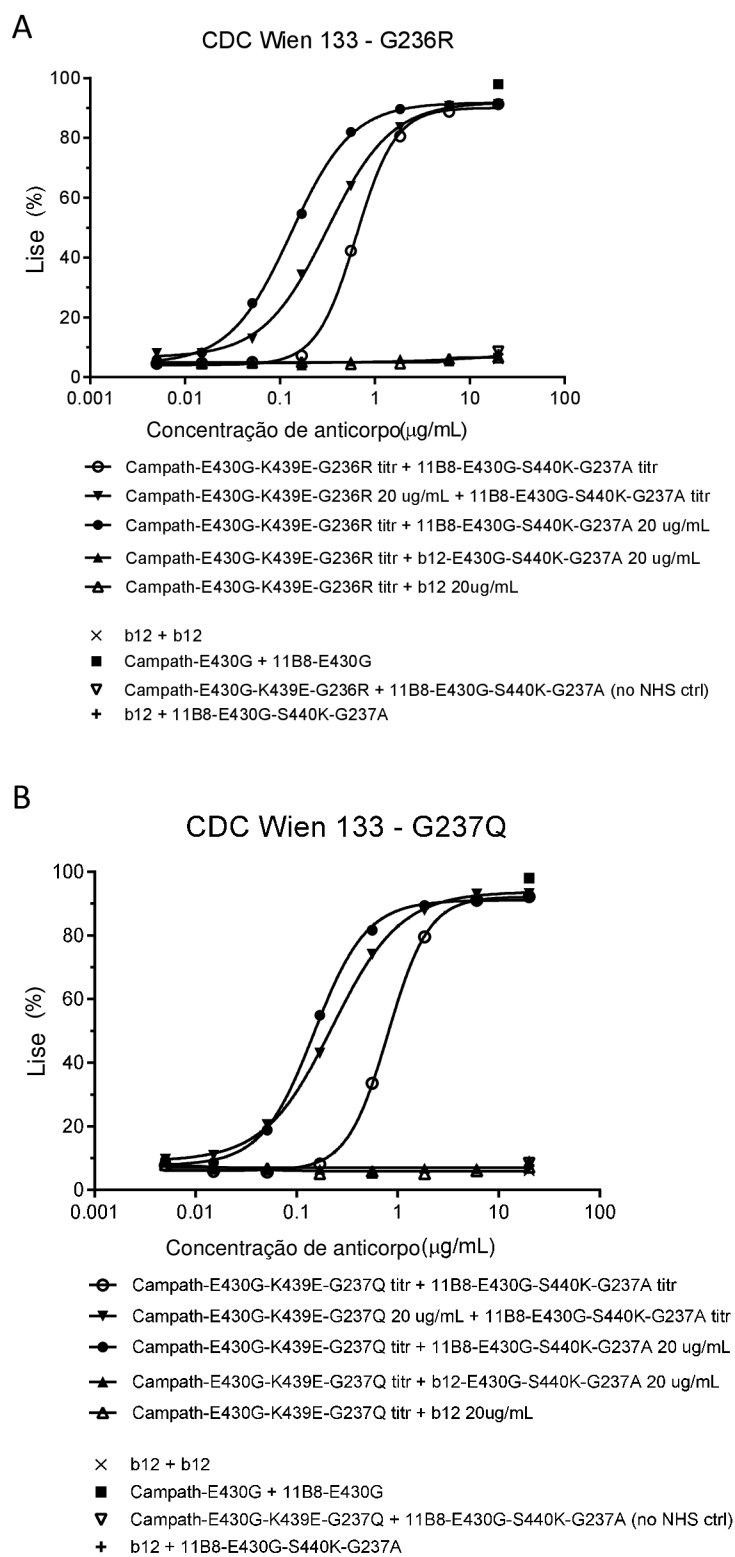


Figura 33

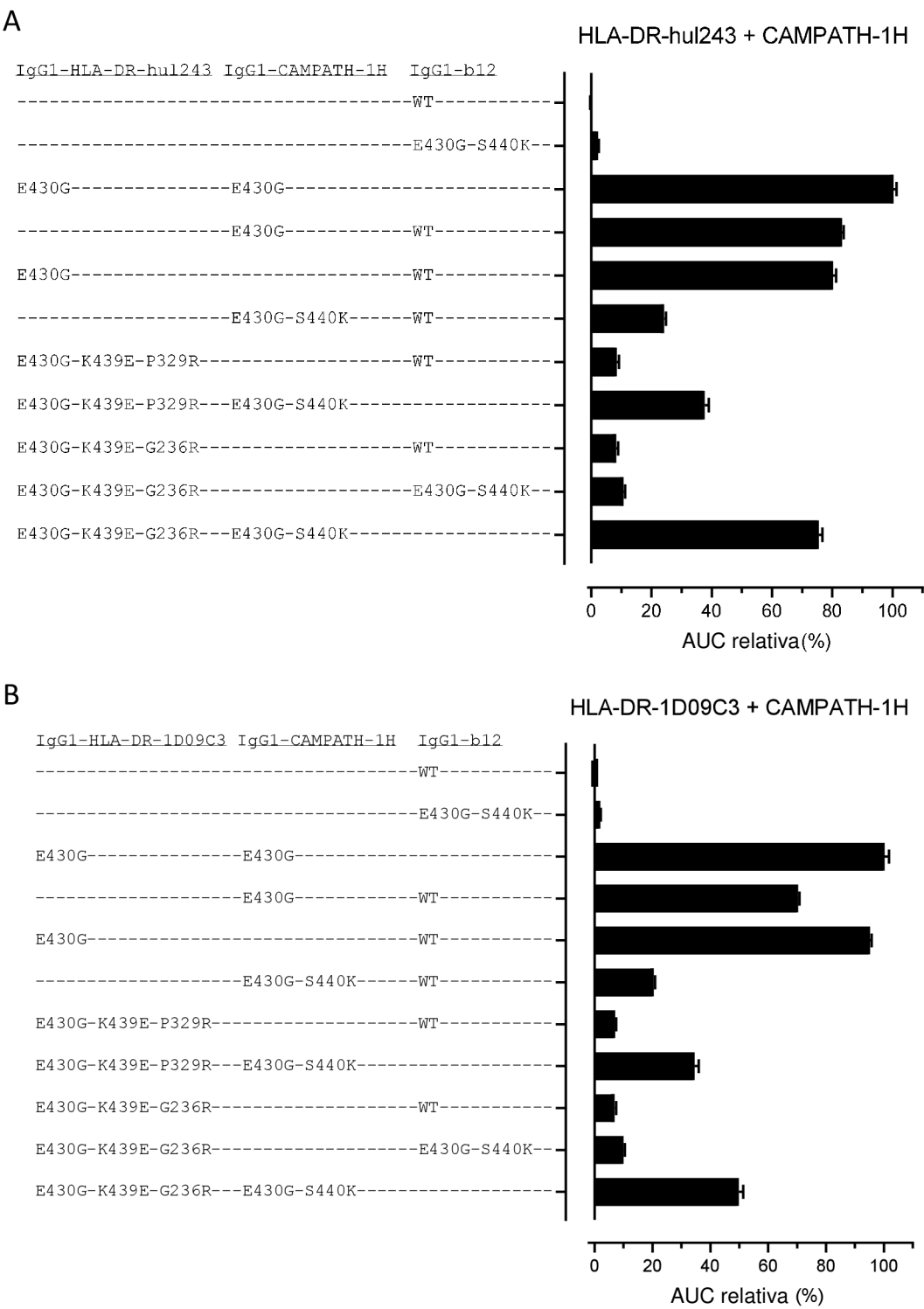


Figura 34

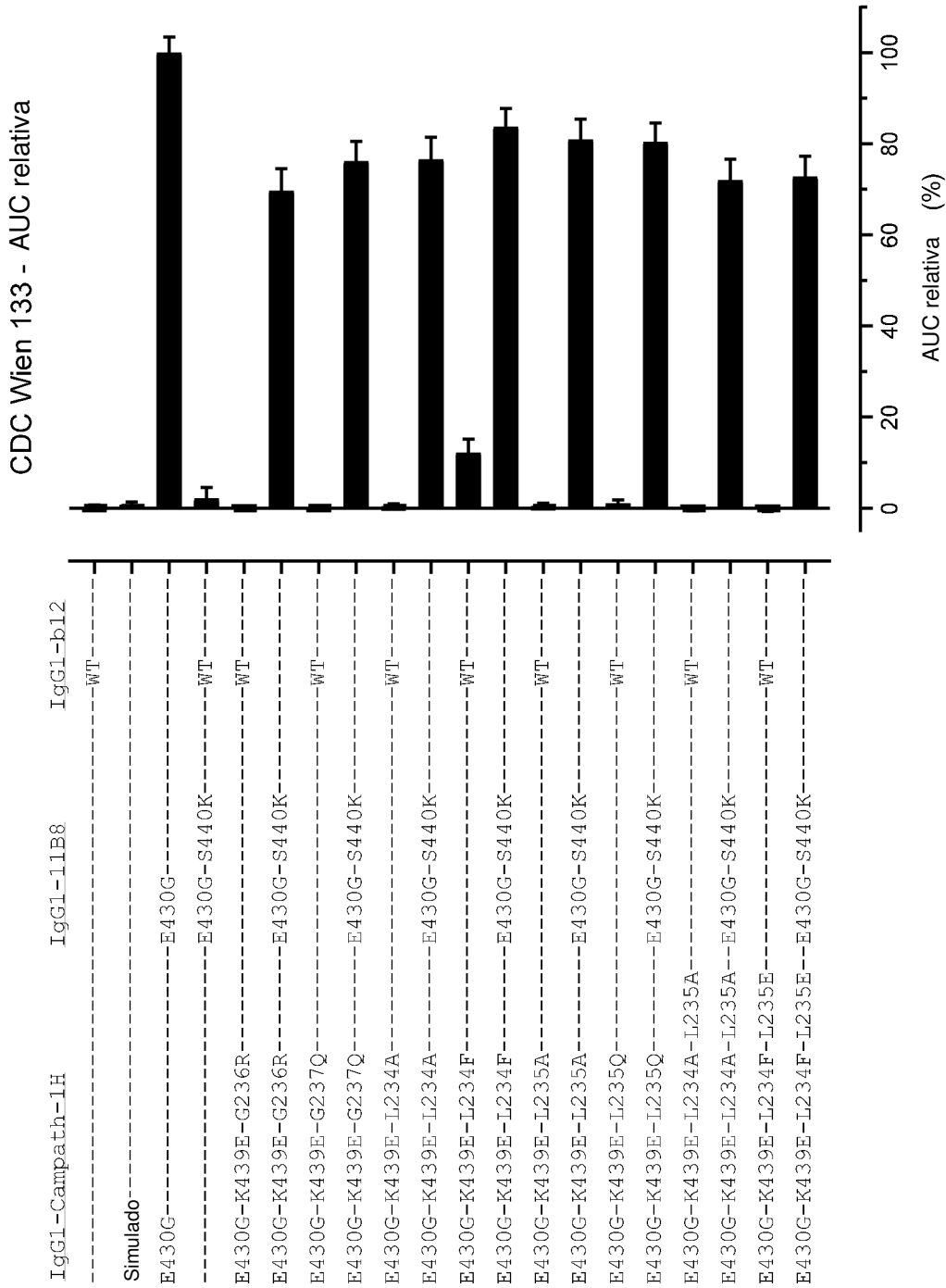


Figura 35

A

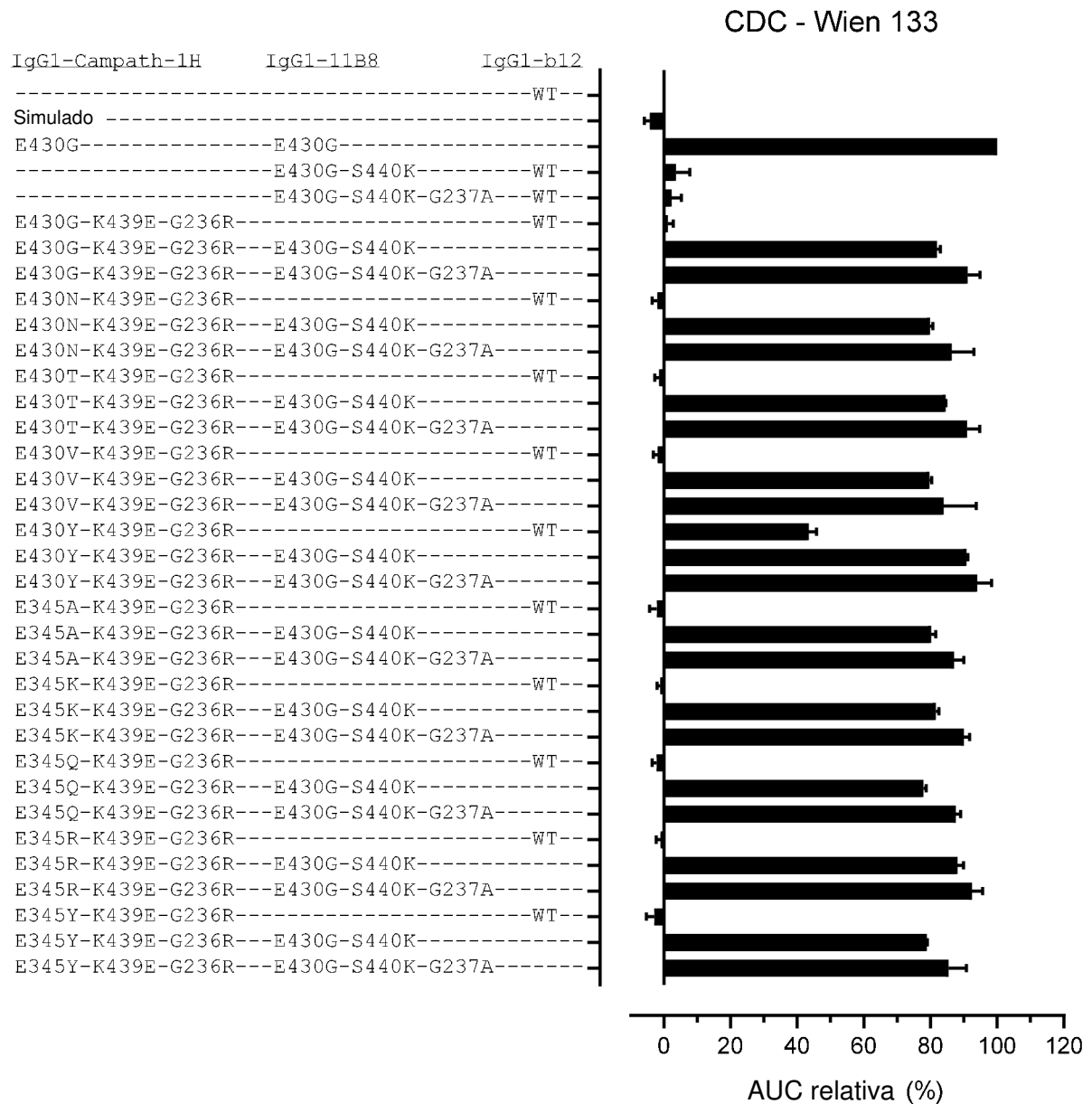
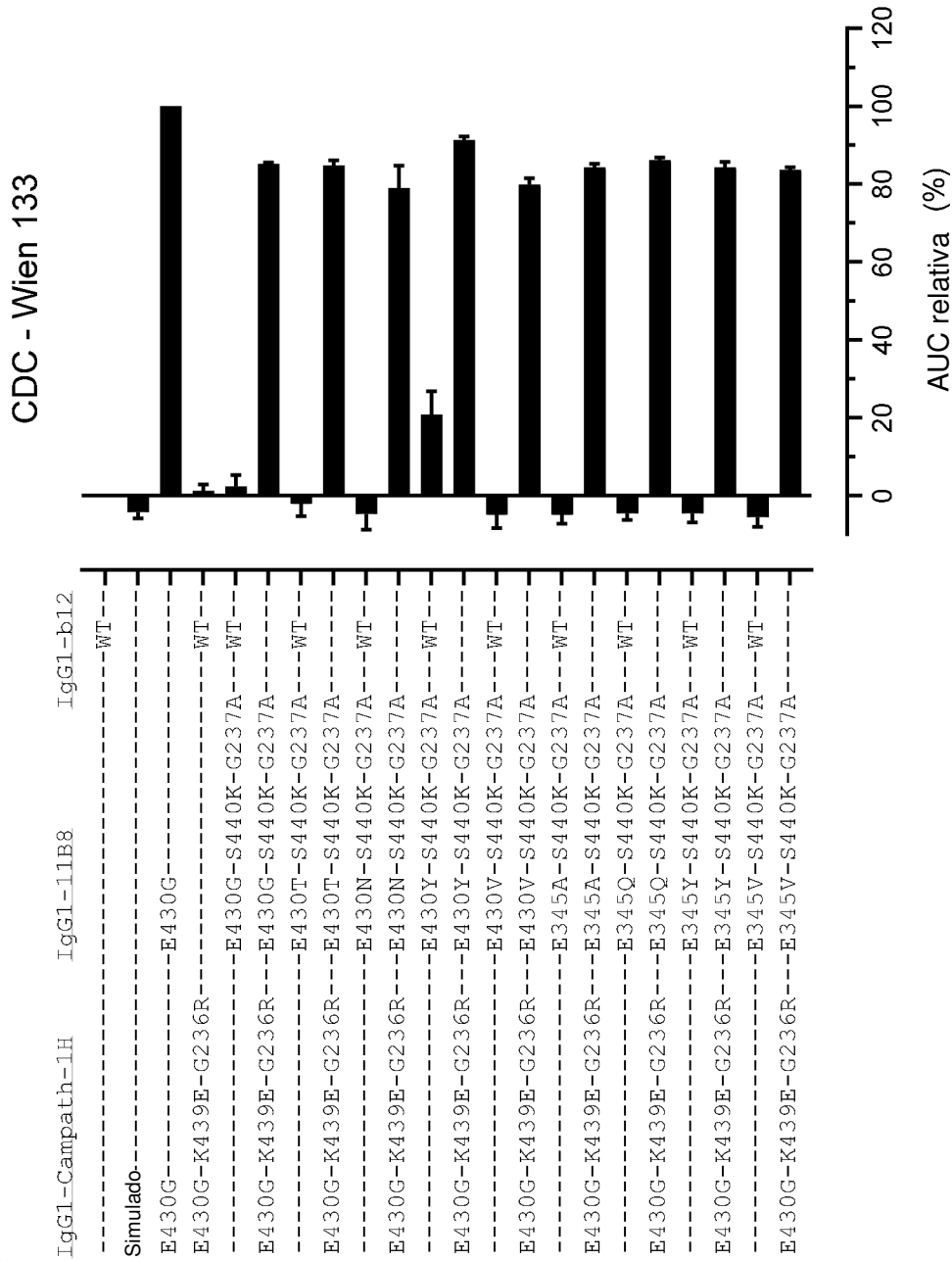


Figura 35 continuação

B



U

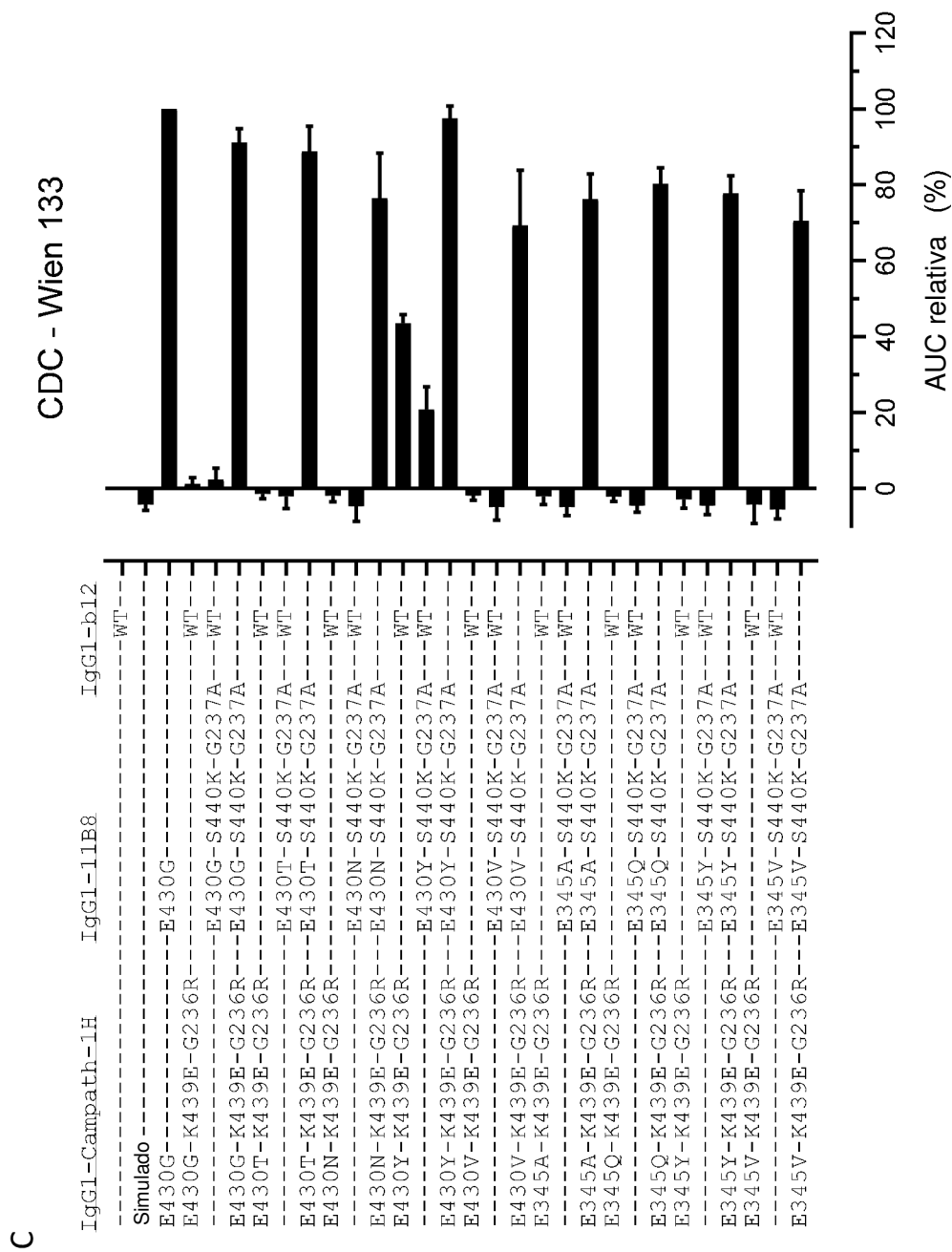


Figura 35 continuação

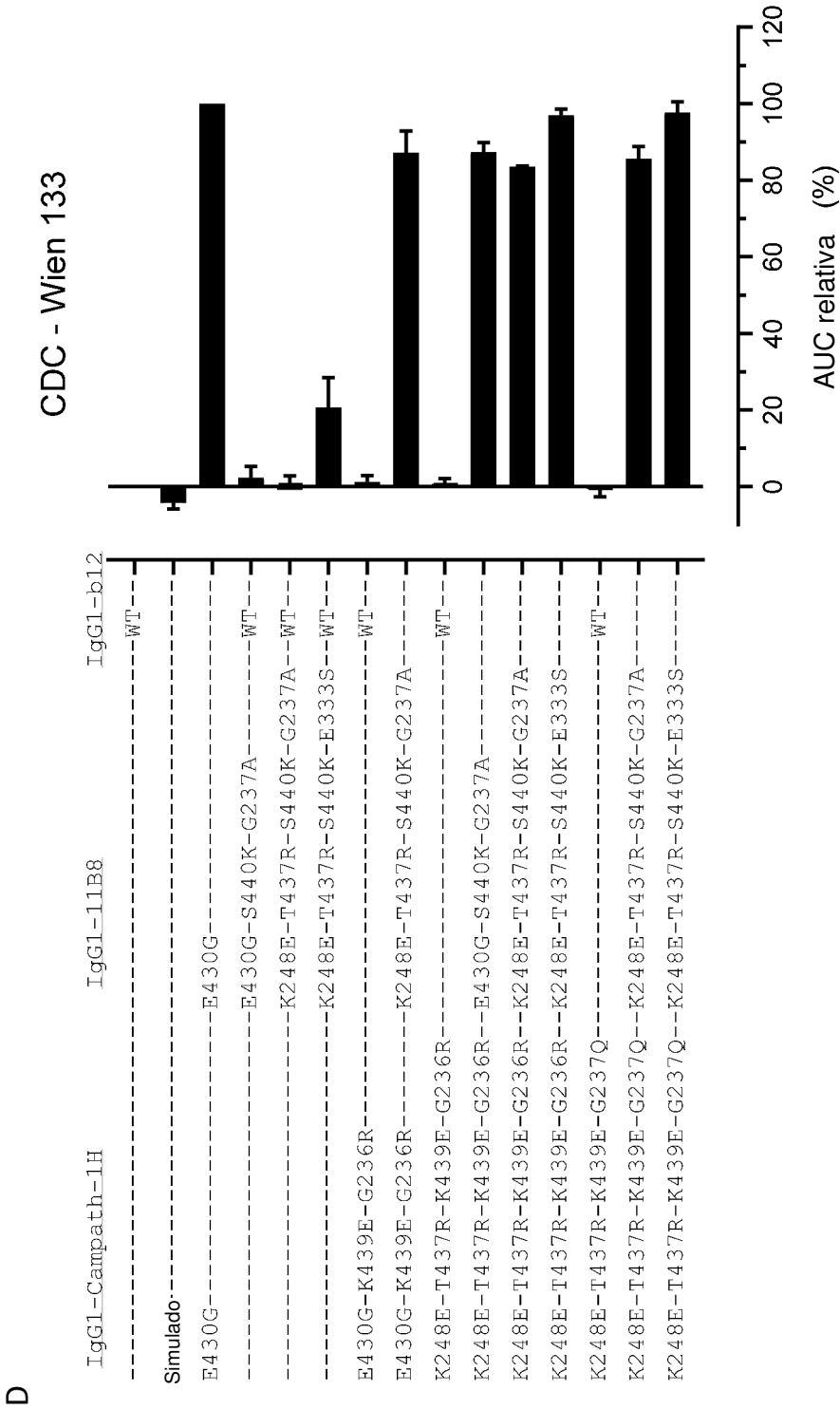


Figura 36

A

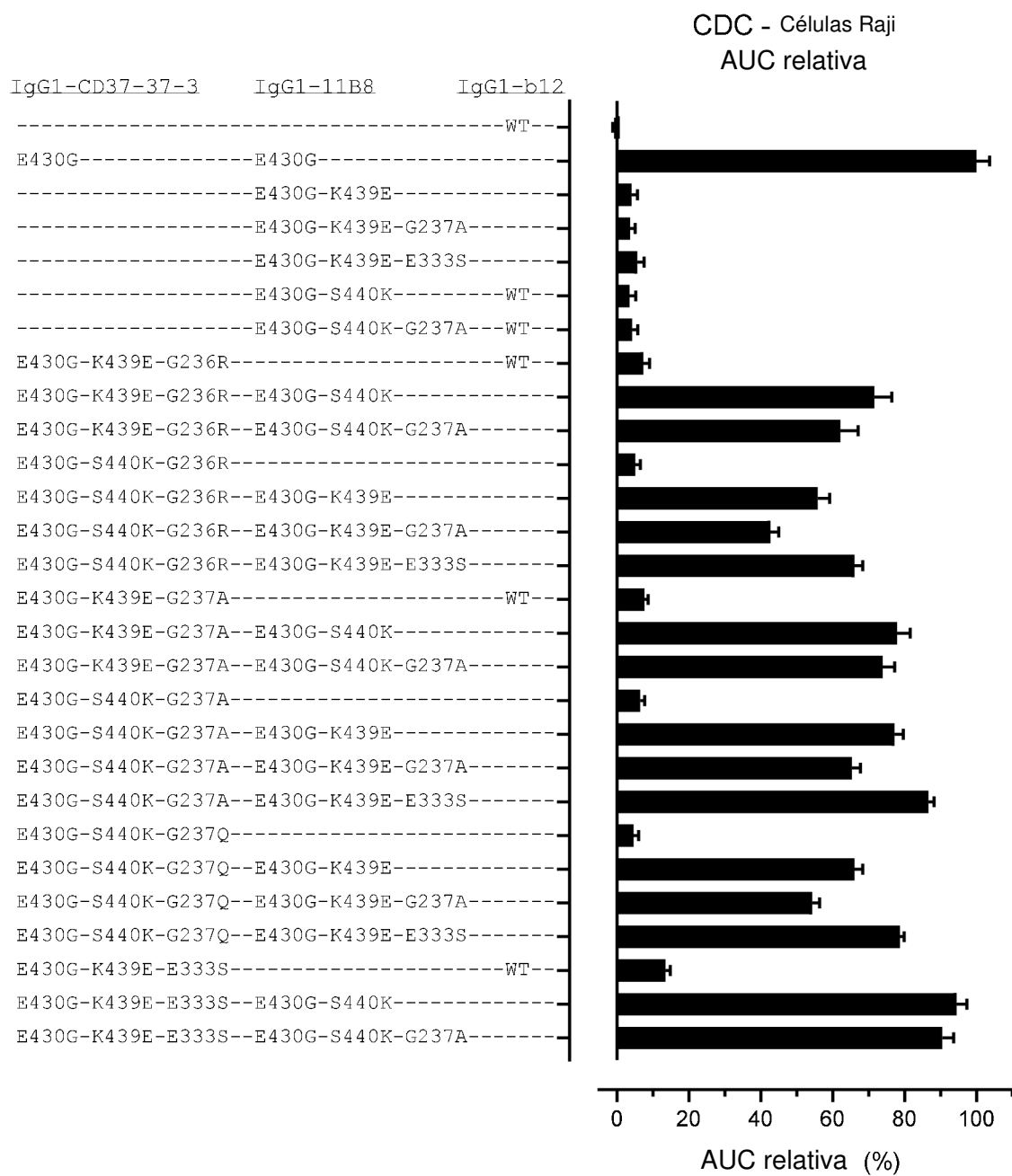


Figura 36 continuação

B

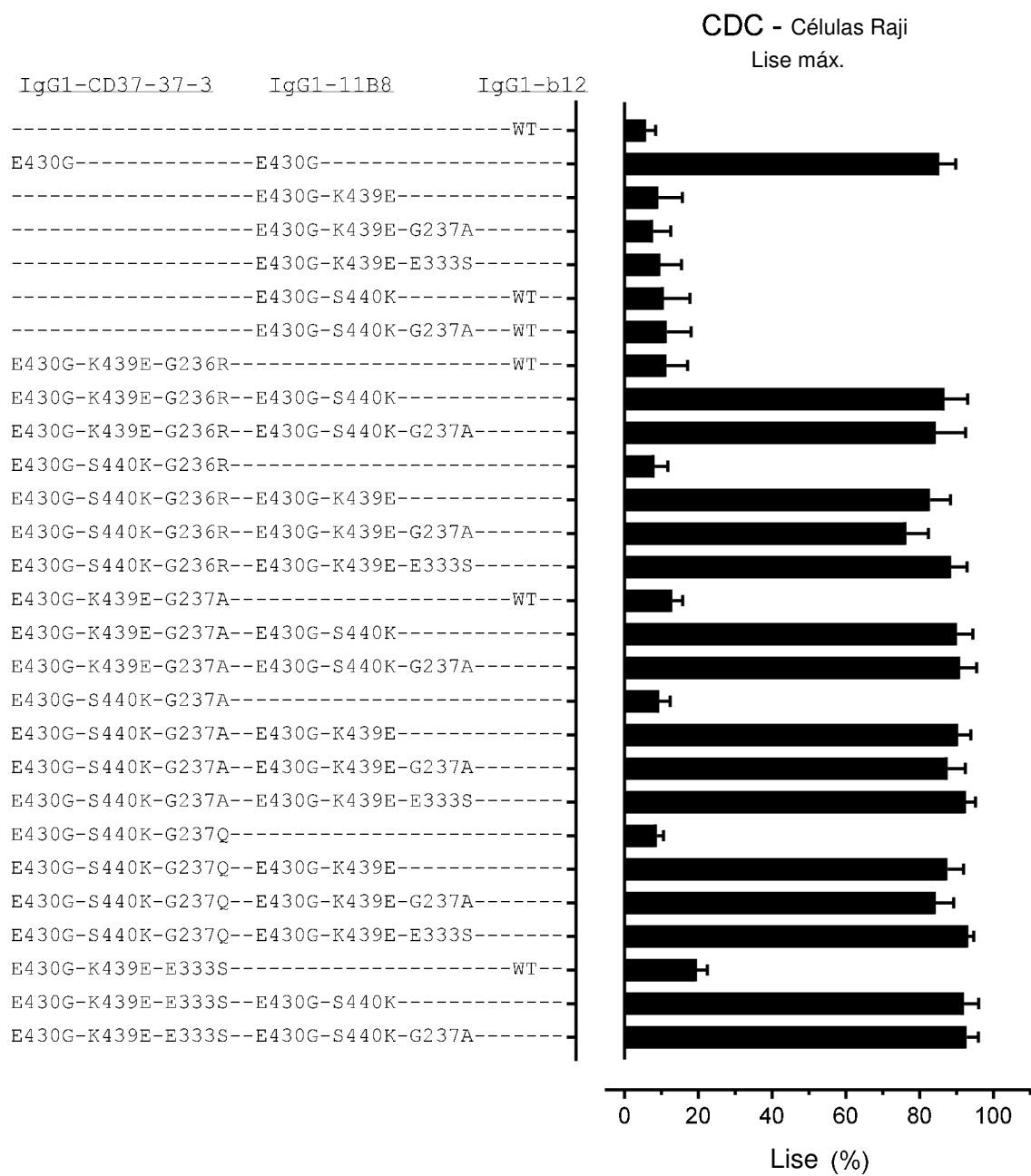


Figura 37

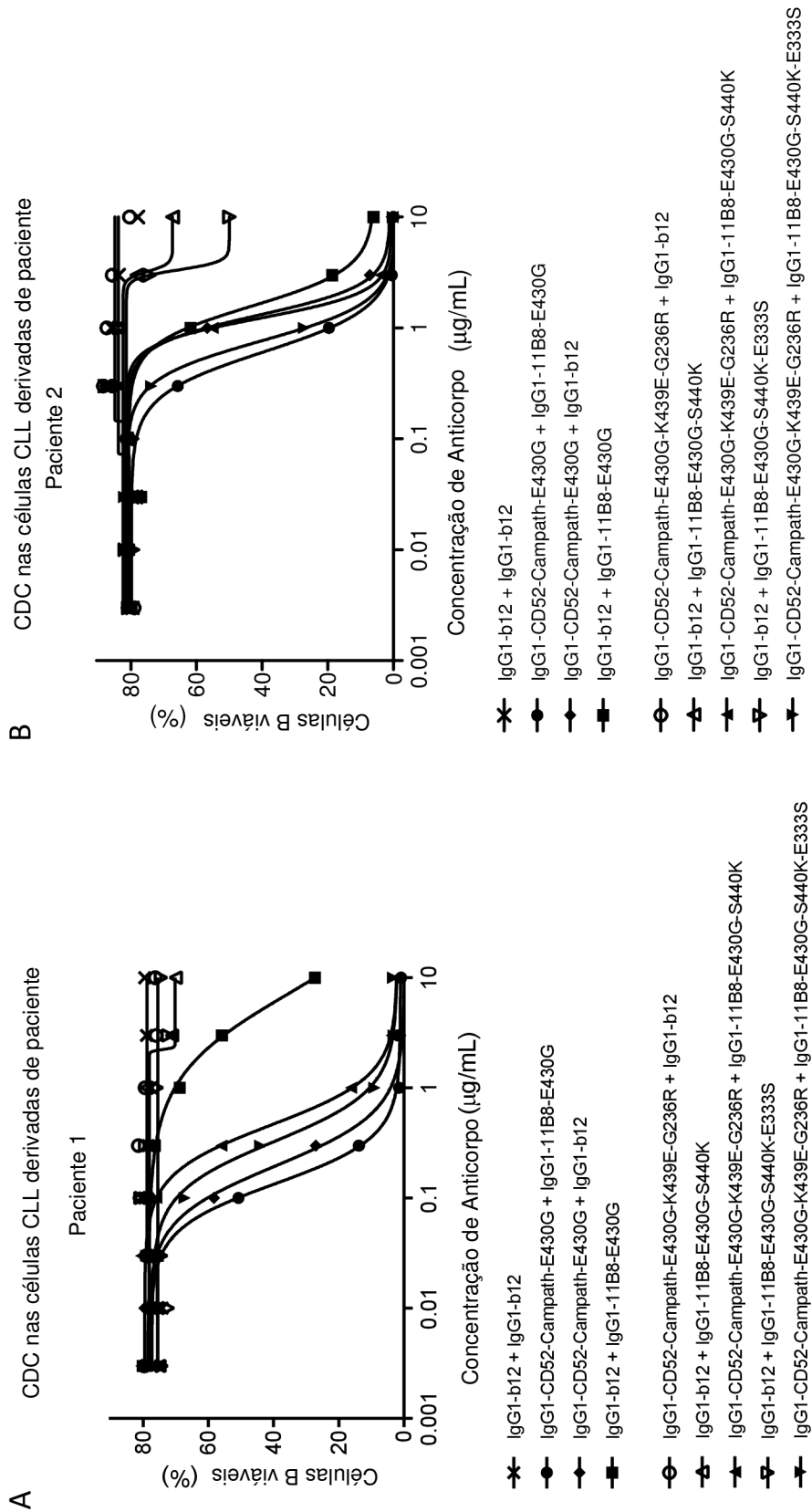


Figura 37 continuação

C

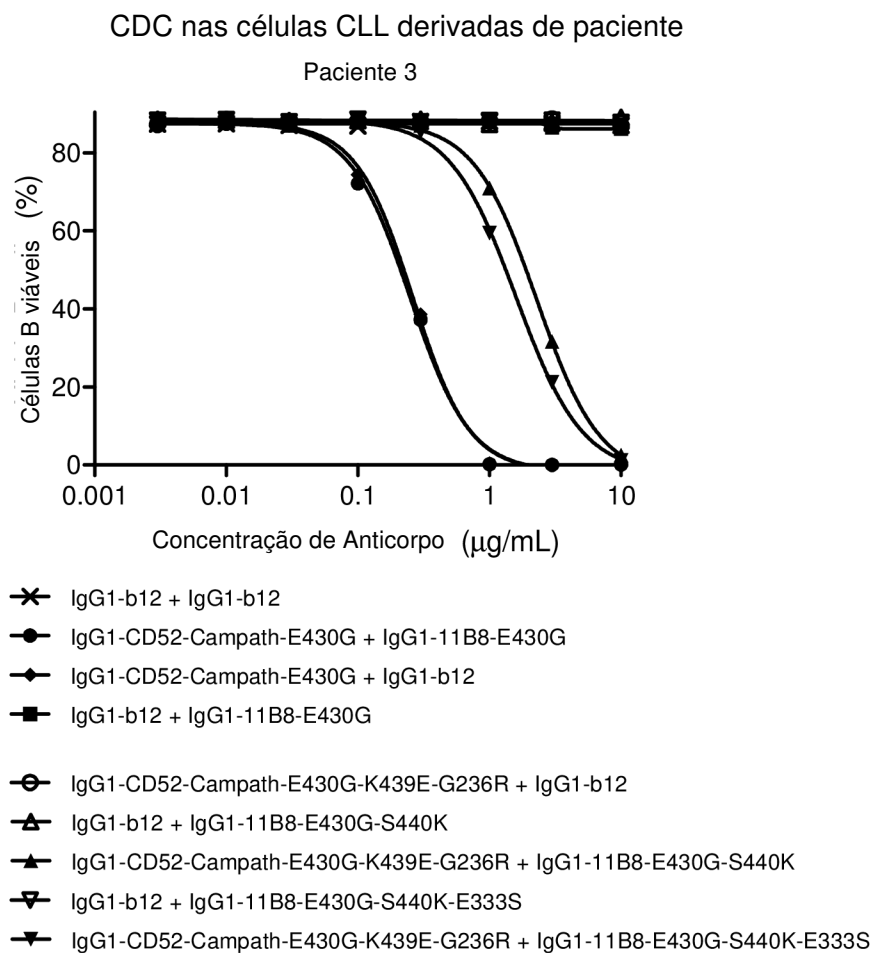


Figura 38

A

Citotoxicidade em sangue integral: células B

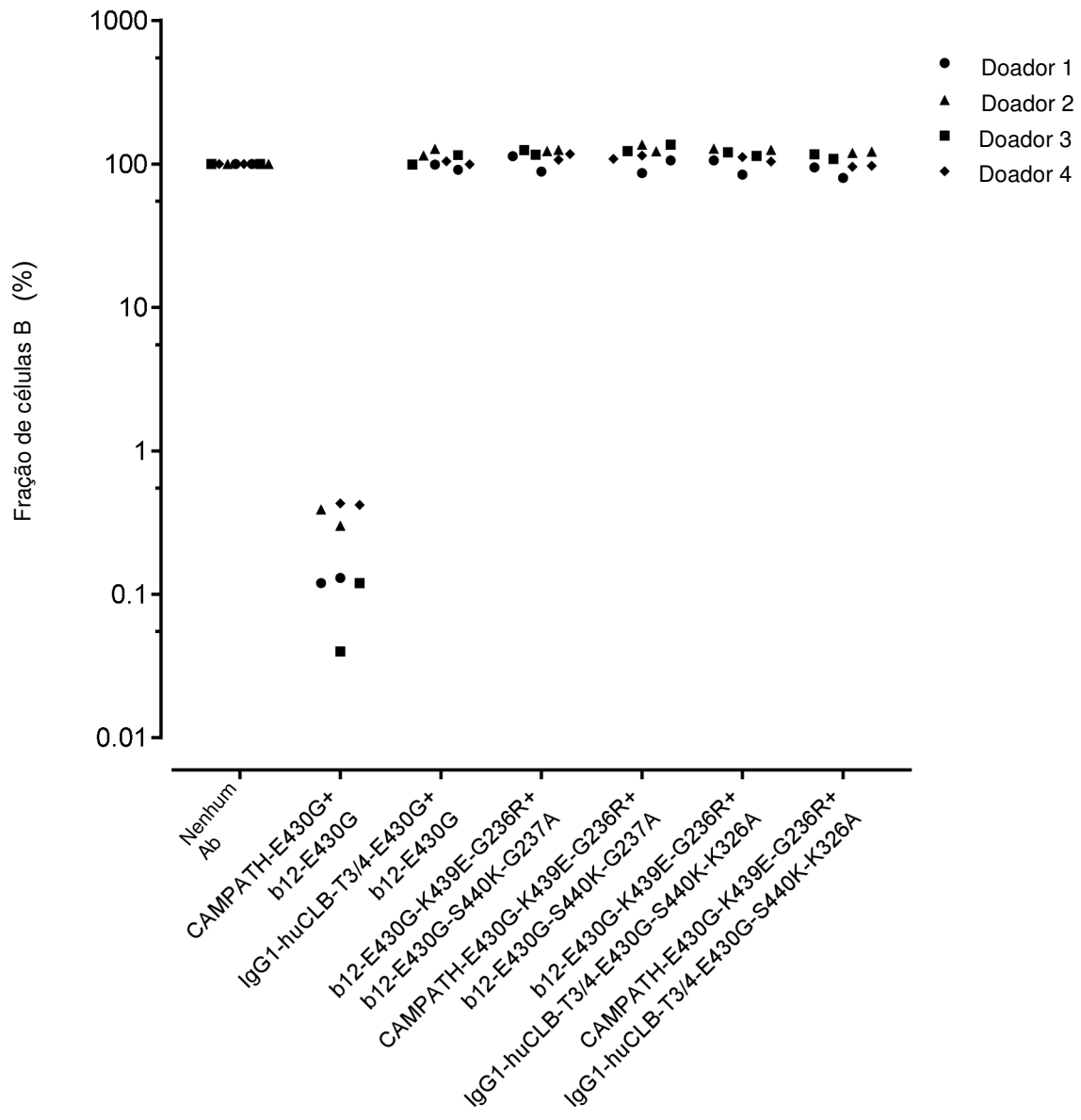


Figura 38 continuação

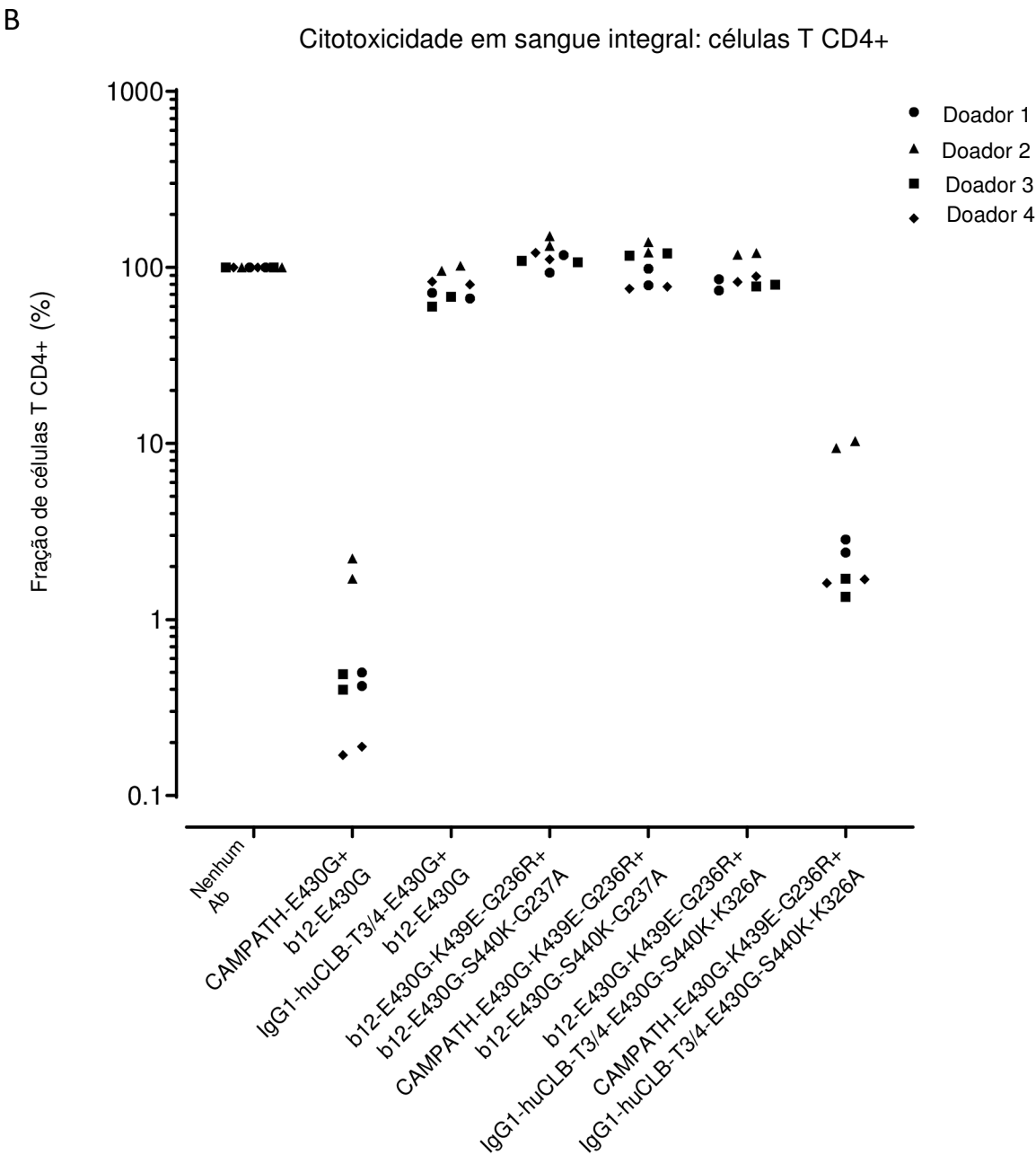


Figura 38 continuação

C

Citotoxicidade em sangue integral: células T CD8+

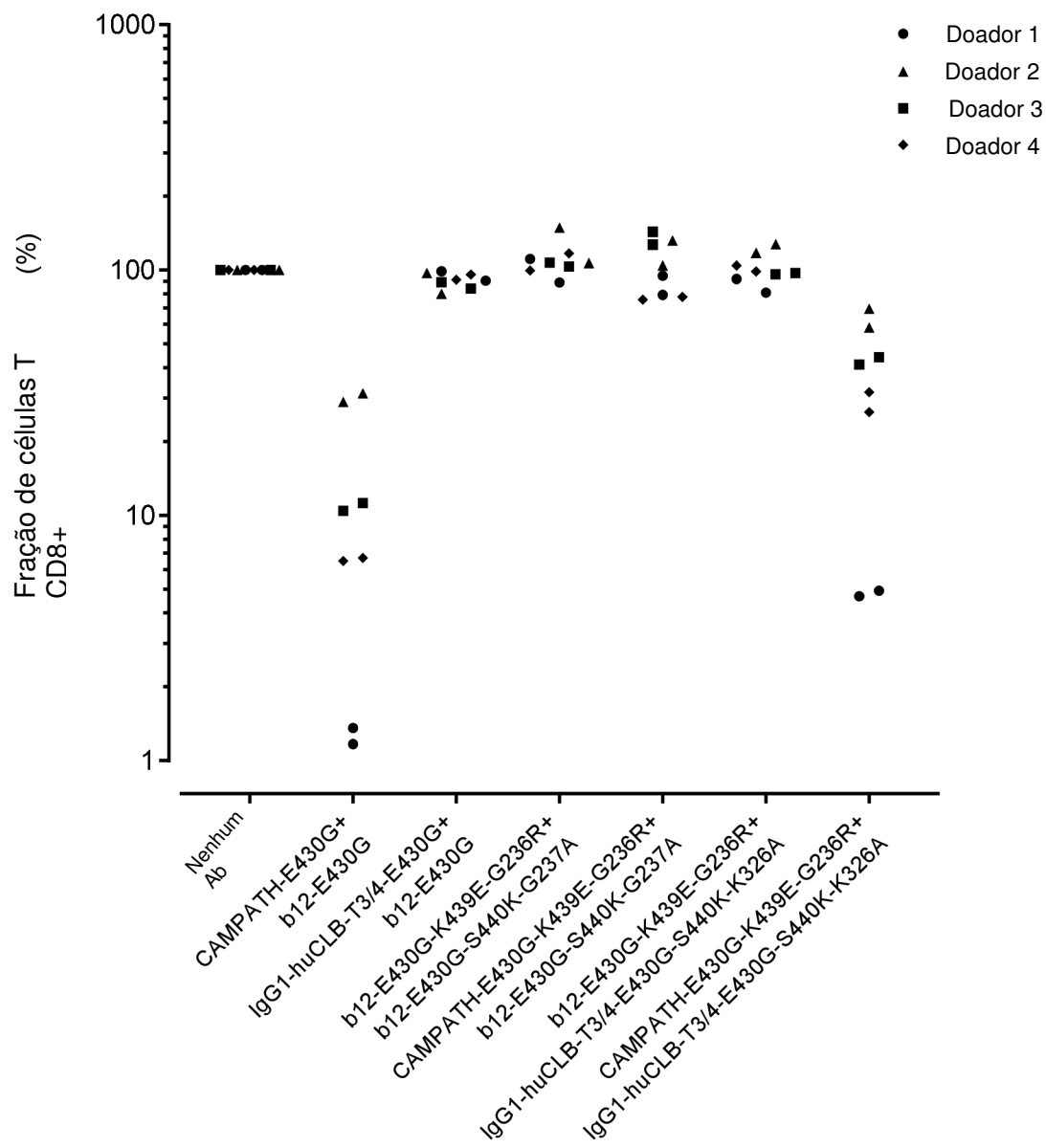


Figura 38 continuação

E

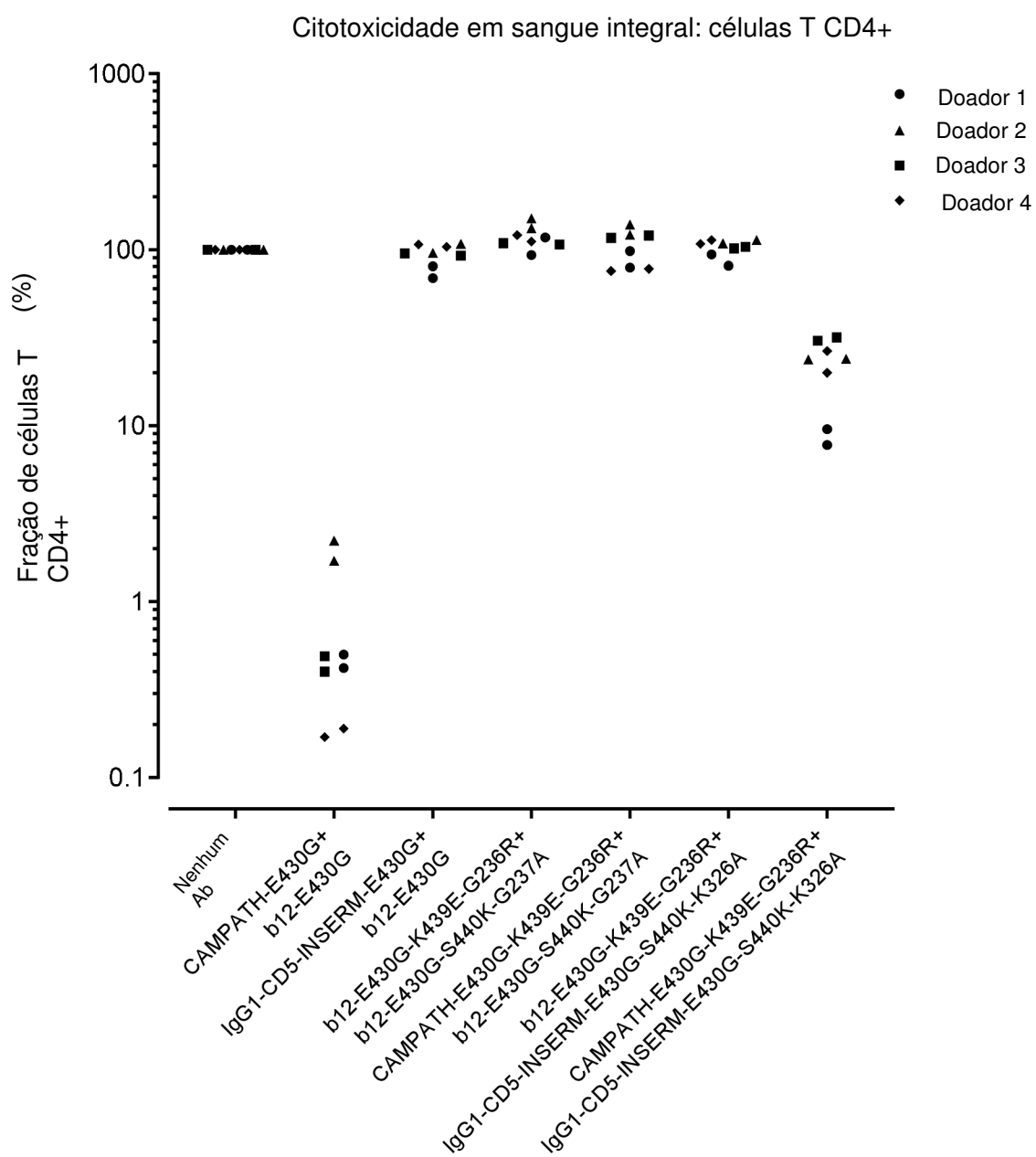


Figura 38 continuação

F

Citotoxicidade em sangue integral: células T CD8+

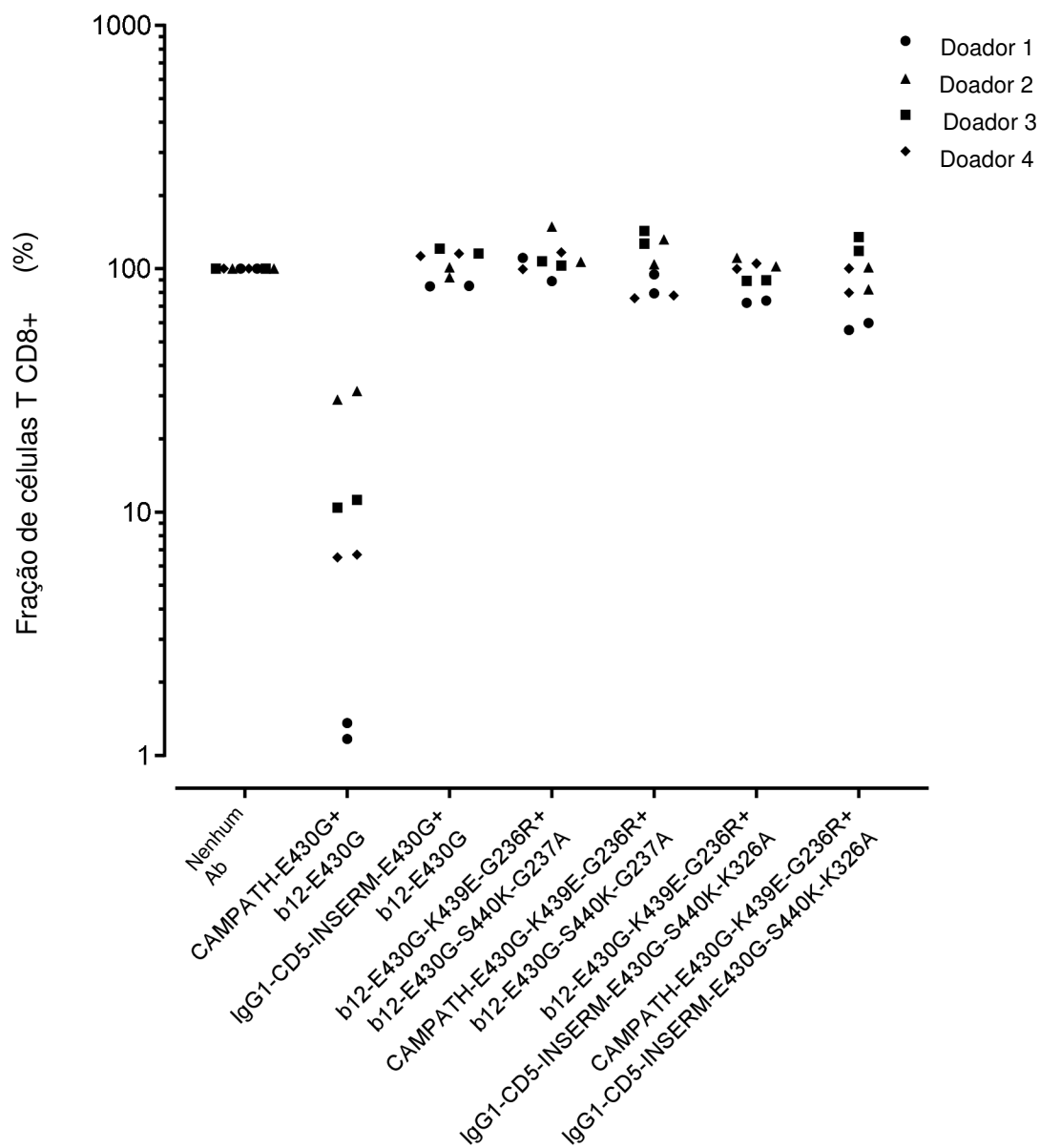
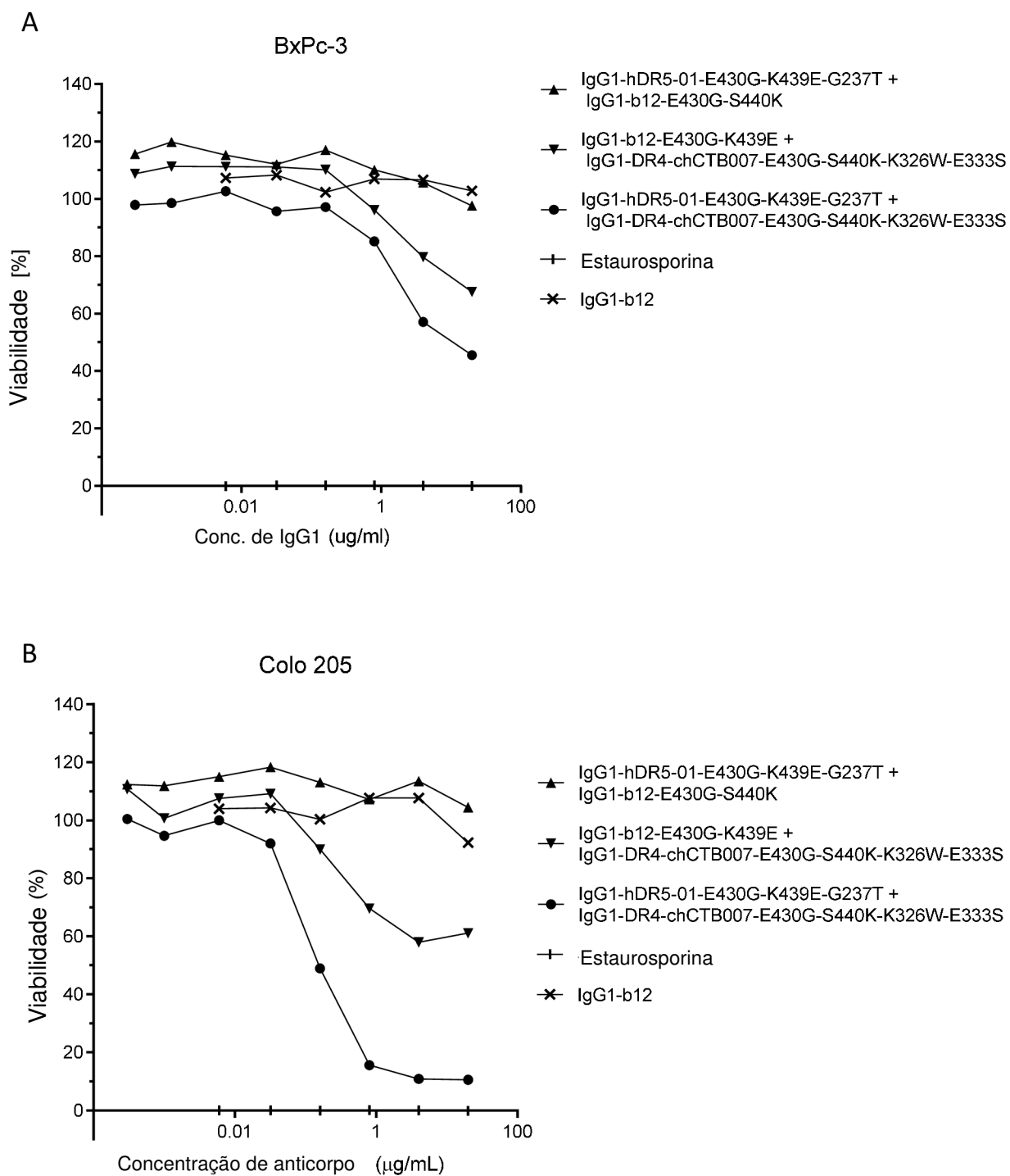


Figura 39



RESUMO

PRIMEIRO ANTICORPO, ANTICORPO, COMPOSIÇÃO, MÉTODOS PARA TRATAR UM INDIVÍDUO TENDO UMA DOENÇA, PARA ESGOTAR UMA POPULAÇÃO DE CÉLULA E PARA INDUZIR A PROLIFERAÇÃO EM UMA POPULAÇÃO DE CÉLULA, E, KIT

São aqui providas combinações de primeiro e segundo anticorpos tendo funções efetoras de Fc modificadas resultantes de substituições de aminoácido na região Fc, as substituições de aminoácido permitem a ativação codependente de funções efetoras tais como CDC e/ou ADCC. Também são providas combinações de primeiro e segundo anticorpos tendo atividade agonística ou atividade agonística realçada resultantes de substituições de aminoácido na região Fc onde a atividade agonística é codependente tanto de um primeiro quanto de um segundo anticorpos.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 142359_LS.txt
- Data de Geração do Código: 09/12/2020
- Hora de Geração do Código: 16:03:05
- Código de Controle:
 - Campo 1: BDD8D5D984678A37
 - Campo 2: 3AC1E8FBE5F40F45