

PROTEÍNAS FC MULTIMÉRICAS

La invención se refiere a proteínas multiméricas de fusión que se unen a receptores Fc humanos. La invención también hace referencia a composiciones terapéuticas que comprenden las proteínas multiméricas de fusión y a su uso en el tratamiento de trastornos del sistema inmune.

ANTECEDENTES

Los trastornos del sistema inmune abarcan una amplia variedad de enfermedades con diferentes signos, síntomas, etiologías y mecanismos patogénicos. Muchas de estas enfermedades se caracterizan por la participación activa de anticuerpos patógenos y/o complejos patógenos inmunes. En algunas enfermedades tales como PTI (variablemente llamada trombocitopenia inmune, púrpura trombocitopénica inmune, púrpura trombocitopénica idiopática) los antígenos diana para los anticuerpos patógenos (Hoernberg, Scand HJ Immunol, Vol 74 (5), p489-495, 2011) y el proceso de la enfermedad se entienden razonablemente. Dichos trastornos del sistema inmune se tratan a menudo con una variedad de agentes convencionales, ya sea como monoterapia o en combinación. Ejemplos de tales agentes son corticosteroides, que están asociados con numerosos efectos secundarios, inmunoglobulina intravenosa (IGIV) y anti-D.

Los anticuerpos, a menudo denominados como inmunoglobulinas, son moléculas en forma de Y que comprenden dos cadenas pesadas (H) idénticas y dos cadenas ligeras (L) idénticas, unidas por enlaces intercatenarios de disulfuro. Cada cadena se compone de un dominio variable (V) que varía en secuencia y es responsable de la unión al antígeno. Cada cadena también se compone de al menos un dominio constante (C). En la cadena ligera hay un solo dominio constante. En la cadena pesada hay por lo menos tres dominios constantes y a veces cuatro, dependiendo del isotipo (IgG, IgA e IgD tienen tres, IgM e IgE tienen cuatro).

En los seres humanos hay cinco clases o isotipos diferentes de inmunoglobulinas denominadas IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Todas estas clases tienen la estructura básica de forma de Y y de cuatro cadenas, pero difieren en sus cadenas pesadas, denominadas α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. IgA puede subdividirse en dos subclases, denominadas IgA1 e IgA2. Existen cuatro subclases de IgG, denominadas IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

El dominio Fc de un anticuerpo comprende normalmente al menos los dos últimos dominios constantes de cada cadena pesada que se dimerizan para formar el dominio Fc. El dominio Fc es responsable de proporcionar funciones efectoras de anticuerpos, incluyendo la determinación de semivida del anticuerpo, principalmente a través de la unión a FcRn, la distribución por todo el cuerpo, la capacidad de fijar el complemento y la unión a los receptores Fc de la superficie celular.

Las diferencias entre los isotipos de anticuerpos son más pronunciadas en los dominios Fc y esto conduce a la activación de diferentes funciones efectoras en la unión a antígenos. Las diferencias estructurales también conducen a diferencias en el estado de polimerización de los anticuerpos. Por lo tanto IgG, IgE e IgD son generalmente monoméricas, mientras que

IgM se produce tanto como un pentámero como un hexámero, e IgA se produce predominantemente como un monómero en suero y como un dímero en las secreciones sero-mucosa.

La inmunoglobulina intravenosa (IGIV) es la inmunoglobulina combinada de miles de donantes de sangre sanos. La IGIV se utilizó inicialmente como una terapia de reemplazo de IgG para prevenir las infecciones oportunistas en pacientes con bajos niveles de IgG (revisado en Baerenwaldt, *Expert Rev Clin Immunol*, Vol. 6 (3), p. 425-434, 2010). Después del descubrimiento de las propiedades anti-inflamatorias de IGIV en niños con PTI (Imbach, *Helv Paediatric Acta*, Vol. 36(1), p. 81-86, 1981), la IGIV está ahora autorizada para el tratamiento de PTI, el síndrome de Guillain-Barré, la enfermedad de Kawasaki y la polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (Nimmerjahn, *Annu Rev Immunol*, Vol. 26, p. 513-533, 2008).

En enfermedades que implican complejos inmunes patógenos, se ha propuesto que una fracción minoritaria de la fracción del componente de inmunoglobulina es desproporcionadamente efectiva. Se observa que hay trazas (normalmente 1-5%) de IgG presentes en formas multiméricas dentro de IGIV. Se piensa que la mayoría de esta fracción multimérica es dimérica con cantidades más pequeñas de formas triméricas y superiores. También se ha propuesto que se pueden formar dímeros adicionales después de la infusión mediante unión de anticuerpos anti-idiotipo receptores. Una teoría es que estas formas multiméricas compiten contra los complejos inmunes para la unión a receptores Fc γ de baja afinidad debido a su avidéz mejorada (Augener, *Blut*, Vol. 50, p. 249-252, 1985; Teeling, *Blood* 98 (4), p. 1095-1099, 2001; Machino, Y., *Clin Exp Immunol*, Vol. 162 (3), p. 415-424, 2010; Machino, Y. et al, *BBRC*, Vol. 418, p. 748-753, 2012). Otra teoría es que las glicoformas de ácido siálico de IgG dentro de IGIV, especialmente, la presencia de niveles más altos de formas de ácido a2-6 siálico, provocan una alteración en el estado de activación del receptor Fc γ (Samuelsson, *Science*, Vol. 291, p. 484-486, 2001; Kaneko, *Science*, vol. 313, p. 670-673, 2006; Schwab, *J Immunol Europea* Vol. 42, p. 826-830, 2012; Sondermann, *PNAS*, Vol. 110 (24), p. 9868-9872, 2013).

En enfermedades que implican anticuerpos patogénicos se ha propuesto que la muy alta dosis de IGIV administrada a seres humanos (1-2 g/kg) anula eficazmente el mecanismo normal de homeostasis de IgG realizado por el FcRn. Efectivamente, una gran dilución de IgG de receptor por IGIV de donante da como resultado un aumento del catabolismo y una semivida en suero más corta de los anticuerpos patogénicos del paciente. Otros mecanismos propuestos para la eficacia incluyen la neutralización anti-idiotipo de anticuerpos patógenos y reducciones transitorias en factores de complemento (Mollnes, *Mol Immunol*, Vol. 34, p. 719-729, 1997; Crow, *Transfusion Medicine Reviews*, Vol. 22(2), p. 103-116, 2008; Schwab, I. y Nimmerjahn, F. *Nature Reviews Immunology*, Vol.13, p. 176-189, 2013).

El uso clínico de IGIV presenta desventajas significativas. La IGIV presenta una calidad variable del producto entre los fabricantes, debido a las diferencias inherentes en los métodos de fabricación y grupos de donantes (Siegel, *Pharmacotherapy* Vol. 25 (11) p. 78S-84, 2005). La IGIV se administra en dosis muy grandes, normalmente en el orden de 1-2 g/kg. Esta gran dosis requiere una larga duración de infusión, (4-8 horas, a veces repartidas en varios días), que puede ser desagradable para el paciente y puede generar eventos adversos relacionados con la infusión. Pueden producirse acontecimientos adversos

graves, siendo bien conocidas reacciones en personas con deficiencia de IgA. La liberación de citoquinas también se puede observar en pacientes que recibieron IGIV pero esto se minimiza en gran medida gracias al control cuidadoso de dosis y velocidad de administración. Como consecuencia de las grandes cantidades utilizadas por paciente y de la dependencia de donantes humanos, la fabricación de IGIV es costosa y los suministros mundiales son muy limitados.

Colectivamente, las desventajas de IGIV significan que existe una necesidad de mejora en términos de suministro clínico, administración y eficacia de moléculas capaces de interferir con la biología de la enfermedad de los anticuerpos patógenos y los complejos inmunes patógenos.

En la literatura, se ha descrito una proteína polimérica de fusión Fc para su uso como un sustituto potencial para la terapia con IGIV. (Mekhaïel et al; Nature Scientific Reports 1: 124, publicado el 19 de octubre de 2011). Mekhaïel et al. describen un extremo de hIgG1-Fc-LH309/310CL-hexamérico. Esta proteína comprende una doble mutación en la que la leucina en la posición 309 se sustituye por cisteína y la histidina en la posición 310 se sustituye por leucina.

En el momento de la invención se creía que la mutación doble de L309C/H310L era esencial para la polimerización de las unidades de monómero. (Mekhaïel et al; 2011). Sin embargo, los presentes inventores han creado sorprendentemente proteínas multiméricas de fusión que se ensamblan de manera eficiente en multímeros en ausencia de la mutación doble de L309C/H310L.

La ausencia del residuo de cisteína en la posición 309 simplifica el aislamiento y la purificación de la proteína multimérica de fusión, mejorando así su capacidad de fabricación. También puede reducir el potencial de inmunogenicidad. Asimismo, se describen otras modificaciones que mejoran en gran medida la seguridad y eficacia de la proteína multimérica de fusión de la presente invención.

En la presente invención, se proporcionaron por consiguiente proteínas multiméricas de fusión mejoradas con una mejor capacidad de fabricación y una mayor eficacia, que resuelven muchas de las desventajas de IGIV y de las alternativas del arte previo. Las proteínas se pueden producir en grandes cantidades, bajo condiciones cuidadosamente controladas, eliminando los problemas de suministro limitado y calidad variable. Además, la mayor eficacia permite la administración de dosis más pequeñas, reduciendo el riesgo de eventos adversos.

Las proteínas descritas por Mekhaïel et al fueron desarrolladas principalmente para su uso como vacunas, y estaban normalmente fusionadas a una proteína diferente denominada “pareja de fusión” tal como un antígeno, patrón molecular asociado a patógenos (PAMP), fármaco, ligando, receptor, citoquina o quimiocina. En un ejemplo, las proteínas de la presente invención no comprenden una pareja de fusión.

En el arte previo, se describieron proteínas de fusión poliméricas en las que se añadió la extensión carboxilo-terminal de IgM o IgA a los extremos carboxilo de las regiones

constantes de moléculas enteras de IgG para producir IgGs recombinantes similares a IgM. (Smith RIF y Morrison, S.L. Biotechnology, Vol. 12, p. 683-688, 1994; Smith RIF et al, J Immunol, Vol. 154, p. 2226-2236, 1995; Sorensen V. et al, J Immunol, Vol. 156, p. 2858-2865, 1996). Las moléculas de IgG estudiadas fueron inmunoglobulinas intactas que comprenden regiones variables. En contraste, las proteínas multiméricas de fusión de la presente invención no comprenden una región variable.

En la presente invención, se proporcionaron por consiguiente proteínas multiméricas de fusión mejoradas con una mejor capacidad de fabricación y una mayor seguridad y eficacia, que resuelven muchas de las desventajas de IGIV y de las alternativas del arte previo. Las proteínas se pueden producir de forma recombinante en grandes cantidades, bajo condiciones cuidadosamente controladas, eliminando los problemas de suministro limitado y calidad variable. Además, la mayor seguridad y eficacia permiten la administración de dosis más pequeñas y reducen significativamente el riesgo de eventos adversos.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Las proteínas multiméricas de fusión de la invención se han denominado colectivamente “multímeros Fc” y ambos términos se utilizan indistintamente en el presente documento.

A menos que se explique de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente una persona versada en la materia a la que pertenece esta descripción entendería. Todas las publicaciones y patentes a las que se hace referencia, se incorporan en el presente documento para referencia.

Se apreciará que cualquiera de las realizaciones descritas en este documento puede combinarse.

En la presente descripción se utiliza el sistema de numeración de la UE para referirse a los residuos en dominios de anticuerpo, a menos que se especifique otra cosa. Este sistema fue ideado originalmente por Edelman et al, 1969 y se describe en detalle en Kabat et al, 1987. Edelman et al., 1969; “The covalent structure of an entire yG immunoglobulin molecule,” PNAS Biochemistry Vol. 63 pp. 78-85.

Kabat et al., 1987; en Sequences of Proteins of Immunological Interest, Departamento de Salud y Servicios Humanos, NIH, EE.UU.

Cuando se menciona un número de posición y/o residuo de aminoácido para un isotipo de anticuerpo en particular, se pretende que el mismo sea aplicable a la posición y/o residuo de aminoácido correspondiente en cualquier otro isotipo de anticuerpo, tal como lo conoce una persona experta en el arte. Al hacer referencia a un residuo de aminoácido en un extremo derivado de IgM o IgA, el número de posición dado es el número de posición del residuo en IgM o IgA de origen natural, según la práctica convencional en el arte.

La presente invención proporciona una proteína multimérica de fusión que comprende dos o más unidades de monómero de polipéptido;

en donde cada unidad de monómero de polipéptido comprende un dominio Fc del anticuerpo que comprende dos regiones Fc de cadena pesada;
en donde cada región Fc de cadena pesada comprende cualquier residuo de aminoácido diferente a cisteína en la posición 309, y se fusiona en su C-terminal a un extremo, lo que hace que las unidades de monómero se ensamblen en un multímero; y
en donde cada unidad de monómero de polipéptido no comprende una región variable de anticuerpo.

En un ejemplo, las proteínas multiméricas de fusión de la presente invención comprenden además una pareja de fusión. El término “pareja de fusión” excluye específicamente uno o más dominios variables de anticuerpos. Por lo general, el término “pareja de fusión” se refiere a un antígeno, patrón molecular asociado a patógenos (PAMP), drogas, ligando, receptor, citocina o quimiocina.

Dicha pareja de fusión, cuando está presente, se fusiona al N-terminal de la o cada región Fc de cadena pesada. La pareja de fusión puede fusionarse directamente al N-terminal de la región Fc de cadena pesada. De forma alternativa, puede fusionarse indirectamente por medio de una secuencia de aminoácidos que interviene, que puede incluir una región bisagra, cuando está presente. Por ejemplo, una secuencia corta de enlace puede proporcionarse entre la pareja de fusión y la región Fc de cadena pesada.

En un ejemplo, las proteínas de la presente invención no comprenden una pareja de fusión.

En concreto, las proteínas multiméricas de fusión de la presente invención no comprenden una o más regiones variables de anticuerpos, normalmente las moléculas no comprenden o bien un VH o un anticuerpo de región variable VL. En un ejemplo, las proteínas multiméricas de fusión de la presente invención no comprenden un fragmento Fab.

Cada unidad de monómero de polipéptido de la proteína multimérica de fusión de la presente invención comprende un dominio Fc del anticuerpo.

El dominio Fc del anticuerpo de la presente invención puede derivar de cualquier especie adecuada. En una forma de realización, el dominio Fc del anticuerpo se deriva de un dominio Fc humano.

El dominio Fc del anticuerpo puede derivarse de cualquier clase adecuada de anticuerpo, incluyendo IgA (incluyendo subclases IgA1 e IgA2), IgD, IgE, IgG (incluyendo subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) e IgM. En una forma de realización, el dominio Fc del anticuerpo se deriva de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En una forma de realización, el dominio Fc del anticuerpo se deriva de IgG1. En una forma de realización, el dominio Fc del anticuerpo se deriva de IgG4.

El dominio Fc del anticuerpo comprende dos cadenas de polipéptido, cada una denominada como una región Fc de cadena pesada. Las dos regiones Fc de cadena pesada se dimerizan para crear el dominio Fc del anticuerpo. Mientras que las dos regiones Fc de cadena pesada dentro del dominio Fc del anticuerpo pueden ser diferentes una de otra, se apreciará que por lo general serán las mismas una de otra. Por lo tanto, cuando en el presente documento se

utilice el término “la región Fc de cadena pesada”, es con el fin de referirse a la región Fc de cadena pesada única que se dimeriza con una región Fc de cadena pesada idéntica para crear el dominio Fc del anticuerpo.

Normalmente, cada región Fc de cadena pesada comprende o consiste de dos o tres dominios constantes de cadena pesada.

En anticuerpos nativos, la región Fc de cadena pesada de IgA, IgD e IgG se compone de dos dominios constantes de cadena pesada (CH2 y CH3) y aquella de IgE e IgM se compone de tres dominios constantes de cadena pesada (CH2, CH3 y CH4). Estas se dimerizan para crear un dominio Fc.

En la presente invención, la región Fc de cadena pesada puede comprender dominios constantes de cadena pesada de una o más clases diferentes de anticuerpo, por ejemplo una, dos o tres clases diferentes.

En una forma de realización, la región Fc de cadena pesada comprende dominios CH2 y CH3 derivados de IgG1.

En una forma de realización, la región Fc de cadena pesada comprende dominios CH2 y CH3 derivados de IgG2.

En una forma de realización, la región Fc de cadena pesada comprende dominios CH2 y CH3 derivados de IgG3.

En una forma de realización, la región Fc de cadena pesada comprende dominios CH2 y CH3 derivados de IgG4.

Las proteínas multiméricas de fusión de la invención se han denominado colectivamente “multímeros Fc” y ambos términos se utilizan indistintamente en el presente documento.

Los presentes inventores han encontrado inesperadamente que el dominio CH3 juega un papel importante en el control de la polimerización de las unidades de monómero de las proteínas multiméricas de fusión de la presente invención. Se halló inesperadamente que la polimerización varía dependiendo de la subclase IgG de la que se derivó la región Fc. Los multímeros Fc que comprenden un dominio CH2 y un dominio CH3 derivados de IgG1 se ensamblan de manera muy eficiente en hexámeros, en donde aproximadamente 80% de las moléculas están presentes en forma hexamérica. En contraste, los multímeros Fc que comprenden un dominio CH2 y un dominio CH3 derivados de IgG4 formaron niveles más bajos de hexámeros. La investigación de multímeros Fc que comprenden regiones híbridas de Fc en las que el dominio CH2 se derivó de una subclase particular de IgG y el dominio CH3 se derivó de una subclase diferente de IgG reveló que la capacidad de formar hexámeros se codifica principalmente por el dominio CH3. La presencia de un dominio CH3 derivado de IgG1 aumenta significativamente la hexamerización. Los multímeros híbridos de Fc en los que el dominio CH3 se deriva de IgG1 y el dominio CH2 se deriva de IgG4 se ensamblan tan eficientemente como la IgG1 de tipo salvaje, en donde aproximadamente 80% de las moléculas son hexámeros. (Ejemplo 4 y Figura 3). Por lo

tanto, la sustitución del dominio CH3 de IgG4 con aquel de IgG1 mejora los niveles de hexamerización en comparación con multímeros Fc de IgG4 de tipo salvaje. El híbrido resultante tiene la ventaja de niveles altos de formación de hexámero mientras que conserva muchas de las propiedades deseables de IgG4.

Además, se sabe que el dominio CH3 de IgG1 confiere estabilidad térmica. (Garber y Demarest, Biochem y Biophys Res Comm, Vol. 355 p. 751-757 2007). Por lo tanto, los multímeros híbridos de Fc que comprenden un dominio CH3 derivado de IgG1 también habrán mejorado la estabilidad.

Así, en una forma de realización, la región Fc de cadena pesada comprende un dominio CH3 derivado de IgG1.

En una forma de realización, la región Fc de cadena pesada comprende un dominio CH2 derivado de IgG4 y un dominio CH3 derivado de IgG1.

En consecuencia, en una forma de realización, la presente invención proporciona una proteína multimérica de fusión que comprende dos o más unidades de monómero de polipéptido; en donde cada unidad de monómero de polipéptido comprende un dominio Fc de anticuerpo que comprende dos regiones Fc de cadena pesada; en donde cada región Fc de cadena pesada comprende cualquier residuo de aminoácido diferente a cisteína en la posición 309, y se fusiona en su C-terminal a un extremo, lo que hace que las unidades de monómero se ensamblen en un multímero; y en donde cada región Fc de cadena pesada comprende un dominio CH2 derivado de IgG4 y un dominio CH3 derivado de IgG1 y, opcionalmente, la unidad de monómero de polipéptido no comprende una región variable de anticuerpo.

Los inventores han demostrado que el aminoácido en la posición 355 del dominio CH3 es crítico para hexamerización. Se encontró que el residuo de arginina que normalmente se encuentra en la posición 355 del dominio CH3 de IgG1 promueve, particularmente, hexamerización eficiente. Véase Ejemplo 4 que se describe aen el presente documento a continuación.

Así, en una forma de realización, la región Fc de cadena pesada comprende un residuo de arginina en la posición 355.

La sustitución del residuo de arginina que normalmente se encuentra en la posición 355 del dominio CH3 de IgG1 con un residuo de cisteína (R355C) aumento la formación de hexámeros más allá de la de IgG1 de tipo salvaje. Véase el Ejemplo 4 que se describe en el presente documento a continuación.

Así, en una forma de realización, la región Fc de cadena pesada comprende un residuo de cisteína en la posición 355.

En los multímeros Fc de la presente invención, que comprenden un dominio CH3 derivado de IgG4, la sustitución del residuo de glutamina en la posición 355 con un residuo de arginina (Q355R) aumenta significativamente la hexamerización. Por lo tanto, el problema

de la hexamerización más baja de multímeros Fc de IgG4 puede resolverse mediante una simple sustitución de aminoácido. Esto tiene la ventaja de que el multímero Fc resultante se ensamble en hexámeros con alta eficiencia mientras que conservan las propiedades características de IgG4.

Así, en una forma de realización, la región Fc de cadena pesada comprende un dominio CH3 derivado de IgG4 en el que el residuo de glutamina en la posición 355 se ha sustituido con otro aminoácido.

Así, en una forma de realización, la región Fc de cadena pesada comprende un dominio CH3 derivado de IgG4 en el que el residuo de glutamina en la posición 355 se ha sustituido con un residuo de arginina (Q355R) o un residuo de cisteína (Q355C).

En una forma de realización, la región Fc de cadena pesada comprende un dominio CH4 de IgM. El dominio CH4 de IgM se encuentra normalmente entre el dominio CH3 y el extremo.

En una forma de realización, la región Fc de cadena pesada comprende los dominios CH2 y CH3 derivados de IgG y un dominio CH4 derivado de IgM.

Se apreciará que los dominios constantes de cadena pesada para su uso en la producción de una región Fc de cadena pesada de la presente invención pueden incluir variantes de los dominios constantes de origen natural descritos anteriormente. Tales variantes pueden comprender una o más variaciones de aminoácidos en comparación con los dominios constantes de tipo salvaje. En un ejemplo, la región Fc de cadena pesada de la presente invención comprende al menos un dominio constante que varía en secuencia con respecto al dominio constante de tipo salvaje. Se apreciará que los dominios constantes variantes pueden ser más largos o más cortos que el dominio constante de tipo salvaje. Preferiblemente, los dominios constantes variantes son al menos 50% idénticos o similares a un dominio constante de tipo salvaje. El término “identidad”, tal como se utiliza en el presente documento, indica que en cualquier posición particular en las secuencias alineadas, el residuo de aminoácido es idéntico entre las secuencias. El término “similitud”, tal como se utiliza en el presente documento, indica que en cualquier posición particular en las secuencias alineadas, el residuo de aminoácido es de un tipo similar entre las secuencias. Por ejemplo, la leucina puede sustituirse por isoleucina o valina. Otros aminoácidos que a menudo pueden sustituirse entre sí incluyen, pero no se limitan a:

- fenilalanina, tirosina y triptófano (aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas);
- lisina, arginina e histidina (aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas);
- aspartato y glutamato (aminoácidos que tienen cadenas laterales ácidas);
- asparagina y glutamina (aminoácidos que tienen cadenas laterales de amida); y
- cisteína y metionina (aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre).

Los grados de identidad y similitud se pueden calcular fácilmente (Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing, Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M., y Griffin, F.I.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von

Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991). En un ejemplo, los dominios constantes variantes son al menos 60% idénticos o similares a un dominio constante de tipo salvaje. En otro ejemplo, los dominios constantes variantes son al menos 70% idénticos o similares. En otro ejemplo, los dominios constantes variantes son al menos 80% idénticos o similares. En otro ejemplo, los dominios constantes variantes son al menos 90% idénticos o similares. En otro ejemplo, los dominios constantes variantes son al menos 95% idénticos o similares.

Cada región Fc de cadena pesada se fusiona en su C-terminal a un extremo, lo que hace que las unidades de monómero de polipéptido se ensamblen a un multímero.

La IgM e IgA se producen naturalmente en los seres humanos como multímeros covalentes de la unidad común de anticuerpo H_2L_2 . La IgM se produce como un pentámero cuando se ha incorporado una cadena J, o como un hexámero cuando carece de una cadena J. La IgA se produce como formas de monómero y dímero. Las cadenas pesadas de IgM e IgA poseen una extensión de 18 aminoácidos para el dominio constante de C-terminal, conocido como un extremo (tailpiece). Este extremo incluye un residuo de cisteína que forma un enlace de disulfuro entre cadenas pesadas en el polímero y se cree que tiene un papel importante en la polimerización. El extremo también contiene un sitio de glicosilación.

El extremo de la presente invención puede comprender cualquier secuencia de aminoácidos adecuada. Puede ser un extremo que se encuentra en un anticuerpo de origen natural o, de forma alternativa, puede ser un extremo modificado que difiere en longitud y/o composición de un extremo natural. Otros extremos modificados pueden ser totalmente sintéticos y pueden diseñarse para poseer propiedades deseadas para la multimerización, tal como la longitud, flexibilidad y composición de cisteína.

El extremo puede derivarse de cualquier especie adecuada. Los extremos de anticuerpos se conservan evolutivamente y se encuentran en la mayoría de especies, incluyendo especies primitivas como los teleósteos. En una forma de realización, el extremo de la presente invención se deriva de un anticuerpo humano.

En una forma de realización, el extremo comprende toda o parte de una secuencia de extremo de 18 aminoácidos de IgM humana o IgA, tal como se muestra en la Tabla 1.

El extremo puede fusionarse directamente al C-terminal de la región Fc de cadena pesada. De forma alternativa, puede fusionarse indirectamente por medio de una secuencia de aminoácidos que interviene. Por ejemplo, una secuencia corta de enlace puede proporcionarse entre el extremo y la región Fc de cadena pesada.

El extremo de la presente invención puede incluir variantes o fragmentos de las secuencias nativas descritas anteriormente. Una variante de un extremo de IgM o IgA tiene normalmente una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia nativa en 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 de las posiciones de 18 aminoácidos que se muestra en la Tabla 1. Un fragmento comprende normalmente 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 aminoácidos. El extremo puede ser un extremo híbrido de IgM/IgA. También se prevén fragmentos de variantes.

Tabla 1. Secuencias del extremo (tailpiece)

<u>Extremo</u>	<u>Secuencia</u>	
IgM	PTLYNVSLVMSDTAGTCY	SEQ ID NO: 1
IgA	PTHVNVSVVMAEVDGTCY	SEQ ID NO: 2

Cada región Fc de cadena pesada de la presente invención puede poseer opcionalmente una región bisagra modificada o nativa en su N-terminal.

Una región bisagra nativa es la región bisagra que normalmente se encuentra entre los dominios Fab y Fc en un anticuerpo de origen natural. Una región bisagra modificada es cualquier bisagra que difiere en longitud y/o la composición con respecto a la región bisagra nativa. Tales bisagras pueden incluir regiones bisagras de otras especies, como regiones bisagras de humano, ratón, rata, conejo, tiburón, cerdo, hámster, camello, llama o cabra. Otras regiones bisagras modificadas pueden comprender una región bisagra completa derivada de un anticuerpo de una clase o subclase diferente de aquella de la región Fc de cadena pesada. De forma alternativa, la región bisagra modificada puede comprender parte de una bisagra natural o una unidad de repetición en la que cada unidad en la repetición se deriva de una región bisagra natural. En una alternativa adicional, la región bisagra natural puede modificarse mediante la conversión de una o más cisteínas u otros residuos en residuos neutros, tales como serina o alanina, o al convertir residuos colocados adecuadamente en residuos de cisteína. Por estos medios, el número de residuos de cisteína en la región bisagra puede aumentar o disminuir. Otras regiones bisagras modificadas pueden ser totalmente sintéticas y pueden diseñarse para poseer propiedades deseadas, tales como longitud, composición de cisteína y flexibilidad.

Ya se ha descrito un número de regiones bisagras modificadas, por ejemplo en US5677425, WO9915549, WO2005003170, WO2005003169, WO2005003170, WO9825971 y WO2005003171, las cuales se han incorporado en este documento para referencia.

Ejemplos de secuencias bisagras adecuadas se muestran en la Tabla 2.

En una forma de realización, la región Fc de cadena pesada posee una región bisagra intacta en su N-terminal.

En una forma de realización, la región Fc de cadena pesada y la región bisagra se derivan de IgG4 y la región bisagra comprende la secuencia mutada CPPC (SEQ ID NO: 11). La región bisagra de núcleo de IgG4 humana contiene la secuencia CPSC (SEQ ID NO: 12) en comparación con IgG1 que contiene la secuencia CPPC. El residuo de serina presente en la secuencia de IgG4 lleva a una mayor flexibilidad en esta región, y por lo tanto una proporción de moléculas forman enlaces de disulfuro dentro de la misma cadena de proteína (un disulfuro intracatenario) en lugar de crear un puente a la otra cadena pesada en la molécula de IgG para formar el disulfuro intracatenario. (Angal S. et al, Mol Immunol, Vol. 30(1), p. 105-108, 1993). Cambiar el residuo de serina a una prolina para dar la misma secuencia central que la de IgG1 permite la formación completa de disulfuros

intracatenarios en la región bisagra de IgG4, reduciendo así la heterogeneidad en el producto purificado. Este isotipo alterado se denomina IgG4P.

Tabla 2. Secuencias bisagras

<u>Bisagra</u>	<u>Secuencia</u>	
IgA1 humana	VPSTPPTPSPSTPPTSPSPS	SEQ ID NO: 3
IgA2 humana	VPPPPP	SEQ ID NO: 4
IgD humana	ESPKAQASSVPTAQQAEGSLAKATTAPATTR NTGRGGEE KKKEKEKEEQEERETKTP	SEQ ID NO: 5
IgG1 humana	EPKSCDKTHTCPPCP	SEQ ID NO: 6
IgG2 humana	ERKCCVECPCPC	SEQ ID NO: 7
IgG3 humana	ELKTPIGDTHHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEP KSCDTP PPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP	SEQ ID NO: 8
IgG4 humana	ESKYGPPCPSCP	SEQ ID NO: 9
IgG4(P) humana	ESKYGPPCPPCP	SEQ ID NO: 10
Recombinante v1	CPPC	SEQ ID NO: 11
Recombinante v2	CPSC	SEQ ID NO: 12
Recombinante v3	CPRC	SEQ ID NO: 13
Recombinante v4	SPPC	SEQ ID NO: 14
Recombinante v5	CPPS	SEQ ID NO: 15
Recombinante v6	SPPS	SEQ ID NO: 16
Recombinante v7	DKTHTCAA	SEQ ID NO: 17
Recombinante v8	DKTHTCPPCPA	SEQ ID NO: 18
Recombinante v9	DKTHTCPPCPATCPPCPA	SEQ ID NO: 19
Recombinante v10	DKTHTCPPCPATCPPCPATCPPCPA	SEQ ID NO: 20
Recombinante v11	DKTHTCPPCPAGKPTLYNSLVMSDTAGTCY	SEQ ID NO: 21
Recombinante v12	DKTHTCPPCPAGKPTHVNVSVVMAEVDGTC Y	SEQ ID NO: 22
Recombinante v13	DKTHTCCVECPCPA	SEQ ID NO: 23
Recombinante v14	DKTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPA	SEQ ID NO: 24
Recombinante v15	DKTHTCPSCPA	SEQ ID NO: 25

La proteína multimérica de fusión de la invención puede comprender dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce o más unidades de monómero de polipéptido. Tales proteínas pueden denominarse de forma alternativa como un dímero,

trímero, tetrámero, pentámero, hexámero, heptámero, octámero, nonámero, decámero, undecámero, dodecámero, etc., respectivamente.

La proteína multimérica de fusión puede comprender una mezcla de proteínas multiméricas de fusión de diferentes tamaños, con un intervalo de números de unidades de monómero de polipéptido.

En una forma de realización, la proteína multimérica de fusión de la invención comprende seis o doce unidades de monómero de polipéptido.

En un ejemplo, la proteína multimérica de fusión de la presente invención es un hexámero. Por consiguiente, en un ejemplo, la presente invención proporciona una proteína multimérica de fusión que consiste en unidades de monómero de polipéptido; en donde cada unidad de monómero de polipéptido consiste en un dominio Fc de anticuerpo y una región de extremo; en donde cada dominio Fc de anticuerpo consiste de dos regiones Fc de cadena pesada en las que el residuo de aminoácido en la posición 309 es cualquier residuo de aminoácido diferente a la cisteína; y, opcionalmente, cada región Fc de cadena pesada posee una región bisagra en el N-terminal; y en donde la región de extremo se fusiona al C-terminal de cada región Fc de cadena pesada y hace que las unidades de monómero se ensamblen a un multímero.

En un ejemplo, la proteína multimérica de fusión de la presente invención es un hexámero purificado. En un ejemplo, el término “purificado” significa mayor que 80% de hexámero, por ejemplo mayor que 90% o 95% de hexámero.

Se apreciará que la cantidad de hexámero en una muestra puede determinarse utilizando cualquier método adecuado como cromatografía analítica de exclusión por tamaño, tal como se describe en el presente documento a continuación.

En un ejemplo, la presente invención proporciona una mezcla que comprende una proteína multimérica de fusión de la invención en más de una forma multimérica, por ejemplo hexámero y dodecámero, pero en la que la mezcla se enriquece para la forma hexamérica de dicha proteína multimérica de fusión.

En un ejemplo, una mezcla de este tipo puede comprender más de 80% de hexámero. En un ejemplo, una mezcla de este tipo puede comprender más de 85%, 90%, o 95% de hexámero.

Cada unidad de monómero de polipéptido de la invención comprende dos cadenas individuales de polipéptidos. Las dos cadenas de polipéptidos dentro de una unidad de monómero de polipéptido particular pueden ser las mismas entre sí o pueden ser diferentes entre sí. En una forma de realización, las dos cadenas de polipéptido son las mismas entre sí.

Del mismo modo, las unidades de monómero de polipéptido dentro de una proteína multimérica de fusión específica pueden ser las mismas entre sí o pueden ser diferentes

entre sí. En una forma de realización, las unidades de monómero de polipéptido son las mismas entre sí.

En una forma de realización, una cadena de polipéptido de una unidad de monómero de polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos conforme a la figura 2, opcionalmente con una bisagra alternativa o secuencia de extremo.

Por consiguiente, en un ejemplo, la presente invención también proporciona una proteína multimérica de fusión que comprende o que consiste en dos o más, preferentemente seis, unidades de monómero de polipéptido;

en donde cada unidad de monómero de polipéptido comprende dos cadenas de polipéptido idénticas, cada cadena de polipéptido comprende o consiste en la secuencia incluida en cualquiera de las SEQ ID Nos 26 a 47; y

en donde cada unidad de monómero de polipéptido no comprende una región variable de anticuerpo.

En un ejemplo, la presente invención también proporciona una proteína multimérica de fusión que comprende o que consiste en dos o más, preferentemente seis, unidades de monómero de polipéptido; en donde cada unidad de monómero de polipéptido comprende dos cadenas de polipéptido idénticas, cada cadena de polipéptido comprende o consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID No: 26, SEQ ID No: 27, SEQ ID No: 28, SEQ ID No: 29, SEQ ID No: 30, SEQ ID No: 31, SEQ ID No: 32, SEQ ID No: 33, SEQ ID No: 34, SEQ ID No: 35, SEQ ID No: 36, SEQ ID No: 37, SEQ ID No: 38, SEQ ID No: 39, SEQ ID No: 40, SEQ ID No: 41, SEQ ID No: 42, SEQ ID No: 43, SEQ ID No: 44, SEQ ID No: 45, SEQ ID No: 46 y SEQ ID No: 47; y

en donde, opcionalmente, cada unidad de monómero de polipéptido no comprende una región variable de anticuerpo.

En un ejemplo, donde la bisagra y el extremo pueden variarse de las secuencias incluidas en la SEQ ID NO 26 a 47, la presente invención proporciona una proteína multimérica de fusión que comprende dos o más unidades de monómero de polipéptido; en donde cada unidad de monómero de polipéptido comprende un dominio Fc de anticuerpo que comprende dos regiones Fc de cadena pesada;

en donde cada región Fc de cadena pesada comprende o consiste en la secuencia incluida en los aminoácidos 6 a 222 de una cualquiera de SEQ ID NOs 26 a 29 o aminoácidos 6 a 222 de una cualquiera de SEQ ID NOs 32 a 47 o la secuencia incluida en los aminoácidos 6 a 333 de SEQ ID NOs 30 o 31 y que se fusionan en su C-terminal a un extremo, lo que hace que las unidades de monómero se ensamblen a un multímero; y

en donde la unidad de monómero de polipéptido no comprende una región variable de anticuerpo.

Normalmente, y además del extremo en el C-terminal, cada región Fc de cadena pesada comprende además una secuencia bisagra en el N-terminal.

Las proteínas multiméricas de fusión de la presente invención pueden comprender una o más mutaciones que alteran las propiedades funcionales de las proteínas, por ejemplo, la unión a receptores Fc, tales como receptores FcRn o leucocitos, la unión para complementar la arquitectura modificada de enlace de disulfuro o los patrones alterados de

glicosilación, tal como se describe en el presente documento a continuación. Se apreciará que cualquiera de estas mutaciones puede combinarse de cualquier manera adecuada para lograr las propiedades funcionales deseadas y/o combinarse con otras mutaciones para alterar las propiedades funcionales de las proteínas.

En la presente invención, se han creado multímeros Fc que son adecuados específicamente para su uso en el tratamiento de trastornos del sistema inmune. Los multímeros Fc se diseñaron para poseer las siguientes propiedades:

La potencia de una proteína de multímero Fc para su uso en el tratamiento de trastornos del sistema inmune debe ser tan alta como sea posible. La potencia puede determinarse midiendo la inhibición de fagocitosis de macrófagos de las células diana recubiertas del anticuerpo, tal como se describe en el Ejemplo 6.

Los efectos secundarios no deseados deben ser tan bajos como sea posible. Los efectos secundarios no deseados pueden determinarse mediante la medición de la liberación de citoquina, la unión C1q y la activación plaquetaria, tal como se describe en los Ejemplos 8, 15 y 16 respectivamente.

El multímero Fc de IgG1 de tipo salvaje que comprende un dominio CH2 y CH3 derivado de IgG1 sin ninguna mutación adicional puede ser menos adecuado para utilizarse en el tratamiento de trastornos del sistema inmune, ya que, aunque muestra alta potencia de inhibición de fagocitosis, también muestra altos niveles de efectos secundarios no deseados, medidos por liberación de citoquina, unión C1q y activación plaquetaria.

El multímero Fc de IgG1 de tipo salvaje que comprende un dominio CH2 y CH3 derivado de IgG4 produce niveles muy bajos de efectos secundarios no deseados a pesar de que su potencia es baja en relación con la de IgG1. No obstante, la potencia del multímero Fc de IgG1 de tipo salvaje es todavía significativamente mayor que aquella de IGIV, tal como se muestra en la Figura 7.

En un ejemplo, la presente invención también proporciona proteínas del multímero Fc que se diseñaron para combinar las propiedades deseables de los multímeros Fc, de tanto IgG1 como de IgG4 de tipo salvaje, sin las propiedades no deseables. Estos multímeros Fc muestran niveles eficaces de potencia, mientras reducen efectos secundarios no deseados a un nivel tolerable, tal como se muestra a continuación en la Tabla 3. Se espera que estos multímeros Fc sean particularmente útiles para su uso en el tratamiento de trastornos del sistema inmune.

Tabla 3

<u>Multímero Fc</u>	<u>Inhibición de fagocitosis</u>	<u>Liberación IFNy</u>	<u>Unión C1q</u>	<u>Activación plaquetaria</u>
multímero Fc de IgG1 de tipo salvaje	el estándar para	el estándar	el estándar para	el estándar

	“similar a IgG1”	para “similar a IgG1”	“similar a IgG1”	para “similar a IgG1”
multímero Fc de IgG4 de tipo salvaje	el estándar para “similar a IgG4”	el estándar para “similar a IgG4”	el estándar para “similar a IgG4”	el estándar para “similar a IgG4”
IgG1 Fc IgM tp L309 L234F P331S	alta	media	similar a IgG4	similar a IgG4
Fc híbrido de IgG4-CH2 IgG1-CH3 IgM tp L309	media	similar a IgG4	similar a IgG4	baja
IgG4 Fc IgM tp L309 F234L	media	similar a IgG4	similar a IgG4	media
IgG4 Fc IgM tp L309 F234L F296Y	media	similar a IgG4	similar a IgG4	media
IgG4 Fc IgM tp L309 G327A S330A	media	similar a IgG4	similar a IgG4	similar a IgG4
IgG4 Fc IgM tp L309 G327A S331P	media	similar a IgG4	media	similar a IgG4
IgG4 Fc IgM tp L309 S330A S331P	media	similar a IgG4	media	similar a IgG4

En un ejemplo, la presente invención proporciona proteínas multiméricas de fusión que comprenden una o más mutaciones que disminuyen la liberación de citoquinas y/o disminuyen la activación plaquetaria y/o disminuyen la unión C1q en comparación con la proteína multimérica de fusión de origen no modificado. En un ejemplo, la de origen no modificado es una proteína multimérica de fusión de la presente invención que contienen dominios CH2 y CH3 derivados de IgG1.

La liberación de citoquina, la activación plaquetas y la unión C1q pueden medirse mediante cualquier método adecuado conocido en el arte. En un ejemplo, la liberación de citoquina se mide en un ensayo de liberación de citoquina de sangre total.

En un ejemplo, la activación plaquetaria se mide por citometría de flujo utilizando CD62p como un marcador de activación.

En un ejemplo, la unión C1q se mide por ELISA.

En un ejemplo, la presente invención proporciona proteínas multiméricas de fusión que comprenden una o más mutaciones que aumentan la potencia de inhibición de fagocitosis de macrófagos de células diana recubiertas del anticuerpo en comparación con la proteína multimérica de fusión de origen no modificado. En un ejemplo, la de origen no modificado

es una proteína multimérica de fusión de la presente invención que contiene un dominio CH2 y CH3 derivado de IgG4 o un dominio CH2 de IgG4 y un dominio CH3 de IgG1.

Los ensayos adecuados para medir la inhibición de fagocitosis de macrófagos de las células diana recubiertas del anticuerpo son conocidos en el arte y se describen en los ejemplos en el presente documento.

Por consiguiente, en un ejemplo, cada región Fc de cadena pesada de una proteína multimérica de fusión de la presente invención comprende dominios CH2 y CH3 derivados de IgG1, en los que el residuo de leucina en la posición 234 y/o el residuo de prolina en la posición 331 y/o la alanina en la posición 327 y/o la tirosina en la posición 296 se ha sustituido con otro aminoácido.

En una forma de realización, la región Fc de cadena pesada comprende dominios CH2 y CH3 derivados de IgG1, en los que el residuo de leucina en la posición 234 se ha sustituido con un residuo de fenilalanina y el residuo de prolina en la posición 331 se ha sustituido con un residuo de serina (L234F/P331S).

En una forma de realización, la región Fc de cadena pesada es un híbrido que comprende un dominio CH2 derivado de IgG4 y un dominio CH3 derivado de IgG1.

En un ejemplo, cada región Fc de cadena pesada de una proteína multimérica de fusión de la presente invención comprende un dominio CH2 de IgG4 y un dominio CH3 derivado de IgG4 o IgG1, en el que uno o más residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en el residuo de fenilalanina en la posición 234, el residuo de fenilalanina en la posición 296, el residuo de glicina en la posición 327, el residuo de serina en la posición 330 y el residuo de serina en la posición 331 se han sustituido con otro aminoácido.

En un ejemplo, cada región Fc de cadena pesada de una proteína multimérica de fusión de la presente invención comprende un dominio CH2 de IgG4 y un dominio CH3 derivado de IgG4 o IgG1, en el que uno o más residuos de aminoácidos o pares de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en F234, F234 y F296, G327, G327 y S331, S330 y S331, y, G327 y S330 se han sustituido por otro aminoácido.

En una forma de realización, la región Fc de cadena pesada comprende dominios CH2 y CH3 derivados de IgG4, en los que el residuo de fenilalanina en la posición 234 se ha sustituido con un residuo de leucina (F234L).

En una forma de realización, la región Fc de cadena pesada comprende dominios CH2 y CH3 derivados de IgG1, en los que el residuo de fenilalanina en la posición 234 se ha sustituido con un residuo de leucina y el residuo de fenilalanina en la posición 296 se ha sustituido con un residuo de tirosina (F234L/F296Y).

En una forma de realización, la región Fc de cadena pesada comprende dominios CH2 y CH3 derivados de IgG4, en los que el residuo de glicina en la posición 327 se ha sustituido con un residuo de alanina y el residuo de serina en la posición 330 se ha sustituido con un residuo de alanina (G327A/S330A).

En una realización, la región Fc de cadena pesada comprende dominios CH2 y CH3 derivados de IgG4, en los que el residuo de glicina en la posición 327 se ha sustituido con un residuo de alanina y el residuo de serina en la posición 331 se ha sustituido con un residuo de prolina (G327A/S331P).

En una realización, la región Fc de cadena pesada comprende dominios CH2 y CH3 derivados de IgG4, en los que el residuo de serina en la posición 330 se ha sustituido con un residuo de alanina y el residuo de serina en la posición 331 se ha sustituido con un residuo de prolina (S330A/S331P).

En una forma de realización, la región Fc de cadena pesada es un híbrido que comprende un dominio CH2 derivado de IgG4 y un dominio CH3 derivado de IgG1, en el que el residuo de fenilalanina en la posición 234 se ha sustituido con un residuo de leucina (F234L).

En una realización, la región Fc de cadena pesada es un híbrido que comprende un dominio CH2 derivado de IgG4 y un dominio CH3 derivado de IgG1, en el que el residuo de fenilalanina en la posición 234 se ha sustituido con un residuo de leucina y el residuo de fenilalanina en la posición 296 se ha sustituido con un residuo de tirosina (F234L/F296Y).

En una forma de realización, la región Fc de cadena pesada es un híbrido que comprende un dominio CH2 derivado de IgG4 y un dominio CH3 derivado de IgG1, en el que el residuo de glicina en la posición 327 se ha sustituido con un residuo de alanina y el residuo de serina en la posición 330 se ha sustituido con un residuo de alanina (G327A/S330A).

En una forma de realización, la región Fc de cadena pesada es un híbrido que comprende un dominio CH2 derivado de IgG4 y un dominio CH3 derivado de IgG1, en el que el residuo de glicina en la posición 327 se ha sustituido con un residuo de alanina y el residuo de serina en la posición 331 se ha sustituido con un residuo de prolina (G327A/S331P).

En una forma de realización, la región Fc de cadena pesada es un híbrido que comprende un dominio CH2 derivado de IgG4 y un dominio CH3 derivado de IgG1, en el que el residuo de serina en la posición 330 se ha sustituido con un residuo de alanina y el residuo de serina en la posición 331 se ha sustituido con un residuo de prolina (S330A/S331P).

La proteína multimérica de fusión de la invención puede mostrar unión alterada a uno o más receptores de Fc (FcR's) en comparación con la unidad de monómero polipéptido correspondiente y/o inmunoglobulina nativa. La unión a cualquier receptor Fc particular puede aumentar o disminuir. En una forma de realización, la proteína multimérica de fusión de la invención comprende una o más mutaciones que alteran el perfil de unión del receptor Fc.

El término “mutación”, tal como se utiliza en el presente documento, puede incluir sustitución, adición o delección de uno o más aminoácidos.

Las células humanas pueden expresar una serie de FcR's unidos a la membrana seleccionados de FcαR, FcγR, FcγR, FcRn y receptores de glicano. Algunas células también

son capaces de expresar FcR soluble (ectodominio) (Fridman et al, (1993) J Leukocyte Biology 54: 504-512 para su revisión). El FcγR puede dividirse aún más por afinidad de unión de IgG (alta baja) y efecto biológico (activación/inhibición). El FcγRI humano es ampliamente considerado como el único receptor de “alta afinidad”, mientras que todos los demás se consideran de mediana a baja. El FcγRIIb es el único receptor con funcionalidad ‘inhibitoria’ gracias a su motivo intracelular ITIM, mientras que se considera que todos los demás se “activan” gracias a motivos ITAM o emparejamiento con la cadena común γ - FcγR. El FcγRIIIb también es único en que aunque es activador se asocia con la célula a través de un GPI. En total, los seres humanos expresan seis FcγR “estándar”: FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIc, FcγRIIIa FcγRIIIb. Además de estas secuencias, existen un gran número de secuencias o variantes alotípicas repartidas en estas familias. Se ha hallado que algunos de ellas tienen consecuencias funcionales importantes y que se consideran a veces como subtipos de receptores por sí mismos. Ejemplos incluyen FcγRIIa^{H134R}, FcγRIIb^{I190T}, FcγRIIIa^{F158V} and FcγRIIIb^{NA1}, FcγRIIIb^{NA2} FcγRIIIb^{SH}. Cada secuencia de receptor ha demostrado tener diferentes afinidades para las 4 subclases de IgG: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 (Bruhns Blood (1993) Vol. 113, p. 3716-3725). Otras especies tienen algunos números y funcionalidades diferentes de FcγR, en donde el sistema de ratón es el mejor estudiado hasta la fecha y que comprende 4 FcγR; FcγRI, FcγRIIb, FcγRIII, FcγRIV (Bruhns, Blood (2012) Vol. 119, p. 5640-5649). Se considera normalmente que el FcγRI humano en las células se ‘ocupa’ mediante IgG monomérica en condiciones normales en suero debido a su afinidad por IgG1/IgG3/IgG4 (~10⁻⁸M) y la concentración de estos IgG en suero (~10mg/ml). Por lo tanto, se considera que las células que en su superficie llevan FcγRI son capaces de “selección” o “muestreo” de su entorno antigénico indirectamente a través de la IgG poliespecífica unida. Se considera normalmente que los otros receptores tienen afinidades más bajas para subclases IgG (en el rango de (~10⁻⁵ – 10⁻⁷M) se encuentran “desocupados”. Los receptores de baja afinidad son por lo tanto inherentemente sensibles a la detección de y a la activación mediante complejos inmunes implicados de anticuerpos. La densidad aumentada de Fc en un complejo inmune de anticuerpo resulta en una afinidad funcional aumentada de “avidez” de unión para baja afinidad FcγR. Esto se ha demostrado *in vitro* utilizando una serie de métodos (Shields R.L. et al, J Biol Chem, Vol. 276(9), p. 6591 -6604, 2001; Lux et al., J Immunol (2013) Vol. 190, p. 4315-4323). También se ha implicado como uno de los principales modos de acción en el uso de anti-RhD para el tratamiento de la PTI en los seres humanos (Crow Transfusion Medicine Reviews (2008) Vol. 22, p. 103-116).

Muchos tipos de células expresan múltiples tipos de FcγR y así la unión del IgG o el complejo inmune de anticuerpo a células que llevan FcγR pueden tener resultados múltiples y complejos dependiendo del contexto biológico. De manera más simple, las células pueden recibir una señal de activación, inhibidora o mixta. Esto puede resultar en eventos tales como fagocitosis (por ejemplo, macrófagos y neutrófilos), procesamiento de antígenos (por ejemplo, células dendríticas), producción reducida de IgG (por ejemplo, células B) o desgranulación (por ejemplo, neutrófilos, mastocitos). Hay datos que apoyan que la señal inhibidora de FcγRIIb puede dominar la de las señales activadoras (Proulx Clinical Immunology (2010) 135:422-429).

Las citoquinas son una familia de proteínas altamente potentes que modulan células del sistema inmune o afectan la muerte de células diana tales como células huésped infectadas

por virus o pre-cancerosas. El alto nivel de potencia se ha investigado para su uso como proteínas terapéuticas por sí mismas o después de fusión a estructuras diana. Los IL-2, TNF α , G-CSF, GM-CSF, IFN α , IFN β , IFN γ se han investigado para su uso en seres humanos. Su potencia extrema se evidenció mediante una amplia gama de efectos secundarios o eventos adversos que dieron lugar a usos más restringidos en pacientes con enfermedades graves o potencialmente mortales.

La producción de citoquinas *in vivo* puede obtenerse después de la administración sistémica de proteínas terapéuticas, tales como anticuerpos o inmunoglobulinas. La producción de citoquina puede ser de corta duración y temporal, tal como durante e inmediatamente después de la administración por infusión o inyección subcutánea. Por ejemplo, la infusión de la inmunoglobulina intravenosa es conocido por dar lugar a la producción de TNF α , IL-6, IL-8 y IFN γ (Aukrust P et al, Blood, Vol. 84, p. 2136-2143, 1994), que se asocia con eventos relacionados a infusión común: fiebre, escalofríos y náuseas. La producción de citoquina puede ser de vida más larga y en relación con el modo de acción de fármacos debido a la activación de células efectoras, por ejemplo como en las que se denominan ‘síndrome de lisis tumoral’. Ejemplos extremos han sido potencialmente mortales cuando la administración de un fármaco causa “tormenta de citoquina” (Suntharalingam G et al, N Engl J Med, Vol 355, p1018-1028, 2006).

Existe una clara necesidad de entender y reducir el riesgo de liberación de citoquina de las proteínas recombinantes producidas. Las proteínas recombinantes que contienen el dominio Fc de anticuerpos, y que son capaces de convertirse funcionalmente en multivalentes, requieren una atención especial.

En el presente estudio de los dominios Fc multiméricos, se utilizó un ensayo de liberación de citoquina de sangre total para estudiar los efectos de mutagénesis con el objetivo de minimizar la liberación de citoquina. (Ejemplo 7).

Las plaquetas (trombocitos) son células anucleadas pequeñas que son muy abundantes en la sangre. Las plaquetas están implicadas, junto con los factores de coagulación y otras células, en el cese de hemorragia mediante la formación de coágulos de sangre. Las plaquetas están implicadas en una serie de enfermedades. La “trombocitopenia” de bajo recuento de plaquetas puede ser causado por una serie de factores y resultados en hematomas y sangrado aumentado. La “trombosis” de coagulación involuntaria incluye eventos tales como el derrame cerebral y trombosis venosa profunda. Las plaquetas de primates no humanos y humanos, pero no las plaquetas de ratones, expresan Fc γ RIIa en su superficie. Las plaquetas pueden responder muy rápidamente a daños en vasos por medio de ‘gránulos densos’ preformados y ‘gránulos alfa’ y liberación de inmunokines potentes y otras moléculas tales como histamina, serotonina, tromboxano, PAF, PDGF, TGF γ IL1 β y muchos otras (Semple Nature Reviews Immunology 2011 11: 265-274).

Las plaquetas se han involucrado mecánicamente en la toxicología de fármacos administrados a seres humanos. Se ha hallado que ciertos anticuerpos son de especial interés debido a que tanto su antígeno diana como el dominio Fc han sido capaces de interactuar con la plaqueta, activándolos y provocando trombosis (Horsewood 1991 78 (4): 1019- 1026). Se han propuesto mecanismos de unión doble directa para anti-CD40 Mabs

(anticuerpos monoclonales anti-CD40) (anticuerpos (Langer Thrombosis and Haemostasis 2005 93:1127-1146). De forma alternativa, la trombosis puede ser causada indirectamente por anticuerpos entrecruzados con una molécula diana que puede interactuar con plaquetas como por ejemplo en 'síndrome HIT' (trombocitopenia inducida por heparina). La heparina no fraccionada se asoció con trombosis venosa en aproximadamente el 12% o destinatarios (Levine Chest 2006 130: 681-687). En otros ejemplos, tales como Mabs enfocados a VEGF, es probable que el mecanismo de acción involucre la actuación de la heparina como puente entre el VEGF, el anticuerpo y las plaquetas (Scappaticci 2007 J National Cancer Institute 99:1232-1239; Meyer J. Thrombosis and Haemostasis 2009 7:171-181). La trombosis también puede ser causada por IgG agregada, por lo tanto, la calidad del producto es de importancia en la fabricación de IgG y tal vez de especial importancia en la fabricación de dominios Fc multiméricos (Ginsberg J. Experimental Medicine 1978 147:207-218).

La activación plaquetaria es un precursor para la trombosis, pero no necesariamente destinado para ella. La activación plaquetaria se puede seguir *in vitro* por medio de ensayos de liberación de serotonina o al seguir marcadores de activación tales como CD62p, CD63 o PAC-1. La agregación plaquetaria se puede observar directamente *in vitro* por medio de la sangre total, plasma rico en plaquetas o ensayos lavados de agregación plaquetaria. Los ratones transgénicos para la expresión FcγRIIa humana en las plaquetas también pueden utilizarse para estudiar trombosis o reducción de coagulación *in vivo*. La construcción de proteínas multiméricas de dominio Fc plantea un riesgo previsible en lo que respecta a la trombosis, por lo tanto, en la presente invención se utilizó la ingeniería Fc y los ensayos de activación plaquetaria para comprender y garantizar la seguridad de los multímeros Fc. El FcRn tiene un papel crucial en el mantenimiento de la semivida larga de IgG en el suero de adultos y niños. El receptor une IgG en vesículas acidificadas (pH <6,5) que protegen la molécula de IgG de la degradación y luego la liberan en el pH mayor de 7,4 en la sangre.

Es poco probable que el FcRn sea receptores Fc de leucocitos, ya que en su lugar tiene similitud estructural a las moléculas MHC de clase I. Es un heterodímero compuesto de una cadena de β2-microglobulina, que no se encuentra unida covalentemente a una cadena unida a la membrana que incluye tres dominios extracelulares. Uno de esos dominios, que incluye una cadena de hidratos de carbono, junto con β2-microglobulina, interactúa con un sitio entre los dominios CH2 y CH3 de Fc. La interacción incluye puentes de sal hechos para residuos de histidina en IgG que están cargados positivamente a pH <6,5. A un pH más alto, los residuos His pierden sus cargas positivas, la interacción de FcRn-IgG se debilita y la IgG se disocia.

En la literatura, se ha descrito una proteína polimérica de fusión Fc para su uso como un sustituto potencial para la terapia con IGIV, pero esta proteína no se une a FcRn humano. Por lo tanto, tiene una funcionalidad reducida *in vivo*. (Mekhaie et al; Nature Scientific Reports 1: 124, publicado el 19 de octubre de 2011).

Mekhaie et al. describen un extremo hlgG1-Fc-LH309/310CL-hexamérico de la proteína polimérica de fusión Fc humano. Esta proteína comprende una doble mutación en la que la leucina en la posición 309 se sustituye por cisteína y la histidina en la posición 310 se

sustituye por leucina. Debido a que el H310 es crítico para la unión a FcRn humano, la proteína descrita por Mekhaïel no es capaz de unirse a FcRn humano.

En el momento de la invención se creía que la mutación doble de L309C/H310L era esencial para la polimerización de las unidades de monómero. (Mekhaïel et al; 2011). Sin embargo, los presentes inventores han creado sorprendentemente proteínas multiméricas de fusión que se ensamblan de manera eficiente en multímeros en ausencia de la mutación doble de L309C/H310L.

Se cree que los residuos de cisteína creados por la mutación de L309C forman enlaces intracatenarios de disulfuro con cisteínas L309C en unidades adyacentes de monómero. Dado que estos disulfuros se encuentran en una proximidad muy cercana a H310, su presencia puede resultar en unión obstruida de FcRn. En la proteína multimérica de fusión de la invención, la ausencia de la mutación de L309C permite la unión sin restricciones a FcRn.

Además, la ausencia del residuo de cisteína en la posición 309 simplifica el aislamiento y la purificación de la proteína multimérica de fusión, mejorando así su capacidad de fabricación. También puede reducir el potencial de inmunogenicidad.

Además, mediante la retención del residuo de histidina en la posición 310 y, preferiblemente, también en la posición 435, la proteína multimérica de fusión de la invención es capaz de unirse a FcRn humano, y está protegida de la degradación, resultando en una semivida más larga y una mayor funcionalidad.

Por lo tanto, en una forma de realización, la proteína multimérica de fusión de la invención se une a FcRn humano.

En una forma de realización, la proteína multimérica de fusión tiene un residuo de histidina en la posición 310 y, preferiblemente, también en la posición 435. Estos residuos de histidina son importantes para la unión a FcRn humano. En una forma de realización, los residuos de histidina en las posiciones 310 y 435 son residuos nativos, es decir, las posiciones 310 y 435 no están mutadas. De forma alternativa, uno o ambos de estos residuos de histidina puede estar presente como resultado de una mutación.

La proteína multimérica de fusión de la invención puede comprender una o más mutaciones que alteran su unión a FcRn. La unión alterada puede ser unión aumentada o unión disminuida.

En una forma de realización, la proteína multimérica de fusión comprende una o más mutaciones de modo que se une a FcRn con mayor afinidad y aidez que la inmunoglobulina nativa correspondiente.

En una forma de realización, el dominio Fc se muta mediante la sustitución del residuo de treonina en la posición 250 con un residuo de glutamina (T250Q).

En una forma de realización, el dominio Fc se muta mediante la sustitución del residuo de metionina en la posición 252 con un residuo de tirosina (M252Y).

En una forma de realización, el dominio Fc se muta mediante la sustitución del residuo de serina en la posición 254 con un residuo de treonina (S254T).

En una forma de realización, el dominio Fc se muta mediante la sustitución del residuo de treonina en la posición 256 con un residuo de ácido glutámico (T256E).

En una forma de realización, el dominio Fc se muta mediante la sustitución del residuo de treonina en la posición 307 con un residuo de alanina (T307A).

En una forma de realización, el dominio Fc se muta mediante la sustitución del residuo de treonina en la posición 307 con un residuo de prolina (T307P).

En una forma de realización, el dominio Fc se muta mediante la sustitución del residuo de valina en la posición 308 con un residuo de cisteína (V308C).

En una forma de realización, el dominio Fc se muta mediante la sustitución del residuo de valina en la posición 308 con un residuo de fenilalanina (V308F).

En una forma de realización, el dominio Fc se muta mediante la sustitución del residuo de valina en la posición 308 con un residuo de prolina (V308P).

En una forma de realización, el dominio Fc se muta mediante la sustitución del residuo de glutamina en la posición 311 con un residuo de alanina (Q311A).

En una forma de realización, el dominio Fc se muta mediante la sustitución del residuo de glutamina en la posición 311 con un residuo de arginina (Q311 R).

En una forma de realización, el dominio Fc se muta mediante la sustitución del residuo de metionina en la posición 428 con un residuo de leucina (M428L).

En una forma de realización, el dominio Fc se muta mediante la sustitución del residuo de histidina en la posición 433 con un residuo de lisina (H433K).

En una forma de realización, el dominio Fc se muta mediante la sustitución del residuo de asparagina en la posición 434 con un residuo de fenilalanina (N434F).

En una forma de realización, el dominio Fc se muta mediante la sustitución del residuo de asparagina en la posición 434 con un residuo de tirosina (N434Y).

En una forma de realización, el dominio Fc se muta mediante la sustitución del residuo de metionina en la posición 252 con un residuo de tirosina, el residuo de serina en la posición 254 con un residuo de treonina y el residuo de treonina en la posición 256 con un residuo de ácido glutámico (M252Y/S254T/T256E).

En una forma de realización, el dominio Fc se muta mediante la sustitución del residuo de valina en la posición 308 con un residuo de prolina y el residuo de asparagina en la posición 434 con un residuo de tirosina (V308P/N434Y).

En forma de realización, el dominio Fc se muta mediante la sustitución del residuo de metionina en la posición 252 con un residuo de tirosina, el residuo de serina en la posición 254 con un residuo de treonina, el residuo de treonina en la posición 256 con un residuo de ácido glutámico, el residuo de histidina en la posición 433 con un residuo de lisina y el residuo de asparagina en la posición 434 con un residuo de fenilalanina (M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F).

En una forma de realización, la proteína multimérica de fusión comprende una o más mutaciones de modo que se une a FcRn con menor afinidad y avidez que la inmunoglobulina nativa correspondiente. En una forma de realización, un residuo de histidina en la posición 310 se muta a otro residuo de aminoácido. En un ejemplo, un residuo de histidina en la posición 310 se sustituye con un residuo de leucina (H310L).

Se apreciará que cualquiera de las mutaciones mencionadas anteriormente puede combinarse para alterar la unión de FcRn.

La proteína multimérica de fusión de la invención puede comprender una o más mutaciones que aumentan su unión a FcγRIIb. El FcγRIIb es el único receptor inhibitor en los seres humanos y el único receptor Fc que se encuentra en las células B. Las células B y sus anticuerpos patógenos se encuentran en el corazón de muchas enfermedades inmunes y por lo tanto las proteínas multiméricas de fusión pueden proporcionar terapias mejoradas para estas enfermedades.

En una forma de realización, el dominio Fc se muta mediante la sustitución del residuo de prolina en la posición 238 con un residuo de ácido aspártico (P238D).

En una forma de realización, el dominio Fc se muta mediante la sustitución del residuo de ácido glutámico en la posición 258 con un residuo de alanina (E258A).

En una forma de realización, el dominio Fc se muta mediante la sustitución del residuo de serina en la posición 267 con un residuo de alanina (S267A).

En una forma de realización, el dominio Fc se muta mediante la sustitución del residuo de serina en la posición 267 con un residuo de ácido glutámico (S267E).

En una forma de realización, el dominio Fc se muta mediante la sustitución del residuo de leucina en la posición 328 con un residuo de fenilalanina (L328F).

En una forma de realización, el dominio Fc se muta mediante la sustitución del residuo de ácido glutámico en la posición 258 con un residuo de alanina y el residuo de serina en la posición 267 con un residuo de alanina (E258A/S267A).

En una forma de realización, el dominio Fc se muta mediante la sustitución del residuo de serina en la posición 267 con un residuo de ácido glutámico y el residuo de leucina en la posición 328 con un residuo de fenilalanina (S267E L328F).

Se apreciará que cualquiera de las mutaciones mencionadas anteriormente puede combinarse para aumentar la unión de FcγRIIb.

En una forma de realización de la invención se proporciona proteínas multiméricas de fusión que muestran disminución de unión a FcγR. La disminución de la unión a FcγR puede proporcionar terapias mejoradas para su uso en el tratamiento de enfermedades inmunes que implican anticuerpos patógenos.

En una forma de realización, la proteína multimérica de fusión de la presente invención comprende una o más mutaciones que disminuyen su unión a FcγR.

En una forma de realización, una mutación que disminuye la unión a FcγR se utiliza en una proteína multimérica de fusión de la invención que comprende un dominio Fc derivado de IgG1.

En una forma de realización, el dominio Fc se muta mediante la sustitución del residuo de leucina en la posición 234 con un residuo de alanina (L234A).

En una forma de realización, el dominio Fc se muta mediante la sustitución del residuo de fenilalanina en la posición 234 con un residuo de alanina (F234A).

En una forma de realización, el dominio Fc se muta mediante la sustitución del residuo de leucina en la posición 235 con un residuo de alanina (L235A).

En una forma de realización, el dominio Fc se muta mediante la sustitución del residuo de glicina en la posición 236 con un residuo de arginina (G236R).

En una forma de realización, el dominio Fc se muta mediante la sustitución del residuo de asparagina en la posición 297 con un residuo de alanina (N297A) o un residuo de glutamina (N297Q).

En una forma de realización, el dominio Fc se muta mediante la sustitución del residuo de serina en la posición 298 con un residuo de alanina (S298A).

En una forma de realización, el dominio Fc se muta mediante la sustitución del residuo de leucina en la posición 328 con un residuo de arginina (L328R).

En una forma de realización, el dominio Fc se muta mediante la sustitución del residuo de leucina en la posición 234 con un residuo de alanina y el residuo de leucina en la posición 235 con un residuo de alanina (L234A/L235A).

En una forma de realización, el dominio Fc se muta mediante la sustitución del residuo de fenilalanina en la posición 234 con un residuo de alanina y el residuo de leucina en la posición 235 con un residuo de alanina (F234A/L235A).

En una forma de realización, el dominio Fc se muta mediante la sustitución del residuo de glicina en la posición 236 con un residuo de arginina y el residuo de leucina en la posición 328 con un residuo de arginina (G236R/L328R).

Se apreciará que cualquiera de las mutaciones mencionadas anteriormente puede combinarse para disminuir la unión de Fc γ R.

En una forma de realización, la proteína multimérica de fusión de la presente invención comprende una o más mutaciones que disminuyen su unión a Fc γ RIIIa sin afectar su unión a Fc γ RII.

En una forma de realización, el dominio Fc se muta mediante la sustitución del residuo de serina en la posición 239 con un residuo de alanina (S239A).

En una forma de realización, el dominio Fc se muta mediante la sustitución del residuo de ácido glutámico en la posición 269 con un residuo de alanina (E269A).

En una forma de realización, el dominio Fc se muta mediante la sustitución del residuo de ácido glutámico en la posición 293 con un residuo de alanina (E293A).

En una forma de realización, el dominio Fc se muta mediante la sustitución del residuo de tirosina en la posición 296 con un residuo de fenilalanina (Y296F).

En una forma de realización, el dominio Fc se muta mediante la sustitución del residuo de valina en la posición 303 con un residuo de alanina (V303A).

En una forma de realización, el dominio Fc se muta mediante la sustitución del residuo de alanina en la posición 327 con un residuo de glicina (A327G).

En una forma de realización, el dominio Fc se muta mediante la sustitución del residuo de lisina en la posición 338 con un residuo de alanina (K338A).

En una forma de realización, el dominio Fc se muta mediante la sustitución del residuo de ácido aspártico en la posición 376 con un residuo de alanina (D376A).

Se apreciará que cualquiera de las mutaciones mencionadas anteriormente puede combinarse para disminuir la unión de Fc γ RIIIa.

La proteína multimérica de fusión de la invención puede comprender una o más mutaciones que alteran su unión a complemento. La unión del complemento alterado puede ser unión aumentada o unión disminuida.

En una forma de realización, la proteína comprende una o más mutaciones que disminuyen su unión a C1q. La iniciación de la vía clásica del complemento se inicia con la unión de la proteína hexamérica C1q al dominio CH2 del IgG e IgM unido a antígeno. Las proteínas multiméricas de fusión de la invención no poseen sitios de unión a antígeno, y por lo tanto no se espera que muestren una unión significativa a C1q. Sin embargo, la presencia de una o más mutaciones que disminuyen la unión de C1q se asegurará de que no activen el complemento en ausencia del acoplamiento de antígeno, proporcionando así terapias mejoradas con mayor seguridad.

Así, en una forma de realización, la proteína multimérica de fusión de la invención comprende una o más mutaciones para disminuir su unión a C1q.

En una forma de realización, el dominio Fc se muta mediante la sustitución del residuo de leucina en la posición 234 con un residuo de alanina (L234A).

En una forma de realización, el dominio Fc se muta mediante la sustitución del residuo de leucina en la posición 235 con un residuo de alanina (L235A).

En una forma de realización, el dominio Fc se muta mediante la sustitución del residuo de leucina en la posición 235 con un residuo de ácido glutámico (L235E).

En una forma de realización, el dominio Fc se muta mediante la sustitución del residuo de glicina en la posición 237 con un residuo de alanina (G237A).

En una forma de realización, el dominio Fc se muta mediante la sustitución del residuo de lisina en la posición 322 con un residuo de alanina (K322A).

En una forma de realización, el dominio Fc se muta mediante la sustitución del residuo de prolina en la posición 331 con un residuo de alanina (P331A).

En una forma de realización, el dominio Fc se muta mediante la sustitución del residuo de prolina en la posición 331 con un residuo de serina (P331S).

En una forma de realización, la proteína multimérica de fusión comprende un dominio Fc derivado de IgG4. La IgG4 tiene un perfil de activación de complemento naturalmente más bajo que IgG1, pero también una unión más débil de FcγRI. Por lo tanto, en una forma de realización, la proteína multimérica de fusión que comprende IgG4 también comprende una o más mutaciones que aumentan la unión de FcγR.

Se apreciará que cualquiera de las mutaciones mencionadas anteriormente puede combinarse para reducir la unión de C1q.

La proteína multimérica de fusión de la invención puede comprender una o más mutaciones para crear o eliminar un residuo de cisteína. Los residuos de cisteína tienen un papel importante en el ensamblaje espontáneo de la proteína multimérica de fusión, mediante la formación de puentes de disulfuro entre pares individuales de unidades de monómero de polipéptido. De forma alternativa, pueden utilizarse para la modificación química del grupo

libre SH. Por lo tanto, al alterar el número y/o la posición de los residuos de cisteína, es posible modificar la estructura de la proteína multimérica de fusión para producir una proteína con propiedades terapéuticas mejoradas.

La proteína multimérica de fusión de la presente invención no comprende un residuo de cisteína en la posición 309. El residuo de aminoácido en la posición 309 puede ser cualquier residuo de aminoácido que no sea cisteína. En una forma de realización, el residuo de aminoácido en la posición 309 es el residuo de tipo salvaje que se encuentra en el anticuerpo de origen natural correspondiente. Por ejemplo, el residuo de tipo salvaje que se encuentra en la posición 309 en la IgG1, IgG3 e IgG4 humana de origen natural es un residuo de leucina, aquel que se encuentra en la IgG2 de origen natural es un residuo de valina.

En una forma de realización, el dominio Fc se muta mediante la sustitución del residuo de valina en la posición 308 con un residuo de cisteína (V308C).

En una forma de realización de la invención, se proporcionan proteínas multiméricas de fusión con una mejor capacidad de fabricación que comprenden un menor número de enlaces de disulfuro y/o sitios de glicosilación. Estas proteínas tienen una arquitectura de enlace de disulfuro menos compleja y patrones post traduccionales de glicosilación, por lo tanto son más sencillas y menos costosas de fabricar.

En una forma de realización, se remueven dos enlaces de disulfuro en la región bisagra mediante la mutación de una CPPC de secuencia bisagra del núcleo a SPPS.

En una forma de realización, se remueve un enlace de disulfuro en el extremo mediante la sustitución del residuo de cisteína en la posición 575 con una serina, treonina o alanina (C575S, C575T, o C575A).

En una forma de realización, se muta una CPPC de secuencia bisagra del núcleo a SPPS y el residuo de cisteína del extremo en la posición 575 se sustituye con una serina, treonina o alanina (C575S, C575T, o C575A).

En una forma de realización, la proteína multimérica de fusión de la invención comprende interacciones inter-dominio sustancialmente no covalentes.

En una forma de realización, la proteína multimérica de fusión de la invención se expresa en una célula de tal manera que una proporción práctica del producto es hexamérico.

Una proporción práctica es preferiblemente mayor que o igual al 50%, por ejemplo 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80-90%, 90-100%.

En una forma de realización, se remueve un sitio de glicosilación en el dominio CH2 mediante la sustitución del residuo de asparagina en la posición 297 con un residuo de alanina (N297A) o un residuo de glutamina (N297Q). Además de mejorar la capacidad de fabricación, estos mutantes de aglicosil también reducen la unión de FcγR, tal como se describe aquí anteriormente.

En una forma de realización, se remueve un sitio de glicosilación en el extremo mediante la sustitución del residuo de asparagina en la posición 563 con un residuo de alanina (N563A) o un residuo de glutamina (N563Q).

En una forma de realización, se remueve tanto un sitio de glicosilación en el dominio CH2 como un sitio de glicosilación en el extremo mediante la sustitución del residuo de asparagina en la posición 297 con un residuo de alanina o un residuo de glutamina, y la sustitución del residuo de asparagina en la posición 563 con un residuo de alanina o un residuo de glutamina (N297A/N563A o N297A/N563Q o N297Q/N563A o N297Q/N563Q).

Se apreciará que cualquiera de las mutaciones mencionadas anteriormente se puede combinar.

La presente invención también proporciona una secuencia aislada de ADN que codifica una cadena de polipéptido de una unidad de monómero de polipéptido de la presente invención o una parte de componente de la misma. La secuencia de ADN puede comprender ADN sintético, por ejemplo producido por procesamiento químico, ADNc, ADN genómico o cualquier combinación de los mismos.

Las secuencias de ADN que codifican una cadena de polipéptido de una unidad de monómero de polipéptido de la presente invención se pueden obtener por métodos bien conocidos por los expertos en el arte. Por ejemplo, las secuencias de ADN que codifican parte o la totalidad de una cadena de polipéptido de una unidad de monómero de polipéptido se pueden sintetizar como se desee a partir de las secuencias de ADN determinadas o sobre la base de las secuencias de aminoácidos correspondientes. Ejemplos de secuencias de ADN adecuadas de acuerdo con la presente invención se proporcionan en SEQ ID NOs 50-59.

Pueden utilizarse las técnicas estándar de biología molecular para preparar secuencias de ADN que codifican una cadena de polipéptido de una unidad de monómero de polipéptido de la presente invención. Las secuencias de ADN deseadas se pueden sintetizar completamente o en parte utilizando técnicas de síntesis de oligonucleótidos. Se pueden utilizar técnicas de reacción en cadena de polimerasa (PCR) y mutagénesis dirigida al sitio según sea apropiado.

La presente invención también se refiere a un vector de clonación o de expresión que comprende una o más secuencias de ADN de la presente invención. En consecuencia, se proporciona un vector de clonación o de expresión que comprende una o más secuencias de ADN que codifican una cadena de polipéptido de una unidad de monómero de polipéptido de la presente invención, o una parte de componente de la misma.

Los métodos generales por los que los vectores se pueden construir, los métodos de transfección y los métodos de cultivo son bien conocidos por los expertos en el arte. En este sentido, se hace referencia a “Current Protocols in Molecular Biology”, 1999, F.M. Ausubel (ed.), Wiley Interscience, Nueva York and the Maniatis Manual produced by Cold Spring Harbor Publishing.

También se proporciona una célula huésped que comprende uno o más vectores de clonación o de expresión que comprenden una o más secuencias de ADN que codifican una proteína multimérica de fusión de la presente invención. Puede utilizarse cualquier sistema adecuado de células huésped/vectores para la expresión de las secuencias de ADN que codifican la proteína multimérica de fusión de la presente invención. Pueden utilizarse sistemas bacterianos, por ejemplo *E. coli*, y otros sistemas microbianos, tales como *Saccharomyces* o *Pichia*, o también pueden utilizarse sistemas de expresión de células huésped eucariotas, por ejemplo de mamífero. Células huésped de mamífero adecuadas incluyen células CHO. Los tipos adecuados de ovarios de hámster chino (células CHO) para uso en la presente invención pueden incluir células CHO y CHO-K1 que incluye células dhfr-CHO, tal como las células CHO-DG44 y células CHO-DXB11, que pueden utilizarse con un marcador seleccionable DHFR o células CHOK1-SV que se pueden utilizar con un marcador seleccionable de glutamina sintetasa. Otras células huésped adecuadas incluyen células NSO.

La presente invención también proporciona un proceso para la producción de una proteína multimérica de fusión de acuerdo con la presente invención, que comprende cultivar una célula huésped que contiene un vector de la presente invención en condiciones adecuadas para lograr la expresión de la proteína de fusión y el ensamble en multímeros, y aislar y, opcionalmente, purificar la proteína multimérica de fusión.

Las proteínas multiméricas de fusión de la presente invención se expresan en niveles buenos a partir de células huésped. Por lo tanto, las propiedades de la proteína multimérica de fusión son propicias para el procesamiento comercial.

Las proteínas multiméricas de fusión de la presente invención pueden llevarse a cabo mediante cualquier método adecuado. En una forma de realización, la proteína multimérica de fusión de la invención puede producirse en condiciones que minimizen la agregación. En un ejemplo, la agregación puede minimizarse mediante la adición de conservantes a los medios de cultivo, a los sobrenadantes de cultivo o a los medios de purificación. Ejemplos de conservantes adecuados incluyen agentes de terminación de cadena de tiol, tales como N-etilmaleimida, ácido yodoacético, β -mercaptoetanol, β -mercaptoetilamina, glutatona o cisteína. Otros ejemplos incluyen agentes de disulfuro inhibidores tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido etilenglicoltetraacético (EGTA) o acidificación por debajo de pH 6,0.

En una forma de realización, se proporciona un proceso para la purificación de una proteína multimérica de fusión de la presente invención, que comprende las etapas de realizar una cromatografía de intercambio aniónico en modo no enlazante de tal manera que las impurezas en la columna se retengan y el anticuerpo se diluya.

En una forma de realización, la purificación emplea captura de afinidad en una columna de proteína FcRn, Fc γ R o C-reactiva.

En una forma de realización, la purificación emplea proteína A.

Las resinas de intercambio iónico adecuadas para su uso en el proceso incluyen resina Q.FF (suministrada por GE-Healthcare). La etapa puede, por ejemplo, llevarse a cabo con un pH de aproximadamente 8. El procedimiento puede comprender además una etapa de captura inicial empleando cromatografía de intercambio catiónico, realizada por ejemplo a un pH de aproximadamente de 4 a 5, tal como 4,5. La cromatografía de intercambio catiónico puede, por ejemplo, emplear una resina, tal como resina CaptoS o SP sepharose FF (suministrada por GE-Healthcare). El anticuerpo o fragmento puede entonces eluirse de la resina empleando una solución de sal iónica, tal como cloruro de sodio, por ejemplo a una concentración de 200 mM. Así, la etapa o las etapas de cromatografía pueden incluir una o más etapas de lavado, según corresponda.

El proceso de purificación puede comprender también una o más etapas de filtración, tales como una etapa de diafiltración.

Los multímeros que tienen el número requerido de unidades de monómero de polipéptido pueden separarse de acuerdo con el tamaño molecular, por ejemplo, mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

Así, en una forma de realización, se proporciona una proteína multimérica de fusión purificada de acuerdo con la invención, en forma sustancialmente purificada, en particular, libre o sustancialmente libre de endotoxina y/o proteína de célula huésped o ADN.

La forma purificada tal como se utiliza arriba se refiere a al menos 90% de pureza, tal como 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% p/p o más pura.

La expresión “sustancialmente libre de endotoxina” pretende generalmente referirse a un contenido de endotoxina de 1 EU por mg de producto de anticuerpo o menos, tal como 0,5 o 0,1 EU por mg de producto.

La expresión “sustancialmente libre de proteínas de célula huésped o ADN” pretende generalmente referirse a un contenido de proteínas de célula huésped y/o ADN de 400µg por mg de producto de anticuerpo o menos, tal como 100µg por mg o menos, en particular 20µg por mg, según sea apropiado.

Dado que las proteínas multiméricas de fusión de la presente invención son útiles en el tratamiento y/o profilaxis de una condición patológica, la presente invención también proporciona una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende una proteína multimérica de fusión de la presente invención en combinación con uno o más de un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Por consiguiente, se proporciona el uso de una proteína de la invención para la fabricación de un medicamento. La composición normalmente se suministra como parte de una composición farmacéutica estéril que normalmente incluirá un vehículo farmacéuticamente aceptable. Una composición farmacéutica de la presente invención puede comprender adicionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también proporciona un proceso para la preparación de una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende añadir y mezclar la proteína

multimérica de fusión de la presente invención junto con uno o más de un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

La proteína multimérica de fusión puede ser el único ingrediente activo en la composición farmacéutica o de diagnóstico o puede estar acompañada por otros ingredientes activos que incluyen otros ingredientes de anticuerpos o ingredientes que no son anticuerpos, tales como esteroides u otras moléculas de fármacos.

Las composiciones farmacéuticas comprenden de manera adecuada una cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína multimérica de fusión de la invención. El término “cantidad terapéuticamente efectiva”, tal como se utiliza en este documento, se refiere a una cantidad de un agente terapéutico necesario para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad o afección identificada, o para exhibir un efecto terapéutico o preventivo detectable. Para cualquier medicamento, la cantidad terapéuticamente efectiva puede calcularse inicialmente en ensayos de cultivo celular o en modelos animales, usualmente en roedores, conejos, perros, cerdos o primates. El modelo animal también puede utilizarse para determinar el intervalo de concentración apropiado y la vía de administración. Tal información puede utilizarse entonces para determinar las dosis útiles y vías de administración en seres humanos.

La cantidad terapéuticamente efectiva precisa para un sujeto humano dependerá de la gravedad del estado de la enfermedad, la salud general del sujeto, la edad, el peso y el género del sujeto, dieta, tiempo y frecuencia de administración, combinación(es) de fármacos, sensibilidades de reacción y tolerancia/respuesta a la terapia. Esta cantidad puede determinarse mediante experimentación rutinaria y se encuentra dentro del criterio del médico. Generalmente, una cantidad terapéuticamente efectiva irá de 0,01 mg/kg a 500 mg/kg, por ejemplo de 0,1 mg/kg a 200 mg/kg, tal como 100mg/kg. Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse convenientemente en formas de dosis unitarias que contienen una cantidad predeterminada de un agente activo de la invención por dosis.

Las dosis terapéuticas de la proteína multimérica de fusión de acuerdo con la presente descripción no muestran efectos toxicológicos aparentes *in vivo*.

En una forma de realización de una proteína multimérica de fusión de acuerdo con la invención, una única dosis puede proporcionar hasta un 90% de reducción en los niveles circulantes de IgG.

Las composiciones pueden administrarse individualmente a un paciente o pueden administrarse en combinación (por ejemplo, simultáneamente, secuencialmente o por separado) con otros agentes, fármacos u hormonas.

En una forma de realización, las proteínas multiméricas de fusión de acuerdo a la presente descripción se emplean con una terapia inmunosupresora, tal como un esteroide, en especial prednisona.

En una forma de realización, las proteínas multiméricas de fusión de acuerdo a la presente descripción se emplean en combinación con Rituximab u otras terapias de célula B.

En una forma de realización, las proteínas multiméricas de fusión de acuerdo a la presente descripción se emplean con cualquier agente de modulación de células B o células T o inmunomodulador. Ejemplos incluyen metotrexato, micofenilato y azatioprina.

La dosis a la que se administra la proteína multimérica de fusión de la presente invención depende de la naturaleza de la afección a tratar, la gravedad de la enfermedad presente y de si la proteína multimérica de fusión se está utilizando profilácticamente o para tratar una afección existente.

La frecuencia de la dosis dependerá de la semivida de la proteína multimérica de fusión y de la duración de su efecto. Si la proteína multimérica de fusión tiene una semivida corta (por ejemplo de 2 a 10 horas) puede ser necesario dar una o más dosis por día. De forma alternativa, si la proteína multimérica de fusión tiene una semivida larga (por ejemplo, de 2 a 15 días) y/o efectos farmacodinámicos de larga duración puede que sea necesario administrar solamente una dosis una vez al día, una vez por semana o incluso una vez cada 1 o 2 meses.

En una forma de realización, la dosis se administra quincenalmente, es decir, dos veces al mes.

El término “semivida”, tal como se emplea en el presente documento, pretende referirse a la duración de la molécula en circulación, por ejemplo en suero/plasma.

El término “farmacodinámico”, tal como se emplea en el presente documento, se refiere al perfil y, en particular, la duración de la acción biológica de la proteína multimérica de fusión de acuerdo con la presente descripción.

El vehículo farmacéuticamente aceptable no debe inducir por sí mismo la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición y no debe ser tóxico. Los vehículos adecuados pueden ser macromoléculas grandes, metabolizadas lentamente, tales como proteínas, polipéptidos, liposomas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas inactivas de virus. Se pueden utilizar sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de ácidos minerales, tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos y sulfatos, o sales de ácidos orgánicos, tales como acetatos, propionatos, malonatos y benzoatos.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables en las composiciones terapéuticas pueden contener adicionalmente líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Adicionalmente, sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes o sustancias tamponantes del pH, pueden estar presentes en tales composiciones. Tales vehículos permiten que las composiciones farmacéuticas se formulen como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones espesas y suspensiones, para ingestión por parte del paciente.

Las formas adecuadas para la administración incluyen formas adecuadas para administración parenteral, por ejemplo, por inyección o infusión, por ejemplo mediante

inyección en bolo o infusión continua. Cuando el producto es para inyección o infusión, puede tomar la forma de una suspensión, solución o emulsión en un vehículo oleoso o acuoso y puede contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, conservantes, estabilizantes y/o dispersantes. La proteína puede encontrarse en la forma de nanopartículas. De forma alternativa, la molécula de anticuerpo puede estar en forma seca, para su reconstitución antes de su uso con un líquido estéril apropiado.

Una vez formuladas, las composiciones de la invención pueden administrarse directamente al sujeto. Los sujetos a tratar pueden ser animales. Sin embargo, en una o más formas de realización, las composiciones están adaptadas para la administración a sujetos humanos.

Adecuadamente, en formulaciones de acuerdo con la presente descripción, el pH de la formulación final no es similar al valor del punto isoeléctrico de la proteína multimérica de fusión, por ejemplo, si el pI de la proteína se encuentra en el intervalo de 8-9 o superior, puede ser apropiada entonces una formulación pH de 7. Sin querer estar limitado por la teoría, se cree que ello puede en última instancia proporcionar una formulación final con una estabilidad mejorada, por ejemplo, donde la proteína multimérica de fusión permanece en solución.

En un ejemplo, la formulación farmacéutica a un pH en el intervalo de 4,0 a 7,0 comprende: 1 a 200mg/ml de una molécula de proteína de acuerdo con la presente descripción, 1 a 100 mM de un tampón, 0,001 a 1% de un agente tensioactivo, a) 10 a 500 mM de un estabilizador, b) 10 a 500 mM de un estabilizador y 5 a 500 mM de un agente de tonicidad, o c) 5 a 500 mM de un agente de tonicidad.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden administrarse mediante cualquier número de rutas, incluyendo, pero sin limitarse a, ruta oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, transcutánea (por ejemplo, ver WO98120734), subcutánea, intraperitoneal, intranasal, enteral, tópica, sublingual, intravaginal o rectal. También pueden usarse hiposprays para administrar las composiciones farmacéuticas de la invención. Normalmente, las composiciones terapéuticas pueden prepararse como inyectables, ya sea como soluciones líquidas o suspensiones. También pueden prepararse formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección.

La administración directa de las composiciones se realizará generalmente por inyección, por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular, o se administran en el espacio intersticial de un tejido. Las composiciones también se pueden administrar en una lesión. El tratamiento de dosificación puede consistir en un programa de dosis única o un programa de dosis múltiples.

Se apreciará que el ingrediente activo en la composición será una molécula de proteína. Como tal, será susceptible a la degradación en el tracto gastrointestinal. Por lo tanto, si la composición se va a administrar por una vía que utiliza el tracto gastrointestinal, será necesario que la composición contenga agentes que protejan la proteína de la degradación, pero que liberen la proteína una vez que ha sido absorbida desde el tracto gastrointestinal.

Una discusión detallada sobre los vehículos farmacéuticamente aceptables está disponible en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J. 1991). En una forma de realización, la formulación se proporciona como una formulación para administraciones tópicas, incluyendo la inhalación.

Preparaciones inhalables adecuadas incluyen polvos inhalables, aerosoles de dosificación que contienen gases propelentes o soluciones inhalables libres de gases propelentes. Polvos inhalables de acuerdo con la descripción que contienen la sustancia activa pueden consistir únicamente en las sustancias activas arriba mencionadas, o en una mezcla de las sustancias activas antes mencionadas con un excipiente fisiológicamente aceptable. Estos polvos inhalables pueden incluir monosacáridos (por ejemplo glucosa o arabinosa), disacáridos (por ejemplo, lactosa, sacarosa, maltosa), oligo- y polisacáridos (por ejemplo dextranos), polialcoholes (por ejemplo sorbitol, manitol, xilitol), sales (por ejemplo cloruro de sodio, carbonato de calcio) o mezclas de estos entre sí. Se utilizan adecuadamente monosacáridos o disacáridos, el uso de lactosa o glucosa, en particular, pero no exclusivamente, en la forma de sus hidratos.

Las partículas para la deposición en el pulmón requieren un tamaño de partícula de menos de 10 micras, tal como 1-9 micras, por ejemplo de 1 a 5 μm . El tamaño de partícula del ingrediente activo (tal como el anticuerpo o fragmento) es de primordial importancia.

Los gases propelentes que se pueden usar para preparar los aerosoles inhalables son conocidos en el arte. Los gases propelentes adecuados se seleccionan de entre hidrocarburos tales como n-propano, n-butano o isobutano e hidrocarburos halogenados tales como derivados clorados y/o fluorados de metano, etano, propano, butano, ciclopropano o ciclobutano. Los gases propelentes mencionados anteriormente pueden utilizarse por sí solos o en mezclas de los mismos.

Gases propelentes particularmente adecuados son los derivados halogenados de alcano seleccionados de entre TG11, TG12, TG134a y TG227. De los hidrocarburos halogenados anteriormente citados, son particularmente adecuados TG134a (1,1,1,2-tetrafluoroetano) y TG227 (1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano) y mezclas de los mismos.

Los aerosoles inhalables que contienen gas propelente también pueden contener otros ingredientes tales como codisolventes, estabilizadores, agentes activos de superficie (tensioactivos), antioxidantes, lubricantes y medios para ajustar el pH. Todos estos ingredientes son conocidos en el arte.

Los aerosoles inhalables que contienen gas propelente de acuerdo con la invención pueden contener hasta 5% en peso de sustancia activa. Los aerosoles de acuerdo con la invención contienen, por ejemplo, de 0,002 a 5% en peso, 0,01 a 3% en peso, 0,015 a 2% en peso, 0,1 a 2% en peso, 0,5 a 2% en peso o 0,5 a 1% en peso de ingrediente activo.

De forma alternativa, las administraciones tópicas al pulmón pueden ser también mediante la administración de una solución líquida o formulación de suspensión, por ejemplo, mediante el empleo de un dispositivo tal como un nebulizador, por ejemplo, un nebulizador

conectado a un compresor (por ejemplo, el nebulizador Pari LC-Jet Plus(R) conectado a un compresor Pari Master(R) fabricado por Pari Respiratory Equipment, Inc., Richmond, Va).

La proteína multimérica de fusión de la invención se puede administrar dispersa en un disolvente, por ejemplo, en forma de una solución o una suspensión. Puede suspenderse en una solución fisiológica adecuada, por ejemplo, solución salina u otro disolvente farmacológicamente aceptable o una solución tamponada. Las soluciones tamponadas conocidas en el arte pueden contener 0,05 mg a 0,15 mg de edetato disódico, 8,0 mg a 9,0 mg de NaCl, 0,15 mg a 0,25 mg de polisorbato, 0,25 mg a 0,30 mg de ácido cítrico anhidro, y 0,45 mg a 0,55 mg de citrato de sodio por 1 ml de agua a fin de lograr un pH de aproximadamente 4,0 a 5,0. Una suspensión puede emplear, por ejemplo, una proteína liofilizada.

Las suspensiones terapéuticas o formulaciones en solución también pueden contener uno o más excipientes. Los excipientes son bien conocidos en el arte e incluyen tampones (por ejemplo, tampón de citrato, tampón de fosfato, tampón de acetato y tampón de bicarbonato), aminoácidos, urea, alcoholes, ácido ascórbico, fosfolípidos, proteínas (por ejemplo, albúmina en suero), EDTA, cloruro de sodio, liposomas, manitol, sorbitol, y glicerol. Las soluciones o suspensiones se pueden encapsular en liposomas o microesferas biodegradables. La formulación se proporcionará generalmente en una forma sustancialmente estéril empleando procesos de fabricación estériles.

Esto puede incluir la producción y la esterilización por filtración del disolvente/disolución tamponado utilizado para la formulación, la suspensión aséptica de la proteína en la solución de disolvente tamponado estéril y la dispensación de la formulación en recipientes estériles mediante métodos que resultan familiares para los expertos en el arte.

Se puede proporcionar una formulación nebulizable de acuerdo con la presente descripción, por ejemplo, como unidades de dosis única (por ejemplo, contenedores de plástico sellados o ampollas) envasadas en sobres de papel de aluminio. Cada ampolla contiene una dosis unitaria en un volumen, por ejemplo, 2 mL, de tampón de disolvente/solución.

Las proteínas multiméricas de fusión descritas en este documento pueden ser adecuadas para la administración mediante nebulización.

También se prevé que las proteínas de la presente invención se puedan administrar mediante el uso de la terapia génica. Con el fin de lograr este propósito, las secuencias de ADN que codifican las cadenas de polipéptido de la molécula de proteína bajo el control de componentes de ADN apropiados se introducen en un paciente de tal manera que las cadenas de polipéptido se expresen a partir de las secuencias de ADN y se ensamblen *in situ*.

En una forma de realización, se proporciona la proteína multimérica de fusión de la invención para su uso en terapia.

En una forma de realización, se proporciona la proteína multimérica de fusión de la invención para su uso en el tratamiento de trastornos del sistema inmune.

En una forma de realización, se proporciona el uso de la proteína multimérica de fusión de la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de trastornos del sistema inmune.

Ejemplos de trastornos del sistema inmune que se pueden tratar utilizando la proteína multimérica de fusión de la invención incluyen trombocitopenia inmune (PTI), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP), enfermedad de Kawasaki y síndrome de Guillain-Barré (GBS).

La presente invención también proporciona una proteína multimérica de fusión (o composiciones que comprenden la misma) para su uso en el control de las enfermedades autoinmunes, por ejemplo, Encefalomiелitis Aguda Diseminada (EMAD), leucoencefalitis aguda hemorrágica necrotizante, enfermedad de Addison, agammaglobulinemia, alopecia areata, amilosis, vasculitis asociada a ANCA, espondilitis anquilosante, nefritis anti-MBG/anti-TBM, Síndrome Antifosfolípídico (SAF), angioedema autoinmune, anemia aplásica autoinmune, disautonomía autoinmune, hepatitis autoinmune, hiperlipidemia autoinmune, inmunodeficiencia autoinmune, enfermedad autoinmune del oído interno (AIED), miocarditis autoinmune, pancreatitis autoinmune, retinopatía autoinmune, Púrpura Trombocitopénica autoinmune (PTA), enfermedad tiroidea autoinmune, urticaria autoinmune, neuropatías axonales y nales, enfermedad Balo, enfermedad de Behcet, penfigoide ampolloso, cardiomiopatía, enfermedad de Castleman, enfermedad celíaca, enfermedad de Chagas, Polineuropatía Desmielinizante Inflamatoria Crónica (PDIC), osteomielitis crónica multifocal recurrente (CRMO), síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial/penfigoide benigno de las mucosas, enfermedad de Crohn, síndrome Cogan, enfermedad por crioaglutininas, bloqueo cardíaco congénito, miocarditis Cocksackie, enfermedad de CREST, crioglobulinemia mixta esencial, neuropatías desmielinizantes, dermatitis herpetiforme, dermatomiositis, enfermedad de Devic (neuromielitis óptica), miocardiopatía dilatada, lupus discoide, síndrome de Dressler, endometriosis, fibrosis eosinofílica angiocéntrica, fascitis eosinofílica, eritema nudoso, encefalomiелitis alérgica experimental, síndrome de Evans, alveolitis fibrosante, arteritis de células gigantes (arteritis temporal), glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, Granulomatosis de Wegener (GPA) ver Wegener, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, encefalitis de Hashimoto, tiroiditis de Hashimoto, anemia hemolítica, púrpura de Henoch-Schönlein, herpes gestacional, hipogammaglobulinemia, nefritis tubulointestinal hipocomplementémica idiopática, Púrpura Trombocitopénica Idiopática (PTI), nefropatía IgA, enfermedad relacionada con IgG4, enfermedad esclerosante relacionada con IgG4, lipoproteínas inmunorreguladoras, aneurisma aórtico inflamatorio, pseudotumor inflamatorio, miositis por cuerpos de inclusión, diabetes insulín dependiente (tipo1), cistitis intersticial, artritis juvenil, diabetes juvenil, síndrome de Kawasaki, tumor de Kuttner, síndrome de Lambert-Eaton, vasculitis leucocitoclástica, liquen plano, liquen escleroso, conjuntivitis leñosa, enfermedad IgA lineal (LAD), lupus (SLE), enfermedad de Lyme, crónico, fibrosis mediastínica, enfermedad de Meniere, poliangitis microscópica, síndrome de Mikulicz, enfermedad mixta del tejido conectivo (MCTD), úlcera de Mooren, enfermedad de Mucha-Habermann, fibroesclerosis multifocal, escleritis múltiple, miastenia gravis, miositis, narcolepsia, neuromielitis óptica (de Devic), neutropenia, penfigoide ocular cicatricial, neuritis óptica, enfermedad de Ormond (fibrosis

retroperitoneal), reumatismo palindrómico, PANDAS (trastorno pediátrico neuropsiquiátrico autoinmune asociado a estreptococo), degeneración cerebelosa paraneoplásica, polineuropatías paraproteínicas, hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH), síndrome de Parry Romberg, síndrome de Parsonnage-Turner, *Pars planitis* (uveítis periférica), pénfigo vulgar, periaortitis, periarteritis, neuropatía periférica, encefalomiелitis perivenosa, anemia perniciosa, síndrome de POEMS, poliarteritis nodosa, síndromes poliglandulares autoinmunes del Tipo I, II y III, polimialgia reumática, polimiositis, síndrome post infarto de miocardio, síndrome post pericardiotomía, dermatitis progesterona, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, psoriasis, artritis psoriásica, fibrosis pulmonar idiopática, pioderma gangrenoso, aplasia pura de células rojas, fenómeno de Raynaud, distrofia simpática refleja, síndrome de Reiter, policondritis recidivante, síndrome de piernas inquietas, fibrosis retroperitoneal (enfermedad de Ormond), fiebre reumática, artritis reumatoide, tiroiditis de Riedel, sarcoidosis, síndrome de Schmidt, escleritis, esclerodermia, síndrome de Sjogren, autoinmunidad testicular y de esperma, síndrome de persona rígida, endocarditis subaguda bacteriana (SBE), síndrome de Susac, oftalmía simpática, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, trombótica, púrpura trombocitopénica (TTP), síndrome de Tolosa-Hunt, miелitis transversa, colitis ulcerosa, enfermedad indiferenciada del tejido conectivo (UCTD), uveítis, vasculitis, dermatosis vesiculobullosa, vitiligo, macroglobulinemia de Waldenstrom, anemia hemolítica idiopática cálida y granulomatosis de Wegener (denominan ahora con Granulomatosis de Wegener (GPA)).

En una forma de realización, las proteínas multiméricas de fusión y los fragmentos de acuerdo con la descripción se emplean en el tratamiento o profilaxis de epilepsia o convulsiones.

En una forma de realización, las proteínas multiméricas de fusión y los fragmentos de acuerdo con la descripción se emplean en el tratamiento o profilaxis de epilepsia o esclerosis múltiple.

En una forma de realización, las proteínas multiméricas de fusión y los fragmentos de la descripción se emplean en el tratamiento o profilaxis de enfermedades/indicios aloinmunes que incluyen:

- incompatibilidad de trasplante del donante debido a anticuerpos anti-HLA
- trombocitopenia aloinmune fetal y neonatal, FNAIT (o trombocitopenia aloinmune neonatal, NAITP o NAIT o NAT, o trombocitopenia aloinmune feto-materna, FMAITP o FMAIT).

Indicios adicionales incluyen: depuración rápida de fármacos biofarmacéuticos que contienen Fc de pacientes humanos y combinación de terapia de proteína multimérica de fusión con otras terapias - IgIV, Rituxan, plasmaféresis. Por ejemplo, la terapia de proteína multimérica de fusión se puede emplear después de la terapia de Rituxan.

En una forma de realización, las proteínas multiméricas de fusión de la descripción se emplean en el tratamiento o profilaxis de un trastorno de neurología, tal como:

- Polineuropatía Desmielinizante Inflamatoria Crónica (PDIC)

- síndrome de Guillain-Barré
- polineuropatías paraproteinémicas
- neuromielitis óptica (NMO, trastornos del espectro NMO o enfermedades del espectro NMO), y
- miastenia gravis.

En una forma de realización, las proteínas multiméricas de fusión de la descripción se emplean en un trastorno de dermatología, tal como:

- penfigoide ampolloso
- pénfigo vulgar
- vasculitis asociada a ANCA
- miocardiopatía dilatada

En una forma de realización, las proteínas multiméricas de fusión de la descripción se emplean en un trastorno de inmunología o hematología, tal como:

- Púrpura Trombocitopénica Idiopática (PTI)
- Púrpura Trombocitopénica Trombótica (PTT)
- anemia hemolítica idiopática cálida
- síndrome de Goodpasture
- incompatibilidad de trasplante del donante debido a anticuerpos anti-HLA

En una forma de realización, el trastorno se selecciona de Miastenia Gravis, Neuro-mielitis Óptica, PDIC, síndrome de Guillaume-Barré, neuropatía Poli Para-proteinémica, epilepsia refractaria, PTI/PTT, anemia hemolítica, síndrome de Goodpasture, incompatibilidad ABO, lupus nefritis, renal vasculitis, esclero-derma, alveolitis fibrosante, cardio-miopatía dilatada, enfermedad de Grave, diabetes Tipo 1, diabetes autoinmune, pénfigo, esclero-derma, lupus, vasculitis ANCA, dermatomiositis, enfermedad de Sjögren y artritis reumatoide.

En una forma de realización, el trastorno se selecciona del síndrome poliendocrino autoinmune Tipo 1 (APECED o síndrome de Whitaker) y Tipo 2 (síndrome de Schmidt); alopecia universal; crisis miasténica; crisis de tiroides; enfermedad ocular asociada a la tiroides; oftalmopatía tiroidea; diabetes autoinmune; autoanticuerpos asociados a encefalitis y/o encefalopatía; pénfigo foliáceo; epidermolisis bullosa; dermatitis herpetiforme; corea de Sydenham; neuropatía motora axonal aguda (AMAN); El síndrome de Miller-Fisher; neuropatía motora multifocal (NMM); opsoclonos; miopatía inflamatoria; síndrome de Isaac (neuromiotonía autoinmune), síndromes paraneoplásicos y encefalitis límbica.

La proteína multimérica de fusión de acuerdo con la presente descripción se pueden emplear para tratamiento o profilaxis.

La presente invención también proporciona un método para reducir la concentración de anticuerpos no deseados en un individuo, el cual comprende las etapas de administrar a un individuo una dosis terapéuticamente efectiva de proteína multimérica de fusión descrita en este documento.

La proteína multimérica de fusión de la presente invención también puede utilizarse en el diagnóstico, por ejemplo, en el diagnóstico *in vivo* y diagnóstico por escaneo de estados de enfermedad que involucran receptores Fc, tales como linfomas relacionadas a células B.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Ejemplo de un constructo de expresión y una proteína multimérica de fusión de acuerdo con la invención. SP es péptido señal, CH2 y CH3 son dominios constantes de cadena pesada, TP es extremo.

Figura 2 Ejemplo de secuencias

2(a) Ejemplo de secuencias de aminoácidos de una cadena de polipéptido de una unidad de monómero de polipéptido. En cada secuencia, la secuencia de extremo está subrayada y cualquier mutación se visualiza en negrilla y subrayada. La bisagra está en negrilla. En constructos que comprenden un dominio CH4 de IgM, esta región se muestra en cursiva.

2(b) Ejemplo de secuencias de aminoácidos de una cadena de polipéptido de multímero Fc que comprende un dominio CH2 y CH3 derivado de IgG1 o un dominio CH2 y CH3 derivado de IgG4. En cada secuencia, las posiciones de diferencia entre IgG1 e IgG4 están en negrilla y subrayadas.

2(c) Ejemplo de secuencias de aminoácidos de multímeros Fc diseñados para combinar ciertas propiedades seleccionadas de IgG1 y ciertas propiedades seleccionadas de IgG4. Las mutaciones se muestran en negrilla y subrayadas.

2(d) Ejemplo de secuencias de aminoácidos de multímeros Fc con regiones híbridas de Fc de cadena pesada diseñadas mediante intercambio de dominio.

2(e) Ejemplo de secuencias de aminoácidos para multímeros Fc con regiones híbridas de Fc de cadena pesada y mutaciones adicionales, que se han diseñado para combinar ciertas propiedades seleccionadas de IgG1 y ciertas propiedades seleccionadas de IgG4.

2(f) Secuencias de aminoácidos y de ADN del péptido señal B72.3, (i) secuencia de ADN, (ii) secuencia de aminoácido.

2(g) Ejemplo de secuencias de ADN para multímeros Fc.

Figura 3 Papel del dominio CH3 en el ensamble de multímero Fc.

3(a) Trazas de cromatografía de exclusión por tamaño que muestran el efecto del cambio de dominio CH3 de IgG1/IgG4 en hexamerización de multímeros Fc.

3(b) Efecto de mutaciones puntuales en el dominio CH3 en hexamerización de IgG1 Fc IgM tp.

3(C) Altos niveles de hexamerización de IgG4 Fc tp IgM se consiguen mediante Q355R de mutación puntual.

3(d) Efecto de mutagénesis de R355 a todos los otros aminoácidos en IgG1 Fc IgM tp.

Figura 4 Unión de multímeros Fc a FcRn, medida por análisis de resonancia de plasmón superficial. Las trazas demuestran unión para el rango de concentración de multímero: 2.5µM, 1.25µM, 0.625µM, 0.3125µM, 0.15625µM, 0.078125µM, 0.0390625µM. Los multímeros Fc muestran todas las histidinas contenidas en la posición 310.

4(a) IgM tp L309C de multímero Fc de hIgG1 uniéndose a FcRn de baja densidad.

4(b) IgM tp de multímero Fc de hIgG1 uniéndose a FcRn de baja densidad.

4(c) IgM tp L309C de multímero Fc de hIgG1 uniéndose a FcRn de alta densidad.

4(d) IgM tp de multímero Fc de hIgG1 uniéndose a FcRn de alta densidad.

Figura 5 Inhibición de multímero Fc de fagocitosis de macrófagos. Los datos muestran que los multímeros Fc derivados de IgG1 o IgG4 humana, polimerizados en formas de hexámero o dodecámero mediante un solo extremo de IgM o un extremo de IgM y L309C, mostraron potencia y niveles máximos de inhibición significativamente mejores que la IGIIV humana.

Figura 6 Inhibición de multímero Fc de fagocitosis de macrófagos. Los datos muestran los efectos inhibidores de multímeros Fc que comprenden una mutación cruzada única en una posición seleccionada de diferencia entre la región Fc de IgG1 e IgG4.

Figura 7 Inhibición de multímero Fc de fagocitosis de macrófagos. Los datos muestran los efectos inhibidores de multímeros Fc diseñados para su uso en el tratamiento de trastornos del sistema inmune.

Figura 8 Estimulación de liberación de citoquinas mediante multímeros Fc. Los datos demostraron que los multímeros Fc de IgG1 de tipo salvaje, tanto con como sin L309C, estimulan niveles muy altos de liberación de citoquina. Los niveles observados de citocina fueron más altos que los producidos por el control positivo de anticuerpos anti-CD52, Campath. En contraste marcado, los multímeros Fc de IgG4 y multímeros Fc de IgG1 que comprenden FcγR y mutación inerte de “LALA” C1q (L234A L235A), producen prácticamente liberación cero de citoquina.

Figura 9 Estimulación de liberación de citoquinas mediante multímeros Fc. Los datos muestran los efectos de multímeros Fc que comprenden una mutación cruzada única en una posición seleccionada de diferencia entre la región Fc de IgG1 e IgG4.

Figura 10 Estimulación de liberación de citoquinas mediante multímeros Fc. Los datos muestran los efectos de multímeros Fc diseñados con mutaciones para modular liberación de citoquina.

Figura 11 Inhibición mediada de FcRn de IgG que se recicla mediante multímeros Fc.

Figura 12 Prevención de pérdida de plaquetas en un modelo *in vivo* de trombocitopenia aguda mediante multímeros Fc. El gráfico muestra los resultados agregados de cinco experimentos independientes que utilizan ratones albinos (Balb/c).

Figura 13 Prevención de pérdida de plaquetas en un modelo *in vivo* de trombocitopenia crónica mediante multímeros Fc.

(a) dosis única de multímero de Fc10 mg/kg administrada en el día 3.

(b) cuatro dosis consecutivas diarias, 10 mg/kg por dosis, administradas en los días 3, 4, 5 y 6.

El tamaño del grupo para cada punto en la gráfica fue $n = 6$.

Figura 14 Unión de multímeros Fc a C1q.

Figura 15 Activación plaquetaria mediante multímeros Fc.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Biología molecular

Se ensamblaron secuencias de ADN de multímero Fc utilizando métodos estándar de biología molecular, incluyendo PCR, clonación de restricción-ligación, mutagénesis puntual (Quikchange) y secuenciación Sanger. Los constructos de expresión se clonaron en plásmidos de expresión (pNAFL, pNAFH) adecuados tanto para la expresión transitoria como para la estable en células CHO. Otros ejemplos de vectores de expresión adecuados incluyen pCDNA3 (Invitrogen).

Un diagrama de un constructo de expresión y de proteína multimérica de fusión de acuerdo con la invención se muestra en la Figura 1.

Diagramas que muestran ejemplos de secuencias de aminoácido de una cadena de polipéptido de una unidad de monómero de polipéptido se proporcionan en la Figura 2 (a) - (e). En cada secuencia, la secuencia de extremo está subrayada y cualquier mutación se visualiza en negrilla y subrayada. En constructos que comprenden un dominio CH4 de IgM, esta región se muestra en cursiva.

Mutaciones cruzadas de IgG1/IgG4

Se construyeron varias variantes de multímero Fc en las que ciertos residuos clave de aminoácidos en el dominio Fc se diseñaron para que coincidan con los encontrados en IgG1, mientras que otros residuos clave de aminoácidos fueron diseñados para que coincidan con los encontrados en IgG4. La IgG1 e IgG4 difieren uno de otra en siete posiciones en el dominio CH2 y seis posiciones en el dominio CH3, tal como se resume en la Tabla 4.

Tabla 4

<u>Número de posición</u>	<u>Residuo de aminoácido de IgG1</u>	<u>Residuo de aminoácido de IgG4</u>	<u>Mutación de IgG1 a IgG4</u>	<u>Mutación de IgG4 a IgG1</u>
----------------------------------	---	---	---------------------------------------	---------------------------------------

234	L	F	L234F	F234L
268	H	Q	H268Q	Q268H
274	K	Q	K274Q	Q274K
296	Y	F	Y296F	F296Y
327	A	G	A327G	G327A
330	A	S	A330S	S330A
331	P	S	P331S	S331P
355	R	Q	R355Q	Q355R
356	D	E	D356E	E356D
358	L	M	L358M	M358L
409	K	R	K409R	R409K
419	Q	E	Q419E	E419Q
445	P	L	P445L	L445P

En la Figura 2(b), se proporcionan diagramas que muestran un ejemplo de secuencias de aminoácidos para una cadena de polipéptido de multímero Fc que comprende un dominio CH2 y CH3 derivado de IgG1 o un dominio CH2 y CH3 derivado de IgG4. En cada secuencia, las posiciones de diferencia entre IgG1 e IgG4 están en negrilla y subrayadas.

En la Figura 2(c), se proporcionan diagramas que muestran un ejemplo de secuencias de aminoácidos de multímeros Fc diseñados para combinar ciertas propiedades seleccionadas de IgG1 y ciertas propiedades seleccionadas de IgG4. Las mutaciones se muestran en negrilla y subrayadas.

Se apreciará que una secuencia particular de interés puede crearse utilizando ya sea la IgG1 o la secuencia de dominio Fc de IgG4 como punto de partida y realización de las mutaciones pertinentes. Por ejemplo, un dominio CH2 de IgG4 con mutación F234L es lo mismo que un dominio CH2 de IgG1 con mutaciones F1268Q, K274Q, Y296F, A327G, A330S y P331S.

Intercambio de dominio de región Fc

También se construyeron variantes de multímero Fc que comprenden regiones híbridas de Fc de cadena pesada en las que el dominio CH2 se derivó de una subclase particular de IgG y el dominio CH3 se derivó de una subclase diferente de IgG. En la Figura 2(d), se proporcionan diagramas que muestran un ejemplo de secuencias de aminoácido para multímeros Fc con regiones híbridas de Fc de cadena pesada.

En la Figura 2(e), se proporcionan diagramas que muestran un ejemplo de secuencias de aminoácidos para multímeros Fc con regiones híbridas de Fc de cadena pesada y mutaciones adicionales, que se han diseñado para combinar ciertas propiedades seleccionadas de IgG1 y ciertas propiedades seleccionadas de IgG4.

Ejemplo 2: Expresión

Se realizó una expresión a pequeña escala utilizando expresión ‘transitoria’ de FIEK293 o células CHO transfectadas utilizando lipofectamina o electroporación. Se cultivaron cultivos en matraces de agitación o bolsas agitadas en medios CD-CHO (Lonza) o

ProCH05 (Life Technologies) a escalas que van desde 50 - 2000 ml durante 5-10 días. Las células se separaron por centrifugación y los sobrenadantes de cultivo se almacenaron a 4°C hasta su purificación. Los conservantes se añadieron a algunos cultivos después de la eliminación de células.

Los resultados demostraron que las proteínas multiméricas de fusión se expresan bien.

Se halló que el péptido señal que se utilizó para expresar las proteínas multiméricas de fusión tenía un impacto sobre el nivel de expresión alcanzado. Un péptido señal de un anticuerpo B72.3 dio lugar a niveles más altos de expresión que un péptido señal de IL-2 que se describe en el arte previo.

Las secuencias de ADN y de aminoácidos del péptido señal B72.3 se muestran en la Figura 2f.

Ejemplo 3: Purificación y análisis

Se purificaron multímeros Fc procedentes de sobrenadantes de cultivo después de comprobar/ajustar el pH a ≥ 6.5 , mediante cromatografía de proteína A con elución de etapa utilizando un tampón de pH 3.4. El eluato se neutralizó inmediatamente a $\sim$ pH 7,0 utilizando 1M Tris pH 8,5 antes de su almacenamiento a 4°C. Se utilizó cromatografía analítica de exclusión por tamaño para separar diversas formas multiméricas de dominios Fc utilizando columnas S200 y colección de fracciones. Se analizaron y agruparon fracciones después del análisis de G3000 HPLC y SDS-PAGE de reducción y de no reducción. Se probó la endotoxina utilizando el ensayo de Lisado de Amebocitos de Limulus (LAL) y las muestras utilizadas en los ensayos fueron $<1\text{EU/mg}$.

Se encontró que las proteínas multiméricas de fusión se expresan y purifican predominantemente en forma hexamérica, con algunas proteínas en formas dodecaméricas y algunas otras. Los resultados demuestran que las proteínas se ensamblan de manera efectiva en multímeros en ausencia de cisteína en la posición 309.

La purificación de las proteínas multiméricas de fusión en presencia de un conservante redujo la tendencia a la agregación, produciendo preparaciones mejoradas con estructura más uniforme. Ejemplos de conservantes que se mostraron eficaces incluyen agentes de terminación de cadena de tiol tales como N-etilmaleimida (NEM) y glutatona (GSH); y agentes de disulfuro inhibidores como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

Figura 4 Papel del dominio CH3 en ensamble de multímero Fc.

Se halló inesperadamente que el grado de multimerización varía dependiendo de la subclase IgG de la que se derivó la región Fc. Los multímeros Fc que comprenden un dominio CH2 y un dominio CH3 derivados de IgG1 se ensamblan de manera muy eficiente en hexámeros, en donde aproximadamente 80% de las moléculas están presentes en forma hexamérica. En contraste, los multímeros Fc que comprenden un dominio CH2 y un dominio CH3 derivados de IgG4 formaron niveles más bajos de hexámeros. La investigación de multímeros Fc que comprenden regiones híbridas de Fc en las que el dominio CH2 se derivó de una subclase particular de IgG y el dominio CH3 se derivó de una subclase diferente de IgG reveló que la capacidad de formar hexámeros se codifica

principalmente por el dominio CH3. La presencia de un dominio CH3 derivado de IgG1 aumenta significativamente la hexamerización. Los multímeros híbridos de Fc en los que el dominio CH3 se deriva de IgG1 y el dominio CH2 se deriva de IgG4 se hexameriza tan eficientemente como la IgG1 de tipo salvaje, en donde aproximadamente 80% de las moléculas son hexámeros. Por lo tanto, la sustitución del dominio CH3 de IgG4 con aquel de IgG1 mejora los niveles de hexamerización en comparación con multímeros Fc de IgG4 de tipo salvaje. El híbrido resultante tiene la ventaja de niveles altos de formación de hexámero mientras que conserva muchas de las propiedades deseables de IgG4. Figura 3(a).

Los dominios CH3 de IgG1 e IgG4 difieren en seis posiciones, tal como se describe en el Ejemplo 1. A partir de un multímero Fc que comprende un dominio CH2 y CH3 derivado de IgG1, cada una de estas posiciones se mutó a su vez a partir del residuo de IgG1 al residuo de IgG4. Los inventores demostraron que el aminoácido en la posición 355 es crítico para hexamerización. El aminoácido que se encuentra en la posición 355 en la IgG1 de tipo salvaje, arginina, promueve hexamerización eficiente. Aquel que se encuentra en IgG4 de tipo salvaje, glutamina, da como resultado hexamerización inferior. Las otras posiciones de la diferencia entre los dominios CH3 de IgG1 e IgG4 no afectaron la hexamerización. Figura 3(b).

En multímeros Fc que comprenden un dominio CH3 derivado de IgG4, la sustitución del residuo de glutamina en la posición 355 con un residuo de arginina (Q355R) resulta en niveles altos de hexamerización. Por lo tanto, el problema de la hexamerización más baja de multímeros Fc de IgG4 puede resolverse mediante una simple sustitución de aminoácido. Esto tiene la ventaja de que el multímero Fc resultante se ensamble en hexámeros con alta eficiencia mientras que conservan las propiedades características de IgG4. Figura 3(c).

En multímeros Fc de IgG1, la sustitución de arginina en la posición 355 con cisteína (R355C) aumento la formación de hexámeros más allá de la de IgG1 de tipo salvaje. Aunque no se desea estar ligado por la teoría, este resultado sugiere que un residuo de cisteína en la posición 355 puede ser capaz de formar enlaces de disulfuro con la cisteína en el extremo. La mutagénesis de R355 a todos los otros aminoácidos no dio lugar a más mejoras de la formación de hexámero en multímeros Fc de IgG1. Figura 3(d).

Ejemplo 5: Mediciones de afinidad de interacciones de multímeros Fc y FcR

Las mediciones de afinidad/avidez para las interacciones de proteínas multiméricas de fusión y receptores Fc (FcR) que incluyen FcγR y FcRn se pueden realizar utilizando métodos bien conocidos que incluyen resonancia de plasmón superficial, competencia ELISA y estudios de unión de competencia en FcR con líneas celulares. Se utilizaron dominios extracelulares solubles (ECDs) de FcRs en experimentos de resonancia de plasmón superficial mediante captura de etiqueta específica o inmovilización no específica en un chip sensor BIAcore en un Biacore T200. Se proporcionó dominio extracelular de FcRn humano como un complejo no covalente entre el dominio extracelular de cadena alfa de FcRn humano y β2-microglobulina Las proteínas multiméricas de fusión se titularon sobre los receptores en una variedad de concentraciones y velocidades de flujo con el fin de

determinar mejor la fuerza de la interacción. Los datos fueron analizados utilizando el software Biacore T200 Evaluation.

La Figura 4 muestra los datos para la unión de proteínas multiméricas de fusión a FcRn, medida por análisis de resonancia de plasmón superficial. Las trazas demuestran unión para el rango de concentración de multímero: 2.5pM, 1.25pM, 0.625pM, 0.3125pM, 0.15625pM, 0.078125pM, 0.0390625pM. Los multímeros Fc muestran toda la histidina contenida en la posición 310.

- (a) IgM tp L309C de multímero Fc de IgG1 humana uniéndose a FcRn de baja densidad.
- (b) IgM tp de multímero Fc de IgG1 humana uniéndose a FcRn de baja densidad.
- (c) IgM tp L309C de multímero Fc de IgG1 humana uniéndose a FcRn de alta densidad.
- (d) IgM tp de multímero Fc de IgG1 humana uniéndose a FcRn de alta densidad.

Los constructos utilizados en (a) y (c) contienen una leucina a la sustitución de cisteína en la posición 309.

Los resultados demostraron que los multímeros Fc que comprenden histidina en la posición 310 se unen a FcRn humano.

También se generó un número de multímeros Fc, los cuales incorporaron mutaciones que se cree aumentan la unión a FcRn humano.

La Tabla 5 muestra las constantes de disociación para la unión de fragmentos mutados de Fc de IgG1 humana monomérica a FcRn humano a pH 6,0. Las mutaciones resultaron en un aumento de unión a FcRn humano. Sin embargo, la fuerza de la interacción de los fragmentos monoméricos todavía es débil, con constantes de disociación en el rango micromolar. La multimerización de los dominios Fc mutados, tal como se describe en la presente invención, puede conferir un beneficio de avidéz, mejorando así en gran medida la fuerza de la interacción.

Tabla 5. Unión de fragmentos mutados de Fc de IgG1 monomérica a FcRn humano a pH 6,0

Muestra de mutación	KD (M)	KD (μ M)
IgG1 Fc, WT	9.78E-07	0,98
IgG1 Fc, L309S	1.25E-06	1,25
IgG1 Fc, Q311A	7.69E-07	0,77
IgG1 Fc, T307A	5.65E-07	0,57
IgG1 Fc, T307P	6.93E-07	0,69
IgG1 Fc, V308C	7.00E-07	0,70
IgG1 Fc, V308F	3.32E-07	0,33
IgG1 Fc, V308P	1.36E-07	0,14
IgG1 Fc, WT	1.07E-06	1,07

Ejemplo 6: Fagocitosis de macrófagos de objetivos de células B

Se diseñó un ensayo para medir fagocitosis dependiente de anticuerpos de las células B por macrófagos humanos. Para preparar macrófagos, se aislaron primero células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas a partir de sangre fresca mediante centrifugación en gradiente de densidad. Luego, se seleccionaron monocitos mediante incubación de las PBMC durante 1 hora a 37°C en placas recubiertas para cultivo de tejidos de 6 pocillos, seguido por eliminación de células no adherentes. Se diferenciaron monocitos adherentes en macrófagos por cultivo de 5 días en factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF). Se prepararon entonces células B humanas a partir de un donante separado (allogénico) mediante aislamiento de PBMC, seguido por purificación de células B por selección negativa utilizando MACS (kit de aislamiento de células B II, Miltenyi Biotec). En algunos ensayos, las células B se marcaron con éster de carboxifluoresceína succinimidil (CFSE) (Molecular Probes). Se co-cultivaron macrófagos diferenciados y células B a una relación de 1: 5 en presencia de anti-CD20 mAb (rituximab) para inducir la fagocitosis dependiente de anticuerpos de las células B. Se añadieron proteínas multiméricas de fusión o controles a las concentraciones indicadas y las células se incubaron a 37°C 5% CO₂ durante 1 - 24 horas. Al final de cada punto de tiempo, se centrifugaron las células y se resuspendieron en tampón FACS a 4°C para detener la fagocitosis y la superficie teñida de las células B con alofocianina anti-CD19 (APC) antes del análisis por citometría de flujo. Los macrófagos se distinguen por sus propiedades de autofluorescencia/dispersión lateral y las células B por su etiquetado CFSE/CD19. Se supone que los macrófagos CFSE-positivos que son negativos para el etiquetado CD19 contienen células B envueltas.

Los resultados demostraron que las proteínas multiméricas de fusión de la invención inhiben la depleción de células B por macrófagos humanos (Figura 5). Los datos muestran que los multímeros Fc derivados de IgG1 o IgG4 humana, polimerizados en formas de hexámero o dodecámero mediante un solo extremo de IgM o un extremo de IgM y L309C, mostraron potencia y niveles máximos de inhibición significativamente mejores que la IGIV humana.

La demostración de que la forma de dodecámero y la forma de hexámero son igualmente potentes es de beneficio para la fabricación y seguridad del producto, ya que no hay necesidad de purificación adicional para eliminar cantidades de trazas del dodecámero de hexámero.

El análisis de citometría de flujo que utiliza células B teñidas de CFSE confirmó que el mecanismo de acción es la inhibición de la fagocitosis de macrófagos y no la destrucción de células B o apoptosis por otros medios.

A fin de evaluar la capacidad de cualquier constructo de multímero Fc dado para inhibir la fagocitosis de macrófagos, se midió su actividad en el ensayo que se describe anteriormente en este documento y comparó con las actividades de multímeros Fc de IgG1 e IgG4 de tipo salvaje. Luego, la actividad de cada mutante se resume como “similar a IgG1”, “alta”, “media”, “baja” o “similar a IgG4”, con base en una comparación visual de su concentración frente a la curva efecto con los obtenidos para multímeros Fc de IgG1 e IgG4 de tipo salvaje.

Los resultados para multímeros Fc que comprenden mutaciones cruzadas únicas en cada una de las ocho posiciones de diferencia en la región Fc de IgG1 e IgG4 se muestran en la Figura 6 y se resumen en la Tabla 6.

El multímero Fc de IgG1 de tipo salvaje, que comprende un dominio CH2 y CH3 derivado de IgG1, inhibe potencialmente la fagocitosis de macrófagos de las células diana recubiertas del anticuerpo. Dos de las mutaciones individuales en multímeros Fc de IgG1 (A330, K409R) no tienen ningún efecto sobre la potencia de la inhibición de fagocitosis. Seis de las mutaciones individuales (L234F, H268Q, K274Q, Y296F, A327G y P331S) resultaron en una reducción modesta de la potencia de inhibición de la fagocitosis. Los residuos L234F y A327G son de interés particular, ya que la mutación de estos reduce significativamente la liberación de citocinas (véase Ejemplo 8), mientras que mantiene potencia relativamente alta en inhibición de fagocitosis. Esta combinación de propiedades será útil para el tratamiento de trastornos autoinmunes.

Los multímeros Fc de IgG4 de tipo salvaje inhiben la fagocitosis de macrófagos de las células diana recubiertas del anticuerpo, pero menos potentes que los multímeros Fc de IgG1. Dos de las mutaciones individuales en multímeros Fc de IgG4 (F234L y G327A) aumenta modestamente la potencia de la inhibición de fagocitosis. Seis de las mutaciones en IgG4 (Q268H, Q274K, F296Y, S330A, S331P, R409K) no tienen ningún efecto sobre la inhibición de la fagocitosis cuando se mutan de manera individual. Los residuos F234L y G327A son de particular interés ya que, mientras que la mutación individual de cualquiera de estas posiciones mejora la potencia de los multímeros Fc de IgG4 en inhibición de fagocitosis, no tienen ningún efecto en el aumento de la producción de citocinas (véase Ejemplo 8). Esta combinación de propiedades será útil para el tratamiento de trastornos autoinmunes.

Tabla 6

<u>Multímero Fc</u>	<u>Potencia de inhibición de fagocitosis</u>
IgG1 Fc IgM tp L309	el estándar para “similar a IgG1”
IgG1 Fc IgM tp L309 L234F	alta
IgG1 Fc IgM tp L309 H268Q	alta
IgG1 Fc IgM tp L309 K274Q	alta
IgG1 Fc IgM tp L309 Y296F	alta
IgG1 Fc IgM tp L309 A327G	alta
IgG1 Fc IgM tp L309 A330S	similar a IgG1
IgG1 Fc IgM tp L309 P331S	alta
IgG1 Fc IgM tp L309 K409R	similar a IgG1
IgG4 Fc IgM tp L309	el estándar para “similar a IgG4”
IgG4 Fc IgM tp L309 F234L	media
IgG4 Fc IgM tp L309 Q268H	similar a IgG4
IgG4 Fc IgM tp L309 Q274K	similar a IgG4
IgG4 Fc IgM tp L309 F296Y	similar a IgG4
IgG4 Fc IgM tp L309 G327A	baja
IgG4 Fc IgM tp L309 S330A	similar a IgG4
IgG4 Fc IgM tp L309 S331P	similar a IgG4

IgG4 Fc IgM tp L309 R409K	similar a IgG4
---------------------------	----------------

Los resultados para constructos de multímero Fc adicionales diseñados para su uso en el tratamiento de trastornos del sistema inmune se muestran en la Figura 7 y resumen en la Tabla 7.

Los multímeros Fc de IgG1 e IgG4 de tipo salvaje inhiben la fagocitosis de macrófagos de las células diana recubiertas del anticuerpo con mayor potencia que IGIV.

Los multímeros Fc de IgG1 que comprenden L234F (que reducen la producción de citoquina) o L234F y P331S (reducen la producción de citoquina y la unión C1Q, véanse Ejemplos 8 y 15) han reducido modestamente la potencia en la inhibición de fagocitosis en relación con los multímeros Fc de IgG1 de tipo salvaje, pero son todavía muy potentes en relación con los multímeros Fc de IgG4 o IGIV.

Los multímeros Fc de IgG4 que comprenden las mutaciones F234L; F234L y F296Y; G327A y S331P; S330A y S331P; o G327A y S330A; han mejorado la potencia en la inhibición de fagocitosis en comparación con los multímeros Fc de IgG4 de tipo salvaje.

Tabla 7.

<u>Multímero Fc</u>	<u>Potencia de inhibición de fagocitosis</u>
IgG1 Fc IgM tp L309	el estándar para “similar a IgG1”
IgG4 Fc IgM tp L309	el estándar para “similar a IgG4”
IgG1 Fc IgM tp L309 L234F	alta
IgG1 Fc IgM tp L309 L234F P331S	alta
Fc híbrido de IgG4-CH2 IgG1-CH3 IgM tp L309	media
IgG4 Fc IgM tp L309 F234L	media
IgG4 Fc IgM tp L309 F234L F296Y	media
IgG4 Fc IgM tp L309 G327A S330A	media
IgG4 Fc IgM tp L309 G327A S331P	media
IgG4 Fc IgM tp L309 S330A S331P	media

Ejemplo 7: Fagocitosis celular de THP1 de perlas FITC de IgG

Las células THP1 se depositaron en el paso 7, se contaron y resuspendieron a 5×10^5 células/ml. Se añadieron 200µl de células a cada pocillo de una placa de fondo plano de 96 pocillos (1×10^5 células por pocillo). Se añadieron perlas recubiertas con IgG de conejo (Cambridge bioscience CAY500290-1 ea) directamente a cada pocillo, se mezclaron (1 en dilución de 10, 10µl/pocillo) y se dejaron durante los puntos de tiempo: 1h, 2h, 4h, 8h. Se afectaron cero puntos de tiempo mediante la adición de perlas a células en tampón frío de hielo en hielo. Al final de cada punto de tiempo, se centrifugaron las células a 300g durante 3mins. Las células se resuspendieron en tampón FACS que contienen una dilución de 1: 20 de solución de reserva azul de tripano durante 2 minutos. Las células con tampón FACS de 150µl se lavaron, centrifugaron y resuspendieron en tampón FACS de 200µl y se transfirieron a una placa de fondo redondo listo para FACS. Las células se centrifugan una vez más y se resuspenden en tampón FACS de 200µl antes del análisis por citometría de

flujo. Las células THP1 se cerraron en adelante y la dispersión lateral y la captación de perlas se midió como fluorescencia FITC.

Ejemplo 8: Ensayo de liberación de citoquina de sangre total humana

La sangre fresca se recogió de donantes en tubos al vacío con heparina de litio. Los constructos de multímero Fc de interés o controles se diluyeron en serie en PBS estéril a las concentraciones indicadas. Se añadió 12.5µl de multímero Fc o control a las placas de ensayo, seguido de 237.5µl de sangre total. La placa se incubó a 37°C sin suplementación de CO₂ durante 24 horas. Las placas se centrifugaron a 1800 rpm durante 5 minutos y el suero se removió para el análisis de citoquina. El análisis de citoquina se realizó mediante Meso Scale Discovery cytokine multiplex de acuerdo con el protocolo del fabricante y se leyó en un Sector Imager 6000.

Los resultados se muestran en la Figura 8. Los datos demostraron que los multímeros Fc de IgG1 de tipo salvaje, tanto con como sin L309C, estimulan niveles muy altos de liberación de citoquina. Los niveles observados de citocina fueron más altos que los producidos por el control positivo, Campath. En contraste marcado, los multímeros Fc de IgG4 y multímeros Fc de IgG1 que comprenden FcγR y mutación inerte de “LALA” C1q (L234A L235A), producen prácticamente liberación cero de citoquina.

A fin de evaluar el efecto de cualquier constructo de multímero Fc dado la liberación de citoquina, se midió su actividad en el ensayo que se describe anteriormente en este documento y comparó con las actividades de multímeros Fc de IgG1 e IgG4 de tipo salvaje. Luego, la actividad del mutante se resume como “similar a IgG1”, “alta”, “media”, “baja” o “similar a IgG4”, con base en una comparación visual de su concentración frente a la curva efecto con los obtenidos para multímeros Fc de IgG1 e IgG4 de tipo salvaje.

Los resultados para multímeros Fc que comprenden mutaciones cruzadas únicas en posiciones seleccionadas de diferencia en la región Fc de IgG1 e IgG4 se muestran en la Figura 9 y se resumen en la Tabla 8.

Los resultados demostraron que el multímero Fc de IgG1 de tipo salvaje, que comprende un dominio CH2 y CH3 derivado de IgG1, estimula la liberación de niveles muy significativos de citoquinas. Los resultados que se muestran son para IFNγ. Se observaron resultados similares para TNFa.

Dos de las mutaciones individuales (L234F, A327G) redujo significativamente la liberación de citoquina en los multímeros Fc de IgG1. Una de las mutaciones individuales (Y296F) produjo una reducción moderada de liberación de citoquina. Una de las mutaciones (P331S) aumentó significativamente la liberación de citoquina. Tres de las mutaciones (H268Q, K274Q, A330) no tuvo ningún efecto sobre la liberación de citoquina.

En marcado contraste, el multímero Fc de IgG4 de tipo salvaje, que comprende un dominio CH2 y CH3 derivado de IgG4, produjo prácticamente ninguna liberación de citoquina. Ninguna de las mutaciones cruzadas únicas tuvo ningún efecto sobre la liberación de citoquina mediante multímeros Fc de IgG4, ni siquiera aquellas en las posiciones que demostraron ser importantes para la liberación de citoquina en los multímeros Fc de IgG1.

Tabla 8

<u>Multímero Fc</u>	<u>Estimulación de liberación de IFNγ</u>
IgG1 Fc IgM tp L309	el estándar para “similar a IgG1”
IgG1 Fc IgM tp L309 L234F	baja
IgG1 Fc IgM tp L309 H268Q	similar a IgG1
IgG1 Fc IgM tp L309 K274Q	similar a IgG1
IgG1 Fc IgM tp L309 Y296F	media
IgG1 Fc IgM tp L309 A327G	baja
IgG1 Fc IgM tp L309 A330S	similar a IgG1
IgG1 Fc IgM tp L309 P331S	más alta que IgG1
IgG1 Fc IgM tp L309 K409R	más alta que IgG1
IgG4 Fc IgM tp L309	el estándar para “similar a IgG4”
IgG4 Fc IgM tp L309 F234L	similar a IgG4
IgG4 Fc IgM tp L309 Q268H	similar a IgG4
IgG4 Fc IgM tp L309 Q274K	similar a IgG4
IgG4 Fc IgM tp L309 F296Y	similar a IgG4
IgG4 Fc IgM tp L309 G327A	similar a IgG4
IgG4 Fc IgM tp L309 S330A	similar a IgG4
IgG4 Fc IgM tp L309 S331P	similar a IgG4
IgG4 Fc IgM tp L309 R409K	similar a IgG4

Los resultados para constructos de multímero Fc adicionales diseñados para modular la liberación de citoquina se muestran en la Figura 10 y resumen en la Tabla 9.

Los datos muestran que la liberación de citoquina mediante multímeros Fc de IgG1 puede reducirse a niveles aproximadamente equivalentes a IGIV por inclusión de L234F solo o en combinación con P331S. Tales multímeros Fc pueden ser útiles para el tratamiento de trastornos del sistema inmune. Todas los multímeros Fc de IgG4 que contienen mutaciones demostraron tener otras propiedades útiles, por ejemplo potencia mejorada en fagocitosis (Ejemplo 6), lo que conserva prácticamente cero niveles de liberación de citoquina y puede por lo tanto ser útil para el tratamiento de trastornos del sistema inmune.

Tabla 9. Liberación de citoquina mediante multímeros Fc

<u>Multímero Fc</u>	<u>Estimulación de liberación de IFNγ</u>
IgG1 Fc IgM tp L309	el estándar para “similar a IgG1”
IgG4 Fc IgM tp L309	el estándar para “similar a IgG4”
IgG1 Fc IgM tp L309 L234F	baja
IgG1 Fc IgM tp L309 L234F P331S	media
Fc híbrido de IgG4-CH2 IgG1-CH3 IgM tp L309	similar a IgG4
IgG4 Fc IgM tp L309 F234L	similar a IgG4
IgG4 Fc IgM tp L309 F234L F296Y	similar a IgG4
IgG4 Fc IgM tp L309 G327A S330A	similar a IgG4
IgG4 Fc IgM tp L309 G327A S331P	similar a IgG4

IgG4 Fc IgM tp L309 S330A S331P	similar a IgG4
---------------------------------	----------------

Ejemplo 9: Efecto sobre IgG que recicla en células en cultivo

Se llevaron a cabo ensayos basados en células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) II que habían sido transfectadas de manera estable con un FcRn humano y un vector de gen doble de B2M humana con un marcador de selección genética. Se seleccionó un clon celular estable que fuera capaz de reciclar y transportar IgG humana, y este se utilizó para todos los estudios posteriores. Se denominará MDCK II clon 15. Se han generado líneas equivalentes de células MDCK transfectadas con ya sea mono cynomolgus (“clon 40”) o ratón FcRn de una manera similar, para uso en ensayos equivalentes a los anteriores.

Se estableció un ensayo *in vitro* para examinar la capacidad de una proteína multimérica de fusión de la presente invención para inhibir la capacidad de reciclaje de IgG de FcRn. Brevemente, se incubaron 15 células de clon MDCK II con IgG humana biotinilada (1µg/ml), en presencia o ausencia de la proteína multimérica de fusión en un tampón ácido (pH 5,9) para permitir la unión a FcRn. Después de un tiempo de pulso de 60 minutos, se eliminó todo exceso de proteína y se incubaron las células en un tampón de pH neutro (pH 7,2), lo que permitió la liberación de superficie expuesta, IgG unido en el sobrenadante. Se continuó la inhibición de FcRn utilizando un ensayo de MSD para detectar la cantidad de IgG reciclado y así liberado en el sobrenadante.

Se colocaron 15 células de clon MDCK II en placas a 15,000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos y se incubaron durante la noche a 37°C, 5% de CO₂. Las células se incubaron con 1 µg/ml de IgG humana biotinilada (Jackson) en la presencia y ausencia de la proteína multimérica de fusión en FIBSS+ (Ca/Mg) pH 5.9 + 1% BSA durante 1 hora a 37°C, 5% de CO₂. Las células se lavaron con HBSS⁺ pH 5,9 y luego se incubaron a 37°C, 5% de CO₂ durante 2 horas en HBSS⁺ pH 7,2. Los lisados y el sobrenadante se eliminaron y analizaron para el total de IgG utilizando un ensayo de MSD (utilizando un anticuerpo de captura anti-IgG humana (Jackson) y un anticuerpo revelador de etiqueta de estreptavidina-sulfo (MSD)). La curva de inhibición se analizó por regresión no lineal (Graphpad Prism) para determinar EC₅₀.

Los resultados demostraron que las proteínas multiméricas de fusión de la invención inhiben el reciclaje de IgG de FcRn mediada. (Figura 11). Los multímeros de extremo de Fc/IgM de IgG1 humana que retienen el residuo de histidina nativo en la posición 310 bloquean la transcitosis de IgG de FcRn mediada y el reciclado en una manera dependiente de concentración, tanto con como sin cisteína en la posición 309. Los datos muestran claramente que la forma que carece de L309C es más potente que la que tiene L309C. Aunque no se desea estar ligado por la teoría, es probable que esta diferencia se deba al impedimento estérico por enlaces de disulfuro de L309C adyacentes al residuo de histidina en la posición 310, el cual está críticamente implicado en la unión a FcRn.

La Tabla 10 muestra los efectos de mutaciones sobre la actividad de bloqueo de multímeros Fc. Se pusieron a prueba tres mutaciones que aumentan la unión a FcRn, V308F, V308P y T307A en multímeros Fc que comprenden extremo de Fc/IgM de IgG1 o extremo de Fc/IgM de IgG4. Los resultados mostraron mejoras significativas en la capacidad de los multímeros Fc para bloquear la captación intracelular de IgG de FcRn mediada y el

reciclaje de IgG. Los datos demuestran la utilidad de estas mutaciones para mejorar la potencia de multímeros Fc que comprenden ya sea regiones Fc de IgG1 o IgG4.

La sustitución de histidina en la posición 310 con leucina (H310L) mostró que destruía la capacidad de los multímeros Fc para bloquear la captación intracelular de IgG de FcRn mediada y el reciclaje de IgG. Los resultados demuestran que los multímeros Fc que retienen el residuo de histidina en la posición 310 tienen mucha mejor unión a FcRn y son bloqueadores más potentes de captación intracelular de IgG y reciclaje de IgG. Los datos confirman que los multímeros Fc de la invención pueden proporcionar nuevas composiciones terapéuticas mejoradas con semivida más larga y una mayor eficacia.

Tabla 10. Efectos de mutaciones en bloqueo de multímero Fc de captación intracelular de IgG y reciclaje de IgG

Mutantes de multímero Fc	Bloqueo de captación intracelular de IgG EC ₅₀ (µg/ml)	Bloqueo de reciclaje de IgG EC ₅₀ (µg/ml)
Extremo de IgG1 IgM, Tipo salvaje	4,4	0,33
Extremo de IgG1 IgM, V308F	0,12	0,073
Extremo de IgG1 IgM, V308P	0,34	0,55
Extremo de IgG1 IgM, T307A	0,54	0,35
Extremo de IgG1 IgM, H310L	Inhibición no detectable	Inhibición máxima de 45% en 100µg/ml
Extremo de IgG4 IgM, Tipo salvaje	5,9	1,0
Extremo de IgG4 IgM, V308F	0,42	0,56
Extremo de IgG4 IgM, V308P	0,51	0,42
Extremo de IgG4 IgM, T307A	0,50	Sin probar

Ejemplo 10: Eficacia de multímeros Fc en PTI aguda

Se estudió la eficacia de multímeros Fc en un modelo de ratón de PTI, en el que la pérdida de plaquetas es inducida por la administración de anti-CD41. Este anticuerpo se une a la glicoproteína Mb en la superficie de las plaquetas, encontrándolas para su destrucción.

Protocolo PTI *in vivo*

Se tomó una muestra de sangre de 5µl de las colas de los ratones antes de la dosificación para obtener los números de plaquetas de base de referencia.

Los ratones se dosificaron por vía intravenosa con multímeros Fc de 1 mg/kg o 10 mg/kg.

Una hora más tarde se dosificaron por vía intraperitoneal con anticuerpo de IgG1 de anti-ratón CD41 de rata de ratón/1µg.

Se realizó punción cardíaca terminal 24 horas después de la administración anti-CD41.

Protocolo de tinción de FACs

Se tomó 5µl de sangre de la vena de la cola. Se extrajo sangre para muestras terminales mediante punción cardíaca en un tubo de heparina y se extrajo 5µl para la tinción.

Se añadieron 100 µl de cóctel de anticuerpos a la muestra de sangre de 5 µl y se incubó a 4°C en la oscuridad durante 20 minutos.

Se añadieron 5 ml de tampón FACs.

Cada muestra se diluyó 1: 4 para hacer un volumen final de 200µl en una placa de fondo 'vee' y se mantuvo en hielo hasta que esté listo para adquirir en el Becton Dickinson FACs Canto.

Tabla 11.

Nombre de anticuerpo/clon	Color de anticuerpo	Dilución	Proveedor/número de lote
CD45 (30-F11)	PerCPCy5.5	1/400	Ebio E08336-1633
CD42d (1C2)	PE	1/200	Ebio E14346-104
Bloque Fc		1/200	

Adquisición FACs

Se recogió un volumen conjunto de 150µl de muestra a una velocidad de flujo de 1.5µl/seg. El umbral se fijó en 200.

El análisis se realizó en el software FlowJo. El recuento de plaquetas se obtuvo a partir de las células confinadas CD45- / CD42d +.

Los recuentos de células se corrigieron para dilución de muestra con base en el hecho de que la muestra de sangre inicial de 5µl se diluye 1/4000 y 150µl de esta se ejecuta a través de la máquina de FACs que equivale a 0.1875µl de la muestra original que se analizó. $5/0,1875 = \text{factor de multiplicación de } \times 26,7 \text{ de plaquetas}/\mu\text{l}$.

Reactivos

Gado funcional purificado de anti-ratón CD41 de rata (Ebiosciences, MWReg30, lot #E11914-1632)

PBS libre de endotoxina (Sigma, D8537)

Tampón FACs: 0.1% FCS, 2mM EDTA

Resultados

Las proteínas multiméricas de fusión humanas (multímeros Fc) en dosis de 1 mg/kg fueron bien toleradas. Sin embargo, no fueron eficaces a esta dosis en el modelo.

Se observaron resultados positivos utilizando 10 mg/kg de multímeros Fc humanos.

Los multímeros Fc, ya sea con un extremo IgM o IgA, inhibieron significativamente la disminución de plaquetas causada por la inyección de 1 µg/anti-CD41 de ratón.

Los resultados demostraron que los multímeros Fc evitan la pérdida de plaquetas en un modelo *in vivo* de trombocitopenia inmune aguda. Se lograron reducciones estadísticamente significativas en la pérdida de plaquetas utilizando multímeros de extremo IgM/Fc humano de IgG1, con y sin L309C, y multímeros de extremo IgM/Fc humano de IgG4 con L309C, a una dosis de 10 mg/kg. (Figura 12) Por lo tanto, las proteínas

multiméricas de fusión que se hexamerizaron a través del extremo, o por medio del disulfuro y extremo L309C, son eficaces *in vivo* por sí solas. La IGIV humana es activa en este modelo sólo a una dosis mucho mayor de 1000 mg/kg. A la dosis equivalente de 10 mg/kg, se encontró que la IGIV era inactiva en la prevención de pérdida de plaquetas.

Ejemplo 11: Eficacia de multímeros Fc en PTI aguda

Se estudió la eficacia de multímeros Fc en un modelo de ratón de PTI crónico, en el que la pérdida de plaquetas es inducida por la administración de anti-CD41 durante un período extendido de tiempo utilizando mini bombas.

Protocolo PTI *in vivo*

Se tomó un sangrado de cola de 5 µl antes de la dosificación para obtener números de plaquetas de base de referencia.

Se implantó una mini bomba Alzet que contiene anti-ratón CD41 de rata a una concentración de 82,5µg/ml (57,75µl anti-ratón CD41 de rata Ab + 642.25µl PBS/BSA (1,5mg/ml)) por vía subcutánea. Las bombas tienen una velocidad de flujo de 0,5µl/hora, lo que dosifica el equivalente de 0,99µg de anti-CD41 por día.

Se realizaron diariamente sangrados de cola de 5 µl para obtener recuentos de plaquetas.

En un punto de tiempo en donde se alcanzó un recuento de plaquetas en estado estacionario, se dosificaron ratones por vía intravenosa con 1 g/kg de IgIV, o multímeros Fc en un rango de dosis.

A los 7 días se realizó una punción cardiaca terminal.

Protocolo de tinción de FACs

Se tomó 5 µl de sangre a través de la vena de la cola. Para las muestras terminales, se tomó la sangre mediante punción cardiaca en un tubo de heparina y se tomó 5 µl para la tinción.

Se añadió 100µl de cóctel de anticuerpo y se incubó a 4°C en la oscuridad durante 20 minutos.

Se añadió 5 ml de tampón FACs

Cada muestra se diluyó 1: 4 para hacer un volumen final de 200µl en una placa de fondo v y se mantuvo en hielo hasta que esté listo para adquirir en el BD FACs Canto.

Tabla 12.

Nombre de anticuerpo/clon	Color de anticuerpo	Dilución	Proveedor/número de lote
CD45 (30-F11)	PerCPCy5.5	1/400	Ebio E08336-1633
CD42d (1C2)	PE	1/200	Ebio E14346-104
Bloque Fc		1/200	

Adquisición FACs

Se recogerá un volumen conjunto de 150µl de muestra a una velocidad de flujo de 1,5µl/seg. El umbral se fijará en 200.

El análisis se realizará en el software FlowJo. El recuento de plaquetas se obtendrá a partir de las células confinadas CD45- / CD42d +.

Los recuentos de células se corregirán para dilución de muestra con base en el hecho de que la muestra de sangre inicial de 5µl se diluye 1/4000 y 150µl de esta se ejecuta a través de la

máquina de FACs que equivale a 0.1875µl de la muestra original que se analizó. $5/0,1875 =$ factor de multiplicación de x 26,7 de plaquetas/µl.

Reactivos

Gado funcional purificado de anti-ratón CD41 de rata (Ebiosciences, MWReg30, lot #E11914-1632)

PBS libre de endotoxina (Sigma, D8537)

Tampón FACs: 0.1% FCS, 2mM EDTA

10mg/kg IgG1 IgM tp, (ID:PB0000238), EWBE-017553, 5.69mg/mg,

Endotoxina<0.35 EU/mg

IgG1 Fc IgM tp L309C, (ID:PB0000198), EWBE-017400, 6.49mg/ml, Endotoxina<0.46 EU/mg

IgIV: Gammunex lot#26NK1 N1.

Los resultados demostraron que las proteínas multiméricas de fusión evitan la pérdida de plaquetas en un modelo *in vivo* de trombocitopenia crónica. La Figura 13 muestra los efectos conseguidos utilizando (a) una sola dosis de multímero Fc de 10 mg/kg, administrada en el día 3; y (b) cuatro dosis diarias consecutivas, 10 mg/kg por dosis, administradas en los días 3, 4, 5 y 6. Las dosis múltiples de multímero Fc aumentaron su eficacia en la prevención de la pérdida de plaquetas. La IGIV humana fue efectiva sólo a una dosis mucho mayor de 1000 mg/kg.

Ejemplo 12: Enlace de disulfuro y análisis de glicano de multímeros Fc hexaméricos mediante espectrometría de masas

Método

Las muestras purificadas de multímeros Fc hexaméricos (100 µg) se desnaturalizaron en presencia de urea de 8M en 55mM Tris-HCl pH8,0 y los tioles libres se taparon mediante incubación con yodoacetamida de 22mM (IAM) durante 60 minutos a 37°C. La concentración de urea se redujo a 6M utilizando ultrafiltración y la proteína se digirió con una mezcla de tripsina/LysC (Promega) durante 3 horas a 37°C. La muestra se diluyó adicionalmente con 5 volúmenes de tampón y la digestión continuó durante la noche a 37°C. Los péptidos se recogieron, se desalinizaron con cartuchos Waters Oasis HLB, se secaron utilizando un evaporador centrífugo y se reconstituyeron en agua que contenía 0,2% de ácido fórmico (disolvente A).

Se cargaron muestras (7.5µl, ~7ug) a 150µl/min en una columna de 2,1 x 150 mm C18 (Waters 1,7u PST 300A) equilibrada con disolvente A y operada a 40°C. Los péptidos se eluyeron mediante un gradiente de 60 min a 50% de disolvente B (4: 4: 1 acetonitrilo: 1 propanol: agua / 0,2% de ácido fórmico) en un espectrómetro de masas Waters Xevo operado en MS^E + modo de ve-ion. Los datos MS^E, que consisten en alternar escaneos de energía baja y alta de colisión, se recogieron en el rango de 100 - 1900m/z. durante la elución. Después de su ejecución, las digestiones se redujeron mediante la adición de solución de Tris(hidroxipropil)fosfina (THP) 10 mM directamente al vial automuestreador e incubado durante > 1 hr a temperatura ambiente. Las muestras reducidas fueron luego analizadas por segunda vez.

Los datos de MS^E se investigaron en comparación con la secuencia de multímero Fc relevante utilizando Waters BiopharmaLynx™ (BPL). La proporción de tioles libres de disulfuro se calculó a partir de la relación de marcado de IAM a péptido libre en la digestión reducida de THP. Los perfiles de glicanose determinaron a partir de las diversas isoformas de glicopéptidos detectadas en las digestiones.

Resultados

Los resultados para el análisis de glicano de multímeros Fc (IgG1 Fc/extremo IgM), con y sin L309C, se muestran en la Tabla 13. Las estructuras de glicano se muestran en la Tabla 8.

Los datos demuestran alta ocupación de N297, con el sitio de glicosilación en la región Fc de IgG1, en donde se encontraron residuos libres de asparagina de menos del 10% en esta posición. La glicosilación en N297 fue principalmente complejo biantenarico fucosilado, principalmente G0F. La ocupación del sitio extremo de IgM, N563, fue de aproximadamente 50%, más alto que el nivel de aproximadamente 20% que se encuentra en IgM nativa. La glicosilación en N563 fue principalmente alto contenido de manosa.

Tabla 13. Análisis de glicano

		Ocupación	G0F-N	G2-F	GI-F	G0-F	M6	M5
IgG1 Fc IgM tp L309C	CH2 N297	93%	14%	5%	20%	38%	1%	15%
	N563 extremo	59%	<1%	7%	5%	2%	24%	20%
IgG1 Fc IgM tp	CH 2 N297	91%	14%	<1%	26%	34%	<1%	15%
	N563 extremo	45%	1%	4%	3%	<1%	14%	22%

Los resultados para el análisis de enlaces intercatenarios de disulfuro se muestran en la Tabla 14. También se obtuvieron resultados similares para enlaces intracatenarios de disulfuro. Los datos demostraron que una alta proporción de los residuos de cisteína en los multímeros Fc son unidos por disulfuro. No hubo evidencia de cantidades significativas de enlaces mezclados de disulfuro, y todos los dipéptidos esperados se encuentran en altos niveles antes de la reducción.

Tabla 14. Enlaces intercatenarios de disulfuro

		DSB (%)	Tiol “libre” (%)
IgG1 Fc IgM tp L309C	Bisagra	97	3
	CH2 L309C- L309C	89	10
	Extremo	84	14

	C575- C575		
IgG1	Bisagra	96	4
IgM tp	Extremo C575- C575	80	19

Ejemplo 13: Unión de multímeros Fc a C1q

La unión de multímeros Fc a C1q se midió por ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), utilizando un kit ELISA C1q de Abnova Corporation, número de catálogo: KA1274, número de lote: V14-111723527. Los constructos de multímeros Fc fueron valorados en cinco diluciones de 500 µg/ml hasta 4 µg/ml. Se añadió 100 µl de cada constructo de multímero Fc al pocillo apropiado y se agitó durante una hora para permitir la unión. El ensayo se llevó a cabo entonces de acuerdo con el protocolo del fabricante y se analizó en un lector de placas a una absorbancia de 450 nm.

A fin de evaluar la unión de cualquier constructo de multímero Fc dado a C1q, se midió su actividad y comparó con las actividades de multímeros Fc de IgG1 e IgG4 de tipo salvaje. Luego, la actividad del mutante se resume como “similar a IgG1”, “alta”, “media”, “baja” o “similar a IgG4”, con base en una comparación visual de su concentración frente a la curva efecto con los obtenidos para multímeros Fc de IgG1 e IgG4 de tipo salvaje.

Los resultados se muestran en la Figura 14 y se resumen en la Tabla 15.

Los resultados demostraron que el multímero Fc de IgG1 de tipo salvaje, que comprende un dominio CH2 y CH3 derivado de IgG1, se une fuertemente a C1q. En contraste, el multímero Fc de IgG4 de tipo salvaje, que comprende un dominio CH2 y CH3 derivado de IgG4, se une muy mal a C1q. Se encontró que el residuo dominante que define la unión C1q en los multímeros Fc es prolina en la posición 331 (P331). La sustitución de este residuo de prolina por serina (P331S) reduce efectivamente la unión de C1q en multímeros Fc con un dominio CH2 derivado de IgG1. El mutante inverso, S331P, aumentó la unión de C1q en multímeros Fc con un dominio CH2 derivado de IgG4.

Tabla 15. Unión de multímeros Fc a C1q

<u>Multímero Fc</u>	<u>Unión C1q</u>
IgG1 Fc IgM tp L309	el estándar para “similar a IgG1”
IgG4 Fc IgM tp L309	el estándar para “similar a IgG4”
IgG1 Fc IgM tp L309 L234F	similar a IgG1
IgG1 Fc IgM tp L309 P331S	baja
IgG1 Fc IgM tp L309 L234F P331S	similar a IgG4
Fc híbrido de IgG4-CH2 IgG1-CH3 IgM tp L309	similar a IgG4
IgG4 Fc IgM tp L309 F234L	similar a IgG4
IgG4 Fc IgM tp L309 F234L F296Y	similar a IgG4
IgG4 Fc IgM tp L309 G327A S330A	similar a IgG4
IgG4 Fc IgM tp L309 G327A S331P	media
IgG4 Fc IgM tp L309 S330A S331P	media

Ejemplo 14 Activación plaquetaria

La activación plaquetaria mediante multímeros Fc se analizó mediante citometría de flujo. Se prepararon dos diluciones de multímero Fc en medio RPMI y transfirieron a tubos de FACS. La concentración final fue de 100 µg/ml a 3,12µg/ml. Se añadieron 5µl de sangre entera fresca (de un mínimo de 2 donantes humanos) por tubo. Las plaquetas se confinaron utilizando anti-CD42b marcado Mab y activación seguida de Mabs frente a marcadores: CD62P, CD63 y PAC-1. (Becton Dickinson, BD CD42b APC Cat:551061, BD CD62p PE Cat:550561, BD CD63 PE-Cy-7 Cat:561982, BD PAC-1 FITC Cat:340507). Las células se fijaron mediante la adición de paraformaldehído de 500µl al 1% antes del análisis por citometría de flujo.

Se halló que CD62P era el más sensible de los tres marcadores de prueba.

A fin de evaluar la activación plaquetaria mediante cualquier constructo de multímero Fc dado, se midió su actividad y comparó con las actividades de multímeros Fc de IgG1 e IgG4 de tipo salvaje. Luego, la actividad del mutante se resume como “similar a IgG1”, “alta”, “media”, “baja” o “similar a IgG4”, con base en una comparación visual de su concentración frente a la curva efecto con los obtenidos para multímeros Fc de IgG1 e IgG4 de tipo salvaje.

Los resultados para la inducción de la expresión de CD62P se muestran en la Figura 15 y se resumen en la Tabla 16.

Los resultados demostraron que el multímero Fc de IgG1 de tipo salvaje, que comprende un dominio CH2 y CH3 derivado de IgG1, resulta en niveles significativos de activación plaquetaria.

Hemos demostrado en el Ejemplo 8 que dos mutaciones son útiles para reducir la liberación de citoquina a partir del multímero Fc de IgG1, L234F y A327G. De estas dos mutaciones, la L234F tiene más niveles reducidos de activación plaquetaria en comparación con el dominio Fc de IgG1 de tipo salvaje, considerando que un multímero Fc con la mutación A327G retiene niveles significativos de activación plaquetaria. Por lo tanto, la L234F es

una mutación muy útil, ya que reduce la liberación de citoquina y la activación plaquetaria con sólo una pérdida menor de potencia en la inhibición de fagocitosis de macrófagos.

La adición de P331S (se muestra en el Ejemplo 13 que es útil para la reducción de mutación de C1q) a L234F (L234F P331S) da como resultado niveles bajos de activación plaquetaria. Este doble mutante es un medio para lograr citocina baja, activación plaquetaria baja y unión cero de C1q. Así, esta combinación de mutaciones es particularmente útil y se espera que proporcione nuevas terapias para el tratamiento de trastornos del sistema inmune.

La L234F puede ser dominante sobre A327G, ya que la mutación triple L234F A327G P331S tiene activación plaquetaria baja.

El multímero Fc de IgG4 de tipo salvaje, que comprende un dominio CH2 y CH3 derivado de IgG4, resulta virtualmente en ninguna activación plaquetaria.

Cambiar el dominio CH3 a aquel de IgG1 retiene estos niveles reducidos de la activación plaquetaria.

La mutación F234L tiene niveles bajos de activación plaquetaria (y de potencia mejorada), pero la activación plaquetaria se incrementa en comparación con el multímero Fc de IgG4 de tipo salvaje.

La F296Y se puede combinar con F234L, sin aumentar adicionalmente la activación plaquetaria. Esta observación es importante ya que F234L F296Y ha aumentado potencia en comparación con los multímeros Fc de IgG4 de tipo salvaje. Así, esta combinación de mutaciones es particularmente útil y se espera que proporcione nuevas terapias para el tratamiento de trastornos del sistema inmune.

La mutación G327A no aumenta la activación plaquetaria. Esta observación es sorprendente en vista de los resultados para la mutación inversa A327G en multímeros Fc de IgG1, los cuales retienen niveles altos de activación plaquetaria.

Ciertos mutantes dobles (G327A S330A, G327A S331P y S330A S331P), que también han mejorado potencia sobre el IgG4 WT, tienen niveles muy bajos de activación plaquetaria (similar a IgG4) y se espera que proporcionen nuevas terapias para el tratamiento de trastornos del sistema inmune.

Tabla 16. Activación plaquetaria mediante multímeros Fc.

<u>Multímero Fc</u>	<u>CD62p</u>
IgG1 Fc IgM tp L309	el estándar para “similar a IgG1”
IgG4 Fc IgM tp L309	el estándar para “similar a IgG4”
IgG1 Fc IgM tp L309 L234F	baja
IgG1 Fc IgM tp L309 L234F P331S	similar a IgG4
IgG1 Fc IgM tp L309 A327G	similar a IgG1

IgG1 Fc IgM tp L309 A327G A330S P331S	similar a IgG1
IgG1 Fc IgM tp L309 A327G P331S	similar a IgG1
IgG1 Fc IgM tp L309 L234F A327G P331S	media
Fc híbrido de IgG4-CH2 IgG1-CH3 IgM tp L309	baja
IgG4 Fc IgM tp L309 F234L	media
IgG4 Fc IgM tp L309 F234L F296Y	media
IgG4 Fc IgM tp L309 G327A S330A	similar a IgG4
IgG4 Fc IgM tp L309 G327A S331P	similar a IgG4
IgG4 Fc IgM tp L309 S330A S331P	baja

Ejemplo 15 Ingeniería de variantes de multímeros Fc

El ejemplo anterior ilustra que los multímeros Fc que fueron creados son adecuados específicamente para su uso en el tratamiento de trastornos del sistema inmune. Los multímeros Fc fueron diseñados con el objetivo de generar multímeros Fc que poseen las siguientes propiedades:

Inhibición de fagocitosis de macrófagos de células diana recubiertas del anticuerpo.

La potencia del multímero Fc debe ser tan alta como sea posible.

Liberación de citoquina.

La estimulación de liberación de citoquina mediante el multímero Fc debe ser tan baja como sea posible.

Unión C1q.

La unión del multímero Fc a C1q debe ser tan baja como sea posible.

Activación plaquetaria.

La activación plaquetaria mediante el multímero Fc debe ser tan baja como sea posible.

Sin embargo, el trabajo en los ejemplos anteriores ha ilustrado que puede ser necesario comprometer la potencia máxima y la potencia ligeramente más baja con el fin de lograr menos efectos secundarios.

El multímero Fc de IgG1 de tipo salvaje que comprende un dominio CH2 y CH3 derivado de IgG1 sin ninguna mutación adicional puede ser menos adecuado para utilizarse en el tratamiento de trastornos del sistema inmune, ya que, aunque muestra alta potencia de inhibición de fagocitosis, también muestra altos niveles de efectos secundarios no deseados, medidos por liberación de citoquina, unión C1q y activación plaquetaria.

El multímero Fc de IgG1 de tipo salvaje que comprende un dominio CH2 y CH3 derivado de IgG4 produce niveles muy bajos de efectos secundarios no deseados a pesar de que su potencia es baja en relación con la de IgG1. No obstante, la potencia del multímero Fc de IgG1 de tipo salvaje es todavía significativamente mayor que aquella de IGIV, tal como se muestra en la Figura 7.

Los multímeros Fc se diseñaron para combinar las propiedades deseables de los multímeros Fc de tanto IgG1 como de IgG4 de tipo salvaje, sin las propiedades no deseables. Estos multímeros Fc muestran niveles eficaces de potencia, mientras reducen efectos secundarios no deseados a un nivel tolerable, tal como se muestra a continuación en la Tabla 17. Se espera que estos multímeros Fc sean particularmente útiles para su uso en el tratamiento de trastornos del sistema inmune.

Tabla 17

<u>Multímero Fc</u>	<u>inhibición de fagocitosis</u>	<u>Liberación IFNγ</u>	<u>Unión C1q</u>	<u>activación plaquetaria</u>
multímero Fc de IgG1 de tipo salvaje	el estándar para “similar a IgG1”	el estándar para “similar a IgG1”	el estándar para “similar a IgG1”	the el estándar para “similar a IgG1”
multímero Fc de IgG4 de tipo salvaje	el estándar para “similar a IgG4”	el estándar para “similar a IgG4”	el estándar para “similar a IgG4”	el estándar para “similar a IgG4”
IgG1 Fc IgM tp L309 L234F P331S	alta	media	similar a IgG4	similar a IgG4
Fc híbrido de IgG4-CH2 IgG1-CH3 IgM tp L309	media	similar a IgG4	similar a IgG4	baja
IgG4 Fc IgM tp L309 F234L	media	similar a IgG4	similar a IgG4	media
IgG4 Fc IgM tp L309 F234L F296Y	media	similar a IgG4	similar a IgG4	media
IgG4 Fc IgM tp L309 G327A S330A	media	similar a IgG4	similar a IgG4	similar a IgG4
IgG4 Fc IgM tp L309 G327A S331P	media	similar a IgG4	media	similar a IgG4
IgG4 Fc IgM tp L309 S330A S331P	media	similar a IgG4	media	similar a IgG4