

Proteínas Fc Multiméricas

La invención se refiere a proteínas de fusión multiméricas que se unen a receptores Fc. La invención también se refiere a composiciones terapéuticas que comprenden las proteínas de fusión multiméricas, y su uso en el tratamiento de desórdenes inmunes.

ANTECEDENTE

Los desórdenes del sistema inmune abarcan una amplia variedad de enfermedades con diferentes signos, síntomas, etiologías y mecanismos patogénicos. Muchas de estas enfermedades se caracterizan por el involucramiento activo de anticuerpos patogénicos y/o complejos inmunes patogénicos. En algunas enfermedades tales como ITP (llamadas variablemente trombocitopenia inmune, púrpura trombocitopénica inmune, púrpura trombocitopénica idiopática) los antígenos diana para los anticuerpos patogénicos (Hoernberg, Scand HJ Immunol, Vol 74(5), p489-495, 2011) y el proceso de la enfermedad son razonablemente bien entendidos. Tales desórdenes inmunes se tratan usualmente con una variedad de agentes convencionales, bien como monoterapia o en combinación. Los ejemplos de tales agentes son corticosteroides, que están asociados con numerosos efectos secundarios, inmunoglobulina intravenosa (IVIG) y anti-D.

Los anticuerpos, usualmente se denominan como inmunoglobulinas, son moléculas en forma de Y que comprenden dos cadenas pesadas (H) idénticas y dos cadenas ligeras (L) idénticas, unidas entre sí mediante enlaces disulfuro entre cadenas. Cada cadena consiste en un dominio variable (V) que varía en secuencia y es responsable por la unión a antígeno. Cada cadena consiste también en al menos un dominio constante (C). En la cadena ligera hay un único dominio constante. En

la cadena pesada hay al menos tres, a veces cuatro dominios constantes, dependiendo en el isótopo (IgG, IgA e IgD tienen tres, IgM e IgE tienen cuatro).

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

El dominio Fc de un anticuerpo comprende típicamente al menos los dos últimos dominios constantes de cada cadena pesada que se dimeriza para formar el dominio Fc. El dominio Fc es responsable de proporcionar funciones del efector de anticuerpo, que incluyen determinar semivida de anticuerpo, principalmente a través de la unión a FcRn, la distribución a través del cuerpo, la habilidad para fijar el complemento, y unirse a receptores Fc de la superficie celular.

Las diferencias entre isotipos de anticuerpos son más pronunciadas en los dominios Fc, y esto lleva al accionamiento de diferentes funciones del efector sobre la unión al antígeno. Las diferencias estructurales también llevan a diferencias en el estado de polimerización de los anticuerpos. Por lo tanto, IgG, IgE e IgD son monoméricos generalmente mientras que IgM ocurre como un pentámero y como un hexámero, IgA ocurre predominantemente como un monómero en el suero y como un dímero en secreciones sero-mucosas.

La inmunoglobulina intravenosa (IVIg) es la inmunoglobulina agrupada de miles de donantes de sangre saludables. La IVIg se usó inicialmente como una terapia de reemplazo IgG para prevenir infecciones oportunistas en pacientes con bajos

niveles de IgG (revisado en Baerenwaldt, Expert Rev Clin Immunol, Vol 6(3), p425-434, 2010). Después del descubrimientos de las propiedades antiinflamatorias de la IVIG en niños con ITP (Imbach, Helv Paediatric Acta, Vol 36(1), p81-86, 1981), la IVIG ahora está autorizada para el tratamiento de ITP, síndrome de Guillain-Barré enfermedad Kawasaki y polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (Nimmerjahn, Annu Rev Immunol, Vol 26, p513-533, 2008).

En enfermedades que involucran complejos inmunes patogénicos se ha propuesto que una fracción minoritaria del componente de fracción de inmunoglobulina sea desproporcionalmente efectiva. Se observa que las trazas (típicamente 1-5%) de IgG están presentes en formas milimétricas dentro de la IVIG. La mayoría de esta fracción multimérica pretende ser dímero con cantidades más pequeñas de trímero y formas superiores. También se ha propuesto que pueden formarse dímeros adicionales después de la infusión mediante la unión de anticuerpos anti-idiotipo receptores. Una teoría es que estas formas multiméricas compiten contra complejos inmunes para unirse a receptores $Fc\gamma$ de baja afinidad debido su avidéz mejorada (Augener, Blut, Vol 50, p249-252, 1985; Teeling, Blood Vol 98(4), p1095-1099, 2001; Machino, Y., Clin Exp Immunol, Vol 162(3), p415-424, 2010; Machino, Y. et al., BBRC, Vol 418, p748-753, 2012). Otra teoría es que las glicoformas de ácido siálico de IgG dentro de la IVIG, especialmente la presencia de altos niveles de formas de ácido siálico $\alpha 2-6$, causan una alteración en el estado de activación del receptor $Fc\gamma$ (Samuelsson, Science, Vol 291, p484-486, 2001; Kaneko, Science, Vol 313, p670-673, 2006; Schwab, European J Immunol Vol 42, p826-830, 2012; Sondermann, PNAS, Vol 110(24), p9868-9872, 2013).

En enfermedades que involucran anticuerpos patogénicos se ha propuesto que las dosis más grandes de IVIG, administradas a humanos (1-2g/kg), anulen efectivamente el mecanismo de homeostasis IgG normal realizado por $FcRn$.

Efectivamente una gran dilución de IgG receptor por el donante IVIG da como resultado catabolismo mejorado y una semivida de suero más corta de anticuerpos patogénicos del paciente. Otros mecanismos propuestos para la eficacia incluyen neutralización idiotípica de anticuerpos patogénicos y reducciones transitorias en factores del complemento (Mollnes, *Mol Immunol*, Vol 34, p719-729, 1997; Crow, *Transfusion Medicine Reviews*, Vol 22(2), p103-116, 2008; Schwab, I. y Nimmerjahn, F. *Nature Reviews Immunology*, Vol 13, p176-189, 2013).

Hay desventajas significativas del uso clínico de la IVIG. La IVIG tiene calidad de producto variable entre los fabricantes debido a las diferencias inherentes en los métodos de fabricación y los grupos de donantes (Siegel, *Pharmacotherapy* Vol 25(11) p78S-84S, 2005). La IVIG se da en dosis muy grandes, típicamente en el orden de 1-2g/kg. Estas grandes dosis necesitan una larga duración de infusión, (4 – 8 horas, algunas veces divididas en múltiples días), lo que puede ser desagradable para el paciente y puede dar como resultado eventos adversos relacionados con la infusión. Los eventos adversos serios pueden ocurrir, entendiéndose bien las reacciones en individuos con deficiencia IgA. La liberación de citoquinas también puede observarse en pacientes que reciben IVIG pero esto se minimiza en gran parte mediante el control cuidadoso de la dosis y la velocidad de infusión. Como consecuencia de las grandes cantidades utilizadas por paciente y la dependencia en los donantes humanos, la fabricación de la IVIG es costosa y los suministros mundiales son severamente limitados.

En conjunto, las desventajas de la IVIG significan que hay necesidad de mejoramiento en términos de abastecimiento clínico, administración y eficacia de que las moléculas puedan interferir con la biología de la enfermedad de anticuerpos patogénicos y complejos inmunes patogénicos.

En la literatura se ha descrito una proteína de fusión Fc polimérica para usar como un reemplazo potencial para terapia IVIG. (Mekhaïel et al; Nature Scientific Reports 1:124, publicado el 19 de octubre de 2011). Mekhaïel et al. describen apéndice hexamérico hlgG1-Fc-LH309/310CL-

Los presentes inventores han creado proteínas de fusión milimétricas que contienen mutaciones que modifican las funciones del efector de las proteínas, incluyendo la unión del receptor Fc alterada y/o la unión del complemento alterado. Las modificaciones mejoran en gran medida la seguridad y eficacia de las proteínas de fusión milimétricas de la presente invención.

En la presente invención hemos, por lo tanto, proporcionado proteínas de fusión multiméricas mejoradas con capacidad de fabricación mejorada y mayor eficacia y seguridad, que resuelve muchas de las desventajas de la IVIG y de las alternativas de las anterioridades. Las proteínas se pueden producir en grandes cantidades, bajo condiciones cuidadosamente controladas, eliminando los problemas de recursos limitados y calidad variable. Adicionalmente, la eficacia y seguridad mejoradas permite la administración de dosis más pequeñas y reduce el riesgo de eventos adversos.

Las proteínas descritas por Mekhaïel et al se desarrollaron principalmente para uso como vacunas, y se fusionaron típicamente una proteína diferente denominada como una “pareja de fusión” tal como un antígeno, patrón molecular asociado a patógeno (PAMP), medicamento, ligando, receptor, citocina o quimiocina. En un ejemplo, las proteínas de la presente invención no comprenden una pareja de fusión.

Las proteínas de fusión poliméricas se han descrito en el arte previo en el que el apéndice de terminal carboxilo tanto de IgM como de IgA se añadió a las terminales carboxilo de todas las regiones constantes de moléculas IgG para producir IgG tipo IgM recombinante. (Smith R.I.F. and Morrison, S.L. Biotechnology, Vol 12, p683-688, 1994; Smith R.I.F. et al, J Immunol, Vol 154, p2226-2236, 1995; Sørensen V. et al, J Immunol, Vol 156, p2858-2865, 1996). Las moléculas IgG estudiadas fueron inmunoglobulinas intactas que comprenden regiones variables. Por el contrario, las proteínas de fusión multiméricas de la presente invención no comprenden una región variable del anticuerpo.

Por lo tanto, en la presente invención nosotros proporcionamos proteínas de fusión multiméricas con capacidad de fabricación mejorada, y mayor seguridad y eficacia, lo que resuelve muchas de las desventajas de la IVIG y de las alternativas del arte previo. Las proteínas pueden producirse de manera recombinante en grandes cantidades, bajo condiciones cuidadosamente controladas, eliminando los problemas de recursos limitados y calidad variable. Adicionalmente, mayor eficacia y seguridad permite la administración de dosis más pequeñas y reduce significativamente el riesgo de eventos adversos.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Las proteínas de fusión multimérica de la invención se han denominado colectivamente “multímeros Fc” y los dos términos se usan de manera intercambiable en este documento.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente la persona versada en la materia a quien pertenece esta invención. Todas las

publicaciones y patentes a las que se refiere en este documento se incorporan por referencia.

Se apreciará que se puede combinar cualquiera de las formas de realización descritas en este documento.

En la presente descripción el sistema de numeración de la UE se usa para referirse a los residuos en dominios de anticuerpo, a menos que se especifique lo contrario. Este sistema se ideó originalmente por Edelman et al, 1969 y se describe en detalle en Kabat et al, 1987.

Edelman et al., 1969; "La estructura covalente de una molécula de inmunoglobulina γ G entera", PNAS Biochemistry Vol.63 pp78-85.

Kabat et al., 1987; en Secuencias de Proteínas de Interés Inmunológico, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU., NIH, EE.UU.

Cuando un número de posición y/o residuo de aminoácido se da para un isotipo de anticuerpo particular, pretende ser aplicable a la posición correspondiente y/o residuo de aminoácido en cualquier otro isotipo de anticuerpo, como se conoce por una persona versada en el arte. Cuando se refiere a un residuo de aminoácido en un apéndice derivado de IgM o IgA, el número de posición dado es el número de posición del residuo en IgM o IgA que ocurren de manera natural, de acuerdo con la práctica convencional en el arte.

La presente invención proporciona una proteína de fusión multimérica que comprende dos o más unidades de monómero polipéptido; en donde cada unidad de monómero polipéptido comprende un dominio Fc del anticuerpo que comprende dos regiones Fc de cadena pesada;

en donde cada región Fc de cadena pesada comprende un residuo de cisteína en la posición 309, y al menos una mutación adicional que altera la unión FcR y/o complementa la unión, y se fusiona en su terminal C a un apéndice que hace que las unidades monómero se ensamblen en un multímero; y
en donde cada unidad de monómero polipéptido no comprende una región variable del anticuerpo.

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

Dicha pareja de fusión, cuando esté presente, se fusiona a la terminal N de o cada región Fc de cadena pesada. La pareja de fusión puede fusionarse directamente al terminal N de la región Fc de cadena pesada. De manera alternativa, puede fusionarse indirectamente por medio de una secuencia de aminoácido que interviene, que puede incluir una bisagra, cuando esté presente. Por ejemplo, puede proporcionarse una secuencia enlazadora 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 particular, las proteínas de fusión multimérica de la presente invención no comprende uno o más regiones variables del anticuerpo, típicamente las moléculas no comprenden ni una región variable del anticuerpo VH o VL. En un ejemplo, las proteínas de fusión multimérica de la presente invención no comprenden un fragmento Fab.

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

El dominio Fc del anticuerpo de la presente invención puede derivarse 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 de anticuerpo adecuada, que incluye IgA (incluyendo las subclases IgA1 e IgA2), IgD, IgE, IgG (incluyendo las subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), y 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 polipeptídicas, 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 la otra, se apreciará que estas sean usualmente las mismas entre sí. De ahí que el término “la región Fc de cadena pesada” se use a continuación en este documento para referirse a la única región Fc de cadena pesada que se dimeriza con una región Fc de cadena pesada idéntica para crear el dominio Fc del anticuerpo.

Típicamente cada región Fc de cadena pesada comprende o consiste en dos o tres dominios constantes de cadena pesada.

En anticuerpos nativos, la región Fc de cadena pesada de IgA, IgD e IgG está compuesta de dos dominios constantes de cadena pesada (CH2 y CH3) y el de IgE e IgM está compuesto por tres dominios constantes de cadena pesada (CH2, CH3 y CH4). Estos 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 uno o más clases diferentes de anticuerpo, por ejemplo uno, dos o más 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 de fusión multiméricas de la invención se han denominado conjuntamente “multímeros Fc” y los dos términos se usan de manera intercambiable en este documento.

Los presentes inventores han encontrado de manera inesperada que el dominio CH3 juega un rol significativo en el control de la polimerización de las unidades monómero de las proteínas de fusión multiméricas de la presente invención. Se

encontró de manera inesperada que la polimerización varía dependiendo de la subclase IgG desde la cual se derivó la región Fc. Los multímeros Fc que comprenden un dominio CH2 y un dominio CH3 derivados de IgG1 ensamblados de manera muy eficiente en hexámeros, con aproximadamente 80% de las moléculas estando presentes en forma hexamérica. Por el contrario, 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 Fc híbridas en las cuales el dominio CH2 se derivó de una subclase IgG particular y el dominio CH3 se derivó de una subclase IgG diferente, reveló que la habilidad de formar hexámeros se codifica principalmente mediante el dominio CH3. La presencia de un dominio CH3 derivado de IgG1 aumenta significativamente la hexamerización. Los multímeros Fc híbridos en los cuales el dominio CH3 se deriva de IgG1 y el dominio CH2 se deriva de IgG4 se ensambló tan eficientemente como IgG1 del tipo salvaje, con aproximadamente 80% de las moléculas encontrándose como hexámeros. (Ejemplo 4 y Figura 3). Por lo tanto, reemplazar el dominio CH3 de IgG4 con el de IgG1 mejora los niveles de hexamerización comparado con multímeros Fc IgG4 del tipo salvaje. El híbrido resultante tiene la ventaja de altos niveles de formación de hexámero mientras conserva muchas de las propiedades deseables de IgG4.

Adicionalmente, se sabe que el dominio CH3 de IgG1 confiere estabilidad térmica. (Garber y Demarest, Biochem y Biophys Res Comm, Vol 355 p751-757 2007). Por lo tanto, los multímeros Fc híbridos que comprenden un dominio CH3 derivado de IgG1 también tendrán estabilidad mejorada.

Por lo tanto, 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 de fusión multimérica que comprende dos o más unidades de monómero polipéptido;

en donde cada unidad de monómero polipéptido comprende un dominio Fc del anticuerpo que comprende dos regiones Fc de cadena pesada;

en donde cada región Fc de cadena pesada comprende un residuo de cisteína en la posición 309, y se fusiona en su terminal C a un apéndice que hace que las unidades 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 cada unidad de monómero polipéptido no comprende una región variable del anticuerpo.

Estas proteínas de fusión multiméricas pueden incorporar una o más mutaciones adicionales como se describen en este documento a continuación.

En consecuencia, en una forma de realización, la presente invención se proporciona una proteína de fusión multimérica que comprende dos o más unidades de monómero polipéptido;

en donde cada unidad de monómero polipéptido comprende un dominio Fc del anticuerpo que comprende dos regiones Fc de cadena pesada;

en donde cada región Fc de cadena pesada comprende un residuo de cisteína en la posición 309, y al menos una mutación adicional que altera la unión FcR y/o complementa la unión, y se fusiona en su terminal C a un apéndice que hace que las unidades 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 polipéptido no comprende una región variable del anticuerpo.

Los inventores han demostrado que el aminoácido en la posición 355 del dominio CH3 es crítico para la hexamerización. El residuo de arginina que se encuentra normalmente en la posición 355 del dominio IgG1 CH3 promovía hexamerización particularmente eficiente. Ver ejemplo 4 descrito en este documento a continuación.

Por lo tanto, 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 normalmente encontrado en la posición 355 del dominio IgG1 CH3 con un residuo de cisteína (R355C) aumentó la formación de hexámero más allá del IgG1 del tipo salvaje. Ver el Ejemplo 4 descrito en este documento a continuación.

Por lo tanto, 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 la hexamerización significativamente. Por lo tanto, el problema de menor hexamerización de multímeros Fc IgG4 puede resolverse mediante una sola sustitución de aminoácido. Esto tiene la ventaja de que el multímero Fc resultante se ensambla en hexámeros con alta eficiencia mientras conserva las propiedades características de IgG4.

Por lo tanto, 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.

Por lo tanto 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 consecuencia, en una forma de realización, la presente invención proporciona una proteína de fusión multimérica que comprende dos o más unidades de monómero polipéptido;

en donde cada unidad de monómero polipéptido comprende un dominio Fc del anticuerpo que comprende dos regiones Fc de cadena pesada;

en donde cada región Fc de cadena pesada comprende un residuo de cisteína en la posición 309, y se fusiona en su terminal C a un apéndice que hace que las unidades 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 IgG4 en el que el residuo de glutamina en la posición 355 se ha sustituido con un residuo de arginina o un residuo de cisteína y opcionalmente cada unidad de monómero polipéptido no comprende una región variable del anticuerpo.

En una forma de realización, la región Fc de cadena pesada comprende un dominio CH4 de IgM. El dominio CH4 IgM está típicamente ubicado entre el dominio CH3 y el apéndice.

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

Se apreciará que los dominios constantes de cadena pesada, para usar en la producción de una región Fc de cadena pesada de la presente invención, puedan incluir variantes de los dominios constantes, descritos arriba, que ocurren naturalmente. Tales variantes pueden comprender una o más variaciones de aminoácido comparado con los dominios constantes del 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 desde el dominio constante del tipo salvaje. Se apreciará que los dominios constantes variables pueden ser más largos o cortos que el dominio constante del tipo salvaje. Preferiblemente, los dominios constantes variables son al menos 50% idénticos o similares al dominio constante del tipo salvaje. El término “identidad”, como se usa en este documento, indica que en cualquier posición particular en las secuencias alineadas, el residuo de aminoácido es idéntico entre las secuencias. El término “semejanza”, como se usa en este 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 usualmente pueden sustituirse por otros incluyen, mas no están limitados 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 amida); y
- cisteína y metionina (aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen sulfuro).

Los grados de identidad y semejanza pueden calcularse fácilmente (Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New 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., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991). En un ejemplo, los dominios constantes variables son al menos 60% idénticos o similares a un dominio constante del tipo salvaje. En otro ejemplo, los dominios constantes variables son al menos 70% idénticos o similares. En otro ejemplo, los dominios constantes variables son al menos 80% idénticos o similares. En otro ejemplo, los dominios constantes variables son al menos 90% idénticos o similares. En otro ejemplo los dominios constantes variables son al menos 95% idénticos o similares.

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

IgM e IgA ocurren de manera natural en humanos como multímeros covalentes de la unidad anticuerpo H_2L_2 común. IgM ocurre como un pentámero cuando tiene una cadena J incorporada, o como un hexámero cuando carece de una cadena J. IgA ocurre como formas de monómero y dímero. Las cadenas pesadas de IgM e IgA poseen una extensión de 18 aminoácidos al dominio constante del terminal C, conocido como un apéndice. Este apéndice incluye un residuo de cisteína que forma un enlace disulfuro entre cadenas pesadas en el polímero, y se cree que tiene un rol importante en la polimerización. El apéndice también contiene un sitio de glicosilación.

El apéndice de la presente invención puede comprender cualquier secuencia de aminoácido adecuada. Puede ser un apéndice encontrado en un anticuerpo que ocurre de manera natural, o de manera alternativa, puede ser un apéndice modificado que difiere en longitud y/o composición de un apéndice natural. Otros apéndices modificados pueden ser completamente sintéticos y pueden diseñarse para poseer propiedades deseadas para la multimerización, tal como longitud, flexibilidad y composición de cisteína.

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

En una forma de realización, el apéndice comprende la totalidad o parte de una secuencia de apéndice de 18 aminoácidos de IgM o IgA humano como se muestra en la Tabla 1.

El apéndice puede fusionarse directamente con el terminal C de la región Fc de cadena pesada. De manera alternativa, puede fusionarse indirectamente por medio de una secuencia de aminoácido que interviene. Por ejemplo, una secuencia enlazadora corta puede proporcionarse entre el apéndice y la región Fc de cadena pesada.

El apéndice de la presente invención puede incluir variantes o fragmentos de las secuencias nativas descritas anteriormente. Una variante de un apéndice IgM o IgA típicamente tiene una secuencia de aminoácido que es idéntica a la secuencia

nativa en 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, o 17 de las 18 posiciones de aminoácido que se muestran en la Tabla 1. Un fragmento comprende típicamente 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, o 17 aminoácidos. El apéndice puede ser un apéndice IgM/IgA híbrido. También se contemplan los fragmentos de variantes.

Tabla 1 Secuencias de apéndice

<u>Apéndice</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 de manera opcional una región bisagra nativa o modificada en su terminal N.

Una región bisagra nativa es la región bisagra que normalmente se encontraría entre los dominios Fab y Fc en un anticuerpo que ocurre de manera natural. Una región bisagra modificada es cualquier bisagra que difiere en longitud y/o composición de la región bisagra nativa. Tales bisagras pueden incluir regiones bisagra de otras especies tales como regiones bisagra de humano, ratón, rata, conejo, tiburón, cerdo, hámster, camello, llama o cabra. Otras regiones bisagra 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 cual cada unidad en la repetición se deriva de una región bisagra natural. En una alternativa adicional, la región bisagra natural puede alterarse convirtiendo una o más cisteína u otros residuos en

residuos neutrales, tal como serina o alanina, o convirtiendo residuos convenientemente colocados en residuos de cisteína. Mediante tales medios el número de residuos de cisteína en la región bisagra pueden aumentarse o disminuirse. Otras regiones bisagra modificadas pueden ser totalmente sintéticas y pueden estar diseñadas para poseer propiedades deseadas tales como longitud, composición de cisteína y flexibilidad.

Un número de regiones bisagra modificadas ya se han descrito por ejemplo, en in US5677425, WO9915549, WO2005003170, WO2005003169, WO2005003170, WO9825971 y WO2005003171 y estas están incorporadas aquí por referencia.

Los ejemplos de secuencias bisagra 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 terminal N.

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 central del IgG4 humano contiene la secuencia CPSC (SEQ ID NO: 12) comparado con IgG1 que contiene la secuencia CPPC. El residuo de serina presente en la secuencia IgG4 lleva a una flexibilidad aumentada en esta región y, por lo tanto, una proporción de moléculas forma enlaces disulfuro dentro de la misma cadena de proteínas (un disulfuro entre cadena) en lugar de extenderse a la otra cadena pesada en la molécula IgG para formar el disulfuro entre cadena. (Angal S. et al, Mol Immunol, Vol 30(1), p105-108, 1993). Cambiar el residuo de serina a una prolina para dar la misma secuencia central que IgG1 permite la formación completa de disulfuros entre cadena en la región bisagra

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

Tabla 2. Secuencias bisagra

<u>Bisagra</u>	<u>Secuencia</u>
IgA1 Humano	VPSTPPTPSPSTPPTSPS SEQ ID NO: 3
IgA2 Humano	VPPPPP SEQ ID NO: 4
IgD Humano	ESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEE KKKEKEKEEQEERETKTP SEQ ID NO: 5
IgG1 Humano	EPKSCDKTHTCPPCP SEQ ID NO: 6
IgG2 Humano	ERKCCVECPPCP SEQ ID NO: 7
IgG3 Humano	ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTP PPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP SEQ ID NO: 8
IgG4 Humano	ESKYGPPCPSCP SEQ ID NO: 9
IgG4(P) Humano	ESKYGPPCPPCP SEQ ID NO: 10
v1 Recombinante	CPPC SEQ ID NO: 11
v2 Recombinante	CPSC SEQ ID NO: 12
v3 Recombinante	CPRC SEQ ID NO: 13
v4 Recombinante	SPPC SEQ ID NO: 14
v5 Recombinante	CPPS SEQ ID NO: 15
v6 Recombinante	SPPS SEQ ID NO: 16

v7 Recombinante	DKTHTCAA SEQ ID NO: 17
v8 Recombinante	DKTHTCPPCPA SEQ ID NO: 18
v9 Recombinante	DKTHTCPPCPATCPPCPA SEQ ID NO: 19
v10 Recombinante	DKTHTCPPCPATCPPCPATCPPCPA SEQ ID NO: 20
v11 Recombinante	DKTHTCPPCPAGKPTLYNSLVMSDTAGTCY SEQ ID NO: 21
v12 Recombinante	DKTHTCPPCPAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY SEQ ID NO: 22
v13 Recombinante	DKTHTCCVECPPPCPA SEQ ID NO: 23
v14 Recombinante	DKTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPA SEQ ID NO: 24
v15 Recombinante	DKTHTCPSCPA SEQ ID NO: 25

La proteína de fusión multimérica de la invención puede comprender dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce o más unidades de monómero polipéptido. Tales proteínas pueden denominarse de manera alternativa como dímero, trímero, tetramero, pentámero, hexámero, heptámero, octámero, nonámero, decámero, undecámero, dodecámero, etc., respectivamente.

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

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

En un ejemplo, la proteína de fusión multimérica de la presente invención es un hexámero.

Por consiguiente, en un ejemplo, la presente invención proporciona una proteína de fusión multimérica que consiste en seis unidades de monómero polipéptido; en donde cada unidad de monómero polipéptido consiste en un dominio Fc de anticuerpo y una región apéndice; en donde cada dominio Fc de anticuerpo consiste en dos regiones Fc de cadena pesada en las que el residuo de aminoácido en la posición 309 en cada región Fc de cadena pesada es un residuo de cisteína y cada región Fc de cadena pesada comprende al menos una mutación adicional que altera la unión FcR y/o la unión complementaria; y, opcionalmente, cada región Fc de cadena pesada posee una región bisagra en el terminal N; y en donde la región apéndice se fusiona con el terminal C de cada región Fc de cadena pesada y hace que las unidades de monómero se ensamblen en un multímero.

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

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

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

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

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

De forma similar, las unidades de monómero polipéptido dentro de una proteína de fusión multimérica pueden ser iguales la una a la otra, o pueden ser diferentes la una de la otra. En una forma de realización, las unidades de monómero polipéptido son las mismas entre sí.

En una forma de realización, una cadena polipeptídica de una unidad de monómero polipéptido comprende una secuencia de aminoácido como se proporciona en la Figura 2, opcionalmente con una secuencia bisagra o apéndice alternativa.

En consecuencia, en un ejemplo, la presente invención también proporciona una proteína de fusión multimérica que comprende o que consiste de dos o más, preferiblemente seis, unidades de monómero polipéptido; en donde cada unidad de monómero polipéptido comprende dos cadenas polipeptídicas idénticas cada cadena polipeptídica comprende o consiste en la secuencia dada en cualquiera de las SEQ ID No. 26 a 32 y 50 a 64 y en donde la unidad de monómero polipéptido no comprende una región variable del anticuerpo.

En un ejemplo donde la bisagra y el apéndice pueden variarse desde las secuencias dadas en las SEQ ID No. 26 a 32 y 50 a 64 la presente invención proporciona una proteína de fusión multimérica que comprende dos o más unidades de monómero polipéptido;

en donde cada unidad de monómero 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 dada en aminoácidos 6 a 222 de cualquiera de las SEQ ID No. 26 a 29 y 32 o aminoácidos 6 a 222 de cualquiera de las SEQ ID No. 50 a 64 o la secuencia dada en aminoácidos 6 a 333 de la SEQ ID No. 30 o 31 y que se fusiona en su terminal C a un apéndice que hace que las unidades de monómero se ensamblen en un multímero y

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

Típicamente, adicional al apéndice en el terminal C, cada región Fc de cadena pesada comprende además una secuencia bisagra en el terminal N.

Las proteínas de fusión multimérica de la presente invención pueden comprender una o más mutaciones que alteran las propiedades funcionales de las proteínas, por ejemplo, unirse a receptores Fc tales como FcRn o receptores de leucocitos, unirse a complemento, arquitectura de enlace disulfuro modificada o patrones de glicosilación alterados, como se describe en este documento a continuación.

Se apreciará que cualquiera de estas mutaciones puede combinarse de cualquier manera adecuada para alcanzar las propiedades funcionales deseadas, y/o combinadas con otras mutaciones para alterar las propiedades funcionales de las proteínas.

En la presente invención, se han creado los multímeros Fc que son particularmente adecuados para usar en el tratamiento de desórdenes inmunes. Los multímeros Fc se han diseñado para poseer las siguientes propiedades:

La potencia de una proteína de multímero Fc para usar en el tratamiento de desórdenes inmunes debe ser tan alta como sea posible. La potencia puede determinarse midiendo la inhibición de fagocitosis de los macrófagos de células diana recubiertas de anticuerpo 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 midiendo la liberación de citoquinas, la unión C1q y la activación de plaquetas como se describe en los ejemplos 8, 15 y 16 respectivamente.

El multímero Fc IgG1 del tipo salvaje que comprende un dominio CH2 y CH3 derivado de IgG1 sin ninguna mutación adicional puede ser menos adecuado para el uso en el tratamiento de desórdenes inmunes porque, aunque presenta alta potencia de inhibición de fagocitosis, también muestra altos niveles de efectos secundarios no deseados, medidos mediante la liberación de citoquina, la unión C1q y la activación de plaquetas.

El multímero Fc IgG4 del tipo salvaje que comprende un dominio CH2 y CH3 derivado de IgG4, produce muy bajos niveles de efectos secundarios no deseados aunque su potencia es baja con relación a la de IgG1. A pesar de lo anterior, la potencia del multímero Fc IgG4 del tipo salvaje es aun significativamente más alta que aquella de la IVIG, como se muestra en la Figura 7.

En un ejemplo, la presente invención también proporciona proteínas multímero Fc que se han diseñado para combinar las propiedades deseadas tanto de multímeros Fc IgG1 como IgG4 del tipo salvaje, sin las propiedades no deseadas. Estos multímeros Fc presentan niveles efectivos de potencia, mientras que reducen efectos secundarios no deseados a un nivel tolerable como se muestra a continuación en la Tabla 3. Estos multímeros Fc se espera que sean particularmente útiles para el uso en el tratamiento de desórdenes inmunes.

Tabla 3

<u>Multímero Fc</u>	<u>Inhibición de fagocitosis</u>	<u>Liberación IFNγ</u>	<u>Unión C1q</u>	<u>Activación de plaquetas</u>
multímero Fc IgG1 del tipo salvaje	el estándar para "tipo IgG1"	el estándar para "tipo IgG1"	el estándar para "tipo IgG1"	el estándar para "tipo IgG1"
multímero Fc IgG4 del tipo salvaje	el estándar para "tipo IgG4"	el estándar para "tipo IgG4"	el estándar para "tipo IgG4"	el estándar para "tipo IgG4"
IgG1 Fc IgM tp L309 L234F P331S	Alto	medio	Tipo IgG4	Tipo IgG4
Fc IgG4-CH2 IgG1-CH3 IgM tp L309 Híbrido	Medio	Tipo IgG4	Tipo IgG4	Bajo
IgG4 Fc IgM tp L309 F234L	Medio	Tipo IgG4	Tipo IgG4	Medio
IgG4 Fc IgM tp L309 F234L F296Y	Medio	Tipo IgG4	Tipo IgG4	Medio
IgG4 Fc IgM tp L309 G327A S330A	Medio	Tipo IgG4	Tipo IgG4	Tipo IgG4
IgG4 Fc IgM tp L309 G327A S331P	Medio	Tipo IgG4	Medio	Tipo IgG4
IgG4 Fc IgM tp L309 S330A S331P	Medio	Tipo IgG4	Medio	Tipo IgG4

En un ejemplo, la presente invención proporciona proteínas de fusión multiméricas que comprenden una o más mutaciones que disminuyen la liberación de citoquinas y/o disminuyen la activación de plaquetas y/o disminuyen la unión C1q cuando se compara con la proteína de fusión multimérica parental sin modificar. En un ejemplo, la parental sin modificar es una proteína de fusión multimérica de la presente invención que contiene dominios CH2 y CH3 derivados de IgG1.

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

En un ejemplo, la activación de plaquetas se mide mediante citometría de flujo usando CD62p como un marcador de activación.

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

En un ejemplo, la presente invención proporciona proteínas de fusión multiméricas que comprenden una o más mutaciones que aumentan la potencia de la inhibición de fagocitosis de los macrófagos de células diana recubiertas de anticuerpo cuando se compara con la proteína de fusión multimérica parental sin modificar. En un ejemplo, la parental sin modificar es una proteína de fusión multimérica de la presente invención que contiene un dominio CH2 y CH3 derivado de IgG4 o un dominio CH2 de IgG y un dominio CH3 de IgG1.

Ensayos adecuados para medir la inhibición de fagocitosis de los macrófagos de células diana recubiertas de anticuerpo se conocen en el arte y se describen en los ejemplos de este documento.

En consecuencia, en un ejemplo, cada región Fc de cadena pesada de una proteína de fusión multimérica de la presente invención comprende dominios CH2

y CH3 derivados de IgG1 en los cuales 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 cuales 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 de fusión multimérica de la presente invención comprende un dominio CH2 de IgG4 y un dominio CH3 derivado de IgG4 o IgG1 en el cual uno o más residuos de aminoácido 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 de fusión multimérica de la presente invención comprende un dominio CH2 de Ig4 y un dominio CH3 derivado de IgG4 o IgG1 en el que uno o más residuos de aminoácido 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 con otro aminoácido.

En una forma de realización, la región Fc de cadena pesada comprende dominios CH2 y CH3 derivados de IgG4 en los cuales 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 IgG4 en los cuales 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 cuales 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 comprende dominios CH2 y CH3 derivados de IgG4 en los cuales 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 comprende dominios CH2 y CH3 derivados de IgG4 en los cuales 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 los cuales 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 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 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 en 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 de fusión multimérica de la invención puede mostrar la unión alterada a uno o más receptores Fc (FcR's) en comparación con la correspondiente unidad de monómero polipéptido y/o inmunoglobulina nativa. La unión a cualquier

receptor Fc particular puede aumentarse o disminuirse. En una forma de realización, la proteína de fusión multimérica de la invención comprende una o más mutaciones que alteran su perfil de unión del receptor Fc.

El término “mutación” como se usa en este documento puede incluir la sustitución, adición o eliminación de uno o más aminoácidos.

Las células humanas pueden expresar un número de FcR unidos a la membrana seleccionado de Fc α R, Fc ϵ R, Fc γ R, FcRn y receptores de glicano. Algunas células también pueden expresar FcR soluble (ectodominio) (Fridman et al., (1993) J Leukocyte Biology 54: 504-512 para revisión). Fc γ R puede dividirse además por afinidad de unión IgG (alta/baja) y efecto biológico (activación / inhibición). El Fc γ R humano se considera ampliamente como el único receptor de “alta afinidad” mientras que todos los demás se consideran como media a baja. Fc γ RIIb es el único receptor con funcionalidad “inhibitoria” en virtud de su motivo ITIM intracelular mientras que todas las otras se consideran como “activadora” en virtud de los motivos ITAM o la vinculación con la cadena Fc γ R - γ común. Fc γ RIIIb también es único en el sentido en que aunque es activador se asocia con la célula a través de un anclaje GPI. En total, los humanos expresan seis Fc γ R “estándar”: Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb, Fc γ RIIc, Fc γ RIIIa Fc γ RIIIb. Adicional a estas secuencias hay un gran número de variantes de secuencias o alotípicas repartidas a través de estas familias. Se ha encontrado que algunas de estas tienen consecuencia funcional importante y por lo tanto a veces se consideran como subtipos de receptor en sí. Los ejemplos incluyen Fc γ RIIa^{H134R}, Fc γ RIIb^{I190T}, Fc γ RIIIa^{F158V} y Fc γ RIIIb^{NA1}, Fc γ RIIIb^{NA2} Fc γ RIIIb^{SH}. Cada secuencia del receptor ha demostrado tener diferentes afinidades para las 4 subclases de IgG: IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4 (Bruhns Blood (1993) Vol 113, p3716-3725). Otras especies tienen, de alguna manera, diferentes números y funcionalidades de Fc γ R, con el sistema del ratón

siendo el mejor estudiado hasta la fecha y que comprende 4 Fc γ R; Fc γ RI Fc γ RIIb Fc γ RIII Fc γ RIV (Bruhns, Blood (2012) Vol 119, p5640-5649). El Fc γ RI humano en las células se considera normalmente como “ocupado” por IgG monomérico en condiciones de suero normales debido a su afinidad para IgG1 / IgG3 / IgG4 ($\sim 10^{-8}$ M) y la concentración de estos IgG en suero (~ 10 mg/ml). De ahí que, las células que llevan Fc γ RI en su superficie se consideran capaces de “cribado” o “muestreo” de su ambiente antigénico indirectamente a través del IgG poliespecífico unido. Los otros receptores que tienen afinidades menores para subclases IgG (en el rango de ($\sim 10^{-5} - 10^{-7}$ M) normalmente se consideran como “no ocupado”. Los receptores de baja afinidad son, por lo tanto, inherentemente sensibles a la detección de y la activación mediante complejos inmunes involucrados en anticuerpo. La densidad Fc aumentada en un complejo inmune de anticuerpo resulta en afinidad funcional aumentada de “avidez” de unión a Fc γ R de baja afinidad. Esto se ha demostrado in vitro usando un número de métodos (Shields R.L. et al, J Biol Chem, Vol 276(9), p6591-6604, 2001; Lux et al., J Immunol (2013) Vol 190, p4315-4323). También se ha relacionado como uno de los modos de acción primarios en el uso de anti-RhD para tratar ITP en humanos (Crow Transfusion Medicine Reviews (2008) Vol 22, p103-116). Muchos tipos de células expresan múltiples tipos de Fc γ R y, por lo tanto, la unión de IgG o complejo inmune de anticuerpo a células que tienen Fc γ R puede tener múltiples y complejos resultados dependiendo en el contexto biológico. De manera más sencilla, las células pueden recibir una señal activadora, inhibidora o mezclada. Esto puede resultar en eventos tales como fagocitosis (por ejemplo, macrófagos y neutrófilos), procesamiento de antígenos (por ejemplo, células dendríticas), reducción de la producción de IgG (por ejemplo, células B) o degranulación (por ejemplo, neutrófilos, mastocitos). Hay datos que apoyan que la señal inhibitoria de Fc γ RIIb puede dominar aquella 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 efectúan la matanza de células diana tales como células huésped viralmente infectadas o precancerosas. El alto nivel de potencia se ha investigado para uso como proteínas terapéuticas por sí solas o después de la fusión a fracciones diana. IL-2, TNF α , G-CSF, GM-CSF, IFN α , IFN β , IFN γ se han investigado para uso en humanos. Su potencia extrema se evidenció mediante una amplia gama de efectos secundarios o eventos adversos que resultaron en, más bien, usos restringidos en pacientes con condiciones serias o que amenazaban la vida.

La producción de citoquinas in vivo puede obtenerse después de la administración sistemática de proteínas terapéuticas tales como anticuerpos o inmunoglobulinas. La producción de citoquinas 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 inmunoglobulina intravenosa se conoce que da como resultado resultado la producción de TNF α , IL-6, IL-8 y IFN γ (Aukrust P et al, Blood, Vol 84, p2136-2143, 1994) que están asociados con eventos relacionados a la infusión común: fiebre, escalofríos y náuseas. La producción de citoquinas puede ser de más larga duración y relacionada con el modo de acción del medicamento debido a la activación de células efectoras, por ejemplo, como en el llamado “síndrome de lisis tumoral”. Los ejemplos extremos han sido peligrosos para la vida cuando la administración de un medicamento causa una “tormenta de citoquinas” (Suntharalingam G et al, N Engl J Med, Vol 355, p1018-1028, 2006).

Hay una clara necesidad de entender y minimizar el riesgo de liberación de citoquina de proteínas recombinantes diseñadas. Las proteínas recombinantes que

contienen el dominio Fc de anticuerpos, y que pueden volverse funcionalmente multivalente, requieren atención especial.

En el presente estudio de dominios Fc multiméricos, se implementó un ensayo de liberación de citoquina de sangre pura para estudiar los efectos de la mutagénesis con el fin 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 involucradas, junto con los factores de coagulación y otras células en el cese del sangrado mediante la formación de coágulos de sangre. Las plaquetas están involucradas en un número de enfermedades. El bajo conteo de plaquetas “trombocitopenia” puede estar causado por un número de factores y da como resultado el aumento de hematomas y sangrado. La coagulación involuntaria “trombosis” incluye eventos tales como derrame cerebral y trombosis venosa profunda. Las plaquetas primates humanas y no humanas, pero no las plaquetas de ratones, expresan Fc γ RIIa en su superficie. Las plaquetas pueden responder muy rápidamente al daño de los vasos por medio de “densos gránulos” preformados y “gránulos alfa” y la liberación de inmunokines potentes y otras moléculas tales como histamina, serotonina, tromboxano, PAF, PDGF, TGF γ IL1 β y muchos otros (Semple Nature Reviews Immunology 2011 11: 265-274).

Las plaquetas se han involucrado de manera mecanicista en la toxicología de medicamentos administrados a humanos. Se ha encontrado que ciertos anticuerpos son de especial interés porque tanto su antígeno diana como el dominio Fc han podido interactuar con la plaqueta, activándola y causando trombosis (Horsewood 1991 78(4):1019-1026). Los mecanismos directos de doble unión se han propuesto para Mab anti-CD40 (Langer Thrombosis and Haemostasis

2005 93:1127-1146). De manera alternativa, la trombosis puede ser causada de manera indirecta por anticuerpos que se entrecruzan con una molécula diana que puede interactuar con plaquetas tales como en el “síndrome HIT” (trombocitopenia inducida por heparina). La heparina no fraccionada se asoció con la trombosis venosa en aproximadamente 12% de los receptores (Levine Chest 2006 130: 681-687). En otros ejemplos, tales como los Mab dirigidos a VEGF, el mecanismo de acción es probable que involucre la heparina actuando como puente entre VEGF, anticuerpo y plaqueta (Scappaticci 2007 J National Cancer Institute 99:1232-1239; Meyer J. Thrombosis y Haemostasis 2009 7:171-181). La trombosis también puede ser causada por IgG agregado y, por lo tanto, la calidad del producto es de importancia cuando se fabrica IgG y tal vez, de especial importancia, cuando se fabrican dominios Fc multiméricos (Ginsberg J. Experimental Medicine 1978 147:207-218).

La activación de plaquetas es un precursor para, pero no necesariamente un garantía para, la trombosis. La activación de plaquetas puede seguirse in vitro por medio de ensayos de liberación de serotonina o siguiendo los marcadores de activación tales como CD62p, CD63 o PAC-1. La agregación de plaquetas puede observarse directamente in vitro por medio de sangre pura, plasma rico en plaquetas o ensayo de agregación de plaquetas lavadas. Los ratones transgénicos para expresión Fc γ RIIa humano en plaquetas puede usarse también para estudiar trombosis o reducción de la coagulación in vivo. La construcción de proteínas de dominio Fc multiméricas posee un riesgo previsible con respecto a la trombosis, por lo tanto, en la presente invención la ingeniería Fc y los ensayos de activación de plaquetas se han desplegado para entender y asegurar la seguridad de los multímeros Fc.

El FcRn tiene un rol crucial al mantener la larga vida media de IgG en el suero de adultos y niños. El receptor une IgG en vesículas acidificadas ($\text{pH} < 6.5$) que protegen la molécula IgG de la degradación y luego la libera en el pH más alto de 7.4 en sangre.

El FcRn es diferente a los receptores Fc de leucocitos y, en cambio, tiene similitud estructural a las moléculas clase I MCH. Es un heterodímero compuesto de una cadena β_2 -microglobulina, no covalentemente unido a una cadena unida a la membrana que incluye tres dominios extracelulares. Uno de estos dominios, incluyendo una cadena de carbohidrato, junto con β_2 -microglobulina interactúa con un sitio entre los dominios CH2 y CH3 de Fc. La interacción incluye puentes salinos hechos de residuos de histidina en IgG que están cargados positivamente en $\text{pH} < 6.5$. En un pH más alto, los residuos His pierden sus cargas positivas, la interacción FcRn-IgG se debilita y el IgG se disocia.

Una proteína de fusión Fc polimérica para usar como un reemplazo potencial para terapia IVIG se ha descrito en la literatura pero esta proteína no se une al FcRn humano. Por lo tanto, tiene una funcionalidad in vivo reducida. (Mekhaïel et al; Nature Scientific Reports 1:124, publicado el 19 de octubre de 2011).

Mekhaïel et al. describen una proteína de fusión Fc humana polimérica, apéndice hexamérico hIgG1-Fc-LH309/310CL. Esta proteína comprende una doble mutación en la cual la leucina en la posición 309 se sustituye con cisteína, y la histidina en la posición 310 se sustituye con leucina. Porque el H310 es crítico para la unión al FcRn humano, la proteína descrita por Mekhaïel no es capaz de unirse al FcRn humano.

Se creía al momento de la invención, que la mutación H310L era esencial para hacerle espacio al cambio L309C vecino, dado que una histidina en esta posición inhibiría el ensamble polimérico interfiriendo con la formación del enlace disulfuro (Mekhaieel et al; 2011). Sin embargo, en un ejemplo los inventores de la presente han creado de manera sorprendente proteínas de fusión multiméricas que se ensamblan de manera eficiente en multímeros en ausencia de la mutación H310L.

Al crear el residuo de histidina, en la posición 310 y preferiblemente también en la posición 435, la proteína de fusión multimérica de la invención es capaz de unirse a FcRn humano, y está protegida de la degradación, lo que da como resultado una vida media más larga y mayor funcionalidad.

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

En una forma de realización, la proteína de fusión multimérica 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 de 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 manera alternativa, uno o ambos de estos residuos de histidina pueden estar presentes como un resultado de una mutación.

En una forma de realización de la presente invención se proporciona una proteína de fusión multimérica que comprende dos o más unidades de monómero polipéptido;
en donde cada unidad de monómero polipéptido comprende un dominio Fc de anticuerpo que comprende dos regiones Fc de cadena pesada;

en donde cada región Fc de cadena pesada comprende un residuo de cisteína en la posición 309 y un residuo de histidina en la posición 310, y se fusiona en su terminal C a un apéndice que hace que las unidades de monómero se ensamblen en un multímero; y

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

La proteína de fusión multimérica 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 de fusión multimérica comprende una o más mutaciones de modo que se une al FcRn con mayor afinidad y avidez que la correspondiente inmunoglobulina nativa.

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 de un residuo de glutamina en la posición 311 con un residuo de arginina (Q311R).

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 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 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, 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 fenilalanina (M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F).

En una forma de realización, la proteína de fusión multimérica comprende una o más mutaciones de modo que se una al FcRn con menor afinidad y avidez que la inmunoglobulina nativa correspondiente. En una forma de realización, el residuo de histidina en la posición 310 se muta con 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 enumeradas a antes puede combinarse para alterar la unión FcRn.

La proteína de fusión multimérica de la invención puede comprender una o más mutaciones que incrementan su unión a FcγRIIb. El FcγRIIb es el único receptor inhibitorio en humanos y el único receptor Fc encontrado en las células B. Las células B y sus anticuerpos patogénicos se sitúan en el centro de muchas enfermedades inmunes, y por lo tanto, las proteínas de fusión multiméricas 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 enumeradas antes puede combinarse para incrementar la unión FcγRIIb.

En una forma de realización de la invención, proporcionamos proteínas de fusión multimérica que muestran unión disminuida para FcγR.

La unión disminuida a FcγR puede proporcionar terapias mejoradas para usar en el tratamiento de enfermedades inmunes que involucran anticuerpos patogénicos.

En una forma de realización la proteína de fusión multimérica 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 usa en una proteína de fusión multimérica 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 cualquier de las mutaciones enumeradas arriba pueden combinarse para disminuir la unión FcγR.

En una forma de realización de la proteína de fusión multimérica de la presente invención comprende una o más mutaciones que disminuyen su unión al FcγRIIIa sin afectar su unión al FcγRII.

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 enumeradas anteriormente puede combinarse para disminuir la unión FcγRIIIa.

La proteína de fusión multimérica de la invención puede comprender una o más mutaciones que alteran su unión al complemento. La unión al complemento alterada 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 del complemento clásico inicia con la unión de la proteína C1q hexamérica al dominio CH2 de la unión al antígeno IgG e IgM. Las proteínas de fusión multiméricas de la invención no poseen sitios de unión al antígeno, y por eso no se esperará que muestren unión significativa al C1q. Sin embargo, la presencia de una o más mutaciones que disminuyen la unión C1q asegurará que no activen el complemento en ausencia de un compromiso antígeno, proporcionando así terapias mejoradas con mayor seguridad.

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

Se apreciará que cualquiera de las mutaciones enumeradas anteriormente pueden combinarse para reducir la unión a C1q.

La proteína de fusión multimérica de la invención puede comprender una o más mutaciones para crear o eliminar un residuo de cisteína. Los residuos de cisteína

tienen un rol importante en el ensamble espontáneo de la proteína de fusión multimérica, formando puentes disulfuro entre pares individuales de unidades de monómero polipéptido. De forma alternativa, pueden usarse para la modificación química del grupo SH libre. Por lo tanto, al alterar el número y/o la posición de residuos de cisteína, es posible modificar la estructura de la proteína de fusión multimérica para producir una proteína con propiedades terapéuticas mejoradas.

La proteína de fusión multimérica de la presente invención comprende un residuo de cisteína en la posición 309. En una forma de realización, el residuo de cisteína en la posición 309 se crea mediante una mutación, por ejemplo, para un dominio Fc derivado de IgG1, el residuo de leucina en la posición 309 se sustituye con un residuo de cisteína (L309C); para un dominio Fc derivado de IgG2, el residuo de valina en la posición 309 se sustituye con un residuo de cisteína (V309C).

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 proporcionamos proteínas de fusión multimérica con capacidad de fabricación mejorada que comprenden menos enlaces disulfuro y/o sitios de glicosilación. Estas proteínas tienen menos arquitectura de enlace disulfuro compleja y patrones de glicosilación postraduccionales y por lo tanto son más simples y menos costosas de fabricar.

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

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

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

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

En una forma de realización, la proteína de fusión multimérica de la invención se expresa en una célula de modo que una proporción práctica del producto sea hexamérica.

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

En una forma de realización, un sitio de glicosilación en el dominio CH2 se elimina 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 la capacidad de fabricación mejorada, estos mutantes glicosilo también reducen la unión FcγR como se describe en este documento arriba.

En una forma de realización, un sitio de glicosilación en el apéndice se elimina 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, un sitio de glicosilación en el dominio CH2 y un sitio de glicosilación en el apéndice se eliminan mediante la sustitución del residuo de asparagina en la posición 297 con un residuo de alanina o un residuo de glutamina, y sustituyendo el 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 puede combinarse cualquiera de las mutaciones enumeradas arriba.

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

Las secuencias de ADN que codifican una cadena polipéptido de una unidad de monómero polipéptido de la presente invención pueden obtenerse mediante métodos bien conocidos por aquellos versados en la materia. Por ejemplo, las secuencias de ADN que codifican parte o toda la cadena polipéptido de una unidad de monómero polipéptido pueden sintetizarse como se desee a partir de las secuencias ADN determinadas o sobre la base de las secuencias de aminoácido correspondientes.

Las técnicas estándar de biología molecular pueden usarse para preparar secuencias de ADN para una cadena polipéptido de una unidad de monómero polipéptido de la presente invención. Las secuencias ADN deseadas pueden sintetizarse completa o parcialmente usando técnicas de síntesis de

oligonucleótidos. Se puede utilizar como apropiado mutagénesis dirigida al sitio y técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

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 polipéptido de una unidad de monómero polipéptido de la presente invención, o una parte componente de la misma.

Los métodos generales mediante los cuales se pueden construir los vectores, los métodos de transfección y los métodos de cultivo son bien conocidos para aquellos versados en la materia. En este aspecto, se hace referencia a "Protocolos actuales en biología molecular", 1999, F. M. Ausubel (ed), Wiley Interscience, New York and the Maniatis, manual producido por 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 de fusión multimérica de la presente invención. Cualquier sistema de célula huésped/vector adecuado puede usarse para la expresión de secuencias ADN que codifican la proteína de fusión multimérica de la presente invención. Las bacterias, por ejemplo *E. coli*, y otros sistemas microbianos tales como *Saccharomyces* o *Pichia* pueden usarse o también pueden usarse sistemas de expresión de célula huésped eucariotas, por ejemplo de mamífero. Las células huésped mamíferas adecuadas incluyen células CHO. Los tipos de ovario de hámster chino adecuados (células CHO) para usar en la presente invención pueden incluir células CHO y CHO-K1, que incluyen células dhfr- CHO, tales como células CHO-DG44 y células CHO-DXB11, que pueden usarse con un marcador

seleccionable DHFR, o células CHOK1-SV que pueden usarse 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 de fusión multimérica de acuerdo con la presente invención, que comprende cultivar una célula huésped que contiene un vector de la presente invención bajo condiciones adecuadas para la expresión de la proteína de fusión y ensamble de multímeros, y aislar y opcionalmente purificar la proteína de fusión multimérica.

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

Las proteínas de fusión multimérica de la presente invención pueden hacerse usando cualquier método adecuado. En otra forma de realización, la proteína de fusión multimérica de la invención puede producirse bajo condiciones que minimicen la agregación. En un ejemplo, la agregación puede minimizarse mediante la adición de preservativo al medio de cultivo, sobrenadante de cultivo, o medio de purificación. Los ejemplos de preservativos adecuados incluyen agentes tiol tapado tales como tales como N-etilmaleimida, ácido yodoacético, β -mercaptoetanol, β -mercaptoetilamina, glutatión, o cisteína. Otros ejemplos incluyen agentes inhibidores de disulfuro tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido etilenglicol tetraacético (EGTA), o acidificación por debajo de pH 6.0.

En una forma de realización se proporciona un proceso para purificar una proteína de fusión multimérica de la presente invención que comprende los pasos: realizar cromatografía de intercambio de aniones en modo de no unión de modo que las impurezas se retengan en la columna y se eluya el anticuerpo.

En una forma de realización, la purificación emplea captura por afinidad en un FcRn, FcγR o una columna de proteína reactiva a C.

En una forma de realización la purificación emplea proteína A.

Las resinas de intercambio iónico adecuadas para usar en el proceso incluyen resina Q.FF (proporcionada por GE-Healthcare). El paso puede, por ejemplo, realizarse en un pH de aproximadamente 8.

El proceso puede comprender además una etapa de captura inicial que emplea cromatografía de intercambio catiónico, realizada por ejemplo en un pH de aproximadamente 4 o 5, tal como 4.5. La cromatografía de intercambio catiónico puede, por ejemplo emplear una resina tal como resina CaptoS o SP Sepharose FF (suministradas 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 una concentración de 200mM.

Por lo tanto el paso o pasos del cromatógrafo pueden incluir uno o más pasos de lavado, como sea apropiado.

El proceso de purificación también puede comprender uno o más pasos de filtración, tal como un paso de diafiltración.

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

Por lo tanto, en una forma de realización, se proporciona una proteína de fusión multimérica 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 como se usa supra pretende referirse a al menos 90% de pureza, tal como 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% w/w o más puro.

Sustancialmente libre de endotoxina pretende referirse generalmente 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.

Sustancialmente libre de proteína de célula huésped o ADN pretende referirse generalmente a la proteína de célula huésped y/o contenido de ADN de 400µg por mg de producto de anticuerpo o menos tal como 100µg por mg o menos, en particular 20µg per mg, como sea apropiado.

Dado que las proteínas de fusión multimérica 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 diagnóstica que comprende una proteína de fusión multimérica de la presente invención en combinación con uno o más excipientes, diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables. En consecuencia, se proporciona el uso de una proteína de la invención para la fabricación de un medicamento. La composición usualmente se suministrará como parte de una composición estéril farmacéutica 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 diagnóstica que comprende añadir y mezclar la proteína de fusión multimérica de la presente invención junto con uno o más excipientes, diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

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

Las composiciones farmacéuticas comprenden adecuadamente una cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína de fusión multimérica de la invención. El término “cantidad terapéuticamente efectiva” como se usa en este documento se refiere a la cantidad de un agente terapéutico necesario para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad o condición apuntada, o exhibir un efecto terapéutico o preventivo detectable. Para cualquier medicina, la cantidad terapéuticamente efectiva puede estimarse inicialmente tanto en ensayos de cultivo celular como en modelos animales, usualmente en roedores, conejos, perros, cerdos y primates. El modelo animal también puede usarse para determinar el rango de concentración adecuado y la ruta de administración. Tal información puede usarse entonces para determinar dosis y rutas útiles para la administración en humanos.

La cantidad terapéuticamente efectiva precisa para un sujeto humano dependerá de la severidad del estado de la enfermedad, la salud general del sujeto, la edad, el peso y el género del sujeto, la dieta, el tiempo y la frecuencia de administración,

las combinaciones de fármacos, la sensibilidad de reacción y la tolerancia/respuesta a la terapia. Esta cantidad se puede determinar mediante experimentación de rutina y está dentro del juicio del médico. Generalmente, una cantidad terapéuticamente efectiva será de 0.01 mg/kg a 500 mg/kg, por ejemplo 0.1 mg/kg a 200 mg/kg, tal como 100mg/kg. Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse de manera conveniente 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 de fusión multimérica de acuerdo con la presente divulgación no muestran efectos toxicológicos aparentes in vivo.

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

Las composiciones pueden administrarse de manera individual a un paciente o pueden administrarse en combinación (por ejemplo, de manera simultánea, secuencial o separada) con otros agentes, fármacos u hormonas.

En una forma de realización, las proteínas de fusión multiméricas de acuerdo con la presente divulgación se emplean con una terapia de inmunosupresores, tal como un esteroide, en particular prednisona.

En una forma de realización, las proteínas de fusión multimérica, de acuerdo con la presente divulgación, se emplean en combinación con Rituximab u otras terapias de células B.

En una forma de realización, las proteínas de fusión multiméricas de acuerdo con la presente divulgación se emplean con cualquier agente modulador o inmunomodulador de célula T o célula B. Los ejemplos incluyen metotrexato, micofenolato y azatioprina

La dosis en la cual la proteína de fusión multimérica de la presente invención se administra depende de la naturaleza de la condición a tratar, la extensión de la enfermedad presente y en si la proteína de fusión multimérica se usa profilácticamente o para tratar una condición existente.

La frecuencia de la dosis dependerá de la vida media de la proteína de fusión multimérica y la duración de su efecto. Si la proteína de fusión multimérica tiene una vida media corta (por ejemplo, 2 a 10 horas) puede ser necesario dar una o más dosis por día. De manera alternativa, si la proteína de fusión multimérica tiene una vida media larga (por ejemplo, 2 a 15 días) y/o efectos farmacodinámicos de larga duración solo será necesario dar 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 entrega quincenalmente, es decir, dos veces al mes.

La vida media como se emplea en este documento pretende referirse a la duración de la molécula en circulación, por ejemplo en suero/plasma.

La farmacodinámica como se usa en este documento se refiere al perfil, y en particular la duración de la acción biológica de la proteína de fusión multimérica de acuerdo con la presente divulgación.

El vehículo farmacéuticamente aceptable no debe inducir por sí mismo a la producción de anticuerpos dañinos para el individuo que recibe la composición y no debe ser tóxico. Los vehículos adecuados pueden ser macromoléculas metabolizadas lentamente, grandes tales como proteínas, polipéptidos, liposomas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglóticos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas de virus inactivas.

Se pueden usar las sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo sales de ácido mineral, tales como clorhidrato, bromhidrato, fosfatos y sulfatos, o sales de ácidos orgánicos, tales como acetatos, propionatos, malonatos y benzoatos.

Vehículos farmacéuticamente aceptables en composiciones terapéuticas pueden contener adicionalmente líquidos tales como agua, salina, glicerol y etanol. Adicionalmente, sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsificantes o sustancias tampón de pH, pueden estar presentes en tales composiciones. Tales vehículos permiten que las composiciones farmacéuticas se formulen como tabletas, pastillas, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones para ingestión por parte del paciente.

Las formas adecuadas para la administración incluyen formas adecuadas para administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección o infusión, por ejemplo mediante inyección en bolo o infusión continua. Donde el producto es para inyección o infusión, puede tomar la forma de una suspensión, solución o emulsión en un vehículo aceitoso o acuoso y puede contener agentes formulatorios, tales como agentes de suspensión, preservativos, estabilizadores y/o dispersantes. La proteína puede estar en la forma de nano partículas.

De forma alternativa, la molécula de anticuerpo puede estar en forma seca, para la reconstrucción antes de usar con un líquido estéril apropiado.

Una vez formulado, las composiciones de la invención pueden administrarse directamente al sujeto. Los sujetos a ser tratados pueden ser animales. Sin embargo, en una o más formas de realización las composiciones se adaptan para administración a sujetos humanos.

Adecuadamente en formulaciones de acuerdo con la presente divulgación, el pH de la formulación final no es similar al valor del punto isoeléctrico de la proteína de fusión multimérica, por ejemplo, si el pI de la proteína está en el rango 8-9 o por encima, entonces una formulación pH de 7 puede ser apropiada. Aunque no se desea estar unido por la teoría se piensa que esto puede proporcionar, en última instancia, una formulación final con estabilidad mejorada, por ejemplo la proteína de fusión multimérica permanece en solución.

En un ejemplo, la formulación farmacéutica en un pH en el rango de 4.0 a 7.0 comprende: 1 a 200mg/mL de una molécula de proteína de acuerdo con la presente divulgación, 1 a 100 mM de un tampón, 0.001 a 1% de un surfactante, a) 10 a 500mM de un estabilizador, b) 10 a 500mM 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, mas no limitado a, rutas orales, intravenosas, intramusculares, intraarteriales, intramedulares, intratecales, intraventricular, transdermal, trasncutáneas (por ejemplo, ver WO98/20734), subcutáneas, intraperitoneales, intranasales, enterales, tópicas, sublinguales, intravaginales o rectales. Los hiposprays también pueden usarse para administrar las composiciones farmacéuticas de la invención. Típicamente, las composiciones terapéuticas pueden prepararse como inyectables, bien como soluciones líquidas o

suspensiones. También pueden prepararse las formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección.

La entrega directa de las composiciones se logrará generalmente mediante la inyección, de manera subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular, o entregada al espacio intersticial de un tejido. Las composiciones pueden también administrarse en una lesión. El tratamiento de dosificación puede ser un programa de una sola dosis o un programa de múltiples dosis.

Se apreciará que el ingrediente activo en la composición será una molécula de proteína. Así, será susceptible a la degradación en el tracto gastrointestinal. Por lo tanto, si la composición debe administrarse mediante una ruta que usa el tracto gastrointestinal, la composición necesitará contener agentes que protejan la proteína de la degradación pero que liberen la proteína una vez se ha absorbido del tracto gastrointestinal.

Una discusión a fondo de 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 que incluyen inhalación.

Las preparaciones inhalables adecuadas incluyen polvos inhalables, aerosoles dosificadores que contienen gases propulsores o soluciones inhalables libres de gases propulsores. Los polvos inhalables de acuerdo con la divulgación que contienen la sustancia activa pueden consistir solamente de las sustancias activas antes mencionadas o de una mezcla de las sustancias activas antes mencionadas con 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. Los mono o disacáridos son usados adecuadamente, el uso de lactosa o glucosa, particularmente mas no exclusivamente, en la forma de sus hidratos.

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

Los gases propulsores que pueden ser usados para preparar los aerosoles inhalables se conocen en el arte. Los gases propulsores adecuados se seleccionan de entre hidrocarburos tales como n-propano, n-butano o isobutano e hidrocarburos tales como derivados clorados y / o fluorados de metano, etano, propano, butano, ciclopropano o ciclobutano. Los gases propulsores antes mencionados pueden usarse por si solos o en mezclas de los mismos.

Los gases propulsores particularmente adecuados son derivados de alcano halogenado seleccionados de entre TG 11, TG 12, TG 134a y TG227. De los hidrocarburos halogenados antes mencionados, el TG134a (1,1,1,2-tetrafluoroethane) y TG227 (1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano) y mezclas de los mismos son particularmente adecuados.

Los aerosoles inhalables que contienen gas propulsor pueden contener también otros ingredientes tales como codisolventes, estabilizadores, agentes de superficie

(surfactantes), antioxidantes, lubricantes y medios para ajustar el pH. Todos estos ingredientes se conocen en el arte.

Los aerosoles inhalables que contienen gas propulsores de acuerdo con la invención pueden contener hasta 5% en peso de la sustancia activa. Los aerosoles de acuerdo con la invención contienen, por ejemplo, 0.002 a 5 % en peso, 0.01 to 3 % en peso, 0.015 to 2 % en peso, 0.1 to 2 % en peso, 0.5 to 2 % en peso o 0.5 to 1 % en peso del ingrediente activo.

De manera alternativa la administración tópica al pulmón también puede ser mediante la administración de una solución líquida o formulación de suspensión, por ejemplo, empleando 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 de fusión multimérica de la invención puede entregarse dispersada en un solvente, por ejemplo, en la forma de una solución o una suspensión. Puede estar suspendida en una solución fisiológica apropiada, por ejemplo salina u otro solvente farmacológicamente aceptable o una solución tamponada. Las soluciones tamponadas conocidas en el arte pueden contener 0.05 mg a 0.15 mg edetato disódico, 8.0 mg a 9.0 mg NaCl, 0.15 mg a 0.25 mg polisorbato, 0.25 mg a 0.30 mg ácido cítrico anhidro, y 0.45 mg a 0.55 mg citrato de sodio por 1 ml de agua de modo que alcance un pH de aproximadamente 4.0 a 5.0. Una suspensión puede emplear, por ejemplo, proteína liofilizada.

Las suspensiones terapéuticas o formulaciones de solución pueden contener también uno o más excipientes. Los excipientes son bien conocidos en el arte e

incluyen tampones (por ejemplo, tampón citrato, tampón fosfato, tampón de acetato y tampón de bicarbonato), aminoácidos, urea, alcoholes, ácido ascórbico, fosfolípidos, proteínas (por ejemplo, albúmina de suero), EDTA, cloruro de sodio, liposomas, manitol, sorbitol y glicerol. Las soluciones o suspensiones pueden encapsularse 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 esterilización mediante filtración del solvente/solución tamponado usado para la formulación, suspensión aséptica de la proteína en la solución solvente tamponada estéril, y dispensar la formulación en receptáculos estériles mediante métodos familiares para aquellos medianamente versados en el arte.

La formulación nebulizable de acuerdo con la presente divulgación puede ser proporcionada, por ejemplo, como unidades de dosis únicas (por ejemplo, contenedores o viales plásticos sellados) empacados en sobres de papel de aluminio. Cada vial contiene una dosis unitaria en un volumen de por ejemplo, 2 mL, de solvente/solución tampón.

Las proteínas de fusión multiméricas reveladas en este documento pueden ser adecuadas para la entrega a través de nebulización.

También se prevé que las proteínas de la presente invención pueden administrarse mediante el uso de terapia genética. Con el fin de lograr esto, las secuencias de ADN que codifican las cadenas polipéptido de la molécula de proteína bajo el control de componentes de ADN apropiados se introducen en un paciente de modo

que las cadenas polipéptido se expresan desde las secuencias de ADN y se ensamblan in situ.

En una forma de realización, proporcionamos la proteína de fusión multimérica de la invención para usar en terapia.

En una forma de realización, proporcionamos la proteína de fusión multimérica de la invención para usar en el tratamiento de desórdenes inmunes.

En una forma de realización proporcionamos el uso de la proteína de fusión multimérica de la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de desórdenes inmunes.

Los ejemplos de desórdenes inmunes que pueden tratarse usando la proteína de fusión multimérica de la invención incluye trombocitopenia inmune (ITP), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP), enfermedad Kawasaki y síndrome de Guillain-Barre (GBS).

La presente invención también proporciona una proteína de fusión multimérica (o composiciones que comprenden la misma) para usar en el control de enfermedades autoinmunes, por ejemplo encefalomiелitis aguda diseminada (ADEM), leucoencefalitis aguda hemorrágica necrotizante, enfermedad de Addison, agamaglobulinemia, alopecia areata, amiloidosis, vasculitis asociada a ANCA, espondilitis anquilosante, nefritis anti-MBG / anti-TBM, síndrome antifosfolípido (APS), angioedema autoinmune, anemia aplásica autoinmune, disautonomía autoinmune, hepatitis autoinmune, hiperlipidemia autoinmune, inmunodeficiencia autoinmune, enfermedad del oído interno autoinmune (AIED), miocarditis autoinmune, pancreatitis autoinmune, retinopatía autoinmune, púrpura

trombocitopénica autoinmune (ATP), enfermedad de la tiroides autoinmune, urticariana autoinmune, neuripatías axonal & nales, enfermedad de Balo, enfermedad de Behcet, penfigoide ampolloso, cardiomiopatía, enfermedad de Castleman, enfermedad de Celiac, enfermedad de Changas, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP), osteomielitis crónica multifocal recurrente (CRMO), síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial / penfigoide benigno de las mucosas, enfermedad de Crohn, síndrome de Cogans, enfermedad por crioaglutininas, bloqueo cardíaco congénito, miocarditis Coxsackie, enfermedad de CREST, crioglobulinemia mixta esencial, neuropatías desmielinizantes, dermatitis herpetiforme, dermatomiositis, enfermedad de Devic (neuromielitis óptica), miocardopatía dilatada, lupus discoide, síndrome de Dressler, endometriosis, fibrosis angiocéntrica eosinofílica, fascitis eosinofílica, eritema nudoso, encefalomielitis alérgica experimental, síndrome de Evans, alveolitis fibrosante, arteritis de células gigantes (arteritis temporal), glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, Granulomatosis de Wegener (GPA) ver, enfermedad de Grave, síndrome de Guillain-Barre, encefalitis de Hashimoto, tiroiditis de Hashimoto, anemia hemolítica, púrpura de Henoch-Schönlein, herpes gestacional, hipogammaglobulinemia, nefritis tubulointersticial hipocomplementémica idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), nefropatía IgA, enfermedad relacionada a IgG4, enfermedad esclerosante relacionada con IgG4, lipoproteínas inmunorreguladores, aneurisma aórtico inflamatorio, pseudotumor inflamatorio, miositis por cuerpos de inclusión, diabetes dependiente de insulina (tipo 1), cistitis intersticial, artritis juvenil, diabetes juvenil, síndrome Kawasaki, tumor Kuttner, síndrome Lambert-Eaton, vasculitis leucocitoclástica, liquen plano, liquen escleroso, conjuntivitis leñosa, enfermedad IgA lineal (LAD), Lupus (SLE), enfermedad de Lyme, fibrosis mediastínica crónica, enfermedad de Meniere, poliangeitis microscópica, síndrome de Mikulicz, enfermedad mixta del tejido conectivo (MCTD), úlcera de Mooren, enfermedad de Mucha-Habermann,

fibroesclerosis multifocal, esclerosis múltiple, miastenia gravis, miositis, narcolepsia, neuromielitis óptica (Devic), neutropenia, penfigoide cicatricial ocular, neuritis óptica, enfermedad de Ormond (fibrosis retroperitoneal), reumatismo palindrómico, PANDAS (enfermedades neuropsiquiátricas autoinmunes pediátricas asociadas con estreptococos), degeneración cerebelosa paraneoplásica, polineuropatías paraproteinémicas, hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH), síndrome de Parry Romberg, síndrome de Parsonnage-Turner, pars planitis (uveítis periférica), pénfigo vulgar, periaortitis, periarteritis, neuropatía periférica, encefalomielitis perivenosa, anemia perniciosa, síndrome de POEMS, poliarteritis nodosa, síndromes autoinmunes poliglandulares del tipo I, II, y III, polimialgia reumática, polimiositis, síndrome de post infarto de miocardio, síndrome de postpericardiotomía, dermatitis de progesterona, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, psoriasis, artritis psoriática, fibrosis pulmonar idiopática, pioderma gangrenoso, aplasia pura de células rojas, fenómeno de Raynauds, 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 bacteriana subaguda (SBE), síndrome de Susac, oftalmía simpática, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de célula gigante, trombótico, púrpura trombocitopénica (TTP), síndrome de Tolosa-Hunt, mielitis transversa, colitis ulcerosa, enfermedad indiferenciada del tejido conectivo (UCTD), uveítis, vasculitis, dermatitis vesiculobullosa, vitíligo, Macroglobulinemia de Waldenstrom, anemia hemolítica idiopática tibia y granulomatosis de Wegener (ahora denominado Granulomatosis con poliangitis (GPA)).

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

En una forma de realización, las proteínas de fusión multimérica y fragmentos de acuerdo con la divulgación se emplean en el tratamiento o profilaxis de la esclerosis múltiple

En una forma de realización las proteínas de fusión multiméricas y los fragmentos de la divulgación se usan en el tratamiento o profilaxis de enfermedad aloinmune/indicaciones que incluyen:

- Desajuste de trasplante de donantes debido a anticuerpos anti HLA.
- Trombocitopenia aloinmune fetal y neonatal, FNAIT (o trombocitopenia aloinmune neonatal, NAITP or NAIT o NAT, o trombocitopenia aloinmune fetomaternal, FMAITP o FMAIT).

Indicaciones adicionales incluyen: aclaramiento rápido de fármacos biofarmacéuticos que contienen Fc de pacientes humanos y combinación de terapia de proteína de fusión multimérica con otras terapias – IVIg, Rituxan, plasmaféresis. Por ejemplo, la terapia de proteína de fusión multimérica puede emplearse siguiendo terapia de Rituxan.

En una forma de realización, las proteínas de fusión multiméricas de la divulgación se emplean en el tratamiento o profilaxis de un desorden neurológico tal como:

- Polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP)
- Síndrome de Guillain-Barre
- Polineuropatía paraproteinémica

- Neuromielitis óptica (NMO, desórdenes del espectro NMO o enfermedades del espectro NMO), y
- miastenia gravis.

En una forma de realización las proteínas de fusión multiméricas de la divulgación se emplean en un desorden dermatológico tal como:

- Penfigoide ampolloso
- Pénfigo vulgar
- Vasculitis asociada a ANCA
- Miocardiopatía dilatada

En una forma de realización las proteínas de fusión multimérica de la divulgación se emplean en un desorden inmunológico o hematológico tal como:

- Púrpura trombocitopénica idiopática (ITP)
- Púrpura trombocitopénica trombótica (TTP)
- Anemia hemolítica idiopática tibia
- Síndrome de Goodpasture
- Desajuste de trasplante de donantes debido a anticuerpos anti HLA.

En una forma de realización el desorden se selecciona de miastenia gravis, neuromielitis óptica, CIDP, síndrome de Guillaume-Barre, paraproteinemic polineuropatía, epilepsia refractaria, ITP/TTP, anemia hemolítica, síndrome de Goodpasture, desajuste ABO, nefritis lúpica, vasculitis renal, esclerodermia, alveolitis fibrosante, miocardiopatía dilatada, enfermedad de Grave, diabetes tipo 1, diabetes autoinmune, pénfigo, esclerodermia, lupus, vasculitis ANCA, dermatomiositis, enfermedad de Sjogren y artritis reumatoide.

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

La proteína de fusión multimérica de acuerdo con la presente divulgación puede emplearse en el tratamiento o la profilaxis.

La presente invención también proporciona un método para reducir la concentración de anticuerpos indeseados en un individuo que comprende los pasos de administrar a un individuo una dosis terapéuticamente efectiva de una proteína de fusión multimérica descrita en el presente documento.

La proteína de fusión multimérica de la presente invención puede usarse también en el diagnóstico, por ejemplo en el diagnóstico in vivo y la formación de imágenes de estados de la enfermedad que involucran receptores Fc, tales como linfomas relacionados a la célula B.

LEYENDAS DE LAS FIGURAS

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

Figura 2 Secuencias de ejemplo

2 (a) Ejemplo de secuencias de aminoácido de una cadena polipéptido de una unidad de monómero polipéptido. En cada secuencia, la secuencia apéndice está subrayada, y cualquier mutación se muestra en negrilla y subrayada. La bisagra está en negrilla. En construcciones que comprenden un dominio CH4 de IgM, esta región se muestra en *itálicas*.

2 (b) Ejemplo de secuencias de aminoácido para una cadena polipéptido de multímero Fc que comprende un dominio CH2 y CH3 derivados 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 aminoácido para multímeros Fc designados 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 para multímeros Fc con regiones Fc de cadena pesada híbrida diseñado por intercambio de dominio.

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

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

2 (g) Ejemplo de secuencias de aminoácido para multímeros Fc ejemplificada en las figuras 2b a 2e, que comprenden un residuo de cisteína en la posición 309.

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

3 (a) Rastros de cromatografía de exclusión por tamaños que muestran el efecto del intercambio de dominio IgG1/IgG4 CH3 en la hexamerización de multímeros Fc.

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

3 (c) Altos niveles de hexamerización de IgG4 Fc IgM tp se alcanzan mediante mutación puntuales Q355R.

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

Figura 4 Unión de multímeros Fc a FcRn, medida mediante análisis de resonancia de plasmones superficiales. Los rastros demuestran unión para rango de concentración de multímero: 2.5µM, 1.25µM, 0.625µM, 0.3125µM, 0.15625µM, 0.078125µM, 0.0390625µM. Los multímeros Fc muestran toda la histidina comprendida en la posición 310.

4 (a) Multímero Fc hIgG1 IgM tp L309C unido a FcRn de baja densidad.

4 (b) Multímero Fc hIgG1 IgM tp unido a FcRn de baja densidad.

4 (c) Multímero Fc hIgG1 IgM tp L309C unido a FcRn de alta intensidad.

4 (d) Multímero Fc hIgG1 IgM tp unido a FcRn de alta intensidad.

Figura 5 La inhibición del multímero Fc de fagocitosis de los macrófagos. Los datos muestran que los multímeros Fc derivados de IgG1 humano o IgG4, polimerizados en formas de hexámeros o dodecámeros por apéndice IgM solamente, o apéndice IgM y L309C, exhiben todos potencia y niveles máximos de inhibición significativamente mejores que la IVIG humana.

Figura 6 La inhibición del multímero Fc de la fagocitosis de los macrófagos. Los datos muestran los efectos inhibidores de multímeros Fc que comprenden una sola mutación de cruce en una posición seleccionada de diferencia entre la región Fc IgG1 e IgG4.

Figura 7 La inhibición del multímero Fc de la fagocitosis de los macrófagos. Los datos muestran los efectos inhibidores de multímeros Fc diseñados para usar en el tratamiento de desórdenes inmunes.

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

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

Figura 10 Estimulación de liberación de citoquinas por multímeros Fc. Los datos presentan los efectos de multímeros Fc diseñados con mutaciones para modular liberación de citoquinas.

Figura 11 Inhibición de reciclaje IgG mediado por FcRn 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 para cinco experimentos independientes usando ratones Balb/c.

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

(a) dosis única de 10 mg/kg de multímero Fc administrado en el día 3.

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

El tamaño del grupo para cada punto en el gráfico era n=6.

Figura 14 Unión de multímeros Fc a C1q.

Figura 15 Activación de plaquetas mediante multímeros Fc.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Biología molecular

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

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

Los diagramas que muestran secuencias de aminoácido de ejemplo de una cadena polipéptido de una unidad de monómero polipéptido se proporcionan en la Figura 2(a) – (e). En cada secuencia, la secuencia de apéndice está subrayada, y cualquier mutación se muestra en negrilla y subrayada. En construcciones que comprenden un dominio CH4 de IgM, esta región se muestra en *itálicas*.

Mutaciones cruzadas IgG1 / IgG4

Se construyeron varias variaciones de multímeros Fc en las que ciertos residuos clave de aminoácidos en el dominio Fc se diseñaron para coincidir con aquellos encontrados en IgG1, mientras que otros residuos de aminoácidos clave se diseñaron para coincidir con aquellos encontrados en IgG4. IgG1 e IgG4 difieren entre sí en siete posiciones en el dominio CH2 y seis posiciones en el dominio CH3 como se resume en la tabla 4.

Tabla 4

<u>Número de posición</u>	<u>Residuo de aminoácido IgG1</u>	<u>Residuo de aminoácido 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

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

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

Se apreciará que una secuencia particular de interés puede crearse usando tanto la secuencia de dominio Fc IgG1 o la IgG4 como un punto de partida y hacer las mutaciones relevantes. Por ejemplo, un dominio IgG4 CH2 con mutación F234L es el mismo que un dominio IgG1 CH2 con mutaciones H268Q, K274Q, Y296F, A327G, A330S, y P331S.

Intercambio de dominio de región Fc

Las variantes de multímeros Fc también se construyeron comprendiendo regiones Fc de cadena pesada híbridas en las que el dominio CH2 se derivó de una subclase IgG particular y el dominio CH3 se derivó de una subclase IgG diferente. Los diagramas que muestran secuencias de aminoácido de ejemplo para multímeros Fc con regiones Fc de cadena pesada híbridas se proporcionan en la Figura 2(d).

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

Ejemplo 2: Expresión

La expresión a pequeña escala se realizó usando expresión “transitoria” de HEK293 o células CHO transfectadas utilizando lipofectamina o electroporación. Los cultivos se hicieron crecer en frascos de agitación o bolsas agitadas en medios CD-CHO (Lonza) o ProCHO5 (Life Technologies) desde escalas de 50 – 2000ml para 5-10 días. Las células se removieron mediante centrifugación y los sobrenadantes de cultivo se almacenaron a 4°C hasta que se purificaron. Los preservativos se añadieron a algunos cultivos después de la remoción de células.

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

Se encontró que el péptido señal, usado para expresar las proteínas de fusión multimérica, tenía un impacto en el nivel de expresión alcanzado. Un péptido señal del anticuerpo B72.3 dio como resultado niveles de expresión más altos que una secuencia de péptido señal IL-2 descrito en la anterioridad.

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

Ejemplo 3: Purificación y análisis

Los multímeros Fc se purificaron a partir de sobrenadantes de cultivo después de verificar / ajustar el pH a ≥ 6.5 , mediante cromatografía de proteína A con etapa de elución usando un tampón pH3.4. El eluido se neutralizó inmediatamente a $\sim$ pH7.0 usando 1M Tris pH8.5 antes de almacenar a 4°C. La cromatografía de exclusión por tamaño analítica se usó para separar varias formas multiméricas de dominios Fc usando columnas S200 y recolección de fracciones. Las fracciones se analizaron y agruparon después del análisis G3000 HPLC y de reducción y no reducción de SDS-PAGE. La endotoxina se ensayó usando el ensayo de lisado de amebocitos del Limulus (LAL) y las muestras usadas en ensayos fueron $<1\text{EU/mg}$.

Se encontró que las proteínas de fusión multiméricas estaban expresadas y purificadas predominantemente en forma hexamérica, con alguna proteína en formas dodecaméricas y otras.

La purificación de las proteínas de fusión multiméricas en la presencia de un preservativo redujo la tendencia a agregar, produciendo preparaciones mejoradas

con más estructura uniforme. Los ejemplos de preservativos mostraron ser efectivos incluyendo agentes de terminación de tiol tales como N-etilmaleimida (NEM) y glutatión (GSH); y agentes inhibidores de disulfuro tales como ácido etilenodiaminotetracético (EDTA).

Ejemplo 4 Rol del dominio CH3 en ensamble multímero Fc

Se encontró de manera inesperada que el grado de multimerización varía dependiendo de la subclase IgG de la cual se derivó la región Fc. Los multímeros Fc que comprenden un dominio CH2 y un dominio CH3 derivado de IgG1 se ensamblaban muy eficientemente en hexámeros, con aproximadamente 80% de las moléculas estando presentes en forma hexamérica. Por el contrario, los multímeros Fc que comprenden un dominio CH2 y un dominio CH3 derivado de IgG4 formaban niveles más bajos de hexámeros.

La investigación de multímeros Fc que comprenden regiones Fc en las que el dominio CH2 se derivó de una subclase IgG particular y el dominio CH3 se derivó de una subclase IgG diferente reveló que la habilidad de formar hexámeros se codifica principalmente por el dominio CH3. La presencia de un dominio CH3 derivado de IgG1 aumenta la hexamerización de manera significativa. Los multímeros Fc híbridos en los cuales el dominio CH3 se deriva de IgG1 y el dominio CH2 se deriva de IgG4 se hexameriza tan eficientemente como el IgG1 del tipo salvaje, con aproximadamente 80% de las moléculas encontrándose como hexámeros. Por lo tanto, reemplazar el dominio CH3 de IgG4 con el de IgG1 mejora los niveles de hexamerización comparado con los multímeros Fc IgG4 del tipo salvaje. El híbrido resultante tiene la ventaja de altos niveles de formación de hexámero mientras que retiene muchas de las propiedades deseables de IgG4. Figura 3 (a).

Los dominios CH3 de IgG1 e IgG4 difieren en seis posiciones como se describe en el ejemplo 1. Empezando con un multímero Fc que comprende un dominio CH2 y CH3 derivado de IgG1, cada una de estas posiciones se mutó a su vez, del residuo IgG1 al residuo IgG4. Los resultados demostraron que el aminoácido en la posición 355 es crítico para la hexamerización. El aminoácido encontrado en la posición 355 en el tipo salvaje IgG1, arginina, promueve la hexamerización eficiente. El encontrado en el tipo salvaje IgG4, glutamina, dio como resultado hexamerización más baja. Las otras posiciones de diferencia entre los dominios CH3 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) dio como resultado altos niveles de hexamerización. Por lo tanto, el problema de la baja hexamerización de multímeros Fc IgG4 puede resolverse mediante una sola sustitución de aminoácido. Esto tiene la ventaja de que el multímero Fc resultante se ensambla en hexámeros con alta eficiencia mientras que retiene las propiedades características de IgG4. Figura 3(c).

En multímeros Fc IgG1, la sustitución de arginina en la posición 355 con cisteína (R355C) aumentó la formación de hexámeros más allá de los del tipo salvaje IgG1. Aunque no queremos estar ligados por la teoría, este resultado sugiere que un residuo de cisteína en la posición 355 puede ser capaz de formar enlaces disulfuro con la cisteína en el apéndice. La mutagénesis de R355 a todos los otros aminoácidos no resultó en una mejora adicional de la formación de hexámeros en multímeros Fc IgG1. Figura 3 (d).

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

Las medidas de afinidad / avidez para las interacciones de proteínas de fusión multiméricas y receptores Fc (FcR) que incluyen FcγR y FcRn pueden realizarse usando métodos bien conocidos, que incluyen resonancia de plasmones superficiales, ELISA de competición y estudios de unión de competición en líneas celulares que tienen FcR.

Los dominios extracelulares, solubles (ECD) de los FcR se usaron en experimentos de resonancia de plasmones superficiales por inmovilización no específica o captura específica de etiqueta en un chip sensor BIAcore en un Biacore T200. El dominio extracelular FcRn humano se proporcionó como un complejo no covalente entre el dominio extracelular de cadena alfa FcRn humano y microglobulina β2. Las proteínas de fusión multimérica se valoraron 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 se analizaron usando el software de evaluación Biacore T200.

La Figura 4 muestra datos para unir proteínas de fusión multimérica a FcRn, medidos mediante análisis de resonancia de plasmones superficiales. Los rastros demuestran la unión para rango de concentración de multímero: 2.5μM, 1.25μM, 0.625μM, 0.3125μM, 0.15625μM, 0.078125μM, 0.0390625μM. Los multímeros Fc muestran toda la histidina que comprenden en la posición 310.

(a) multímero Fc IgG1 humano IgM tp L309C que se une a FcRn de baja intensidad.

(b) multímero Fc IgG1 humano IgM tp que se une a FcRn de baja intensidad.

(c) multímero Fc IgG1 humano IgM tp L309C que se une a FcRn de alta intensidad.

(d) multímero Fc IgG1 humano IgM tp que se une a FcRn de alta intensidad.

Las construcciones usadas en (a) y (c) contienen una sustitución de leucina a 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 generaron un número de multímeros Fc que incorporaron mutaciones pensadas para aumentar la unión a FcRn humano.

La Tabla 5 muestra las constantes de disociación para la unión de fragmentos Fc IgG1 humanos monoméricos mutados a FcRn humano en pH6.0. Las mutaciones resultaron en unión aumentada a FcRn humano. Sin embargo, la fuerza de la interacción de los fragmentos monoméricos es aún débil, con constantes de disociación en el rango micromolar. La multimerización de los dominios Fc mutados, como se describe en la presente invención, puede conferir un beneficio de avidéz, que mejora así la fuerza de la interacción.

Tabla 5. Unión de fragmentos Fc IgG1 monoméricos mutados a FcRn humano en pH6.0

Mutación de la muestra	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 los macrófagos de dianas de células B

Se diseñó un ensayo para medir la fagocitosis dependiente de anticuerpo de las células B por macrófagos humanos. Para preparar los macrófagos, primero se aislaron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) de la sangre fresca mediante centrifugación gradiente de densidad. Luego se seleccionaron los monocitos mediante la incubación de las PBMC por 1 hora a 37°C en placas recubiertas de 6 pocillos de cultivo de tejidos, seguido de la remoción de células no adherentes. Los monocitos adherentes se diferenciaron en macrófagos por cultivo de 5 días en factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF). Luego, las células B humanas se prepararon a partir de un donante separado (allogénico) por aislamiento de PBMC seguido de purificación de células B por selección negativa usando MACS (kit de aislamiento de célula B II, Miltenyi Biotec). En algunos ensayos, las células B fueron etiquetadas con carboxifluoresceína succinimidil ester (CFSE) (Molecular Probes). Los macrófagos diferenciados y las células B se co-cultivaron en una proporción 1:5 en presencia de anti-CD20 mAb (rituximab) para inducir fagocitosis dependiente de anticuerpo de las células B. Las proteínas de fusión multimérica o controles se añadieron en las concentraciones indicadas y las células se incubaron a 37°C 5% CO₂ por 1 - 24hrs. Al final de cada punto de tiempo, las células se centrifugaron y resuspendieron en tampón FACS a 4°C para detener fagocitosis adicional y se manchó la superficie de las células B con alofococianina anti-CD19 (APC) antes del análisis mediante citometría de flujo. Los macrófagos se distinguieron por su auto fluorescencia / propiedades de dispersión lateral y las células B por su CFSE / etiquetado CD19. Se asumió que los macrófagos positivo CFSE negativos para etiquetado CD19 contenían células B envueltas.

Los resultados demostraron que las proteínas de fusión multimérica de la invención inhiben la disminución de la célula B por los macrófagos humanos. (Figura 5). Los datos muestran que los multímeros Fc derivados de IgG1 o IgG4 humano, polimerizado en formas de hexámero o dodecámero solamente por apéndice de IgM, o apéndice IgM y L309C, todos exhiben potencia y niveles máximos de inhibición significativamente mejores que el IVIG humano.

La demostración de que el IgG4 muestra claro bloqueo de fagocitosis de los macrófagos es evidencia del beneficio de la creación de una especie multivalente con unión ávida a FcγRs de baja afinidad.

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

El análisis de citometría de flujo usando células B manchadas con CFSE confirmó que el mecanismo de acción es la inhibición de fagocitosis de los macrófagos, y no la destrucción o apoptosis de células B por otros medios.

Con el fin de evaluar la habilidad de cualquier construcción de multímero Fc dado para inhibir fagocitosis de los macrófagos, se midió su actividad en el ensayo descrito en este documento arriba y se comparó con las actividades de los multímeros Fc IgG1 e IgG4 del tipo salvaje. La actividad de cada mutante se resumió entonces como “tipo IgG1”, “alta”, “media”, “baja”, o “tipo IgG4”, con base en una comparación visual de su concentración vs. la curva de efecto con aquellas obtenidas para multímeros Fc IgG1 e IgG4 del tipo salvaje.

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

El multímero Fc IgG1 del tipo salvaje, que comprende un dominio CH2 y CH3 derivado de IgG1, inhibe potentemente la fagocitosis de los macrófagos de células diana recubiertas con anticuerpo. Dos de las mutaciones sencillas en multímeros Fc IgG1 (A330S, K409R) no tienen efecto en la potencia de inhibición de fagocitosis. Seis de las mutaciones sencillas (L234F, H268Q, K274Q, Y296F, A327G y P331S) resultan en una reducción modesta en la potencia de inhibición de fagocitosis. Los residuos L234F y A327G son de particular interés dado que al mutarlos se reduce significativamente la liberación de citoquinas (ver Ejemplo 8), mientras que mantiene una potencia relativamente alta en la inhibición de fagocitosis. Esta combinación de propiedades será útil para el tratamiento de desórdenes autoinmunes.

Los multímeros Fc IgG4 del tipo salvaje inhiben la fagocitosis de los macrófagos de células dianas cubiertas de anticuerpo, pero menos potentemente que los multímeros Fc IgG1. Dos de las mutaciones sencillas en multímeros Fc IgG4 (F234L y G327A) aumentan modestamente la potencia de inhibición de fagocitosis. Seis de las mutaciones en IgG4 (Q268H, Q274K, F296Y, S330A, S331P, R409K) no tienen efecto en la inhibición de fagocitosis cuando se mutan de manera individual. Los residuos F234L y G327A son de particular interés dado que, mientras que mutan de forma individual, cualquiera de estas posiciones mejora la potencia de multímeros Fc IgG4 en la inhibición de fagocitosis, no tienen efecto en aumentar la producción de citoquinas (ver Ejemplo 8). Esta combinación de propiedades será útil para el tratamiento de desórdenes autoinmunes.

Tabla 6

<u>Multímero Fc</u>	<u>Potencia de inhibición de fagocitosis</u>
IgG1 Fc IgM tp L309	El estándar para “tipo IgG1”
IgG1 Fc IgM tp L309 L234F	Alto
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	Tipo IgG1
IgG1 Fc IgM tp L309 P331S	Alta
IgG1 Fc IgM tp L309 K409R	Tipo IgG1
IgG4 Fc IgM tp L309	El estándar para “tipo IgG4”
IgG4 Fc IgM tp L309 F234L	Media
IgG4 Fc IgM tp L309 Q268H	Tipo IgG4
IgG4 Fc IgM tp L309 Q274K	Tipo IgG4
IgG4 Fc IgM tp L309 F296Y	Tipo IgG4
IgG4 Fc IgM tp L309 G327A	Baja
IgG4 Fc IgM tp L309 S330A	Tipo IgG4
IgG4 Fc IgM tp L309 S331P	Tipo IgG4
IgG4 Fc IgM tp L309 R409K	Tipo IgG4

Los resultados para construcciones de multímero Fc adicionales, diseñadas para el uso en el tratamiento de desórdenes inmunes se muestran en la Figura 7 y se resumen en la Tabla 7.

Los multímeros Fc IgG1 e IgG4 del tipo salvaje inhiben la fagocitosis de los macrófagos de células diana recubiertas de anticuerpo más potentemente que la IVIG.

Los multímeros Fc IgG1 que comprenden L234F (que reduce la producción de citoquinas) o L234F y P331S (reduce la producción de citoquinas y la unión a C1Q, ver Ejemplos 8 y 15) han reducido modestamente la potencia en la inhibición de fagocitosis relacionada con multímeros Fc IgG1 del tipo salvaje, pero aún son altamente potentes con relación a los multímeros Fc IgG4 del tipo salvaje o IVIG.

Los multímeros Fc IgG4 que comprenden las mutaciones F234L; F234L y F296Y; G327A y S331P; S330A y S331P; o G327A y S330A; tienen potencia mejorada en la inhibición de fagocitosis comparado con los multímeros Fc del tipo IgG4.

Tabla 7.

<u>Multímero Fc</u>	<u>Potencia de inhibición de fagocitosis</u>
IgG1 Fc IgM tp L309	El estándar para "tipo IgG1"
IgG4 Fc IgM tp L309	El estándar para "tipo IgG4"
IgG1 Fc IgM tp L309 L234F	Alta
IgG1 Fc IgM tp L309 L234F P331S	Alta
Fc IgG4-CH2 IgG1-CH3 IgM tp L309 Híbrido	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 de la célula THP1 de las perlas FITC IgG

Las células THP1 se cultivaron en el pasaje 7, contaron y resuspendieron a 5×10^5 células/ml. 200µl de células se añadieron a cada pocillo de una placa de fondo

plano de 96 pocillos (1×10^5 células por pocillo). Las perlas cubiertas con IgG de conejo (Cambridge bioscience CAY500290-1 ea) se añadieron directamente a cada pocillo, se mezclaron (1 en 10 de dilución, 10 μ l / pocillo) y se dejaron por los puntos de tiempo: 1h, 2h, 4h, 8h. Los puntos de tiempo cero se efectuaron añadiendo perlas a células en tampón frío en hielo. Al final de cada punto de tiempo, las células se centrifugaron a 300g por 3 min. Las células se suspendieron en tampón FACS que contiene un 1:20 de dilución de solución de azul de tripano por 2 minutos. Las células se lavaron con 150 μ l de tampón FACS, se centrifugaron y resuspendieron en 200 μ l de tampón FACS y se transfirieron a una placa de fondo redondo lista para FACS. Las células se centrifugaron una vez más y se resuspendieron en 200 μ l de tampón FACS antes del análisis mediante la citometría de flujo. Las células THP1 se seleccionaron y dispersaron lateralmente y la captación de perlas medida como fluorescencia FITC.

Ejemplo 8: Ensayo de liberación de citoquinas de sangre pura humana

Se recolectó sangre fresca de donantes en tubos al vacío con heparina de litio. Las construcciones de multímero Fc de interés o controles se diluyeron en serie en PBS estéril a las concentraciones indicadas. Se añadió 12.5 μ l de multímero Fc o control a las placas de ensayo, seguido por 237.5 μ l de sangre pura. La placa se incubó a 37°C sin suplementación de CO₂ por 24 horas. Las placas se centrifugaron a 1800rpm por 5 minutos y se extrajo el suero para análisis de citoquina. El análisis de citoquina se realizó por múltiplex de citoquinas Meso Scale Discovery 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 IgG1 del tipo salvaje, tanto con como sin L309C, estimulan muy altos niveles de liberación de citoquinas. Los niveles observados de citoquinas fueron más altos que aquellos producidos por el control positivo, Campath. En

marcado contraste, los multímeros Fc IgG4, y los multímeros Fc IgG1 que comprenden FcγR y la mutación “LALA” inerte C1q (L234A L235A), produjeron virtualmente cero liberación de citoquinas.

Con el fin de evaluar el efecto de cualquier construcción de multímero Fc dado sobre liberación de citoquinas, su actividad se midió en el ensayo descrito anteriormente en este documento y se comparó con las actividades de los multímeros Fc del tipo salvaje IgG1 e IgG4. La actividad del mutante se resumió como “tipo IgG1”, “alta”, “media”, “baja”, o “tipo IgG4”, con base en una comparación visual de su concentración vs. la curva de efecto con aquellas obtenidas para multímeros Fc IgG1 e IgG4 del tipo salvaje.

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

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

Dos de las mutaciones sencillas (L234F, A327G) redujeron significativamente la liberación de citoquinas en multímeros Fc IgG1. Una de las mutaciones sencillas (Y296F) produjo una reducción moderada de liberación de citoquinas. Una de las mutaciones (P331S) aumentó significativamente la liberación de citoquinas. Tres de las mutaciones (H268Q, K274Q, A330S) no tuvieron efecto en la liberación de citoquina.

En marcado contraste, el multímero Fc IgG4 del tipo salvaje, que comprende un dominio CH2 y CH3 derivado de IgG4, virtualmente no produjo liberación de citoquina. Ninguna de las mutaciones de entrecruzamiento sencillo tuvo ningún efecto sobre la liberación de citoquina mediante multímeros Fc IgG4, ni siquiera aquellas en posiciones que demostraban ser importantes para la liberación de citoquinas en los multímeros Fc IgG1.

Tabla 8

<u>Multímero Fc</u>	<u>Estimulación de liberación de</u> <u>IFNγ</u>
IgG1 Fc IgM tp L309	El estándar para “tipo IgG1”
IgG1 Fc IgM tp L309 L234F	Baja
IgG1 Fc IgM tp L309 H268Q	Tipo IgG1
IgG1 Fc IgM tp L309 K274Q	Tipo IgG1
IgG1 Fc IgM tp L309 Y296F	Media
IgG1 Fc IgM tp L309 A327G	Baja
IgG1 Fc IgM tp L309 A330S	Tipo IgG1
IgG1 Fc IgM tp L309 P331S	Más alto que IgG1
IgG1 Fc IgM tp L309 K409R	Más alto que IgG1
IgG4 Fc IgM tp L309	El estándar para “tipo IgG4”
IgG4 Fc IgM tp L309 F234L	Tipo IgG4
IgG4 Fc IgM tp L309 Q268H	Tipo IgG4
IgG4 Fc IgM tp L309 Q274K	Tipo IgG4
IgG4 Fc IgM tp L309 F296Y	Tipo IgG4
IgG4 Fc IgM tp L309 G327A	Tipo IgG4
IgG4 Fc IgM tp L309 S330A	Tipo IgG4
IgG4 Fc IgM tp L309 S331P	Tipo IgG4
IgG4 Fc IgM tp L309 R409K	Tipo IgG4

Los resultados para construcciones de multímeros Fc adicionales diseñadas para modular la liberación de citoquinas se muestran en la Figura 10 y se resumen en la Tabla 9.

Los datos muestran que la liberación de citoquinas por multímeros Fc IgG1 puede reducirse a niveles aproximadamente equivalente a IVIG por la inclusión de L234F solamente o en combinación con P331S. Tales multímeros Fc pueden ser útiles para el tratamiento de desórdenes inmunes. Todos los multímeros Fc IgG4 que contienen mutaciones mostraron tener otras propiedades útiles, por ejemplo potencia mejorada en la fagocitosis (Ejemplo 6), retener virtualmente niveles cero de liberación de citoquina, y por lo tanto pueden ser útiles para el tratamiento de desórdenes inmunes.

Tabla 9. Liberación de citoquinas mediante multímeros Fc

<u>Multímeros Fc</u>	<u>Estimulación de liberación de IFN_γ</u>
IgG1 Fc IgM tp L309	El estándar para "tipo IgG1"
IgG4 Fc IgM tp L309	El estándar para "tipo IgG4"
IgG1 Fc IgM tp L309 L234F	Baja
IgG1 Fc IgM tp L309 L234F P331S	Media
Fc IgG4-CH2 IgG1-CH3 IgM tp L309 Híbrido	Tipo IgG4
IgG4 Fc IgM tp L309 F234L	Tipo IgG4
IgG4 Fc IgM tp L309 F234L F296Y	Tipo IgG4
IgG4 Fc IgM tp L309 G327A S330A	Tipo IgG4

IgG4 Fc IgM tp L309 G327A S331P	Tipo IgG4
IgG4 Fc IgM tp L309 S330A S331P	Tipo IgG4

Ejemplo 9: Efecto en el reciclaje de IgG en células en cultivo

Los ensayos a base de células se realizaron usando células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) II que se transfectaron establemente con un FcRn humano y un vector de gen doble β 2M humano con un marcador de selección de genética. Se seleccionó un clon de células estable que pudiera reciclarse y transcitarse IgG humano y esto se usó para todos los estudios posteriores. Se denominará como clon 15 MDCK II. Las líneas celulares MDCK equivalentes, transfectadas tanto con FcRn de mono cynomolgus ("clon 40") como de ratón se han generado de forma similar, para usar en ensayos equivalentes a los anteriores.

En un ensayo in vitro se estableció examinar la habilidad de una proteína de fusión multimérica de la presente invención para inhibir las capacidades de reciclaje de IgG por parte de FcRn. En pocas palabras, las células de clon 15 MDCK II se incubaron con IgG humano biotinilado (1 μ g/ml) en la presencia o ausencia de la proteína de fusión multimérica 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 el exceso de proteína y las células se incubaron en un tampón pH neutral (pH 7.2) que permitió la liberación de la superficie expuesta, unió IgG en el sobrenadante. La inhibición de FcRn continuó con el uso de un ensayo MSD para detectar la cantidad de IgG reciclado y liberarlo así en el sobrenadante.

Las células clon 15 MDCK II se sembraron en 15.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos y se incubó durante la noche a 37°C, 5% CO₂. Las células se incubaron con 1 μ g/ml de IgG humano biotinilado (Jackson) en la presencia y ausencia de la proteína de fusión multimérica en HBSS+ (Ca/Mg) pH 5.9 + 1%

BSA por 1 hora a 37°C, 5% CO₂. Las células se lavaron con HBSS+ pH 5.9 luego se incubaron a 37°C, 5% CO₂ por 2 horas en HBSS+ pH 7.2. Los lisados y sobrenadantes se eliminaron y analizaron para IgG total usando un ensayo MSD (usando un anticuerpo de captura IgG antihumano (Jackson) y un anticuerpo de revelación de etiquetado de estreptavidina-sulfo (MSD)). La curva de inhibición se analizó mediante regresión no lineal (Graphpad Prism) para determinar el EC₅₀.

Los resultados demostraron que las proteínas de fusión multiméricas de la invención inhiben el reciclaje de IgG mediado por FcRn. (Figura 11). Los multímeros de apéndice IgG1 Fc/IgM humano que retienen el residuo de histidina nativo en la posición 310 bloquean la transcitosis IgG mediada por FcRn y el reciclaje en una manera dependiente de concentración, tanto con como sin cisteína en la posición 309.

La Tabla 10 muestra los efectos de las mutaciones en la actividad de bloqueo de multímeros Fc. Las tres mutaciones que aumentan la unión a FcRn, V308F, V308P y T307A, fueron ensayadas en multímeros Fc que comprenden apéndice IgG1 Fc / IgM o apéndice IgG4 Fc / IgM. Los resultados mostraron mejoras significativas en la habilidad de los multímeros Fc para bloquear captación intracelular IgG mediada por FcRn y el reciclaje IgG. Los datos demuestran la utilidad de estas mutaciones para mejorar la potencia de multímeros Fc que comprenden regiones Fc tanto de IgG1 como de IgG4.

La sustitución de histidina en la posición 310 con leucina (H310L) mostró destruir la habilidad de los multímeros Fc de bloquear la captación intracelular IgG mediada por FcRn y el reciclaje IgG. Los resultados demuestran que los multímeros Fc que retienen el residuo de histidina en la posición 310 tienen mucho mejor unión a FcRn, y son bloqueadores más potentes de captación intracelular IgG y reciclaje

IgG. Los datos confirman que los multímeros Fc de la invención pueden proporcionar nuevas composiciones terapéuticas mejoradas con vida media más larga y mayor eficacia.

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

Mutantes de multímeros Fc	Bloqueo de captación intracelular IgG EC ₅₀ (μg/ml)	Bloqueo de reciclaje de IgG EC ₅₀ (μg/ml)
Apéndice IgG1 IgM, tipo salvaje	4.4	0.33
Apéndice IgG1 IgM, V308F	0.12	0.073
Apéndice IgG1 IgM, V308P	0.34	0.55
Apéndice IgG1 IgM, T307A	0.54	0.35
Apéndice IgG1 IgM, H310L	Inhibición no detectable	Inhibición máxima 45% a 100μg/ml
Apéndice IgG4 IgM, tipo salvaje	5.9	1.0
Apéndice IgG4 IgM, V308F	0.42	0.56
Apéndice IgG4 IgM, V308P	0.51	0.42
Apéndice IgG4 IgM, T307A	0.50	No probado

Ejemplo 10: Eficacia de multímeros Fc en ITP aguda

La eficacia de multímeros Fc se estudió en un modelo de ratón de ITP, en el que la pérdida de plaquetas es inducida por la administración de anti CD41. Este anticuerpo se une a la glicoproteína IIb en la superficie de las plaquetas, atacándolas para destrucción.

Protocolo ITP in vivo

Una muestra de sangre de 5µl se tomó de las colas de los ratones antes de la dosificación para obtener números de plaqueta basal.

Los ratones fueron dosificados i.v. con 1mg/kg o 10mg/kg de multímeros Fc.

Una hora después 1µg/ anticuerpo CD41 IgG de ratón rata anti-ratón (MWReg30) se dosificó i.p.

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

Protocolo de tinción FAC

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

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

Se añadió 5mls de tampón FAC.

Cada muestra se diluyó 1:4 para hacer un volumen final de 200µl en una placa de fondo en “uve” y se mantuvo en hielo hasta estar lista para adquirir en el Becton Dickinson FACs Canto.

Tabla 11.

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

Fc block		1/200	
----------	--	-------	--

Adquisición FACS

Un volumen de series de 150µl de muestra se recolectó en una tasa de flujo de 1.5µl/sec. El umbral se estableció en 200.

El análisis se realizó en el software FlowJo. Los conteos de plaquetas se derivaron de las células separadas CD45-/CD42d+.

Los conteos celulares se corrigieron para la dilución de la muestra con base en el hecho de que la muestra de sangre 5µl inicial se diluye 1/4000 y 150µl de esta corre a través de la máquina FAC que equivale a 0.1875µl de la muestra original que se analiza. $5/0.1875 =$ al factor de multiplicación de x 26.7 por plaqueta/µl.

Reactivos

Rata anti ratón CD41 grado funcional purificado (Ebiosciences, MWReg30, lote #E11914-1632)

Endotoxina libre PBS (Sigma, D8537)

Tampón de FAC: 0.1% FCS, 2mM EDTA

Resultados

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

Los resultados positivos se observaron usando 10mg/kg de multímero Fc humano.

Los multímeros Fc tanto con apéndice IgM como con IgA inhibieron significativamente la disminución de plaquetas causada por la inyección de 1µg/anti CD41 de ratón.

Los resultados demostraron que los multímeros Fc previenen la pérdida de plaquetas en un modelo in vivo de trombocitopenia inmune aguda. Estadísticamente, se alcanzaron reducciones significativas en la pérdida de plaquetas usando multímeros apéndice IgG1 Fc/IgM humanos, ambos con y sin L309C, y multímeros apéndice IgG4 Fc/IgM con L309C, en una dosis de 10 mg/kg (Figura 12) Por lo tanto, las proteínas de fusión multiméricas hexamerizadas a través del apéndice únicamente, o a través de disulfuro L309C y apéndice, son eficaces in vivo. La IVIG humana es activa en este modelo solamente en una dosis mucho más alta de 1000 mg/kg. En la dosis equivalente de 10 mg/kg, se encontró que la IVIG era inactiva para prevenir la pérdida de plaquetas.

Estadísticamente, los datos también mostraron reducción significativa en la pérdida de plaquetas usando un multímero apéndice IgG4-Fc-IgM humano con L309C a 10 mg/kg. La eficacia de un multímero Fc IgG4 es sorprendente dado que IgG4 es ampliamente visto como un isotipo inerte como un monómero. El monómero IgG4 se describe normalmente como que tiene una unión débil uniforme a la baja afinidad FcγRs (Bruhns et al; Blood Vol 113(16); p3716-3725; 2009). Por lo tanto, sin desear que esté unido a la teoría, la eficacia in vivo observada en la presente invención puede resultar del beneficio de avidez de hexamerización.

Ejemplo 11: Eficacia de multímeros Fc en ITP crónico

La eficacia de multímeros Fc se estudió en un modelo de ratón de ITP crónico, en el que la pérdida de plaquetas es inducida por la administración de anti CD41 por un periodo sostenido de tiempo usando minibombas.

Protocolo ITP in vivo

Se tomó un sangrado de la cola de 5µl antes de la dosificación para obtener número de plaquetas basal.

Una mini bomba Alzet, que contiene, rata anti ratón CD41 en una concentración de 82.5ug/ml (57.75µl rata anti ratón CD41 Ab + 642.25ul PBS/BSA (1.5mg/ml)) se implantó de manera subcutánea. Las bombas tienen una velocidad de flujo de 0.5µl/hora, administrando el equivalente de 0.99ug de anti CD41 por día.

El sangrado de la cola de 5µl para obtener conteos de plaqueta se hizo diariamente.

En un punto de tiempo cuando un conteo de plaquetas en estado estable se ha alcanzado, los ratones se dosifican de manera intravenosa con 1g/kg IVIg, o multímeros Fc en una gama de dosis.

A los 7 días se realizó una punción cardiaca terminal.

Protocolo de tinción FAC

Sacar 5µl de sangre a través de la vena de la cola. Para muestras de terminales sacar sangre mediante punción cardiaca en un tubo de heparina y sacar 5µl para tinción.

Añada 100µl de cóctel de anticuerpo e incube a 4°C en la oscuridad por 20 min.

Añada 500mls de tampón FAC.

Diluya cada muestra 1:4 para hacer un volumen final de 200µl en una placa de fondo en v y mantenga en hielo hasta que esté lista para adquirir en el BD FACs Canto.

Tabla 12.

Nombre del anticuerpo / Clon	Color del anticuerpo	Dilución	Proveedor/ Número de lote
CD45 (30-F11)	PerCPCy5.5	1/400	Ebio E08336-1633
CD42d (1C2)	PE	1/200	Ebio E14346-

			104
Fc block		1/200	

Adquisición FACS

Un volumen de series de 150µl de muestra se recolectará a una tasa de flujo de 1.5µl/sec. El umbral se establecerá en 200.

El análisis se realizará en el software FlowJo. Los conteos de plaquetas se derivarán de las células separadas CD45-/CD42d+.

Los conteos celulares se corregirán para la dilución de la muestra con base en la muestra de sangre 5µl inicial se diluye 1/4000 y 150µl de esta corre a través de la máquina FAC que equivale a 0.1875µl de la muestra original que se analiza. $5/0.1875 =$ al factor de multiplicación de x 26.7 por plaqueta/µl.

Reactivos

Rata anti ratón CD41 grado funcional purificado (Ebiosciences, MWReg30, lote #E11914-1632)

Endotoxina libre PBS (Sigma, D8537)

Tampón de FAC: 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

IVIg: Gammunex lot#26NK1N1.

Los resultados demostraron que las proteínas de fusión multimérica previenen la pérdida de plaquetas en un modelo in vivo de trombocitopenia crónica. La Figura 13 muestra los efectos alcanzados al usar (a) un sola dosis de 10 mg/kg de multímero Fc, administrado 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 efectividad al prevenir la pérdida de plaquetas. La IVIG humana fue efectiva solamente en una dosis mucho más alta de 1000 mg/kg.

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

Método

Las muestras purificadas de multímeros hexaméricos Fc (100ug) se desnaturalizaron en la presencia de 8M urea en 55mM Tris-HCl pH8.0 y los tioles libres se taparon mediante incubación con 22mM yodoacetamida (IAM) por 60 minutos a 37°C. La concentración de urea se redujo a 6M usando ultrafiltración y la proteína se digirió con una mezcla LysC/trypsin (Promega) por 3 horas a 37°C. La muestra se diluyó además con 5 volúmenes de tampón y la digestión continuó en la noche a 37°C. Se recolectaron los péptidos, desalados con cartuchos Waters Oasis HLB, secados usando un evaporador centrífugo y reconstituidos en agua que contiene 0.2% de ácido fórmico (solvente A).

Las muestras (7.5uL, ~7ug) se cargaron en 150uL/min en una columna 2.1 x 150mm C18 (Waters 1.7u PST 300A) equilibradas con solvente A y operado a 40°C. Los péptidos se eluyeron mediante un gradiente de 60min a 50% de solvente B (4:4:1 acetonitrilo: 1-propanol: agua / 0.2% ácido fórmico) en un espectrómetro de masas Waters Xevo operado en modo MS^E +ve-ion. Los datos MS^E , que consisten en exploraciones alternantes de alta y baja energía de colisión, se recolectaron en el rango 100 – 1900m/z durante la elución. Después de ejecutar, las digestiones se redujeron añadiendo 10mM de solución Tris (hidroxipropil) fosfina (THP) directamente al vial automuestreador e incubarlo por >1hora a temperatura ambiente. Las muestras reducidas se analizaron entonces una segunda vez.

Los datos MS^E se registraron en contra de la secuencia de multímero Fc relevante usando Waters BiopharmaLynx™ (BPL). La proporción de tioles disulfuro libres se calculó a partir de la proporción de IAM etiquetado con péptido libre en la digestión reducida THP. Los perfiles de glicanos se determinaron a partir de varias isoformas de glicopéptidos detectadas en las digestiones.

Resultados

Los resultados para el análisis de glicanos de multímeros Fc (apéndice IgG1Fc/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, el sitio de glicosilación en la región Fc IgG1, con menos del 10% de residuos de asparagina libres encontrándose en esta posición. La glicosilación en N297 fue principalmente complejo de fucosilado biantenarico, fundamentalmente G0F. La ocupación de sitio deapéndice IgM, N563, fue aproximadamente 50%, más alto que el nivel de aproximadamente 20% encontrado en IgM nativo. La glicosilación en N563 fue principalmente alta manosa.

Tabla 13. Análisis de glicanos

		Ocupación	G0F-N	G2-F	G1-F	G0-F	M6	M5
IgG1 Fc IgM tp L309C	CH2 N297	93%	14%	5%	20%	38%	1%	15%
	Apéndice N563	59%	<1%	7%	5%	2%	24%	20%
IgG1 Fc IgM tp	CH2 N297	91%	14%	<1%	26%	34%	<1%	15%
	Apéndice N563	45%	1%	4%	3%	<1%	14%	22%

Los resultados para el análisis de enlaces disulfuro entre cadenas se muestran en la Tabla 14. Resultados similares también fueron obtenidos para enlaces disulfuro entre cadenas. Los datos demostraron que una alta proporción de los residuos de cisteína en los multímeros Fc están unidos por disulfuro. No había evidencia para cantidades significativas de enlace disulfuro revuelto, y todos los dipéptidos esperados se encontraron en altos niveles antes de la reducción.

Tabla 14. Enlaces disulfuro entre cadenas

		DSB (%)	Tiol libre (%)
IgG1 Fc IgM tp L309C	Bisagra	97	3
	CH2 L309C - L309C	89	10
	Apéndice C575 - C575	84	14
IgG1 IgM tp	Bisagra	96	4
	Apéndice C575 - C575	80	19

Ejemplo 13: Unión de multímeros Fc a C1q

La unión de multímeros Fc a C1q se midió mediante ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), usando un kit ELISA C1q de Abnova Corporation, número de catálogo: KA1274, número de lote: V14-111723527. Las construcciones de multímero Fc se ajustaron en cinco diluciones de 500µg/ml hasta 4 µg/ml. 100 µl de cada construcción de multímero Fc se añadió al pocillo adecuado, y se agitó por 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 en una absorbancia de 450nm.

Con el fin de evaluar la unión de cualquier construcción de multímero Fc dada a C1q, esta actividad se midió y comparó con las actividades de los multímeros Fc del tipo salvaje IgG1 y IgG4. La actividad del mutante se resumió entonces como “tipo IgG1”, “alta”, “media”, “baja”, o “tipo IgG4”, con base en una comparación visual de su concentración vs. la curva de efecto con aquellas obtenidas de los multímeros Fc del tipo salvaje IgG1 e IgG4.

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

Los resultados demostraron que el multímero Fc IgG1 del tipo salvaje, que comprende un dominio CH2 y CH3 derivado de IgG1, se une fuertemente a C1q. Por el contrario, el multímero Fc IgG4 del tipo salvaje, que comprende un dominio CH2 y CH3 derivado de IgG4, se une muy débilmente a C1q. Se encontró que el residuo dominante que define la unión C1q en los multímeros Fc era prolina en la posición 331 (P331). La sustitución de este residuo de prolina con serina (P331S) redujo efectivamente la unión a C1q en multímeros Fc con un dominio CH2 derivado de IgG1. El mutante inverso, S331P, aumentó la unión 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 a C1q</u>
IgG1 Fc IgM tp L309	El estándar para “tipo IgG1”
IgG4 Fc IgM tp L309	El estándar para “tipo IgG4”
IgG1 Fc IgM tp L309 L234F	Tipo IgG1
IgG1 Fc IgM tp L309 P331S	Baja
IgG1 Fc IgM tp L309 L234F P331S	Tipo IgG4

Fc IgG4-CH2 IgG1-CH3 IgM tp L309 Híbrido	Tipo IgG4
IgG4 Fc IgM tp L309 F234L	Tipo IgG4
IgG4 Fc IgM tp L309 F234L F296Y	Tipo IgG4
IgG4 Fc IgM tp L309 G327A S330A	Tipo IgG4
IgG4 Fc IgM tp L309 G327A S331P	Media
IgG4 Fc IgM tp L309 S330A S331P	Media

Ejemplo 14 Activación de plaquetas

La activación de plaquetas mediante multímeros Fc se analizó mediante citometría de flujo. Las diluciones dobles de multímero Fc se prepararon en medio RPMI y se transfirieron a tubos FACS. La concentración final fue desde 100µg/ml hasta 3.12µg/ml. Se añadió 5µl de sangre pura fresca (de un mínimo de 2 donantes humanos) por tubo. Las plaquetas se cerraron usando Mab marcado anti CD42b y siguió la activación con Mabs contra 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 500µl de paraformaldehído al 1% antes del análisis mediante citometría de flujo.

Se encontró que el CD62p era el más sensible de los tres marcadores probados.

Con el fin de evaluar la activación de plaquetas mediante cualquier construcción de multímero Fc dada, su actividad se midió y comparó con las actividades de multímeros Fc del tipo salvaje IgG1 e IgG4. La actividad del mutante se resumió entonces como “tipo IgG1”, “alta”, “media”, “baja” o “tipo IgG4”, con base en una comparación visual de su concentración vs. la curva de efecto con aquellas obtenidas para multímeros Fc del tipo salvaje IgG1 e IgG4.

Los resultados para inducción de expresión CD62p se muestran en la Figura 15 y se resumen en la Tabla 16.

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

Hemos mostrado, en el Ejemplo 8, que son útiles dos mutaciones para reducir la liberación de citoquina del multímero Fc IgG1, L234F y A327G. De estas dos mutaciones, L234F tiene niveles más reducidos de activación de plaquetas comparado con el dominio Fc del tipo salvaje IgG1, mientras que un multímero Fc con la mutación A327G retiene niveles de activación de plaquetas significativos. Por lo tanto, L234F es una mutación muy útil – reduce la liberación de citoquina y la activación de plaquetas con solamente una menor pérdida de potencia en la inhibición de fagocitosis de los macrófagos.

La adición de P331S (mostró ser, en el Ejemplo 13, una mutación reductora de C1q útil) para L234F (L234F P331S) dio como resultado bajos niveles de activación de plaquetas. Este mutante doble es un medio para alcanzar baja citoquina, baja activación de plaquetas y cero unión a C1q. Por lo tanto, esta combinación de mutaciones es particularmente útil y se espera que proporcione nuevas terapias para el tratamiento de desórdenes inmunes.

L234F puede ser dominante sobre A327G dado que el mutante triple L234F A327G P331S tiene baja activación de plaquetas.

El multímero Fc IgG4 del tipo salvaje, que comprende un dominio CH2 y CH3 derivado de IgG4, virtualmente no da como resultado activación de plaquetas.

Cambiando el dominio CH3 al de IgG1 retiene estos niveles reducidos de activación de plaquetas.

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

F296Y puede combinarse con F234L sin incrementar adicionalmente la activación de plaquetas. Esta observación es importante dado que F234L F296Y tiene potencia aumentada comparada con multímero Fc del tipo salvaje IgG4. Por lo tanto esta combinación de mutaciones es particularmente útil y se espera que proporcione nuevas terapias para el tratamiento de desórdenes inmunes.

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

Ciertos mutantes dobles (7A S330A, G327A S331P y S330A S331P) que también tienen potencia mejorada sobre IgG4 WT tienen muy bajos niveles de activación de plaquetas (tipo IgG4) y se espera que proporcionen nuevas terapias para el tratamiento de desórdenes inmunes.

Tabla 16. Activación de plaquetas por multímeros Fc

<u>Multímero Fc</u>	<u>CD62p</u>
---------------------	--------------

IgG1 Fc IgM tp L309	El estándar para "tipo IgG1"
IgG4 Fc IgM tp L309	El estándar para "tipo IgG4"
IgG1 Fc IgM tp L309 L234F	Baja
IgG1 Fc IgM tp L309 L234F P331S	Tipo IgG4
IgG1 Fc IgM tp L309 A327G	Tipo IgG1
IgG1 Fc IgM tp L309 A327G A330S P331S	Tipo IgG1
IgG1 Fc IgM tp L309 A327G P331S	Tipo IgG1
IgG1 Fc IgM tp L309 L234F A327G P331S	Media
Fc IgG4-CH2 IgG1-CH3 IgM tp L309 Híbrido	Baja
IgG4 Fc IgM tp L309 F234L	Media
IgG4 Fc IgM tp L309 F234L F296Y	Media
IgG4 Fc IgM tp L309 G327A S330A	Tipo IgG4
IgG4 Fc IgM tp L309 G327A S331P	Tipo IgG4
IgG4 Fc IgM tp L309 S330A S331P	Baja

Ejemplo 15 Ingeniería de variantes de multímero Fc

Los anteriores ejemplos ilustran que se han creado multímeros Fc que son particularmente adecuados para usar en el tratamiento de desórdenes inmunes. Los multímeros Fc se diseñaron con el fin de generar multímeros Fc que posean las siguientes propiedades.

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

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

Liberación de citoquina

La estimulación de la liberación de citoquina por parte del multímero Fc debe ser tan baja como sea posible.

Unión a C1q

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

Activación de plaquetas

La activación de plaquetas por el multímero Fc debe ser tan baja como sea posible.

Sin embargo, el trabajo en los ejemplos anteriores ha ilustrado que puede ser necesario un compromiso entre potencia máxima y potencia ligeramente inferior con el fin de alcanzar efectos secundarios reducidos.

El multímero Fc IgG1 del tipo salvaje que comprende un dominio CH2 y CH3 derivado de IgG1 sin ninguna mutación adicional puede ser menos adecuado para usar en el tratamiento de desórdenes inmunes porque, aunque presenta alta potencia de inhibición de fagocitosis, también muestra altos niveles de efectos secundarios no deseados, medidos por la liberación de citoquina, la unión a C1q y la activación de plaquetas.

El multímero Fc IgG4 del tipo salvaje que comprende un dominio CH2 y CH3 derivado de IgG4, produce muy bajos niveles de efectos secundarios no deseados aunque su potencia es baja con relación a aquella de IgG1. No obstante, la potencia del multímero Fc IgG4 del tipo salvaje es aun significativamente más alta que la de la IVIG, como se muestra en la figura 7.

Los multímeros Fc se han diseñado que combinen las propiedades deseables tanto de multímeros Fc del tipo salvaje IgG4 como del IgG1, sin las propiedades indeseadas. Estos multímeros Fc presentan niveles efectivos de potencia, mientras que reducen efectos secundarios no deseados a un nivel tolerable como se muestra a continuación en la Tabla 17. Se espera que estos multímeros Fc sean particularmente útiles para el uso en el tratamiento de desórdenes inmunes.

Tabla 17

<u>Multímero Fc</u>	<u>Inhibición de fagocitosis</u>	<u>Liberación de IFNγ</u>	<u>Unión a C1q</u>	<u>Activación de plaquetas</u>
Multímero Fc IgG1 del tipo salvaje	El estándar para "tipo IgG1"	El estándar para "tipo IgG1"	El estándar para "tipo IgG1"	El estándar para "tipo IgG1"
Multímero Fc IgG4 del tipo salvaje	El estándar para "tipo IgG4"	El estándar para "tipo IgG4"	El estándar para "tipo IgG4"	El estándar para "tipo IgG4"
IgG1 Fc IgM tp L309 L234F P331S	Alta	Media	Tipo IgG4	Tipo IgG4
Fc IgG4-CH2 IgG1-CH3 IgM tp L309 Híbrido	Media	Tipo IgG4	Tipo IgG4	Baja
IgG4 Fc IgM tp L309 F234L	Media	Tipo IgG4	Tipo IgG4	Media
IgG4 Fc IgM tp L309 F234L F296Y	Media	Tipo IgG4	Tipo IgG4	Media
IgG4 Fc IgM tp L309 G327A S330A	Media	Tipo IgG4	Tipo IgG4	Tipo IgG4
IgG4 Fc IgM tp L309 G327A S331P	Media	Tipo IgG4	Media	Tipo IgG4
IgG4 Fc IgM tp L309 S330A S331P	Media	Tipo IgG4	Media	Tipo IgG4