

VARIANTE DE REGIÓN Fc**Campo técnico**

La presente invención se refiere a una variante de región Fc, una variante de región Fc sialilada, un polipéptido que comprende la variante de región Fc sialilada y una composición farmacéutica que comprende el polipéptido, etc.

Antecedentes de la invención

En los últimos años, los medicamentos que contienen anticuerpos se han desarrollado activamente y también han atraído un gran interés. Por ejemplo, la inmunoglobulina intravenosa (IVIG, por sus siglas en inglés) que utiliza un anticuerpo IgG se utiliza en el tratamiento de enfermedades autoinmunes y enfermedades inflamatorias, tales como la púrpura trombocitopénica idiopática (ITP, por sus siglas en inglés), la enfermedad de Kawasaki y el síndrome de Guillain-Barré (GBS, por sus siglas en inglés) (Literatura no relacionada con patente 1). En la IVIG, por ejemplo, anticuerpos IgG policlonales se aíslan a partir de plasma combinado de varios miles o más de donantes sanos, se preparan para el tratamiento y se utilizan. Sin embargo, los medicamentos que contienen anticuerpos aún presentan varios problemas. Ejemplos de los mismos incluyen, en general, dosis elevadas de los medicamentos que contienen anticuerpos, un alto costo de producción y la posible producción de anticuerpos antifármaco. Si se puede desarrollar un medicamento que contiene anticuerpos que tenga altos efectos terapéuticos, se espera que puedan obtenerse efectos equivalentes o superiores a los anteriores incluso con dosis reducidas.

Uno de los factores que contribuyen a los efectos terapéuticos de diversos anticuerpos es el ácido siálico. En este contexto, el ácido siálico, también denominado ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac), está enlazado a un residuo de galactosa en una región Fc para constituir un extremo no reductor del N-glicano Fc de IgG. Dicha sialilación en la región Fc de IgG es conocida, por ejemplo, por adquirir un efecto antiinflamatorio; por obtener un mejor efecto con el aumento de la tasa de sialilación (Literatura no relacionada con patente 2); y por suprimir las células B mediante una cadena de azúcar a la que se ha agregado ácido siálico en preparaciones de IVIG a través de CD22 (también denominado Siglec-2) (Literatura no relacionada con patente 3).

Por consiguiente, la sialilación de una región Fc de inmunoglobulina ha recibido atención. Se conoce que un polipéptido que contiene una variante de región Fc con una cantidad aumentada de ácido siálico agregado presenta una vida media incrementada y características antiinflamatorias preferidas (Literatura relacionada con patente 1). Se conoce un método que permite que células hospederas que exhiben actividades de β -galactosiltransferasa y sialiltransferasa expresen un anticuerpo que tiene mutaciones en una región Fc (por ejemplo, F243, V264 y D265) como un método para aumentar la cantidad de ácido siálico agregado en una región Fc (Literatura relacionada con patente 1). Asimismo, se han realizado estudios sobre un método para aumentar la cantidad de ácido siálico agregado mediante la mutación de aminoácidos específicos (por ejemplo, aminoácidos en las posiciones 240 a 243, 258 a 267 y 290 a 305) de una región Fc utilizando células HEK293 e YB2/0 (Literatura relacionada con patente 2).

Lista de citaciones

Literatura relacionada con patente

Literatura relacionada con patente 1: Solicitud internacional No. WO 2012/113863

Literatura relacionada con patente 2: Traducción al japonés de la publicación de solicitud internacional PCT núm. 2017-522040

5 Literatura no relacionada con patente

Literatura no relacionada con patente 1: Journal of Allergy and Clinical Immunology, Mar. 2017, Vol. 139 (3), Supplement, p. S1-S46

Literatura no relacionada con patente 2: Science, 4 de Ago, 2006, Vol. 313 (5787), p. 670-673

Literatura no relacionada con patente 3: Blood, 9 de Sep, 2010, Vol. 116 (10), p. 1698-1704

10 **Breve descripción de la invención**

Problema técnico

Un objetivo de la presente invención es proporcionar una variante de región Fc sialilada con una cantidad adicionalmente aumentada de ácido siálico agregado.

Solución al problema

15 Los presentes inventores han realizado estudios diligentes y, como resultado, han encontrado que se agregan numerosas moléculas de ácido siálico a una región Fc de inmunoglobulina para sialilarla, mediante la adición de variaciones de aminoácidos específicas a la región Fc.

La presente invención es, por ejemplo, como sigue.

[1] Una variante de región Fc sialilada que comprende las siguientes variaciones de
20 aminoácidos (1) y (2):

(1)

(a) los residuos de aminoácidos 234 y/o 235 están sustituidos por serina, treonina, asparagina, glutamina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina, histidina, glicina, alanina, prolina, metionina, valina o isoleucina, en donde los aminoácidos en las posiciones 234 y 235 son iguales o
25 diferentes después de la sustitución;

(b) el residuo de aminoácido 234 está sustituido por fenilalanina, tirosina, triptófano, isoleucina, valina, metionina, prolina, alanina o glicina, y el residuo de aminoácido 235 está sustituido por serina, treonina, asparagina, glutamina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina o histidina; o

(c) el residuo de aminoácido 234 está sustituido por serina, treonina, asparagina, glutamina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina o histidina, y el residuo de aminoácido 235 está
30 sustituido por fenilalanina, tirosina, triptófano, isoleucina, valina, metionina, prolina, alanina o glicina; y

(2) el residuo de aminoácido 293 o 294 se elimina,

en donde los números de residuo de aminoácido corresponden a las posiciones de aminoácidos de acuerdo con el índice EU.

35 [2] La variante de la región Fc sialilada de acuerdo con [1], en donde los residuos de aminoácidos 234 y 235 están sustituidos por serina, treonina, asparagina, glutamina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina, histidina, glicina, alanina, prolina, metionina, valina o isoleucina, en donde los aminoácidos en las posiciones 234 y 235 son iguales o diferentes después de la sustitución.

[3] La variante de región Fc sialilada de acuerdo con [1] o [2], en donde los residuos de aminoácidos 234 y 235 están sustituidos por alanina, o el residuo de aminoácido 234 está sustituido por alanina y el residuo de aminoácido 235 está sustituido por ácido glutámico.

5 [4] La variante de región Fc sialilada de acuerdo con cualquiera de [1] a [3], en donde la región Fc se deriva de IgG humana.

[5] La variante de región Fc sialilada de acuerdo con [4], en donde la región Fc se deriva de Ig γ 1 humana, Ig γ 2 humana, Ig γ 3 humana o Ig γ 4 humana.

[6] La variante de región Fc sialilada de acuerdo con [4], en donde la variante de región Fc sialilada comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad del 90 % o mayor con respecto a una secuencia que consiste en los aminoácidos en las posiciones 218 a 448 de la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 7, o una secuencia de aminoácidos con una identidad del 90 % o mayor con respecto a una secuencia que consiste en los aminoácidos en las posiciones 217 a 447 de la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 13.

15 [7] Un polipéptido que comprende la variante de región Fc sialilada de acuerdo con cualquiera de [1] a [6].

[8] El polipéptido de acuerdo con [7], en donde el polipéptido que comprende la variante de región Fc sialilada es un anticuerpo.

[9] El polipéptido de acuerdo con [8], en donde el anticuerpo es un anticuerpo IgG.

20 [10] El polipéptido de acuerdo con [7], en donde el polipéptido que comprende la variante de región Fc sialilada es una molécula de proteína de fusión Fc.

[11] El polipéptido de acuerdo con [10], en donde la molécula de proteína de fusión Fc sialilada comprende una proteína derivada de no humano.

[12] Un polinucleótido que codifica el polipéptido de acuerdo con cualquiera de [7] a [11].

25 [13] Un vector de expresión que comprende el polinucleótido de acuerdo con [12].

[14] Una célula hospedera transformada con el vector de expresión de acuerdo con [13].

[15] Un método para producir un polipéptido que comprende una variante de región Fc sialilada, comprendiendo el método el paso de cultivar la célula hospedera de acuerdo con [14].

[16] El método de acuerdo con [15], que comprende además el paso de agregar o expresar β -galactósido α -2,6-sialiltransferasa 1 (ST6GAL1).

30 [17] Una variante de región Fc que comprende las siguientes variaciones de aminoácidos (1) y (2):

(1)

(a) los residuos de aminoácidos 234 y/o 235 están sustituidos por serina, treonina, asparagina, glutamina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina, histidina, glicina, alanina, prolina, metionina, valina o isoleucina, en donde los aminoácidos en las posiciones 234 y 235 son iguales o diferentes después de la sustitución;

(b) el residuo de aminoácido 234 está sustituido por fenilalanina, tirosina, triptófano, isoleucina,

valina, metionina, prolina, alanina o glicina, y el residuo de aminoácido 235 está sustituido por serina, treonina, asparagina, glutamina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina o histidina; o

(c) el residuo de aminoácido 234 está sustituido por serina, treonina, asparagina, glutamina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina o histidina, y el residuo de aminoácido 235 está sustituido por fenilalanina, tirosina, triptófano, isoleucina, valina, metionina, prolina, alanina o glicina; y

(2) el residuo de aminoácido 293 o 294 se elimina,

en donde los números de residuo de aminoácido corresponden a las posiciones de aminoácidos de acuerdo con el índice EU.

[18] Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de acuerdo con cualquiera de [7] a [11] y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[19] La composición farmacéutica de acuerdo con [18] para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmune.

[20] El polipéptido de acuerdo con cualquiera de [7] a [11] para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmune.

[21] Un método para tratar una enfermedad autoinmune, que comprende el paso de administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido de acuerdo con cualquiera de [7] a [11].

[22] Uso del polipéptido de acuerdo con cualquiera de [7] a [11] en la producción de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad autoinmune.

Efectos ventajosos de la invención

La presente invención puede proporcionar una variante de región Fc sialilada con una cantidad adicionalmente aumentada de ácido siálico agregado.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un diagrama que muestra una porción desde una bisagra hasta un dímero CH2 en la estructura de longitud completa de IgG1 (código PDB: 1HZH). La leucina en las posiciones 234 y 235 (L234/L235) se representa mediante una pluralidad de esferas, y una cadena de azúcar se representa mediante una pluralidad de bastones.

La figura 2 es un diagrama que muestra un bucle N297 y su estructura marginal mediante la superposición de una estructura modelo de mutante E294Del sialilado con una estructura de tipo silvestre. L234/L235 se representa mediante una pluralidad de esferas, y una cadena de azúcar se representa mediante una pluralidad de bastones (gris: estructura cristalina de IgG1 de tipo silvestre; negro: estructura modelo del mutante E294Del sialilado). En el mutante E294Del sialilado, el bucle N297 que va a ser glicosilado se acorta y la cadena de azúcar se deforma, en comparación con el tipo silvestre.

La figura 3 es un diagrama que muestra una estructura modelo del mutante E294Del sialilado y una estructura marginal de L234/L235. L234/L235 se representa mediante una pluralidad de esferas, y una cadena de azúcar se representa mediante una pluralidad de bastones.

La figura 4 es un diagrama que muestra una estructura modelo del mutante con eliminación E294 y L234A/L235A sialilado, y una estructura marginal de las posiciones 234 y 235 (L234A/L235A). La alanina en las posiciones 234 y 235 se representa mediante una pluralidad de esferas, y una cadena de azúcar se

representa mediante una pluralidad de bastones.

La figura 5 es un diagrama que muestra una estructura modelo del mutante con eliminación E294 y L234A/L235E sialilado, y una estructura marginal de las posiciones 234 y 235 (L234A/L235E). La alanina en la posición 234 y el ácido glutámico en la posición 235 se representan cada uno mediante una pluralidad de esferas, y una cadena de azúcar se representa mediante una pluralidad de bastones.

La figura 6 es un diagrama que muestra una estructura modelo del mutante con eliminación E294 y L234F/L235Q sialilado, y una estructura marginal de las posiciones 234 y 235 (L234F/L235Q). La fenilalanina en la posición 234 y la glutamina en la posición 235 se representan cada una mediante una pluralidad de esferas, y una cadena de azúcar se representa mediante una pluralidad de bastones.

Descripción de las modalidades

En lo sucesivo, se describirá en detalle el modo de llevar a cabo la presente invención. Los materiales, configuraciones y similares descritos a continuación no limitan la presente invención, y pueden realizarse diversas modificaciones o cambios en la presente invención sin apartarse del espíritu de la presente invención.

1. Definición

Los términos en la presente especificación se utilizan con los significados generalmente usados por los técnicos en la materia, a menos que se especifique lo contrario.

El anticuerpo (o inmunoglobulina) se refiere a una glicoproteína que tiene una estructura de cuatro cadenas con una estructura en forma de Y bilateralmente simétrica, compuesta por dos cadenas pesadas que tienen una sola secuencia y dos cadenas ligeras que tienen una sola secuencia. El anticuerpo tiene cinco clases: IgG, IgM, IgA, IgD y IgE. La estructura básica de la molécula de anticuerpo es común entre estas clases, y dos cadenas pesadas con un peso molecular de 50,000 a 70,000 y dos cadenas ligeras con un peso molecular de 20,000 a 30,000 están unidas mediante un enlace disulfuro y un enlace no covalente para formar una molécula de anticuerpo con una estructura de cuatro cadenas en forma de Y con un peso molecular de 150,000 a 190,000. La cadena pesada consiste en una cadena polipeptídica que por lo general contiene aproximadamente 440 aminoácidos, tiene una estructura característica de cada clase y se designa como Ig γ , Ig μ , Ig α , Ig δ e Ig ϵ , correspondientes a IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. La IgG además tiene las subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, y las cadenas pesadas correspondientes a las mismas se designan como Ig γ 1, Ig γ 2, Ig γ 3 e Ig γ 4, respectivamente. La cadena ligera consiste en una cadena polipeptídica que por lo general contiene aproximadamente 220 aminoácidos, y se conoce que tiene dos tipos, tipo L y tipo K, que se designan como Ig λ e Ig κ , respectivamente. Cada uno de estos dos tipos de cadenas ligeras se puede emparejar con cualquier tipo de cadena pesada.

En una molécula de anticuerpo, la cadena pesada tiene cuatro enlaces disulfuro intracatenarios (cinco en Ig μ e Ig ϵ), mientras que la cadena ligera tiene dos enlaces disulfuro intracatenarios, y se forma un bucle cada 100 a 110 residuos de aminoácidos. Sus estructuras tridimensionales son similares entre los bucles y se designan como unidades estructurales o dominios. Tanto en la cadena pesada como en la cadena ligera, un dominio situado en el extremo N se designa como una región variable, la cual presenta secuencias de aminoácidos diversas incluso entre anticuerpos producidos a partir de la misma clase (o

subclase) de la misma especie animal, y se conoce que participa en la unión específica anticuerpo-antígeno. Un dominio en el lado C-terminal, corriente abajo de la región variable en el lado C-terminal, tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente constante en cada clase o subclase, y se designa como una región constante. La cadena pesada tiene, en la dirección desde el extremo N hacia el extremo C, una región variable de la cadena pesada (VH) y una región constante de la cadena pesada (CH). La CH se divide además, desde el lado N-terminal, en tres dominios: un dominio CH1, un dominio CH2 y un dominio CH3 (en el caso de IgG). La cadena ligera tiene, en la dirección desde el extremo N hacia el extremo C, una región variable de la cadena ligera (VL) y una región constante de la cadena ligera (CL).

Las secuencias de aminoácidos de tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) presentes en VH y VL varían en gran medida y contribuyen a la variabilidad de las regiones variables. Las CDR se localizan en el orden de CDR1, CDR2 y CDR3 en el extremo N de cada una de la cadena pesada y la cadena ligera, y estas regiones están compuestas por aproximadamente 5 a 10 residuos de aminoácidos y forman un sitio de unión al antígeno. Por otro lado, la porción de la región variable distinta de las CDR se designa como regiones marco (FR), que consisten en FR1 a FR4 y varían comparativamente poco en la secuencia de aminoácidos.

Cuando un anticuerpo se trata con la proteasa papaína, se obtienen tres fragmentos de anticuerpo. Dos fragmentos del extremo N se designan como regiones Fab (fragmento de unión al antígeno). Como se utiliza en la presente, el término “región Fab” se refiere a una región compuesta por el dominio VH y CH1 de la cadena pesada y la cadena ligera (VL y CL), y se une a un antígeno a través de un sitio de unión al antígeno en una porción terminal constituida por la región Fab. Como se utiliza en la presente, el término “fragmento de cadena pesada” se refiere a un fragmento compuesto por el dominio VH y CH1 de la cadena pesada que constituyen la región Fab.

El fragmento del extremo C se designa como una región Fc (fragmento cristizable). Como se utiliza en la presente, la “región Fc” significa un polipéptido compuesto por una región constante de anticuerpo, con excepción del dominio CH1. Por lo tanto, las regiones Fc de IgA, IgD e IgG tienen los dos últimos dominios de la región constante de la cadena pesada del extremo C (CH2 y CH3), y las regiones Fc de IgE e IgM comprenden los tres últimos dominios de la región constante de la cadena pesada del extremo C (CH2, CH3 y CH4). Una región bisagra, una cadena J y similares, si están presentes, también se incluyen en el término “región Fc”. Por ejemplo, la región Fc de IgG1 humana incluye un polipéptido compuesto por el dominio CH2 y el dominio CH3, y un polipéptido compuesto por una porción o la totalidad de la región bisagra, y los dominios CH2 y CH3. Las regiones Fc en anticuerpos de otras clases se pueden determinar mediante alineamiento de secuencias con la cadena pesada de IgG1 humana o un fragmento de la misma.

Como se utiliza en la presente, el término “variante de región Fc” significa una región Fc que comprende al menos una variación de aminoácido en una región Fc de tipo silvestre, e incluye como variación de aminoácido la sustitución, adición, delección, inserción, modificación y similares. Como se utiliza en la presente, la “variación” y la “mutación” de un aminoácido se utilizan indistintamente entre sí. Como se utiliza en la presente, el término “variante de región Fc sialilada” significa una variante de región Fc

sialilada (es decir, que tiene ácido siálico agregado) mediante un método conocido en la técnica. Como se utiliza en la presente, el término “variante de región Fc” se utiliza como un término que incluye tanto una variante de región Fc no sialilada como la variante de región Fc sialilada, a menos que el contexto lo limite particularmente. Como se utiliza en la presente, el término “región Fc” o “variante de región Fc” utilizado se entiende que también incluye un complejo (por ejemplo, un dímero) compuesto por una pluralidad de regiones Fc.

Un anticuerpo de un solo brazo y una proteína de fusión Fc de un solo brazo también se incluyen en el alcance de la presente invención. Por ejemplo, un anticuerpo IgG de un solo brazo comprende un complejo de una región Fab y dos regiones Fc, y tiene una estructura en la que el fragmento de cadena pesada de la región Fab está enlazado a una de las dos regiones Fc. En una modalidad, el anticuerpo de un solo brazo comprende una cadena pesada (VH, dominio CH1 y variante de región Fc sialilada (región bisagra + dominio CH2 + dominio CH3)), una cadena ligera (VL y CL) y una variante de región Fc sialilada. En una modalidad, la proteína de fusión Fc de un solo brazo tiene una estructura en la que solo una de dos variantes de región Fc sialiladas en un complejo está unida a otra proteína o péptido.

Como se utiliza en la presente, el término “anticuerpo multiespecífico” se refiere a un anticuerpo que se puede unir específicamente a dos o más antígenos diferentes, y se designa, por ejemplo, como un anticuerpo biespecífico o un anticuerpo triespecífico, dependiendo del número de antígenos a los que se une. El anticuerpo multiespecífico comprende un complejo de dos o más anticuerpos y/o fragmentos de unión a antígeno que pueden unirse a diferentes antígenos, respectivamente. El “anticuerpo”, como se utiliza en la presente, incluye el anticuerpo multiespecífico, a menos que el contexto lo limite particularmente.

Como se utiliza en la presente, el término “anticuerpo biespecífico” se refiere a un anticuerpo que se puede unir específicamente a dos antígenos diferentes.

Como se utiliza en la presente, el término “anticuerpo humano” se refiere a un anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana. Como se utiliza en la presente, el término “anticuerpo humanizado” se refiere a un anticuerpo que tiene residuos de aminoácidos, con excepción de las CDR, sustituidos parcial, mayoritaria o totalmente por residuos de aminoácidos derivados de una molécula de inmunoglobulina humana. El método de humanización no está particularmente limitado, y el anticuerpo humanizado se puede preparar con referencia, por ejemplo, a las patentes estadounidenses núm. 5,225,539 y 6,180,370.

Los números de residuos de aminoácidos de una región Fc o de un anticuerpo utilizados en la presente especificación se prescriben de acuerdo con el índice EU de Kabat et al. (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5a Ed, 1991, Publicación NIH núm. 91-3242).

Como se utiliza en la presente, el término “enlace” o “enlazado” significa que una pluralidad de componentes (por ejemplo, una región Fab y una región Fc) están unidos directamente o a través de uno o más mediadores (por ejemplo, enlazadores peptídicos). Como se utiliza en la presente, el “enlazador peptídico” significa uno o más residuos de aminoácidos arbitrarios que se pueden introducir mediante ingeniería genética con el fin de enlazar dos o más porciones (por ejemplo, entre una región variable de la

cadena pesada de un anticuerpo y una región variable de la cadena ligera). La longitud del enlazador peptídico utilizado en la presente invención no está particularmente limitada y se puede seleccionar apropiadamente por los técnicos en la materia dependiendo del propósito.

Como se utiliza en la presente, el término “identidad” significa un valor de identidad obtenido con los parámetros proporcionados como predeterminados utilizando EMBOSS Needle (Nucleic Acids Res., 2015, Vol. 43, p. W580–W584). Los parámetros son los siguientes.

Penalización por apertura de hueco = 10

Penalización por extensión de hueco = 0.5

Matriz = EBLOSUM62

Penalización por hueco terminal = falso

Como se utiliza en la presente, el término “sujeto” significa un ser humano u otros animales que requieren prevención o tratamiento. En un cierto aspecto, el sujeto es un ser humano que requiere prevención o tratamiento.

2. Variante de región Fc sialilada

La variante de la región Fc sialilada de acuerdo con una modalidad de la presente invención comprende las siguientes variaciones de aminoácidos (1) y (2):

(1)

(a) los residuos de aminoácidos 234 y/o 235 están sustituidos por serina, treonina, asparagina, glutamina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina, histidina, glicina, alanina, prolina, metionina, valina o isoleucina, en donde los aminoácidos en las posiciones 234 y 235 son iguales o diferentes después de la sustitución;

(b) el residuo de aminoácido 234 está sustituido por fenilalanina, tirosina, triptófano, isoleucina, valina, metionina, prolina, alanina o glicina, y el residuo de aminoácido 235 está sustituido por serina, treonina, asparagina, glutamina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina o histidina; o

(c) el residuo de aminoácido 234 está sustituido por serina, treonina, asparagina, glutamina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina o histidina, y el residuo de aminoácido 235 está sustituido por fenilalanina, tirosina, triptófano, isoleucina, valina, metionina, prolina, alanina o glicina; y

(2) el residuo de aminoácido 293 o 294 se elimina

(en donde los números de residuo de aminoácido corresponden a las posiciones de aminoácidos de acuerdo con el índice EU).

En particular, la variante de región Fc sialilada de acuerdo con una modalidad de la presente invención comprende ambas variaciones de aminoácidos (1) y (2) y se requiere que comprenda una de las variaciones de aminoácidos (a) a (c) para (1). La variante de región Fc sialilada tiene una cantidad aumentada de ácido siálico agregado (es decir, el grado de sialilación) en comparación con una región Fc de tipo silvestre sialilada o con una variante de región Fc sialilada que tenga únicamente la delección de un aminoácido en la posición 294. La variante de región Fc sialilada de acuerdo con una modalidad presenta, en particular, una cantidad aumentada de ácido siálico agregado a la cadena de azúcar enlazada a la asparagina en la posición 297.

La razón por la cual las variaciones de aminoácidos mencionadas anteriormente aumentan la cantidad de ácido siálico agregado (en particular, el ácido siálico agregado a la cadena de azúcar enlazada a la asparagina en la posición 297) se presume que es la descrita a continuación. Aunque se conoce que una variación de aminoácido (en particular, una delección) en la posición 294 de una región Fc es capaz de contribuir al aumento de la adición de ácido siálico (Literatura relacionada con patente 2), los presentes inventores han encontrado que la delección del aminoácido en la posición 294 puede causar una distorsión en una posición de inicio de la cadena de azúcar (alrededor de la posición 297). La figura 1 es un diagrama que muestra la estructura tridimensional del dominio CH2 de IgG de tipo silvestre. La figura 2 es un diagrama que muestra la estructura tridimensional de una forma en la que el ácido glutámico en la posición 294 de la IgG de tipo silvestre está eliminado. Como se muestra en la figura 1, en la IgG de tipo silvestre, una interfaz de dímero CH2 está compuesta principalmente por una cadena de azúcar y leucina en las posiciones 234 y 235. La delección del ácido glutámico en la posición 294 acorta un bucle que incluye la asparagina en la posición 297, que sirve como posición de inicio de la cadena de azúcar, como se muestra en la Figura 2, dando como resultado un desplazamiento alrededor de la posición de inicio de la cadena de azúcar, de modo que toda la cadena de azúcar se deforma.

La figura 3 es un diagrama que muestra la estructura tridimensional de una distorsión de la cadena de azúcar causada por la eliminación del ácido glutámico en la posición 294. Como resultado de dicha distorsión de la cadena de azúcar, la interacción entre la leucina en la posición 234 y la leucina en la posición 235 participa principalmente en el contacto del dímero CH2. La leucina en la posición 234 y la leucina en la posición 235 están unidas entre sí mediante una interacción de Van der Waals y, por lo tanto, no existe espacio entre ellas, y así no se admite una distorsión adicional en la cadena de azúcar.

Los presentes inventores han introducido variaciones en los aminoácidos en las posiciones 234 y/o 235 con el fin de disminuir la interacción entre los mismos y, como resultado, han encontrado que la cantidad de ácido siálico agregado a la cadena de azúcar se incrementa. Esto se presume que se debe a que, cuando la interacción disminuida entre las posiciones 234 y 235 genera un margen tridimensional tal como un espacio entre estos sitios, se acepta así una distorsión adicional en la cadena de azúcar. La cadena de azúcar se deforma hasta una posición que facilita la adición de ácido siálico, y de este modo se incrementa la cantidad de ácido siálico agregado a la cadena de azúcar. La figura 4 es un diagrama que muestra la estructura tridimensional de una forma en la que el residuo de aminoácido 294 está eliminado y, además, cada leucina en las posiciones 234 y 235 está sustituida por alanina en relación con la IgG de tipo silvestre. De acuerdo con la figura 4, cuando cada leucina en las posiciones 234 y 235 se sustituye por alanina, la interacción de Van der Waals entre las mismas se debilita, lo que resulta en la formación de espacio entre estos sitios. Dado que puede existir margen para la estructura molecular, se acepta una distorsión adicional en la cadena de azúcar. Como resultado, se presume que la cantidad de ácido siálico agregado también se incrementa.

Las sustituciones de aminoácidos en las posiciones 234 y/o 235 no están limitadas a las formas mencionadas anteriormente, y se pueden obtener los efectos deseados siempre y cuando los aminoácidos en dichas posiciones se seleccionen para que disminuyan la interacción entre los aminoácidos en las

posiciones 234 y 235. Las posibles variaciones que disminuyen la interacción entre los aminoácidos en las posiciones 234 y 235 son variaciones que debilitan la interacción de Van der Waals entre los aminoácidos en las posiciones 234 y 235. Se presume que las variaciones que debilitan la interacción de Van der Waals entre los aminoácidos en las posiciones 234 y 235 incluyen, por ejemplo, la sustitución de al menos uno de los aminoácidos en las posiciones 234 y 235 por un aminoácido menos hidrofóbico o más hidrofílico que el aminoácido original y/o por un aminoácido más pequeño (menos voluminoso) que el aminoácido original. Por ejemplo, cuando ambos aminoácidos en las posiciones 234 y 235 son leucina antes de la sustitución, uno o ambos de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido menos hidrofóbico que la leucina, es decir, serina, treonina, asparagina, glutamina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina, histidina, glicina, alanina, prolina o metionina (J. Mol. Biol., 1982, Vol. 157 (1), p. 105–32). Los aminoácidos se ordenan según su volumen de la siguiente manera: triptófano > tirosina > arginina > fenilalanina > histidina > metionina > ácido glutámico > lisina > glutamina > ácido aspártico > asparagina > leucina > isoleucina > cisteína > treonina > valina > prolina > serina > alanina > glicina. Por consiguiente, la sustitución de al menos uno de los aminoácidos en las posiciones 234 y 235 por un aminoácido más pequeño (menos voluminoso) que el aminoácido original significa que cada aminoácido se sustituye por un aminoácido menos voluminoso que el aminoácido antes de la sustitución, con referencia al orden de volumen mencionado anteriormente. Por ejemplo, cuando ambos aminoácidos en las posiciones 234 y 235 son leucina antes de la sustitución, uno o ambos de estos aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido menos voluminoso, es decir, isoleucina, cisteína, treonina, valina, prolina, serina, alanina o glicina. Alternativamente, cuando uno de los aminoácidos en las posiciones 234 y 235 se sustituye por un aminoácido hidrofílico (serina, treonina, asparagina, glutamina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina o histidina), el otro aminoácido puede sustituirse por un aminoácido hidrofóbico más voluminoso que el aminoácido antes de la sustitución. Por ejemplo, cuando ambos aminoácidos en las posiciones 234 y 235 son leucina antes de la sustitución, uno de estos aminoácidos puede sustituirse por un aminoácido hidrofílico y el otro aminoácido puede sustituirse por un aminoácido hidrofóbico más voluminoso, triptófano, tirosina, fenilalanina o metionina. Ejemplos de dicha variación de aminoácidos que disminuye la interacción entre los aminoácidos en las posiciones 234 y 235 incluyen la variación de aminoácidos (1) descrita en la modalidad anterior.

Ejemplos de la combinación de las variaciones que debilitan la interacción de Van der Waals entre los aminoácidos en las posiciones 234 y 235 incluyen, cuando cualquiera de los residuos de aminoácidos 234 y 235 es leucina, la sustitución del otro residuo de aminoácido por serina, treonina, asparagina, glutamina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina, histidina, glicina, alanina, prolina, metionina, valina o isoleucina.

Ejemplos de la combinación de aminoácidos en las posiciones 234 y 235 que debilitan la interacción de Van der Waals también incluyen las siguientes combinaciones:

(1) isoleucina–lisina, isoleucina–arginina, isoleucina–asparagina, isoleucina–ácido aspártico, isoleucina–glutamina, isoleucina–ácido glutámico, isoleucina–histidina, isoleucina–serina, isoleucina–treonina, isoleucina–metionina, isoleucina–glicina, isoleucina–alanina, isoleucina–cisteína, isoleucina–

prolina, isoleucina–valina o isoleucina–isoleucina; y

(2) valina–lisina, valina–arginina, valina–asparagina, valina–ácido aspártico, valina–glutamina, valina–ácido glutámico, valina–histidina, valina–serina, valina–treonina, valina–metionina, valina–glicina, valina–alanina, valina–cisteína, valina–prolina, valina–valina o valina–isoleucina;

5 (3) metionina–lisina, metionina–arginina, metionina–asparagina, metionina–ácido aspártico, metionina–glutamina, metionina–ácido glutámico, metionina–histidina, metionina–serina, metionina–treonina, metionina–metionina, metionina–glicina, metionina–alanina, metionina–cisteína, metionina–prolina, metionina–valina o metionina–isoleucina;

(4) prolina–lisina, prolina–arginina, prolina–asparagina, prolina–ácido aspártico, prolina–glutamina,
10 prolina–ácido glutámico, prolina–histidina, prolina–serina, prolina–treonina, prolina–metionina, prolina–glicina, prolina–alanina, prolina–cisteína, prolina–prolina, prolina–valina o prolina–isoleucina;

(5) cisteína–lisina, cisteína–arginina, cisteína–asparagina, cisteína–ácido aspártico, cisteína–glutamina, cisteína–ácido glutámico, cisteína–histidina, cisteína–serina, cisteína–treonina, cisteína–metionina, cisteína–glicina, cisteína–alanina, cisteína–prolina, cisteína–valina o cisteína–isoleucina;

15 (6) alanina–lisina, alanina–arginina, alanina–asparagina, alanina–ácido aspártico, alanina–glutamina, alanina–ácido glutámico, alanina–histidina, alanina–serina, alanina–treonina, alanina–metionina, alanina–glicina, alanina–alanina, alanina–cisteína, alanina–prolina, alanina–valina o alanina–isoleucina;

(7) glicina–lisina, glicina–arginina, glicina–asparagina, glicina–ácido aspártico, glicina–glutamina,
20 glicina–ácido glutámico, glicina–histidina, glicina–serina, glicina–treonina, glicina–metionina, glicina–glicina, glicina–alanina, glicina–cisteína, glicina–prolina, glicina–valina o glicina–isoleucina;

(8) treonina–lisina, treonina–arginina, treonina–asparagina, treonina–ácido aspártico, treonina–glutamina, treonina–ácido glutámico, treonina–histidina, treonina–serina, treonina–treonina, treonina–metionina, treonina–glicina, treonina–alanina, treonina–cisteína, treonina–prolina, treonina–valina o
25 treonina–isoleucina;

(9) serina–lisina, serina–arginina, serina–asparagina, serina–ácido aspártico, serina–glutamina, serina–ácido glutámico, serina–histidina, serina–serina, serina–treonina, serina–metionina, serina–glicina, serina–alanina, serina–cisteína, serina–prolina, serina–valina o serina–isoleucina;

(10) lisina–lisina, lisina–arginina, lisina–asparagina, lisina–ácido aspártico, lisina–glutamina, lisina–ácido glutámico, lisina–histidina, lisina–serina, lisina–treonina, lisina–metionina, lisina–glicina, lisina–alanina, lisina–cisteína, lisina–prolina, lisina–valina o lisina–isoleucina;

(11) histidina–lisina, histidina–arginina, histidina–asparagina, histidina–ácido aspártico, histidina–glutamina, histidina–ácido glutámico, histidina–histidina, histidina–serina, histidina–treonina, histidina–metionina, histidina–glicina, histidina–alanina, histidina–cisteína, histidina–prolina, histidina–valina o
35 histidina–isoleucina;

(12) glutamina–lisina, glutamina–arginina, glutamina–asparagina, glutamina–ácido aspártico, glutamina–glutamina, glutamina–ácido glutámico, glutamina–histidina, glutamina–serina, glutamina–treonina, glutamina–metionina, glutamina–glicina, glutamina–alanina, glutamina–cisteína, glutamina–

prolina, glutamina–valina o glutamina–isoleucina;

(13) ácido glutámico–lisina, ácido glutámico–arginina, ácido glutámico–asparagina, ácido glutámico–ácido aspártico, ácido glutámico–glutamina, ácido glutámico–ácido glutámico, ácido glutámico–histidina, ácido glutámico–serina, ácido glutámico–treonina, ácido glutámico–metionina, ácido glutámico–glicina, ácido glutámico–alanina, ácido glutámico–cisteína, ácido glutámico–prolina, ácido glutámico–valina o ácido glutámico–isoleucina;

(14) asparagina–lisina, asparagina–arginina, asparagina–asparagina, asparagina–ácido aspártico, asparagina–glutamina, asparagina–ácido glutámico, asparagina–histidina, asparagina–serina, asparagina–treonina, asparagina–metionina, asparagina–glicina, asparagina–alanina, asparagina–cisteína, asparagina–prolina, asparagina–valina o asparagina–isoleucina;

(15) ácido aspártico–lisina, ácido aspártico–arginina, ácido aspártico–asparagina, ácido aspártico–ácido aspártico, ácido aspártico–glutamina, ácido aspártico–ácido glutámico, ácido aspártico–histidina, ácido aspártico–serina, ácido aspártico–treonina, ácido aspártico–metionina, ácido aspártico–glicina, ácido aspártico–alanina, ácido aspártico–cisteína, ácido aspártico–prolina, ácido aspártico–valina o ácido aspártico–isoleucina;

(16) arginina–lisina, arginina–arginina, arginina–asparagina, arginina–ácido aspártico, arginina–glutamina, arginina–ácido glutámico, arginina–histidina, arginina–serina, arginina–treonina, arginina–metionina, arginina–glicina, arginina–alanina, arginina–cisteína, arginina–prolina, arginina–valina o arginina–isoleucina;

(17) triptófano–lisina, triptófano–arginina, triptófano–asparagina, triptófano–ácido aspártico, triptófano–glutamina, triptófano–ácido glutámico, triptófano–histidina, triptófano–serina, triptófano–treonina o triptófano–cisteína;

(18) tirosina–lisina, tirosina–arginina, tirosina–asparagina, tirosina–ácido aspártico, tirosina–glutamina, tirosina–ácido glutámico, tirosina–histidina, tirosina–serina, tirosina–treonina o tirosina–cisteína;

y

(19) fenilalanina–lisina, fenilalanina–arginina, fenilalanina–asparagina, fenilalanina–ácido aspártico, fenilalanina–glutamina, fenilalanina–ácido glutámico, fenilalanina–histidina, fenilalanina–serina, fenilalanina–treonina o fenilalanina–cisteína,

(en donde, en la combinación “aminoácido I–aminoácido II”, el residuo de aminoácido 234 puede ser el aminoácido I y el residuo de aminoácido 235 puede ser el aminoácido II, o viceversa).

Ejemplos específicos preferidos de los mismos incluyen la sustitución de la leucina en las posiciones 234 y 235 por alanina. Otros ejemplos específicos preferidos incluyen la sustitución de la leucina en la posición 234 por alanina y la leucina en la posición 235 por ácido glutámico. En este caso, los resultados del análisis de una estructura modelo se muestran en la figura 5. La figura 5 es un diagrama que muestra la estructura tridimensional de una forma en la que el residuo de aminoácido 294 está eliminado y, además, la leucina en la posición 234 está sustituida por alanina y la leucina en la posición 235 está sustituida por ácido glutámico, en relación con la IgG de tipo silvestre. De acuerdo con la figura 5, las respectivas cadenas laterales de la alanina en la posición 234 y del ácido glutámico en la posición 235

se orientan una hacia la otra, y la interacción de Van der Waals entre las mismas se debilita, dando como resultado la formación de espacio entre estos sitios. Dado que puede existir margen para la estructura molecular, se acepta una distorsión adicional en la cadena de azúcar. Como resultado, se presume que la cantidad de ácido siálico agregado también se incrementa.

5 Otros ejemplos específicos preferidos de los mismos pueden incluir la sustitución de la leucina en la posición 234 por fenilalanina y la leucina en la posición 235 por glutamina. En este caso, los resultados del análisis de una estructura se muestran en la figura 6. La figura 6 es una vista esquemática de una forma en la que el residuo de aminoácido 294 está eliminado y, además, la leucina en la posición 234 está sustituida por fenilalanina y la leucina en la posición 235 está sustituida por glutamina, en relación con la
10 IgG de tipo silvestre. De acuerdo con la figura 6, las respectivas cadenas laterales de la fenilalanina en la posición 234 y de la glutamina en la posición 235 se orientan una hacia la otra, y la interacción de Van der Waals entre las mismas se debilita, dando como resultado la formación de espacio entre estos sitios. Dado que puede existir margen para la estructura molecular, se acepta una distorsión adicional en la cadena de azúcar. Como resultado, se presume que la cantidad de ácido siálico agregado también se incrementa.

15 En el análisis estructural de las figuras 1 a 6, el modelado se realizó con WinCoot (Coot 0.9.6 Marina Bay), los dibujos se prepararon con PyMOL (versión de código abierto 2.60a0) y la interacción se evaluó con Schrödinger Maestro (Maestro versión 12.4.072).

La variante de región Fc sialilada de acuerdo con una modalidad tiene una cantidad aumentada de ácido siálico agregado y, por lo tanto, exhibe una farmacocinética excelente, tal como una vida media incrementada, y ejerce un efecto antiinflamatorio excelente. En otras palabras, la variante de región Fc
20 sialilada también tiene la ventaja de requerir una dosis baja cuando se utiliza como medicamento, debido a sus elevados efectos terapéuticos.

Un problema que ocurre con frecuencia con los medicamentos que contienen anticuerpos es la producción *in vivo* de un anticuerpo antifármaco (ADA) después de la administración. Sin embargo, la
25 variante de región Fc sialilada de acuerdo con una modalidad es poco probable que cause la producción *in vivo* de un anticuerpo antifármaco (ADA) después de la administración. Esto significa que un medicamento que contiene la variante de región Fc sialilada de acuerdo con una modalidad, incluso cuando se utiliza de manera repetida, produce de forma persistente los efectos deseados, lo que conduce a ventajas muy significativas.

30 Además, la delección de aminoácidos en las posiciones 293 y/o 294 puede atenuar la actividad de unión del medicamento de anticuerpo utilizado frente a FcγRI y, como resultado, reducir las reacciones adversas. Este efecto se potencia mediante la sustitución de los aminoácidos en las posiciones 234 y/o 235, como se mencionó anteriormente.

Como se mencionó anteriormente, las variaciones de aminoácidos en las posiciones 234 y/o 235
35 no están limitadas siempre y cuando los aminoácidos en dichas posiciones se seleccionen para que disminuyan la interacción entre los aminoácidos en las posiciones 234 y 235.

En una modalidad preferida, los residuos de aminoácidos 234 y 235 se sustituyen por serina, treonina, asparagina, glutamina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina, histidina, glicina,

alanina, prolina, metionina, valina o isoleucina (en donde los aminoácidos en las posiciones 234 y 235 son iguales o diferentes después de la sustitución).

En una modalidad más preferida, los residuos de aminoácidos 234 y 235 se sustituyen por alanina, o el residuo de aminoácido 234 se sustituye por alanina y el residuo de aminoácido 235 se sustituye por ácido glutámico.

En la variante de región Fc sialilada de la presente invención, se elimina un aminoácido en la posición 293 o 294. Dado que ambos aminoácidos en las posiciones 293 y 294 suelen ser ácido glutámico en la IgG de tipo silvestre, la eliminación de cualquiera de ellos produce la misma variación. En una modalidad preferida, se elimina el ácido glutámico en la posición 293 o 294.

El origen de la región Fc no está particularmente limitado. Por ejemplo, existe como región Fc de anticuerpo una región Fc de tipo IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 o IgM. La variante de región Fc de acuerdo con una modalidad puede derivarse de cualquiera de estos anticuerpos y se deriva preferiblemente de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4), más preferiblemente de IgG humana, aún más preferiblemente de Ig γ 1 humana, Ig γ 2 humana, Ig γ 3 humana o Ig γ 4 humana, y particularmente preferiblemente de Ig γ 1 humana.

En particular, las mutaciones de aminoácidos L234A y L235A en una región constante de Ig γ 1 humana se denominan “mutaciones LALA”. En este contexto, L234A es la sustitución de la leucina en la posición 234 de acuerdo con el índice EU en la región constante de Ig γ 1 humana por alanina. L235A es la sustitución de la leucina en la posición 235 de acuerdo con el índice EU en la región constante de Ig γ 1 humana por alanina. Se conoce que estas mutaciones reducen la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos o la citotoxicidad dependiente del complemento de un anticuerpo (Mol. Immunol., 1992, Vol. 29, p. 633-639).

La variante de región Fc sialilada de acuerdo con una modalidad tiene una cantidad aumentada de ácido siálico agregado (es decir, el grado de sialilación) en comparación con una región Fc de tipo silvestre sialilada o con una variante de región Fc sialilada que tenga únicamente la delección de un aminoácido en la posición 294. La variante de región Fc de acuerdo con una modalidad presenta, en particular, una cantidad aumentada de ácido siálico agregado a la cadena de azúcar enlazada a la asparagina en la posición 297, aunque la posición de adición del ácido siálico no se limita a dicha posición. La cantidad de ácido siálico agregado puede medirse como se describe en los Ejemplos que se mencionan posteriormente, y se indica como una “tasa de sialilación (%)”. Como se utiliza en la presente, la “tasa de sialilación (%)” significa la proporción de una cadena de azúcar que contiene ácido siálico con respecto a las cadenas de azúcar N-ligadas presentes en un material que se va a medir, y un método de medición específico y un método de cálculo son los descritos en los Ejemplos que se mencionan posteriormente.

La tasa de sialilación de la variante de región Fc sialilada de acuerdo con una modalidad se incrementa, por ejemplo, en 2 a 10 %, 3 a 8 % o 3 a 6 %, en comparación con una variante que tiene únicamente la delección de un aminoácido en la posición 294.

La variante de región Fc sialilada de acuerdo con una modalidad se puede obtener mediante un método que se utiliza habitualmente en la técnica, y las variaciones de aminoácidos y la adición de ácido

siálico también pueden llevarse a cabo mediante métodos utilizados habitualmente en la técnica. Se conoce un método para producir una variante de región Fc sialilada que consiste en permitir que las células coexpresen plásmidos que codifican respectivamente β -galactosiltransferasa y sialiltransferasa junto con un plásmido que codifica una variante de región Fc, como un método para aumentar la cantidad de ácido siálico agregado en una región Fc, aunque no se limita a ello.

La variante de región Fc sialilada de acuerdo con una modalidad puede comprender una variación distinta de las mencionadas anteriormente. Aunque dicha variación no está particularmente limitada siempre y cuando pueda lograrse una tasa de sialilación deseada, la variante de región Fc sialilada puede comprender, por ejemplo, una variación S239D/I332E (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006, Vol. 103 (11), p. 4005-4010) y variaciones basadas en la tecnología “botón en ojal” (de aquí en adelante, también denominada “variaciones botón en ojal”). La tecnología “botón en ojal” es una técnica que permite obtener de manera eficiente una molécula de anticuerpo heterodimérico de interés mediante la sustitución de las cadenas laterales de aminoácidos presentes en una región CH3 de una de las cadenas pesadas por cadenas laterales de mayor tamaño (botón), la sustitución de las cadenas laterales de aminoácidos presentes en una región CH3 de la otra cadena pesada por cadenas laterales de menor tamaño (ojal), y la colocación de los botones en los ojales para promover la heterodimerización de las cadenas pesadas (Nature Biotech., 1998, Vol. 16, p. 677-681; J. Mol. Biol., 1997, Vol. 270, p. 26-35; y Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 2013, Vol. 110, p. E2987-E2996).

En particular, la variante de región Fc sialilada de acuerdo con una modalidad puede tener una porción de región Fc en la secuencia de aminoácidos de una cadena pesada representada por la SEQ ID NO: 7 o 13 descritas en los Ejemplos, es decir, una secuencia que consiste en los aminoácidos en las posiciones 218 a 448 de la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 7 o una secuencia que consiste en los aminoácidos en las posiciones 217 a 447 de la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 13. La variante de región Fc de acuerdo con una modalidad puede comprender una porción distinta de estas secuencias, siempre y cuando se ejerzan los efectos deseados. La región Fc de acuerdo con una modalidad tiene, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos con una identidad del 90 % o mayor, preferiblemente del 95 % o mayor, con respecto a la porción de región Fc en la secuencia de aminoácidos de una cadena pesada representada por la SEQ ID NO: 7 o 13.

3. Polipéptido que comprende una variante de región Fc sialilada

De acuerdo con una modalidad, la presente invención proporciona un polipéptido que comprende la variante de región Fc sialilada mencionada anteriormente. El tipo de polipéptido no está limitado siempre y cuando el polipéptido comprenda la variante de región Fc sialilada mencionada anteriormente. Ejemplos de los mismos incluyen anticuerpos. Por consiguiente, de acuerdo con una modalidad, la presente invención proporciona un anticuerpo que comprende la variante de región Fc sialilada mencionada anteriormente.

Tal como se utiliza en la presente, el término “anticuerpo” se utiliza en el sentido más amplio e incluye cualquier anticuerpo, tal como un anticuerpo monoclonal (incluido un anticuerpo monoclonal de longitud completa), un anticuerpo policlonal, un mutante de anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un

anticuerpo multiespecífico (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico), un anticuerpo quimérico y un anticuerpo humanizado, siempre y cuando el anticuerpo exhiba la actividad biológica deseada. El anticuerpo puede ser un anticuerpo de un solo brazo. El anticuerpo de acuerdo con una modalidad puede ser un anticuerpo de cualquiera de las clases IgG, IgM, IgA, IgD e IgE y es, por ejemplo, un anticuerpo IgG.

5 El anticuerpo de acuerdo con una modalidad no está limitado por el tipo de antígeno, el origen del anticuerpo u otros factores, y puede ser cualquier anticuerpo. Ejemplos del origen del anticuerpo pueden incluir, aunque no se limitan particularmente a ello, anticuerpos humanos, anticuerpos de ratón, anticuerpos de rata y anticuerpos de conejo.

10 Las porciones (regiones variables de la cadena ligera y de la cadena pesada, etc.) distintas de la región Fc en el anticuerpo de acuerdo con una modalidad pueden tener secuencias arbitrarias y pueden tener secuencias de un anticuerpo de cualquier origen, tales como un anticuerpo de ratón, un anticuerpo de rata, un anticuerpo de conejo, un anticuerpo de cabra, un anticuerpo de camélido, un anticuerpo humanizado obtenido mediante la humanización de dicho anticuerpo no humano y un anticuerpo humano. Asimismo se aceptan variaciones en los residuos de aminoácidos siempre y cuando se mantenga la actividad de unión al antígeno. En el caso de introducir variaciones en la secuencia de aminoácidos de una
15 región variable, el sitio de variación y el número de aminoácidos que reciben variaciones no están particularmente limitados.

El anticuerpo puede tener un enlazador peptídico que enlace dos o más de sus porciones (por ejemplo, la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera del anticuerpo). Su tipo y longitud no están particularmente limitados y se pueden seleccionar apropiadamente por los técnicos en la materia. La longitud es preferiblemente de 5 o más aminoácidos (cuyo límite superior no está particularmente limitado y suele ser de 30 aminoácidos o menos, preferiblemente 20 aminoácidos o menos), y particularmente preferiblemente de 15 aminoácidos. Por ejemplo, se puede utilizar un enlazador de glicina-serina (enlazador GS) o un enlazador de glicina-lisina-prolina-glicina-serina (enlazador GKPGS)
20 como el enlazador peptídico que enlaza la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera del anticuerpo.

El anticuerpo de acuerdo con una modalidad se puede producir de conformidad con un método conocido en la técnica. Un método específico es el descrito en “6. Método para producir polipéptido” que se menciona posteriormente.

30 El polipéptido que comprende la variante de región Fc sialilada de acuerdo con una modalidad puede ser una molécula de proteína de fusión Fc en la que la variante de región Fc sialilada esté enlazada a una proteína adicional, un péptido bioactivo u otro similar. Ejemplos de la proteína adicional y del péptido bioactivo incluyen, aunque no se limitan a ello, receptores, moléculas de adhesión, ligandos y enzimas.

Ejemplos preferidos de la molécula de proteína de fusión Fc incluyen moléculas proteicas de la región Fc (la variante de región Fc sialilada de acuerdo con una modalidad) fusionadas con una proteína receptora que se une a un blanco. Ejemplos de dicha molécula proteica incluyen proteínas de fusión TNFR-Fc, proteínas de fusión IL1R-Fc y proteínas de fusión VEGFR-Fc. Otros ejemplos adicionales de la proteína o del péptido que se va a fusionar incluyen moléculas scFv, moléculas de anticuerpo de dominio único y
35

moléculas similares a anticuerpos (por ejemplo, DARPin, Aficuerpo, Avímero y Adnectina). La molécula de proteína de fusión Fc puede tener múltiple especificidad que permita la unión a múltiples tipos de moléculas blanco o epítopos. Cuando una pluralidad de variantes de región Fc forma un complejo, la proteína o el péptido adicional puede estar enlazado únicamente a una o a algunas de las variantes de región Fc. Por ejemplo, cuando dos variantes de región Fc forman un complejo, la proteína o el péptido adicional puede estar enlazado únicamente a una de las variantes de región Fc para formar una proteína de fusión Fc de un solo brazo.

La molécula de proteína de fusión Fc puede comprender una proteína derivada de no humano. La proteína de fusión Fc se puede administrar de manera repetida al mismo sujeto porque la proteína derivada de no humano enlazada a la región Fc sialilada suprime la producción de ADA.

La molécula de proteína de fusión Fc de acuerdo con una modalidad se puede producir de conformidad con un método conocido en la técnica. Un método específico es el descrito en “6. Método para producir polipéptido” que se menciona posteriormente.

4. Polinucleótido y vector de expresión

De acuerdo con una modalidad, la presente invención proporciona un polinucleótido que codifica la variante de región Fc de la presente invención, y un polinucleótido que codifica el polipéptido que comprende la variante de región Fc sialilada mencionada anteriormente. Los técnicos en la materia son capaces de preparar el polinucleótido de acuerdo con una modalidad mediante el uso de un método conocido en la técnica con base en su secuencia de nucleótidos. El polinucleótido de acuerdo con una modalidad se puede sintetizar mediante el uso de, por ejemplo, un método de síntesis génica conocido en la técnica. Varios métodos conocidos por los técnicos en la materia, tales como un método de síntesis génica de anticuerpos descrito en la publicación internacional núm. WO 90/07861, se pueden utilizar como dichos métodos de síntesis génica.

De acuerdo con una modalidad adicional, la presente invención proporciona un vector de expresión que comprende el polinucleótido mencionado anteriormente. Un polinucleótido puede estar contenido por separado en diferentes vectores, o una pluralidad de polinucleótidos puede estar contenida en un solo vector.

El vector de expresión de acuerdo con una modalidad no está particularmente limitado siempre y cuando el polinucleótido de acuerdo con una modalidad pueda producirse en diversas células hospederas, tales como células eucariotas (por ejemplo, células animales, células de insecto, células vegetales o levaduras) o células procariotas (por ejemplo, *E. coli*). Ejemplos de dicho vector de expresión incluyen vectores plasmídicos y vectores virales. Por ejemplo, se pueden utilizar como vector plasmídico la serie pcDNA (Thermo Fisher Scientific Inc.), pALTER(R)-MAX (Promega Corp.), pHEK293 Ultra Expression Vector (Takara Bio Inc.) o pEE6.4 o pEE12.4 (Lonza Biologics plc). Por ejemplo, se pueden utilizar como vector viral lentivirus, adenovirus, retrovirus o virus adenoasociado. Por ejemplo, en el caso de utilizar lentivirus para introducir el polinucleótido de acuerdo con una modalidad en células, se puede utilizar el vector pLV SIN-CMV/EF1a (Takara Bio Inc.), el vector pLenti (Thermo Fisher Scientific Inc.) o similares como el lentivirus. En una modalidad, el vector que se utiliza en el vector de expresión de acuerdo con una

modalidad es el vector pcDNA™3.4-TOPO® (Thermo Fisher Scientific Inc.) y el vector pcDNA™3.1 (Thermo Fisher Scientific Inc.).

El vector de expresión de acuerdo con una modalidad puede contener un promotor unido operativamente al polinucleótido de la presente invención. Ejemplos del promotor para expresar el polinucleótido de acuerdo con una modalidad en células animales incluyen promotores derivados de virus tales como CMV, RSV y SV40, el promotor de actina, el promotor EF (factor de elongación) 1 α y el promotor de choque térmico. Ejemplos del promotor para expresar el polinucleótido de acuerdo con una modalidad en una bacteria (por ejemplo, una bacteria del género *Escherichia*) incluyen el promotor trp, el promotor lac, el promotor λ PL y el promotor tac. Ejemplos del promotor para expresar el polinucleótido de acuerdo con una modalidad en una levadura incluyen el promotor GAL1, el promotor GAL10, el promotor PH05, el promotor PGK, el promotor GAP y el promotor ADH.

En el caso de utilizar células animales, células de insecto o una levadura como células hospedera, el vector de expresión de acuerdo con una modalidad puede contener un codón de inicio y un codón de terminación. En este caso, el vector de expresión puede contener, por ejemplo, una secuencia potenciadora, regiones no traducidas 5' y 3' de un gen que codifica la variante de región Fc de acuerdo con una modalidad, una secuencia señal secretora, un sitio de empalme, un sitio de poliadenilación o una unidad replicable. En el caso de utilizar *E. coli* como células hospederas, el vector de expresión de acuerdo con una modalidad puede contener un codón de inicio, un codón de terminación, una región terminadora y una unidad replicable. El vector de expresión de acuerdo con una modalidad puede contener un gen marcador de selección de fármacos (por ejemplo, un gen de resistencia a tetraciclina, un gen de resistencia a ampicilina, un gen de resistencia a kanamicina, un gen de resistencia a neomicina o un gen de dihidrofolato reductasa) que se utiliza habitualmente en función del propósito.

5. Célula hospedera

De acuerdo con una modalidad, la presente invención proporciona una célula hospedera transformada con el vector de expresión mencionado anteriormente. La célula hospedera de acuerdo con una modalidad puede contener uno o más polinucleótidos de acuerdo con una modalidad mediante la transformación con el vector de expresión de acuerdo con una modalidad.

La célula hospedera que se transformará no está particularmente limitada siempre y cuando sea compatible con el vector de expresión utilizado y pueda expresar el polipéptido de acuerdo con una modalidad mediante la transformación con el vector de expresión. Como célula hospedero que se transformará se pueden utilizar varias células, tales como células convencionales que se utilizan habitualmente en la técnica o células establecidas artificialmente. Ejemplos de las mismas incluyen células animales (células CHO-K1, células ExpiCHO-S™, células CHOK1SV, células CHO-DG44, células HEK293, células NS0, etc.), células de insecto (Sf9, etc.), bacterias (bacterias del género *Escherichia*, etc.) y levaduras (el género *Saccharomyces*, el género *Pichia*, etc.). En una modalidad, la célula hospedera es una célula CHO-K1 o una célula ExpiCHO-S.

Un método para transformar la célula hospedera no está particularmente limitado. Por ejemplo, se puede utilizar un método generalmente empleado por los técnicos en la materia, tal como el método de

fosfato de calcio, la electroporación o la lipofección.

La célula hospedera transformada se puede seleccionar mediante un método que se utiliza habitualmente por los técnicos en la materia. Por ejemplo, como método de selección se puede utilizar un método de aislamiento celular tal como un método de selección con fármacos que utiliza un gen marcador de selección de fármacos y un fármaco tal como tetraciclina, ampicilina, neomicina o higromicina, un método de dilución límite, un método de clasificación de células individuales o un método de recolección de colonias.

6. Método para producir polipéptido

De acuerdo con una modalidad, la presente invención proporciona un método para producir la variante de región Fc sialilada y un método para producir el polipéptido que comprende la variante de región Fc sialilada mencionada anteriormente. El método de acuerdo con una modalidad puede comprender, por ejemplo, los siguientes pasos: cultivar la célula hospedera transformada mencionada anteriormente para que el polipéptido se exprese en la célula hospedera o en un sobrenadante de cultivo; y recuperar, aislar o purificar el polipéptido, aunque no se limita a estos métodos siempre y cuando se produzca el polipéptido de interés.

La célula hospedera transformada se puede cultivar mediante un método conocido en la técnica. Las condiciones de cultivo, por ejemplo, la temperatura, el pH del medio y el tiempo de cultivo, se seleccionan adecuadamente por los técnicos en la materia. Cuando la célula hospedera es una célula animal, por ejemplo, pueden utilizarse medio MEM (Science, 1959, Vol. 130, p. 432-437), medio DMEM (Virol., 1959, Vol. 8, p. 396), medio RPMI-1640 (J. Am. Med. Assoc., 1967, Vol. 199, p. 519), o medio 199 (Exp. Biol. Med., 1950, Vol. 73, p. 1-8) que contiene aproximadamente 5 a 20 % de suero bovino fetal se puede utilizar como medio. El pH del medio es, por ejemplo, de aproximadamente 6 a 8. El cultivo se realiza generalmente a aproximadamente 30 a 40 °C durante aproximadamente 15 a 336 horas, si es necesario, con aireación o agitación. Cuando la célula hospedera es una célula de insecto, por ejemplo, se puede utilizar el medio de Grace (Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1985, Vol. 82, p. 8404) que contiene suero fetal bovino como medio. El pH del medio es, por ejemplo, de aproximadamente 5 a 8. El cultivo se realiza generalmente a aproximadamente 20 a 40 °C durante aproximadamente 15 a 100 horas, si es necesario, con aireación o agitación.

Cuando la célula hospedera es *E. coli* o una levadura, por ejemplo, es adecuado como medio un medio líquido que contenga un nutriente. El medio nutritivo contiene, por ejemplo, una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno inorgánico u orgánico necesarias para el crecimiento de la célula hospedera transformada. Ejemplos de la fuente de carbono incluyen glucosa, dextrano, almidón soluble y sacarosa. Ejemplos de la fuente de nitrógeno inorgánico o de la fuente de nitrógeno orgánico incluyen sales de amonio, nitratos, aminoácidos, licor de maceración de maíz, peptona, caseína, extractos de carne, torta de soya y extractos de papa. Otros nutrientes (por ejemplo, sales inorgánicas (por ejemplo, cloruro de calcio, dihidrogenofosfato de sodio y cloruro de magnesio) y vitaminas) y antibióticos (por ejemplo, tetraciclina, neomicina, ampicilina y kanamicina) pueden incluirse, si se desea. El pH del medio es, por ejemplo, de aproximadamente 5 a 8. Cuando la célula hospedera es *E. coli*, por ejemplo, se puede utilizar como medio

el medio LB o el medio M9 (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Vol. 3, A2.2). El cultivo se realiza generalmente a aproximadamente 14 a 43 °C durante aproximadamente 3 a 24 horas, si es necesario, con aireación o agitación. Cuando la célula hospedera es una levadura, por ejemplo, se puede utilizar el medio mínimo de Burkholder (Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1980, Vol. 77, p. 4505) como medio.

- 5 El cultivo se realiza generalmente a aproximadamente 20 a 35 °C durante aproximadamente 14 a 144 horas, si es necesario, con aireación o agitación. El polipéptido de interés se puede expresar mediante el cultivo como se mencionó anteriormente.

El método puede comprender además el paso de agregar o expresar sialiltransferasa. Ejemplos de dicha enzima incluyen β -galactósido α -2,6-sialiltransferasa 1 (ST6GAL1), sialiltransferasa y β -galactósido α -2,3-sialiltransferasa. Esto incrementa adicionalmente la cantidad de ácido siálico agregado a la región Fc. La sialiltransferasa se puede simplemente agregar, o se puede preparar un vector de expresión que tenga un inserto de ADN que codifique esta enzima para que la enzima se coexpresen con la variante de región Fc de la presente invención o con el polipéptido que comprende la variante de región Fc de la presente invención, tal como un anticuerpo. En el caso de agregar la sialiltransferasa, el momento o el método de adición no están particularmente limitados. La sialiltransferasa se puede agregar, por ejemplo, durante el curso de la producción del polipéptido mediante cultivo celular o se puede agregar y reaccionar después de la purificación del polipéptido. En el caso de expresar la sialiltransferasa, ejemplos de ello incluyen, aunque no se limitan a un método que consiste en permitir que las células coexpresen un plásmido que codifica la sialiltransferasa y un plásmido que codifica el polipéptido para producir un polipéptido sialilado. En el caso de producir el polipéptido utilizando células que contienen glicosiltransferasa endógena, tales como células CHO, el ácido siálico se puede agregar durante el curso de la producción del polipéptido sin la adición de la sialiltransferasa mencionada anteriormente.

El método de acuerdo con una modalidad puede comprender además el paso de recuperar, aislar o purificar el polipéptido a partir de la célula hospedera, además del paso de cultivar la célula hospedera transformada para que se exprese el polipéptido que comprende la variante de región Fc sialilada. Ejemplos del método de aislamiento o purificación incluyen métodos que aprovechan la solubilidad, tales como la precipitación por salificación y la precipitación con disolvente; métodos que aprovechan la diferencia de peso molecular, tales como diálisis, ultrafiltración y filtración en gel; métodos que aprovechan la carga, tales como cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de hidroxapatita; métodos que aprovechan la afinidad específica, tales como cromatografía de afinidad; métodos que aprovechan la diferencia de hidrofobicidad, tales como cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa; y métodos que aprovechan la diferencia en el punto isoeléctrico, tales como electroforesis de enfoque isoeléctrico. En una modalidad, el polipéptido secretado en el sobrenadante del cultivo se puede purificar mediante cada cromatografía, por ejemplo, cromatografía en columna utilizando una columna de proteína A o una columna de proteína G.

De acuerdo con una modalidad, la presente invención proporciona un polipéptido que comprende la variante de región Fc sialilada, siendo el polipéptido producido mediante el método de producción mencionado anteriormente.

7. Composición farmacéutica

De acuerdo con una modalidad, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende la variante de región Fc sialilada de la presente invención o el polipéptido que comprende la variante de región Fc sialilada mencionada anteriormente, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 La composición farmacéutica se puede preparar mediante un método utilizado habitualmente empleando un excipiente utilizado habitualmente en la técnica, es decir, un excipiente farmacéutico, un vehículo farmacéutico u otro similar. Ejemplos de la forma de dosificación de la composición farmacéutica incluyen formulaciones parenterales, tales como inyecciones y formulaciones para infusión intravenosa. Se puede realizar una administración tal como administración intravenosa, administración subcutánea o
10 administración intraperitoneal. Para la preparación de las formulaciones, se pueden utilizar excipientes, portadores, aditivos y similares apropiados para estas formas de dosificación, dentro de un rango farmacéuticamente aceptable.

La composición farmacéutica de acuerdo con una modalidad puede comprender además un medicamento de anticuerpo adicional y/o uno o más agentes terapéuticos adicionales. La composición
15 farmacéutica de acuerdo con una modalidad se puede utilizar en combinación (de manera concurrente o secuencial) con un medicamento de anticuerpo adicional y/o uno o más agentes terapéuticos adicionales.

La cantidad del polipéptido de acuerdo con una modalidad en la composición farmacéutica se puede establecer apropiadamente dependiendo de la gravedad de los síntomas, la edad del paciente, la forma de dosificación de la preparación utilizada, etc.

20 El polipéptido de acuerdo con una modalidad y la composición farmacéutica que lo contiene se pueden utilizar en el tratamiento de enfermedades autoinmunes y enfermedades inflamatorias. De acuerdo con otra modalidad, la presente invención proporciona un método para tratar una enfermedad autoinmune, que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido de acuerdo con una modalidad. De acuerdo con una modalidad adicional, la presente invención incluye el polipéptido
25 de la presente invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmune. La presente invención también proporciona el uso del polipéptido de acuerdo con una modalidad en la producción de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad autoinmune. La enfermedad autoinmune que se va a tratar no está particularmente limitada.

Ejemplos

30 En los Ejemplos que se presentan a continuación, la “tasa de sialilación” significa la proporción de una cadena de azúcar que contiene ácido siálico con respecto a todas las cadenas de azúcar N-ligadas presentes en el sistema. Para los anticuerpos producidos en los Ejemplos que se presentan a continuación, mediante análisis estructural se encontró que la cadena de azúcar N-ligada era únicamente una cadena de azúcar enlazada a la asparagina en la posición 297. Por lo tanto, la tasa de sialilación significa la proporción
35 de una cadena de azúcar que contiene ácido siálico con respecto a todas las cadenas de azúcar N-ligadas (es decir, la cadena de azúcar enlazada a la asparagina en la posición 297) presentes en el sistema.

Ejemplo 1: Preparación del mutante E294Del de un anticuerpo anti-lisozima

Se sintetizaron ADN que codifican los polipéptidos de una cadena pesada y una cadena ligera de

un anticuerpo anti-lisozima de conformidad con un método rutinario, y cada uno se insertó en el vector pcDNA3.4-TOPO (Thermo Fisher Scientific Inc.) para preparar un vector de expresión de cadena pesada y un vector de expresión de cadena ligera. Un gen que codifica la secuencia de la región variable de la cadena pesada de un anticuerpo anti-lisozima se enlazó a un gen que codifica Igγ1 humana que tiene una mutación de aminoácido E294Del (Del = delección), y el ADN resultante que codifica el polipéptido de la cadena pesada se insertó en el vector pcDNA3.4-TOPO para preparar un vector de expresión para la cadena pesada que tiene la mutación de aminoácido E294Del. Las células ExpiCHO-S (Thermo Fisher Scientific Inc., A29127) se transfectaron con el vector de expresión de la cadena pesada y el vector de expresión de la cadena ligera, o con el vector de expresión de la cadena pesada que tiene la mutación de aminoácido E294Del y el vector de expresión de la cadena ligera, y se cultivaron. El sobrenadante de cultivo se purificó utilizando MabSelect SuRe (GE Healthcare Japan Corp., 17-5438-02) de conformidad con un método rutinario para obtener un anticuerpo purificado. El anticuerpo que tiene la región constante Igγ1 humana (Fc no variante) se designó como LYS_1c3-m1_h10. El anticuerpo que tiene la mutación de aminoácido E294Del en la región constante Igγ1 humana se designó como LYS_E294Del_h1x. La Tabla 1 muestra la secuencia de aminoácidos y la secuencia de ácidos nucleicos de cada anticuerpo.

Tabla 1

	Aminoácido de cadena pesada	Ácido nucleico de cadena pesada	Aminoácido de cadena ligera	Ácido nucleico de cadena ligera
Nombre del anticuerpo				
LYS_1c3-m1_h10	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
LYS_E294Del_h1x	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4

Se ha informado que los anticuerpos que tienen la mutación E294Del exhiben una actividad de unión atenuada frente a FcγR humanos (WO2012/175751, Tabla 4). De acuerdo con informes previos (por ejemplo, CELL IMMUNOL., 2000, Vol. 200 (1), p. 16–26), la actividad de unión reducida frente a FcγR suprime la activación de células T y, presumiblemente, puede reducir de este modo las reacciones adversas del tratamiento de determinadas afecciones.

Por consiguiente, los anticuerpos obtenidos de esta manera se evaluaron con respecto a su actividad de unión frente a FcγR humanos utilizando Biacore (GE Healthcare Japan Corp., Biacore T200) de conformidad con el manual. La actividad de unión frente a FcγRI humano aún se mantuvo en LYS_E294Del_h1x, aunque la actividad de unión se atenuó en comparación con LYS_1c3-m1_h10.

Ejemplo 2: Preparación del mutante L234A/L235A/E294Del de un anticuerpo anti-lisozima

Se preparó un anticuerpo que tiene la mutación E294Del mencionada anteriormente y, en combinación, una mutación L234A y una mutación L235A, mediante el método descrito a continuación. Un gen que codifica la secuencia de la región variable de la cadena pesada de un anticuerpo anti-lisozima se enlazó a un gen que codifica Igγ1 humana que tiene las mutaciones de aminoácidos L234A/L235A/E294Del, y el ADN resultante que codifica el polipéptido de la cadena pesada se insertó en el vector pcDNA3.4-TOPO para preparar un vector de expresión para la cadena pesada que tiene las mutaciones de aminoácidos L234A/L235A/E294Del. Las células ExpiCHO-S se transfectaron con el vector

de expresión para la cadena pesada que tiene las mutaciones de aminoácidos L234A/L235A/E294Del y el vector de expresión de la cadena ligera preparado en el Ejemplo 1, y se cultivaron. Un anticuerpo se purificó mediante el mismo método que en el Ejemplo 1. El anticuerpo obtenido, es decir, el anticuerpo que tiene las mutaciones de aminoácidos L234A/L235A/E294Del en la región constante Ig γ 1 humana, se designó como LYS_E294Del_LALA_h1x. La Tabla 2 muestra la secuencia de aminoácidos y la secuencia de ácidos nucleicos del anticuerpo.

Tabla 2

Nombre del anticuerpo	Aminoácido de cadena pesada	Ácido nucleico de cadena pesada	Aminoácido de cadena ligera	Ácido nucleico de cadena ligera
LYS_E294Del_LALA_h1x	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4

LYS_E294Del_LALA_h1x se evaluó con respecto a su actividad de unión frente a Fc γ RI humano mediante el mismo método que en el Ejemplo 1, utilizando Biacore. Como resultado, la actividad de unión de LYS_E294Del_LALA_h1x frente a Fc γ RI humano desapareció. Un anticuerpo de este tipo, del cual ha desaparecido la actividad de unión frente a Fc γ RI humano, es útil para ejercer efectos terapéuticos mientras reduce las reacciones adversas en el tratamiento de ciertas afecciones.

Ejemplo 3: Preparación de un mutante de anticuerpo anti-lisozima sialilado y medición de la tasa de sialilación

Un mutante del anticuerpo anti-lisozima al que se le agregó ácido siálico se preparó mediante el método descrito a continuación utilizando células CHO, que se utilizan con frecuencia en la producción industrial de anticuerpos. Las células CHO no expresan α 2,6-sialiltransferasa (MAbs, 2015, Vol. 7 (3), p. 571-83). Por lo tanto, con el fin de conferir ácido siálico enlazado en α 2,6 al anticuerpo, el ADN que codifica el polipéptido de β -galactósido α -2,6-sialiltransferasa 1 (ST6GAL1) (UniProt: P15907-1) se insertó en el vector pcDNA3.4-TOPO para preparar un vector de expresión.

Las células ExpiCHO-S se transfectaron con el vector de expresión de ST6GAL1, junto con el vector de expresión para la cadena pesada que tiene la mutación de aminoácido E294Del preparado en el Ejemplo 1 y el vector de expresión de la cadena ligera preparado en el Ejemplo 1, o bien con el vector de expresión para la cadena pesada que tiene las mutaciones de aminoácidos L234A/L235A/E294Del preparado en el Ejemplo 2 y el vector de expresión de la cadena ligera preparado en el Ejemplo 1, de modo que ST6GAL1 y cada anticuerpo se coexpresaran. La cantidad de cada vector de expresión agregado se ajustó de tal manera que la proporción del vector de expresión que codifica ST6GAL1 con respecto al total del vector de expresión de la cadena pesada y el vector de expresión de la cadena ligera fuera del 2 %. Cada anticuerpo se purificó mediante el mismo método que en el Ejemplo 1. El anticuerpo que tiene la región constante Ig γ 1 humana con la mutación de aminoácido E294Del se designó como LYS_E294Del_h1x-ST6_2%. El anticuerpo que tiene la región constante Ig γ 1 humana con las mutaciones de aminoácidos L234A/L235A/E294Del se designó como LYS_E294Del_LALA_h1x-ST6_2%.

A cada anticuerpo se le agregó ditiotreitol (Thermo Fisher Scientific Inc., A39255) y se incubó a 37

°C durante 1 hora para reducir un enlace disulfuro intercatenario. La muestra reducida de esta manera se inyectó en un sistema HPLC (Waters Corp.), se separó a través de una columna de fase inversa (Waters Corp., ACQUITY UPLC Protein BEH C4) y, posteriormente, se introdujo en un espectrómetro de masas (Waters Corp.). Las modificaciones de las cadenas de azúcares se atribuyeron a sus respectivos tipos comparando el peso molecular teórico de las cadenas de azúcares agregadas al peso molecular del anticuerpo reducido con la masa realmente medida, y la proporción (%) de cada cadena de azúcares se calculó a partir de una relación de intensidad iónica. La proporción total de las cadenas de azúcar que contienen ácido siálico se definió como la “tasa de sialilación (%)”. La tasa de sialilación se calculó de acuerdo con la siguiente expresión.

Tasa de sialilación (%) = (Intensidad total de MS de una cadena H modificada con la cadena de azúcar enlazada a ácido siálico) / (Intensidad total de MS de todas las cadenas H) × 100.

Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

Nombre del anticuerpo	Tasa de sialilación (%)
LYS_E294Del_h1x-ST6_2%	22.9
LYS_E294Del_LALA_h1x-ST6_2%	28.0

Inesperadamente, LYS_E294Del_LALA_h1x-ST6_2% presentó una tasa de sialilación más alta que la de LYS_E294Del_h1x-ST6_2%. En resumen, la combinación de la mutación E294Del y las mutaciones L234A/L235A mejoró la tasa de sialilación del anticuerpo en comparación con la mutación E294Del sola.

Ejemplo 4: Análisis de la estructura tridimensional del anticuerpo

Con el fin de analizar la causa de la tasa de sialilación aumentada observada en el Ejemplo 3, se construyeron estructuras modelo para el anticuerpo que tiene la mutación E294Del, el anticuerpo que tiene las mutaciones L234A/L235A/E294Del, un anticuerpo que tiene las mutaciones L234A/L235E/E294Del y un anticuerpo que tiene las mutaciones L234F/L235Q/E294Del, y se analizaron sus estructuras tridimensionales. Para las estructuras modelo, se seleccionó la estructura de longitud completa de IgG1 (código PDB: 1HZH), en la que se observa el enlace S-S de una región bisagra de IgG y se forma un anclaje hidrofóbico de L234/L235. Las cadenas de azúcar de IgG1 en la estructura de longitud completa de IgG1 se sustituyeron por cadenas de azúcar con ácido siálico unido, aisladas de una estructura Fc sialilada (código PDB: 4BYH). Posteriormente, se introdujeron en la misma cada una de las mutaciones E294Del, las mutaciones L234A/L235A/E294Del, las mutaciones L234A/L235E/E294Del y las mutaciones L234F/L235Q/E294Del.

(1) Estructura modelo de IgG1

L234/L235 de IgG1 forma una fuerte interacción de Van der Waals entre las cadenas de un dímero. A través de esta interacción se forma un anclaje, y el receptor Fcγ se une al mismo (J. Biol. Chem., 2017, Vol. 292 (9), p. 3900-3908; y Nature, 2000, Vol. 406, p. 267-273). En la estructura de longitud completa de IgG1, L234/L235 y la cadena de azúcar enlazada al grupo amino de una cadena lateral en la posición N297

entran en contacto entre los dominios CH2 de un dímero (Figura 1). Por lo tanto, se considera que la interacción de L234/L235 y la cadena de azúcar contribuye a la formación estructural y a la estabilidad del dímero CH2.

(2) Estructura modelo de IgG1 sialilada que alberga la mutación E294Del

5 Como resultado del análisis de la estructura modelo de IgG1 del mutante E294Del sialilado, se encontró que el mutante E293 o E294Del, que tiene una mutación que mejora la tasa de sialilación, presenta la delección de solo un residuo y, sin embargo, acorta en 3 residuos un bucle que incluye N297, situado en el lado C-terminal con respecto a dicha posición (una cadena constituida por aminoácidos; en lo sucesivo, denominada “bucle N297”). Se confirmó que el acortamiento del bucle N297 resulta en un
10 desplazamiento en la posición espacial de N297, de modo que la cadena de azúcar enlazada a N297 se deforma (Figura 2). Se considera que esta distorsión facilita el acceso de la glicosiltransferasa, o bien que un cambio conformacional secundario en todo el CH2 incrementa la tasa de sialilación.

A continuación, como resultado del análisis de la interfaz del dímero de L234/L235, se observó que la cadena de azúcar en la interfaz del dímero CH2 estaba distorsionada, mientras que aún se confirmó la
15 fuerte interacción de Van der Waals entre L234 y L235 (Figura 3).

(3) Estructura modelo de IgG1 sialilada que alberga las mutaciones L234A/L235A/E294Del

Como resultado de la preparación y el análisis de la estructura modelo del mutante con delección E294 y L234A/L235A, se confirmó que la interacción de Van der Waals L234A/L235A es más débil que la interacción L234/L235, de modo que se creó espacio entre estos sitios (Figura 4). Se considera que este
20 cambio contribuye a la mejora de la tasa de sialilación.

(4) Estructura modelo de IgG1 sialilada que alberga las mutaciones L234A/L235E/E294Del

Como resultado de la preparación y el análisis de la estructura modelo del mutante con delección E294 y L234A/L235E, se confirmó que la alanina (A) y el ácido glutámico (E) se enfrentan entre L234A y L235E, y que la interacción de Van der Waals L234A/L235E se ve así debilitada, de modo que se crea
25 espacio entre estos sitios (Figura 5). Al igual que en el anticuerpo que tiene las mutaciones L234A/L235A/E294Del, se considera que este cambio contribuye a la mejora de la tasa de sialilación.

(5) Estructura modelo de IgG1 sialilada que alberga las mutaciones L234F/L235Q/E294Del

Como resultado de la preparación y el análisis de la estructura modelo del mutante con delección E294 y L234F/L235Q, se confirmó que la fenilalanina (F) y la glutamina (Q) se enfrentan entre L234F y L235Q, y que la interacción de Van der Waals L234F/L235Q se ve así debilitada, de modo que se crea
30 espacio entre estos sitios (Figura 6). Al igual que en el anticuerpo que tiene las mutaciones L234A/L235A/E294Del, se considera que este cambio contribuye a la mejora de la tasa de sialilación.

(6) Discusión sobre la mutación que mejora la tasa de sialilación

La delección E294 y las mutaciones L234A/L235A mejoraron la tasa de sialilación en comparación
35 con la mutación de delección E294 sola, presumiblemente porque la interacción de Van der Waals L234/L235 del dímero se debilitó. Por lo tanto, se considera que la delección E294 y el cambio de L234/L235 a aminoácidos menos hidrofóbicos que la leucina (L), o el cambio de los residuos L234/L235 que se enfrentan entre sí a una combinación hidrofóbica/hidrofílica, debilitan la interacción de Van der Waals y

mejoran la tasa de sialilación.

Además de la interacción de Van der Waals, el cambio de L234/L235 a aminoácidos más pequeños que L sirve como una mutación que interrumpe la formación del anclaje entre L234 y L235 y también se considera que mejora la tasa de sialilación.

5 Ejemplo 5: Preparación de un anticuerpo anti-isoforma del dominio adicional A de la fibronectina (Fn-EDA)

El ADN que codifica un polipéptido de cadena pesada que tiene las mutaciones de aminoácidos E294Del o L234A/L235A/E294Del agregadas a la secuencia de la cadena pesada de un anticuerpo anti-isoforma del dominio adicional A de la fibronectina (Fn-EDA) se insertó en el vector pcDNA3.4-TOPO para preparar un vector de expresión para la cadena pesada que tiene la mutación de aminoácido E294Del, y un vector de expresión para la cadena pesada que tiene las mutaciones de aminoácidos L234A/L235A/E294Del. El ADN que codifica el polipéptido de la cadena ligera del anticuerpo anti-Fn-EDA se sintetizó de conformidad con un método rutinario y se insertó en el vector pcDNA3.4-TOPO para preparar un vector de expresión de la cadena ligera.

Las células ExpiCHO-S se transfectaron con el vector de expresión de ST6GAL1 preparado en el Ejemplo 3, junto con el vector de expresión para la cadena pesada que tiene la mutación de aminoácido E294Del y el vector de expresión de la cadena ligera, o con el vector de expresión para la cadena pesada que tiene las mutaciones de aminoácidos L234A/L235A/E294Del y el vector de expresión de la cadena ligera, de modo que ST6GAL1 y cada anticuerpo se coexpresaran. La cantidad de cada vector de expresión agregado se ajustó de tal manera que la proporción del vector de expresión que codifica ST6GAL1 con respecto al total del vector de expresión de la cadena pesada y el vector de expresión de la cadena ligera fuera del 0.5%, 1%, 2% y 5%. Cada anticuerpo se purificó mediante el mismo método que en el Ejemplo 1.

El anticuerpo que tiene la región constante Igγ1 humana con la mutación de aminoácido E294Del se designó como GLY_F8_E294Del_h1x, que se designó como GLY_F8_E294Del_h1x (0.5%), GLY_F8_E294Del_h1x (1%), GLY_F8_E294Del_h1x (2%) y GLY_F8_E294Del_h1x (5%) dependiendo de la cantidad de ST6GAL1 coexpresada. El anticuerpo que tiene la región constante Igγ1 humana con las mutaciones de aminoácidos L234A/L235A/E294Del se designó como GLY_F8_E294Del_LALA_h1x, que se designó como GLY_F8_E294Del_LALA_h1x (0.5%), GLY_F8_E294Del_LALA_h1x (1%), GLY_F8_E294Del_LALA_h1x (2%) y GLY_F8_E294Del_LALA_h1x (5%) dependiendo de la cantidad de ST6GAL1 coexpresada. La Tabla 4 muestra la secuencia de aminoácidos y la secuencia de ácidos nucleicos de cada anticuerpo.

Tabla 4

	Aminoácido de cadena pesada	Ácido nucleico de cadena pesada	Aminoácido de cadena ligera	Ácido nucleico de cadena ligera
Nombre del anticuerpo				
GLY_F8_E294Del_h1x	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12
GLY_F8_E294Del_LALA_h1x	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12

Cada anticuerpo se analizó con respecto a su tasa de sialilación mediante el método descrito en el

Ejemplo 3. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5

	Nombre del anticuerpo	Tasa de sialilación (%)
	GLY_F8_E294Del_h1x(0.5%)	5.3
5	GLY_F8_E294Del_LALA_h1x(0.5%)	8.3
	GLY_F8_E294Del_h1x(1%)	6.8
	GLY_F8_E294Del_LALA_h1x(1%)	10.5
	GLY_F8_E294Del_h1x(2%)	7.0
	GLY_F8_E294Del_LALA_h1x(2%)	10.8
10	GLY_F8_E294Del_h1x(5%)	5.9
	GLY_F8_E294Del_LALA_h1x(5%)	10.4

Bajo todas las condiciones de coexpresión de ST6GAL1, el anticuerpo anti-Fn-EDA que tiene las mutaciones L234A/L235A/E294Del exhibió una tasa de sialilación más alta que la del anticuerpo anti-Fn-EDA que tiene la mutación E294Del.

Ejemplo 6: Preparación de un anticuerpo variante anti-Fn-EDA

Las regiones marco (FR) de la cadena pesada y de la cadena ligera de cada anticuerpo anti-Fn-EDA obtenido en el Ejemplo 5 se sustituyeron por las secuencias FR de otro anticuerpo humano conocido en la técnica. Con el fin de reducir el riesgo latente de glicación, se introdujo adicionalmente una mutación K94R en la secuencia de la región variable de la cadena pesada para preparar un anticuerpo variante anti-Fn-EDA. Un método de preparación específico es el siguiente.

Se sintetizaron ADN que codifican los polipéptidos de una cadena pesada y una cadena ligera de un anticuerpo variante anti-Fn-EDA de conformidad con un método rutinario, y cada uno se insertó en el vector pcDNA3.4-TOPO para preparar un vector de expresión de la cadena pesada y un vector de expresión de la cadena ligera. Un gen que codifica la secuencia de la región variable de la cadena pesada de un anticuerpo variante anti-Fn-EDA se enlazó a un gen que codifica Igγ1 humana que tiene las mutaciones de aminoácidos L234A/L235A, E294Del o L234A/L235A/E294Del, y el ADN resultante que codifica el polipéptido de la cadena pesada se insertó en el vector pcDNA3.4-TOPO para preparar un vector de expresión para la cadena pesada que tiene las mutaciones de aminoácidos L234A/L235A, un vector de expresión para la cadena pesada que tiene la mutación de aminoácido E294Del, y un vector de expresión para la cadena pesada que tiene las mutaciones de aminoácidos L234A/L235A/E294Del.

A continuación, las células ExpiCHO-S® se transfectaron con el vector de expresión que codifica ST6GAL1 preparado en el Ejemplo 3, junto con el vector de expresión de la cadena pesada y el vector de expresión de la cadena ligera, el vector de expresión para la cadena pesada que tiene las mutaciones de aminoácidos L234A/L235A y el vector de expresión de la cadena ligera, el vector de expresión para la cadena pesada que tiene la mutación de aminoácido E294Del y el vector de expresión de la cadena ligera, o el vector de expresión para la cadena pesada que tiene las mutaciones de aminoácidos L234A/L235A/E294Del y el vector de expresión de la cadena ligera, obtenidos como se describió

anteriormente, para que ST6GAL1 y cada anticuerpo se coexpresaran. La cantidad de cada vector de expresión agregado se ajustó de tal manera que la proporción del vector de expresión que codifica ST6GAL1 con respecto al total del vector de expresión de la cadena pesada y el vector de expresión de la cadena ligera fuera del 5 %.

- 5 Posteriormente, cada anticuerpo se purificó mediante el mismo método que en el Ejemplo 1. El anticuerpo que tiene la región constante Ig γ 1 humana (Fc no variante) se designó como SSA_m3_K94R_h10. El anticuerpo que tiene las mutaciones de aminoácidos L234A/L235A en la región constante Ig γ 1 humana se designó como SSA_m3_K94R_h1g. El anticuerpo que tiene la mutación de aminoácido E294Del en la región constante Ig γ 1 humana se designó como SSA_E294Del_m3_K94R_h1x.
- 10 El anticuerpo que tiene las mutaciones de aminoácidos L234A/L235A/E294Del en la región constante Ig γ 1 humana se designó como SSA_E294Del_LALA_m3_K94R_h1x. La Tabla 6 muestra la secuencia de aminoácidos y la secuencia de ácidos nucleicos de cada anticuerpo.

Tabla 6

Nombre del anticuerpo	Aminoácido de cadena pesada	Ácido nucleico de cadena pesada	Aminoácido de cadena ligera	Ácido nucleico de cadena ligera
SSA_m3_K94R_h10	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18
SSA_m3_K94R_h1g	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18
SSA_E294Del_m3_K94R_h1x	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18
SSA_E294Del_LALA_m3_K94R_h1x	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18

Cada anticuerpo se analizó con respecto a su tasa de sialilación mediante el método descrito en el

- 20 Ejemplo 3. Los resultados se muestran en la tabla 7.

Tabla 7

Nombre del anticuerpo	Tasa de sialilación (%)
SSA_m3_K94R_h10	1.3
SSA_m3_K94R_h1g	0.0
SSA_E294Del_m3_K94R_h1x	16.5
SSA_E294Del_LALA_m3_K94R_h1x	21.9

- 25 Rara vez se incorporó ácido siálico al Fc no variante y al anticuerpo que tiene las mutaciones L234A/L235A, mientras que la tasa de sialilación se incrementó en el anticuerpo que tiene la mutación E294Del. La tasa de sialilación se incrementó aún más en el anticuerpo que tiene la mutación E294Del y las mutaciones L234A/L235A, en comparación con el anticuerpo que tiene únicamente la mutación
- 30 E294Del.

- 35 Cuando los anticuerpos anti-Fn-EDA obtenidos en el Ejemplo 5 y preparados en las mismas condiciones que las descritas anteriormente (es decir, GLY_F8_E294Del_h1x (5%) y GLY_F8_E294Del_LALA_h1x (5%)) se compararon con los anticuerpos variantes anti-Fn-EDA obtenidos en este Ejemplo (es decir, SSA_E294Del_m3_K94R_h1x y SSA_E294Del_LALA_m3_K94R_h1x), los anticuerpos variantes anti-Fn-EDA exhibieron una tasa de sialilación más alta entre todos los anticuerpos que tenían la mutación E294Del y los anticuerpos que tenían la mutación E294Del junto con las mutaciones L234A/L235A. Estos resultados indican que la conversión de las secuencias FR puede aumentar la tasa de sialilación de la región Fc.

Las secuencias de aminoácidos y las secuencias de ADN de los polipéptidos de acuerdo con una modalidad se muestran en las tablas siguientes.

5

10

15

20

25

30

35

[Tabla 8-1]

Tabla 8

SEQ ID NO:	Nombre de la secuencia	Organismo del cual se deriva la secuencia	ADN/ proteína	Información de la secuencia
1	anti-LYS_cadena H	Ser humano	Proteína	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFSSSWVNWVRQAPGQGLEWMGRIYPGDGDTDYN GKFKGRVTLTADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARRRGYEAVFDYWGQGLTVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K

[Tabla 8-2]

Tabla 8 (continuación)

2	anti- LYS_cadena H	Ser humano	ADN	CAGGTGCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCTGTGAAGGTGT CCTGCAAGGCTTCTGGCTACGCCTTCTCCTCCTCCTGGGTCAACTGGGTCCGACAGGCTCCT GGACAAGGCCTGGAATGGATGGGCAGAATCTATCCTGGCGACGGCGACACCGACTACAACG GCAAGTTTAAGGGCAGAGTGACCCTGACCGCCGACAAGTCTACCTCCACCGCCTACATGGAA CTGTCCAGCCTGAGATCTGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCTCGGAGAAGAGGCTACG AGGCCGTGTTTGATTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCTCTGCTTCTACCAAG GGACCCAGCGTGTTCCCTCTGGCTCCTAGCTCTAAGTCCAACCTCTGGCGGAACAGCTGCTCT GGGCTGTCTGGTCAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGTCTTGGAACCTCTGGCGCTC TGACATCCGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAATCCTCCGGCCTGTACTCTCTGTCC TCCGTCGTGACCGTGCCTTCTAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCA CAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGTCCTGCGACAAGACCCAC ACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAACTGCTCGGCGGACCTTCCGTGTTTCTGTTCCCTCC AAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCTCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGAT GTGTCTCACGAGGACCCAGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACA ACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCT GACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAG GCCCTGCCTGCTCCTATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCC AGGTTTACACCTTGCCTCCATCTCGGGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGT CTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCTAATGGCCAGCCAG AGAACAACCTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCTGTACTCC AAGCTGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGC ACGAGGCCCTGCACAATCACTACACACAGAAGTCCCTGTCTCTGTCCCCTGGCAAG
---	--------------------------	---------------	-----	--

3

25

20

15

10

5

[Tabla 8-3]

Tabla 8 (continuación)

3	anti- LYS_cadena L	Ser humano	Proteína	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASESVDNYDISFLNWFQQKPGKAPKLLIYAASNQGSVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSKEVPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
4	Cadena anti- LYS_L	Ser humano	ADN	GACATCCAGCTGACCCAGAGCCCTTCCAGCCTGTCTGCTTCCGTGGGCGACAGAGTGACCA TCACCTGTCGGGCCTCCGAGTCCGTGGACAACACTACGATATCTCCTTCCCTGAACTGGTTCCAG CAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGCCGCTCCAATCAGGGCTCCGGCG TGCCCTCTAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCGACTTTACCCTGACCATCTCCAGCCTG CAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTCCAAAGAGGTGCCCTACACCTTCG GCGGAGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTCATCTTCCC ACCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCTTCTGTCTGTGCTGCTGAACAACCTTCT ACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCC AGGAATCCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCCTCCACCCTGAC CCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGC CTGTCTAGCCCCGTGACCAAGTCTTTCAACCGGGGCGAGTGC
5	anti- LYS_cadena H_E294Del	Ser humano	Proteína	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFSSSWVNWVRQAPGQGLEWMGRIYPGDGDTDYN GKFKGRVTLTADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARRRGYEAVFDYWGGQGLTVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

3

[Tabla 8-4]

Tabla 8 (continuación)

6	anti- LYS_cadena H_E294Del	Ser humano	ADN	CAGGTGCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCTGTGAAGGTGT CCTGCAAGGCTTCTGGCTACGCCTTCTCCTCCTCCTGGGTCAACTGGGTCCGACAGGCTCCT GGACAAGGCCTGGAATGGATGGGCAGAATCTATCCTGGCGACGGCGACACCGACTACAACG GCAAGTTTAAGGGCAGAGTGACCCTGACCGCCGACAAGTCTACCTCCACCGCCTACATGGAA CTGTCCAGCCTGAGATCTGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCTCGGAGAAGAGGCTACG AGGCCGTGTTTGATTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCTCTGCTTCTACCAAG GGACCCAGCGTGTTCCCTCTGGCTCCTAGCTCTAAGTCCACCTCTGGCGGAACAGCTGCTCT GGGCTGTCTGGTCAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGTCTTGGAACCTCTGGCGCTC TGACATCCGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAATCCTCCGGCCTGTACTCTCTGTCC TCCGTCGTGACCGTGCCTTCTAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCA CAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGTCCTGCGACAAGACCCAC ACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAACTGCTCGGCGGACCTTCCGTGTTTCTGTTCCCTCC AAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCTCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGAT GTGTCTCACGAGGACCCAGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACA ACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGCAGTACAACTCCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGAC CGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCC CTGCCTGCTCCTATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCCAGG TTTACACCTTGCCTCCATCTCGGGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTC GTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCTAATGGCCAGCCAGAGA ACAACTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCTGTACTCCAAG CTGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACG AGGCCCTGCACAATCACTACACACAGAAGTCCCTGTCTCTGTCCCCTGGCAAG
---	----------------------------------	---------------	-----	--

35

25

20

15

10

5

[Tabla 8-5]

Tabla 8 (continuación)

7	anti- LYS_cadena H_L234A/L2 35A/E294Del	Ser humano	Proteína	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFSSSWVNWVRQAPGQGLEWMGRIYPGDGDTDYNG KFKGRVTLTADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARRRGYEAVFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT EVTCTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
8	anti- LYS_cadena H_L234A/L2 35A/E294Del	Ser humano	ADN	CAGGTGCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCTGTGAAGGTGTC CTGCAAGGCTTCTGGCTACGCCTTCTCCTCCTCCTGGGTCAACTGGGTCCGACAGGCTCCTGG ACAAGGCCTGGAATGGATGGGCAGAATCTATCCTGGCGACGGCGACACCGACTACAACGGCA AGTTTAAGGGCAGAGTGACCCTGACCGCCGACAAGTCTACCTCCACCGCCTACATGGAAGTGT CCAGCCTGAGATCTGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCTCGGAGAAGAGGCTACGAGGCC GTGTTTGATTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGTCTCTGCTTCTACCAAGGGACCC AGCGTGTTCCCTCTGGCTCCTAGCTCTAAGTCCACCTCTGGCGGAACAGCTGCTCTGGGCTGT CTGGTCAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGTCTTGGAAGTCTGGCGCTCTGACATCC GGCGTGACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAATCCTCCGGCCTGTACTCTCTGCTCCTCCGTCGTG ACCGTGCTTCTAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTTCC AACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGTCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCTCC ATGTCCTGCTCCAGAAGCTGCTGGCGGCCCTTCCGTGTTTCTGTTCCCTCCAAAGCCTAAGGA CACCTGATGATCTCTCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCACGAGG ACCCAGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGACACAACGCCAAGACCAAG CCTAGAGAGCAGTACAACCTCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGACACAGGAT TGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAA AAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCCAAGGTTTACACCTTGCCTCCATCT CGGGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTC CGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCTAATGGCCAGCCAGAGAACAACTACAAGACAACCCCTCC TGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCCTGTACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCAGATG GCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACACA GAAGTCCCTGTCTCTGTCCCCTGGCAAG

[Tabla 8-6]

Tabla 8 (continuación)

9	anti-Fn EDA_cadena H_E294Del	Ser humano	Proteína	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLFTMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADS VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
10	anti-Fn EDA_cadena H_E294Del	Ser humano	ADN	GAAGTTCAACTCGTGGAATCCGGCGGCGGCCTGGTTCAGCCAGGTGGCAGCCTCCGACTCT CATGTGCAGCCAGTGGATTACATTACAGTCTTTTACCATTGTCTTGGGTAGGCAGGCTCCC GGAAAGGGCCTGGAATGGGTTTCAGCAATCAGCGGATCAGGTGGCAGTACCTACTACGCTG ATAGCGTCAAGGGCCGTTTACAATCAGTCGGGACAATAGCAAGAATACTCTTTATCTTCAAA TGAATAGCCTGCGCGCAGAAGATACAGCCGTCTACTATTGCGCAAAGTCAACTCATCTCTAC CTCTTTGATTATTGGGGACAGGGCACCCTTGTGACAGTAAGCTCAGCCTCCACAAAAGGTCC TTCTGTGTTTCTCTCGCTCCATCTTCCAAATCAACCTCAGGTGGCAGCAGCCGCCCTTGGGT GCCTCGTTAAAGATTACTTCCCTGAACCTGTTACCGTCAGCTGGAACAGCGGAGCCCTGACC TCCGGAGTCCACACTTTCCAGCTGTTCTGCAGAGCAGTGGCCTCTACTCACTCAGCAGTGT TGTGACTGTCCCTTCAAGTTCTTTGGGTACACAACTTATATCTGCAACGTTAACCACAAACCA TCCAACACCAAAGTCGATAAGAAGGTGAGCCTAAGTCCTGCGACAAAACCTCATACTTGCCC ACCCTGCCCCGCACCAGAGCTCTTGGGAGGTCCAAGCGTCTTTCTCTTCCCTCCTAAACCCA AGGATACACTTATGATATCAAGAACCCCTGAGGTCACATGTGTGTCGTCGACGTATCACATG AGGACCCTGAGGTGAAATTCAATTGGTACGTAGATGGCGTCGAAGTCCATAATGCTAAGACC AAACCTCGAGAACAGTATAACAGTACTTACCGAGTAGTTTTCAGTCTTGACTGTGTTGCACCAG GACTGGCTCAACGGGAAGGAATACAAATGCAAAGTTTCTAACAAGGCTTTGCCTGCTCCAATT GAGAAAATATTAGCAAGGCCAAGGGTCAGCCCCGTGAGCCACAAGTATATACTCTTCCTCC TTCAAGGGACGAATTGACCAAGAACCAGGTTTCTTGACTTGCTTGGTTAAAGGATTCTACCC CAGTGACATCGCAGTGGAATGGGAAAGTAACGGGCAGCCTGAGAATAATTACAAGACTACTC CTCCTGTGCTTGATTGAGATGGAAGTTTCTTCTTTACAGTAAGTTGACTGTAGACAAAAGTC GATGGCAACAAGGGAATGTGTTTTCTGTTCTGTGATGCATGAGGCATTGCATAACCATTATA CACAGAAATCCCTGTCATTGTCCCCAGGTAAA

35

25

20

15

10

5

[Tabla 8-7]

Tabla 8 (continuación)

11	anti-Fn EDA_cadena L	Ser humano	Proteína	EIVLTQSPGTL ³⁵ SLSPGEKATL ²⁵ SCRASQSVSMPFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSG SGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQMRGRPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLN ²⁰ NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK ¹⁵ STYLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVT ¹⁰ KSFNRGEC
12	anti-Fn EDA_cadena L	Ser humano	ADN	GAAATAGTATTGACCCAGTCACCTGGTACACTGTCACTGTCTCCAGGAGAAAAGGCAACCTT GTCATGCCGGGCAAGCCAGTCTGTGTCCATGCCTTTCTTGGCATGGTACCAGCAGAAGCCAG GTCAAGCTCCCAGGCTGCTTATCTATGGAGCTAGCTCTAGGGCTACCGGTATTCCTGACCGG TTCAGCGGCTCAGGCTCTGGGACCGATTTCACTCACCATTAGCAGACTGGAACCTGAAGA CTTTGCTGTCTACTACTGCCAGCAGATGCGAGGAAGACCTCCACCTTCGGTCAGGGTACTA AAGTGGAGATAAAGAGAACCGTCGCTGCTCCCTCTGTATTCAATTTCTCCAAGTGATGAAC AGCTGAAGTCCGGCACTGCCTCTGTGGTTTGCCTGCTCAACAAC ⁵ TTTTACCCACGCGAGGCC AAGGTGCAGTGAAGGTCGACAATGCTCTGCAGAGTGGAAATTCACAGGAAAGCGTGACAG AACAAGATTCCAAGGACTCCACATATAGCCTTAGTAGTACTCTGACTCTGTCCAAAGCCGATT ATGAGAAACATAAAGTATATGCCTGTGAGGTTACTCACCAGGGGCTGTCCAGTCCCGTGACA AAATCATTTA ³⁵ ACCGCGGCGAGTGC
13	anti-Fn EDA_cadena H_L234A/L2 35A/E294Del	Ser humano	Proteína	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS ³⁵ CAASGFTFSLFTMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADS VKGRFTISRDN ²⁵ SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS ²⁰ SS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT ¹⁵ P EVT ¹⁰ CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVS ⁵ NKALPAIEKTI ³⁵ SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTT ²⁵ PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV ²⁰ FSCSV ¹⁵ MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

35

[Tabla 8-8]

Tabla 8 (continuación)

14	anti-Fn EDA_cadena H_L234A/L2 35A/E294Del	Ser humano	ADN	GAAGTTCAACTCGTGGAATCCGGCGGGCGCCTGGTTTCAGCCAGGTGGCAGCCTCCGACTCT CATGTGCAGCCAGTGGATTACATTACAGTCTTTTCACCATGTCTTGGGTTAGGCAGGCTCCC GGAAAGGGCCTGGAATGGGTTTCAGCAATCAGCGGATCAGGTGGCAGTACCTACTACGCTG ATAGCGTCAAGGGCCGTTTCACAATCAGTCGGGACAATAGCAAGAATACTCTTTATCTTCAA TGAATAGCCTGCGCGCAGAAGATACAGCCGTCTACTATTGCGCAAAGTCAACTCATCTCTAC CTCTTTGATTATTGGGGACAGGGCACCCCTTGTGACAGTAAGCTCAGCTTCTACCAAGGGACC CAGCGTGTTCCCTCTGGCTCCTAGCTCTAAGTCCACCTCTGGCGGAACAGCTGCTCTGGGCT GTCTGGTCAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGTCTTGGAAGTCTGGCGCTCTGACA TCCGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAATCCTCCGGCCTGTACTCTCTGTCTCCGT CGTGACCGTGCCTTCTAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAGC CTTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGTCCTGCGACAAGACCCACACCTGT CCTCCATGTCCTGCTCCAGAAGCTGCTGGCGGCCCTTCCGTGTTTCTGTTCCCTCCAAAGCC TAAGGACACCCTGATGATCTCTCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTC ACGAGGACCCAGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAA GACCAAGCCTAGAGAGCAGTACAACTCCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTG CACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTG CTCCTATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCCAGGTTTACACC TTGCCTCCATCTCGGGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAGG GCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCTAATGGCCAGCCAGAGAACAACACTAC AAGACAACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCTGTACTCCAAGCTGACAGT GGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTG CACAATCACTACACACAGAAGTCCCTGTCTCTGTCCCCTGGCAAG
----	--	---------------	-----	--

[Tabla 8-9]

Tabla 8 (continuación)

15	Variante anti-Fn EDA_cadena H	Ser humano	Proteína	QVELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLFTMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADS VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSTHLYLFDYWGGQTLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
16	Variante anti-Fn EDA_cadena H	Ser humano	ADN	CAGGTGGAACCTGGTGGAACTCTGGCGGCGGATTGGTTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGT CTTGTGCCGCCTCCGGCTTCACCTTCAGCCTGTTTACAATGTCCTGGGTCCGACAGGCTCCT GGCAAAGGACTGGAATGGGTGTCCGCCATCTCTGGCAGCGGCGGCTCTACCTACTACGCCG ATTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACCTCCAAGAACACCCTGTACCTGCAG ATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAgaAGCACCCACCTGTA TCTGTTGACTATTGGGGCCAGGGCACCTGGTCACAGTGTCTCTGCTTCTACCAAGGGAC CCAGCGTGTTCCTCTGGCTCCTTCCAGCAAGTCTACCTCTGGCGGAACAGCTGCTCTGGGC TGCCTGGTCAAGGACTACTTTCTGAGCCTGTGACCGTGTCTCTGGAACCTCTGGCGCTCTGAC ATCTGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCTCTCCGGCCTGTACTCTCTGTCTCTG TCGTGACCGTGCCTTCCAGCTCTCTGGGAACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAG CCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGTCTGCGACAAGACCCACACCT GTCCTCCATGTCTCTGCTCCAGAACTGCTCGGCGGACCTTCCGTGTTTCTGTTCCCTCCAAAG CCTAAGGACACCCTGATGATCTCTCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTC TCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCAACGCC AAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGT GCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTG CCTGCTCCTATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCCAGGTTTA CACCTTGCCTCCATCTCGGGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGA AGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCTAATGGCCAGCCTGAGAACAAC TACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGACTCCGACGGCTCATTCTTCTGTACTCCAAGCTGAC AGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCC CTGCACAATCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCTCTGTCCCCTGGCAA

35

25

20

15

10

5

[Tabla 8-10]

Tabla 8 (continuación)

17	Variante anti-Fn EDA_cadena L	Ser humano	Proteína	DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSMPLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGVPARFSG SGSGTDFTLTISSELPEDFATYYCQQMRGRPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNFPYFREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
18	Variante anti-Fn EDA_cadena L	Ser humano	ADN	GACATCGTGCTGACCCAGTCTCCAGCCACACTGTCACTGTCTCCAGGCGAGAGAGCTACCCT GTCCTGTAGAGCCTCTCAGTCCGTGTCTATGCCCTTCTGCGCTGGTATCAGCAGAAGCCTG GACAGGCTCCCCGGCTGTTGATCTACGGCGCTTCTTCTAGAGCTACCGGCGTGCCCGCTAG ATTCTCCGGATCTGGCTCTGGCACCAGACTTTACCCTGACCATCAGCTCCCTGGAACCTGAGG ACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGATGAGAGGCAGACCTCCTACCTTTGGCCAGGGCACC AAGGTGGAAATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTCATCTTCCACCTTCCGACGA GCAGCTGAAGTCCGGCACCCTTCTGTCTGTGCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGCGAG GCCAAGGTGCAGTGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAATCCGTGA CCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCTCCACCCTGACCCTGTCCAAGGC CGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCTAGCCCC GTGACCAAGTCTTTCAACCGGGGCGAGTGC
19	Variante anti-Fn EDA_cadena H_L234A/L235 A	Ser humano	Proteína	QVELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLFTMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADS VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSTHLYLFDYWGGTLTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSST LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT P EVTCTVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

35

35

25

20

15

10

5

[Tabla 8-11]

Tabla 8 (continuación)

20	Variante anti-Fn EDA_cadena H_L234A/L235 A	Ser humano	ADN	CAGGTGGAAGTGGTGGAAATCTGGCGGCGGATTGGTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTC TTGTGCCGCCTCCGGCTTCACCTTCAGCCTGTTTCAATGTCCTGGGTCCGACAGGCTCCTGG CAAAGGACTGGAATGGGTGTCCGCCATCTCTGGCAGCGGCGGCTCTACCTACTACGCCGATT CTGTGAAGGGCAGATTACCATCAGCCGGGACAACCTCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGA ACTCCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGAAGCACCCACCTGTATCTGT TCGACTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTACAGTGTCTCTGCTTCTACCAAGGGACCCAGC GTGTTCCCTCTGGCTCCTTCCAGCAAGTCTACCTCTGGCGGAACAGCTGCTCTGGGCTGCCTG GTCAAGGACTACTTTTCTGAGCCTGTGACCGTGTCTGGAAGTCTGGCGCTCTGACATCTGGC GTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCTCCGGCCTGTACTCTGTCTCTGTCTGTGACG GTGCCTTCCAGCTCTCTGGGAACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTTCCAAC ACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAAGTCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGT CCTGCTCCAGAAGCTGCTGGCGGCCCTTCCGTGTTTCTGTTCCCTCCAAAGCCTAAGGACACC CTGATGATCTCTCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCACGAGGATCCC GAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAG AGAGGAACAGTACAACCTCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTG GCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAAAA GACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCCAGGTTTACACCTTGCCTCCATCTCG GGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCG ATATCGCCGTGGAATGGGAGTCTAATGGCCAGCCTGAGAACAACCTACAAGACAACCCCTCCTG TGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCTGTACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCAGATGGC AGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGA AGTCCCTGTCTCTGTCCCCTGGCAAA
21	Variante anti-Fn EDA_cadena H_E294Del	Ser humano	Proteína	QVELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLFTMSWVRQAPGKLEWVSAISGSGGSTYYADSV KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSTHLYLFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

40

35

25

20

15

10

5

[Tabla 8-12]

Tabla 8 (continuación)

22	Variante anti-Fn EDA_cadena H_E294Del	Ser humano	ADN	CAGGTGGAAGTGGTGGAACTCTGGCGGCGGATTGGTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTC TTGTGCCGCCTCCGGCTTCACCTTCAGCCTGTTACAATGTCCTGGGTCCGACAGGCTCCTGG CAAAGGACTGGAATGGGTGTCCGCCATCTCTGGCAGCGGCGGCTCTACCTACTACGCCGATT CTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACCTCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGA ACTCCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAgaAGCACCCACCTGTATCTGT TCGACTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACAGTGTCTCTGCTTCTACCAAGGGACCCAGC GTGTTCCCTCTGGCTCCTTCCAGCAAGTCTACCTCTGGCGGAACAGCTGCTCTGGGCTGCCTG GTCAAGGACTACTTTCTGAGCCTGTGACCGTGTCTGGAAGTCTGGCGCTCTGACATCTGGC GTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCTCCGGCCTGTACTCTCTGTCTCTGTCTGTGACC GTGCCTTCCAGCTCTCTGGGAACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTTCCAAC ACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGTCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCTCCATG TCCTGCTCCAGAACTGCTCGGCGGACCTTCCGTGTTTCTGTTCCCTCCAAAGCCTAAGGACAC CCTGATGATCTCTCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCACGAGGATCC CGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGACAACGCCAAGACCAAGCCTA GAGAGCAGTACAACCTCCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGG CTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAAAAG ACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCAGGTTTACACCTTGCCCTCCATCTCGG GACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGAT ATCGCCGTGGAATGGGAGTCTAATGGCCAGCCTGAGAACAACCTACAAGACAACCCCTCCTGTG CTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCTGTACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCAG CAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAG TCCCTGTCTCTGTCCCCTGGCAA
23	Variante anti-Fn EDA_cadena H_L234A/L235 A/E294Del	Ser humano	Proteína	QVELVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLFTMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSV KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARSTHLYLFDYWGGTLVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

3

25

20

15

10

5

[Tabla 8-13]

Tabla 8 (continuación)

24	Variante anti-Fn EDA_cadena H_L234A/L235 A/E294Del	Ser humano	ADN	CAGGTGGAAGTGGTGGAACTCTGGCGGAGGATTGGTTCAGCCTGGCGGCTCTCTGAGACTGTC TTGTGCCGCCTCTGGCTTCACCTTCAGCCTGTTACCATGTCCTGGGTCCGACAGGCTCCTGG CAAAGGACTGGAATGGGTGTCCGCCATCTCTGGCTCTGGCGGCAGCACCTACTACGCCGATT CTGTGAAGGGCAGATTACCATCAGCCGGGACAACCTCCAAGAACCCTGTACCTGCAGATGA ACTCCCTGAGAGCCGAGGACACCCGCCGTGTACTACTGTGCCAgaAGCACCCACCTGTATCTGT TCGACTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACAGTCTCTTCTGCTTCTACCAAGGGACCCAGCG TGTTCCCTCTGGCTCCTAGCTCTAAGTCCACCTCTGGCGGAACAGCTGCTCTGGGCTGTCTGG TCAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGTCTTGGAAGTCTGGCGCTCTGACATCCGGCG TGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAATCCTCCGGCCTGTACTCTCTGTCTCCTCCGTCTGACCG TGCCTTCTAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTTCCAACA CCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGTCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGT CCTGCTCCAGAAGCTGCTGGCGGCCCTTCCGTGTTTCTGTTCCCTCCAAAGCCTAAGGACACC CTGATGATCTCTCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCACGAGGACCC AGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGACACAACGCCAAGACCAAGCCTA GAGAGCAGTACAACTCCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGACACAGGATTGG CTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAAAAG ACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCAGGTTTACACCTTGCCTCCATCTCGG GACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGAT ATCGCCGTGGAATGGGAGTCTAATGGCCAGCCAGAGAACAACCTACAAGACAACCCCTCCTGTG CTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCTGTACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCAG CAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACACAGAAG TCCCTGTCTCTGTCCCCTGGCAAG
----	---	------------	-----	--

Aunque algunas modalidades de la presente invención se han descrito anteriormente, dichas modalidades se presentan a modo de ejemplo y no pretenden limitar el alcance de la invención. Estas modalidades novedosas pueden llevarse a cabo en otras diversas formas, y en las mismas pueden realizarse diversas omisiones, sustituciones y cambios o modificaciones sin apartarse de la esencia de la invención. Estas modalidades o sus modificaciones están incluidas en el alcance y la esencia de la invención y también están incluidas en el alcance de los aspectos de la invención descritos en las reivindicaciones y en un alcance equivalente a los mismos.

Aplicabilidad industrial

La variante de región Fc sialilada con una cantidad adicionalmente incrementada de ácido siálico agregada de acuerdo con la presente invención es útil en la prevención o el tratamiento de diversas enfermedades autoinmunes y enfermedades inflamatorias.

15

20

25

30

35