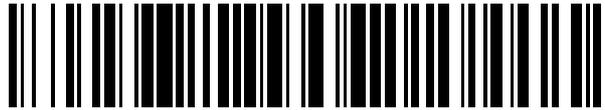


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 969**

51 Int. Cl.:

C07K 16/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.03.2007 E 07723539 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2012 EP 1999154**

54 Título: **Dominios de proteínas heterodiméricas genéticamente modificados**

30 Prioridad:

24.03.2006 US 785474 P

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

18.02.2013

73 Titular/es:

**MERCK PATENT GMBH (100.0%)
FRANKFURTER STRASSE 250
64293 DARMSTADT, DE**

72 Inventor/es:

**DAVIS, JONATHAN, H. y
HUSTON, JAMES, STAFFORD**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 395 969 T3

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

DESCRIPCIÓN

Dominios de proteínas heterodiméricas genéticamente modificados

Área de la invención.

5 La presente invención hace referencia a dominios de inmunoglobulina heterodimérica y métodos de producción de los mismos.

Antecedentes de la invención

10 La naturaleza proporciona una gran cantidad de proteínas heterodiméricas y dominios de proteínas que se encuadran en familias de proteínas relacionadas. Tales proteínas y dominios forman, a menudo, homodímeros entre ellos, pero no forman heterodímeros con otros miembros de la familia. Por otro lado, las proteínas heterodiméricas o heteromultiméricas resultan útiles a menudo. Proporcionan herramientas de investigación y de terapéutica novedosas. Por ejemplo, anticuerpos biespecíficos (BsAbs, por sus siglas en inglés) capaces de unirse a, al menos, dos antígenos diferentes, presentan un potencial significativo en una amplia gama de aplicaciones clínicas como agentes de determinación de dianas, para inmunodiagnóstico y terapia *in vitro* e *in vivo*, y para inmunoensayos diagnósticos. En el área diagnóstica, los BsAbs han resultado de gran utilidad en hibridar las propiedades funcionales de las moléculas de la superficie celular, y en definir la habilidad de los diferentes receptores Fc para mediar en la citotoxicidad (Fanger et al. (1992) Crit. Rev. Immunol, 12:101-124, los contenidos de la cual se incorporan a la presente patente a modo de referencia). Sin embargo, cuando los BsAbs se generan simplemente por coexpresión de múltiples componentes que pueden interactuar sin especificidad, se genera una gran cantidad de especies, y resulta difícil a menudo separar las especies deseadas de las especies no deseadas. Por lo tanto, resulta deseable poseer técnicas para producir heteromultímeros de manera eficiente. Resulta particularmente deseable generar subunidades de anticuerpos que formen heterodímeros de manera preferente a la formación de homodímeros, de manera que los BsAbs puedan ser recuperados directamente de cultivos celulares recombinantes.

15 20 25 Se ha informado sobre métodos de realización de proteínas heterodiméricas. Por ejemplo, Stahl y Yancopoulos han descrito el uso de las proteínas de fusión que incluyen dos subunidades receptoras diferentes para formar receptores heterodiméricos solubles que podían unirse a una citocina dada en circulación, y por tanto bloquear la actividad de dicha citocina (ver la Patente Estadounidense No. 6,472,179). Carter et al. han descrito un enfoque "protuberancia en la cavidad" para generar una fracción Fc heterodimérica (ver Patente Estadounidense No. 5,807,706).

30 Estos métodos existentes permiten las construcciones de heterodímeros individuales, pero no proporcionan técnicas generales para la construcción de proteínas multiméricas que implican interacciones de múltiples dominios. Por lo tanto, existe la necesidad de un sistema general para el diseño de pares heterodiméricos que puedan ensamblarse de manera específica en un entorno que contenga múltiples compañeros de ensamblaje potenciales diferentes.

Resumen de la invención

35 La presente invención proporciona una aproximación novedosa para el diseño de dominios de inmunoglobulina que se heterodimerizan, de manera preferente. En particular, la presente invención utiliza una estrategia de "Dominio Modificado por Intercambio de Cadena" (Strand Exchange Engineered Domain) (SEED, por sus siglas en inglés), para modificar por ingeniería genética la interfaz de interacción proteína-proteína dentro de dicha heterodimerización de dominios de inmunoglobulina. La invención también proporciona inmunoglobulinas que contienen dominios modificados por ingeniería genética utilizando el método de la presente invención.

40 45 50 En un aspecto, la presente invención presenta una inmunoglobulina heterodimérica multidominio, que incluye al menos un primer y un segundo dominio modificados no idénticos, cada uno de los cuales contiene una interfaz de interacción proteína-proteína que contiene segmentos de secuencia de aminoácidos derivados de dos o más dominios parentales homólogos naturales, concediendo, de ese modo, a los dominios primero y segundo modificados especificidades de ensamblaje distintas de las especificidades de ensamblaje de los dominios parentales, en donde los dominios primero y segundo modificados forman heterodímeros entre sí, de manera preferente a la formación de homodímeros (por ejemplo, los heterodímeros constituyen más del 55%, 65%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95% de la cantidad total de dímeros). Los dominios primero y segundo modificados no son dominios variables de anticuerpos. En algunos modos de realización, la inmunoglobulina multidominio de la invención incluye una primera subunidad que contiene el primer dominio modificado, y una segunda subunidad que contiene el segundo dominio modificado. Tal como se utiliza en la presente patente, un "segmento de secuencia de aminoácidos" incluye cualquier segmento de secuencia que contiene dos o más aminoácidos (por ejemplo, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, nueve o más, o diez o más).

En realizaciones preferentes, la inmunoglobulina multidominio incluye dominios no idénticos modificados por ingeniería genética a partir de dominios parentales homólogos naturales, por ejemplo, dominios CH3 de anticuerpos. En particular, los dominios modificados se derivan de los dominios CH3 de la IgG y la IgA.

5 En algunas realizaciones, la inmunoglobulina multidominio de la invención incluye dominios modificados que forman parte de cadenas polipeptídicas que se encuentran conectadas mediante un puente disulfuro.

10 En un modo de realización, uno de los dominios modificados contenidos en la inmunoglobulina multidominio de la invención, incluye, al menos, dos segmentos de secuencia no adyacentes derivados del mismo dominio parental. En otro modo de realización, cada uno de los dominios primero y segundo incluye al menos dos, tres, o cuatro o más segmentos de secuencia no adyacentes, derivados a partir del mismo dominio parental. En otro modo de realización, al menos uno de los dominios modificados incluye segmentos de secuencia de cada dominio parental que son de, al menos, dos aminoácidos de longitud. En otro modo de realización, al menos uno de los dominios modificados incluye segmentos de secuencia de cada dominio parental que son de, al menos, tres, cuatro, cinco o seis aminoácidos de longitud.

15 En algunos modos de realización, la inmunoglobulina multidominio de la invención incluye un primer dominio bio-activo. El primer dominio bio-activo puede ocupar una posición N-terminal o C-terminal con respecto al primer dominio modificado.

20 En modos de realización adicionales, la inmunoglobulina multidominio puede incluir, adicionalmente, un segundo dominio bio-activo además del primer dominio bio-activo. En un modo de realización, el segundo dominio bio-activo se encuentra asociado al segundo dominio modificado, y puede ocupar una posición N-terminal o C-terminal con respecto al segundo dominio modificado. En una realización alternativa, el segundo dominio bio-activo se encuentra también asociado al primer dominio modificado, y puede ocupar una posición opuesta al primer dominio bio-activo. Por ejemplo, los dominios bio-activos primero y segundo pueden ocupar posiciones N-terminal y C-terminal, respectivamente, respecto al primer dominio modificado.

25 La inmunoglobulina multidominio de la presente invención puede ser utilizada para generar anticuerpos biespecíficos. Por ejemplo, la proteína multidominio puede incluir un primer dominio bio-activo que contenga un dominio variable de anticuerpo, y un segundo dominio bio-activo que contenga un segundo dominio variable de anticuerpo con especificidad distinta.

30 En otro aspecto, la invención proporciona una inmunoglobulina multidominio, en donde la primera región bio-activa contiene dos o más dominios variables de anticuerpos de una primera especificidad, o de una primera combinación de especificidades. La proteína multidominio puede también contener una segunda región bio-activa que incluya dos o más dominios variables de anticuerpos de una segunda especificidad o una segunda combinación de especificidades. Por ejemplo, la proteína multidominio puede incluir una o más fracciones Fv de cadena única, un díptico de cadena única [un VH(1) – VL(2) -----VH(2) – VL(1)], u otras repeticiones fusionadas a Fv de cadena única (de las mismas o diferentes especificidades).

35 En otro aspecto, la invención proporciona una inmunoglobulina multidominio en donde la primera región bio-activa comprende dos o más dominios variables de anticuerpos de una primera especificidad o de una primera combinación de especificidades. La inmunoglobulina multidominio comprende, adicionalmente, una segunda región bio-activa que comprende dos o más dominios variables de anticuerpos de una segunda especificidad o segunda combinación de especificidades, que son sustancialmente distintas de la primera combinación de especificidades.

40 La presente invención describe, además, un método de colocación de dominios bio-activos cuando se administran a un sistema biológico. El método incluye el paso de administrar al sistema biológico la inmunoglobulina heterodimérica que incluye los dominios bio-activos primero y segundo, tal como se ha descrito anteriormente en varios modos de realización. En un modo de realización, el sistema biológico es un mamífero. En un modo de realización más preferente, el sistema biológico es un humano.

45 En otro aspecto, la presente invención proporciona una inmunoglobulina heterodimérica multidominio que incluye, al menos, un primer y un segundo dominio no idénticos que confluyen en una interfaz. La interfaz del primer dominio modificado contiene al menos dos segmentos de secuencias de aminoácidos, donde cada segmento se deriva de un dominio parental homólogo natural diferente, otorgando, de ese modo, una especificidad de ensamblaje distinta a la especificidad de ensamblaje de los dominios parentales, en donde los dominios modificados por ingeniería genética primero y segundo forman heterodímeros. En un modo de realización preferente, el segundo dominio modificado además contiene, al menos, dos segmentos de secuencia de aminoácidos, donde cada segmento se deriva de un dominio parental homólogo natural diferente, otorgando, de ese modo, una especificidad de ensamblaje distinta de la especificidad de ensamblaje de los dominios parentales, en donde los segundos dominios modificados por ingeniería genética forman heterodímeros.

En aún otro aspecto, la presente invención proporciona una inmunoglobulina multidominio que incluye, al menos, dominios primero y segundo modificados por ingeniería genética no idénticos que confluyen en una interfaz, en donde (1) los dominios primero y segundo modificados por ingeniería genética se derivan de dos o más dominios parentales homólogos naturales, (2) la interfaz del primer dominio modificado comprende al menos un segmento de secuencia de aminoácidos que interactúa con un segmento de secuencia de aminoácidos, sobre la interfaz del segundo dominio modificado por ingeniería genética derivado del mismo dominio parental, y (3) los dominios primero y segundo modificados por ingeniería genética forman heterodímeros.

En un aspecto adicional, la presente invención presenta un dominio de inmunoglobulina modificado por ingeniería genética que contiene una interfaz de interacción proteína-proteína que incluye aminoácidos de dos o más dominios de inmunoglobulina parental, de tal manera que la interfaz de interacción proteína-proteína otorga al dominio de inmunoglobulina modificado genéticamente especificidades de ensamblaje que son distintas a las especificidades de ensamblaje de los dominios de inmunoglobulina parentales, en donde el dominio de inmunoglobulina modificado genéticamente no es un dominio variable de anticuerpo. En modos de realización preferentes, el dominio de inmunoglobulina modificado genéticamente de la invención se ensambla con un dominio parental con especificidad aumentada, en comparación con los dominios parentales. En algunos modos de realización, el dominio parental es un dominio de inmunoglobulina modificado por ingeniería genética de la invención.

En aún otro aspecto, la presente invención proporciona un dominio de una superfamilia inmunoglobulina modificado genéticamente que contiene una interfaz de interacción proteína-proteína, que incluye aminoácidos de dos o más dominios de una superfamilia inmunoglobulina parental, de tal forma que la interfaz de interacción proteína-proteína otorga al dominio de la superfamilia inmunoglobulina modificado genéticamente propiedades de interacción que son distintas a las propiedades de interacción de los dominios de una superfamilia inmunoglobulina parental.

La invención, además, proporciona una inmunoglobulina multidominio que comprende un dominio modificado genéticamente con las siguientes propiedades. En primer lugar, el dominio modificado genéticamente comprende una interfaz de interacción proteína-proteína. En segundo lugar, el dominio modificado genéticamente es homólogo a una familia de dominios naturales, preferentemente de tal manera que la secuencia de aminoácidos del dominio modificado genéticamente pueda ser alineada con las secuencias de aminoácidos de los dominios naturales, las cuales pueden ser adicionalmente alineadas entre sí. De manera preferente, el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los dominios naturales corresponde a un alineamiento de las estructuras tridimensionales de los dominios naturales. En tercer lugar, la interfaz de interacción del dominio modificado por ingeniería genética comprende aminoácidos de posiciones de secuencias correspondientes de dos o más dominios parentales naturales. En cuarto lugar, no todos los aminoácidos en la interfaz del dominio modificado genéticamente, considerado como un grupo, se encuentran en la correspondiente interfaz de cualquier miembro individual de los dominios naturales homólogos. En quinto lugar, la interfaz de interacción del dominio modificado genéticamente otorga propiedades de ensamblaje distintas de cualquiera de los dominios parentales. De manera preferente, las propiedades de ensamblaje del dominio modificado genéticamente son distintivas porque la interfaz de interacción tiene aminoácidos de dos o más parentales que realizan contactos específicos con compañeros de ensamblaje, adquiriendo de este modo una especificidad de ensamblaje que es un híbrido entre las especificidades de ensamblaje de los dominios parentales.

Más aún, la presente invención proporciona un ácido nucleico que codifica una inmunoglobulina multidominio, tal como se ha descrito en varios modos de realización anteriormente. En particular, la presente invención proporciona un ácido nucleico que codifica una proteína multidominio que incluye al menos un dominio bio-activo. La presente invención, además, proporciona células que contienen el ácido nucleico de la invención.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método de diseño de una inmunoglobulina multidominio con dominios que heterodimerizan. El método incluye los siguientes pasos: (a) seleccionar un primer polipéptido, un segundo polipéptido, un tercer polipéptido y un cuarto polipéptido, en donde los polipéptidos primero y tercero dimerizan entre sí pero no con el segundo o cuarto polipéptido, y en donde dichos polipéptidos segundo y cuarto dimerizan entre sí, (b) constituir una secuencia de aminoácidos con un primer dominio de los polipéptidos primero y segundo que comprende, al menos, un elemento de ensamblaje del primer polipéptido, y (c) constituir una secuencia de aminoácidos de un segundo dominio de los polipéptidos tercero y cuarto que comprenden, al menos, un elemento de ensamblaje del tercer polipéptido, de tal manera que los elementos de ensamblaje de los polipéptidos primero y tercero ensamblen entre sí, promoviendo la heterodimerización de los dominios primero y segundo.

Otras características, objetos, y ventajas de la presente invención resultan evidentes en la descripción detallada que sigue a continuación. Debe entenderse, sin embargo, que la descripción detallada, aunque indica los modos de realización preferentes de la presente invención, se proporciona a modo de ilustración únicamente, no en modo limitativo. Varios cambios y modificaciones dentro del alcance de la invención resultarán evidentes para aquellos expertos en el arte a partir de la descripción detallada.

Para resumir, la invención hace referencia a:

- 5 • Una inmunoglobulina heterodimérica multidominio que comprende al menos un primer y un segundo dominio no idénticos modificados genéticamente, donde cada uno de los dominios modificados primero y segundo contiene una interfaz de interacción proteína-proteína que comprende segmentos de secuencia de aminoácidos derivados a partir de dos o más dominios parentales homólogos naturales, otorgando, de ese modo, a los dominios primero y segundo modificados genéticamente especificidades de ensamblaje distintas de las especificidades de ensamblaje de los dominios parentales, en donde los dominios primero y segundo modificados genéticamente forman heterodímeros.
- Una inmunoglobulina multidominio correspondiente, en donde la inmunoglobulina multidominio comprende una primera subunidad que comprende el primer dominio modificado, y una segunda subunidad que comprende el segundo dominio modificado genéticamente;
- 10 • Una inmunoglobulina multidominio correspondiente, en donde los dominios de inmunoglobulina son dominios CH3 de anticuerpo;
- Una inmunoglobulina multidominio correspondiente, en donde los dominios CH3 comprenden dominios CH3 de la IgG y la IgA;
- 15 • Una inmunoglobulina multidominio correspondiente, en donde los dominios primero y segundo modificados genéticamente son parte de las cadenas polipeptídicas que están asociadas mediante un puente disulfuro;
- Una inmunoglobulina multidominio correspondiente, en donde uno de los dominios modificados primero y segundo comprende al menos dos segmentos de secuencia no adyacentes derivados del mismo dominio parental;
- Una inmunoglobulina multidominio correspondiente, en donde cada uno de los dominios primero y segundo modificados genéticamente comprende al menos dos segmentos de secuencia no adyacentes derivados del mismo dominio parental;
- 20 • Una inmunoglobulina multidominio correspondiente, en donde cada uno de los segmentos de secuencia de aminoácidos comprende dos o más aminoácidos;
- Una inmunoglobulina multidominio correspondiente, en donde la interfaz de interacción proteína-proteína del primer dominio modificado genéticamente comprende al menos dos aminoácidos de cada dominio parental.
- 25 • Una inmunoglobulina multidominio correspondiente, en donde la inmunoglobulina multidominio comprende un primer dominio bio-activo;
- Una inmunoglobulina multidominio correspondiente, en donde el primer dominio bio-activo ocupa una posición N-terminal del primer dominio modificado genéticamente;
- 30 • Una inmunoglobulina multidominio correspondiente, en donde la inmunoglobulina multidominio comprende además un segundo dominio bio-activo;
- Una inmunoglobulina multidominio correspondiente, en donde el segundo dominio bio-activo ocupa una posición C-terminal del primer dominio modificado genéticamente;
- Una inmunoglobulina multidominio correspondiente, en donde el primer dominio bio-activo comprende un dominio variable de anticuerpo;
- 35 • Una inmunoglobulina multidominio correspondiente, en donde la inmunoglobulina multidominio además comprende un segundo dominio bio-activo que comprende un segundo dominio variable de anticuerpo con especificidad distinta.
- Una inmunoglobulina multidominio que comprende, al menos, dominios primero y segundo modificados genéticamente no idénticos que confluyen en una interfaz, donde dicha interfaz de cada uno de los dominios primero y segundo modificados genéticamente comprenden, al menos, dos segmentos de secuencia de aminoácidos, cada uno de ellos derivado de un dominio parental homólogo natural diferente, otorgando de ese modo una especificidad de ensamblaje distinta de la especificidad de ensamblaje de los dominios parentales, en donde los dominios primero y segundo modificados genéticamente forman heterodímeros.
- 40 • Una inmunoglobulina multidominio correspondiente que comprende, al menos, dominios modificados genéticamente primero y segundo no idénticos que confluyen en una interfaz, en donde (1) los dominios primero y segundo modificados se derivan de dos o más dominios parentales homólogos naturales, (2) la interfaz del primer dominio modificado genéticamente comprende al menos un segmento de secuencia de aminoácidos que interactúa con un segmento de secuencia de aminoácidos sobre la interfaz del segundo dominio modificado genéticamente
- 45

derivado del mismo dominio parental, y (3) los dominios primero y segundo modificados genéticamente forman heterodímeros.

- 5 • Un dominio de inmunoglobulina modificado genéticamente que contiene una interfaz de interacción proteína-proteína que comprende aminoácidos de dos o más dominios de inmunoglobulina parental, de tal forma que la interfaz de interacción proteína-proteína otorga al dominio de inmunoglobulina modificado, especificidades de ensamblaje que son distintas de las especificidades de ensamblaje de los dominios de inmunoglobulina parental, en donde el dominio de inmunoglobulina modificado genéticamente no es un dominio variable de anticuerpo;
- 10 • Un dominio de inmunoglobulina modificado genéticamente correspondiente, en donde el dominio de inmunoglobulina modificado genéticamente se ensambla con un dominio compañero con especificidad aumentada, en comparación con dichos dominios parentales.
- 15 • Un dominio constante de superfamilia inmunoglobulina modificado genéticamente que contiene una interfaz de interacción proteína-proteína que comprende aminoácidos de dos o más dominios de inmunoglobulina parental, de tal manera que la interfaz de interacción proteína-proteína otorga al dominio de inmunoglobulina modificado genéticamente propiedades de interacción que son distintas de las propiedades de interacción de los dominios de inmunoglobulina parental.
- 20 • Una inmunoglobulina multidominio que comprende un dominio modificado genéticamente que comprende una interfaz de interacción proteína-proteína, donde dicho dominio es homólogo a una familia de dominios naturales, donde dicha interfaz comprende aminoácidos que se encuentran en posiciones de secuencia correspondientes en dos o más de dichos dominios naturales, donde no todos de dichos aminoácidos se encuentran en las posiciones de secuencia correspondientes en cualquier miembro individual de dicha familia de dominios naturales;
- Una inmunoglobulina multidominio correspondiente, en donde la interfaz de interacción del dominio modificado genéticamente otorga propiedades de ensamblaje distintas de cualquiera de los dominios parentales;
- 25 • Una molécula de inmunoglobulina modificada genéticamente heterodimérica, que comprende una primera cadena de inmunoglobulina natural derivada de un primer miembro de la superfamilia inmunoglobulina, y una segunda cadena de inmunoglobulina natural derivada de un segundo elemento diferente de la familia inmunoglobulina, en donde cada una de las cadenas de inmunoglobulina comprende un dominio bio-activo, la cual no es una región variable de anticuerpo, y comprende un dominio de interfaz proteína-proteína que comprende segmentos de aminoácidos complementarios de la otra cadena de la superfamilia inmunoglobulina; dicha interfaz proteína-proteína de la primera cadena se encuentra interactuando con el dominio de la interfaz proteína-proteína de la segunda
- 30 cadena por dimerización, de manera preferente homodimerización de los segmentos de aminoácidos correspondientes derivados de la misma superfamilia inmunoglobulina dentro de dichos dominios de interacción;
- Una molécula de inmunoglobulina modificada genéticamente heterodimérica, en donde el dominio bio-activo es un dominio CH3 de anticuerpo, un dominio CH2-CH3 o un dominio CH1-CH2-CH3;
- 35 • Un ácido nucleico que codifica una inmunoglobulina multidominio que comprende al menos un primer y un segundo dominio modificados genéticamente no idénticos, donde cada uno de los dominios primero y segundo modificados genéticamente contienen una interfaz de interacción proteína-proteína que comprende segmentos de secuencia de aminoácidos derivados de dos o más dominios parentales homólogos naturales, otorgando de ese modo especificidades de ensamblaje de dichos dominios primero y segundo modificados, distintas de especificidades de ensamblaje de dominios parentales, en donde (1) los dominios primero y segundo modificados genéticamente
- 40 forman heterodímeros entre sí de forma preferente a la formación de homodímeros, y (2) los dominios primero y segundo modificados genéticamente no son dominios variables de anticuerpo;
- Una célula que comprende el ácido nucleico tal como se ha descrito;
- Un ácido nucleico que codifica la inmunoglobulina multimérica tal como se ha descrito;

Breve descripción de los dibujos

45 Los dibujos se proporcionan a modo de ilustración, no de forma limitativa.

La Figura 1A representa de manera esquemática un método, a modo de ejemplo, para el diseño de constructos SEED. Dos dominios parentales relacionados X e Y se encuentran alineados. Las secuencias de las dos subunidades SEED (XY e YX) se generan entonces mediante la elección para cada subunidad SEED segmentos de secuencia alternos de las dos secuencias parentales, y eligiendo los segmentos de secuencia complementarios para generar la otra secuencia de la subunidad SEED. Los SEED modificados genéticamente mediante este método se denominan SEEDS "Completos".

La Figura 1B representa, de manera esquemática, un segundo método a modo de ejemplo para el diseño de constructos SEED, que es similar a la Figura 1A, excepto porque únicamente se eligen aminoácidos que forman la interfaz de dimerización de una de las secuencias parentales. Los SEED modificados genéticamente mediante este método son también denominados SEEDS "De Superficie".

5 La Figura 1C representa, en forma de diagrama, configuraciones a modo de ejemplo de un heterodímero de SEED, compuesto de un primer SEED hijo (óvalo en blanco) y un segundo SEED hijo (óvalo en negro), y un compañero de fusión, tal como un dominio bio-activo (rombos blancos conectados). La fracción SEED y el compañero de fusión pueden acoplarse mediante un segmento conector (no representado). En configuraciones con más de un compañero de fusión, los compañeros de fusión pueden ser idénticos entre sí o distintos uno del otro, aunque en los diagramas se muestran de manera genérica como rombos blancos conectados. El compañero de fusión puede ser N-terminal (A) o C-terminal (B) con respecto a la fracción SEED. Puede haber múltiples compañeros de fusión concatenados en un extremo de un SEED, como en (C), o los compañeros de fusión pueden estar localizados en extremos opuestos de un SEED (D). Un compañero de fusión puede estar situado N-terminal a un primer SEED hijo y un segundo compañero de fusión puede estar situado N-terminal (F) o C-terminal (G) a un segundo SEED hijo. El heterodímero de SEED puede contener tres (H) o cuatro (I) compañeros de fusión.

La Figura 2 representa el alineamiento estructural de los dominios CH3 (SEQ ID NO:51) de la IgG1 humana y CH3 (SEQ ID NO: 52) de la IgA humana. Los números de residuos se muestran por la parte superior y por la parte inferior de las secuencias. La IgG1 se encuentra numerada de acuerdo a la numeración EU de Kabat, mientras que la IgA se encuentra numerada secuencialmente, como en la estructura del Banco de Datos de Proteínas (PDB, por sus siglas en inglés) con la referencia PDB 1OW0. Las letras en negrita designan las posiciones de la cadena principal que se incluyeron en el alineamiento descrito en la Tabla 2, en el Ejemplo 1. Los rombos designan los residuos que hacen contacto o se acercan a la interfaz de dimerización en los homodímeros de IgG1 y de IgA.

La Figura 3A representa los alineamientos de secuencia y la estructura secundaria de la IgA (SEQ ID NO:52), IgG1 (SEQ ID NO:51) humanas, y secuencias de SEED "De Superficie" hijas "AG SURF" (SEQ ID NO:10) y "GA SURF" (SEQ ID NO:11), mientras que la figura 3B representa los alineamientos y estructura secundaria de la IgA, IgG1 humanas y secuencias de SEED "Completo" hijo "AG SEED" (SEQ ID NO:3) y "GA SEED" (SEQ ID NO:6). La IgG1 se encuentra numerada de acuerdo a la numeración EU de Kabat, mientras que la IgA se encuentra numerada secuencialmente como en la estructura con la referencia PDB 1OW0 (números de nativos en el centro del alineamiento). Para los propósitos de esta figura, la numeración secuencial del SEED se interrumpe en los residuos del bucle extra, que se encuentran designados con las letras "A", "B", etc. (por ejemplo, 18A), para ilustrar el alineamiento estructural de las moléculas. Los puntos de intercambio se encuentran designados por letras en negrita de la secuencia. Los dos puntos de intercambio que no contienen residuos comunes se encuentran en cursiva. Las estructuras secundarias modeladas (flechas por la parte superior e inferior de las secuencias) de los dos SEED, ilustran los cambios de cadena, y están coloreadas para indicar la manera en la que el dominio fue dividido, tal como se muestra en las Figuras 6B y 6C. Los segmentos en blanco □ son de la IgA; los segmentos en gris ■ son de la IgG, y los segmentos en negro ■ son residuos comunes en los puntos de intercambio. Doce (12) residuos en los segmentos de la IgA se encuentran subrayados. Estos son residuos que se mantuvieron como IgG debido a su proximidad a la región de interfaz de CH2/CH3. Estos residuos no están implicados en la dimerización de CH3, pero son potencialmente importantes para la interacción con CH2, y/o con el complejo con FcRn. Debido a que el CH2 es de la IgG humana para ambos SEED, se dejó que estos residuos mantuvieran tanto la interacción de CH2/CH3 nativo, como las diferentes y bien conocidas ventajas otorgadas por la unión a FcRn.

La Figura 4 es una representación de una molécula de anticuerpo de la IgG que ilustra la simetría del homodímero CH3. La barra vertical designa el eje de la simetría rotacional doble.

La Figura 5 es una representación de una molécula biespecífica, similar a un anticuerpo que tiene dos dominios Fab diferentes, emparejado por el análogo SEED heterodimérico del dominio CH3. La parte en gris, con relleno en forma de almohadillas, representa la porción derivada de la IgG, mientras que la parte en blanco □ representa la porción derivada de la IgA. La simetría del complejo CH3 se rompe en el heterodímero AG/AG, tal como se representa mediante la "X" en la barra vertical que designa el eje de la simetría rotacional doble.

Las Figuras 6A-C son representaciones esquemáticas de la estructura secundaria del CH3 de la IgG y de los dos SEED basados en CH3. La Figura 6A representa la estructura secundaria de CH3 de tipo silvestre.

La Figura 6B representa la estructura secundaria del "GA SEED", y muestra el patrón de intercambio de cadena. El ■ gris representa la secuencia de la IgG; el □ representa la secuencia de la IgA; y el ■ muestra los puntos de intercambio, con una banda negra más ancha que indica residuos que se conservan tanto en la IgA como en la IgG.

La Figura 6C representa la estructura secundaria del "AG SEED", que contiene un patrón opuesto al patrón del "GA SEED".

5 Las Figuras 7A-C son representaciones de diagramas de cintas de la estructura tridimensional de los dominios CH3 de "GA SEED" y "AG SEED" y de su estructura heterodimérica supuesta que representa interacciones del dominio CH3 y el punto de cruce del intercambio. En todos los diagramas, las cintas de color gris claro o blanco representan la secuencia y estructura de la IgA, el color gris oscuro corresponde a la secuencia y estructura de la IgG, y las secciones en negro denotan dónde se intercambia la secuencia de G a A o *viceversa*. Aparte de los dos puntos de intercambio referenciados en 55-56 y 101-102 (numerados según la Figura 3B), todos los residuos en negro son compartidos por la IgA y la IgG, en secuencia y en estructura básica.

10 La Figura 7A representa el "GA SEED", donde el N-terminal comienza como una secuencia de la IgG y finaliza como IgA tras intercambiarse en siete ocasiones. En esta estructura, la capa superior de las cadenas β se encuentra en la lámina exterior, mientras que la capa que se encuentra detrás forma la interfaz con el otro dominio CH3.

La Figura 7B representa el "AG SEED", comenzando con la secuencia de la IgA. Aquí, las cadenas β frontales forman la interfaz, mientras que las cadenas β de detrás se encuentran en el exterior del dímero.

15 La Figura 7C representa la estructura heterodimérica supuesta del "GA SEED" y "AG SEED". La traducción de la estructura que se muestra en la Figura 7A sobre la estructura que se muestra en la Figura 7B agrupa las superficies de la interfaz. Los residuos en negro forman un plano aproximado que está orientado verticalmente y perpendicular a la página. Todos los residuos a la izquierda son de color gris oscuro (IgG), mientras que todos los residuos a la derecha son de color blanco (IgA). Por tanto, con blanco frente a blanco y gris frente a gris, la interfaz completa se encuentra bien formada, como una fusión de las interfaces de la IgA y la IgG. Los homodímeros alternativos, (AG/AG y GA/GA) tendrían cada uno su lado de IgA yuxtapuesto a su lado de IgG (en ambos lados del plano de división), y por tanto no son favorecidos.

20 Las Figuras 8 – 10 muestran mediante diagramas una serie de moléculas de proteínas que pueden ser producidas utilizando las fracciones SEED descritas en la presente patente. Para todas estas figuras, las diferentes fracciones se indican como sigue a continuación. En la Figura 8 y la Figura 9, las cadenas polipeptídicas que incluyen el GA SEED se encuentran coloreadas en negro, mientras que las cadenas polipeptídicas que incluyen el AG SEED se encuentran coloreadas en blanco. Dentro de dichas cadenas polipeptídicas, las regiones V de anticuerpo que son parte de la cadena polipeptídica que contiene el GA SEED son de color negro con rayas blancas, mientras que las regiones V de anticuerpo que son parte de la cadena polipeptídica que contiene el AG SEED son de color blanco con rayas negras finas. Las regiones constantes de cadena liviana se muestran con un patrón en forma de tablero de ajedrez. Las regiones bisagra de anticuerpo se muestran como óvalos delgados conectados mediante un "S-S" y una línea gruesa para representar los puentes disulfuro entre las regiones bisagra. Los conectores polipeptídicos se encuentran representados con líneas discontinuas.

25 Las diferentes partes de la Figura 8, Figura 9 y Figura 10 se encuentran etiquetadas numéricamente tal como sigue a continuación. En algunos casos, para simplificar las figuras, no se muestran las etiquetas numéricas, pero la identidad de los varios dominios y regiones puede ser inferida a partir de las figuras con los correspondientes dominios y regiones.

"1" indica un grupo de regiones V de cadena liviana y pesada asociadas a GA.

"2" indica un grupo de regiones V de cadena liviana y pesada asociadas a AG.

"3" indica una región V de cadena liviana asociada a GA.

"4" indica una región Fab.

40 "5" indica una región V de cadena pesada asociada a GA.

"6" indica una región V de cadena pesada asociada a AG.

"7" indica una región V de cadena liviana asociada a AG.

"8" indica una región constante de cadena liviana.

"9" indica una región Fc que comprende un par SEED.

45 "10" indica un par SEED.

"11" indica un conector artificial.

“12” indica una región V de camélidos o dominio único asociado a GA.

“13” indica una región V de camélidos o dominio único asociado a AG.

“14” indica un diacuerpo o un diacuerpo fusionado de cadena única que se incorpora a la cadena polipeptídica que comprende el GA SEED.

5 “15” indica un diacuerpo o un diacuerpo fusionado de cadena única que se incorpora a la cadena polipeptídica que comprende el AG SEED.

“16”, “17”, “18”, o “19” hace referencia a cualquier proteína o péptido, tal como un dominio no Ig. Tales dominios pueden incluir, por ejemplo, citocinas, hormonas, toxinas, enzimas, antígenos, y dominios extracelulares de receptores de la superficie celular.

10 “20” indica una región Fc homodimérica canónica.

“21” indica un par homodimérico canónico de dominios CH3.

15 La Figura 8 ilustra tipos de configuraciones de SEED de tipo anticuerpo que comprende fracciones con regiones V esencialmente naturales, tales como las regiones Fab (Figura 8A y Figura 8F), Fab de cadena única (Figura 8C y Figura 8D), y regiones V de dominio único o de dominio único de camélido (Figura 8E y Figura 8F). La Figura 8A, Figura 8C, y Figura 8E muestran moléculas que comprenden una región Fc esencialmente intacta, que incluye dominios CH2, además de una región bisagra. La Figura 8B, Figura 8D, y Figura 8F muestra moléculas que carecen de un dominio CH2, en las que la región bisagra se reemplaza de manera opcional mediante un conector que, opcionalmente, posee o carece de residuos de cisteína capaces de unión mediante puente disulfuro.

20 La Figura 9 ilustra tipos de configuraciones de SEED de tipo anticuerpo que comprenden fracciones con regiones V configuradas de forma artificial, tal como Fvs de cadena única (Figura 9A y Figura 9B), diacuerpos (Figura 9C y Figura 9D), y Fvs de cadena única con fracciones adicionales acopladas a los N- y/o C-terminales de las dos cadenas polipeptídicas (Figura 9E y Figura 9F). La Figura 9A, la Figura 9C, y la Figura 9E muestran moléculas que comprenden una región Fc esencialmente intacta, que incluye dominios CH2, además de una región bisagra. La Figura 9B, la Figura 9D, y la Figura 9F muestran moléculas que carecen de un dominio CH2, en las que la región bisagra se reemplaza de manera opcional mediante un conector que, opcionalmente, posee o carece de residuos de cisteína capaces de unión mediante puente disulfuro.

30 La Figura 10 ilustra mediante diagramas una molécula en la que el par GA/AG SEED reemplaza esencialmente el apareamiento CH1-CL en un anticuerpo. Las fracciones adicionales, indicadas por X e Y, pueden situarse en los N-terminales de los SEED GA y AG. La fracción X y la fracción Y pueden ser, por ejemplo, una región Fab, una Fab de cadena única, una región V de dominio único de camélido, una Fv de cadena única, un diacuerpo de cadena única tal como el que se ha ilustrado con la referencia “14” y “15” en la Figura 9C y la Figura 9D. Las fracciones adicionales pueden fusionarse a los C-terminales de los dominios CH3 indicados con la referencia “21”.

35 La Figura 11: la Figura 11A muestra un heterodímero producido tal como se ha descrito en el Ejemplo 5, en el cual una fracción de AG SEED tiene una fracción de IL-2 fusionada a su C-terminal. Las fracciones CH2 y bisagra son idénticas en este caso. La Figura 11B muestra un anticuerpo producido tal como se ha descrito en el Ejemplo 7, en el cual la fracción de AG SEED tiene una fracción de IL-2 fusionada a su C-terminal. Cada dominio de anticuerpo se encuentra representado por un óvalo, y la fracción de IL-2 se encuentra representada por un cuadrado en blanco. Las fracciones CH2, CH1, bisagra, VH, VL, y CL son idénticas en este caso. Las regiones bisagra se acoplan mediante puentes disulfuro representados mediante “S-S” en la figura. La región constante de cadena liviana se encuentra representada por un patrón en forma de tablero de ajedrez. La región V de cadena pesada se encuentra representada con un patrón de líneas verticales. Las regiones VH, CH1, y CH2 son de color negro.

45 La Figura 12: las Figuras 12A-C representan el ensamblaje preferente de los AG/GA SEED en heterodímeros, tal como se representa mediante los resultados de la expresión de Fc y Fc-IL2 en la misma célula. La Figura 12A representa las posibles configuraciones de las moléculas que son el resultado de la co-expresión de Fc-IL2, de tal manera que cada especie dimérica tiene un peso molecular diferente. La Figura 12B representa un análisis en gel de SDS no reductor en el cual se cargaron las siguientes muestras: carril 1 – estándares de peso molecular; carril 2-4 - aproximadamente 1, 2, y 4 microgramos de proteína total de Fc(GA SEED)/Fc(AG SEED)-IL2 “Completa” expresada a partir de células NS/0; carriles 5-7 - aproximadamente 1, 2, y 4 microgramos de proteína total de Fc(GA SEED)/Fc(AG SEED)-IL2 “De superficie” expresada a partir de células NS/0; carriles 8-10 - 1, 2, y 4 microgramos de proteína total de IgG Fc/Fc-IL2 expresada a partir de células NS/0. La Figura 12C es un análisis en gel reductor que muestra el ratio de expresión de Fc y Fc-IL2 derivada de IgG.

Las Figuras 12D-E representan un análisis Western blot de muestras no reducidas (panel D) y reducidas (panel E) de las proteínas Fc/Fc-IL2 de las Figuras 12B-C. Muestras duplicadas de Fc(GA SEED)/Fc(AG SEED)-IL2 "completa" (carriles 1 y 4), Fc(GA SEED)/Fc(AG SEED)-IL2 "de superficie" (carriles 2 y 5), y Fc/Fc-IL2 parental (carriles 3 y 6) se cargaron, y el blot se hibridó utilizando anticuerpos de IgG Fc anti-humano (carriles 1-3) y de IL-2 antihumana (carriles 4-6).

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona métodos para el diseño de dominios de inmunoglobulina heterodimérica que, de manera preferente, heterodimerizan o heteromultidimerizan. En particular, la invención utiliza una estrategia de "Dominio Modificado por Intercambio de Cadena" (SEED, por sus siglas en inglés), para modificar por ingeniería genética una interfaz de interacción proteína-proteína que promueve la heterodimerización o heteromultimerización. La invención además proporciona proteínas multidominio que contienen dominios modificados por ingeniería genética utilizando esta aproximación. Por tanto, la presente invención representa un avance significativo en la ingeniería de proteínas.

Varios aspectos de la invención se describen en mayor detalle en las siguientes sub-secciones. El uso de sub-secciones no pretende limitar la invención. Cada sub-sección puede aplicarse a cualquier aspecto de la invención.

Tal como se utiliza en la presente patente, una "inmunoglobulina multidominio" incluye cualquier inmunoglobulina que contenga dos o más dominios. Los dominios pueden encontrarse en un único polipéptido; también pueden encontrarse en diferentes polipéptidos. La "heteromultidimerización" hace referencia a dominios no idénticos que forman un complejo multimérico mediado por interacciones de dominios. Una "proteína heteromultidimérica" es una molécula de proteína que comprende al menos una primera subunidad y una segunda subunidad, cada subunidad contiene un dominio no idéntico. El heteromultímero puede incluir un "heterodímero" formado por la primera y la segunda subunidad o puede formar estructuras de orden mayor (por ejemplo, ternarias), donde se encuentran presentes polipéptidos de las subunidades además de la primera y la segunda subunidad. De manera habitual, cada subunidad contiene un dominio. Estructuras a modo de ejemplo para el heteromultímero incluyen heterodímeros, heterotrímeros, heterotetrámeros (*por ejemplo*, un anticuerpo biespecífico) y estructuras oligoméricas adicionales.

Tal como se utiliza en la presente patente, un "dominio" incluye cualquier región de un polipéptido que es responsable para el ensamblaje selectivo con un compañero de ensamblaje de interés (por ejemplo, otro dominio, ligando, receptor, sustrato o inhibidor). Dominios de ejemplo incluyen un dominio constante de una superfamilia inmunoglobulina, tal como un dominio CH2 o CH3, un dominio de unión a receptor, un dominio de unión al ligando, un dominio enzimático, o cualquier polipéptido que ha sido modificado genéticamente y/o seleccionado para unirse a una diana. Cuando dos dominios se ensamblan entre sí, confluyen en una interfaz de interacción proteína-proteína. Tal como se utiliza en la presente patente, una "interfaz de interacción proteína-proteína", una "interfaz de interacción", o una "interfaz" incluye aquellos residuos "de contacto" (residuos aminoácidos u otros no aminoácidos tal como los grupos carbohidratos, NADH, biotina, FAD o grupo hemo) en el primer dominio que interactúa con uno o más residuos "de contacto" (grupos aminoácidos u otros no aminoácidos) en la interfaz del segundo dominio. Tal como se utiliza en la presente patente, un residuo "de contacto" hace referencia a cualquier residuo aminoácido o no aminoácido de un dominio que interactúa con otro residuo aminoácido o no aminoácido de un dominio diferente, mediante fuerzas de van der Waals, enlaces de hidrógeno, enlaces de hidrógeno mediados por agua, puentes de sal u otras fuerzas electrostáticas, interacciones de atracción entre cadenas laterales aromáticas, la formación de los puentes de disulfuro, u otras fuerzas conocidas para un experto en el arte. De manera habitual, la distancia entre los carbonos alfa de los dos residuos aminoácidos de contacto que interactúan en la interfaz de interacción no es mayor a 12 Å. De forma más habitual, la distancia entre los carbonos alfa de los dos residuos aminoácidos de contacto que interactúan en la interfaz de interacción no es mayor a 11 Å.

Tal como se utiliza en la presente patente, un "dominio parental" hace referencia a cualquier dominio de ensamblaje existente, tal como se ha descrito con anterioridad, que pueda ser utilizado como una secuencia parental para el diseño de un dominio modificado genéticamente mediante la estrategia de intercambio de cadena. Dominios parentales adecuados están habitualmente relacionados o son homólogos, y tienen una especificidad de ensamblaje particular. "Homólogo" significa dos dominios que comparten al menos un 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 62%, 65%, 68%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99% de identidad de secuencia. Si los dominios parentales se encuentran presentes en una solución común, pueden tender a homodimerizar en lugar de heterodimerizar entre sí. Tal como se utiliza en la presente patente, "dominios de ensamblaje existentes" incluyen secuencias naturales o de tipo silvestre de organismos tales como un humano, ratón, levadura, bacterias, por nombrar algunos, además de secuencias derivadas que han sido modificadas a partir de secuencias de tipo silvestre, tales como, por ejemplo, secuencias que se han estabilizado; se han vuelto menos inmunogénicas; se han dotado con especificidad de ensamblaje modificada, aumentada o disminuida, con propiedades enzimáticas modificadas, con solubilidad modificada, o expresión aumentada; se han truncado; o se han fusionado a otro polipéptido. Los "dominios de ensamblaje existentes" pueden además ser secuencias completamente o parcialmente sintéticas que se sintetizan en base al diseño molecular, métodos de selección *in vitro* o *in vivo* (por ejemplo, sistema de dos híbridos en levadura, expresión en fago (o phage display)), o combinaciones de los mismos.

Un "dominio modificado genéticamente" hace referencia a un dominio modificado a partir de al menos dos dominios parentales no idénticos. Un dominio modificado genéticamente también se denomina un dominio hijo. De forma habitual, un dominio modificado genéticamente de la presente invención contiene segmentos de secuencia de aminoácidos derivados a partir de dos o más dominios parentales homólogos existentes. De manera preferente, la interfaz de un dominio modificado genéticamente incluye aminoácidos derivados a partir de más de un dominio parental. La presencia de aminoácidos de diferentes dominios parentales otorga una especificidad de ensamblaje distinta de las especificidades de ensamblaje de los dominios parentales. Por ejemplo, la presencia de los aminoácidos de diferentes dominios parentales promueve o aumenta la heterodimerización o heteromultimerización.

Un dominio modificado por intercambio de cadena (SEED) es un dominio modificado genéticamente que se ha modificado a partir de, al menos, dos dominios parentales no idénticos, mediante el método de ingeniería genética de intercambio de cadena descrito en detalle a continuación.

Tal como se utiliza en la presente patente, un "polipéptido" hace referencia en general a cualquier polipéptido o proteína que tiene más de aproximadamente diez aminoácidos. De manera preferente, los polipéptidos mamíferos (polipéptidos que se derivaron originalmente a partir de un organismo mamífero), se utilizan para la modificación por ingeniería genética de SEED, de manera más preferente aquellos que son directamente secretados en el medio. Ejemplos de polipéptidos bacterianos incluyen, por ejemplo, fosfatasa alcalina y β -lactamasa. Ejemplos de polipéptidos de mamíferos incluyen moléculas tales como renina, una hormona del crecimiento, incluyendo la hormona del crecimiento humana; hormona del crecimiento bovina; factor de liberación de la hormona del crecimiento; hormona paratiroidea; hormona estimulante del tiroides; lipoproteínas; α -1-antitripsina; cadena A de insulina; cadena B de insulina; proinsulina; hormona estimulante del folículo; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación tales como factor VIIIc, factor IX, trombocinasa, y factor de von-Willebrand; factores anticoagulación tales como la Proteína C; factor natriurético auricular; tensioactivo pulmonar; un activador del plasminógeno, tal como uroquinasa u orina humana o activador de tipo tisular del plasminógeno (t-PA, por sus siglas en inglés); bombesina; trombina; factor de crecimiento hemopoyético; factor de necrosis tumoral $-\alpha$ y $-\beta$; encefalinasa; quimiocina RANTES (del inglés *Regulated on Activation Normal T-cell Expressed and Secreted*, expresada y secretada por linfocitos T normales y regulada en función de su grado de activación); proteína inflamatoria de macrófago humana (MIP-1 α); una seroalbúmina, tal como la seroalbúmina humana; sustancia inhibidora de Müllerian; cadena A de relaxina; cadena B de relaxina; prorrelaxina; péptido asociado a gonadotropina de ratón; ADNasa; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés); receptores para hormonas o factores de crecimiento; proteína A o D; factores reumatoide; un factor neurotrófico, tal como el factor neurotrófico derivado de hueso (BDNF, por sus siglas en inglés); neurotrofina-3, -4, -5 o -6 (NT-3, NT-4, NT-5, o NT-6), o un factor de crecimiento nervioso tal como NGF-beta; factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, por sus siglas en inglés); factor de crecimiento de fibroblastos, tal como AFGF y bFGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF, por sus siglas en inglés); factor de crecimiento transformante (TGF, por sus siglas en inglés), tal como TGF- α y TGF- β , incluyendo TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4, o TGF- β 5; Factores I y II de crecimiento similar a insulina (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I de cerebro), proteínas de unión a factor de crecimiento similar a insulina; proteínas CD, tales como CD-3, CD-4, CD-8, y CD-19; eritropoyetina; factores osteoinductivos; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón, tal como interferón $-\alpha$, $-\beta$, y $-\gamma$; factores estimuladores de colonias (CSFs, por sus siglas en inglés), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF, y G-CSF; interleucinas (ILs), por ejemplo, IL-1 a IL-10; superóxido dismutasa; receptores de linfocitos T; proteínas de membrana de superficie; factor acelerador de la degradación; proteínas de transporte; receptores de "homing"; adhesinas; proteínas reguladoras; inmunoglobulinas (anticuerpos); y fragmentos de cualquiera de los polipéptidos indicados anteriormente.

Tal como se utiliza en la presente patente, el "primer polipéptido" o "primera subunidad" es un polipéptido que se encuentra asociado con un segundo polipéptido a través de la interacción entre los dominios modificados genéticamente. El "segundo polipéptido" o "segunda subunidad" es cualquier polipéptido que se encuentra asociado con el primer polipéptido a través de la interacción entre los dominios modificados genéticamente. Además de los dominios modificados genéticamente, el primer y/o segundo polipéptido puede incluir uno o más dominios bio-activos adicionales, tales como, por ejemplo, un dominio variable de anticuerpo, dominio de unión al receptor, dominio de unión al ligando o dominio enzimático u otros "dominios de unión", tales como dominios constantes de anticuerpo (o partes del mismo), incluyendo dominios CH3 y CH2. Como un ejemplo, el primer polipéptido puede incluir al menos un dominio modificado genéticamente de la invención, tal como un dominio CH3 modificado genéticamente de una inmunoglobulina, y puede formar la interfaz del primer polipéptido. El primer polipéptido puede incluir, además, otros dominios de unión a la cadena pesada de anticuerpo (por ejemplo, CH1, CH2, o CH4), y dominios bio-activos adicionales, tales como polipéptidos receptores (especialmente aquellos que forman dímeros con otro polipéptido receptor, *por ejemplo*, heterodímeros de integrina y receptor de interleucina-8, *por ejemplo*, LFA-1 o GBIIIb/IIIa), polipéptidos ligando (*por ejemplo*, citocinas, factor de crecimiento nervioso, neurotrofina-3, y factor neurotrófico derivado del cerebro – ver Arakawa et al. (1994) J. Biol. Chem. 269(45):27833-27839 y Radziejewski et al (1993) Biochem. 32(48):1350), y polipéptidos de dominio variable de anticuerpo (*por ejemplo*, diacuerpos y BsAbs).

Tal como se utiliza en la presente patente, "ensamblaje" hace referencia a una interacción proteína-proteína que ocurre durante la producción de una proteína con múltiples subunidades. Por ejemplo, durante la producción de anticuerpo, las cadenas liviana y pesada se sintetizan a partir de ribosomas asociados con el retículo endoplasmático. Las cadenas individuales se pliegan entonces, y a continuación se ensamblan en anticuerpos maduros a través de la asociación adecuada de cadenas livianas y pesadas. Por ejemplo, en el caso de los anticuerpos de IgG, el ensamblaje de la porción Fab es, en un principio, impulsado principalmente por las interacciones entre los dominios CH1 y CL, y también por las interacciones entre las regiones VH y VL. En el caso de dos cadenas pesadas, la reacción inicial de ensamblaje es la asociación de dos dominios CH3. Estas reacciones iniciales de ensamblaje son de forma usual, pero no siempre, continuadas con la formación de un puente disulfuro entre los polipéptidos de subunidades ensambladas. Tal como se utiliza en la presente patente, "ensamblaje" es distinto a "unión"; ensamblaje hace referencia a los eventos de interacción de proteínas que tienen lugar durante la producción de una proteína madura, tal como un anticuerpo antes de ser secretado de una célula, mientras que unión hace referencia a los eventos de interacción de proteínas que tienen lugar después de la secreción, tal como la interacción de un anticuerpo con un antígeno o con un receptor Fc. En un sentido operativo, el ensamblaje de una proteína diagnóstica o terapéutica tiene lugar durante la preparación de la proteína terapéutica hasta, e incluyendo, la colocación de un producto en un vial, y la unión de una proteína diagnóstica o terapéutica hace referencia a los eventos que tienen lugar después de que una proteína terapéutica sea administrada a un paciente o cuando una proteína diagnóstica se utiliza en un test diagnóstico.

Por "unión" se entiende la interacción de una proteína con una proteína diana posterior a la síntesis y ensamblaje de la proteína.

Ingeniería genética por intercambio de cadena

La presente invención utiliza el hecho de que los dominios de proteínas naturales que median en las interacciones proteína-proteína son, a menudo, homólogos o, en el caso de homodímeros, idénticos, y que tales proteínas y dominios a menudo tan sólo homodimerizan entre sí, pero habitualmente no heterodimerizan con miembros de otras familias, o no heterodimerizan con miembros de otras familias con una afinidad igual o mayor que sus afinidades para la homodimerización. De acuerdo a la invención, tales proteínas pueden ser utilizadas para diseñar proteínas heterodiméricas o heteromultiméricas utilizando métodos de ingeniería genética de intercambio de cadena, descritos en detalle a continuación. Tales dominios modificados genéticamente también se conocen como "Dominios Modificados genéticamente por Intercambio de Cadena" ("SEEDs", por sus siglas en inglés). Las proteínas multidominio que contienen tales dominios modificados genéticamente también se conocen como proteínas modificadas genéticamente por intercambio de cadena.

La ingeniería genética por intercambio de cadena comienza, habitualmente, con un modelo estructural de un dominio de proteína parental dimerico. Dos dominios parentales que pueden homodimerizar o dimerizar cada uno con su compañero de ensamblaje, pero no heterodimerizan entre sí, se alinean estructuralmente. Los dominios parentales pueden dimerizar de manera que se enfrenten en una posición cara con cara, es decir, los compañeros del dímero pueden estar relacionados mediante una simetría rotacional de 180 grados. Los dominios parentales pueden también dimerizar de manera que se encuentren en una posición cara con parte posterior.

Debido a la geometría de la simetría rotacional de las proteínas homodiméricas, existe de forma habitual una línea de aminoácidos en la superficie de interacción que interactúa de manera homotípica. En otras palabras, existen aminoácidos que interactúan con sus equivalentes en la otra subunidad. Por ejemplo, en el dominio CH3 de la IgG1, estos aminoácidos incluyen L351, P352, T366, T394, P395, e Y407. Esta línea de aminoácidos se encuentra en general paralela al eje de simetría rotacional del dímero. A la hora de elegir dominios parentales, resulta útil a menudo elegir proteínas que homodimerizan de tal manera que el eje largo de la interfaz de dimerización no se encuentre claramente paralelo al eje de simetría rotacional. Por ejemplo, los SEED basados en miembros de la familia de cremallera de leucina son difíciles de construir, ya que la interfaz de dimerización es paralela al eje de simetría, y muchas de las interacciones de aminoácidos son homotípicas. Por consiguiente, en algunos modos de realización preferentes, los dominios modificados genéticamente de la invención no son dominios de cremallera de leucina. En contraste, los dominios de la familia CH3 resultan particularmente útiles, ya que una porción significativa de la superficie de interacción se encuentra fuera de la línea de simetría. Sin embargo, se reconocerá por parte de los expertos en el arte que la línea de simetría (es decir, una línea de aminoácidos que interactúan de manera homotípica), puede ser una simplificación excesiva. Por ejemplo, las cadenas laterales de aminoácidos sobre la línea de simetría pueden señalar hacia el núcleo hidrofóbico del dominio.

Una nueva interfaz de dimerización es conceptualmente diseñada y dividida en al menos dos regiones que, de forma habitual, se encuentran en cada lado de la línea de interacción homotípica (es decir, la línea de simetría). Los nuevos dominios se diseñan entonces por intercambio de cadena en donde dos secuencias de aminoácidos lineales de dominio hijo se construyen a partir de dos secuencias de aminoácidos de dominio parental alineadas, tomando segmentos complementarios de cada secuencia parental. Como resultado, en las regiones de la interfaz de dimerización, los dos dominios hijos (es decir, dos SEED) tienen segmentos de aminoácidos complementarios de dominios parentales. Este concepto se encuentra ilustrado en las Figuras 1A y 1B. Tal como se muestra en la Figura

1A, dos secuencias SEED hijas, 1 y 2, se modifican genéticamente a partir de dos secuencias parentales, A y B, de manera enteramente complementaria. Si la Hija 1 tiene un segmento de aminoácidos del Parental A en una región dada de la interfaz de interacción, la Hija 2 tendrá el correspondiente segmento de aminoácidos del Parental B. La interfaz de interacción se diseña de tal manera que al menos un segmento de una secuencia de aminoácidos en la Hija 1 interactúa con un segmento de secuencia de aminoácidos en la hija 2 que derivó del mismo dominio parental. En la Figura 1B, los dominios SEED hijos se derivan principalmente a partir de un dominio parental. Sin embargo, los aminoácidos en la interfaz de dimerización se derivan a partir de o bien a partir de un parental o de otro de forma complementaria.

Debe señalarse que la Figura 1A y la Figura 1B representan dos ejemplos extremos de la invención, y que los SEED pueden ser modificados genéticamente mediante métodos de la invención que tienen diseños intermedios entre la Figura 1A y la Figura 1B. Por ejemplo, tal como se describe en los Ejemplos en más detalles, es posible construir un SEED basado en dominios parentales a partir de la familia del dominio CH3 de la inmunoglobulina. Los SEED hijos pueden derivarse principalmente de manera complementaria a partir de la IgG y la IgA, pero los aminoácidos que interactúan con FcRn se derivan de la IgG para preservar la interacción con FcRn.

Por tanto, los SEED se modifican genéticamente mediante la combinación de dos o más dominios parentales homólogos. Los dominios parentales son polipéptidos que difieren entre sí por al menos cuatro aminoácidos. A la hora de producir un SEED, las secuencias de los polipéptidos originales se alinean en base a sus homologías, modelos estructurales teóricos, estructuras cristalinas o estructuras provenientes de soluciones de modelado, o una combinación de las mismas. Existe al menos un aminoácido diferente en una o más posiciones de secuencia alineadas, o un número diferente de aminoácidos en al menos un par de secuencias originales alineadas. Las secuencias parentales se dividen entonces en, al menos, dos segmentos que incluyen al menos un aminoácido cada uno. Una secuencia SEED puede ser compuesta mediante la elección, de entre las secuencias originales, de la deseada para cada segmento dividido. Un SEED a menudo difiere de cada secuencia parental individual en al menos dos aminoácidos consecutivos, y en algunas ocasiones en tres, cuatro o más aminoácidos consecutivos. Además de seleccionar secuencias de los polipéptidos parentales originales, un SEED puede contener cualquier aminoácido que se desee en cualquier posición, tal como posiciones fuera de la interfaz diseñada, a fin de satisfacer otras necesidades de diseño.

Existen posiciones en la secuencia del SEED donde la secuencia parental cambia de un parental a un segundo parental. Estas posiciones se denominan puntos de intercambio o posiciones de intercambio. Los puntos de intercambio o posiciones de intercambio, pueden incluir uno o más aminoácidos cuya identidad puede ser compartida por ambos parentales. De manera habitual, los puntos de intercambio se eligen de los aminoácidos en, o cerca de, la línea de simetría, aunque los puntos también pueden ser elegidos. Los puntos de intercambio pueden incluir aminoácidos no compartidos por los parentales. En este caso, la secuencia cambia de manera abrupta de un parental a otro. Más aún, los puntos de intercambio pueden incluir uno o más aminoácidos que no pertenecen a ninguno de los parentales. En este caso, de manera habitual, aparecen secuencias parentales diferentes en cada lado de los aminoácidos nuevos. Si hay múltiples puntos de intercambio en la secuencia de un SEED, el número total de segmentos parentales puede ser mayor a dos, hasta un número mayor que el número de puntos de intercambio. Estos segmentos parentales pueden seleccionarse de distintos dominios parentales. Por tanto, la presente invención contempla SEEDs que se modifican genéticamente a partir de más de dos dominios parentales.

Para fines de conveniencia, cada SEED se identifica de acuerdo al orden de sus secuencias parentales, comenzando con el N-terminal del SEED. En los ejemplos que se dan más adelante, un AG SEED tiene un segmento de secuencia de la IgA1 en el extremo N-terminal, que luego cambia a un segmento de secuencia de la IgG1 en el primer punto de intercambio. Un GA SEED tiene un segmento de secuencia de la IgG1 en el extremo N-terminal, que luego cambia a un segmento de secuencia de la IgA1 en el primer punto de intercambio.

Por tanto, la interfaz de interacción de los SEED de la invención incluye segmentos de secuencias de aminoácidos derivados a partir de dos o más dominios parentales. Como resultado, la interfaz de los SEED tiene propiedades de interacción distintas de las propiedades de interacción de los dominios parentales. En particular, la presencia de aminoácidos a partir de diferentes dominios parentales otorga una especificidad de ensamblaje distinta a la especificidad de ensamblaje de cualquiera de los dominios parentales. Por ejemplo, la especificidad de heterodimerización o heteromultimerización es aumentada por la presencia de aminoácidos de diferentes dominios parentales en la interfaz de un SEED. Como resultado, un par de SEEDs forman heterodímeros entre sí de manera preferente sobre la formación de homodímeros. Por tanto, cuando un par de SEEDs se expresan en un sistema de expresión, heterodímeros de los SEED pueden ensamblarse de manera específica, de tal manera que los SEED heterodiméricos puedan ser directamente recuperados del sistema de cultivo celular sin la necesidad de elaborar pasos de separación para extraer los homodímeros.

SEEDs basados en CH3

La homología y las diferencias de la cadena principal entre las interfaces de dimerización de los dominios parentales son importantes para la creación de los SEED. Por tanto, de acuerdo a un modo de realización de la invención, las

clases de proteínas de inmunoglobulina son una fuente útil para los dominios parentales. Los SEED pueden ser creados utilizando secuencias parentales de dos clases de inmunoglobulina diferentes. Por ejemplo, los SEED pueden ser modificados genéticamente a partir de dominios de la familia CH3 mediante el método de la invención. Dominios de la familia CH3 adecuados para el diseño de SEEDs incluyen, pero no se limitan a, dominios CH3 de la IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, y la IgD, y los dominios CH4 de la IgE y la IgM.

Los dominios CH3 de la IgG1 y la IgA humana forman homodímeros pero no forman heterodímeros entre sí. Por lo tanto, los pares de SEED (por ejemplo, un AG SEED y un GA SEED), pueden ser modificados genéticamente a partir de los dominios CH3 de la IgG1 y la IgA, de tal manera que pueden heterodimerizar entre sí pero su habilidad para homodimerizar es mínima. De acuerdo con un modo de realización, la interfaz de ensamblaje en el dominio CH3 se divide en dos regiones, las cuales se encuentran en cada lado de la línea de interacciones homotípicas. Las interacciones homotípicas para los dominios CH3 de IgA y de IgG1 pueden ser determinados mediante la observación e hibridando la estructura cristalina con una esfera de 1.4Å, para determinar si las dos cadenas laterales se encuentran o no suficientemente cerca para evitar el agua. Si las superficies se unen a través de la interfaz, esto implica que las cadenas laterales se encuentran interactuando estrechamente. Por ejemplo, en el dominio CH3 de tipo silvestre de la IgG1, los aminoácidos que interactúan de manera homotípica incluyen, pero no se limitan a, L351, P352, T366, T394, P395, y Y407. Para el dominio CH3 de tipo silvestre de la IgA1, los aminoácidos que interactúan de manera homotípica incluyen, pero no se limitan a, L352, P353, T368, W398, A399 y T414. En una subunidad SEED a modo de ejemplo, aquellos aminoácidos con cadenas laterales que señalan hacia el exterior, que se encuentran a la izquierda de la línea de interacción homotípica, se toman del CH3 de la IgA, y aquellos con cadenas laterales que señalan hacia el exterior a la derecha de la línea de interacción homotípica a la derecha de la línea de interacción homotípica, se toman del CH3 de la IgG1. La elección de aminoácidos a lo largo de la línea de interacción homotípica se basa en consideraciones estructurales y se realiza sobre una base caso por caso, aunque es probable que los aminoácidos de cualquiera de los dos dominios parentales puedan ser seleccionados para una región de un SEED en particular.

Por ejemplo, un AG SEED basado en CH3 puede tener una secuencia polipeptídica como se muestra en la SEQ ID NO:1, en donde X_1 , X_2 , o X_3 pueden ser cualquier aminoácido. En algunos modos de realización, X_1 es K o S, X_2 es V o T, y X_3 es T o S. De manera preferente, X_1 es S, X_2 es V o T, y X_3 es S. Un GA SEED basado en CH3 puede tener una secuencia polipeptídica como se muestra en SEQ ID NO:2, en donde X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 , o X_6 pueden ser aminoácidos. En algunos modos de realización, X_1 es L o Q, X_2 es A o T, X_3 es L, V, D, o T, X_4 es F, A, D, E, G, H, K, N, P, Q, R, S', o T, X_5 es A o T, y X_6 es E o D. De manera preferente, X_1 es Q, X_2 es A o T, X_3 es L, V, D, o T, X_4 es F, A, D, E, G, H, K, N, P, Q, R, S, o T, X_5 es T, y X_6 es D. Heterodímeros de SEED a modo de ejemplo pueden incluir una subunidad SEED seleccionada de AG(F0) SEED (SEQ ID NO:3), AG(f) SEED (SEQ ID NO:4), o AG(f2) SEED (SEQ ID NO:5), y la otra subunidad SEED seleccionada de GA(F0) SEED (SEQ ID NO:6), GA(f1) SEED (SEQ ID NO:7), GA(f2) SEED (SEQ ID NO:8), o GA(f3) SEED (SEQ ID NO:9). Por ejemplo, un heterodímero de SEED puede incluir subunidades AG(F0) SEED (SEQ ID NO:3) y GA(f0) SEED (SEQ ID NO:6). En otro ejemplo, un heterodímero de SEED puede incluir subunidades AG(f2) SEED (SEQ ID NO:5) y GA(f2) SEED (SEQ ID NO:8). En aún otro modo de realización, un heterodímero de SEED puede incluir subunidades AG(s0) SEED (SEQ ID NO:10) y GA(s0) SEED (SEQ ID NO:11).

Dominios bio-activos

Los SEED de acuerdo a la presente invención, resultan particularmente útiles cuando se acoplan a un compañero de fusión. Un compañero de fusión (X) puede fusionarse al N-terminal del SEED (X-SEED), también puede fusionarse al C-terminal del SEED (SEED-X). Además, un compañero de fusión puede fusionarse al N-terminal y al C-terminal del SEED al mismo tiempo (X-SEED-X). Dos diferentes compañeros de fusión pueden fusionarse a un SEED (X-SEED-Y).

Dado que dos secuencias SEED habitualmente forman heterodímeros, es posible que al menos uno, dos, tres, o cuatro compañeros de fusión puedan contemplarse en el heterodímero de SEED. Por ejemplo, de acuerdo con un modo de realización, el primer SEED hijo tiene un compañero de fusión, y el segundo SEED hijo no tiene compañero de fusión, dando como resultado las siguientes configuraciones a modo de ejemplo: SEED-X heterodimerizado a SEED; o X-SEED heterodimerizado a SEED. En un ejemplo adicional, el primer SEED hijo tiene dos compañeros de fusión diferentes (X, Y), y el segundo SEED hijo tiene dos compañeros de fusión diferentes (W, Z) que difieren de los compañeros de fusión del primer SEED hijo. Posibles configuraciones a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a: X-SEED-Y heterodimerizado a W-SEED-Z; X-SEED-Y heterodimerizado a Z-SEED-W; Y-SEEDX heterodimerizado a W-SEED-Z; o Y-SEED-X heterodimerizado a Z-SEED-W. De acuerdo a la invención, un SEED puede también tener dos o más compañeros de fusión (X) fusionado secuencialmente a, por ejemplo, el N-terminal (X-X-SEED). De manera alternativa, en otro modo de realización de la invención, el primer SEED hijo tiene un compañero de fusión (X), y el segundo SEED hijo tiene un compañero de fusión (Y), dando como resultado las siguientes configuraciones a modo de ejemplo: X-SEED heterodimerizado a Y-SEED; X-SEED heterodimerizado a SEED-Y; o SEED-X heterodimerizado a SEED-Y. En aún otro modo de realización de la presente invención, el primer SEED hijo tiene un compañero de fusión (X), y el segundo SEED hijo tiene dos compañeros de fusión (Z, Y).

Posibles configuraciones a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a: X-SEED heterodimerizado a Y-SEED-Z; X-SEED heterodimerizado a Z-SEED-Y; SEED-X heterodimerizado a Z-SEED-Y; o SEED-X heterodimerizado a Y-SEED-Z. Configuraciones a modo de ejemplo se ilustran en la Figura 1C.

5 En particular, un compañero de fusión puede ser uno o más dominios bio-activos, incluyendo cualquier proteína biológicamente activa o una porción biológicamente activa de la misma. Por ejemplo, un dominio bio-activo puede incluir una región variable o constante de anticuerpo, incluyendo, pero sin limitarse a, un dominio VL, un dominio VH, un Fv, un Fv de cadena única, un diacuerpo, un fragmento Fab, un Fab de cadena única, o un F(ab')₂.

10 De acuerdo con la invención, los compañeros de fusión pueden acoplarse a las fracciones SEED directamente o indirectamente. Por ejemplo, un compañero de fusión puede estar ligado a una fracción SEED mediante un péptido conector, tal como se ha descrito en las Patentes Estadounidenses Nos. 5,258,498 y US 5,482,858 de Huston et al., o U.S. Patent Nos. 5,856,456 y US 5,990,275 de Whitlow et al., cuyos contenidos se incorporan en la presente patente a modo de referencia. De forma habitual, un péptido conector adecuado puede contener residuos de glicina y serina. De manera habitual, un péptido conector adecuado puede además presentar diferentes propiedades. Por ejemplo, en algunos modos de realización, un conector puede además incluir un sitio de corte para la proteasa, tal como un sitio de reconocimiento de metaloproteínasa de matriz.

20 Por tanto, la presente invención proporciona un método novedoso para producir anticuerpos multiespecíficos basados en la tecnología SEED. Un anticuerpo multiespecífico es una molécula que tiene especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. Mientras que tales moléculas se unen, de manera habitual, únicamente a dos antígenos (es decir, BsAbs), los anticuerpos con especificidades adicionales, tales como anticuerpos tri-específicos o tetra-específicos se encuentran incluidos por esta expresión cuando se utiliza en la presente patente. Ejemplos de BsAbs incluyen aquellos que se unen a diferentes antígenos en la misma superficie celular, o aquellos que se unen a un antígeno de superficie celular y a un antígeno que no es de superficie celular. Un antígeno que no es de superficie celular incluye, pero no se limita a, un antígeno intracelular o extracelular, un antígeno soluble o insoluble. Los anticuerpos multiespecíficos pueden unirse a diferentes antígenos de forma simultánea, aunque la unión simultánea no se requiere para la función de los anticuerpos multiespecíficos. En algunas aplicaciones, los antígenos se encuentran, de manera preferente, relacionados de forma funcional, tal como EGFR y HER2. En particular, tipos útiles de anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero no se limitan a, anti-EGFR/anti-HER2; anti-EGFR/anti-HER2/anti-HER3; anti-EGFR/anti-HER3; anti-EGFR/anti-HER2/anti-IGF1R; anti-EGFR/anti-HER2/anti-HER3/anti-IGF1R; anti-EGFR/anti-HER3/anti-IGF1R; anti-EGFR/anti-IGF1R; y anti-HER2/anti-IGF1R. Otras combinaciones de especificidades que implican la familia EGFR, HER y IGF1R se encuentran dentro del alcance de la presente invención.

35 Ejemplos adicionales de BsAbs incluyen aquellos con un brazo dirigido contra un antígeno de célula tumoral y el otro brazo dirigido contra una molécula gatillo citotóxica, tal como anti-FcγRI/anti-CD 15, anti-p185HER2 /FcγRIII (CD 16), anti-CD3/ anti-célula B maligna (1D10), anti-CD3/ anti-p 185^{HER2}, anti-CD3/ anti-p97, anti-CD3/anti- carcinoma de células renales, anti-CD3/anti-OVCAR-3, anti-CD3/L-D1 (anti-carcinoma de colon), anti-CD3/anti-análogo de la hormona estimulante de melanocitos, anti-receptor EGF/anti-CD3, anti-CD3/anti-CAMA1, anti-CD3/anti-CD19, anti-CD3/MoV18, anti- molécula de adhesión celular neuronal (NCAM, por sus siglas en inglés)/ anti-CD3, anti-proteína de unión al folato (FBP)/anti-CD3, anti-pan antígeno asociado con carcinoma (AMOC-31)/anti-CD3; BsAbs con un brazo que se une específicamente a un antígeno tumoral y un brazo que se une a una toxina tal como la anti-saporina/anti-id-1, anti-CD22/anti-saporina, anti-CD7/anti-saporina, anti-CD38/anti-saporina, anti-CEA/anti-cadena A de la ricina, anti-interferón-α (IFN-α)/ anti-idiotipo de hibridoma, anti-CEA/ anti-vinca alcaloide; BsAbs para convertir los fármacos activados por enzimas, tales como el anti-CD30/anti- fosfatasa alcalina (la cual cataliza la conversión del profármaco mitomicina fosfato a mitomicina alcohol); BsAbs que pueden ser utilizados como agentes fibrinolíticos, tales como el anti-fibrina/ anti-activador del plasminógeno tisular (tPA), anti-fibrina/anti-uroquinasa-tipo activador del plasminógeno (uPA); BsAbs para dirigir complejos inmunes a los receptores de superficie celular, tal como el anti- lipoproteína de baja densidad (LDL) /anti-receptor Fc (por ejemplo, FcγFI, FcγRII o FcγRIII); BsAbs para su uso en la terapia de enfermedades infecciosas, tal como un anti-CD3/ anti-virus herpes simplex (VHS), anti-receptor de linfocito T: complejo CD3 /anti-influenza, anti-FcγR/anti-VIH, BsAbs para la detección tumoral *in vitro* o *in vivo*, tal como el anti-CEA/anti-EOTUBE, anti-CEA/anti-DPTA, anti-p185^{HER2}/ anti-hapteno; BsAbs como adyuvantes de vacunas; y BsAbs como herramientas diagnósticas, tales como anti-IgG de conejo/anti-ferritina, anti-peroxidasa de rábano (HRP, por sus siglas en inglés)/anti-hormona, anti-somatostatina/ anti-sustancia P, anti-HRP/anti-FITC, anti-CEA/anti-β-galactosidasa. Ejemplos de anticuerpos trie-specificos incluyen el anti-CD3/anti-CD4/anti-CD37, anti-CD3/anti-CD5/anti-CD37 y el anti-CD3/anti-CD8/anti-CD37.

55 De acuerdo a la invención, otros dominios bio-activos incluyen hormonas, citocinas, quimiocina, enzimas secretadas, ligandos, porciones extracelulares de receptores transmembrana, o receptores. Las hormonas incluyen, pero no se limitan a, hormonas del crecimiento, o péptido similar al glucagón (GLP-1). Las citocinas incluyen, pero no se limitan a, interleucina-2 (IL-2), IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-18, IL-21, IL-23, IL-31; factores hematopoyéticos tales como el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, por sus siglas en inglés), factor estimulante de colonias de granulocitos o G-CSF y eritropoyetina; factores de necrosis tumoral

(TNF, por sus siglas en inglés), tal como el TNF α ; linfocinas tales como la linfotoxina; reguladores del proceso metabólico tales como la leptina; e interferones (IFN) tales como el INF- α , INF- β , e IFN- γ .

Por tanto, las inmunoglobulinas heterodiméricas modificadas genéticamente de la presente invención permiten la co-localización de diferentes dominios bio-activos en un sistema biológico. Esto puede lograrse, por ejemplo, en el contexto de una proteína multimérica que incorpora dos dominios variables de anticuerpo diferentes, donde un dominio variable de anticuerpo se fusiona a un dominio modificado genéticamente, y un segundo dominio variable de anticuerpo se fusiona a un segundo dominio modificado genéticamente que, de manera preferente, ensamble con el primer dominio modificado genéticamente. La administración de tal proteína modificada genéticamente causa que dos actividades distintas – en este caso, actividades de unión – estén presentes en la misma molécula en el sistema biológico, co-localizando las actividades dentro del sistema biológico. Si las actividades implican la unión a otras moléculas (como una interacción dominio variable de anticuerpo/antígeno, una interacción ligando/receptor, etc.), actividades enzimáticas, o una combinación de las mismas, la presente invención proporciona un sistema que requiera que las actividades estén presentes en el mismo lugar permitiendo, por ejemplo, la focalización de una actividad terapéutica a una célula o localización en particular; el entrecruzamiento de diferentes receptores o células; la co-localización de un antígeno y adyuvante; etc. Esto puede lograrse mediante la administración directa de una proteína heteromérica modificada genéticamente a un sistema biológico o mediante expresión de ácido nucleico que codifica las subunidades dentro del sistema biológico. La expresión de ácido nucleico permite la modificación por ingeniería genética de niveles adicionales de control en el sistema. Por ejemplo, la expresión de cada subunidad puede ser regulada de manera diferencial, de tal manera que la proteína heteromérica completa y la co-localización resultante de las actividades tiene lugar, únicamente, ante la presencia de todas las condiciones que se requieren para la expresión de cada subunidad.

Dominios modificados genéticamente con inmunogenicidad reducida

En otro modo de realización de la invención, las secuencias de SEED pueden ser modificadas para reducir su inmunogenicidad potencial. Debido a que los polipéptidos SEED son híbridos entre dos diferentes secuencias humanas naturales, incluyen segmentos de secuencia en sus uniones que no se encuentran en proteínas humanas naturales. En un organismo, estos segmentos de secuencia pueden ser procesados en epítopos de linfocitos T no propios.

Métodos para analizar secuencias de péptidos por su potencial para crear epítopos de linfocitos T, son bien conocidos en el arte. Por ejemplo, ProPred (<http://www.imtech.res.in/raghava/propred>; Singh y Raghava (2001) Bioinformatics 17:1236 - 1237), es una herramienta disponible públicamente basada en la web que puede ser utilizada para la predicción de péptidos que enlazan alelos HLA-DR. ProPred está basado en un algoritmo de predicción matricial descrito por Sturniolo para un conjunto de 50 alelos HLA-DR (Sturniolo et al., (1999) Nature Biotechnol. 17:555 – 561). Al utilizar un algoritmo de tales características, se descubrieron varias secuencias de péptidos dentro de las secuencias polipeptídicas AG SEED y GA SEED, las cuales se predice que van a unirse a múltiples alelos MHC de clase II con una fuerza de unión significativa y, por lo tanto, potencialmente inmunogénica.

Por ejemplo, en un modo de realización, las secuencias AG SEED y GA SEED se modifican para eliminar uno o más epítopos de linfocitos T presentes en la secuencia SEED. Esta modificación puede incluir la sustitución, delección, o modificación de uno o más residuos de aminoácidos a fin de eliminar el epítipo de linfocito T. La tabla 1 presenta una lista de secuencias de péptidos que son epítopos de linfocitos T potenciales en el AG SEED y GA SEED, y posibles sustituciones de aminoácidos que se predice que reducen o eliminan el epítipo de linfocito T.

AG(f0) SEED		
Pos	Péptido	Sustitución de Aminoácido
32	FYPKDIAVE (SEQ ID NO:12)	K35S
67	FAVTSKLTV (SEQ ID NO:13)	V75T
69	VTSKLTVDK (SEQ ID NO:14)	
99	YTQKTISLS (SEQ ID NO:15)	T103S

Tabla 1 (continuación)

GA(f0) SEED		
Pos	Péptido	Sustitución de Aminoácido
18	LALNELVTL (SEQ ID NO:16)	L23Q
20	LNELVTLTC (SEQ ID NO:17)	
23	LVTLTCLVK (SEQ ID NO:18)	
54	YLTWAPVLD (SEQ ID NO:19)	A58T
55	LTWAPVLDS (SEQ ID NO:20)	L61V,D,T
61	LDSDGSFFL (SEQ ID NO:21)	L61V, D, T
67	FFLYSILRV (SEQ ID NO:22)	F67A, D, E, G, H, K, N, P, Q, R, S, T
68	FLYSILRVA (SEQ ID NO:23)	A76T E78D
69	LYSILRVAA (SEQ ID NO:24)	
70	YSILRVAE (SEQ ID NO:25)	
72	ILRVAEDW (SEQ ID NO:26)	

5 La tabla 1 muestra los péptidos en AG(f0) SEED o GA(f0) SEED que se predice que van a unirse a los alelos HLA-DR y que son epítomos de linfocitos T potenciales, y sustituciones de aminoácidos en residuos específicos (indicados en **negrita**) dentro de los péptidos que se predice que reducen la unión a los alelos HLA-DR. "Pos" indica la posición del péptido dentro de la secuencia. La numeración de aminoácidos es secuencial y relativa al primer aminoácido de la molécula SEED.

10 Los polipéptidos originales de AG SEED (AG(f0) SEED (SEQ ID NO:3)) and GA SEED (GA(f0) SEED (SEQ ID NO:6)) "completo", y algunas variantes de polipéptidos a modo de ejemplo, incluyendo AG(f1) SEED (SEQ ID NO:4), AG(f2) SEED (SEQ ID NO:5), GA(f1) SEED (SEQ ID NO:7), GA(f2) SEED (SEQ ID NO:8), y GA(f3) SEED (SEQ ID NO:9), se muestran en los siguientes alineamientos.

Alineamiento de AG SEEDs (el punto indica la indentidad del residuo)

```

1  GQPFREPVHLLPPSREEMTKNOVSLTCLARGFYPKDIAVEWESNGQPENNYKTTPSRQEP  AG (f0) SEED
1  .....S.....  AG (f1) SEED
1  .....S.....  AG (f2) SEED

61  SQGTTTFAVTSKLTVDKSRWQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKTI SL  AG (f0) SEED
61  .....S...  AG (f1) SEED
61  .....T.....S...  AG (f2) SEED
    
```

Alineamiento de GA SEEDs (el punto indica la indentidad del residuo)

```

1  GQPREPQVYTLPPPSSEELALNELVTLTCLVKGFYPSDIAVEWLGQSQELPREKYLTWAPV  GA (f0) SEED
1  .....Q.....T..  GA (f1) SEED
1  .....Q.....  GA (f2) SEED
1  .....Q.....T..  GA (f3) SEED

61  LDSDGSFFLYSILRVAEDWKKGDTFSCSCVMHEALHNHYTQKSLDR  GA (f0) SEED
61  V.....T.D.....  GA (f1) SEED
61  D.....H.....T.D.....  GA (f2) SEED
61  T.....D.....T.D.....  GA (f3) SEED
    
```

15 Modos de realización adicionales a modo de ejemplo, de acuerdo a la invención, se detallan en los ejemplos que siguen a continuación.

Ejemplos

EJEMPLO 1: Identificación de estructuras homólogas para convertirse en parentales de un SEED.

En este grupo de ejemplos, la finalidad es producir dos SEED homólogos de CH3 distintos que formarán dímeros que favorezcan la formación de un heterodímero sobre la formación de dos posibles homodímeros, dando como resultado, de ese modo, una predominancia de los heterodímeros homólogos de CH3. La primera tarea es identificar dos o más dominios CH3 que puedan producir este resultado cuando sean utilizados como parentales de un par de SEEDs. El homodímero de CH3 forma una interfaz de dimerización entre las láminas β . Es importante encontrar dos dominios CH3 que presenten diferencias significativas en esta interfaz, a fin de producir un par efectivo de SEEDs que, de manera preferente, heterodimericen.

Los dominios CH3 de la IgG se encuentran estructuralmente sumamente conservados a través del reino animal, conteniendo un clásico plegamiento tipo sándwich β del dominio de inmunoglobulina. Mientras que existen diferencias significativas entre especies en las identidades de los aminoácidos que se observan en la superficie exterior, la interfaz de la superficie de dimerización que queda sepultada al producirse la dimerización se conserva en su mayoría.

Cada clase diferente de inmunoglobulina tiene su propia Fc, y en particular tiene su propio equivalente de la secuencia y estructura de CH3 de la IgG. El examen del dominio CH3 en la estructura cristalina de la porción Fc de una IgA1 humana (número del PDB 1OW0, resolución 3.1Å), reveló que el plegamiento global era homólogo al CH3 de la IgG humana. La RMSD (por sus siglas en inglés) principal (desviación cuadrática media) del alineamiento de dominios CH3 únicos de la IgA Fc 1OW0 y de la IgG Fc 1L6X, excluyendo vueltas donde el alineamiento tenía diferentes longitudes, era de aproximadamente 0.99 Å. (Ver tabla 2). Sin embargo, la interfaz del homodímero del CH3 de la IgA es diferente, de manera significativa, a aquél de la IgG1. Por tanto, dos SEED producidos a partir del CH3 de la IgA1 humana y el CH3 de la IgG1 humana, contienen cada uno alguna porción de la interfaz de la IgA1, y algo de la IgG1, y se encuentran diseñados para no dimerizar entre ellos, ni con cualquier otro CH3 parental, pero sí para dimerizar, de manera preferente, con el otro SEED complementario.

Tabla 2. Alineamiento estructural de los dominios CH3 de la IgG y la IgA*

IgG Humana	IgA Humana
Q342 - M358	N343 - L359
N361 - P387	E363 - E389
N390 - S400	K394 - P404
G402 - L443	T409 - R450

*Porciones de secuencias de IgG y de IgA fueron utilizadas para superponer estructuras y determinar el RMSD de la cadena principal. El programa InsightII (Accelrys, San Diego, CA) sobreimpuso los átomos de la cadena principal de los residuos Incluidos en las secuencias estructuralmente homólogas, numeradas anteriormente. El RMSD entre las dos cadenas principales (dentro de los rangos de la tabla) fue de 0.99Å.

Por ejemplo, el dominio CH3 de la IgA1 humana y el dominio CH3 de la IgG1 humana se utilizaron como polipéptidos parentales. Para el alineamiento y la modelización estructural, se utilizaron las entradas del PDB de la IgG1 1DN2 (resolución 2.7Å) y 1L6X (secuencia de CH3 sumamente homóloga a 1DN2, con dos diferencias de poca importancia, resolución 1.65 Å), y la entrada del PDB de la IgA1 1OW0 (resolución 3.1Å). La Figura 2 muestra el alineamiento estructural de las dos secuencias. EL dominio CH3 de la IgG1 se encuentra numerado de acuerdo a la numeración del índice EU de Kabat (Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Edition, NIH Publication 91-3242), mientras que el dominio CH3 de la IgA se encuentra numerado secuencialmente como en la estructura del PDB 1OW0. Las letras en negrita designan las posiciones de la cadena principal que fueron incluidas en el alineamiento descrito en la Tabla 2, las cuales fueron utilizadas adicionalmente para diseñar puntos de cruce de unión en el diseño de los SEED.

EJEMPLO 2: Elección de los puntos de intercambio

Una vez que el alineamiento estructural se determina y que los residuos de la interfaz se identifican, los puntos de intercambio se encuentran preparados para ser elegidos para crear los SEED. El homodímero de CH3 tiene una simetría rotacional de 180° alrededor de un eje que transcurre entre los dominios de forma aproximadamente perpendicular a las cadenas beta (Figura 4). Cada dominio tiene el N-terminal y el C-terminal en lados opuestos del eje de simetría. Por lo tanto, los dominios CH3 dimerizan de una manera similar a un apretón de manos, donde, únicamente en una línea por el centro de la interfaz a lo largo del eje de simetría, los residuos en un lado entran en contacto con el mismo residuo en el otro compañero. Los residuos que se encuentran a cualquier lado de esa línea, entran en contacto con el dominio del compañero de manera enfrentada: *por ejemplo*, los residuos en el lado N-terminal del primer dominio hacen contacto con residuos en el segundo dominio que se encuentran en el lado C-terminal, y viceversa.

En un modo de realización, un SEED basado en CH3 es diseñado para romper la simetría, haciendo los dos lados diferentes. Por ejemplo, el intercambio de cadena hará un lado del dímero más similar a la IgA1, y el otro lado más similar a la IgG. Esta aproximación crea dos SEED diferentes basados en CH3 que son aproximadamente complementarios en su uso de los aminoácidos derivados de la IgG y la IgA. Tal como se muestra en las Figuras 3A y 3B, la secuencia polipeptídica lineal va de un lado a otro entre las secuencias de IgG y de IgA a fin de producir un lado físico de la estructura dimerica similar a la IgA y el otro lado similar a la IgG. Por tanto, cada secuencia de un SEED final contiene múltiples puntos de intercambio, en cada uno de los cuales la secuencia lineal cambia de la IgA a la IgG o de la IgG a la IgA (Figuras 3A y 3B).

En general, existen varios múltiples puntos de intercambio potenciales en la secuencia polipeptídica que pueden ser elegidos para alternar entre secuencias de IgA y IgG1. Una consideración importante es que la estructura final debería tener buenas características estructurales (*por ejemplo*, estabilidad, plegamiento, expresión, homología con el original). Esto puede lograrse mediante inspección, modelización simple, cálculo extensivo, ensayo y error, selección, o mediante otros medios. En el modo de realización específico descrito en el presente documento, la homología de secuencia entre los dominios CH3 de la IgA y de la IgG1 se utilizó para decidir los puntos de intercambio. El alineamiento de las estructuras cristalinas del CH3 de la IgG1 y la IgA, revelaron líneas aproximadamente paralelas de aminoácidos a lo largo de un plano aproximado en ángulo a través del área del medio del dominio. Los residuos en el plano eran idénticos en ambas clases de CH3 en todo excepto en dos cadenas en el alineamiento estructural de IgG1/IgA. Más aún, el alineamiento de estructuras mostraba en general las cadenas laterales de aquellos aminoácidos en las mismas orientaciones de los rotámeros, en particular en el núcleo hidrofóbico. Se realizó entonces la hipótesis de que estos residuos podrían ser utilizados como puntos de intercambio, y los residuos en uno u otro lado podrían ser modificados sin alterar la estructura global. Las Figuras 3A y 3B muestran el alineamiento de secuencias con los puntos de intercambio resaltados en letras en negrita. Las Figuras 5 y 6A-C muestran la estructura molecular que ilustra las localizaciones tridimensionales de los puntos de intercambio.

En los dos casos donde los residuos no son los mismos en una región de unión, las opciones de puntos de intercambio se basaron en consideraciones estructurales. En un caso, Pro395 y Pro396 en la IgG1 corresponden estructuralmente a Ala399 y Ser400 en la IgA1. La división se realizó entre estos dos residuos. La otra localización se encuentra cerca del C-terminal, Leu441 y Ser442 en la IgG1 corresponden estructuralmente a Ile448 y Asp449 en la IgA1. De nuevo, la división se realizó entre estos dos residuos.

Las interacciones proteína-proteína están mediadas por la complementariedad de las dos superficies que interactúan. El factor dominante para la interacción es la composición y forma de esas superficies. Ya que las estructuras de la cadena principal subyacentes y los interiores hidrofóbicos de los dominios CH3 de la IgA y la IgG1 son similares, se contempló de acuerdo a los principios de la invención que tan sólo la superficie tendría que ser modificada, mientras que el resto del dominio podría contener secuencias de IgG. En este caso, los puntos de intercambio se diseñaron en las cadenas que forman la interfaz y se encontraban muy cerca uno del otro, permitiendo que sólo se intercambiaran los residuos cruciales para la dimerización. Por tanto, como una alternativa, es posible que el resto de la estructura pudiera estabilizar el dominio de ensamblaje, y así los SEED de CH3 con un único punto de intercambio en cada una de las siete cadenas podría tener ventajas.

Por lo tanto, dos tipos de SEED pueden ser diseñados y designados como "Completos" para los SEED en los que la mayoría de o todos los residuos en el dominio estaban implicados en el intercambio de cadena (que corresponde a la Figura 1A), o "De superficie" para los SEED en los que los únicos residuos modificados se encuentran en la interfaz de dimerización de CH3 (que corresponde a la Figura 1B).

En base a este Ejemplo, se podrá apreciar por aquellos expertos en el arte que una variedad de estrategias pueden ser utilizadas para generar SEEDs basados en los dominios constantes de la superfamilia inmonoglobulina.

EJEMPLO 3: Diseño de las secuencias de los AG y GA SEED "Completos"

Como un ejemplo, la manera más sencilla de producir un SEED "Completo" sería utilizar una secuencia de IgA pura en el primer lado del punto de intercambio, y una secuencia de IgG1 pura en el segundo lado del punto de intercambio. Si el punto de intercambio se elige de manera adecuada, esto daría como resultado un SEED que debería plegarse de manera apropiada y tendría una superficie de dimerización similar a la IgGA1 en un lado (*por ejemplo*, aproximadamente la mitad) del dominio, y una superficie de dimerización similar a la IgG en el otro lado. Un SEED de 'imagen espectral' puede producirse de forma similar, en el que el primer lado esté compuesto de secuencia de la IgG1 y el segundo lado esté compuesto de secuencia de la IgA. Cuando estos dos SEED se expresan conjuntamente, formarán de manera preferente heterodímeros, ya que únicamente en el heterodímero estará cada superficie haciendo contacto con una superficie en el otro dominio que se adapta a su clase: es decir, la primera mitad del primer SEED, que es similar a la IgA, hará contacto con la segunda mitad del segundo SEED, que es también similar a la IgA, mientras que la segunda mitad del primer SEED, que es similar a la IgG1, hará contacto con la primera mitad del segundo SEED, que es también similar a la IgG1. Debido a que ambos lados de la superficie de contacto son sumamente complementarios, la asociación debería ser fuerte. Por otro lado, cuando

5 cualquiera de los SEED intenta formar un homodímero, cada mitad de la superficie de dimerización hará contacto con una superficie en el SEED compañero que proviene de una clase diferente: es decir, la primera mitad de un SEED, que es similar a la IgA hará contacto con la segunda mitad del dominio compañero, que es similar a la IgG; y la segunda mitad del primer SEED, que es similar a la IgG1, hará contacto con la primera mitad del dominio compañero, que es similar a la IgA. Debido a que estas superficies no son muy complementarias, su afinidad se verá disminuida, dando como resultado una termodinámica que favorece la formación de menos homodímeros y más heterodímeros.

10 En este ejemplo, el CH3 es la única parte de la Fc o del anticuerpo que fue modificada. El resto de la Fc o la inmunoglobulina proviene de la IgG1 humana. Modificar la secuencia de aminoácidos donde el CH3 entra en contacto o interactúa con el CH2 podría, potencialmente, crear problemas con la interfaz entre los SEED de CH3 y los dominios CH2 de la IgG1. Además, esta interfaz contiene el sitio de unión para FcRn, lo que otorga propiedades importantes a la Fc que resulta deseable que se mantengan. Por lo tanto, se utilizó información estructural (Martin et al. (2001) Molec. Cell 7:867) para identificar los residuos de CH3 implicados en las interacciones entre el CH3 y el CH2, y entre Fc y FcRn. Se utilizaron secuencias de la IgG1 humana para aquellos residuos en todos los SEED. Se utilizó también modelización molecular para ayudar a elegir los residuos adyacentes para evitar modificar la estructura de la superficie de interacción de FcRn. La porción de CH3 que interactúa con el CH2 y con FcRn no forma parte de la interfaz de dimerización, por lo tanto, era improbable que estas modificaciones obstaculizaran la formación de heterodímeros.

20 La Figura 3B tiene las secuencias de SEED "Completo" alineadas con las secuencias de la IgG1 y la IgA en alineamiento estructural. Los residuos que residen en los puntos de intercambio se encuentran resaltados en negrita. Los residuos que no fueron modificados debido a su importancia en mantener la interacción con el CH2 y/o con FcRn se encuentran subrayados.

EJEMPLO 4: Construcción de Fc heterodimérico y moléculas de anticuerpo que contienen SEEDs basados en CH3

25 La siguiente aproximación general fue utilizada para producir constructos HuFc y HuFc-IL2, además de constructos de anticuerpo y anticuerpo-IL2, que contienen dominios CH3 de SEED en lugar de dominios CH3 de IgG1. El dominio CH3 de la IgG1 se encuentra contenida casi enteramente en un fragmento de ADN genómico Ngo MIV / Sma I de aproximadamente 0.4kb, que se encuentra presente en los plásmidos de expresión pdCs o pdHL que expresan la región constante de una cadena pesada de la IgG1. Plásmidos de expresión a modo de ejemplo son, por ejemplo, pdCs-huFc-IL2 (ver, por ejemplo, Lo et al., Protein Engineering [1998] 11:495), o pdHL7-KS-IL2 (ver, por ejemplo la Patente estadounidense US Patent 6,696,517). El sitio Ngo MIV se encuentra dentro de la secuencia del intrón inmediatamente 5' del exón que codifica el CH3 de la IgG1, y el sitio Sma I se encuentra en una secuencia que codifica Ser₄₄₄Pro₄₄₅Gly₄₄₆ cerca del C-terminal de la IgG1 (índice EU de Kabat). Una secuencia de ADN a modo de ejemplo de Fc de la IgG1 humana madura, expresado a partir de un vector pdCs, se muestra en SEQ ID NO:27. El reemplazo del fragmento Ngo MIV / Sma I parental con un fragmento Ngo MIV / Sma I que codifica un SEED de CH3 de la invención, genera tras la expresión un polipéptido que contiene una región constante con un SEED de CH3.

SEQ ID NO:27

Secuencia de ADN en pdCs que codifican Fc de IgG1 humana madura que incluye un residuo de Lisina terminal

GAGCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAGGTAAGCCAGCCCAGGCCTC
 GCCCTCCAGCTCAAGGCGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTGCATCCAGGGACAGGCCCCAGCCG
 GGTGCTGACACGTCCACCTCCATCTCTTCCTCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTT
 CCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCACATGCGTGG
 TGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG
 CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTT
 CACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC
 TCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGTGGGACCCGTGGGGTGCAGGGCCA
 CATGGACAGAGGCCGGCTCGGCCACCCTCTGCCCTGAGAGTGACCGCTGTACCAACCTCTGTCC
 CTACAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCACGGGAGGAGATGACCAAG
 AACCAGGTGAGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA
 GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA ACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT
 TCTTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC
 TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAA
 ATGA

5 Se utilizaron técnicas estándar para obtener secuencias de ADN que codifican los SEED de CH3 de la invención. Por ejemplo, moléculas de ADN con las siguientes secuencias como se muestran en SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, y SEQ ID NO:53, fueron sintetizadas *de novo* y propagadas en un plásmido portador derivado de pUC (Blue Heron Biotechnology, Bothell, WA).

SEQ ID NO:28

Fragmento Ngo MIV / Sma I de ADN, que contiene secuencia que codifica AG(f0) SEED (subrayado correspondiente a la Figura 3B, "AG SEED Completo"):

gccggctcggccccaccctctgccctgagagtgaccgctgtaccaacctctgtccctacaGGGCAG
CCCTTCCGGCCAGAGGTCCACCTGCTGCCCCATCACGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAG
CCTGACCTGCCTGGCAGCGGCTTCTATCCAAGGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC
AGCCGGAGAACA ACTACAAGACCACGCCTTCCCGGCAGGAGCCCAGCCAGGGCACCACCACCTTC
GCTGTGACCTCGAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGACCATCTCCCTGtccccggg

10 SEQ ID NO:29

Fragmento Ngo MIV / Sma I de ADN, que contiene secuencia que codifica AG(s0) SEED (subrayado correspondiente a la Figura 3A, "AG SEED De superficie"):

gccggctcggccccaccctctgccctgagagtgaccgctgtaccaacctctgtccctacaGGGCAG
CCCTTCGAACCAGAGGTCCACACCCTGCCCCATCACGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAG
CCTGACCTGCCTGGTCCGCGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC
AGCCGGAGAACA ACTACAAGACCACGCCTTCCCGGCTGGAGCCCAGCCAGGGCACCACCACCTTC
GCTGTGACCTCGAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGtccccggg

SEQ ID NO:30

Fragmento Ngo MIV / Sma I de ADN, que contiene secuencia que codifica GA(f0) SEED (subrayado correspondiente a la Figura 3B, "GA SEED Completo"):

gcccggctcggcccaccctctgccctgagagtgaccgctgtaccaacctctgtccctacaGGGCAG
CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCACCGTCGGAGGAGCTGGCCCTGAACGAGCTGGT
GACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGCTGCAGGGGT
CCCAGGAGCTGCCCCGCGAGAAGTACCTGACTTGGGCACCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC
TTCTCTATAGTATACTGCGCGTGGCAGCCGAGGACTGGAAGAAGGGGGACACCTTCTCATGCTC
CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCGACCGctccccggg

5 SEQ ID NO:31

Fragmento Ngo MIV / Sma I de ADN, que contiene secuencia que codifica GA(s0) SEED (subrayado correspondiente a la Figura 3A, "GA SEED De superficie"):

gcccggctcggcccaccctctgccctgagagtgaccgctgtaccaacctctgtccctacaGGGCAG
CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCACCGTCGGAGGAGCTGGCCCTGAACAACAGGT
GACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG
GGCAGCCGGAGCCCCGCGAGAAGTACCTGACTTGGGCACCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC
TTCTCTATTTCGATACTGCGCGTGGACGCAAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC
CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGtccccggg

SEQ ID NO:32

10 Fragmento Ngo MIV / Sma I de ADN, que contiene secuencia que codifica GA(f1) SEED (subrayado):

gcccggctcggcccaccctctgccctgagagtgaccgctgtaccaacctctgtccctacaGGGCAG
CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCACCGTCGGAGGAGCTGGCCCTGAACGAGCaGGT
GACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGCTGCAGGGGT
CCCAGGAGCTGCCCCGCGAGAAGTACCTGACTTGGaCcCCCGTGgTGGACTCCGACGGCTCCTTC
TTCTCTATAGTATACTGCGCGTGaCAGCCGAtGACTGGAAGAAGGGGGACACCTTCTCATGCTC
CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCGACCGctccccggg

SEQ ID NO:53

Fragmento Ngo MIV / Sma I de ADN, que contiene secuencia que codifica GA(f2) SEED (subrayado):

gccggctcggcccaccctctgccctgagagtgaccgctgtaccaacctctgtccctacaGGGCAG
CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCACCGTCGGAGGAGCTGGCCCTGAACGAGCaGGT
GACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGCTGCAGGGGT
CCCAGGAGCTGCCCCGCGAGAAGTACCTGACTTGGgCaCCCGTGgacGACTCCGACGGCTCCcaC
TTCTCTATAGTATACTGCGCGTGaCAGCCGatGACTGGAAGAAGGGGGACACCTTCTCATGCTC
CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCGACCGCtccccggg

Además, un polipéptido que contiene GA(f3) SEED puede ser codificado por la siguiente secuencia de ADN:

SEQ ID NO:54

Fragmento Ngo MIV / Sma I de ADN, que contiene secuencia que codifica GA(f3) SEED (subrayado):

gccggctcggcccaccctctgccctgagagtgaccgctgtaccaacctctgtccctacaGGGCAG
CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCACCGTCGGAGGAGCTGGCCCTGAACGAGCaGGT
GACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGCTGCAGGGGT
CCCAGGAGCTGCCCCGCGAGAAGTACCTGACTTGGaCcCCCGTGaccGACTCCGACGGCTCCgac
TTCTCTATAGTATACTGCGCGTGaCAGCCGatGACTGGAAGAAGGGGGACACCTTCTCATGCTC
CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCGACCGCtccccggg

5

Estas secuencias sintéticas fueron extendidas, de manera adicional, en su extremo 3' con una extensión de ADN aleatorio de aproximadamente 50 bp, a fin de permitir la fácil separación del fragmento inserto deseado de Ngo MIV / Sma I tomado por excisión y un fragmento de un vector plasmídico de tamaño similar durante la purificación del fragmento. Los fragmentos Ngo MIV / Sma I purificados fueron entonces ligados a un vector pdCs tratado de forma similar, que podía contener o bien una fracción Fc o una fracción Fc-IL2, o de manera alternativa, a un vector pdHL tratado de forma similar que podía contener o bien una fracción DI-KS o una fracción DI-KS-IL2. Por tanto, por ejemplo, se obtuvo pdCs-HuFc(AG(f0))-IL2 que contiene el fragmento Ngo MIV / Sma I para AG(f0) SEED (SEQ ID NO:28), y pdCs-HuFc(GA(f0)), que contiene el fragmento Ngo MIV / Sma I para GA(f0) SEED (SEQ ID NO:30). pdCs-HuFc(AG(f0))-IL2 y pdCs-HuFc(GA(f0)) codifican una cadena polipeptídica Fc(AG(f0) SEED)-IL-2, y una cadena polipeptídica Fc(GA(f0) SEED), respectivamente. Secuencias a modo de ejemplo de Fc(AG(f0) SEED)-IL-2 y de Fc(GA(f0) SEED) se muestran como SEQ ID NO:33 y SEQ ID NO:34, respectivamente, a continuación. Un diagrama de la proteína heterodimérica resultante se muestra en la Figura 11A. Para obtener la expresión simultánea de ambas cadenas polipeptídicas a partir de una célula hospedadora, las unidades de transcripción para estos polipéptidos de Fc se combinaron en un vector de expresión único, tal como se describe a continuación en el Ejemplo 5.

10

15

20

SEQ ID NO:33

Secuencia polipeptídica de un Fc(AG(f0) SEED)-IL2:

EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPF
PEVHLLPPSREEMTKNQVSLTCLARGFYPKDIAVEWESNGQPENNYKTTPSRQEPSQGTTF
AVT SKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKTI SLS PGKAPTS SSTKKTQLQLEHLLLDLQ
MIL NGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLIS
NIN VIVLELKGSETTFMCEYADETAT IVEFLNRWITFCQSIISTLT

SEQ ID NO:34

Secuencia polipeptídica de un Fc(GA(f0) SEED):

EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
 PQVYTLPPPSSEELALNELVTLTCLVKGFYPSDIAVEWLGQSQELPREKYLTWAPVLDSDGSFFLY
 SILRVAEADWKKGDTFSCSVMHEALHNHYTQKSLDRSPGK

5 De manera similar, se obtuvo pdHL-DI-KS(AG(f0))-IL2, que contiene el fragmento Ngo MIV / Sma I para AG(f0) SEED (SEQ ID NO:28), y pdHL-DI-KS(GA(f0)), que contienen el fragmento Ngo MIV / Sma I para GA(f0) SEED (SEQ ID NO:30). pdHL-DI-KS(AG(fD))-IL2 y pdHL-DI-KS(GA(f0)) codifican la cadena pesada de DI-KS(AG(f0) SEED)-IL-2 (SEQ ID NO:35), la cadena pesada de DI-KS(GA(f0) SEED) (SEQ ID NO:36), respectivamente. Ambos vectores de expresión también codifican la cadena liviana de DI-KS (SEQ ID NO:37).

SEQ ID NO:35

Secuencia polipeptídica de la cadena pesada de DI-KS(AG(f0) SEED)-IL2:

QIQLVQSGPELKKPGSSVKISCKASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLKWMGWINTYTGEPTYADDFK
 GRFTITAETSTSTLYLQLNNLRSEDATYFCVRFISKGDYWGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPS
 SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
 TYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
 VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 ALPAPIEKTISKAKGQPRPEVHLLPPSREEMTKNQVSLTCLARGFYPKDIAVEWESNGQPENNY
 KTTPSRQEPSQGTTFFAVTSKLTVDKSRWQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKTIISLSPGAAPTSSS
 TKKTQLQLEHLLLDLQMI LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVLN
 LAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT

10

SEQ ID NO:36

Secuencia polipeptídica de la cadena pesada de DI-KS(GA(f0) SEED):

QIQLVQSGPELKKPGSSVKISCKASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLKWMGWINTYTGEPTYADDFK
 GRFTITAETSTSTLYLQLNNLRSEDATYFCVRFISKGDYWGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPS
 SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
 TYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
 VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPPSSEELALNELVTLTCLVKGFYPSDIAVEWLGQSQELPR
 EKYLTWAPVLDSDGSFFLYSILRVAEADWKKGDTFSCSVMHEALHNHYTQKSLDRSPGK

SEQ ID NO:37

15 Secuencia polipeptídica de la cadena liviana de DI-KS:

QIVLTQSPASLAVSPGQRATITCSASSSVSYILWYQQKPGQPPKRWIFDTSNLSAGFPPSRFSGSG
SGTSYTLTINSLEAEDAATYYCHQRSQGYPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS

VVCLLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV
THQGLSSPVTKSFNRGEC

Para obtener un único vector de expresión que exprese tanto las unidades de transcripción de la cadena pesada de DI-KS(AG(f0) SEED)-IL-2 como de DI-KS(GA(f0) SEED), además de la unidad de transcripción de la cadena liviana común, se preparó un constructo esencialmente tal como sigue a continuación: un fragmento Sal I / Mfe I de aproximadamente 3.9 kb que contiene la secuencia que codifica KS(AG(f0) SEED)-IL-2 se tomó por excisión del constructo de expresión pdHL-10 (pdHL-10 es un vector de expresión de una generación posterior de pdHL que contiene un único sitio Sal I fuera de la unidad de transcripción) y se ligó a un plásmido pBS digerido Sal I / Bam HI, conjuntamente con un fragmento conector doble Bam HI / Mfe I. Este fragmento conector doble está compuesto de Oligo 11 (SEQ ID NO:38) y Oligo12 (SEQ ID NO:39) y contiene un sitio Sal I interno.

10 Oligo11 (SEQ ID NO:38)

AATTGCCGGGTCGACATACG

Oligo12 (SEQ ID NO:39)

GATCCGATGTCGACCCGGC

15 El fragmento de 3.9 kb se tomó entonces por excisión del pBS como un fragmento Sal I y se insertó en el único sitio Sal I de un constructo de expresión pdHL-10 que ya contiene las unidades de transcripción que codifica la cadena pesada de DI-KS(GA(f0) SEED) y la cadena liviana de DI-KS.

EJEMPLO 5: Ensayo para determinar las moléculas Fc heterodiméricas que contienen SEEDs basados en CH3

20 Los ejemplos descritos en la presente patente implican la dimerización de CH3, lo que es un paso importante en la nucleación de la formación de los dímeros de cadena pesada de Fc y de la inmunoglobulina. En teoría, si dos fracciones Fc distintas (*por ejemplo*, denominadas A y B) que contienen dominios CH3 se expresan de manera simultánea en una célula, podrían emparejar y formar moléculas diméricas de Fc en las siguientes configuraciones: A:A, A:B, y B:B. Si los dominios CH3 y los dominios bisagra son idénticos, se espera que tengan lugar las configuraciones A:A, A:B, y B:B en un ratio 1:2:1 si A y B se expresan en cantidades iguales. Las cantidades
25 relativas, la cinética y la termodinámica de las interacciones de A-A, A-B, y B-B son factores de regulación importantes para el ratio observado de estas tres especies finales, al igual que los niveles de expresión. En general, cuando la proteína A y la proteína B se expresan en cantidades relativas [A] y [B], donde [A] + [B] = 1, y se producen homodímeros y heterodímeros en concentraciones relativas [AA], [A-B], y [B-B], si existe una asociación insesgada, estas especies diméricas estarán respectivamente presente en un ratio de $[A]^2:2*[A]*[B]:[B]^2$. Si la concentración
30 relativa es $[A-B] > 2*[A]*[B]$, entonces se favorece la heterodimerización, mientras que si la concentración relativa es $[A-B] < 2*[A]*[B]$, entonces se favorece la homodimerización. Para un par SEED preferente, el ratio $[A-B] / 2*[A]*[B]$ es mayor que 2, y de manera preferente mayor que 3, y de manera más preferente mayor que 5.

35 Para determinar los ratios de diferentes especies, se necesita una forma para distinguirlos mediante un ensayo. Una manera sencilla de hacerlo es unir un compañero de fusión a una de las subunidades Fc (*por ejemplo*, "A"), lo que daría como resultado que cada una de las tres especies finales tuviera un peso molecular significativamente diferente. Por consiguiente, se prepararon constructos para expresar tanto la Fc humana (HuFc) como la Fc humana fusionada a la IL-2 humana (HuFc-IL-2) en una célula. Los constructos se prepararon como sigue a continuación: El gen para HuFc se tomó por excisión de un vector que contiene una fracción Fc (ver, *por ejemplo*, Lo et al., Protein Engineering [1998] 11:495) mediante restricción enzimática en un sitio 5' XbaI y un sitio 3' XhoI. El fragmento de 1.4
40 kb que contiene el gen HuFc fue purificado en gel y subclonado en un segundo vector, pdCS-MuFc-KS-kappa, reemplazando su muFc con HuFc. El gen HuFc fue flanqueado por dos sitios Sall en el exterior de la región promotora.

45 Se eligió un tercer vector que contiene un gen que codifica HuFc-IL-2 y un único sitio Sall para recibir el gen HuFc. El vector se cortó con Sall, se trató con Fosfatasa de Intestino de ternera (CIP, por sus siglas en inglés) y se purificó en gel. El segundo vector fue digerido con Sall y se purificó en gel un fragmento de 2.5 kb. Este fragmento contenía el gen HuFc y un promotor, y se insertó en el tercer vector purificado en gel. El vector final resultante contenía dos unidades de transcripción diferentes con versiones duplicadas de los mismos elementos regulatorios, donde una

unidad de transcripción controlaba la expresión de HuFc de tipo silvestre y la otra controlaba la expresión de HuFc-IL-2 de tipo silvestre. Los constructos de expresión que contienen HuFc basado en SEED y HuFc-IL-2 basado en SEED se produjeron de una manera similar.

5 Este vector final se expandió utilizando Qiagen maxi-prep. Se utilizó 10 mg de ADN para transfectar de manera transitoria células de riñón de crías de hámster (BHK, por sus siglas en inglés), utilizando un kit de Lipofectamina TM2000 (Invitrogen). Las células fueron divididas, una mitad se cultivó en un medio habitual, la otra mitad en un medio libre de suero, durante dos días. Se cosecharon los sobrenadantes (*por ejemplo*, 100 µl). Se añadieron 10 microlitros de granulado de proteína A y se mezclaron durante la noche a 4° C para enlazar la proteína. Después de lavarlos 3 veces con PBS que contiene 1% Triton-X100, las muestras se cargaron en Bi- y Tri- geles con gradiente de 4-12% de electroforesis en Un-Page (Invitrogen), tanto bajo condiciones de reducción como no reductoras. Los geles se sometieron a tinción con azul coloidal (Invitrogen) para la visualización directa de proteínas.

15 Los resultados de control típicos se muestran en los carriles 8-10 en los geles que se muestran en la Figura 12. El análisis en gel reductor en la Figura 12C muestra el ratio de las subunidades HuFc y HuFc-IL-2. El análisis en gel no reductor en la Figura 12B muestra que las moléculas HuFc y HuFc-IL-2 dimerizan de forma aleatoria, con ninguna preferencia para la heterodimerización en comparación a la homodimerización.

20 Los geles fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa para su análisis por Western blot. En los Western blot, la proteína se detectó de dos formas a fin de medir tanto el Fc como la IL-2. Se utilizaron los anticuerpos contra Fc de la IgG humana (Jackson Inmunolabs) conjugadas con la peroxidasa de rábano (HRP) para detectar la Fc. Los blots se detectaron con sustrato de quimioluminiscencia enzimática o ECL (por sus siglas en inglés) y por exposición de película. Un anticuerpo biotinilado contra la IL-2 humana (R&D systems) se utilizó para detectar la IL-2, y la señal se desarrolló mediante la adición de avidina conjugada con HRP, y la detección con sustrato ECL y exposición de película. Estos experimentos confirmaron la identidad de las bandas que se muestran en la Figura 12.

25 Para medir los niveles de heterodímeros y homodímeros formados durante la expresión de proteínas de GA SEED/AG SEED "Completo" y GA SEED/AG SEED "De superficie", se llevaron a cabo experimentos similares. Los constructos del vector de expresión de expresión única que expresan una proteína de fusión AG SEED-IL2 y una proteína GA SEED fueron construidos tal como se ha descrito con anterioridad para la expresión de Fc/Fc-IL2. Tal como se muestra en los carriles 2-4 en las Figuras 12B y 12C, cuando las proteínas GA SEED (Fc(GA(f1)) SEED) "Completas" y AG SEED-IL-2 (Fc(AG(f0)) SEED)-IL2) "Completas" fueron co-expresadas en células NS/0, la heterodimerización se prefirió de manera clara, con homodímeros de Fc(AG SEED)-IL2 no detectables, y únicamente pequeñas cantidades de homodímeros de Fc(GA SEED) fueron detectadas. De manera similar, tal como se muestra en los carriles 5-7 en las Figuras 12B y 12C, cuando las proteínas GA SEED (Fc(GA(s0)) SEED) "De superficie" y AG SEED-IL-2 (Fc(AG(s0)) SEED)-IL2) "De superficie" fueron co-expresadas en células NS/0, la heterodimerización se favoreció de manera clara, con homodímeros Fc(AG SEED)-IL-2 no detectables, y únicamente pequeñas cantidades del homodímero de Fc(GA SEED) detectado. Se estimó que los heterodímeros contituyeron aproximadamente >90% de la cantidad total de proteínas ensambladas en la célula.

EJEMPLO 6. Propiedades de construcción, expresión, y heterodimerización de moléculas de SEED con inmunogenicidad reducida.

40 Debido a que las secuencias de proteína de AG y GA SEED son híbridos entre dos secuencias humanas naturales, estas secuencias incluyen segmentos de péptidos que no se observan en las proteínas humanas normales y que pueden ser procesadas en epítopos de linfocitos T de Clase II MHC no propios. Por lo tanto, las siguientes secuencias se diseñaron para reducir la cantidad de epítopos de linfocitos T no propios potenciales en las secuencias de AG SEED y de GA SEED, representadas por la secuencia polipeptídica que se muestra en SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2, respectivamente, en donde X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, o X₆ pueden ser cualquier aminoácido. En algunos modos de realización, en SEQ ID NO:1, X₁ es S, X₂ es V o T, y X₃ es S. En algunos modos de realización, en SEQ ID NO:2, X₁ es Q, X₂ es A o T, X₃ es L, V, D, o T, X₄ es F, A, D, E, G, H, K, N, P, Q, R, S, o T, X₅ es T, y X₆ es D.

SEQ ID NO:1

Secuencia polipeptídica de AG SEED, con las variantes de aminoácidos X₁ – X₃:

GQPFPRPEVHLLPPSREEMTKNQVSLTCLARGFYXP₁DIAVEWESNGQPENNYKTTPSRQEPSQGT

50 TFAVTSKLT₂DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKX₃ISL

SEQ ID NO:2

Secuencia polipeptídica de GA SEED, con las variantes de aminoácidos X₁ – X₆:

**GQPREPQVYTLPPPSEELALNEX₁VTLTCLVKGFYPSDIAVEWLQGSQELPREKYLTWX₂PVX₃DS
DGSX₄FLYSILRVX₅AX₆DWKKGDTFSCSVMEALHNHYTQKSLDR**

5 La molécula de ADN (SEQ ID NO:32) que codifica la variante de SEED a modo de ejemplo GA(f1) SEED (SEQ ID NO:7) fue creada mediante síntesis *de novo* y se introdujo en el vector de expresión pdCs, tal como se ha descrito en el Ejemplo 4, produciendo el polipéptido Fc(GA(f1) SEED).

SEQ ID NO:7

Secuencia polipeptídica de GA(f1) SEED:

**GQPREPQVYTLPPPSEELALNEQVTLTCLVKGFYPSDIAVEWLQGSQELPREKYLTWTPVVDSDG
SFFLYSILRVTADDWKKGDTFSCSVMEALHNHYTQKSLDR**

10 Se introdujeron mutaciones en las variantes de las fracciones SEED a modo de ejemplo, AG(f1) SEED (SEQ ID NO:4), AG(f2) SEED (SEQ ID NO:5), y GA(f2) SEED (SEQ ID NO:8), mediante una aproximación por PCR (reacción de la polimerasa en cadena) en dos pasos, en la que dos fragmentos de PCR mutagenizados que se solapan parcialmente, de una primera ronda de amplificación de PCR, se combinan en una segunda ronda de amplificación de PCR para generar el fragmento de tamaño completo final, utilizando métodos estándar familiares para aquellas personas expertas en el arte. De manera esencial, dos reacciones PCR se llevaron a cabo en la primera ronda, cada una con un cebador de PCR que incorporaba la secuencia mutante emparejada con un cebador flanqueador adecuado que contiene sitios de restricción apropiados, Ngo MIV para el cebador upstream y Sma I para el cebador downstream, y un ADN modelo que codificaba la fracción SEED parental apropiada. Los mismos cebadores de PCR flanqueadores se utilizaron en la segunda reacción de amplificación de PCR, utilizando los productos de la primera amplificación de PCR como modelos. El fragmento resultante se clonó en un vector pCR2.1 (Invitrogen) y su secuencia se verificó. Finalmente, el fragmento de ADN de Ngo MIV / Sma I de 0.4 kb se tomó por excisión del vector, se purificó en gel, y se ligó a un plásmido de expresión destinatario tratado de forma similar, tal como se ha descrito en el Ejemplo 4.

15

20

25 De manera específica, para AG(f1) SEED, los pares de cebadores Oligo 1 (SEQ ID NO:40) / Oligo2 (SEQ ID NO:41) y Oligo3 (SEQ ID NO:42) / Oligo4 (SEQ ID NO:43), con el modelo pdCs-Fc(AG(f0) SEED)-IL2, se utilizaron en la primera ronda de reacciones de PCR. Oligo1 (SEQ ID NO:40) / Oligo4 (SEQ ID NO:43) se utilizaron en la segunda ronda de reacciones de PCR, generando el fragmento de ADN que se muestra en SEQ ID NO:44, el cual fue introducido en pdCs-Fc(AG(f0) SEED)-IL2. Para AG(f1) SEED, se utilizaron los pares de cebadores Oligo1 (SEQ ID NO:40) / Oligo5 (SEQ ID NO:45) y Oligo6 (SEQ ID NO:46) / Oligo4.(SEQ ID NO:43), con el modelo pCR2.1 que contiene la secuencia que se muestra en SEQ ID NO:44 en la primera ronda de las reacciones de PCR. Oligo1 (SEQ ID NO:40) / Oligo4 (SEQ ID NO:43) se utilizaron en la segunda ronda de reacciones de PCR, generando el fragmento de ADN que se muestra en SEQ ID NO:47, el cual fue introducido en pdCs-Fc(AG(f0) SEED)-IL2. Para For GA(f2) SEED, se utilizaron los pares de cebadores Oligo1 (SEQ ID NO:40) / Oligo10 (SEQ ID NO:48) y Oligo7 (SEQ ID NO:49) / Oligo9 (SEQ ID NO:50) con el plásmido portador modelo pUC que contiene la secuencia que se muestra en SEQ ID NO:32, en la primera ronda de reacciones de PCR. Oligo1 (SEQ ID NO:40) / Oligo9 (SEQ ID NO:50) se utilizaron en la segunda ronda de reacciones de PCR, generando el fragmento de ADN que se muestra en SEQ ID NO:47, el cual fue introducido en pdCs-Fc(GA(f2) SEED). Todas las secuencias a las que se ha hecho referencia con anterioridad se muestran a continuación.

30

35

Oligo1 (SEQ ID NO:40)

GCCGGCTCGGCCACCTCT

40 Oligo2 (SEQ ID NO:41)

CGGCGATGTCGCTGGATAGAA

Oligo3 (SEQ ID NO:42)

TTCTATCCCAGCGACATCGCCG

Oligo4 (SEQ ID NO:43)

CCCCGGGACAGGGAGATGGACTTCTGCGTGT

Oligo5 (SEQ ID NO:45)

GCTCTTGTCTGTGGTGAGCTT

Oligo6 (SEQ ID NO:46)

5 AAGCTCACCACAGACAAGAGC

Oligo7 (SEQ ID NO:49)

CCTGACTTGGGCACCCGTGGACGACTCCGACGGCTCCCACTTCTCTATA

Oligo9 (SEQ ID NO:50)

CCCCGGGAGCGGTCGAGGCTC

10 Oligo10 (SEQ ID NO:48)

TATAGAGGAAGTGGGAGCCGTCGGAGTCGTCCAGGGGTGCCAAGTCAGG

SEQ ID NO:44

Fragmento de ADN de Ngo MIV / Sma I, que contiene una secuencia que codifica AG(f) SEED (subrayado):

gccggctcgccccaccctctgccctgagagtgaccgctgtaccaacctctgtccctacaGGGCAGCCCTTCCGGC
CAGAGGTCCACCTGCTGCCCCATCACGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGC
CTGGCAGCGGGCTTCTATCCCAgcGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA
CAACTACAAGACCACGCCTTCCCGGCAGGAGCCAGCCAGGGCACCACCACCTTCGCTGTGACCT
CGAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT
GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGtCCATCTCCCTGtccccggg

15 SEQ ID NO:47

Fragmento de ADN de Ngo MIV / Sma I, que contiene una secuencia que codifica AG(f2) SEED (subrayado):

gccggctcgccccaccctctgccctgagagtgaccgctgtaccaacctctgtccctacaGGGCAGCCCTTCC
GGCCAGAGGTCCACCTGCTGCCCCATCACGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGG
CACGCGGCTTCTATCCCAgcGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACAAGA
CCACGCCTTCCCAGGAGCCAGCCAGGGCACCACCACCTTCGCTGTGACCTCGAAGCTCACCaGACA
AGAGCAGATGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGC
AGAAGtCCATCTCCCTGtccccggg

20 Las secuencias Fc(AG(f1) SEED), Fc(AG(f2) SEED), Fc(GA(f1) SEED)-IL2 y Fc(GA(f2) SEED)-IL2 fueron expresadas de manera individual y en combinaciones en células HEK 293T, y las proteínas secretadas resultantes fueron parcialmente purificadas en base a la unión de Fc a la proteína A de Estafilococo y caracterizadas mediante gel SDS-PAGE. Cuando las muestras se sometieron a gel SDS reductor, resultó aparente que las proteínas de Fc(AG(f1) SEED) y Fc(AG(f2) SEED) fueron expresadas de manera muy deficiente por las mismas, lo que es similar al caso de la proteína Fc(AG(f0) SEED) parental. Sin la intención de estar sujetos a la teoría, la expresión deficiente es muy probablemente el resultado de la proteólisis de la proteína monomérica que no tiene compañero de dimerización. La proteína de Fc (GA(f1) SEED)-IL2 fue expresada a un nivel alto, mientras que la proteína de Fc(GA(f2) SEED)-IL2, que difiere en la sustitución adicional de aminoácido Va175Thr, fue expresada a un nivel muy

bajo. De nuevo, sin la intención de estar sujetos a la teoría, la expresión deficiente puede ser el resultado de la proteólisis de la proteína monomérica que no tiene compañero de dimerización. Las combinaciones Fc(AG(f1) SEED) más Fc(GA(f1) SEED)-IL2, Fc(AG(f2) SEED) más Fc(GA(f1) SEED)-IL2, Fc(AG(f1) SEED) más Fc(GA(f2) SEED)-IL2, y Fc(AG(f2) SEED) más Fc(GA(f2) SEED)-IL2, se sometieron a prueba y todas fueron expresadas a niveles altos. Las mismas muestras se sometieron a análisis en gel no reductor y se confirmaron estos resultados. Este análisis indicó que, para las combinaciones, básicamente toda la proteína expresada era heterodimérica. Estos resultados indican que ciertas variantes de proteínas de GA y AG SEED con inmunogenicidad reducida mantienen su preferencia por la heterodimerización.

EJEMPLO 7. Expresión de una proteína de fusión anticuerpo-citocina utilizando regiones Fc de SEED.

Para demostrar más aún la versatilidad de las regiones Fc basadas en SEED, un anticuerpo intacto con una única fracción IL-2 se construyó tal como se ha descrito en el Ejemplo 4. Un diagrama de esta proteína se muestra en la Figura 11B. De manera específica, la proteína contiene regiones V de anticuerpo que se unen a EpCAM, y que tienen las secuencias tal como describen en la Patente Estadounidense 6,696,517, dominios CH2 y CH1 de la IgG1 humana, Ckappa humana, los dominios GA y AG SEED, y la IL-2 humana fusionada al C-terminal de la cadena pesada que contiene el AG SEED.

La proteína fue expresada en células de mamíferos de acuerdo a técnicas estándar, produciendo una proteína con las cadenas polipeptídicas que se muestran en SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:36, y SEQ ID NO:35.

La proteína resultante se caracterizó para determinar el grado en que las formas heterodiméricas fueron secretadas a partir de células mamíferas. Por ejemplo, la proteína secretada se caracterizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida de SDS no reductor. En principio, podrían identificarse tres bandas, correspondientes a anticuerpos con ninguna, una o dos fracciones de IL-2. El análisis en gel no reductor real mostró, de manera predominante, una banda única con un peso molecular correspondiente a un anticuerpo con una fracción única de IL-2. Se observó una banda mucho menos intensa con un peso molecular correspondiente a fracciones que no son de la IL-2, y una banda con un peso molecular correspondiente a dos fracciones de la IL-2 no fue detectable. Cuando las muestras se redujeron antes de someterlas al análisis en gel, se detectaron cantidades aproximadamente iguales de proteína correspondiente a una cadena pesada de anticuerpo y a una IL-2 de cadena pesada.

La anterior descripción de la presente invención proporciona ilustración y descripción, pero se pretende que sea exhaustiva o que limite la invención a la precisa que se ha revelado. Modificaciones y variaciones consistentes con los contenidos expresados anteriormente pueden ser adquiridos a partir de la práctica de la invención. Por tanto, se observa que el alcance de la invención se define por las reivindicaciones y sus equivalentes.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de inmunoglobulina modificada genéticamente heterodimérica que comprende

(i) una primera cadena de inmunoglobulina de un primer miembro de la superfamilia inmunoglobulina natural y

5 (ii) una segunda cadena de inmunoglobulina modificada genéticamente de un segundo miembro diferente de dicha superfamilia inmunoglobulina natural,

10 en donde cada una de las cadenas de inmunoglobulina modificada genéticamente comprende un dominio CH3 de anticuerpo que comprende un dominio de la interfaz de interacción proteína-proteína híbrido, en donde cada dicho dominio de la interfaz de interacción está formado por segmentos de aminoácidos del dominio CH3 de dicho primer miembro y segmentos de aminoácidos del dominio CH3 de dicho segundo miembro,

en donde, dicho dominio de la interfaz proteína-proteína de la primera cadena está interactuando con la interfaz proteína-proteína de la segunda cadena mediante homodimerización de los correspondientes segmentos de aminoácidos del mismo miembro de la superfamilia inmunoglobulina dentro de dichos dominios de interacción.

15 2. Una molécula de inmunoglobulina modificada genéticamente heterodimérica de la reivindicación 1, en donde el primer miembro de la superfamilia inmunoglobulina es la IgG y el segundo miembro es la IgA.

3. Una molécula de inmunoglobulina modificada genéticamente heterodimérica de la reivindicación 2, en donde los aminoácidos que interactúan con FcRn se derivan de la IgG para preservar la interacción con FcRn.

20 4. Una molécula de inmunoglobulina modificada genéticamente heterodimérica de la reivindicación 2, en donde la primera o segunda cadena de inmunoglobulina modificada genéticamente tiene la secuencia polipeptídica ("AG-SEED"): GQPFPRPEVHLLPPSREEMTKNQVSLTCLARGFYXP₁DIAVEWESNGQPENNYKTTPSRQEPSQGTT TFAVTSKLT_{X2}DKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKX₃ISL (SEQ ID NO:1), en donde X₁, X₂, y X₃ pueden ser cualquier aminoácido.

5. Una molécula de inmunoglobulina modificada genéticamente heterodimérica de la reivindicación 4, en donde X₁ es K o S, X₂ es V o T, y X₃ es T o S.

25 6. Una molécula de inmunoglobulina modificada genéticamente heterodimérica de la reivindicación 2, en donde la primera o segunda cadena de inmunoglobulina modificada genéticamente tiene la secuencia polipeptídica ("GA-SEED"): GQPREPQVYTLPPPSEELALNEX₁VTLTCLVKGFYPSDIAVEWLQGSQELPREKYLTW_{X2}PVX₃DSD GSX4FLYSILRVX5AX6DWKKGDTFSCSVMEALHNHYTQKSLDR (SEQ ID NO:2), en donde X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, y X₆ pueden ser cualquier aminoácido.

30 7. Una molécula de inmunoglobulina modificada genéticamente heterodimérica de la reivindicación 6, en donde X₁ es L o Q, X₂ es A o T, X₃ es L, V, D, o T; X₄ es F, A, D, E, G, H, K, N, P, Q, R, S o T; X₅ es A o T, y X₆ es E o D.

35 8. Una molécula de inmunoglobulina modificada genéticamente heterodimérica de la reivindicación 2, en donde la primera cadena de inmunoglobulina tiene la secuencia polipeptídica ("AG-SEED"): GQPFPRPEVHLLPPSREEMTKNQVSLTCLARGFYPKDIAVEWESNGQPENNYKTTPSRQEPSQGTT TFAVTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKTISL (SEQ ID NO:3) y la segunda cadena de inmunoglobulina tiene la secuencia polipeptídica ("GA-SEED"): GQPREPQVYTLPPPSEELALNELVTLTCLVKGFYPSDIAVEWLQGSQELPREKYLTWAPVLDSGD SFFLYSILRVAEDWKKGDTFSCSVMEALHNHYTQKSLDR (SEQ ID NO:6).

40 9. Una molécula de inmunoglobulina modificada genéticamente heterodimérica de la reivindicación 2, en donde la primera cadena de inmunoglobulina modificada genéticamente tiene la secuencia polipeptídica ("AG-SEED"): GQPFPEVHLLPPSREEMTKNQVSLTCLVRGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPSRLEPSQGTT TFAVTSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL (SEQ ID NO:10) y la segunda cadena de inmunoglobulina modificada genéticamente tiene la secuencia polipeptídica ("GA-SEED"): GQPREPQVYTLPPPSEELALNNQVTLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEPREKYLTWAPVLDSGD SFFLYSILRVDASRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL (SEQ ID NO:11).

45

10. Una molécula de inmunoglobulina modificada genéticamente heterodimérica de la reivindicación 1, en donde al menos un dominio bio-activo se fusiona a las fracciones de la molécula heterodimérica.

11. La molécula de inmunoglobulina modificada genéticamente heterodimérica de la reivindicación 10, en donde dicho dominio bio-activo es una región variable o constante de un anticuerpo.
12. La molécula de inmunoglobulina modificada genéticamente heterodimérica de la reivindicación 11, en donde dicha región variable es un dominio VL, un dominio VH, un Fv, un Fv de cadena única, un diacuerpo, un fragmento Fab, un Fab de cadena única, o un F(ab')₂.
13. Un ácido nucleico que codifica una molécula de inmunoglobulina modificada genéticamente de la reivindicación 1.
14. La molécula de inmunoglobulina modificada genéticamente heterodimérica de la reivindicación 11, en donde dicha molécula modificada genéticamente es un anticuerpo multiespecífico.
15. La molécula de inmunoglobulina modificada genéticamente heterodimérica de la reivindicación 14, en donde dicho anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo biespecífico.
16. La molécula de inmunoglobulina modificada genéticamente heterodimérica de la reivindicación 10, en donde dicho dominio bio-activo es una hormona, una citocina, una quimiocina, un ligando, una enzima secretada o una porción extracelular de un receptor transmembrana.
17. Una molécula de inmunoglobulina modificada genéticamente heterodimérica de la reivindicación 1, en donde las secuencias se encuentran modificadas para reducir su inmunogenicidad potencial.
18. La molécula de inmunoglobulina modificada genéticamente heterodimérica de la reivindicación 17, en donde la secuencia AG-SEED de SEQ ID NO:3 y la secuencia GA-SEED de SEQ ID NO:6 se encuentran modificadas para eliminar uno o más epítomos de linfocitos T presentes en la secuencia SEED, en donde la modificación es la sustitución de uno o más residuos de aminoácidos.

Figura 1A

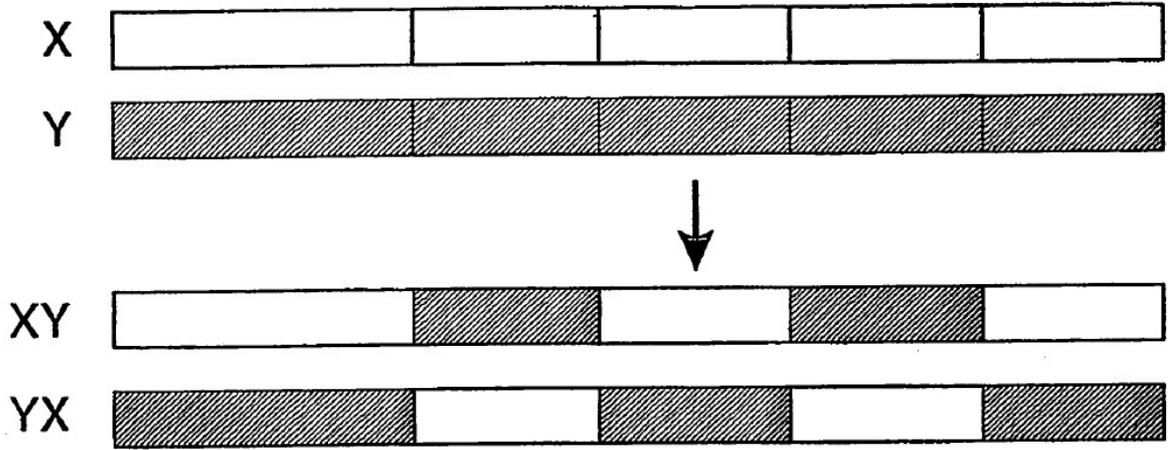


Figura 1B

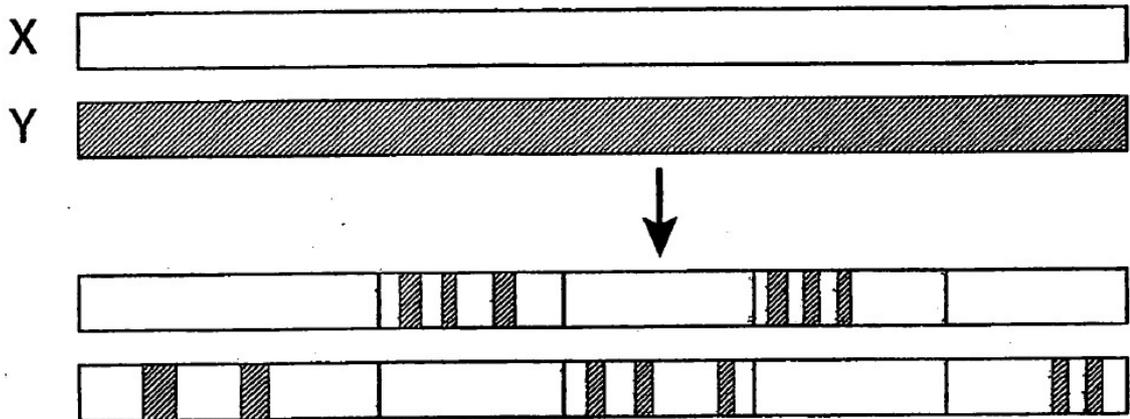
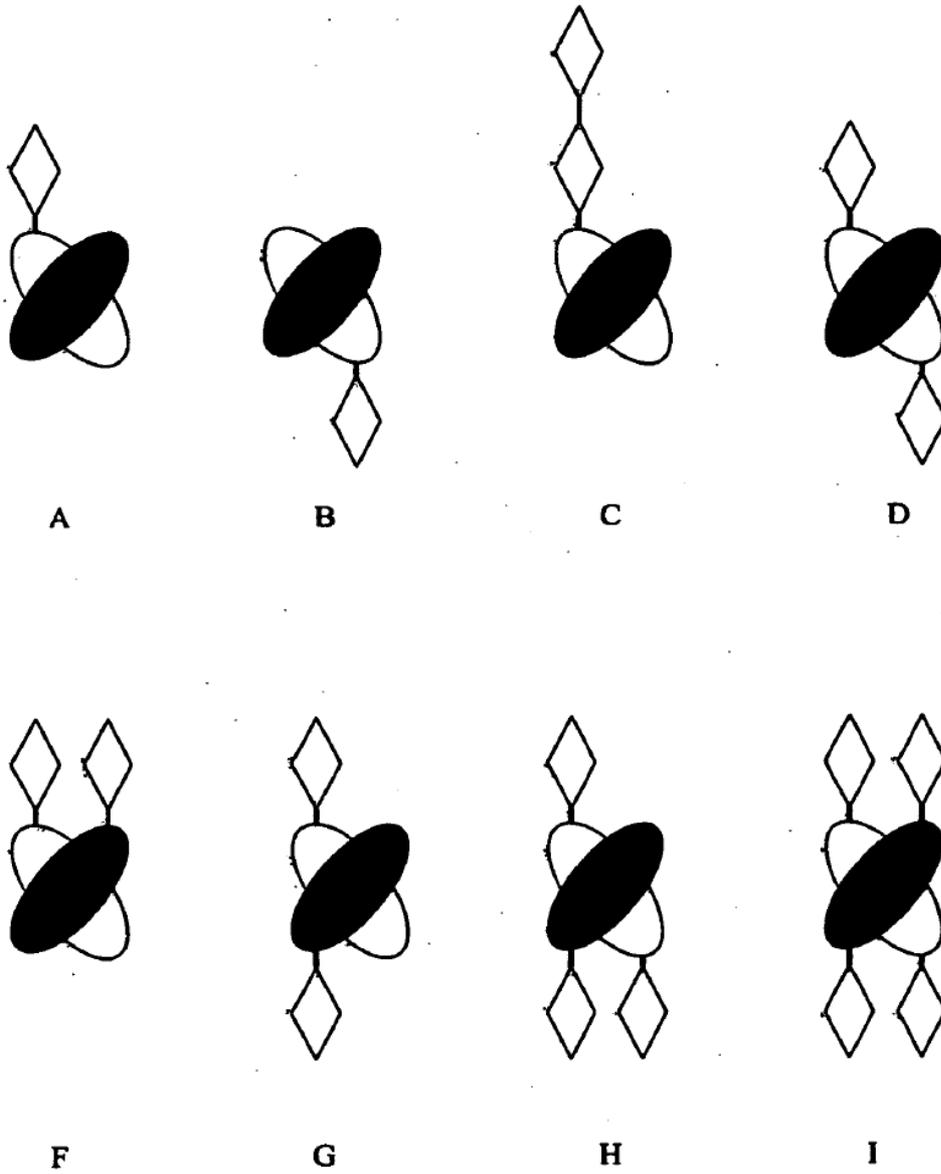


FIG. 1C



	3	3	3	3	3
	4	5	6	7	8
	1	0	0	0	0
Hu_IgG:	GQPREPQVYTLPPSREEM-TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN				
	◆ ◆ ◆◆ ◆◆◆ ◆◆◆◆◆◆◆◆◆◆◆				
Hu_IgA:	GNTFRPEVHLLPPSEELALNELVTLTCLARGFSPKDLVLRWLQGSQELP				
	3	3	3	3	3
	4	5	6	7	8
	2	0	0	0	0

	3	4	4	4	4
	9	0	1	2	3
	0	0	0	0	0
Hu_IgG:	--NYKTTPEVLDSD---GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHN				
	◆ ◆ ◆◆ ◆◆◆ ◆◆◆◆◆◆◆◆◆◆◆				
Hu_IgA:	REKYLTVASRQEPSQGTTFVAVTSILRVAEDWKKGDTFSCMVGHEALPL				
	4	4	4	4	4
	0	1	2	3	4
	0	0	0	0	0

	4
	4
	0
Hu_IgG:	HYTQKSLSL
	◆
Hu_IgA:	AFTQKTIDR
	4
	5
	0

Figura 2

AG y GA SEEDs de superficie

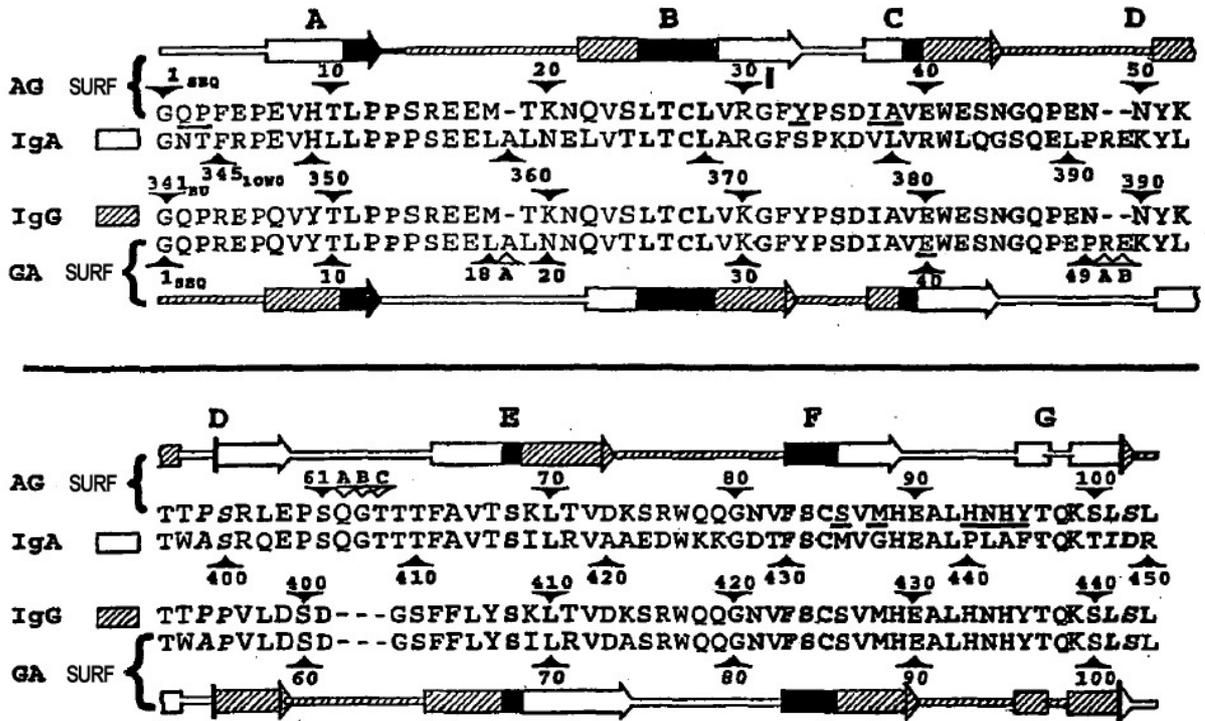


FIG. 3A

AG y GA SEEDs completos

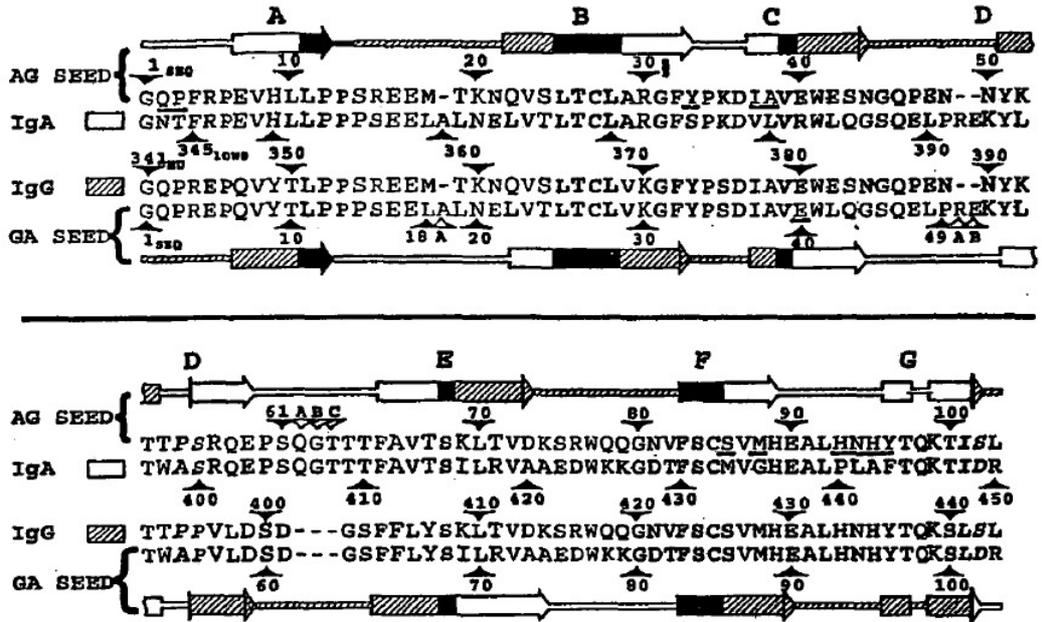
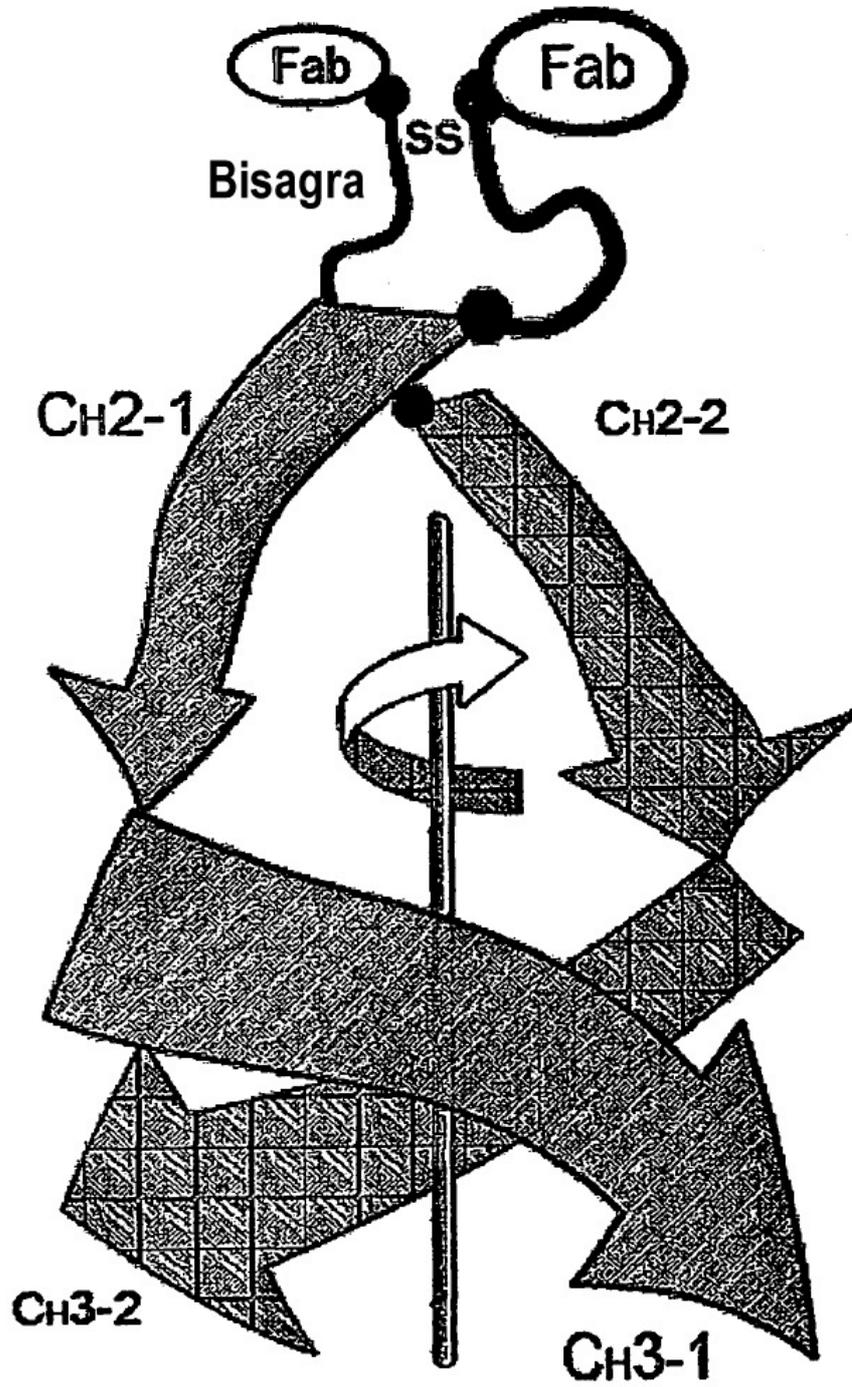


FIG. 3B

FIG. 4



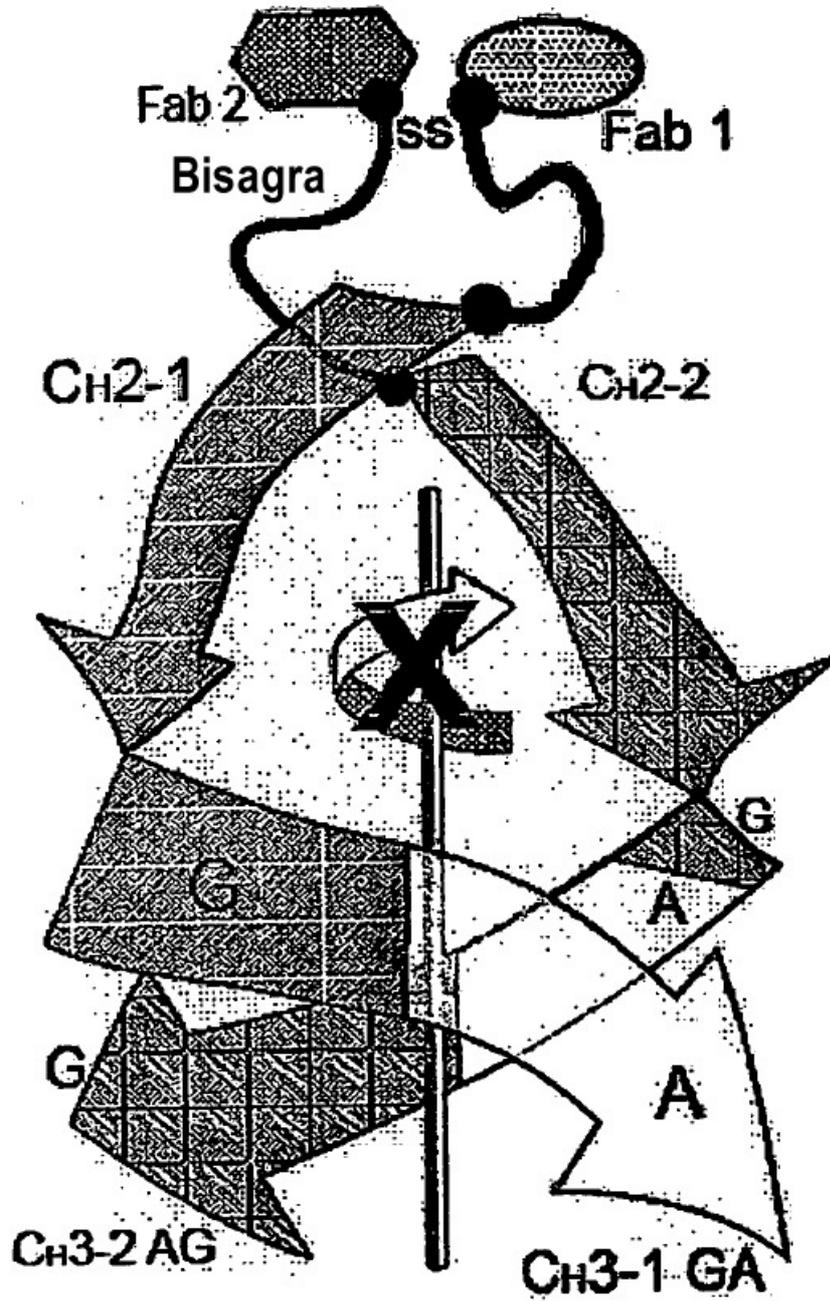


FIG. 5

Mapa Estructural Secundario de AGy GA

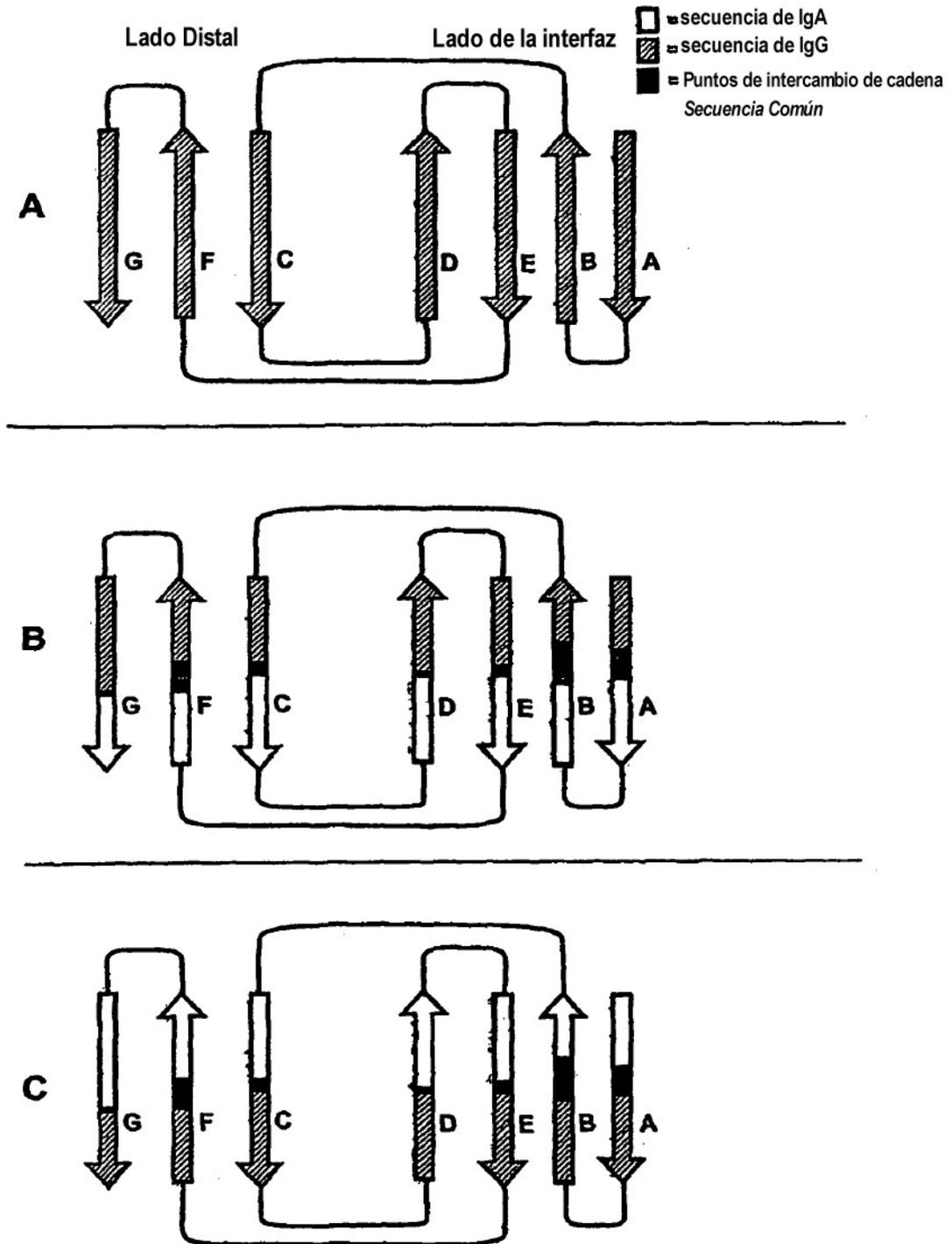


FIG. 6

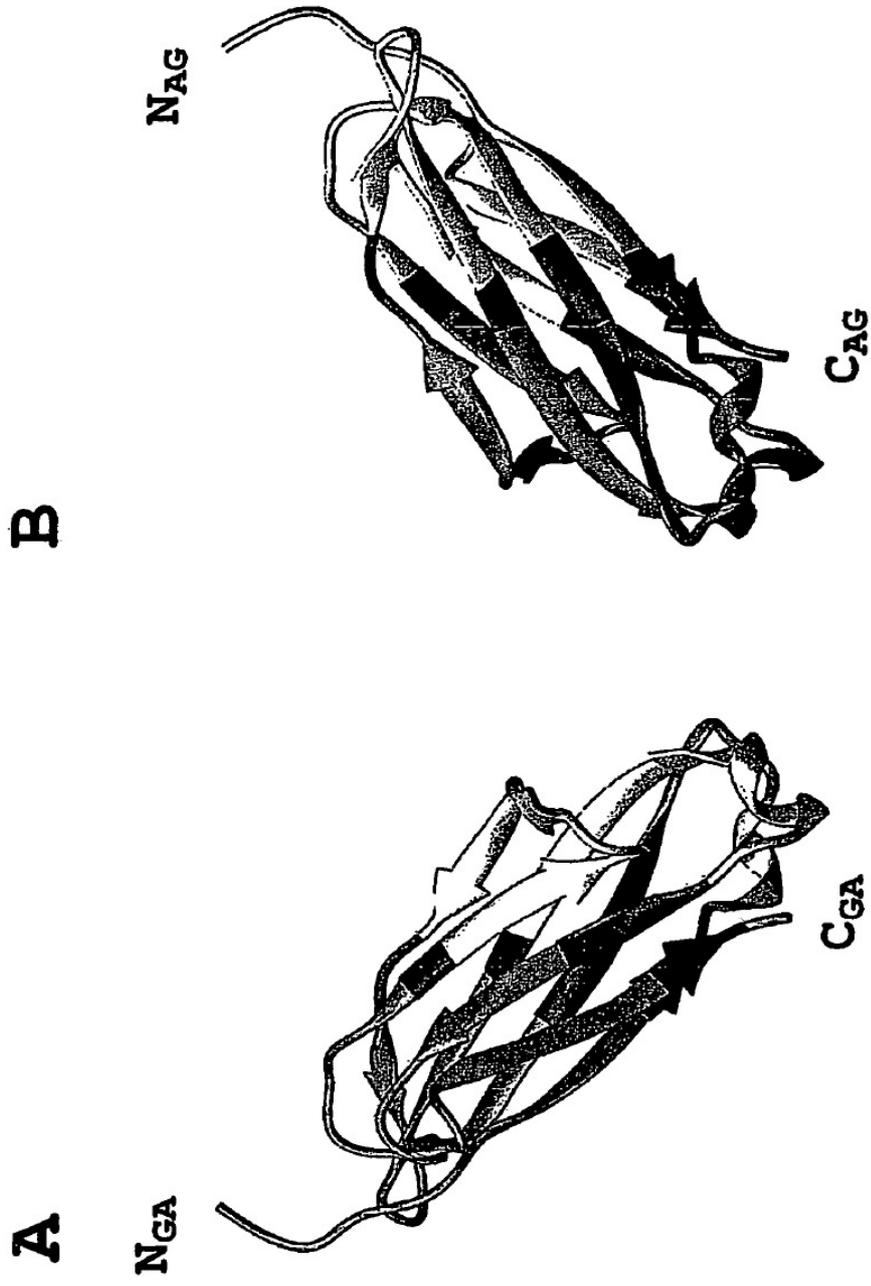


Figura 7

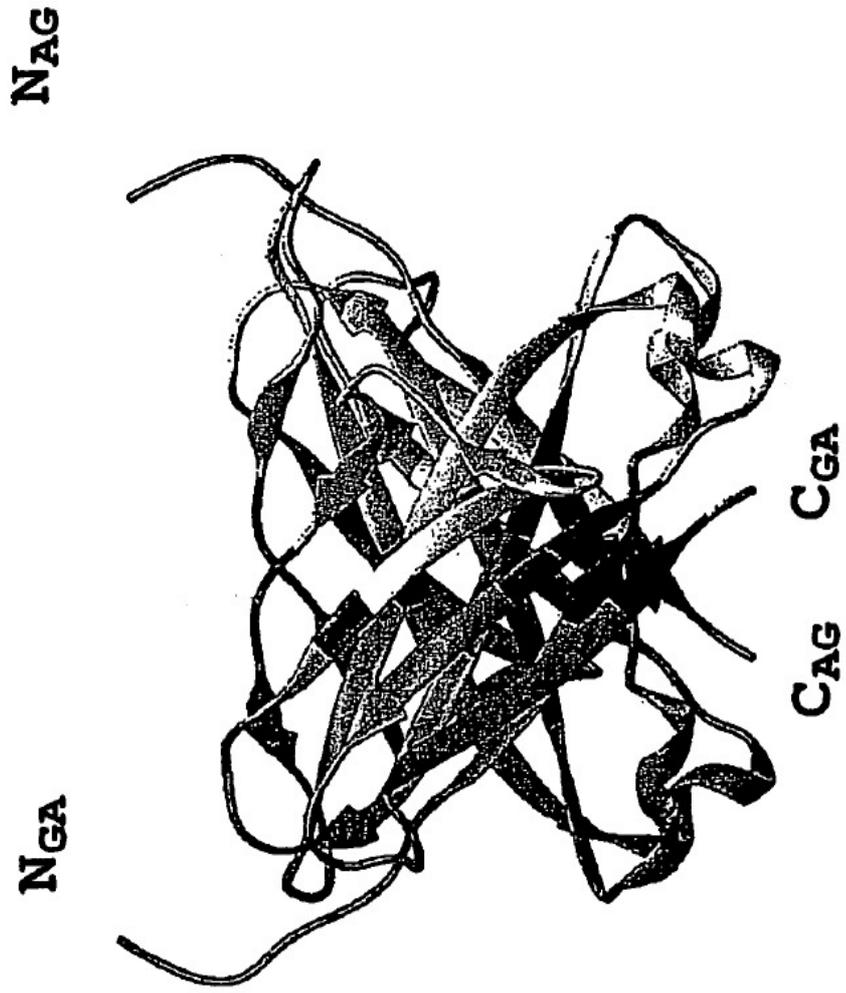


Figura 7C

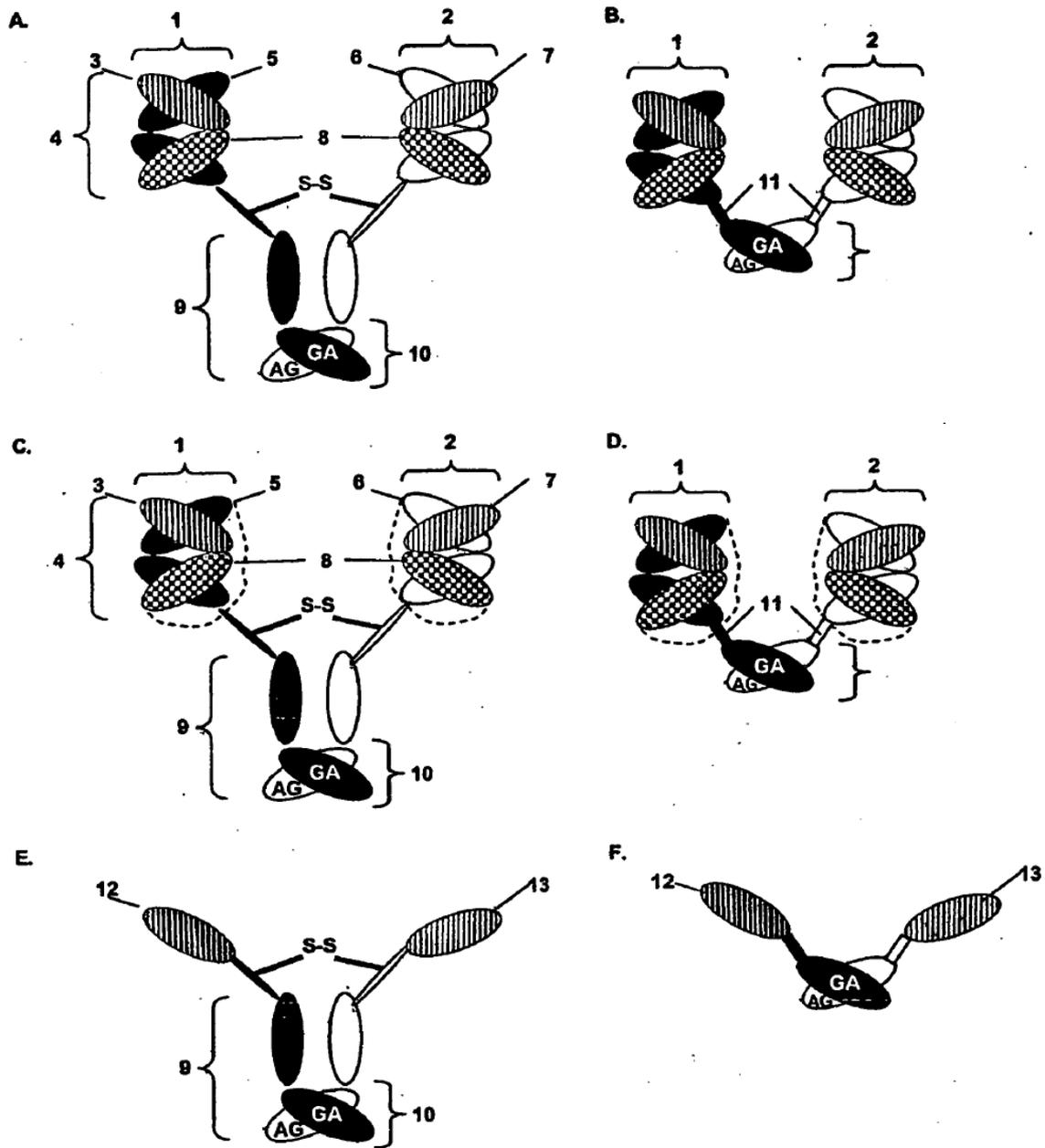


Fig. 8

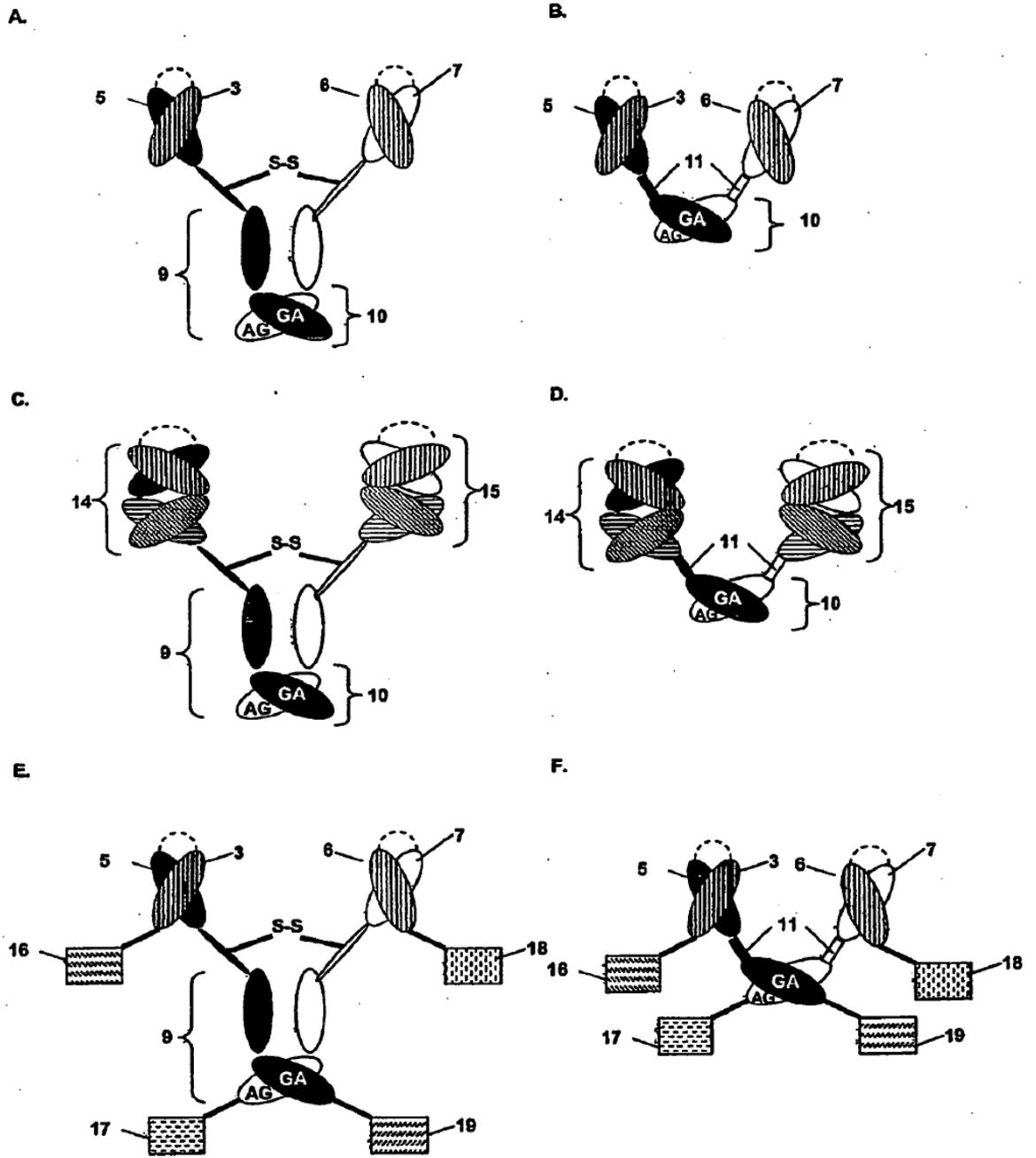


Fig. 9

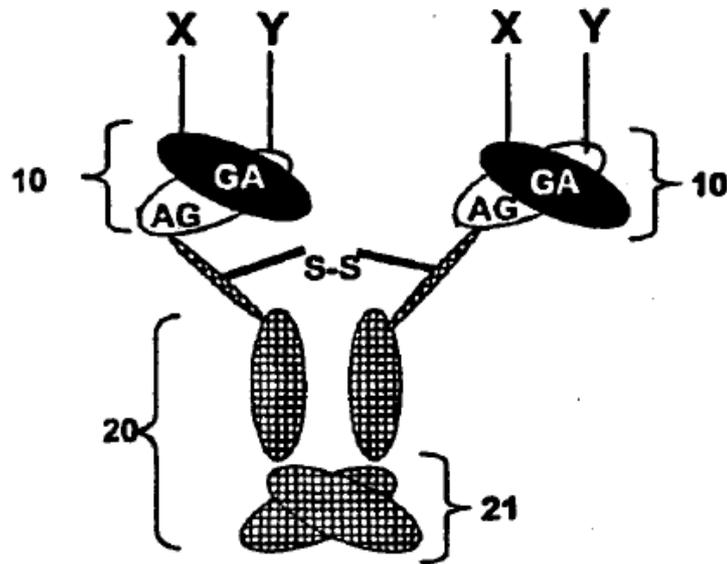
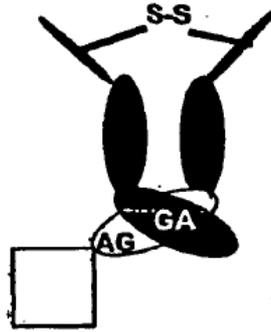


Fig. 10

FIG. 11

A.



B.

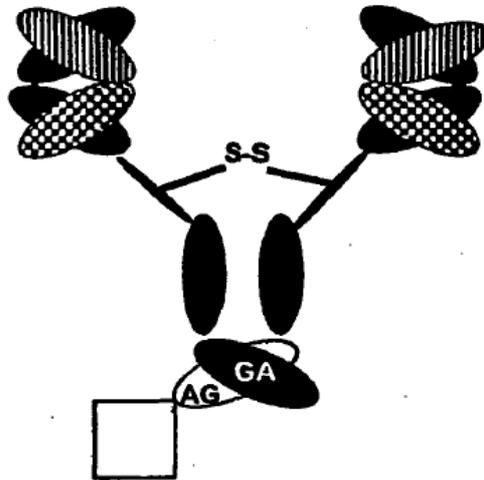
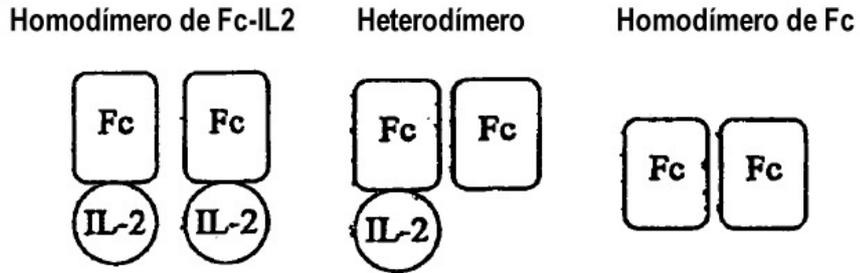
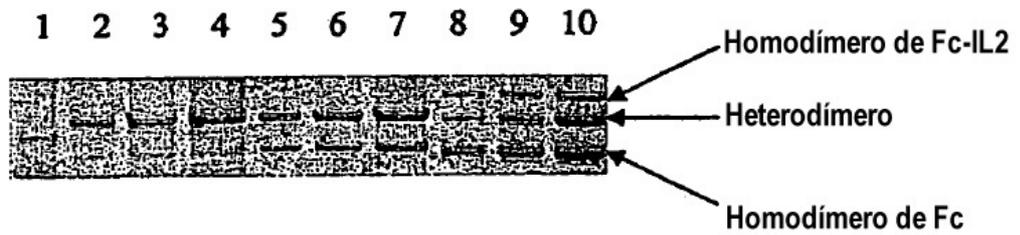


FIG. 12

A.



B.



C.

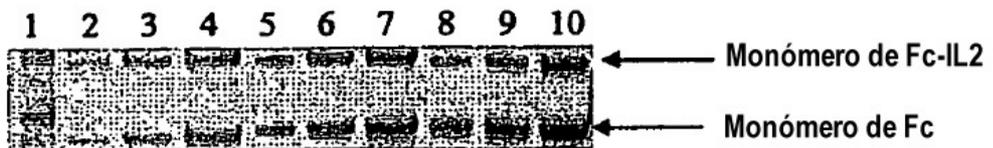


FIG. 12D Western Blot en Gel no reductor

1 2 3 4 5 6

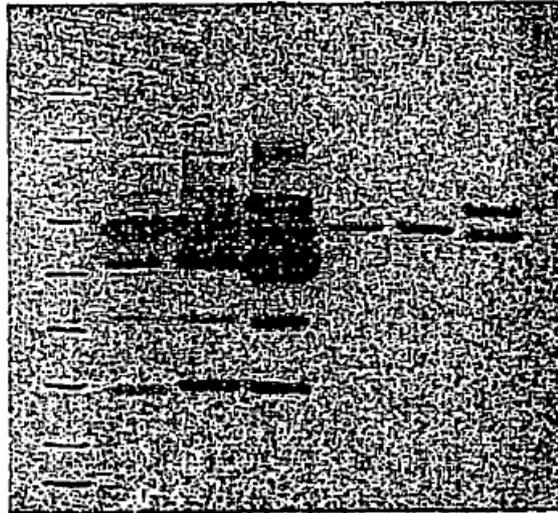


FIG. 12E Western Blot en Gel reductor

1 2 3 4 5 6

