

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 710 936**

51 Int. Cl.:

C07K 16/46	(2006.01)
C07K 16/00	(2006.01)
C12P 21/00	(2006.01)
C12N 15/11	(2006.01)
A61K 39/385	(2006.01)
A61K 35/00	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)
C07K 16/18	(2006.01)
C12N 5/10	(2006.01)
C12N 15/09	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.07.2013 PCT/CN2013/080060**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **30.01.2014 WO14015804**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.07.2013 E 13822582 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2018 EP 2889313**

54 Título: **Método para preparar una mezcla de proteínas homodiméricas usando efecto de repulsión de carga**

30 Prioridad:
25.07.2012 CN 201210258592

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.04.2019

73 Titular/es:
JIANGSU ALPHAMAB BIOPHARMACEUTICALS CO., LTD. (50.0%)
Rm 310, Building G, No. 388 Ruoshui Road, SIP, Suzhou
Jiangsu 215125, CN y
SUZHOU ALPHAMAB CO., LTD (50.0%)

72 Inventor/es:
XU, TING;
XU, TAO;
WANG, XIAOXIAO;
SUN, XINGLU;
FAN, YING y
ZENG, YAN

74 Agente/Representante:
ARIAS SANZ, Juan

ES 2 710 936 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

Método para preparar una mezcla de proteínas homodiméricas usando efecto de repulsión de carga

5 Campo de la invención

La invención se refiere a un método para preparar una mezcla de proteínas homodiméricas, en particular a un método para preparar una mezcla de proteínas homodiméricas usando interacción repulsiva de cargas. La invención se refiere además a una mezcla de proteínas homodiméricas obtenida por el método y los usos del método para preparar la mezcla de proteínas homodiméricas.

Antecedentes de la invención

Los fármacos de anticuerpos monoclonales han realizado progresos significativos en los últimos 15 años y se han convertido en un impulsor de la industria farmacéutica. Desde 1996, se han aprobado en total aproximadamente 30 fármacos de anticuerpos monoclonales, en donde las ventas anuales para nueve fármacos han alcanzado más de mil millones de dólares. En 2010, las ventas globales de fármacos de anticuerpos monoclonales fueron de más de 30 mil millones de dólares y la tasa anual de crecimiento fue de más del 10 %. El anticuerpo monoclonal solamente inhibe una única diana debido a la alta especificidad contra la diana del mismo. Sin embargo, puede ser necesario inhibir múltiples dianas/rutas de señal para evitar un efecto compensatorio para tumores, enfermedades autoinmunitarias y otras enfermedades. Para la infección vírica, debido a la alta tasa de mutación de virus, en general, es necesario inhibir múltiples sitios antigénicos para evitar el escape. Existen varias soluciones alternativas. Una es usar anticuerpos policlonales, u obtener un heterodímero, por ejemplo un anticuerpo biespecífico, modificando fragmentos Fc de anticuerpos. Otra solución es usar una mezcla de anticuerpos para el tratamiento, en donde la mezcla de anticuerpos comprende dos o más anticuerpos contra diferentes epítomos en la misma diana, o contra diferentes dianas.

El documento US7262028 desvela un método para producir un anticuerpo bivalente o una mezcla de anticuerpos bivalentes a partir de un único clon de célula hospedadora mediante expresión de una cadena ligera y diferentes cadenas pesadas, y también proporciona un método para producir una combinación de anticuerpos que puede explorarse para determinar la utilidad en diversas aplicaciones.

El documento WO/2010/084197 describe un método para producir una mezcla que comprende dos o más anticuerpos diferentes de un único clon de célula hospedadora. En una realización, se produce una mezcla de diferentes anticuerpos monovalentes. En otra realización, se produce una mezcla de anticuerpos monovalentes y bivalentes. En el método, los homodímeros se estabilizan en virtud del fenómeno de intercambio natural entre dos ramas Fab de IgG4, en donde algunos restos de la región bisagra y el dominio CH3 que provocaron el fenómeno se cambian. Sin embargo, la patente no menciona si el problema de la existencia de heterodímeros está completamente resuelto.

Los documentos US5789208 y US6335163 han descrito un método para expresar una biblioteca de anticuerpos policlonales, en donde se expresó una biblioteca de fragmentos Fab policlonales en un vector de presentación en fagos y después se exploró para determinar la reactividad a antígenos. Las combinaciones seleccionadas de genes de región variable de cadenas pesadas y cadenas ligeras se transfieren de una manera emparejada a un vector de expresión eucariota que comprende genes de regiones constantes para obtener una subbiblioteca de anticuerpos policlonales completos. Después la subbiblioteca se transfecta a células de mieloma, los clones estables producirían anticuerpos que pueden mezclarse para obtener una mezcla de anticuerpos monoclonales. Usando el método, aunque es teóricamente posible obtener directamente anticuerpos policlonales de un proceso de producción recombinante cultivando un grupo de células transfectadas mixtas, puede haber problemas potenciales con respecto a la estabilidad del grupo de las células mixtas y de este modo la consistencia de los anticuerpos policlonales producidos. En un método de producción a gran escala (industrial) farmacéuticamente aceptable, es una tarea ardua controlar diferentes células en un grupo completo. Por ejemplo, las propiedades tales como la tasa de crecimiento de células y la tasa de producción de anticuerpos deberían mantenerse estables para todos los clones individuales en el grupo no clonal, de modo que la relación de los anticuerpos en la mezcla de anticuerpos policlonales puede mantenerse constante. Por lo tanto, aunque la producción para anticuerpos mixtos puede haberse realizado en la técnica, aún no hay soluciones factibles que sean fiables desde un punto de vista económico y práctico para fabricación a gran escala.

Recientemente, la compañía Merck and Symphogen A/S de Dinamarca firmó un acuerdo de licencia global exclusivo para Sym004. Sym004 es una nueva mezcla de anticuerpos que se está desarrollando ahora y se dirige al receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR).

Sym004 consiste en dos anticuerpos, puede bloquear la unión a ligando, activación del receptor y señalización corriente abajo, y también se considera que induce retirada de los receptores EGFR de la superficie de células cancerosas induciendo internalización y degradación de EGFR. Sym004 se está evaluando en la actualidad en un ensayo de Fase I/II para el tratamiento de pacientes con cáncer colorrectal metastásico (mCRC) KRAS de tipo

silvestre avanzado que han progresado previamente tras el tratamiento con quimioterapia convencional y un anticuerpo monoclonal anti EGFR disponible en el mercado. Además, se está realizando en la actualidad un ensayo de Fase II en pacientes con carcinoma de células escamosas de la cabeza y cuello (SCCHN) que han fracasado en la terapia basada en anti EGFR.

- 5 La tecnología de mezclas de anticuerpos de la compañía Symphogen A/S implica los siguiente: en primer lugar obtener una pluralidad de anticuerpos contra la misma diana por una plataforma de exploración de anticuerpos, después realizar construcción molecular para cada anticuerpo, cultivar células en matraz de agitación y mezclar las células, y cultivar la mezcla celular de un modo de cultivo de amplificación gradual, realizando después una purificación optimizada para obtener el producto final. Sin embargo, el método aún implica los problemas provocados por tasa de crecimiento celular y tasa de producción de anticuerpos inestables, ya que se usan células hospedadoras recombinantes en el método para producir una mezcla de diversos homodímeros. Debido a que un único anticuerpo se expresa en una única célula en el método, el método no implica el problema de heterodímeros.
- 10
- 15 En todos los casos, sería más conveniente producir una mezcla de proteínas o anticuerpos, si pueden producirse dos o más proteínas o anticuerpos en un único clon celular recombinante.

Contenidos de la invención

- 20 Basándose en un gran volumen de experimentos, los inventores han desarrollado un método para preparar simultáneamente dos o más proteínas o anticuerpos de un único clon celular recombinante. La invención comprende específicamente los siguientes aspectos:

El primer aspecto de la invención se refiere a un método para obtener una mezcla que contiene dos o más proteínas usando un único clon celular recombinante, en donde la proteína está en forma de un dímero que se forma por polimerización entre cadenas monoméricas, y las dos o más proteínas contienen el mismo dominio, en donde el método comprende la etapa de reemplazar parte de restos de las dos cadenas monoméricas en el mismo dominio de una o más proteínas con el aminoácido o los aminoácidos de carga opuesta, de modo que las cadenas monoméricas de diferentes proteínas son desfavorables para formar heterodímeros debido a la interacción repulsiva entre cargas iguales, mientras que la cadena monomérica de la misma proteína es más favorable para formar homodímeros debido a la interacción atrayente entre cargas opuestas; en donde el mismo dominio se refiere a dominio CH3 de un anticuerpo o región Fc de un anticuerpo; en donde reemplazar parte de los restos de aminoácidos de las dos cadenas monoméricas en los mismos dominios de una o más proteínas con el resto de carga opuesta se refiere a:

- 35 1) reemplazar Lys en la posición 392 con Asp, reemplazar Lys en la posición 409 con Asp y reemplazar Asp en la posición 399 con Lys de una proteína;
- 2) reemplazar Lys en la posición 392 con Asp, reemplazar Lys en la posición 409 con Asp y reemplazar Asp en la posición 399 con Lys de una proteína; y, simultáneamente, reemplazar Glu en la posición 357 con Lys y reemplazar Lys en la posición 370 con Glu de otra proteína; o
- 40 3) reemplazar Lys en la posición 392 con Asp, reemplazar Lys en la posición 409 con Asp y reemplazar Asp en la posición 399 con Lys de una proteína, y, simultáneamente, reemplazar Glu en la posición 356 con Lys y reemplazar Lys en la posición 439 con Glu de otra proteína; y en donde las posiciones de los restos se determinan según el índice de numeración de EU del sistema KABAT para anticuerpos.

- 45 En una realización de la invención, la proteína es un anticuerpo o una proteína de fusión que comprende una parte de los anticuerpos.

En el método según una realización cualquiera del primer aspecto de la invención, en particular no se reemplazan los restos de como máximo una proteína. En una realización de la invención, los restos de una proteína no se reemplazan mientras que los restos de la otra proteína se reemplazan. En otra realización de la invención, se reemplazan los restos de ambas proteínas.

50

Cuando los restos de múltiples (dos o más) proteínas se reemplazan como se detalla en las reivindicaciones, al menos una posición de los restos reemplazados entre diferentes proteínas son diferentes, preferentemente, todas las posiciones de los restos reemplazados entre diferentes proteínas son diferentes.

55

En el método según una realización cualquiera del primer aspecto de la invención, el mismo dominio se refiere en particular a un dominio CH3 de un anticuerpo.

- 60 En el método según una realización cualquiera del primer aspecto de la invención, el mismo dominio se refiere en particular a la región Fc de un anticuerpo.

En el método según una realización cualquiera del primer aspecto de la invención, los anticuerpos proceden en particular de mamíferos, tales como seres humanos, ratones o ratas.

65

En el método según una realización cualquiera del primer aspecto de la invención, los anticuerpos se seleccionan en

particular del grupo que consiste en IgG (tal como IgG1, IgG2, IgG3), IgA (tal como IgA1, IgA2), IgE, IgD e IgM (tal como IgM1, IgM2).

5 En el método según una realización cualquiera del primer aspecto de la invención, reemplazar parte de los restos en los mismos dominios con los restos con carga opuesta comprende en particular las siguientes etapas:

- (1) obtener los restos de interfaz entre los mismos dominios de las dos cadenas monoméricas de la proteína;
 (2) seleccionar restos emparejados con cargas positivas y negativas emparejadas de los restos de interfaz obtenidos en la etapa (1); y
 10 (3) seleccionar uno o más pares (tales como dos pares, tres pares o cuatro pares) de restos de los restos emparejados con las cargas positivas y negativas emparejadas obtenidas en la etapa (2) y reemplazar restos de los pares seleccionados con los restos de carga opuesta.

15 En la invención, el aminoácido con carga se selecciona del grupo que consiste en lisina (Lys), arginina (Arg), histidina (His), ácido aspártico (Asp) y ácido glutámico (Glu).

Las posiciones de los pares de restos se determinan según el índice de numeración de EU del sistema KABAT para anticuerpos.

20 En la invención, reemplazar la parte de restos de las dos cadenas monoméricas en los mismos dominios de una o más proteínas con los restos de carga opuesta se refiere a una o cualquier combinación de las siguientes situaciones:

- (1) reemplazar Lys en la posición 392 con Asp, reemplazar Lys en la posición 409 con Asp y reemplazar Asp en la posición 399 con Lys para una proteína;
 (2) reemplazar Lys en la posición 392 con Asp, reemplazar Lys en la posición 409 con Asp y reemplazar Asp en la posición 399 con Lys para una proteína; y, simultáneamente, reemplazar Glu en la posición 357 con Lys y reemplazar Lys en la posición 370 con Glu para la otra proteína; y
 25 (3) reemplazar Lys en la posición 392 con Asp, reemplazar Lys en la posición 409 con Asp y reemplazar Asp en la posición 399 con Lys para una proteína; y, simultáneamente, reemplazar Glu en la posición 356 con Lys y reemplazar Lys en la posición 439 con Glu para la otra proteína.
 30

Los restos con carga emparejados con las cargas positivas y negativas emparejadas en la secuencia como se muestra en la SEQ ID NO: 2 son 8 pares de restos como se muestra en a1)-h1):

- 35 a1) Glu (E) en la posición 161 de la primera cadena y Lys (K) en la posición 244 de la segunda cadena;
 b1) Glu (E) en la posición 162 de la primera cadena y Lys (K) en la posición 175 de la segunda cadena;
 c1) Lys (K) en la posición 175 de la primera cadena y Glu (E) en la posición 163 de la segunda cadena;
 d1) Lys (K) en la posición 197 de la primera cadena y Asp (D) en la posición 204 de la segunda cadena;
 40 e1) Asp (D) en la posición 204 de la primera cadena y Lys (K) en la posición 197 de la segunda cadena;
 f1) Asp (D) en la posición 204 de la primera cadena y Lys (K) en la posición 214 de la segunda cadena;
 g1) Lys (K) en la posición 214 de la primera cadena y Asp (D) en la posición 204 de la segunda cadena;
 h1) Lys (K) en la posición 244 de la primera cadena y Glu (E) en la posición 161 de la segunda cadena.

45 Los restos con carga emparejados con las cargas positivas y negativas emparejadas en la secuencia como se muestra en la SEQ ID NO: 4 son 8 pares de restos como se muestra en a2)-h2):

- 50 a2) Glu (E) en la posición 399 de la primera cadena y Lys (K) en la posición 482 de la segunda cadena;
 b2) Glu (E) en la posición 400 de la primera cadena y Lys (K) en la posición 413 de la segunda cadena;
 c2) Lys (K) en la posición 413 de la primera cadena y Glu (E) en la posición 400 de la segunda cadena;
 d2) Lys (K) en la posición 435 de la primera cadena y Asp (D) en la posición 442 de la segunda cadena;
 e2) Asp (D) en la posición 442 de la primera cadena y Lys (K) en la posición 435 de la segunda cadena;
 f2) Asp (D) en la posición 442 de la primera cadena y Lys (K) en la posición 452 de la segunda cadena;
 g2) Lys (K) en la posición 452 de la primera cadena y Asp (D) en la posición 442 de la segunda cadena;
 55 h2) Lys (K) en la posición 482 de la primera cadena y Glu (E) en la posición 399 de la segunda cadena.

60 En el método según una realización cualquiera del primer aspecto de la invención, el proceso de reemplazar parte de los restos en los mismos dominios con los restos de carga opuesta comprende en particular las etapas de obtener una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína resultante del remplazo de los restos, y expresar la secuencia de nucleótidos con la célula hospedadora recombinante para obtener la proteína resultante del remplazo de los restos.

65 En la invención, la mezcla de proteínas puede obtenerse clonando por separado las diferentes proteínas en vectores de expresión, cotransfectando los diferentes vectores de expresión en una célula hospedadora y cultivando la célula hospedadora recombinante para expresar las proteínas; o conectando operativamente y clonando las diferentes proteínas en un vector de expresión y transfiriendo además el vector de expresión a la célula hospedadora para

cultivo.

En la invención, el proceso para obtener la secuencia de nucleótidos codificante basada en la secuencia de aminoácidos resultante de reemplazo se conoce bien en la técnica.

5 El segundo aspecto de la invención se refiere a una mezcla que contiene dos o más proteínas, en donde las proteínas están en forma de un dímero que se forma por polimerización entre cadenas monoméricas, y las dos o más proteínas contienen el mismo dominio, en donde parte de los restos de las dos cadenas monoméricas en el mismo dominio de una o más proteínas se reemplazan con el aminoácido o aminoácidos de carga opuesta, de modo
10 que las cadenas monoméricas de las diferentes proteínas son desfavorables para formar un heterodímero debido a la interacción repulsiva entre cargas iguales, mientras que la cadena monomérica de la misma proteína es más favorable para formar un homodímero debido a la interacción atrayente entre cargas opuestas-; en donde el mismo dominio se refiere a dominio CH3 de un anticuerpo o región Fc de un anticuerpo; en donde reemplazar parte de los restos de aminoácidos de las dos cadenas monoméricas en los mismos dominios de una o más proteínas con el
15 resto de carga opuesta se refiere a:

1) reemplazar Lys en la posición 392 con Asp, reemplazar Lys en la posición 409 con Asp y reemplazar Asp en la posición 399 con Lys de una proteína;

20 2) reemplazar Lys en la posición 392 con Asp, reemplazar Lys en la posición 409 con Asp y reemplazar Asp en la posición 399 con Lys de una proteína; y, simultáneamente, reemplazar Glu en la posición 357 con Lys y reemplazar Lys en la posición 370 con Glu de otra proteína; o

3) reemplazar Lys en la posición 392 con Asp, reemplazar Lys en la posición 409 con Asp y reemplazar Asp en la posición 399 con Lys de una proteína, y, simultáneamente, reemplazar Glu en la posición 356 con Lys y reemplazar Lys en la posición 439 con Glu de otra proteína; y en donde las posiciones de los restos se
25 determinan según el índice de numeración de EU del sistema KABAT para anticuerpos.

En una realización de la invención, las proteínas son anticuerpos o proteínas de fusión que comprenden una parte de los anticuerpos.

30 En la mezcla según una realización cualquiera del segundo aspecto de la invención, en particular no se reemplazan los restos de como máximo una proteína o anticuerpo. En una realización de la invención, los restos de una proteína no se reemplazan y los restos de la otra proteína se reemplazan. En otra realización de la invención, se reemplazan los restos de ambas proteínas.

35 Cuando los restos de múltiples (dos o más) proteínas se reemplazan, al menos una posición de los restos reemplazados entre diferentes proteínas es diferente; preferentemente, todas las posiciones de los restos reemplazados entre diferentes proteínas son diferentes.

40 En la mezcla según una realización cualquiera del segundo aspecto de la invención, el mismo dominio se refiere en particular a un dominio CH3 de un anticuerpo.

En la mezcla según una realización cualquiera del segundo aspecto de la invención, el mismo dominio se refiere en particular a la región Fc de un anticuerpo.

45 En la mezcla según una realización cualquiera del segundo aspecto de la invención, los anticuerpos proceden en particular de mamíferos, tales como seres humanos, ratones o ratas.

50 En la mezcla según una realización cualquiera del segundo aspecto de la invención, los anticuerpos se seleccionan en particular del grupo que consiste en IgG (tal como IgG1, IgG2, IgG3), IgA (tal como IgA1, IgA2), IgE, IgD e IgM (tal como IgM1, IgM2).

55 En la mezcla según una realización cualquiera del segundo aspecto de la invención, en donde la parte de los restos son restos de interfaz entre los mismos dominios de las dos cadenas monoméricas de la proteína, preferentemente, los restos de interfaz son los restos cargados con cargas positivas y negativas emparejadas; y, más preferentemente, uno o más pares (tales como dos pares, tres pares o cuatro pares) de restos emparejados se reemplazan con los restos de carga opuesta.

60 En una realización de la invención, el aminoácido con carga se selecciona del grupo que consiste en lisina (Lys), arginina (Arg), histidina (His), ácido aspártico (Asp) y ácido glutámico (Glu).

En la invención, reemplazar la parte de restos de las dos cadenas monoméricas en los mismos dominios de una o más proteínas con los restos de carga opuesta se refiere a una o cualquier combinación de las siguientes situaciones:

65 (1) reemplazar Lys en la posición 392 con Asp, reemplazar Lys en la posición 409 con Asp y reemplazar Asp en la posición 399 con Lys para una proteína;

(2) reemplazar Lys en la posición 392 con Asp, reemplazar Lys en la posición 409 con Asp y reemplazar Asp en la posición 399 con Lys para una proteína; y, simultáneamente, reemplazar Glu en la posición 357 con Lys y reemplazar Lys en la posición 370 con Glu para la otra proteína; y

5 (3) reemplazar Lys en la posición 392 con Asp, reemplazar Lys en la posición 409 con Asp y reemplazar Asp en la posición 399 con Lys para una proteína; y, simultáneamente, reemplazar Glu en la posición 356 con Lys y reemplazar Lys en la posición 439 con Glu para la otra proteína.

Los restos con carga emparejados con las cargas positivas y negativas emparejadas en una secuencia como se muestra en la SEQ ID NO: 2 son 8 pares de restos como se muestra en a1)-h1):

10

a1) Glu (E) en la posición 161 de la primera cadena y Lys (K) en la posición 244 de la segunda cadena;
 b1) Glu (E) en la posición 162 de la primera cadena y Lys (K) en la posición 175 de la segunda cadena;
 c1) Lys (K) en la posición 175 de la primera cadena y Glu (E) en la posición 163 de la segunda cadena;
 d1) Lys (K) en la posición 197 de la primera cadena y Asp (D) en la posición 204 de la segunda cadena;
 15 e1) Asp (D) en la posición 204 de la primera cadena y Lys (K) en la posición 197 de la segunda cadena;
 f1) Asp (D) en la posición 204 de la primera cadena y Lys (K) en la posición 214 de la segunda cadena;
 g1) Lys (K) en la posición 214 de la primera cadena y Asp (D) en la posición 204 de la segunda cadena;
 h1) Lys (K) en la posición 244 de la primera cadena y Glu (E) en la posición 161 de la segunda cadena.

20

Los restos con carga emparejados con las cargas positivas y negativas emparejadas en la secuencia como se muestra en la SEQ ID NO: 4 son 8 pares de restos como se muestra en a2)-h2):

25

a2) Glu (E) en la posición 399 de la primera cadena y Lys (K) en la posición 482 de la segunda cadena;
 b2) Glu (E) en la posición 400 de la primera cadena y Lys (K) en la posición 413 de la segunda cadena;
 c2) Lys (K) en la posición 413 de la primera cadena y Glu (E) en la posición 400 de la segunda cadena;
 d2) Lys (K) en la posición 435 de la primera cadena y Asp (D) en la posición 442 de la segunda cadena;
 e2) Asp (D) en la posición 442 de la primera cadena y Lys (K) en la posición 435 de la segunda cadena;
 f2) Asp (D) en la posición 442 de la primera cadena y Lys (K) en la posición 452 de la segunda cadena;
 g2) Lys (K) en la posición 452 de la primera cadena y Asp (D) en la posición 442 de la segunda cadena;
 30 h2) Lys (K) en la posición 482 de la primera cadena y Glu (E) en la posición 399 de la segunda cadena.

El tercer aspecto de la invención se refiere a la mezcla de proteínas obtenida según el método de una realización cualquiera del primer aspecto de la invención.

35

Los polipéptido que contienen dominios CH3 forman interfaces de interacción debido a interacción entre restos y por lo tanto forman dímeros, por lo tanto, en una realización de la invención, se describe un método para obtener una mezcla de homodímeros, en donde la interacción atrayente entre dos dominios CH3 en un heterodímero puede reducirse modificando los restos en las interfaces de interacción de dominios CH3 mediante el efecto repulsivo de las cargas, dando como resultado una mezcla de homodímeros. En general, en la interfaz CH3-CH3 del heterodímero, el efecto repulsivo de las cargas puede formarse modificando los restos relacionados como restos con carga. En algunos casos, cuando un aminoácido determinado con cargas positivas (lisina, arginina, histidina) en la interfaz se muta a uno con cargas negativas (ácido aspártico, ácido glutámico), puede formarse el efecto repulsivo, y viceversa.

40

45

En una realización de la invención, tras interacción de los restos en la interfaz CH3-CH3, se determina la interacción entre los restos con carga en los pares, se seleccionan uno cualquiera o más de los restos y se analiza el efecto de los restos seleccionados en la formación de homodímeros, después se mutan los restos seleccionados a restos con carga y se investiga el efecto de restos mutados en la formación de homodímeros y heterodímeros después de la mutación, después se comparan los efectos después y antes de las mutaciones y una mutación apropiada daría como resultado el efecto de reforzar la formación de homodímeros y debilitamiento de la formación de heterodímeros. Por último, se seleccionan mutaciones razonables de los restos para maximizar el efecto del fortalecimiento de la formación de homodímeros y debilitamiento de la formación de heterodímeros.

50

55

En una realización específica, el método descrito anteriormente se define de la siguiente manera: los restos con carga emparejados en los dominios CH3 de las proteínas homodiméricas se mutan a los restos con carga opuesta, de modo que pueden formarse homodímeros entre Fc de las dos cadenas monocatenarias, debido a la interacción resultante de la interacción atrayente de los restos con carga opuesta emparejados, mientras que no pueden formarse heterodímeros debido a la interacción repulsiva de cargas iguales resultante del intercambio de las propiedades eléctricas de las cargas de los aminoácidos emparejados en una cadena y se obtiene de este modo el anticuerpo Fc o la mezcla de proteínas de fusión de Fc que solamente comprende los homodímeros.

60

65

En la invención, la proteína, también denominada polipéptido, contiene más de 10 restos, preferentemente más de 50 restos y más preferentemente más de 100 restos. En una realización de la invención, la proteína es un anticuerpo o comprende una parte de un anticuerpo. En otra realización específica de la invención, la proteína es fragmento Fc de IgG1. En otra realización de la invención, la proteína es una proteína de fusión de fragmento variable monocatenario (scFv) y fragmento Fc de IgG1.

En la invención, la célula hospedadora es una célula adecuada para expresar proteínas o anticuerpos, tal como una célula procariota o una célula eucariota. Un ejemplo de una célula procariota es *E. coli*; los ejemplos para una célula eucariota son una célula de levadura o una célula de mamífero; y los ejemplos para una célula de mamífero son una célula epitelial humana (tal como 293H), una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula de mieloma.

5 En la invención, la proteína diferente contiene el mismo dominio. En una realización de la invención, los mismos dominios se refieren a dominios CH3 de anticuerpos o regiones Fc de anticuerpos.

10 En la invención, la cadena monomérica, también denominada el polipéptido individual, se refiere a un monómero o una subunidad para formar la proteína dimérica. En una realización de la invención, las dos cadenas monoméricas que forman el dímero son simétricas, concretamente las secuencias de las dos cadenas monoméricas son iguales.

15 En la invención, reemplazar los restos se refiere a reemplazar los restos en las posiciones correspondientes de las dos cadenas monoméricas que forman la proteína dimérica.

20 En la invención, el dímero se refiere a una combinación formada por dos subunidades o dos monómeros durante la formación de proteína o ácido nucleico y las subunidades o monómeros pueden combinarse mediante enlaces covalentes o enlaces no covalentes; el homodímero significa que la secuencia de dos subunidades que forman el dímero son iguales; y el heterodímero significa que las dos subunidades del dímero son diferentes.

25 En la invención, el dominio se refiere a la región con estructura específica y función independiente en biomacromoléculas, particularmente en proteínas. En una realización de la invención, el dominio se refiere a dominio CH3 de un anticuerpo o región Fc de un anticuerpo.

30 En la invención, los restos de interfaz se refieren a los restos que forman interfaces de contacto entre los dominios. Los restos de interfaz consisten en dos o más restos.

35 En la invención, la proteína o la misma proteína se refiere a la proteína expresada a partir de una secuencia de nucleótidos, concretamente la proteína formada como homodímero.

40 La mezcla de proteínas o anticuerpos obtenida usando el método de la invención puede ser una mezcla de dos o más homodímeros de proteínas o anticuerpos, preferentemente una mezcla de dos homodímeros de proteínas o anticuerpos.

45 En una realización de la invención, el dominio que contiene CH3 puede ser solamente dominio CH3 o región Fc de inmunoglobulina humana que contiene dominio CH3. En general, los polipéptidos de dominios CH3 de región Fc de inmunoglobulina humana proceden de región Fc de inmunoglobulina humana de tipo silvestre. La Fc de inmunoglobulina humana de tipo silvestre se refiere a una secuencia de aminoácidos que aparece en la población humana. Por supuesto, la secuencia de Fc puede variar ligeramente entre individuos. El Fc de inmunoglobulina humana en la invención también puede contener fragmentos con varias alteraciones de restos en comparación con la secuencia de Fc de inmunoglobulina humana de tipo silvestre, tales como alteraciones de algunos restos en la región Fc, que comprende algunos restos mutados en sitios de glucosilación u otras mutaciones. La secuencia de dominio CH3 puede ser por ejemplo la secuencia como se muestra en las posiciones 148-252 de la SEQ ID NO: 2. La secuencia de región Fc puede ser por ejemplo la secuencia como se muestra en las posiciones 26-252 de la SEQ ID NO: 2.

50 En la invención, la expresión "Fc de inmunoglobulina humana" se refiere a fragmento de inmunoglobulina humana cristizable, es la parte C-terminal de una región constante de cadena de inmunoglobulina humana, en particular la región constante de cadena pesada de inmunoglobulina. Por ejemplo, la región Fc de inmunoglobulina puede comprender la combinación de dos o más dominios de CH2, CH3 y CH4 de cadenas pesadas con una región bisagra de inmunoglobulina. En el presente documento, la región Fc de IgG corresponde al dominio de región bisagra inferior -CH2-CH3 (para IgG, CH2 y CH3 también se denominan dominios C_γ2 y C_γ3). En el fondo de IgG1 humana, según índices de EU en el sistema Kabat, la región bisagra inferior se refiere a las posiciones 226-236, el dominio CH2 se refiere a las posiciones 237-340 y el dominio CH3 se refiere a las posiciones 341-447. Según la

55 secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena pesada, las inmunoglobulinas se pueden dividir en diferentes tipos. Hay cinco tipos principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, en donde algunas de las inmunoglobulinas puede dividirse adicionalmente en subtipos (isotipos): tales como IgG-1, IgG-2, IgG-3, IgG-4, IgA-1 e IgA-2. Los dominios similares de otros subtipos de IgG pueden determinarse comparando cadenas pesadas o fragmentos de cadena pesada de los subtipos de IgG con la secuencia de aminoácidos de cadena pesada o fragmentos de cadena pesada de IgG1 humana. La selección de regiones Fc de inmunoglobulina de tipos y subtipos de inmunoglobulina específicos está dentro del alcance de los expertos en la materia. Debido a que la interfaz interactiva de restos de monómeros de inmunoglobulina está altamente conservada entre humanos y murinos, el método para preparar una mezcla de proteínas o anticuerpos homodiméricos usando la interacción repulsiva de cargas también es adecuado para IgA, IgD, IgE, IgG e IgM tanto humanas como murinas. El método relacionado

60 también es adecuado para mutar los restos sin carga de dominios CH3 a los restos con carga.

65

En la invención, los restos en la región Fc se numeran según los índices de EU para la cadena pesada de inmunoglobulina (Kabat, *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), que se cita aquí para referencia). Los índices de EU del sistema de Kabat se refieren a la numeración de restos de EU para anticuerpo IgG1 humano. Las posiciones en la secuencia de aminoácidos de la región Fc de anticuerpo se indican con los índices de EU mencionados en Kabat, *et al.*

En la invención, los prototipos de anticuerpos para producir mezcla de proteínas homodiméricas pueden ser anticuerpos, inmunoglobulinas, polipéptidos de fusión de Fc, conjugados de Fc (véase Fig. 2), pero no se pretende que la lista sea limitante.

En la invención, las proteínas homodiméricas pueden ser una proteína homodimérica de un polipéptido que contiene regiones Fc, que incluyen, pero sin limitación, anticuerpos, proteínas de fusión Fc, conjugados de Fc, polipéptidos procedentes de Fc, Fc aislados y fragmentos de los mismos. Por lo tanto, la proteína homodimérica puede ser un polipéptido natural, variantes del polipéptido natural, formas modificadas por ingeniería genética de los polipéptidos naturales, polipéptidos sintéticos o polipéptidos que contienen fragmentos no proteicos. Las formas modificadas por ingeniería genética de los polipéptidos naturales son polipéptidos que no están codificados por genes naturales. Por ejemplo, los polipéptidos modificados por ingeniería genética pueden ser anticuerpos quiméricos o anticuerpos humanizados.

En la invención, la mezcla homodimérica puede purificarse a partir de las células recombinantes con una técnica experimental convencional. Por ejemplo, cuando la proteína homodimérica comprende una región Fc, la proteína puede purificarse usando proteína A. Los métodos de purificación incluyen, pero sin limitación, métodos cromatográficos tales como cromatografía de exclusión por tamaños, de intercambio iónico, basada en afinidad y ultrafiltración. Los métodos de separación y purificación de la mezcla homodimérica de la invención también incluye cualquier combinación apropiada de los métodos anteriores.

La invención se refiere además a una cadena monomérica modificada por ingeniería genética o un único polipéptido modificado por ingeniería genética para constituir la proteína o el anticuerpo homodimérico.

La invención se refiere además a una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína o el anticuerpo homodimérico modificado por ingeniería genética (o la cadena monomérica o el polipéptido individual).

La invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende la proteína o el anticuerpo homodimérico modificado por ingeniería genética (o la cadena monomérica o el polipéptido individual).

Ventajas de la invención

Debido a la interacción entre los mismos dominios de diferentes proteínas (tales como Fc de anticuerpos), la formación de los homodímeros y heterodímeros es un proceso dinámico y complejo, que implica la formación de homodímeros estables debido a la interacción de los restos de interfaz de los homodímeros y la formación de heterodímeros estables debido a la interacción de los restos de interfaz de los heterodímeros, así como los cambios dinámicos en el contenido de los heterodímeros debido a la existencia de homodímeros y los cambios dinámicos en el contenido de los homodímeros debido a la existencia de heterodímeros. La invención proporciona un método para preparar una mezcla de dos o más proteínas o anticuerpos con un único clon celular recombinante, que puede aumentar el contenido de los homodímeros de las proteínas o anticuerpos y puede reducir el contenido de otros productos no deseados, tales como los heterodímeros. Los resultados experimentales muestran que la mezcla de proteínas o anticuerpos obtenida por la invención tiene componentes puros y estabilidad deseada. La mezcla de proteínas o anticuerpos preparada por la invención puede actuar simultáneamente en diferentes epítopos de la misma diana o inhibir simultáneamente las funciones de diferentes antígenos, proporcionando de este modo un nuevo método y rutina para el tratamiento de tumores y otras enfermedades.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es un diagrama esquemático de la estructura de un vector recombinante pcMV β -SP-Fc.

La Fig. 2 es un diagrama esquemático de la estructura de un vector recombinante pcDNA3.1-zeo-ScFv-Fc.

La Fig. 3 es un alineamiento de secuencias de subtipo IgG humano (a) y murino (b). En la figura, se realiza el alineamiento de CH3 de cadenas pesadas, en donde los restos indicados con asterisco (*) son los restos de regiones de interacción CH3-CH3 según la estructura cristalina de un Fc IgG1 humano, y los restos indicados con un marco cuadrado representan mutaciones de aminoácidos preferentes para formar una mezcla homodimérica. Debería observarse que la mayoría de los restos con carga en IgG están altamente conservados, (c) representa la comparación de secuencias de CH3 de otros subtipos de anticuerpos (IgA, IgE, IgD e IgM). Los asteriscos (*) en (b) y (c) representan los restos en las regiones interactivas CH3-CH3 según IgG1 humana.

La Fig. 4 es un diagrama esquemático de la interacción de cargas en tipo silvestre y la interacción de cargas en mutante; el último obstaculiza la formación de heterodímero y potencia la formación de homodímero. (a) En el caso de tipo silvestre, la interacción de cargas facilita la formación tanto de heterodímero como de homodímero. (b) En el caso de mutaciones dobles (D399K y K409D) en el dominio CH3 de la región Fc de una cadena, el

heterodímero no puede formarse debido a una interacción repulsiva de las cargas y puede formarse fácilmente una mezcla homodimérica debido a la interacción atrayente de las cargas.

La Fig. 5 es el resultado de análisis de electroforesis de los homodímeros (scFv-Fc/scFv-Fc y Fc/Fc) y el heterodímero (scFv-Fc/Fc), en donde el carril M muestra marcadores de peso molecular (los tres fragmentos superiores representan 104 KD, 78 KD y 50 KD de arriba a abajo), y los carriles 1-9 son las combinaciones de mutaciones 0-8 en la Tabla 5, respectivamente.

La Fig. 6 es el resultado de un análisis de SDS-PAGE en ensayos de estabilidad acelerada de 31 días, en donde el Control es de tipo silvestre, scFv-Fc/Fc-mix1 es la combinación de mutaciones 1, scFv-Fc/Fc-mix13 es la combinación de mutaciones 4 y scFv-Fcmix1/Fc-mix2 es la combinación de mutaciones 6.

La Fig. 7 es el resultado de un análisis de CE-SDS en ensayos de estabilidad acelerada de 31 días, en donde el Control es de tipo silvestre, Mix1 es la combinación de mutaciones 1 y Mix2 es la combinación de mutaciones 6.

Modelos específicos para llevar a cabo la invención

Las realizaciones de la invención se ilustran en detalle haciendo referencia a los ejemplos, pero los expertos en la materia entenderían que los siguientes ejemplos son únicamente para ilustrar la invención y no deberían considerarse como restricción de la invención. Los ejemplos en los que no se proporcionan condiciones específicas se realizan según condiciones convencionales o condiciones sugeridas por los fabricantes. Los reactivos o instrumentos para los que no se proporcionan fabricantes son todos productos convencionales disponibles en el mercado.

A menos que se especifique de otro modo, los métodos experimentales usados en los siguientes ejemplos son métodos convencionales.

A menos que se especifique de otro modo, materiales, reactivos y similares usados en los siguientes ejemplos están disponibles en el mercado.

Ejemplo 1: Selección de restos mutados en dominio CH3 de fragmentos Fc de anticuerpo

1. Obtención de secuencias y estructuras

Se obtienen estructuras cristalinas de 48 anticuerpos IgG1 humanos que contienen regiones Fc de una base de datos de proteínas (PDB, www.pdb.org) y los fragmentos Fc de los 48 anticuerpos procedieron de 1DN2 (número de PDB) mediante un algoritmo de búsqueda de similitud estructural (Referencia: Yuzhen Ye y Adam Godzik. FATCAT: a web server for flexible structure comparison and structure similarity searching. Nucleic Acids Res., 2004, 32 (número de servidor web): W582-585.).

2. Determinación de restos de interfaz

Se usó software de predicción de aminoácidos de interfaz CMA (URL: <http://ligin.weizmann.ac.il/cma/>) para explorar y reconocer restos de contacto entre CH3-CH3 en los anticuerpos (número de PDB: 1DN2) basándose en las distancias de interacción de restos. Según las normas de contacto de restos de aminoácidos, los restos de interfaz se refieren a los que tienen distancias (de los átomos pesados de una cadena lateral a los átomos pesados de cualquiera de los restos de otra cadena) menores que un límite. En este ejemplo, el límite de distancia se estableció como 4,5 Å o 5,5 Å (véase B. Erman, I. Bahar y R. L. Jernigan. Equilibrium states of rigid bodies with multiple interaction sites. Application to protein helices. J. Chem. Phys. 1997, 107:2046-2059.). La conservación de interfaces de contacto de restos de subtipo IgG humano y murino podría determinarse mediante alineamientos múltiples de secuencias en la Fig. 3. La Tabla 1 mostró 34 restos de interfaz del anticuerpo 1DN2 identificados mediante exploración con las normas de contacto de restos (concretamente la distancia entre los restos es menor de 4,5 Å), en donde la cadena A y la cadena B representaron la primera cadena y la segunda cadena del anticuerpo 1DN2, respectivamente. Las posiciones de los siguientes restos se designaron mediante el índice de EU del sistema de numeración de KABAT para Fc de anticuerpo.

Tabla 1. Lista de restos de interfaz CH3-CH3 del anticuerpo 1DN2

Aminoácido de contacto en la cadena A	Aminoácido de contacto en la cadena B
Gln347A	Lys360B
Val348A	Glu356B
Tyr349A	Ser354B, Glu356B, Glu357B, Lys360B
Thr350A	Ser354B, Glu356B

ES 2 710 936 T3

Aminoácido de contacto en la cadena A	Aminoácido de contacto en la cadena B
Leu351A	Leu351B,Pro352B,Pro353B,Ser354B,Thr366B
Pro352A	Leu351B,Pro352B
Pro353A	Leu351B
Ser354A	Tyr349B,Thr350B,Leu351 B
Glu356A	Val348B,Tyr349B,Thr350B,Lys439B
Glu357A	Tyr349B,Leu368B,Lys370B
Lys360A	Gln347B,Tyr349B,Lys370B
Gln362A	Lys370B
Val363A	Lys370B
Ser364A	Leu368B,Lys370B,Tyr407B
Leu365A	Tyr407B
Thr366A	Leu351B,Leu368B,Tyr407B
Leu368A	Glu357B,Ser364B,Thr366B,Lys409B
Lys370A	Glu357B,Lys360B,Gln362B,Ser364B,Lys409B,Thr411B
Asn390A	Ser400B
Lys392A	Val397B,Leu398B,Asp399B,Ser400B,Phe405B
Thr393A	Val397B
Thr394A	Thr394B, Val397B, Phe405B, Tyr407B
Pro395A	Pro395B,Val397B
Val397A	Lys392B,Thr393B,Thr394B,Pro395B
Leu398A	Lys392B
Asp399A	Lys392B,Lys409B,Thr411B
Ser400A	Asn390B,Lys392B
Phe405A	Lys392B,Thr394B,Tyr407B,Lys409B
Leu406A	Thr394B
Tyr407A	Thr366B,Thr394B,Phe405B,Tyr407B,Lys409B
Ser408A	Tyr407B
Lys409A	Leu368B,Lys370B,Asp399B,Phe405B,Tyr407B
Thr411A	Lys370B,Asp399B
Lys439A	Glu356B

3. Búsqueda de restos con carga emparejados

Basándose en los restos de interfaz CH3-CH3 enumerados en la Tabla 1, los restos con carga emparejados se seleccionaron según las cargas de los restos, los resultados se muestran en la Tabla 2 y hubo 8 pares de restos con carga.

Tabla 2. Restos con carga emparejados del anticuerpo 1DN2

Aminoácido de contacto en la cadena A	Aminoácido de contacto en la cadena B
Glu356A	Lys439B
Glu357A	Lys370B
Lys370A	Glu357B
Lys392A	Asp399B
Asp399A	Lys392B
Asp399A	Lys409B
Lys409A	Asp399B
Lys439A	Glu356B

4. Mutación de restos con carga

5 Según los resultados de la Tabla 2, las dos cadenas Fc del anticuerpo 1DN2 son dos cadenas simétricas. Por lo tanto, para los restos emparejados de cualquier cadena, si el resto en una posición determinada de una cadena se muta al resto con carga opuesta, entonces el resto en la misma posición de las dos cadenas del anticuerpo está en ambos casos mutado y, por ejemplo, para los restos emparejados Glu356A-Lys439B, los dos tipos de mutación son los siguientes:

10

- 1) el Glu356A se muta a Lys356A o Arg356A, y/o el Lys439A se muta a Glu439A o Asp439A; y
- 2) el Glu356B se muta a Lys356B o Arg356B, y/o el Lys439B se muta a Glu439B o Asp439B.

15

En este caso, las cargas opuestas significan que los restos con carga positiva (lisina (Lys, K) o arginina (Arg, R) o histidina (His, H)) se mutan a los restos con carga negativa (ácido aspártico (Asp, D) o ácido glutámico (Glu, E)) o los restos con carga negativa (ácido aspártico o ácido glutámico) se mutan a los restos con carga positiva (lisina o arginina). Las posiciones de mutaciones específicas son como se muestra en la Tabla 3 y la Tabla 4.

Tabla 3. Restos mutados en la cadena A

Aminoácido en la cadena A	Cargas de aminoácido después de la mutación	Aminoácido en la cadena A	Cargas de aminoácido después de la mutación
Glu356A	+	Lys439A	-
Glu357A	+	Lys370A	-
Lys392A	-	Asp399A	+
Asp399A	+	Lys409A	-

Nota: + representa cargas positivas y - representa cargas negativas.

20

Tabla 4. Restos mutados en la cadena B

Aminoácido en la cadena B	Cargas de aminoácido después de la mutación	Aminoácido en la cadena B	Cargas de aminoácido después de la mutación
Glu356B	+	Lys439B	-
Glu357B	+	Lys370B	-
Lys392B	-	Asp399B	+

Aminoácido en la cadena B	Cargas de aminoácido después de la mutación	Aminoácido en la cadena B	Cargas de aminoácido después de la mutación
Asp399B	+	Lys409B	-

Nota: + representa cargas positivas y - representa cargas negativas.

Además, en casos más complicados, la operación también puede basarse en el método anterior o las combinaciones de mutaciones de los restos emparejados descritos anteriormente. El método para modificar Fc (para la preparación de mezcla de Fc) y preparar una mezcla de anticuerpos según la solución de la invención no estuvo limitada por mutaciones dobles de restos emparejados de la cadena sencilla como se ha mencionado anteriormente o cualquier combinación de las mutaciones.

Ejemplo 2: Preparación de una mezcla de proteínas homodiméricas modificando restos en un dominio CH3 de un fragmento Fc de anticuerpo

1. Construcción de un vector recombinante pcMV β -SP-Fc para expresar un fragmento Fc de IgG1 humana

Según la secuencia génica del fragmento Fc (bisagra-CH2-CH3) de IgG1 humana en una base de datos génica, un gen de Fc humano como se muestra en la SEQ ID NO: 1, que contenía en dos extremos Hind III y EcoRI como secuencia de reconocimiento y bases protectoras respectivamente (780 pb de longitud y denominada SP-Fc), se obtuvo mediante síntesis artificial. El gen de Fc se digirió por duplicado con EcoRI y Hind III, y el fragmento resultante se conectó con la cadena principal de vector del vector de expresión pcMV β para células de mamíferos (Invitrogen) que se había digerido por duplicado con EcoRI y Hind III, y se obtuvo el vector recombinante pcMV β -SP-Fc (el diagrama esquemático de su estructura es como se muestra en la Fig. 1). Se demostró tras la secuenciación que el vector recombinante pcMV β -Fc era un vector en donde un fragmento de ADN como se muestra por la secuencia de nucleótidos de las posiciones 16 a 771 en la SEQ ID NO: 1 se insertó entre los sitios EcoRI y Hind III de pcMV β .

La secuencia de aminoácidos de la proteína de Fc codificada por la secuencia de nucleótidos de las posiciones 16 a 771 en la SEQ ID NO: 1 es la siguiente (como se muestra en la SEQ ID NO: 2):

METDLLLLWLLLWVPGSTGGSGGGDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHENPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
 (SEQ ID NO: 2).

2. Construcción de un vector recombinante pcDNA3.1-zeo-ScFv-Fc para expresar una proteína de fusión scFv-Fc

El gen que codifica la proteína de fusión scFv-Fc como se muestra en la SEQ ID NO: 3 que contenía Hind III y EcoRI en ambos extremos como secuencia de reconocimiento y bases protectoras respectivamente se obtuvo mediante síntesis génica. La ORF que codificaba la proteína de fusión scFv-Fc se digirió por duplicado con EcoRI y Hind III, y el fragmento resultante se conectó con la cadena principal del vector de expresión pcDNA3.1-zeo para células de mamíferos (Invitrogen) que se había digerido por duplicado con EcoRI y Hind III, y se obtuvo el vector recombinante pcDNA3.1-zeo-ScFv-Fc (el diagrama esquemático de la estructura es como se muestra en la Fig. 2). Se demostró tras la secuenciación que el vector recombinante pcDNA3.1-zeo-ScFv-Fc era un vector en donde el fragmento de ADN como se muestra por una secuencia de nucleótidos de las posiciones 16 a 1488 en la SEQ ID NO: 3 se insertó entre los sitios EcoRI y Hind III de pcDNA3.1-zeo.

La secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión scFv-Fc codificada por la secuencia de nucleótidos de las posiciones 16 a 1488 en la SEQ ID NO: 3 es la siguiente (como se muestra en la SEQ ID NO: 4):

MGWSLILLFLVAVATRVLSEVQLLES~~GGGVQPGRSLRLSCIASGFTFSS~~
YPMTWVRQAPGKGLEWVASISYDGSYKYKADSMKGRLTISRDN SKNTLYLE
MNSLTAEDTAVYYCARTAFFNAYDFWGQGT~~LVTVSSASTKGPSVGGGGSG~~
GGGSEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVRSNLAWYQQKPGQAPRL
IYAASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLT~~ISSLQSEDFAVYYCQQYNEWFRTSGQ~~
GTKVEIKRDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD
VSHENPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS~~SDGSFFLYSKLTVDKSRWQ~~
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 4).

La secuencia de aminoácidos de las partes subrayadas en la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 4 son iguales.

- 5 3. Preparación de un vector recombinante modificado por ingeniería genética seleccionando posiciones de aminoácidos para mutagénesis

Según los restos para mutar en la Tabla 3 y la Tabla 4 del Ejemplo 1, se usó un método de PCR solapante para mutación y mutación combinada de secuencias de nucleótidos (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 3) que codifican scFV-Fc y Fc. Como se muestra en las combinaciones de mutaciones 1-8 en la Tabla 5, se obtuvieron 8 vectores recombinantes pcDNA3.1-zeo-ScFv-Fc y pcMVβ-SP-Fc después de modificación por ingeniería genética.

- 10

Tabla 5. Mutaciones específicas de mutantes y posiciones de los mismos

Combinación de mutaciones	Aminoácido mutado en la proteína scFv-Fc	Posición de aminoácido mutado en la SEQ ID NO: 4	Aminoácido mutado en la proteína Fc	Posición de aminoácido mutado en la SEQ ID NO: 2
0	WT	WT	WT	WT
1 ^{y)}	NA,	NA,	K392D/K409D/D399K	K197D/K214D/D204K
2	NA,	NA,	E356K/K439E	E161K/K244E
3	NA,	NA,	E357K/K370E	E162K/K175E
4	NA,	NA,	E357K/K370E/K392D/K409D/D399K	E162K/K175E/K197D/K214D/D204K
5 ^{y)}	E357K/K370E	E400K/K413E	K392D/K409D/D399K	K197D/K214D/D204K
6 ^{y)}	E356K/K439E	E399K/K482E	K392D/K409D/D399K	K197D/K214D/D204K
7	NA,	NA,	K392D/D399K	K197D/D204K
8	NA,	NA,	D399K/K409D	D204K/K214D
^{y)} Ejemplos de acuerdo con la invención				

Nota: WT representa el tipo silvestre (sin mutación), NA representa que no se realiza mutación en el aminoácido emparejado, "I" representa la relación "y", 365 en "E356K" representa la posición del aminoácido mutado, la letra E antes de 365 representa que el aminoácido antes de la mutación es E, la letra K después de 365 representa que el aminoácido después de la mutación es K. El mismo principio se aplica para otras situaciones.

5

4. Detección de células transfectadas y la mezcla de anticuerpos

Los vectores de expresión albergan 8 combinaciones de mutaciones en la etapa 3 se transfectaron por separado con PEI en células 293H adaptadas a suspensión (ATCC CRL-1573), la relación de cotransfección de plásmidos pcDNA3.1-zeo-ScFv-Fc con respecto a pcMVβ-SP-Fc fue 1: 1, y después de 3-4 días, se recogió el sobrenadante de cultivo celular. Se realizó inmunoprecipitación con resina de agarosa de la proteína A, y el contenido de las proteínas o los anticuerpos homodiméricos (scFv-Fc/scFv-Fc y Fc/Fc) y la proteína o el anticuerpo heterodimérico (scFv-Fc/Fc) se detectó mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras. Se usó software de análisis de imágenes profesional Gel-Pro (compañía Media Cybernetics) para analizar la proporción de las proteínas o los anticuerpos homodiméricos (scFv-Fc/scFv-Fc y Fc/Fc) y la proteína o el anticuerpo heterodimérico (scFv-Fc/Fc). Los resultados fueron como se muestra en la Figura 5 y la Tabla 6. Cuando la combinación de mutaciones relacionadas en la Tabla 5 se introdujeron en scFv-Fc, la proporción de los homodímeros scFv-Fc/scFv-Fc y Fc/Fc aumentó en gran medida, mientras que el heterodímero (scFv-Fc/Fc) se redujo en gran medida; y cuando se introdujeron tres mutaciones K392D/K409D/D399K (combinación de mutaciones 2) o las combinaciones de mutaciones 4, 5 o 6 se introdujeron en el Fc, las proteínas expresadas existieron principalmente en las formas de homodímeros scFv-Fc/scFv-Fc y Fc/Fc (>96 %), lo que sugiere que la interacción repulsiva de cargas es crucial para potenciar la formación de los homodímeros y obstaculizar la formación del heterodímero. Debería observarse que mutaciones adicionales (E357K/K370E o E356K/K439E) en scFv-Fc no aumentaron significativamente el contenido de los homodímeros, sino que aumentaron el contenido del heterodímero en un grado determinado. Además, cuando se introdujo E357K/K370E/K392D/K409D/D399K (combinación de mutaciones 4) en Fc, la estabilidad debería investigarse adicionalmente debido a la aparición de monómeros de Fc (aproximadamente 6 %).

10

15

20

25

30

35

El método usado para analizar la composición de mezcla de proteínas o anticuerpos es la siguiente: la proteína de fusión scFv-Fc tiene un mayor peso molecular que Fc, por lo tanto tras la combinación de scFv-Fc y Fc, los homodímeros (scFv-Fc/scFv-Fc y Fc/Fc) y el heterodímero (scFv-Fc/Fc) mostrarían diferentes bandas en posiciones en el SDS-PAGE. Puede detectarse la proporción de los homodímeros y el heterodímero. Los vectores de expresión de scFv-Fc y Fc se cotransfectan y los homodímeros (scFv-Fc/scFv-Fc y Fc/Fc) y el heterodímero (scFv-Fc/Fc) pueden visualizarse simultáneamente.

Tabla 6. Proporción de homodímeros y heterodímero de diversos mutantes en SDS-PAGE

Combinación de mutaciones	Aminoácido mutado en la proteína scFv-Fc	Aminoácido mutado en la proteína Fc	Homodímero de scFV-Fc	Heterodímero de scFV-Fc	Proporción de homodímero de FC
0	WT	WT	25,0	37,0	38,0
1 ¹⁾	NA,	K392D/K409D/D399K	44,5	4,2	51,3
2	NA,	E356K/K439E	33,1	25,8	41,1
3	NA,	E357K/K370E	19,9	32,7	47,5
4	NA,	E357K/K370E/K392D/K409D/D399K	52,3	12,1	28,7
5 ¹⁾	E357K/K370E	K392D/K409D/D399K	41,5	5,9	52,6
6 ¹⁾	E356K/K439E	K392D/K409D/D399K	31,2	8,4	60,4
7	NA	K392D/D399K	36,4	18,9	44,7
8	NA,	D399K/K409D	31,2	22,4	43,4
¹⁾ Ejemplos de acuerdo con la invención					

Para investigar la influencia de la relación de cotransfección de plásmidos pcDNA3.1-zeo-ScFv-Fc con respecto a pcMVβ-SP-Fc en las relaciones de los homodímeros con respecto al heterodímero, los plásmidos pcDNA3.1-zeo-ScFv-Fc y pcMVβ-SP-Fc con la combinación de mutaciones 1 se cotransfectaron con PEI en células 293H (ATCC

CRL-1573) en cultivo en suspensión en las relaciones de 4:1, 1: 1 y 1:4, y después de cultivar durante 3-4 días, se recogió el sobrenadante de cultivo celular. Se realizó inmunoprecipitación con resina de agarosa de la proteína A, y el contenido de las proteínas o los anticuerpos homodiméricos (scFv-Fc/scFv-Fc y Fc/Fc) y la proteína o el anticuerpo heterodimérico (scFv-Fc/Fc) se detectó mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras. Los resultados se muestran en la Tabla 7. Puede verse a partir de los resultados que, cambiando la relación de cotransfección de scFV-Fc con respecto a Fc, la proporción de los diferentes homodímeros cambia, pero la proporción del heterodímero siempre es menor del 5 %, lo que sugiere que la combinación de mutaciones 1 puede excluir de forma estable el heterodímero.

Tabla 7. Influencia de diferentes relaciones de cotransfección en proporciones de homodímero y heterodímeros

Relación de cotransfección de scFV-Fc con respecto a Fc	Homodímero de scFV-Fc	Heterodímero de scFV-Fc/Fc	Heterodímero de Fc/Fc
4:1	71,0	3,8	25,2
1:1	44,1	4,3	51,6
1:4	23,8	4,1	72,1

Según la invención, cambiando la relación de cotransfección de dos plásmidos que comprenden diferentes cadenas de Fc, la relación de diferentes homodímeros se puede ajustar hasta un grado determinado, pero la proporción general del homodímero así como la proporción de los heterodímeros no puede cambiarse significativamente, lo que indica que la proporción general de los homodímeros se mantiene estable mientras que la relación de cotransfección de los plásmidos se cambia.

5. Estudio de estabilidad acelerada de las mezclas de anticuerpos

Basándose en los resultados de las diversas combinaciones de mutaciones en SDS-PAGE en la etapa 4, los inventores seleccionaron las mezclas de anticuerpos de combinación de mutaciones 1, 4, 6 y 0 (tipo silvestre, solamente se transfecta la scFV-Fc de tipo silvestre) para realizar estudio de estabilidad acelerada durante 31 días a 45 °C, y el análisis de SDS-PAGE se realiza el día 0, 4, 8, 16, 21 y 31. De forma similar, los inventores seleccionaron mezclas de anticuerpos de la combinación de mutaciones 1 (mix 1), combinación 6 (mix 2) y combinación 0 (tipo silvestre, control) para realizar análisis de CE-SDS (electroforesis capilar) el día 0, 8, 21 y 31.

Los resultados de SDS-PAGE de estabilidad acelerada de 31 días indicaron que la combinación de mutaciones 1 y 6 mostró estabilidad muy alta, como las mezclas de anticuerpos de tipo silvestre (homodímero scFV/scFV, control). Desde el Día 16, los homodímeros scFV-Fc/scFV-Fc se degradaron parcialmente, mientras que los homodímeros Fc/Fc mostraron estabilidad excelente hasta el Día 31. Teniendo en cuenta la inestabilidad de scFV, se considera que las mezclas de anticuerpos de combinación de mutaciones 1 y 6 no tuvieron diferencias en la estabilidad en comparación con Fc de tipo silvestre. Debería observarse que la mezcla de anticuerpos producida por la combinación de mutaciones 4 mostró degradación relativamente significativa con precipitación observada. Se especula que con cinco mutaciones en cadena de Fc individual (es decir, 10 mutaciones en dímero de Fc), se vio afectada la estructura que provoca la inestabilidad. Los resultados relacionados son como se muestran en la Fig. 6.

A diferencia de SDS-PAGE tradicional, CE-SDS tiene ventajas tales como cantidad pequeña de carga de muestras, capacidad de obtener marcadores de peso molecular precisos, detección en línea con ultravioleta y similares y análisis cuantitativo, etc. Por lo tanto este método puede usarse para medir la degradación de las mezclas homodiméricas con más precisión. Pudo verse a partir de la Fig. 7 y la Tabla 6 que la combinación de mutaciones 1 y 6 mostró la misma buena estabilidad que mezclas de anticuerpos de tipo silvestre (control). Aparece un pico de degradación relativamente evidente de muestras de homodímeros scFV-Fc/scFV-Fc a partir del Día 16. Los resultados relacionados son coherentes con el análisis por SDS-PAGE de resultados de estabilidad.

Tabla 6. Análisis de CE-SDS de mezclas de anticuerpos en estudio de estabilidad acelerada

Muestra		día 0	día 8	día 16	día 31
Control	pico principal de homodímero scFv-Fc	99,79 %	94,48 %	85,30 %	81,24 %
	pico de degradación de homodímero scFv-Fc	0,21 %	5,51 %	13,72 %	18,19 %
Mix1	pico principal de homodímero scFv-Fc	42,88 %	40,02 %	35,20 %	32,75 %

ES 2 710 936 T3

Muestra		día 0	día 8	día 16	día 31
	pico de degradación de homodímero scFv-Fc	0,36 %	4,77 %	7,85 %	8,27 %
	pico principal de homodímero Fc	53,27 %	51,75 %	51,86 %	54,49 %
	pico de degradación de homodímero Fc	3,49 %	3,46 %	3,67 %	3,63 %
Mix2	pico principal de homodímero scFv-Fc	47,01 %	44,21 %	40,33 %	35,93 %
	pico de degradación de homodímero scFv-Fc	0,11 %	3,84 %	4,78 %	7,40 %
	pico principal de homodímero Fc	49,42 %	48,43 %	49,51 %	50,9 %
	pico de degradación de homodímero Fc	3,47 %	3,52 %	3,87 %	4,13 %

Aunque los modelos específicos para llevar a cabo la invención se han descrito en detalle, los expertos en la materia entenderán que estos detalles pueden modificarse y cambiarse según todas las enseñanzas de la técnica y estos cambios están dentro del alcance de protección de la invención. El alcance completo de la invención es proporcionado por las reivindicaciones adjuntas y cualquier equivalente de las mismas.

5

LISTADO DE SECUENCIAS

- 10 <110> SUZHOU ALPHAMAB CO., LTD
- <120> Método para preparar una mezcla de proteínas homodiméricas usando la interacción repulsiva de cargas
- <130> 59737P EP-WO
- 15 <140> PCT/CN2013/080060
<141> 25/07/2013
- <160> 16
- 20 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
<211> 780
<212> ADN
- 25 <213> secuencia artificial
- <220>
<223> SP-Fc
- 30 <400> 1

ES 2 710 936 T3

aagcttgccg ccaccatgga gaccgacacc ctgctgctgt gggtgctgct gctgtgggtg 60
cccggcagca ccggcggcag cggcggcggc gacaagaccc acacctgccc cccctgcccc 120
gccccgagc tgctgggcgg cccagcgtg ttctgttcc cccccaagcc caaggacacc 180
ctgatgatca gcaggacccc cgaggtgacc tgcgtggtg tggacgtgag ccacgaggac 240
cccgaggtga agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcacaacgc caagaccaag 300
cccagggagg agcagtacaa cagcacctac agggtggtga gcgtgctgac cgtgctgcac 360
caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag tgcaaggtga gcaacaaggc cctgcccgcc 420
cccatcgaga agaccatcag caaggccaag ggccagccca gggagcccca ggtgtacacc 480
ctgcccccca gcagggacga gctgaccaag aaccaggtga gcctgacctg cctggtgaag 540
ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca acggccagcc cgagaacaac 600
tacaagacca cccccccgt gctggacagc gacggcagct tcttctgta cagcaagctg 660
accgtggaca agagcaggtg gcagcagggc aacgtgttca gctgcagcgt gatgcacgag 720
gccctgcaca accactacac ccagaagagc ctgagcctga gccccgcaa gtaagaattc 780

<210> 2
<211> 252
<212> PRT
<213> secuencia artificial

5

<220>
<223> Proteína Fc codificada por la secuencia de nucleótidos de las posiciones 16 a 771 en la SEQ ID NO: 1

10

<400> 2

ES 2 710 936 T3

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Gly Ser Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 20 25 30

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 35 40 45

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 50 55 60

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asn Pro Glu Val Lys Phe
65 70 75 80

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 85 90 95

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 100 105 110

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 115 120 125

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 130 135 140

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
145 150 155 160

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 165 170 175

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 180 185 190

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser

ES 2 710 936 T3

195 200 205

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 210 215 220

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 225 230 235 240

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 245 250

5 <210> 3
 <211> 1494
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> secuencia que codifica la proteína de fusión scFv-Fc
 <400> 3

aagcttgccg ccaccatggg ctggagcctg atcctgctgt tctggtggc cgtggccacc 60

agggtgctga gcgaggtgca gctgctggag agcggcggcg gcgtggtgca gcccggcagg 120

agcctgaggc tgagctgcat cgccagcggc ttcacctca gcagctacc catgacctgg 180

gtgaggcagg cccccggcaa gggcctggag tgggtggcca gcatcagcta cgacggcagc 240

tacaagtaca aggccgacag catgaagggc aggctgacca tcagcagga caacagcaag 300

aacaccctgt acctggagat gaacagcctg accgccgagg acaccgccgt gtactactgc 360

gccaggaccg cttcttcaa cgctacgac ttctggggcc agggcacct ggtgacctg 420

agcagcgcca gcaccaaggg cccagcgtg ggcggcggcg gcagcggcg cggcggcagc 480

gagatcgtga tgaccagag cccgccacc ctgagcgtga gccccggcga gaggccacc 540

ctgagctgca gggccagcca gagcgtgagg agcaacctg cctggtacca gcagaagccc 600

ggccaggccc ccaggctgct gatctacgcc gccagcacca gggccaccgg catccccgcc 660

aggftcagcg gcagcggcag cggcaccgag ttcacctga ccatcagcag cctgcagagc 720

gaggactcg ccgtgtacta ctgccagcag tacaacgagt ggftcaggac cagcggccag 780

ggcaccaagg tggagatcaa gagggacaag acccacacct gccccctg cccgcccc 840

gagctgctgg gcgccccag ctgttctgt tcccccca agcccaagga caccctgat 900

atcagcagga cccccaggt gacctcgtg gtggtggacg tgagccacga ggaccccgag 960

ES 2 710 936 T3

gtgaagtca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcaca acgccaagac caagcccagg 1020
gaggagcagt acaacagcac ctacaggggtg gtgagcgtgc tgaccgtgct gcaccaggac 1080
tggctgaacg gcaaggagta caagtgaag gtgagcaaca aggcctgcc cgccccatc 1140
gagaagacca tcagcaaggc caagggccag cccagggagc cccaggtgta cacctgccc 1200
cccagcaggg acgagctgac caagaaccag gtgagcctga cctgcctggt gaagggcttc 1260
taccacagcg acatgccgt ggagtgggag agcaacggcc agcccagaaa caactacaag 1320
accaccccc cctgctgga cagcgacggc agctcttc tgtacagcaa gctgaccgtg 1380
gacaagagca ggtggcagca gggcaacgtg ttcagctgca gcgtgatgca cgaggccctg 1440
cacaaccact acaccagaa gagcctgagc ctgagccccg gcaagtaaga attc 1494

- <210> 4
- <211> 490
- 5 <212> PRT
- <213> secuencia artificial

- <220>
- 10 <223> Proteína de fusión scFv-Fc codificada por la secuencia de nucleótidos de las posiciones 16 a 1488 en la SEQ ID NO: 3

- <400> 4

ES 2 710 936 T3

Met Gly Trp Ser Leu Ile Leu Leu Phe Leu Val Ala Val Ala Thr Arg
1 5 10 15

Val Leu Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ile Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Ser Ser Tyr Pro Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ala Ser Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Tyr Lys Tyr Lys Ala
65 70 75 80

Asp Ser Met Lys Gly Arg Leu Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Glu Met Asn Ser Leu Thr Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

ES 2 710 936 T3

Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Ala Phe Phe Asn Ala Tyr Asp Phe Trp Gly
115 120 125

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
130 135 140

Val Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Met Thr
145 150 155 160

Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu
165 170 175

Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln
180 185 190

Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr
195 200 205

Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
210 215 220

Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val
225 230 235 240

Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Glu Trp Phe Arg Thr Ser Gly Gln Gly
245 250 255

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
260 265 270

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
275 280 285

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
290 295 300

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asn Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
305 310 315 320

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
325 330 335

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
340 345 350

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
355 360 365

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
370 375 380

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
385 390 395 400

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
405 410 415

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
420 425 430

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
435 440 445

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
450 455 460

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
465 470 475 480

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
485 490

5 <210> 5
<211> 109
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <220>
<221> DOMINIO
<222> (1)..(109)
<223> IGG1_HUMAN_fragment

ES 2 710 936 T3

<400> 5

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser

1 5 10 15

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 20 25 30

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 35 40 45

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 50 55 60

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
65 70 75 80

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 85 90 95

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 100 105

5

<210> 6

<211> 109

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> DOMINIO

<222> (1)..(109)

15 <223> IGG2_HUMAN_fragment

<400> 6

ES 2 710 936 T3

Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
1 5 10 15

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 20 25 30

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 35 40 45

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
 50 55 60

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
65 70 75 80

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 85 90 95

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 100 105

5 <210> 7
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> DOMINIO
 <222> (1)..(109)
 <223> IGG3_HUMAN_fragment

15 <400> 7

ES 2 710 936 T3

Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
1 5 10 15

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 20 25 30

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln
 35 40 45

Pro Glu Asn Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
 50 55 60

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
65 70 75 80

Gln Gly Asn Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 85 90 95

Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 100 105

- <210> 8
- <211> 109
- 5 <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*

- <220>
- <221> DOMINIO
- 10 <222> (1)..(109)
- <223> IGG4_HUMAN_fragment

- <400> 8

ES 2 710 936 T3

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
1 5 10 15

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 20 25 30

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 35 40 45

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 50 55 60

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
65 70 75 80

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 85 90 95

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 100 105

<210> 9
<211> 106
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

5

<220>
<221> DOMINIO
<222> (1)..(106)
<223> IGG1_MOUSE_fragment

10

<400> 9

Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro
1 5 10 15

Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr

15

ES 2 710 936 T3

20 25 30
Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln
35 40 45
Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asn Thr Asn Gly
50 55 60
Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu
65 70 75 80
Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn
85 90 95
His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser
100 105

5 <210> 10
<211> 106
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

10 <220>
<221> DOMINIO
<222> (1)..(106)
<223> IGG2A_MOUSE_fragment

<400> 10

Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro
1 5 10 15

Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr
20 25 30

Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys
35 40 45

Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
50 55 60

Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val
65 70 75 80

15

ES 2 710 936 T3

Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn
85 90 95

His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr
100 105

5 <210> 11
<211> 106
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

10 <220>
<221> DOMINIO
<222> (1)..(106)
<223> IGG2B_MOUSE_fragment

<400> 11

Ile Lys Gly Leu Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Pro
1 5 10 15

Ala Glu Gln Leu Ser Arg Lys Asp Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Val
20 25 30

Gly Phe Asn Pro Gly Asp Ile Ser Val Glu Trp Thr Ser Asn Gly His
35 40 45

Thr Glu Glu Asn Tyr Lys Asp Thr Ala Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
50 55 60

Ser Tyr Phe Ile Tyr Ser Lys Leu Asn Met Lys Thr Ser Lys Trp Glu
65 70 75 80

Lys Thr Asp Ser Phe Ser Cys Asn Val Arg His Glu Gly Leu Lys Asn
85 90 95

15 Tyr Tyr Leu Lys Lys Thr Ile Ser Arg Ser
100 105

20 <210> 12
<211> 106
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

25 <220>
<221> DOMINIO
<222> (1)..(106)
<223> IGG3_MOUSE_fragment

ES 2 710 936 T3

<400> 12

Pro Lys Gly Arg Ala Gln Thr Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro
1 5 10 15

Arg Glu Gln Met Ser Lys Lys Lys Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Thr
20 25 30

Asn Phe Phe Ser Glu Ala Ile Ser Val Glu Trp Glu Arg Asn Gly Glu
35 40 45

Leu Glu Gln Asp Tyr Lys Asn Thr Pro Pro Ile Leu Asp Ser Asp Gly
50 55 60

Thr Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Thr Asp Ser Trp Leu
65 70 75 80

Gln Gly Glu Ile Phe Thr Cys Ser Val Val His Glu Ala Leu His Asn
85 90 95

His His Thr Gln Lys Asn Leu Ser Arg Ser
100 105

5 <210> 13
<211> 114
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <220>
<221> DOMINIO
<222> (1)..(114)
<223> IGA_HUMAN_fragment

15 <400> 13

Ser Gly Asn Thr Phe Arg Pro Glu Val His Leu Leu Pro Pro Pro Ser
1 5 10 15

Glu Glu Leu Ala Leu Asn Glu Leu Val Thr Leu Thr Cys Leu Ala Arg
20 25 30

Gly Phe Ser Pro Lys Asp Val Leu Val Arg Trp Leu Gln Gly Ser Gln

ES 2 710 936 T3

35 40 45

Glu Leu Pro Arg Glu Lys Tyr Leu Thr Trp Ala Ser Arg Gln Glu Pro
50 55 60

Ser Gln Gly Thr Thr Thr Phe Ala Val Thr Ser Ile Leu Arg Val Ala
65 70 75 80

Ala Glu Asp Trp Lys Lys Gly Asp Thr Phe Ser Cys Met Val Gly His
85 90 95

Glu Ala Leu Pro Leu Ala Phe Thr Gln Lys Thr Ile Asp Arg Leu Ala
100 105 110

Gly Lys

5 <210> 14
<211> 112
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <220>
<221> DOMINIO
<222> (1)..(112)
<223> IGE_HUMAN_fragment

<400> 14

Thr Ser Gly Pro Arg Ala Ala Pro Glu Val Tyr Ala Phe Ala Thr Pro
1 5 10 15

Glu Trp Pro Gly Ser Arg Asp Lys Arg Thr Leu Ala Cys Leu Ile Gln
20 25 30

Asn Phe Met Pro Glu Asp Ile Ser Val Gln Trp Leu His Asn Glu Val
35 40 45

Gln Leu Pro Asp Ala Arg His Ser Thr Thr Gln Pro Arg Lys Thr Lys
50 55 60

Gly Ser Gly Phe Phe Val Phe Ser Arg Leu Glu Val Thr Arg Ala Glu
65 70 75 80

15

ES 2 710 936 T3

Trp Glu Gln Lys Asp Glu Phe Ile Cys Arg Ala Val His Glu Ala Ala
85 90 95

Ser Pro Ser Gln Thr Val Gln Arg Ala Val Ser Val Asn Pro Gly Lys
100 105 110

5 <210> 15
<211> 114
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <220>
<221> DOMINIO
<222> (1)..(114)
<223> IGD_HUMAN_fragment

<400> 15

Arg Glu Pro Ala Ala Gln Ala Pro Val Lys Leu Ser Leu Asn Leu Leu
1 5 10 15

Ala Ser Ser Asp Pro Pro Glu Ala Ala Ser Trp Leu Leu Cys Glu Val
20 25 30

Ser Gly Phe Ser Pro Pro Asn Ile Leu Leu Met Trp Leu Glu Asp Gln
35 40 45

Arg Glu Val Asn Thr Ser Gly Phe Ala Pro Ala Arg Pro Pro Pro Gln
50 55 60

Pro Gly Ser Thr Thr Phe Trp Ala Trp Ser Val Leu Arg Val Pro Ala
65 70 75 80

Pro Pro Ser Pro Gln Pro Ala Thr Tyr Thr Cys Val Val Ser His Glu
85 90 95

Asp Ser Arg Thr Leu Leu Asn Ala Ser Arg Ser Leu Glu Val Ser Tyr
100 105 110

15 Val Thr

20 <210> 16
<211> 115
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> DOMINIO
<222> (1)..(115)

ES 2 710 936 T3

<223> IGM_HUMAN_fragment

<400> 16

Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro
1 5 10 15

Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu
 20 25 30

Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg
 35 40 45

Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro
 50 55 60

Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val
65 70 75 80

Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala
 85 90 95

His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser
 100 105 110

Thr Gly Lys
 115

REIVINDICACIONES

1. Un método para obtener una mezcla que contiene dos o más proteínas usando un único clon celular recombinante, en donde las proteínas están en forma de un dímero que se forma por polimerización entre cadenas monoméricas, y las dos o más proteínas contienen el mismo dominio, en donde el método comprende la etapa de reemplazar parte de los restos de aminoácidos de las dos cadenas monoméricas en el mismo dominio de una o más proteínas con los restos de carga opuesta, de modo que las cadenas monoméricas de diferentes proteínas son desfavorables para formar un heterodímero debido a la interacción repulsiva entre cargas iguales, mientras que la cadena monomérica de la misma proteína es más favorable para formar un homodímero debido a la interacción atrayente entre cargas opuestas;
- 5 en donde el mismo dominio se refiere a dominio CH3 de un anticuerpo o región Fc de un anticuerpo; en donde reemplazar parte de los restos de aminoácidos de las dos cadenas monoméricas en los mismos dominios de una o más proteínas con el resto de carga opuesta se refiere a:
- 15 1) reemplazar Lys en la posición 392 con Asp, reemplazar Lys en la posición 409 con Asp y reemplazar Asp en la posición 399 con Lys de una proteína;
- 2) reemplazar Lys en la posición 392 con Asp, reemplazar Lys en la posición 409 con Asp y reemplazar Asp en la posición 399 con Lys de una proteína; y, simultáneamente, reemplazar Glu en la posición 357 con Lys y reemplazar Lys en la posición 370 con Glu de otra proteína; o
- 20 3) reemplazar Lys en la posición 392 con Asp, reemplazar Lys en la posición 409 con Asp y reemplazar Asp en la posición 399 con Lys de una proteína, y, simultáneamente, reemplazar Glu en la posición 356 con Lys y reemplazar Lys en la posición 439 con Glu de otra proteína; y en donde las posiciones de los restos se determinan según el índice de numeración de EU del sistema KABAT para anticuerpos.
- 25 2. El método de la reivindicación 1, en donde el proceso de reemplazar parte de los restos de aminoácidos de las dos cadenas monoméricas en el mismo dominio de una o más proteínas con los restos de carga opuesta comprende las etapas de obtener una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína resultante del remplazo de los restos, y expresar la secuencia de nucleótidos con una célula hospedadora recombinante para obtener la proteína resultante del reemplazo de los restos.
- 30 3. El método de la reivindicación 1, en donde la proteína es un anticuerpo.
4. El método de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo proviene de mamíferos, preferentemente de un ser humano, ratones o ratas.
- 35 5. El método de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en IgG, IgA, IgE, IgD e IgM.
6. El método de la reivindicación 5, en donde la IgG se selecciona entre IgG1, IgG2 e IgG3 y/o la IgA se selecciona entre IgA1 y IgA2 y/o la IgM se selecciona entre IgM1 y IgM2.
- 40 7. Una mezcla que contiene dos o más proteínas, en donde las proteínas están en forma de un dímero que se forma por polimerización entre cadenas monoméricas, y las dos o más proteínas contienen el mismo dominio, en donde parte de los restos de las dos cadenas monoméricas en el mismo dominio de una o más proteínas se reemplazan con los restos de carga opuesta, de modo que las cadenas monoméricas de las diferentes proteínas son desfavorables para formar un heterodímero debido a la interacción repulsiva entre cargas iguales, mientras que la cadena monomérica de la misma proteína es más favorable para formar un homodímero debido a la interacción atrayente entre cargas opuestas;
- 45 en donde el mismo dominio se refiere a dominio CH3 de un anticuerpo o región Fc de un anticuerpo; en donde reemplazar parte de los restos de aminoácidos de las dos cadenas monoméricas en los mismos dominios de una o más proteínas con el resto de carga opuesta se refiere a:
- 50 1) reemplazar Lys en la posición 392 con Asp, reemplazar Lys en la posición 409 con Asp y reemplazar Asp en la posición 399 con Lys de una proteína;
- 55 2) reemplazar Lys en la posición 392 con Asp, reemplazar Lys en la posición 409 con Asp y reemplazar Asp en la posición 399 con Lys de una proteína; y, simultáneamente, reemplazar Glu en la posición 357 con Lys y reemplazar Lys en la posición 370 con Glu de otra proteína; o
- 3) reemplazar Lys en la posición 392 con Asp, reemplazar Lys en la posición 409 con Asp y reemplazar Asp en la posición 399 con Lys de una proteína, y, simultáneamente, reemplazar Glu en la posición 356 con Lys y reemplazar Lys en la posición 439 con Glu de otra proteína; y en donde las posiciones de los restos se determinan según el índice de numeración de EU del sistema KABAT para anticuerpos.
- 60 8. La mezcla de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la proteína es un anticuerpo.
- 65 9. La mezcla de la reivindicación 7, en donde el anticuerpo proviene de mamíferos, preferentemente de un ser humano, ratones o ratas.

10. La mezcla de la reivindicación 7, en donde el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en IgG, IgA, IgE, IgD e IgM.

5 11. La mezcla de la reivindicación 10, en donde la IgG se selecciona entre IgG1, IgG2 e IgG3 y/o la IgA se selecciona entre IgA1 y IgA2 y/o la IgM se selecciona entre IgM1 y IgM2.

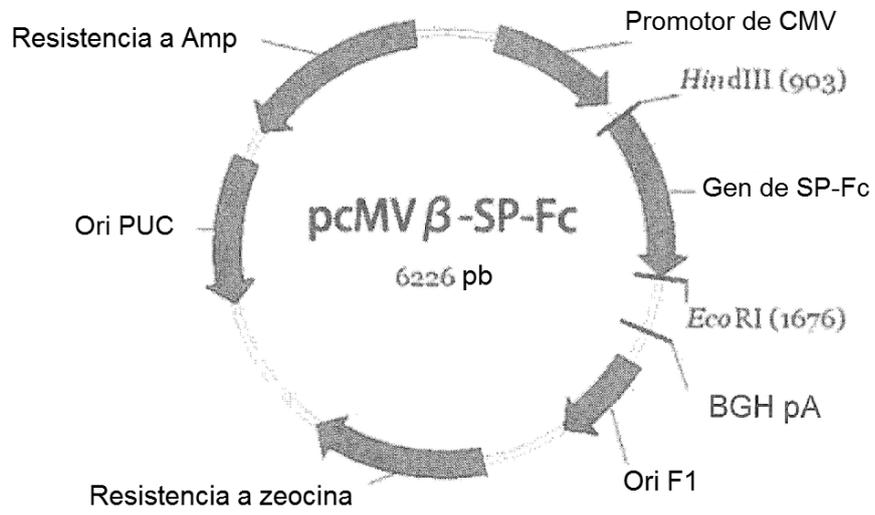


Fig. 1

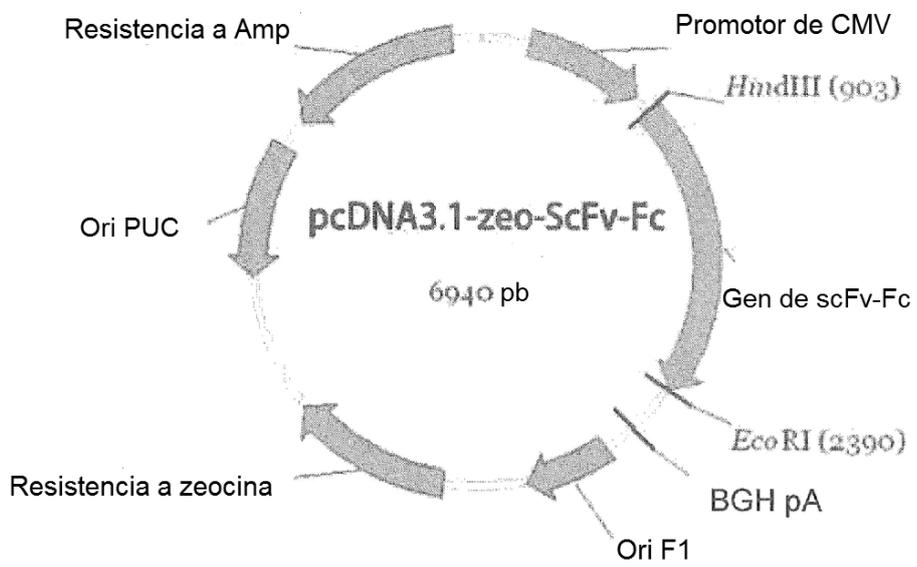


Fig. 2

ES 2 710 936 T3

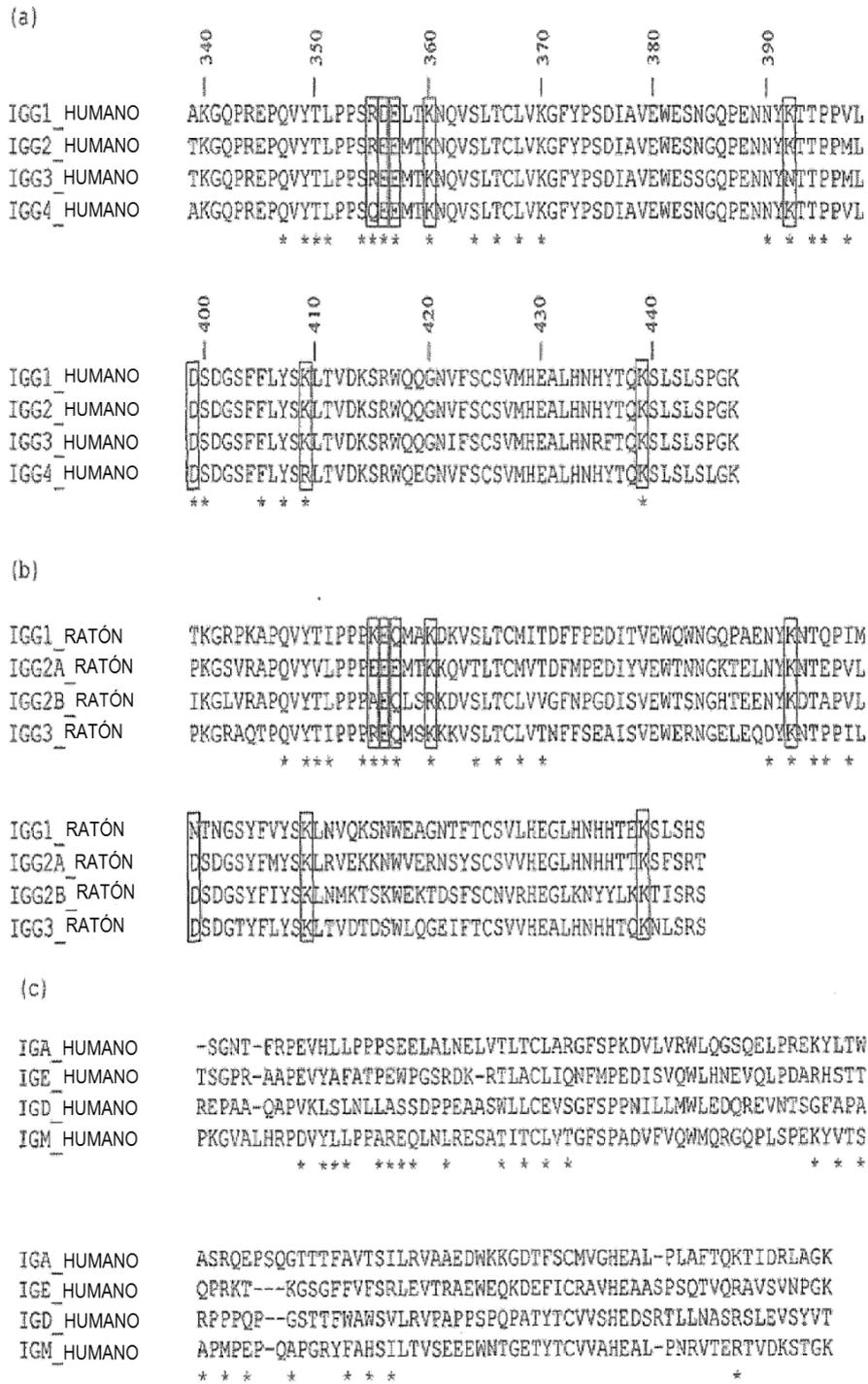


Fig. 3

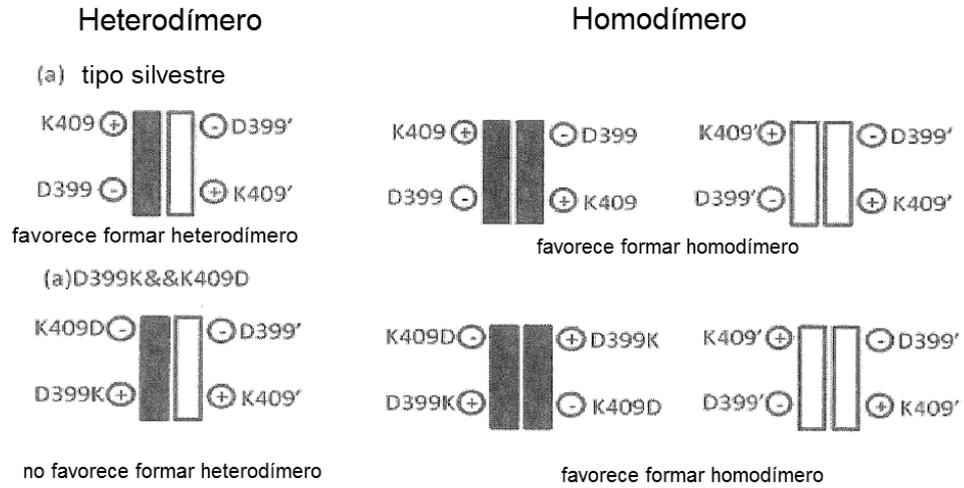


Fig. 4

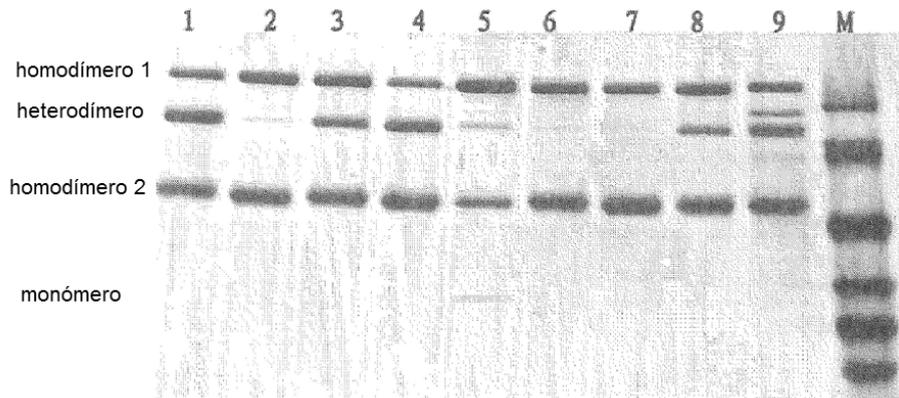


Fig. 5

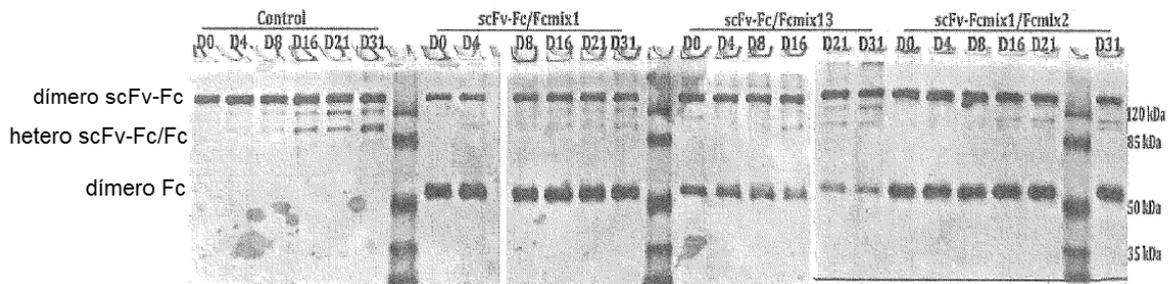


Fig. 6

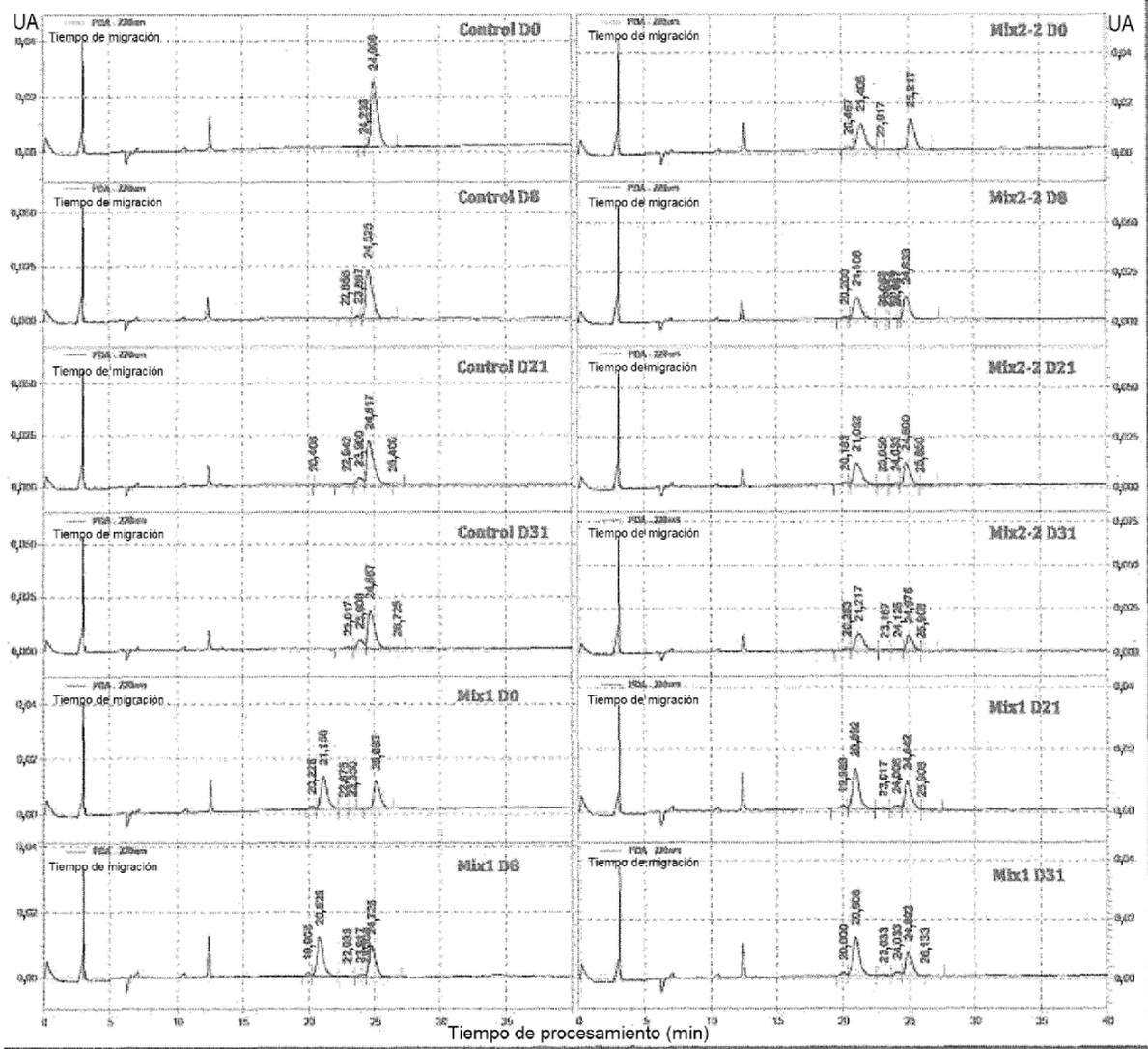


Fig. 7