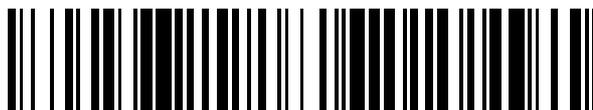


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 740 749**

51 Int. Cl.:

C07K 16/12	(2006.01)
C07K 16/26	(2006.01)
C07K 16/36	(2006.01)
C07K 16/46	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)
A61K 39/40	(2006.01)
C07K 16/18	(2006.01)
C07K 16/28	(2006.01)
C12P 21/00	(2006.01)
A61K 39/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.04.2013 PCT/NL2013/050294**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **24.10.2013 WO13157954**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.04.2013 E 13720615 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2019 EP 2838918**

54 Título: **Métodos y medios para la producción de moléculas heterodiméricas similares a Ig**

30 Prioridad:

20.04.2012 US 201261635935 P

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

06.02.2020

73 Titular/es:

**MERUS N.V. (100.0%)
Yalelaan 62
3584 CM Utrecht, NL**

72 Inventor/es:

**DE KRUIF, CORNELIS ADRIAAN;
HENDRIKS, LINDA JOHANNA ALEIDA y
LOGTENBERG, TON**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 740 749 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

Métodos y medios para la producción de moléculas heterodiméricas similares a Ig

Campo de la Invención

5 La invención se refiere a los campos de la biología molecular, la medicina y las terapias biológicas. En particular, se refiere al campo de los anticuerpos terapéuticos para el tratamiento de diversas enfermedades.

Antecedentes

Muchas de las terapias biológicas utilizadas actualmente son anticuerpos monoclonales recombinantes humanos, o humanizados aislados que mejoran la capacidad del sistema inmunitario del cuerpo para neutralizar o eliminar células y/o moléculas involucradas en procesos patológicos o para erradicar patógenos invasores o agentes infecciosos. Los anticuerpos monoclonales se unen a un área específica única, o epítipo, de un antígeno y, para su uso en terapia, a menudo se seleccionan para una propiedad funcional deseable tal como, por ejemplo, la destrucción de células tumorales, el bloqueo de las interacciones receptor-ligando o la neutralización del virus. Hoy en día, hay alrededor de 30 anticuerpos monoclonales aprobados por la FDA, que generalmente se producen en grandes cantidades y sus características biofísicas y bioquímicas se pueden analizar con gran detalle para garantizar la consistencia de un lote a otro, lo que facilita la aceptación regulatoria. A pesar de estas características favorables, los anticuerpos monoclonales tienen varias desventajas, algunas de las cuales se relacionan con su naturaleza monoespecífica y la complejidad de las enfermedades. Los procesos de enfermedades a menudo son de naturaleza multifactorial e implican una acción redundante o sinérgica de los mediadores de enfermedades o la sobrerregulación de diferentes receptores, incluida la interferencia entre sus redes de señalización. En consecuencia, el bloqueo de múltiples y diferentes factores y vías involucradas en la patología puede mejorar la eficacia terapéutica. Por la naturaleza de su monoespecificidad, los anticuerpos monoclonales solo pueden interferir con una sola etapa dentro de los procesos complejos de la enfermedad que a menudo no tienen un efecto óptimo. Además de no abordar completamente los múltiples aspectos de un proceso patológico, se ha vuelto claro que el objetivo de un solo epítipo en una única proteína celular o soluble o patógeno a menudo no será suficiente para tratar la enfermedad de manera eficiente porque el epítipo objetivo ya no puede estar disponible para que el anticuerpo monoclonal se una y ejerza el efecto deseado. Como ejemplo, las células tumorales a menudo escapan de la terapia con anticuerpos monoclonales por subregulación negativa, mutación o protección del epítipo objetivo presente en un receptor del factor de crecimiento. Al activar receptores alternativos y/o sus ligandos, las células tumorales pueden explotar un camino diferente que conduce a un crecimiento continuo y metástasis. De manera similar, los virus y otros patógenos frecuentemente mutan y pierden o protegen el epítipo objetivo, escapando así al tratamiento con anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales que se unen a un solo epítipo a menudo no reclutan todo el espectro de los mecanismos efectores provocados por los anticuerpos policlonales, que incluyen, entre otras cosas, la opsonización (mejorando la fagocitosis de los antígenos) y el impedimento estérico (los antígenos recubiertos con anticuerpos no pueden adherirse a las células huésped o superficies mucosas), neutralización de toxinas, aglutinación o precipitación (los anticuerpos que se unen a varios antígenos solubles causan la agregación y posterior depuración), la activación del complemento y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (los anticuerpos permiten la destrucción de las células objetivo por las células asesinas naturales y los neutrófilos).

Los anticuerpos policlonales para aplicaciones terapéuticas pueden obtenerse a partir de suero humano agrupado. Dichos anticuerpos policlonales terapéuticos derivados de suero pueden usarse, por ejemplo, para tratar o prevenir infecciones causadas por virus como el virus de la rabia, el citomegalovirus y el virus sincitial respiratorio, para neutralizar toxinas como la toxina tetánica y la toxina botulínica o para prevenir la inmunización del aloinjerto Rhesus D. Se ha evitado un uso más generalizado de preparaciones de anticuerpos policlonales derivados del suero por el hecho de que la fuente de plasma solo está disponible para un intervalo limitado de objetivos como enfermedades infecciosas y toxinas. Además, los productos dependen en gran medida de la disponibilidad de sangre del donante, tanto en términos de cantidad como de conveniencia, lo que resulta en una variación considerable entre los lotes. Además, las tecnologías de detección no se mantienen al día con los virus en constante evolución, por lo que los productos de inmunoglobulina conllevan un riesgo potencial de transmisión de enfermedades infecciosas. Finalmente, el largo proceso de recolección de sangre, detección y purificación de inmunoglobulina significa que las inmunoglobulinas derivadas del plasma son costosas de producir.

50 Las mezclas de anticuerpos monoclonales pueden mejorar la eficacia de los anticuerpos monoclonales a la vez que evitan las limitaciones asociadas con los anticuerpos policlonales derivados del suero. En la técnica, las combinaciones de dos anticuerpos monoclonales humanos o humanizados se han probado en modelos preclínicos y en ensayos clínicos (por ejemplo, mezclas de 2 anticuerpos monoclonales contra el receptor HER2, mezclas de 2 anticuerpos contra el receptor EGFR y 2 anticuerpos monoclonales contra el virus de la rabia). En la técnica, se ha demostrado que las combinaciones de 2 anticuerpos monoclonales pueden tener efectos aditivos o sinérgicos y reclutar mecanismos efectores que no están asociados con ningún anticuerpo solo. Por ejemplo, se demostró que las mezclas de 2 anticuerpos monoclonales contra el EGFR o HER2 destruyen de manera más potente las células tumorales en función de una combinación de actividades que incluyen una mayor internalización del receptor, un bloqueo mejorado de las vías de señalización secuencia abajo de los receptores y una citotoxicidad mediada por un efector inmune. Para terapias de combinación basadas en 2 anticuerpos monoclonales, los anticuerpos componentes pueden producirse

por separado y combinarse a nivel de proteína. Un inconveniente de este enfoque es el costo asombroso de desarrollar los 2 anticuerpos individualmente en ensayos clínicos y (parcialmente) repetir ese proceso con la combinación. Esto llevaría a un costo inaceptable de los tratamientos basados en combinaciones de anticuerpos. Alternativamente, las 2 líneas celulares recombinantes que producen los anticuerpos monoclonales componentes se pueden mezclar en un fermentador y la mezcla resultante de anticuerpos se puede purificar como una preparación única (documento WO 2004/061104). Un inconveniente de este enfoque es el control deficiente sobre la composición y, por lo tanto, la reproducibilidad de la preparación del anticuerpo policlonal recombinante resultante, especialmente cuando se considera que tales composiciones pueden cambiar con el tiempo a medida que se cultivan las células.

Durante la última década, los anticuerpos biespecíficos han surgido como una alternativa al uso de combinaciones de 2 anticuerpos. Mientras que una combinación de 2 anticuerpos representa una mezcla de 2 moléculas de inmunoglobulina diferentes que se unen a diferentes epítomos en objetivos iguales o diferentes, en un anticuerpo biespecífico esto se logra a través de una única molécula de inmunoglobulina. Al unirse a 2 epítomos en los mismos o diferentes objetivos, los anticuerpos biespecíficos pueden tener efectos similares en comparación con una combinación de 2 anticuerpos que se unen a los mismos epítomos. Además, dado que los anticuerpos biespecíficos del formato de IgG combinan 2 regiones de unión monovalentes diferentes en una sola molécula y las mezclas de 2 anticuerpos IgG combinan 2 moléculas de unión bivalentes diferentes en una preparación única, también se han observado diferentes efectos de estos formatos. Desde una perspectiva tecnológica y reguladora, esto hace que el desarrollo de un único anticuerpo biespecífico sea menos complejo porque la fabricación, las pruebas preclínicas y clínicas involucran una sola molécula. Por lo tanto, las terapias basadas en un único anticuerpo biespecífico se ven facilitadas por un proceso de desarrollo de fármacos menos complicado y económico, al tiempo que proporcionan terapias de anticuerpos más eficaces.

Los anticuerpos biespecíficos basados en el formato de IgG, que consiste en 2 cadenas pesadas y dos ligeras, se han producido por una variedad de métodos. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se pueden producir al fusionar dos líneas celulares secretoras de anticuerpos para crear una nueva línea celular o al expresar dos anticuerpos en una sola célula utilizando tecnología de ADN recombinante. Estos enfoques producen múltiples especies de anticuerpos, ya que las respectivas cadenas pesadas de cada anticuerpo pueden formar dímeros monoespecíficos (también llamados homodímeros), que contienen dos cadenas pesadas emparejadas idénticas con la misma especificidad, y dímeros biespecíficos (también llamados heterodímeros) que contienen dos cadenas pesadas emparejadas diferentes con especificidad diferente. Además, las cadenas ligeras y las cadenas pesadas de cada anticuerpo pueden emparejarse al azar para formar combinaciones no funcionales inapropiadas. Este problema, conocido como emparejamientos erróneos de cadenas pesada y ligera, se puede resolver seleccionando anticuerpos que comparten una cadena ligera común para la expresión como biespecífica. Pero incluso cuando se usa una cadena ligera común, la expresión de dos cadenas pesadas y una cadena ligera común en una sola célula dará como resultado 3 especies de anticuerpos diferentes, es decir, dos anticuerpos "parentales" monoespecíficos y el anticuerpo biespecífico, de modo que el anticuerpo biespecífico de interés necesita ser purificado de la mezcla de anticuerpos resultante. Aunque se han empleado tecnologías para aumentar aún más el porcentaje de anticuerpos biespecíficos en las mezclas de anticuerpos parentales y biespecíficos y para disminuir el porcentaje de cadenas pesadas y ligeras emparejadas erróneamente, sigue existiendo la necesidad de formatos biespecíficos que eliminen o minimicen algunas de las desventajas mencionado anteriormente.

Tomados en conjunto, la técnica proporciona una variedad de tecnologías y métodos para generar anticuerpos monoclonales, anticuerpos biespecíficos, mezclas de anticuerpos monoclonales o mezclas de anticuerpos monoespecíficos y biespecíficos que pueden usarse posteriormente para la aplicación terapéutica en pacientes. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, cada una de estas tecnologías y métodos existentes tienen sus inconvenientes y limitaciones. Por lo tanto, existe la necesidad de tecnologías mejoradas y/o alternativas para producir terapias biológicas en forma de mezclas o enfoques biespecíficos para atacar múltiples moléculas modificadoras de la enfermedad.

Descripción de la invención

La invención proporciona métodos y medios para tecnologías mejoradas y/o alternativas para producir terapias biológicas en forma de mezclas o enfoques biespecíficos para atacar múltiples moléculas modificadoras de la enfermedad, así como productos y usos resultantes de estos métodos y medios.

Se describen diversos enfoques en la técnica para promover la formación de un cierto anticuerpo biespecífico de interés, reduciendo así el contenido de anticuerpos no deseados en la mezcla resultante.

Para los anticuerpos, es bien sabido que la interacción CH3-CH3 es el principal impulsor de la dimerización de Fc (Ellerson JR., et al., J. Immunol 1976 (116) 510 - 517; Deisenhofer J. Biochemistry 1981 (20) 2361 - 2370). Además, es bien sabido que cuando dos dominios CH3 interactúan entre sí se encuentran en una interfaz proteína-proteína que comprende residuos de "contacto" (también llamados aminoácidos de contacto, residuos de interfaz o aminoácidos de interfaz). Los aminoácidos de contacto de un primer dominio CH3 interactúan con uno o más aminoácidos de contacto de un segundo dominio CH3. Los aminoácidos de contacto están típicamente dentro de 5,5 Å (preferiblemente dentro de 4,5 Å) entre sí en la estructura tridimensional de un anticuerpo. La interacción entre los residuos de contacto de un dominio CH3 y los residuos de contacto de un dominio CH3 diferente puede ser, por ejemplo, a través de las fuerzas

de Van der Waals, enlaces de hidrógeno, enlaces de hidrógeno mediados por agua, puentes salinos u otras fuerzas electrostáticas, interacciones atractivas entre las cadenas laterales aromáticas, enlaces disulfuro u otras fuerzas conocidas por los expertos en la técnica. Anteriormente se demostró que aproximadamente un tercio de las cadenas laterales de aminoácidos de contacto en la interfaz del dominio CH3 de IgG1 humana pueden dar cuenta de la mayoría de las contribuciones al plegamiento y asociación del dominio. Además, se puede prever que otros residuos de aminoácidos (vecinos) pueden afectar las interacciones en la interfaz proteína-proteína.

Los enfoques para interferir con la dimerización de las cadenas pesadas de anticuerpos se han empleado en la técnica. Se aplicaron modificaciones específicas en los dominios CH3 para favorecer la heterodimerización sobre la homodimerización. Los ejemplos de tales modificaciones de la interfaz CH3-CH3 incluyen la introducción de mutaciones complementarias de protuberancia y cavidad, también conocidas como enfoques de "botón en ojal" como se describe, por ejemplo, en el documento WO1998/050431, Ridgeway et al., 1996 y Merchant et al., 1998.

En general, el método implica la introducción de una protuberancia en la interfaz de un primer polipéptido y una cavidad correspondiente en la interfaz de un segundo polipéptido, de manera que la protuberancia se puede colocar en la cavidad para promover la formación de heteromultímeros y dificultar la formación de homomultímeros. Las "protuberancias" o "botones" se construyen reemplazando pequeñas cadenas laterales de aminoácidos de la interfaz del primer polipéptido con cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Las "cavidades" o "agujeros" compensatorios de tamaño idéntico o similar a las protuberancias se crean en la interfaz del segundo polipéptido al reemplazar grandes cadenas laterales de aminoácidos por cadenas más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). La protuberancia y la cavidad se pueden elaborar por medios sintéticos, tales como la alteración del ácido nucleico que codifica los polipéptidos o por síntesis de péptidos.

Usando solo la tecnología de botón en ojal, la relación de un anticuerpo biespecífico de interés es, en el mejor de los casos, el 87% de la mezcla de los 2 anticuerpos parental y biespecífico. Merchant et al., lograron aumentar la relación de anticuerpos biespecíficos al 95% de la mezcla mediante la introducción de un enlace disulfuro adicional entre los dos dominios CH3 en la interfaz CH3-CH3. Aún así, para usar dicho anticuerpo biespecífico como medicamento, el anticuerpo biespecífico debe ser purificado (separado) de los homodímeros y formulado en un diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. La purificación de los heterodímeros a partir de tales mezclas plantea un desafío importante debido a la similitud en las propiedades físico-químicas de los homodímeros y los heterodímeros. Un objetivo de la presente invención es proporcionar métodos para producir un anticuerpo biespecífico en un solo clon celular con una relación mejorada adicional del anticuerpo biespecífico en la mezcla. De acuerdo con la invención, la tecnología de botón en ojal se puede usar así como uno de los medios, junto con otros medios, para lograr dicha relación biespecífica mejorada adicional en una mezcla.

Otro ejemplo de dicha modificación de la interfaz CH3-CH3 se proporciona mediante una tecnología de Fc heterodimérica que respalda el diseño de proteínas de fusión biespecíficas y asimétricas mediante la creación de heterodímeros CH3 de dominio modificado de intercambio de cadenas (SEED). Estos heterodímeros CH3 de SEED son derivados de los dominios CH3 de IgG e IgA humanas que se componen de segmentos alternos de secuencias de CH3 de IgA e IgG humanas que dan como resultado pares de heterodímeros CH3 de SEED humanos complementarios, los denominados cuerpos de SEED (Davis JH. et al. Protein Engineering, Design & Selection 2010 (23) 195-202; WO2007/110205).

Otro enfoque más para la producción de un determinado anticuerpo biespecífico de interés se basa en la modificación electrostática de los residuos de contacto dentro de la interfaz CH3-CH3 que se cargan naturalmente, como se describe, por ejemplo, en los documentos EP01870459 o US2010/0015133, WO2007/147901, WO2010/129304, Gunasekaran et al (2010) y WO 2009/089004. Estas publicaciones describen mutaciones en los dominios CH3 de cadenas pesadas en las que los residuos de contacto de aminoácidos cargados que se producen naturalmente se reemplazan por residuos de aminoácidos de carga opuesta (es decir, una estrategia de inversión de carga). Esto crea una polaridad de carga alterada a través de la interfaz del dímero Fc, de modo que la coexpresión de cadenas de Fc electrostáticamente compatibles apoya interacciones atractivas favorables, promoviendo así la formación del heterodímero Fc deseado, mientras que las interacciones de carga repulsiva desfavorables suprimen la formación del homodímero Fc no deseado.

Se describió que dentro de la interfaz CH3-CH3 hay cuatro pares de residuos de carga únicos involucrados en la interacción dominio-dominio. Estos son D356/K439', E357/K370', K392/D399' y D399/K409' (numeración de acuerdo con Kabat (1991) en la que los residuos en la primera cadena están separados de los residuos en la segunda cadena por '/' y donde prima (') indica la numeración de residuos en la segunda cadena). Como la interfaz CH3-CH3 muestra una simetría doble, cada par de carga único se representa dos veces en IgG intacta (es decir, también están presentes las interacciones de carga K439/D356', K370/E357', D399/K392' y K409/D399' en la interfaz). Aprovechando esta simetría doble, se demostró que una sola inversión de carga, por ejemplo, K409D en la primera cadena, o D399'K en la segunda cadena dio como resultado una menor formación de homodímero debido a la repulsión de cargas idénticas. La combinación de diferentes reversiones de carga mejoró aún más este efecto repulsivo. Se demostró que la expresión de diferentes dominios CH3 que comprenden diferentes reversiones de carga complementarias, podría conducir a la heterodimerización, dando como resultado una mayor relación de las especies biespecíficas en la mezcla.

Usando el enfoque descrito anteriormente, es posible producir un anticuerpo biespecífico en una sola célula con

relaciones que oscilan entre aproximadamente 76% y aproximadamente 96%. Es un objetivo de la presente invención proporcionar métodos para producir un anticuerpo biespecífico en una sola célula con un porcentaje mejorado adicional de anticuerpos biespecíficos deseados. De acuerdo con la presente invención, la tecnología de modificación electrostática puede usarse como uno de los medios, solo o junto con otros medios, por ejemplo, enfoques de botón en ojal, para lograr dichos porcentajes mejorados adicionales de anticuerpos deseados (biespecíficos).

La presente invención proporciona un método para producir una molécula heterodimérica que comprende un dominio CH3 a partir de una única célula, en donde dicha molécula comprende dos dominios CH3 de IgG humana que son capaces de formar una interfaz, comprendiendo dicho método proporcionar en dicha célula

a. Una primera molécula de ácido nucleico que codifica una primera cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 de IgG humana,

b. Una segunda molécula de ácido nucleico que codifica una segunda cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 de IgG humana,

en donde dicha primera cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 comprende un residuo de lisina (K) en la posición del aminoácido 366 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE y en donde la segunda cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 comprende un residuo de ácido aspártico (D) en la posición del aminoácido 351 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE, y dicho método comprende además la etapa de cultivar dicha célula huésped y permitir la expresión de dichas dos moléculas de ácido nucleico y la recolección de dicha molécula heterodimérica que comprende un dominio CH3 del cultivo.

A menudo se desea producir más de un anticuerpo (biespecífico), por ejemplo, para interferir más eficazmente en múltiples vías biológicas involucradas en un proceso de enfermedad o con la invasión, replicación y/o propagación de un patógeno.

Una mezcla de más de un anticuerpo biespecífico también es particularmente útil para el tratamiento de ciertas enfermedades. Por ejemplo, las células tumorales utilizan muchas estrategias diferentes para desarrollar resistencia durante el tratamiento con anticuerpos o fármacos de moléculas pequeñas. La resistencia puede involucrar múltiples receptores de la superficie celular y moléculas solubles y se considera beneficioso desarrollar tratamientos basados en anticuerpos para los cánceres que abordan múltiples moléculas de este tipo asociadas a enfermedades y escapes simultáneamente. En el caso de que estén involucradas más de 2 moléculas o epítomos objetivo relacionados con la enfermedad y el escape, una mezcla de anticuerpos biespecíficos proporciona un formato terapéutico innovador y atractivo. Preferiblemente, tales mezclas de anticuerpos biespecíficos son producidas por una sola célula para facilitar un proceso de desarrollo de fármacos que es menos complicado desde un punto de vista regulador y rentable y factible desde un punto de vista de fabricación de fármacos y desarrollo clínico. En un enfoque basado en células individuales, es deseable usar métodos que permitan la producción controlada y eficiente de los anticuerpos biespecíficos, reduciendo así o incluso eliminando completamente la necesidad de separar la mezcla deseada de moléculas de IgG biespecíficas de moléculas de IgG mono-específicas no deseadas. En la técnica anterior, las mezclas de anticuerpos mono-específicos y biespecíficos han sido producidos por una sola célula (documento WO2004/009618), pero estas mezclas representan mezclas complejas de varias especies diferentes de anticuerpos biespecíficos y mono-específicos.

Como se explica en el presente documento con más detalle, dicha primera cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 comprende un residuo de lisina (K) en la posición del aminoácido 366 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE, y dicha segunda cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 comprende un residuo de ácido aspártico (D) en la posición del aminoácido 351 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE. Dicha primera cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 comprende además preferiblemente un residuo de lisina (K) en la posición del aminoácido 351 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE. Además, dicha segunda cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 preferiblemente comprende además un residuo de ácido glutámico (E) o un residuo de ácido aspártico (D) en la posición del aminoácido 349 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE, y/o un residuo de ácido glutámico (E) en la posición del aminoácido 368 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE, más preferiblemente un residuo de ácido glutámico (E) en la posición del aminoácido 368 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE.

En un método de acuerdo con la presente invención, cada una de las cadenas polipeptídicas que comprenden un dominio CH3 preferiblemente comprende además una región variable que reconoce un epítomo objetivo. Las regiones variables que forman parte de las cadenas polipeptídicas que comprenden del dominio CH3 comparten preferiblemente una cadena ligera común. En ese caso, solo los VH de las regiones variables difieren, mientras que el VL en todas las regiones variables es esencialmente el mismo. Por lo tanto, en un aspecto preferido se proporciona un método de acuerdo con la invención, que comprende además proporcionar a dicha célula huésped una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena ligera común.

En un método de acuerdo con la presente invención, se usan al menos dos dominios CH3 que comprenden al menos una combinación de mutaciones proporcionada por la presente invención. A través de estas mutaciones se forman nuevas interacciones específicas entre dos dominios CH3. Estas mutaciones de acuerdo con la presente invención se

discuten a continuación con más detalle.

El término "molécula similar a Ig", como se usa en este documento, significa una molécula proteica que posee al menos un dominio de inmunoglobulina (Ig). Dicha molécula similar a Ig comprende una secuencia que comprende la función de al menos un dominio CH3 de inmunoglobulina, preferiblemente la secuencia comprende un dominio CH3 de IgG1. Las moléculas proteicas que poseen al menos un dominio CH3 pueden equiparse adicionalmente con fracciones de unión específicas. Los dominios CH3 de la presente invención, que contienen medios para el emparejamiento preferencial, pueden usarse así para el emparejamiento preferente de dos dominios CH3 que comprenden moléculas proteicas para diseñar moléculas de unión heterodiméricas deseadas o mezclas de moléculas de unión. Las fracciones de unión que pueden ser modificadas con las moléculas proteicas que comprenden un dominio CH3 pueden ser cualquier agente de unión, que incluye, pero no se limita a, Fv de cadena sencilla, diacuerpos de cadena sencilla o en tándem (TandAb®), VHH, Anticalins®, Nanobodies®, BiTE®, un Fab, proteínas de repetición de anquirina o DARPIN®, Avimers®, un DART, un anticuerpo similar a TCR, Adnectins®, Affilins®, Transbodies®, Affibodies®, un TrimerX®, MicroProteins, Fynomers®, Centyrins® o un KALBITOR®. En una realización preferida, las fracciones de unión son regiones variables de anticuerpo (es decir, combinaciones VH/VL). Las regiones variables que forman parte de la cadenas polipeptídicas que comprenden un dominio CH3 comparten preferiblemente una cadena ligera común. En ese caso, solo los VH de las regiones variables difieren, mientras que el VL en todas las regiones variables es esencialmente el mismo.

Alternativamente, o además, se pueden modificar otras moléculas para los dominios CH3 de la presente invención, incluyendo citoquinas, hormonas, ligandos solubles, receptores y/o péptidos.

En una realización más preferida, dicha molécula similar a Ig comprende un esqueleto de Fc de longitud completa. En una realización más preferida, las moléculas similares a Ig son anticuerpos. Las regiones variables de estos anticuerpos comparten preferiblemente una cadena ligera común, pero pueden diferir en sus regiones VH. El término "anticuerpo", como se usa en este documento, significa una molécula proteica que pertenece a la clase de proteínas de inmunoglobulina, que contiene uno o más dominios que se unen a un epítipo en un antígeno, donde dichos dominios se derivan de o comparten una homología de secuencia con la región variable de un anticuerpo. Los anticuerpos son conocidos en la técnica e incluyen varios isotipos, tales como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgD, IgE e IgM. Un anticuerpo de acuerdo con la invención puede ser un IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, o un derivado y/o fragmento funcional de estos. En una realización preferida, se producen moléculas que comprenden un dominio CH3 que son anticuerpos del isotipo IgG porque los anticuerpos IgG, por ejemplo, tienen una vida media más larga en comparación con los anticuerpos de otros isotipos.

Los anticuerpos producidos con métodos de acuerdo con la presente invención tienen secuencias humanas. Los anticuerpos pueden consistir en secuencias de un solo origen, tal como anticuerpos completamente humanos, o pueden tener secuencias de más de un origen, resultando por ejemplo en anticuerpos quiméricos o humanizados. Los anticuerpos para uso terapéutico son preferiblemente tan cerca de los anticuerpos naturales del sujeto a tratar como sea posible (por ejemplo, anticuerpos humanos para sujetos humanos). La unión del anticuerpo puede expresarse en términos de especificidad y afinidad. La especificidad determina qué antígeno o epítipo del mismo está unido por el dominio de unión. La afinidad es una medida de la fuerza de unión a un antígeno o epítipo particular. La unión específica se define como la unión con afinidades (K_D) de al menos 1×10^{-5} M, más preferiblemente 1×10^{-7} M, más preferiblemente mayor que 1×10^{-9} M. Normalmente, los anticuerpos monoclonales para aplicaciones terapéuticas tienen afinidades de hasta 1×10^{-10} M o incluso más. El término "antígeno", como se usa en este documento, significa una sustancia o molécula que, cuando se introduce en el cuerpo, desencadena la producción de un anticuerpo por el sistema inmunológico. Un antígeno, entre otros, puede derivarse de organismos patógenos, células tumorales u otras células aberrantes, de haptenos o incluso de estructuras propias. A nivel molecular, un antígeno se caracteriza por su capacidad para unirse al sitio de unión a antígeno de un anticuerpo. También las mezclas de antígenos se pueden considerar como "antígeno", es decir, los expertos apreciarán que a veces un lisado de células tumorales o partículas virales pueden indicarse como "antígeno", mientras que el lisado de células tumorales o la preparación de partículas virales existen de muchos determinantes antigénicos. Un antígeno comprende al menos uno, pero a menudo más, epítopos. El término "epítipo" como se usa en este documento significa una parte de un antígeno que es reconocido por el sistema inmune, específicamente por anticuerpos, células B o células T. Aunque generalmente se piensa que los epítopos se derivan de proteínas no propias, las secuencias derivadas del huésped que pueden reconocerse también se clasifican como epítopos.

El término "dominio CH3" es bien conocido en la técnica. La estructura de IgG tiene cuatro cadenas, dos ligeras y dos pesadas; cada cadena ligera tiene dos dominios, la variable y la cadena ligera constante (VL y CL) y cada cadena pesada tiene cuatro dominios, la cadena pesada variable (VH) y tres dominios de cadena pesada constante (CH1, CH2, CH3). La región de los dominios CH2 y CH3 de la cadena pesada se denomina porción Fc (fragmento cristizable), fragmento Fc, esqueleto Fc o simplemente Fc. La molécula de IgG es un heterotetrámero que tiene dos cadenas pesadas que se mantienen juntas mediante enlaces disulfuro (-S-S-) en la región bisagra y dos cadenas ligeras. Las cadenas pesadas se dimerizan a través de las interacciones en la interfaz del dominio CH3-CH3 y a través de las interacciones en la región bisagra. El número de enlaces disulfuro de la bisagra varía entre las subclases de inmunoglobulina (Papadea y Check 1989). El fragmento Fc de una molécula de inmunoglobulina es un dímero de las dos regiones constantes del terminal C, es decir, los dominios CH2 y CH3, de la cadena pesada. Entre sus funciones fisiológicas se encuentran las interacciones con el sistema del complemento y con receptores específicos en la

5 superficie de una variedad de células. Se sabe que las interacciones entre los dominios CH3 de dos cadenas pesadas individuales desempeñan un papel importante en la conducción de la dimerización de la cadena pesada. Por lo tanto, los dominios CH3 dirigen la asociación de cadenas pesadas de anticuerpos, y se sabe que la interfaz entre los dominios CH3 contiene más de 20 residuos de contacto de cada cadena que desempeñan un papel en la interacción CH3-CH3 (Deisenhofer J., Biochemistry 1981 (20) 2361-2370; Miller S., J. Mol. Biol. 1990 (216) 965-973; Padlan, Advances in Protein Chemistry 1996 (49) 57-133). Las variantes de CH3 de la presente invención se pueden usar así en asociación con otros dominios de anticuerpos para generar anticuerpos de longitud completa que sean 10 biespecíficos o monoespecíficos. La especificidad del anticuerpo como se define en las combinaciones VH/VL típicamente no afecta el comportamiento de dimerización de la cadena pesada que es impulsado por los dominios CH3.

Los términos "residuo de contacto", "aminoácido de contacto", "residuo de interfaz" y "aminoácido de interfaz", como se usan en el presente documento, típicamente se refieren a cualquier residuo de aminoácido presente en el dominio CH3 que puede estar involucrado en los contactos interdominio, como se puede calcular por tecnologías conocidas en la técnica, incluido el cálculo del área de superficie accesible al solvente (ASA) de los residuos del dominio CH3 en presencia y ausencia de la segunda cadena (Lee y Richards J. Mol. Biol. 1971 (55) 379), en donde los residuos que muestran diferencia ($> 1\text{\AA}^2$) en ASA entre los dos cálculos se identifican como residuos de contacto. Los residuos de contacto que se han identificado incluyen residuos en las posiciones 347, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 360, 364, 366, 368, 370, 390, 392, 394, 395, 397, 399, 400, 405, 407, 409, 439 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE (Tabla A).

20

Tabla A: Lista de residuos de la interfaz del dominio CH3

Residuo de la interfaz en la cadena A	Residuos de contacto en la cadena B
Q347	K360
Y349	S354, D356, E357, K360
T350	S354, R355
L351	L351, P352, P353, S354, T366
S354	Y349, T350, L351
R355	T350
D356	Y349, K439
E357	Y349, K370
K360	Q347, Y349
S364	L368, K370
T366	L351, Y407
L368	S364, K409
K370	E357, S364
N390	S400
K392	L398, D399, S400, F405
T394	T394, V397, F405, Y407
P395	V397
V397	T394, P395
D399	K392, K409
S400	N390, K392

F405	K392, T394, K409
Y407	T366, T394, Y407, K409
K409	L368, D399, F405, Y407
K439	D356

Los residuos de contacto dentro de la interfaz CH3-CH3 pueden ser aminoácidos cargados o residuos de aminoácidos neutros. El término "residuo de aminoácido cargado" o "residuo cargado" como se usa en este documento significa residuos de aminoácido con cadenas laterales cargadas eléctricamente. Estas pueden ser cadenas laterales cargadas positivamente, como las presentes en arginina (Arg, R), histidina (His, H) y lisina (Lys, K) o pueden ser cadenas laterales cargadas negativamente, como las presentes en el ácido aspártico (Asp, D) y ácido glutámico (Glu, E). El término "residuo de aminoácido neutro" o residuo neutro como se usa en el presente documento se refiere a todos los demás aminoácidos que no llevan cadenas laterales cargadas eléctricamente. Estos residuos neutros incluyen serina (Ser, S), treonina (Thr, T), asparagina (Asn, N), glutamina (Glu, Q), cisteína (Cys, C), glicina (Gly, G), prolina (Pro, P), alanina (Ala, A), valina (Val, V), isoleucina (Ile, I), leucina (Leu, L), metionina (Met, M), fenilalanina (Phe, F), tirosina (Tyr, Y), y triptófano (Trp, T).

El término "interfaz de dominio CH3-CH3", o "interfaz de CH3", "emparejamiento de CH3-CH3", "interfaz de dominio" o simplemente "interfaz", como se usa en este documento, se refiere a la asociación entre dos dominios CH3 de los polipéptidos que comprenden un dominio CH3 que es el resultado de la interacción de residuos de aminoácidos, es decir, al menos una interacción entre un aminoácido de un primer dominio CH3 y un aminoácido de un segundo dominio CH3. Dicha interacción es, por ejemplo, a través de fuerzas de Van der Waals, enlaces de hidrógeno, enlaces de hidrógeno mediados por agua, puentes salinos u otras fuerzas electrostáticas, interacciones atractivas entre cadenas laterales aromáticas, la formación de enlaces disulfuro u otras fuerzas conocidas por los expertos en la técnica.

En un método de acuerdo con la invención, al menos una primera y una segunda molécula de ácido nucleico codifican dominios CH3 con nuevas mutaciones como se proporciona en la presente invención. Como se describe a continuación en la presente memoria con más detalle, la presente invención proporciona nuevas mutaciones de CH3 que permiten la producción de ciertas moléculas de interés biospecíficas similares a Ig sin una cantidad significativa de subproductos no deseados (diméricos). La presente invención también proporciona nuevas mutaciones de CH3 que permiten la producción de ciertas moléculas de interés similares a Ig mono-específicas sin una cantidad significativa de subproductos no deseados (diméricos). El uso de al menos una de estas mutaciones de CH3 de acuerdo con la presente invención es, por lo tanto, preferida.

El término "polipéptido", "molécula de polipéptido" o "cadena de polipéptido", como se usa en el presente documento, se refiere a una cadena de aminoácidos que se unen covalentemente entre sí a través de enlaces peptídicos. Las proteínas se componen típicamente de una o más moléculas polipeptídicas. Un extremo de cada polipéptido, llamado terminal amino o terminal N, tiene un grupo amino libre. El otro extremo, con su grupo carboxilo libre, se llama el terminal carboxilo o terminal C. Los polipéptidos de acuerdo con la presente invención pueden haber pasado por procesos de modificación postraduccional y pueden por ejemplo, estar glicosilados. Las cadenas polipeptídicas que comprenden un dominio CH3 de la presente invención se refieren, por lo tanto, a cadenas polipeptídicas que al menos abarcan un dominio CH3 de Ig y que pueden haber pasado por procesos de modificación postraduccional.

El término "molécula de ácido nucleico", como se usa en este documento, se define como una molécula que comprende una cadena de nucleótidos, más preferiblemente ADN y/o ARN. En una realización, se usa ARN de doble cadena. En otras realizaciones, una molécula de ácido nucleico de la invención comprende otros tipos de estructuras de ácido nucleico tales como, por ejemplo, una hélice de ADN/ARN, ácido nucleico peptídico (PNA), ácido nucleico bloqueado (LNA) y/o una ribozima. Por lo tanto, el término "molécula de ácido nucleico" también abarca una cadena que comprende nucleótidos no naturales, nucleótidos modificados y/o bloques de construcción no nucleotídicos que exhiben la misma función que los nucleótidos naturales.

Un aspecto adicional de la presente invención es proporcionar un método para elaborar una célula huésped para la producción de una molécula heterodimérica que comprende un dominio CH3, comprendiendo el método la etapa de introducir en dichas secuencias de ácido nucleico de la célula huésped que codifican al menos una primera y una segunda cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 de Ig humana, en donde dicha primera cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 comprende un residuo de lisina (K) en la posición del aminoácido 366 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE y en donde dicha segunda cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 comprende un residuo de ácido aspártico (D) en la posición del aminoácido 351 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE, en el que dichas secuencias de ácido nucleico se introducen de forma consecutiva o concomitante. Dichos métodos para elaborar dichas células huésped preferiblemente comprenden además la etapa de introducir en dicha célula huésped una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera común.

La invención proporciona además una célula huésped recombinante que comprende secuencias de ácido nucleico que codifican al menos una primera y una segunda cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 de IgG humana, en la que dicha primera cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 comprende un residuo de lisina (K) en la posición del aminoácido 366 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE y en la que dicha segunda cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 comprende un residuo de ácido aspártico (D) en la posición del aminoácido 351 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE.

Una célula huésped recombinante de acuerdo con la invención preferiblemente comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera común.

Una "célula huésped" de acuerdo con la invención puede ser cualquier célula huésped capaz de expresar moléculas de ADN recombinante, incluyendo bacterias tales como, por ejemplo, *Escherichia* (por ejemplo, *E. coli*), *Enterobacter*, *Salmonella*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, levaduras tales como *S. cerevisiae*, *K. lactis*, *P. pastoris*, *Candida* o *Yarrowia*, hongos filamentosos como *Neurospora*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus nidulans* y *Aspergillus niger*, células de insectos tales como las células SF-9 o SF-21 de *Spodoptera frugiperda* y preferiblemente células de mamíferos tales como las células de ovario de hámster chino (CHO), células BHK, células de ratón que incluyen células SP2/0 y células de mieloma NS-0, células de primate tales como células COS y Vero, células MDCK, células BRL 3A, hibridomas, células tumorales, células primarias inmortalizadas, células humanas como W138, HepG2, HeLa, HEK293, HT1080 o células de retina embrionaria tales como PER.C6, y similares. A menudo, el sistema de expresión de elección involucrará un vector de expresión de células de mamíferos y un huésped, de modo que los anticuerpos puedan estar adecuadamente glicosilados. Una línea celular humana, preferiblemente PER.C6, puede usarse ventajosamente para obtener anticuerpos con un patrón de glicosilación completamente humano. Las condiciones para hacer crecer o multiplicar las células (véase, por ejemplo, Tissue culture, Academic Press, Kruse y Paterson, editores (1973)) y las condiciones para la expresión del producto recombinante pueden diferir un poco, y la optimización del proceso generalmente se realiza para aumentar relaciones y/o crecimiento del producto de las células entre sí, de acuerdo con métodos generalmente conocidos por los expertos en la técnica. En general, los principios, protocolos y técnicas prácticas para maximizar la productividad de los cultivos celulares de mamíferos se pueden encontrar en Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach (M. Butler, editores, IRL Press, 1991). La expresión de anticuerpos en células huésped recombinantes se ha descrito ampliamente en la técnica (véase, por ejemplo, los documentos EP0120694; EP0314161; EP0481790; EP0523949; y la patente de los Estados Unidos No. 4.816.567; y el documento WO 00/63403). Las moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas ligera y pesada pueden estar presentes como copias extracromosómicas y/o integrarse de manera estable en el cromosoma de la célula huésped, se prefiere esto último.

Un aspecto adicional de la presente invención es proporcionar un cultivo de células huésped recombinantes de acuerdo con la invención, o un cultivo de células huésped recombinantes obtenibles u obtenidas mediante un método de acuerdo con la invención, produciendo dicho cultivo una molécula heterodimérica que comprende un dominio CH3 de IgG humano.

Para obtener la expresión de secuencias de ácido nucleico que codifican los polipéptidos que comprenden un dominio CH3, los expertos en la técnica saben que las secuencias capaces de conducir dicha expresión pueden unirse funcionalmente a las secuencias de ácido nucleico que codifican los polipéptidos que comprenden un dominio CH3. Funcionalmente enlazado pretende describir que las secuencias de ácido nucleico que codifican los polipéptidos que comprenden un dominio CH3 o sus precursores están enlazadas a las secuencias capaces de dirigir la expresión de tal manera que estas secuencias pueden dirigir la expresión de los polipéptidos que comprenden un dominio CH3 o sus precursores. Los vectores de expresión útiles están disponibles en la técnica, por ejemplo, la serie de vectores pcDNA de Invitrogen. Cuando la secuencia que codifica el polipéptido de interés se inserta correctamente con referencia a las secuencias que gobiernan la transcripción y traducción del polipéptido codificado, el casete de expresión resultante es útil para producir el polipéptido de interés, denominado expresión. Las secuencias que dirigen la expresión pueden incluir promotores, potenciadores y similares, y combinaciones de los mismos. Estos deben ser capaces de funcionar en la célula huésped, lo que conduce a la expresión de las secuencias de ácido nucleico que están funcionalmente enlazadas a ellas. Los promotores pueden ser constitutivos o regulados, y pueden obtenerse de varias fuentes, incluidos virus, fuentes procarionóticas o eucariotas, o diseñados artificialmente. La expresión de los ácidos nucleicos de interés puede ser del promotor natural o derivado del mismo o de un promotor completamente heterólogo. Algunos promotores bien conocidos y muy utilizados para la expresión en células eucariotas comprenden promotores derivados de virus, tales como adenovirus, por ejemplo, el promotor E1A, promotores derivados de citomegalovirus (CMV), tales como el promotor temprano inmediato (IE) de CMV, promotores derivados del Virus de Simio 40 (SV40), y similares. Los promotores adecuados también pueden derivarse de células eucariotas, tales como promotores de metalotioneína (MT), promotor del factor de elongación 1 α (EF-1 α), promotor de actina, un promotor de inmunoglobulina, promotores de choque térmico, y similares. Cualquier promotor o potenciador/promotor capaz de dirigir la expresión de la secuencia de interés en la célula huésped es adecuado en la invención. En una realización, la secuencia capaz de dirigir la expresión comprende una región de un promotor de CMV, preferiblemente la región que comprende los nucleótidos -735 a +95 del potenciador/promotor del gen temprano inmediato de CMV. El experto en la materia sabrá que las secuencias de expresión usadas en la invención pueden combinarse adecuadamente con elementos que pueden estabilizar o mejorar la expresión, tales como aislantes, regiones de unión a matriz, elementos STAR (documento WO 03/004704), y similares. Esto puede mejorar la estabilidad y/o los niveles de expresión.

La producción de proteínas en células huésped recombinantes se ha descrito ampliamente, por ejemplo, en Current Protocols in Protein Science, 1995, Coligan JE, Dunn BM, Ploegh HL, Speicher DW, Wingfield PT, ISBN 0-471-11184-8; Bendig, 1988. El cultivo de una célula se realiza para permitirle metabolizar, y/o crecer y/o dividir y/o producir proteínas recombinantes de interés. Esto se puede lograr mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, e incluye, pero no se limita a, el suministro de nutrientes para la célula. Los métodos comprenden crecimiento adherido a superficies, crecimiento en suspensión o combinaciones de los mismos. Se pueden optimizar varias condiciones de cultivo mediante métodos bien conocidos en la técnica para optimizar los rendimientos de producción de proteínas. El cultivo se puede hacer, por ejemplo, en placas, botellas de rodillo o en biorreactores, utilizando sistemas discontinuos alimentados por lotes, o continuos, fibra hueca y similares. Con el fin de lograr una producción a gran escala (continua) de proteínas recombinantes a través del cultivo celular, en la técnica se prefiere tener células capaces de crecer en suspensión, y se prefiere tener células que puedan cultivarse en ausencia de suero derivado de animales o de seres humanos o componentes de suero derivados de animales o de seres humanos. Por lo tanto, la purificación es más fácil y la seguridad aumenta debido a la ausencia de proteínas animales o humanas adicionales derivadas del medio de cultivo, mientras que el sistema también es muy confiable ya que los medios sintéticos son los mejores en reproducibilidad.

Las moléculas similares a Ig se expresan en células huésped y se recogen de las células o, preferiblemente, del medio de cultivo celular por métodos que son generalmente conocidos por los expertos en la técnica. Después de la recolección, estas moléculas similares a Ig pueden purificarse utilizando métodos conocidos en la técnica. Dichos métodos pueden incluir precipitación, centrifugación, filtración, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio catiónico y/o aniónico, cromatografía de interacción hidrófoba y similares. Para una mezcla de anticuerpos que comprenden moléculas de IgG, se puede usar adecuadamente la cromatografía de afinidad de proteína A o proteína G (véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nos. 4.801.687 y 5.151.504).

Las moléculas similares a Ig, y/o mezclas de las mismas, producidas con métodos de acuerdo con la presente invención, tienen preferiblemente una cadena ligera común. Además, se proporciona, por lo tanto, un método de acuerdo con la invención, que comprende además proporcionar a dicha célula huésped una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena ligera común. Esta es una cadena ligera que es capaz de emparejarse con al menos dos cadenas pesadas diferentes, formando así dominios de unión a antígeno funcionales. Un dominio funcional de unión a antígeno es capaz de unirse específicamente a un antígeno. Preferiblemente, se usa una cadena ligera común que es capaz de emparejarse con todas las cadenas pesadas producidas con un método de acuerdo con la invención, formando de este modo dominios de unión a antígeno funcionales, de modo que se evite el error de cadenas pesadas y ligeras no emparejadas. En un aspecto, solo se usan cadenas ligeras comunes con una secuencia de aminoácidos idéntica. Alternativamente, los expertos en la técnica reconocerán que "común" también se refiere a equivalentes funcionales de la cadena ligera de los cuales la secuencia de aminoácidos no es idéntica. Existen muchas variantes de dicha cadena ligera en la que están presentes mutaciones (eliminaciones, sustituciones, adiciones) que no influyen materialmente en la formación de regiones de unión funcionales. Dichas variantes también son capaces de unir diferentes cadenas pesadas y formar dominios de unión funcionales a antígeno. El término "cadena ligera común", como se usa en el presente documento, por lo tanto, se refiere a cadenas ligeras que pueden ser idénticas o tener algunas diferencias en la secuencia de aminoácidos, al tiempo que conservan la especificidad de unión del anticuerpo resultante después del emparejamiento con una cadena pesada. Por ejemplo, es posible preparar o encontrar cadenas ligeras que no sean idénticas pero que sean funcionalmente equivalentes, por ejemplo, introduciendo y probando cambios de aminoácidos conservadores, y/o cambios de aminoácidos en regiones que no contribuyen o solo parcialmente a la especificidad de unión cuando se emparejan con la cadena pesada, y similares. Una combinación de una cierta cadena ligera común y tales variantes funcionalmente equivalentes se engloba dentro del término "cadena ligera común". Se hace referencia al documento WO 2004/009618 para una descripción detallada del uso de cadenas ligeras comunes. Preferiblemente, se usa una cadena ligera común en la presente invención que es una cadena ligera similar a la línea germinal, más preferiblemente una cadena ligera de la línea germinal, preferiblemente una cadena ligera kappa humana de la línea germinal reorganizada, lo más preferiblemente cualquiera de las cadenas ligeras kappa humana de la línea germinal reorganizada IgVk1-39/Jk o IGVk3-20/Jk.

Alternativamente, el experto en la materia puede seleccionar, como alternativa al uso de una cadena ligera común y para evitar el error de cadenas pesadas y ligeras no emparejadas, medios para el emparejamiento forzado de la cadena pesada y ligera, tal como por ejemplo se describe en los documentos WO2009/080251, WO2009/080252 y WO2009/080253.

La presente invención proporciona nuevos dominios CH3 modificados así como nuevas combinaciones de mutaciones de CH3. Antes de la presente invención, se sustituyeron los aminoácidos cargados de los dominios CH3 que se sabía que estaban involucrados en el emparejamiento de CH3-CH3 con aminoácidos de carga opuesta (inversión de carga), lo que influyó en el emparejamiento de CH3-CH3. Las mutaciones de acuerdo con la presente invención son una alternativa inventiva a este enfoque, porque ahora los aminoácidos de CH3 que no están cargados o son neutros en CH3 de tipo silvestre están sustituidos con residuos cargados. La presente invención en esta realización no intercambia aminoácidos de contacto cargados por aminoácidos de carga opuesta, sino que sustituye los aminoácidos de CH3 no cargados por cargados. El enfoque de la presente invención proporciona no solo un método para dirigir eficientemente la dimerización de los dominios CH3, sino que también tiene la ventaja de que se crea al menos una interacción de carga-carga adicional en la interfaz CH3. En vista de esta interacción de carga-carga adicional sobre

los pares de carga existentes en la interfaz CH3-CH3, los dímeros de acuerdo con la invención son generalmente más estables en comparación con los dímeros de tipo silvestre (el dímero de tipo silvestre se define como una IgG biespecífica (AB) sin modificación de CH3 en contraste con sus homodímeros parentales (AA o BB)). Además, sorprendentemente ha sido posible aumentar aún más la relación de una o más moléculas de interés similares a Ig en una mezcla. Como se describe anteriormente en esta memoria, los métodos conocidos en la técnica para la producción preferencial de un anticuerpo biespecífico típicamente implican la producción de algunos productos secundarios diméricos no deseados. Por ejemplo, la relación de un anticuerpo biespecífico de interés que utiliza la tecnología de botón en el ojal es, en el mejor de los casos, del 87%, mientras que el enfoque de modificación electrostática en el que los aminoácidos de contacto cargados se sustituyen por aminoácidos de carga opuesta, también resulta en relaciones de hasta al 96% (véase, por ejemplo, el Ejemplo 11). Sorprendentemente, los presentes inventores han logrado introducir mutaciones que aumentan aún más la relación de una molécula de interés similar a Ig en una mezcla. Por ejemplo, el Ejemplo 17 describe un método que usa mutaciones de acuerdo con la presente invención, en donde la relación de un anticuerpo biespecífico de interés se incrementó hasta tal punto que no se detectó ningún producto secundario dimérico en la mezcla resultante. En las mezclas se encontraban presentes en alguna medida moléculas parcialmente desapareadas que consistían en una sola cadena pesada sencilla emparejada con una cadena ligera común, pero estos son el resultado de una expresión desequilibrada de las cadenas pesadas y se pueden separar fácilmente de la mezcla por cromatografía de exclusión de tamaño. Por lo tanto, con tales mutaciones de acuerdo con la presente invención, se puede producir una molécula biespecífica similar a Ig en una sola célula con una alta relación sin que esencialmente haya subproductos diméricos contaminantes, lo cual es particularmente adecuado para la producción de una composición farmacéutica.

Una realización de la presente invención, por lo tanto, proporciona un método para producir una molécula heterodimérica que comprende un dominio CH3 a partir de una única célula, en donde dicha molécula comprende dos dominios CH3 de IgG humana que son capaces de formar una interfaz, comprendiendo dicho método proporcionar en dicha célula

a. Una primera molécula de ácido nucleico que codifica una primera cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 de la IgG humana,

b. Una segunda molécula de ácido nucleico que codifica una segunda cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 de la IgG humana,

en donde dicha primera cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 comprende un residuo de lisina (K) en la posición del aminoácido 366 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE y en donde la segunda cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 comprende un residuo de ácido aspártico (D) en la posición del aminoácido 351 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE, y dicho método comprende además la etapa de cultivar dicha célula huésped y permitir la expresión de dichas dos moléculas de ácido nucleico y la recolección de dicha molécula heterodimérica similar a Ig del cultivo.

Dicho método preferiblemente comprende además la etapa de proporcionar a dicha célula huésped una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena ligera común, que tiene ventajas como se describió anteriormente en este documento.

Se ha informado que los aminoácidos en la posición 366 de un dominio CH3 y la posición 351 de un segundo dominio CH3 son un par de residuos de contacto en la interfaz CH3-CH3, lo que significa que están ubicados lo suficientemente cerca uno del otro en la conformación tridimensional de la molécula similar a Ig resultante para poder interactuar entre sí. Por lo tanto, el primer dominio CH3 se emparejará preferentemente con el segundo dominio CH3.

Si el polipéptido que comprende el primer dominio CH3, que transporta un residuo cargado en la posición 366, comprende además un dominio variable que tiene especificidad por el antígeno A, y si el polipéptido que comprende el segundo dominio CH3, que transporta un residuo cargado de manera opuesta en la posición 351, comprende además un dominio variable que tiene especificidad por el antígeno B, se formarán predominantemente moléculas biespecíficas similares a Ig con una especificidad AB.

Una combinación preferida de mutaciones de acuerdo con la presente invención es la sustitución de treonina (T) por lisina (K) en la posición 366 de un polipéptido que comprende el primer dominio CH3 que comprende además un dominio variable (por ejemplo, con especificidad A) y la sustitución de leucina (L) por ácido aspártico (D) en la posición 351 de un polipéptido que comprende el segundo dominio CH3 que comprende además un dominio variable (por ejemplo, con especificidad B). Esto se denota como una mutación del par T366K/L351'D. Como se explicó antes, se ha informado que los aminoácidos en la posición 366 de un dominio CH3 y la posición 351 de un segundo dominio CH3 son un par de residuos de contacto en la interfaz CH3-CH3. La lisina que se introduce en la posición 366 y el ácido aspártico introducido en la posición 351 tienen cargas opuestas, de modo que estos aminoácidos se atraen electrostáticamente entre sí. Por lo tanto, el primer dominio CH3 atraerá preferentemente el segundo dominio CH3 y las moléculas similares a Ig que comprenden un primer dominio CH3 que contiene lisina en la posición 366 apareada con un segundo dominio CH3 que contiene ácido aspártico en la posición 351 se formarán predominantemente. Si el polipéptido que comprende el primer dominio CH3 tiene especificidad por el antígeno A, y si el polipéptido que comprende el segundo dominio CH3 tiene especificidad por el antígeno B, se formarán predominantemente moléculas

biespecíficas similares a Ig con especificidad 'AB'. Obsérvese que, en algunas realizaciones, la especificidad de los dominios variables de dichas primera y segunda cadenas polipeptídicas que comprenden un dominio CH3 puede ser la misma, lo que dará como resultado la formación de moléculas similares a Ig mono-específicas (por ejemplo, con especificidad 'AA'). Como se mencionó anteriormente, una de las ventajas de las mutaciones de acuerdo con la presente invención es el hecho de que se crea una nueva interacción entre un par de aminoácidos cargados recientemente introducidos, en lugar de reemplazar las interacciones existentes de aminoácidos cargados. Esto no fue previamente revelado o sugerido. Por lo tanto, un aspecto de la invención proporciona un método para producir una molécula heterodimérica que comprende un dominio CH3 a partir de una única célula, en donde dicha molécula comprende dos dominios CH3 de IgG humana que son capaces de formar una interfaz, comprendiendo dicho método proporcionar en dicha célula:

- una primera molécula de ácido nucleico que codifica una primera cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 de IgG humana, y
- una segunda molécula de ácido nucleico que codifica una segunda cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 de IgG humana,

en donde dicha primera cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 comprende la sustitución de aminoácido T366K y en la que dicha segunda cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 comprende la sustitución de aminoácido L351D, comprendiendo dicho método además la etapa de cultivar dicha célula huésped y permitir la expresión de dichas dos moléculas de ácido nucleico y recoger dicha molécula heterodimérica similar a Ig del cultivo.

Utilizando las sustituciones de aminoácidos mencionadas anteriormente de acuerdo con la presente invención, se ha hecho posible producir una molécula heterodimérica similar a Ig a partir de una única célula, por lo que la presencia de homodímeros contaminantes es inferior al 5%, preferiblemente inferior al 2%, más preferiblemente, inferior al 1%, o, lo más preferiblemente, por lo que los homodímeros contaminantes están esencialmente ausentes. Por lo tanto, una realización proporciona un método para producir una molécula heterodimérica que comprende un dominio CH3 a partir de una sola célula, en donde dicha molécula que comprende un dominio CH3 comprende dos dominios CH3 de IgG humana que son capaces de formar una interfaz y en donde la presencia de homodímeros contaminantes es inferior al 5%, preferiblemente inferior al 2%, más preferiblemente inferior al 1%, y lo más preferiblemente los homodímeros contaminantes están esencialmente ausentes, comprendiendo dicho método proporcionar en dicha célula:

- una primera molécula de ácido nucleico que codifica una primera cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 de IgG humana, y
- una segunda molécula de ácido nucleico que codifica una segunda cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 de IgG humana,

en donde dicha primera cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 comprende la sustitución de aminoácido T366K y en la que dicha segunda cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 comprende la sustitución de aminoácido L351D, comprendiendo dicho método además la etapa de cultivar dicha célula huésped y permitir la expresión de dichas dos moléculas de ácido nucleico y recoger dicha molécula heterodimérica similar a Ig del cultivo.

Preferiblemente, se proporciona un método de acuerdo con la invención para producir una molécula heterodimérica que comprende un dominio CH3, en el que dicha primera cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 comprende además la sustitución de aminoácido L351K. Además, se prefiere que dicha segunda cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 comprenda además una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en Y349E, Y349D y L368E. Más preferiblemente, dicha segunda cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 comprende además la sustitución de aminoácido L368E.

Por lo tanto, en una realización preferida, las mutaciones T366K/L351'D mencionadas anteriormente de acuerdo con la presente invención se combinan adicionalmente con la sustitución de leucina (L) por ácido glutámico (E) en la posición 368 del segundo dominio CH3. Esto, por ejemplo, se denota como una mutación T366K/L351'D,L368'E (pero también son posibles formas alternativas de denotación, como T336K/L351D-L368E o T366K/L351D,L368E o T366K-L351D, L368E). Como se muestra en el Ejemplo 17, la introducción de esta mutación de acuerdo con la invención en un polipéptido que comprende el primer dominio CH3 con especificidad por el antígeno A, y un polipéptido que comprende el segundo dominio CH3 con especificidad por el antígeno B da como resultado una buena relación particular de moléculas biespecíficas similares a Ig con doble especificidad AB. Con este par de mutaciones, incluso es posible obtener anticuerpos biespecíficos sin que se forme una cantidad detectable de homodímeros. Una realización particularmente preferida, por lo tanto, proporciona un método para producir una molécula heterodimérica que comprende un dominio CH3 a partir de una única célula, en donde dicha molécula comprende dos dominios CH3 de IgG humana que son capaces de formar una interfaz y en donde la presencia de homodímeros contaminantes es inferior al 5%, preferiblemente inferior al 2%, más preferiblemente inferior al 1%, y más preferiblemente los homodímeros contaminantes están esencialmente ausentes, comprendiendo dicho método proporcionar en dicha célula:

- una primera molécula de ácido nucleico que codifica una primera cadena polipeptídica que comprende un dominio

CH3 de IgG humana, y

- una segunda molécula de ácido nucleico que codifica una segunda cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 de IgG humana,

5 en donde dicha primera cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 comprende un residuo de lisina (K) en la posición del aminoácido 366 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE y en donde dicha segunda cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 comprende un residuo de ácido aspártico (D) en la posición del aminoácido 351 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE y un residuo del ácido glutámico (E) en la posición del aminoácido 368 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE, comprendiendo dicho método la etapa de cultivar dicha célula huésped y permitir su expresión en dos moléculas de ácido nucleico y recolectar dicha molécula heterodimérica similar a Ig del cultivo.

10 En otra realización preferida, la treonina (T) está sustituida por lisina (K) en la posición 366 de un primer dominio CH3 y la leucina (L) está sustituida por ácido aspártico (D) en la posición 351 de un segundo dominio CH3 y la tirosina (Y) está sustituida por ácido glutámico (E) en la posición 349 de dicho segundo dominio CH3. Esto se indica, por ejemplo, como una mutación T366K/L351'D,Y349'E, pero otras formas de denotar estas mutaciones pueden incluir, por ejemplo, 15 T366K-L351D:Y349E, o T366K/L351D,Y349E o simplemente T366K/L351DY349E. El residuo Y349 es un residuo vecino del residuo en la posición 351 que puede contribuir a las interacciones del dímero. De acuerdo con los datos *in silico*, Y349E se suma a la estabilidad del heterodímero (puntuaciones más bajas *in silico*), así como a la desestabilización del monodímero (puntuaciones más altas *in silico*) y el ácido glutámico (E) en la posición 349 es más favorable que el ácido aspártico (D). Por lo tanto, la introducción de una segunda sustitución de aminoácidos en el polipéptido que comprende el segundo dominio CH3, que ya comprende la sustitución de aminoácidos en la posición 20 351, favorece aún más la heterodimerización.

Una realización particularmente preferida, por lo tanto, proporciona un método para producir una molécula heterodimérica que comprende un dominio CH3 a partir de una única célula, en donde dicha molécula comprende dos dominios CH3 de IgG humanos que son capaces de formar una interfaz y en donde los homodímeros contaminantes son menos del 5%, más preferiblemente menos del 2%, incluso más preferiblemente menos del 1%, y lo más preferiblemente esencialmente ausentes, comprendiendo dicho método proporcionar en dicha célula:

- una primera molécula de ácido nucleico que codifica una primera cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 de IgG humana, y
- una segunda molécula de ácido nucleico que codifica una segunda cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 de IgG humana,

30 en donde dicha primera cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 comprende un residuo de lisina (K) en la posición del aminoácido 366 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE y en donde dicha segunda cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 comprende un residuo de ácido aspártico (D) en la posición del aminoácido 351 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE y un residuo del ácido glutámico (E) en la posición del aminoácido 349 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE, comprendiendo dicho método etapa de cultivar dicha célula huésped y permitir la expresión de dichas moléculas en dos moléculas de ácido nucleico y recolectar dicha molécula heterodimérica similar a Ig del cultivo.

35 En otra realización preferida, la treonina (T) está sustituida por lisina (K) en la posición 366 de un primer dominio CH3 y la leucina (L) está sustituida por ácido aspártico (D) en la posición 351 de un segundo dominio CH3 y la tirosina (Y) está sustituida por ácido glutámico (E) en la posición 349 de dicho segundo dominio CH3 y la leucina (L) está sustituida por el ácido glutámico (E) en la posición 368 de dicho segundo dominio CH3. Esto se denota como una mutación T366K/L351'D,Y349'E,L368'E. Los dos residuos Y349 y L368 son residuos que pueden contribuir a las interacciones del dímero. De acuerdo con los datos *in silico*, Y349E y L368E se suman a la estabilidad del heterodímero (puntuaciones más bajas *in silico*), así como a la desestabilización del dímero BB (puntuaciones más altas *in silico*) y 40 ácidos glutámicos (E) en las posiciones 349 y 368 son más favorables que los ácidos aspárticos (D). Por lo tanto, la introducción de una segunda y tercera sustitución de aminoácidos en la cadena B, que ya comprende la sustitución de aminoácidos en la posición 351, favorece aún más la heterodimerización. Una realización particularmente preferida, por lo tanto, proporciona un método para producir una molécula heterodimérica que comprende un dominio CH3 a partir de una única célula, en donde dicha molécula comprende dos dominios CH3 de IgG humana que son capaces de formar una interfaz y en donde los homodímeros contaminantes son menos del 5%, más preferiblemente menos del 2%, incluso más preferiblemente menos del 1%, y lo más preferiblemente esencialmente ausentes, comprendiendo dicho método proporcionar en dicha célula:

- una primera molécula de ácido nucleico que codifica una primera cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 de IgG humana, y
- una segunda molécula de ácido nucleico que codifica una segunda cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 de IgG humana,

55 en donde dicha primera cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 comprende un residuo de lisina (K) en

la posición del aminoácido 366 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE y en donde dicha segunda cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 comprende un residuo de ácido aspártico (D) en la posición del aminoácido 351 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE y un residuo del ácido glutámico (E) en la posición del aminoácido 349 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE y un residuo ácido glutámico (E) en la posición del aminoácido 368 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE, comprendiendo dicho método además la etapa de cultivar dicha célula huésped y permitir la expresión de dicha molécula en dos moléculas de ácido nucleico y recoger dicha molécula heterodimérica similar a Ig del cultivo.

En otra realización preferida, la treonina (T) está sustituida por lisina (K) en la posición 366 de un primer dominio CH3 y la leucina (L) está sustituida por lisina (K) en la posición 351 de dicho primer dominio CH3 y la leucina (L) está sustituida por ácido aspártico (D) en la posición 351 de un segundo dominio CH3 y la leucina (L) está sustituida por ácido glutámico (E) en la posición 368 de dicho segundo dominio CH3. Esto se denota como una mutación T366K, L351K/L351'D, L368'E. Esta mutación también aumenta la relación del anticuerpo (bienespecífico) de interés, como se muestra en los Ejemplos. También con esta mutación ha sido posible obtener anticuerpos bienespecíficos sin que se forme una cantidad detectable de homodímeros. Por lo tanto, también se proporciona un método para producir una molécula heterodimérica que comprende un dominio CH3 a partir de una sola célula, en donde dicha molécula comprende dos dominios CH3 de IgG humana que son capaces de formar una interfaz y en donde los homodímeros contaminantes son menos del 5%, preferiblemente menos de 2%, más preferiblemente menos del 1%, y lo más preferiblemente esencialmente ausentes, comprendiendo dicho método proporcionar en dicha célula:

- una primera molécula de ácido nucleico que codifica una primera cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 de IgG humana, y
- una segunda molécula de ácido nucleico que codifica una segunda cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 de IgG humana,

en donde dicha primera cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 comprende un residuo de lisina (K) en la posición del aminoácido 366 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE y un residuo de lisina (K) en la posición del aminoácido 351 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE, y en el que dicha segunda cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 comprende un residuo de ácido aspártico (D) en la posición del aminoácido 351 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE y un residuo de ácido glutámico (E) en la posición del aminoácido 368 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE, comprendiendo dicho método además la etapa de cultivar dicha célula huésped y permitir la expresión de dicha molécula en dos moléculas de ácido nucleico y recoger dicha molécula heterodimérica similar a Ig del cultivo.

En otra realización preferida, la treonina (T) está sustituida por lisina (K) en la posición 366 de un primer dominio CH3 y la leucina (L) está sustituida por lisina (K) en la posición 351 de dicho primer dominio CH3 y la leucina (L) está sustituida por ácido aspártico (D) en la posición 351 de un segundo dominio CH3 y la tirosina (Y) está sustituida por ácido aspártico (D) en la posición 349 de dicho segundo dominio CH3 y la arginina (R) está sustituida por ácido aspártico (D) en la posición 355 de dicho segundo dominio CH3. Esto se denota como mutación T366K, L351K/L351'D, Y349'D, R355'D. El par T366K-L351K/L351'D-Y349'D puede ser mejorado aún más por la mutación R355'D en la cadena B, lo que resulta en una mayor puntuación *in silico* de BB, pero también la puntuación de AB *in silico* es ligeramente más alta. Por lo tanto, también se proporciona un método para producir una molécula heterodimérica que comprende un dominio CH3 a partir de una sola célula, en donde dicha molécula comprende dos dominios CH3 de IgG humana que son capaces de formar una interfaz y en donde los homodímeros contaminantes son menos del 5%, más preferiblemente menos del 2%, incluso más preferiblemente menos del 1%, y lo más preferiblemente esencialmente ausentes, comprendiendo dicho método proporcionar en dicha célula:

- una primera molécula de ácido nucleico que codifica una primera cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 de IgG humana, y
- una segunda molécula de ácido nucleico que codifica una segunda cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 de IgG humana,

en donde dicha primera cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 comprende un residuo de lisina (K) en la posición del aminoácido 366 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE y un residuo de lisina (K) en la posición del aminoácido 351 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE, y en el que dicha segunda cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 comprende un residuo de ácido aspártico (D) en la posición del aminoácido 351 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE y un residuo de ácido aspártico (D) en la posición del aminoácido 349 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE y un residuo de ácido aspártico (D) en la posición del aminoácido 355 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE, comprendiendo dicho método además la etapa de cultivo de dicha célula huésped y permite la expresión de dicha molécula en dos moléculas de ácido nucleico y la recolección de dicha molécula heterodimérica similar a Ig del cultivo.

La Tabla B proporciona una visión general de las mutaciones que pueden introducirse en los dominios CH3 como medios preferidos para el emparejamiento preferencial para crear heterodímeros u homodímeros.

Tabla B:

Sustituciones de AA en CH3	Constructo #	Preferencialmente pares con
- (tipo silvestre)	-	Tipo silvestre
E356K, D399K	1	Constructo 2 o 3
K392D, K409D	2	Constructo 1
K392D, K409D, K439D	3	Constructo 1
K392D, D399K, K409D	4	Constructo 4
E356K, E357K, K439D, K370D	5	Constructo 5
T366W	6	Constructo 7
T366S, L368A, Y407V	7	Constructo 6
T366K	43	Constructo 63, 69, 70, 71, 73
L351D	63	Constructo 43, 68
T366K, L351K	68	Constructo 63, 69, 70, 71, 72, 75
L351D, L368E	69	Constructo 43, 68
L351E, Y349E	70	Constructo 43, 68
L351D, Y349E	71	Constructo 43, 68
L351D, R355D	72	Constructo 43, 68
L351D, Y349E, L368E	73	Constructo 43
L351D, Y349D, R355D	75	Constructo 68

Un método de acuerdo con la invención para producir una molécula heterodimérica similar a Ig, en donde dichos medios para el emparejamiento preferencial de dichos primer y segundo polipéptidos que comprenden un dominio CH3 comprenden al menos una combinación de mutaciones como se muestra en la Tabla B también se describe a continuación.

5

En un aspecto de la invención, se proporciona un método de acuerdo con la invención para producir una molécula heterodimérica que comprende un dominio CH3, en donde cada una de las cadenas polipeptídicas que comprenden un dominio CH3 comprende además una región variable que reconoce un epítipo objetivo diferente, en donde los epítipos objetivo están localizados en la misma molécula. Esto a menudo permite una neutralización más eficiente de la función (biológica) de dicha molécula objetivo en comparación con una situación en la que solo un epítipo es el objetivo. Por ejemplo, una molécula heterodimérica similar a Ig puede unirse simultáneamente a 2 epítipos presentes en, por ejemplo, receptores del factor de crecimiento o moléculas solubles críticas para que proliferen las células tumorales, bloqueando así efectivamente varias vías de señalización independientes que conducen a una proliferación incontrolada, y cualquier combinación de al menos dos moléculas similares a Ig pueden unirse simultáneamente a 2, o incluso a 3 o 4 epítipos presentes en dichos receptores del factor de crecimiento o moléculas solubles.

10

15

En una realización preferida, la molécula objetivo es una molécula soluble. En otra realización preferida, la molécula objetivo es una molécula unida a la membrana.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un método de acuerdo con la invención para producir una molécula heterodimérica que comprende un dominio CH3, en el que cada una de las cadenas polipeptídicas que comprenden un dominio CH3 comprende además una región variable que reconoce un epítipo objetivo, en el que los epítipos objetivo se localizan en diferentes moléculas. En este caso, cada una de las diferentes moléculas objetivo puede ser una molécula soluble o una molécula unida a la membrana. En una realización, las diferentes moléculas objetivo son moléculas solubles. Alternativamente, una molécula objetivo es una molécula soluble mientras que la segunda molécula objetivo es una molécula unida a la membrana. En otra alternativa más, ambas moléculas objetivo son moléculas unidas a la membrana. En una realización, las diferentes moléculas objetivo se expresan en las mismas células, mientras que en otras realizaciones las diferentes moléculas objetivo se expresan en diferentes células. Como

20

25

ejemplo no limitativo, cualquier molécula heterodimérica similar a Ig o cualquier combinación de al menos dos moléculas similares a Ig puede ser adecuada para bloquear simultáneamente múltiples receptores unidos a la membrana, neutralizando múltiples moléculas solubles tales como citoquinas o factores de crecimiento para células tumorales o para neutralizar diferentes serotipos virales o cepas virales.

- 5 Una realización preferida proporciona un método de acuerdo con la invención para producir una molécula heterodimérica que comprende un dominio CH3, en el que al menos uno de dichos epítomos objetivo está localizado en una célula tumoral. Alternativamente, o adicionalmente, al menos uno de dichos epítomos objetivo está situado en la superficie de una célula efectora. Esto es, por ejemplo, adecuado para el reclutamiento de células T o células NK para la destrucción de células tumorales. Por ejemplo, al menos una molécula similar a Ig se produce con un método de acuerdo con la invención que es capaz de reclutar células efectoras inmunes, preferiblemente células efectoras inmunes humanas, al unirse específicamente a una molécula objetivo localizada en células efectoras inmunes. En una realización adicional, dicha célula efectora inmune se activa tras la unión de la molécula similar a Ig a la molécula objetivo. El reclutamiento de mecanismos efectores puede, por ejemplo, abarcar la redirección de la citotoxicidad modulada inmune mediante la administración de una molécula similar a Ig producida por un método de acuerdo con la invención que es capaz de unirse a una molécula activadora citotóxica como el receptor de células T o un receptor Fc gamma, activando así las vías del efector inmune secuencia abajo. El término "célula efectora inmune" o "célula efectora" como se usa en el presente documento se refiere a una célula dentro del repertorio natural de células en el sistema inmune de los mamíferos que puede activarse para afectar la viabilidad de una célula objetivo. Las células efectoras inmunes incluyen células del linaje linfóide, tales como las células asesinas naturales (NK), las células T que incluyen las células T citotóxicas o las células B, pero también las células del linaje mielóide pueden considerarse células efectoras inmunes, tales como monocitos o macrófagos, células dendríticas y granulocitos neutrófilos. Por lo tanto, dicha célula efectora es preferiblemente una célula NK, una célula T, una célula B, un monocito, un macrófago, una célula dendrítica o un granulocito neutrófilo. Los antígenos objetivo presentes en las células efectoras inmunes pueden incluir CD3, CD16, CD25, CD28, CD64, CD89, NKG2D y NKp46. Por lo tanto, también se proporciona un método de acuerdo con la invención para producir una molécula heterodimérica que comprende un dominio CH3, en el que dicho epítomo objetivo está localizado en una molécula CD3, CD16, CD25, CD28, CD64, CD89, NKG2D o NKp46.

La viabilidad de una célula objetivo puede incluir la supervivencia celular, proliferación y/o la capacidad de interactuar con otras células.

- 30 En un aspecto, la presente invención proporciona por lo tanto, métodos de acuerdo con la invención para producir una molécula heterodimérica similar a Ig, en la que cada una de las cadenas polipeptídicas que comprenden un dominio CH3 comprende además una región variable que reconoce un epítomo objetivo. En una realización, cada una de las 2 regiones variables de las cadenas polipeptídicas que comprenden un dominio CH3 reconoce el mismo epítomo objetivo pero con afinidades diferentes. En otra realización, cada una de las 2 regiones variables de las cadenas polipeptídicas que comprenden un dominio CH3 reconoce un epítomo objetivo diferente. En otra realización, los diferentes epítomos objetivo están localizados en la misma molécula objetivo, que puede ser una molécula unida a la membrana o una molécula soluble. En otra realización, los diferentes epítomos objetivo están localizados en diferentes moléculas objetivo, que pueden expresarse en las mismas células o en diferentes células. Alternativamente, las diferentes moléculas objetivo pueden ser moléculas solubles, o una molécula objetivo puede ser una molécula soluble mientras que la segunda molécula objetivo es una molécula unida a la membrana. En una realización preferida, al menos una de las moléculas objetivo de la molécula heterodimérica similar a Ig está localizada en una célula tumoral. En otra realización preferida, al menos una de las moléculas objetivo de la molécula heterodimérica similar a Ig está localizada en una célula efectora (es decir, una célula NK, una célula T, una célula B, un monocito, un macrófago, una célula dendrítica o un granulocito neutrófilo, y dicho epítomo objetivo puede ubicarse en una molécula CD3, CD16, CD25, CD28, CD64, CD89, NKG2D o NKp46).

En una realización preferida, se proporciona un método de acuerdo con la invención para producir una molécula heterodimérica que comprende un dominio CH3, en el que dicha molécula que comprende un dominio CH3 es un anticuerpo del isotipo IgG, incluso más preferiblemente el isotipo IgG1, como se describió anteriormente en el presente documento.

- 50 Se proporciona además una molécula heterodimérica que comprende un dominio CH3 obtenible mediante un método de acuerdo con la presente invención. Dicha molécula heterodimérica que comprende un dominio CH3 comprende preferiblemente al menos una mutación de CH3 como se muestra en la Tabla B. También se proporciona una composición farmacéutica que comprende al menos una molécula que comprende un dominio CH3 de acuerdo con la presente invención. En una realización, dicha molécula es una molécula biespecífica, tal como un anticuerpo biespecífico. En otra realización, dicha molécula es una molécula monoespecífica, tal como un anticuerpo monoespecífico. Además, se proporciona una molécula heterodimérica que comprende un dominio CH3 obtenible mediante un método de acuerdo con la invención, en la que dicha molécula heterodimérica se une a diferentes epítomos en el mismo antígeno y/o a diferentes epítomos en diferentes antígenos. Las ventajas y los usos preferidos de tales anticuerpos se describieron anteriormente en el presente documento. Otra realización preferida más proporciona un anticuerpo heterodimérico que comprende dos dominios CH3 de IgG humana, en el que uno de dichos dos dominios CH3 comprende las sustituciones de aminoácidos L351D y L368E y en el que el otro de dichos dos dominios CH3 comprende las sustituciones de aminoácidos T366K y L351K. Estas sustituciones de aminoácidos son

medios preferidos para el emparejamiento preferencial de dichos dos dominios CH3, como se explicó anteriormente. Las sustituciones de aminoácidos L351D y L368E en uno de dichos dos dominios CH3 y las sustituciones de aminoácidos T366K y L351K en el otro de dichos dos dominios CH3 juntos se denominan la 'combinación de mutaciones DEKK', 'variante DEKK', 'par DEKK', 'dominios CH3 modificados por DEKK', 'DEKK' o nombres alternativos que se refieren a DEKK. El dominio CH3 que porta las sustituciones de aminoácidos L351D y L368E también se denomina 'el lado DE' y el dominio CH3 que porta las sustituciones de aminoácidos T366K y L351K también se denomina 'el lado KK'.

También se proporciona una composición farmacéutica que comprende una molécula heterodimérica que comprende un dominio CH3 obtenible mediante cualquier método de acuerdo con la invención. Dicha molécula heterodimérica que comprende un dominio CH3 es preferiblemente un anticuerpo. Dicha composición farmacéutica puede comprender dicha molécula heterodimérica que comprende un dominio CH3, una mezcla que comprende moléculas mono-específica o biespecífica que comprenden un dominio CH3, o una combinación de moléculas mono-específica o biespecífica que comprenden un dominio CH3. Además, una composición farmacéutica de acuerdo con la invención comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tal como se usa en el presente documento, dicho "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, sales, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retardo de la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. Dependiendo de la vía de administración (por ejemplo, por vía intravenosa, subcutánea, intraarticular y similares), las moléculas similares a Ig pueden recubrirse en un material para proteger las moléculas similares a Ig de la acción de los ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar las moléculas similares a Ig. Además, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una molécula heterodimérica que comprende un dominio CH3 obtenible mediante cualquier método de acuerdo con la invención, en la que dicha molécula heterodimérica se ha producido mediante células huésped recombinantes de acuerdo con la presente invención.

Una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 que comprende al menos una mutación como se describe en la Tabla B también se describe en el presente documento, así como una célula huésped recombinante que comprende al menos una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3, que comprende al menos una mutación como se muestra en la Tabla B.

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos. Estos ejemplos no limitan la invención de ninguna manera, sino que simplemente sirven para aclarar la invención.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: A) representación esquemática del vector del constructo MV1057. La región de relleno es la región en la que se clona una región VH del anticuerpo. B) Representación esquemática del vector de presentación en fagos MV1043.

Figura 2: secuencia de aminoácidos de Fc de IgG1 de tipo silvestre, como se presenta en el vector del constructo MV1057 (esquema de numeración de la UE aplicado).

Figura 3: secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las regiones VH utilizadas para la clonación en los diferentes constructos.

Figura 4: datos de espectros de masas de las transfecciones A, G y H.

Figura 5: datos de espectros de masas de las transfecciones M y U.

Figura 6: de espectros de masas de la transfección O.

Figura 7: prevención de homodimerización por sustitución de aminoácidos neutros por aminoácidos cargados.

Figura 8: Espectro nativo de MS de la muestra de transfección ZO (T366K/L351'D)(A) y Espectro complejo de MS de la muestra de transfección ZO (T366K/L351'D). El pico secundario/principal representa la molécula biespecífica (B).

Figura 9: puntuaciones de HADDOCK en pares de mutaciones verificados experimentalmente.

Figura 10: Dibujos animados de interacciones en la interfaz CH3-CH3; A) K409D:K392D/D399'K:E356'K, B) D399K: E356K/D399'K:E356'K, C) K409D:K392D/K409'D:K392'D

Figura 11: puntuaciones de HADDOCK para varios mutantes de carga 366/351'

Figura 12: Dibujos animados de interacciones en la interfaz CH3-CH3; A) L351D/L351'D, B) L351D:S354A: R355D/L351'D:S354'A:R355'D

Figura 13: puntuaciones de HADDOCK para mutaciones de carga adicionales alrededor de la posición L351

Figura 14: puntuaciones de HADDOCK para mutaciones de carga adicionales alrededor de la posición T366 en la cadena A y la posición L351 en la cadena B.

Figura 15: Dibujos animados de interacciones en la interfaz CH3-CH3

Figura 16: puntuaciones de HADDOCK para variantes alrededor de T366/L351

5 Figura 17: puntuaciones de HADDOCK para variantes adicionales alrededor de T366/L351

Figura 18: Ejemplos de espectros nMS para IgG biespecífica obtenida después de la coexpresión del constructo T366K,L351K ya sea con el constructo L351D (panel de la izquierda) o L351D,Y349E (panel de la derecha), ampliados en un solo estado de carga de la IgG completa (medios cuerpos no mostrados)

10 Figura 19: A) Resultados de MS nativa que muestran abundancias relativas de AA, AB, BB, A y B (el total de todas las especies es 100%); B) Igual, pero ahora sin AB para tener una mejor visión general de las especies no deseadas AA, BB, A y B

Figura 20: Resultados del ensayo de termoestabilidad. Cuadrados: tipo silvestre; triángulos: par de inversión de carga E356K:D399K/K392D:K409D; círculos: combinaciones de CH3 mutantes como se indica arriba de cada gráfica.

15 Figura 21: Resultados del experimento de congelación-descongelación 10x. 1122 = primer anticuerpo parental BB; 1337 = Segundo anticuerpo parental AA; tipo silvestre = AA, AB, BB; CR = biespecífico del par de inversión de carga E356K: D399K/K392D:K409D; 3-6 y 9-12 = moléculas biespecíficas de las combinaciones 3-6 y 9-12 de la Tabla 15.

20 Figura 22: Resultados en la estabilidad del suero, medidos por ELISA utilizando fibrinógeno como antígeno recubierto. A) Datos de ELISA con muestras de IgG diluidas a 0,5 µg/mL; B) Datos de ELISA con muestras de IgG diluidas a 0,05 µg/mL. Los resultados se normalizan al punto de tiempo T = 0 días (100%). 1337 = segundo anticuerpo parental AA; tipo silvestre = AA, AB, BB; CR = biespecífico del par de inversión de carga E356K:D399K/K392D:K409D; 3-6 y 9-12 = moléculas biespecíficas de las combinaciones 3-6 y 9-12 de la Tabla 15.

25 Figura 23: resultados de nMS de experimentos de relación con relaciones de transfección de 1:5 a 5:1. A) Combinación de mutaciones DEKK, con especificidad 'A' en el lado DE y 'B' en el lado KK; B) Combinación de mutaciones DEKK, con especificidad 'C' en el lado DE y 'B' en el lado KK; C) combinación de inversión de carga de mutaciones, con especificidad 'A' en el lado E356K:D399K y 'B' en el lado K392D:K409D.

Figura 24: resultados nMS de las transfecciones # 1-11 de la Tabla 20.

Figura 25: puntuaciones de HADDOCK para dímeros con diferentes vectores modificados CH3. Barras grises: especies deseadas AB y CD; barras negras: especies no deseadas AA, BB, CC, DD, AC, BC, AD, BD.

30 Figura 26: SDS-PAGE de las transfecciones # 1-11 de la Tabla 20. También se incluyen las muestras de control DE/KK, DE/DE y KK/KK.

Figura 27: nMS de las transfecciones # 9 (A) y # 11 (B).

Figura 28: nMS de muestras filtradas en gel 1516:1516 (A), 1337:1337 (B) y 1516:1337 (C).

Figura 29: niveles en suero de muestras de anticuerpos modificados por DEKK y sus dos anticuerpos parentales (estudio de pK).

35 Ejemplos

Ejemplo 1: sustituciones de aminoácidos para crear varios dominios CH3 diferentes

Para tener una amplia variedad de moléculas similares a Ig que difieren en sus dominios CH3, de manera que el emparejamiento del dominio CH3 que comprende moléculas similares a Ig se promueve o inhibe preferentemente, varias sustituciones de aminoácidos que se sabe que promueven la formación de heterodímeros, así como una serie de sustituciones alternativas de aminoácidos que no se informaron ni probaron previamente pero que se eligieron para promover la formación de homodímeros, se introdujeron en un constructo de vector (Vectores del constructo MV1057; Figura 1A). El vectores del constructo MV1057 comprende secuencias de ácido nucleico que codifican la parte normal de Fc de IgG1 de tipo silvestre, como se muestra en la Figura 2. La Tabla 1 enumera las sustituciones de aminoácidos que se introdujeron en este Fc de tipo silvestre, lo que dio como resultado una serie de siete constructos. Todos los constructos se elaboraron en Genart. Los constructos 1, 2 y 3, o alternativas de los mismos, se han descrito anteriormente para impulsar la heterodimerización (documentos EP01870459, WO2009/089004) como los constructos 6 y 7 (documento WO98/50431). Los constructos 4 y 5 son nuevos y están diseñados para promover la homodimerización.

Tabla 1

Sustituciones de AA en CH3	Constructo #	Emparejado con	% producto biespecifico reportado
- (tipo silvestre)	-	- (tipo silvestre)	~ 50%
E356K, D399K	1	Constructo 2 o 3	~ 100%
K392D, K409D	2	Constructo 1	~ 100%
K392D, K409D, K439D	3	Constructo 1	~ 100%
K392D, D399K, K409D	4	Constructo 4	
E356K, E357K, K439D, K370D	5	Constructo 5	
T366W	6	Constructo 7	~86,7%
T366S, L368A, Y407V	7	Constructo 6	~86,7%

Ejemplo 2: clonación de VH en constructos con mutaciones CH3

Se usaron varias regiones VH de anticuerpo con especificidades conocidas y capacidad conocida para emparejarse con la cadena ligera IGKV1-39 humana para la clonación en estos constructos. Como se indicó anteriormente, todas las variantes de CH3 se pueden usar en asociación con otros dominios de anticuerpos para generar anticuerpos de longitud completa que sean biespecíficos o monoespecíficos. La especificidad del anticuerpo como se define en las combinaciones VH/VL no afectará el comportamiento de dimerización de la cadena pesada que es impulsado por los dominios CH3. Las combinaciones modelo VH/VL se utilizaron a lo largo de los estudios, en donde todas las VL se basan en la línea germinal IGKV1-39 humana y las VH varían. La Figura 3 proporciona secuencias completas y especificidades de las regiones VH del anticuerpo utilizadas a lo largo de los estudios. La codificación MF se refiere a la designación interna de Merus para varias VH, por ejemplo, VH MF1337 tiene especificidad por el toxoide tetánico, MF1025 para tiroglobulina porcina, MF1122 para fibrinógeno bovino. Las regiones VH presentes en el vector de presentación en fagos MV1043 (Figura 1B) se digieren con las enzimas de restricción Sfil y BstEII (New England Biolabs/cat # R0123L y R0162L/de acuerdo con las instrucciones del fabricante) que liberan el fragmento VH de este vector. El vector MV1057 se digiere con Sfil y BstEII de acuerdo con los procedimientos estándar (de acuerdo con las instrucciones del fabricante). Los fragmentos y el vector se purifican sobre gel (Promega/cat # V3125/de acuerdo con las instrucciones del fabricante) para aislar el vector de corte y los insertos del gen VH. Ambos se combinan mediante ligación, después de lo cual la ligación se transforma en DH5 α de *E. coli* (Invitrogen/cat # 12297-016/de acuerdo con las instrucciones del fabricante). Después de selección durante la noche, se seleccionaron colonias individuales y los vectores con un inserto correcto identificado por secuenciación.

Ejemplo 3: transfección y expresión de IgG completa en células HEK293T

La transfección de los diversos plásmidos que codifican las variantes de VH nuevamente clonadas, y que codifica adicionalmente la cadena ligera común huIGKV1-39, en células HEK293T se realizó de acuerdo con procedimientos estándar de tal manera que IgG podría expresarse (de Kruij et al. Biotech Bioeng. 2010). Después de la transfección, los niveles de expresión de IgG en sobrenadantes se midieron utilizando el sistema ForteBIO Octet-QK, que se basa en la interferometría de biocapa (BLI) y que permite la cuantificación en tiempo real y la caracterización cinética de las interacciones biomoleculares; para más detalles véase www.fortebio.com. Cuando se midieron niveles de expresión superiores a 5 μ g/mL, la IgG se purificó utilizando purificación por afinidad con Proteína A.

Ejemplo 4: purificación de IgG

Los sobrenadantes de cultivo se purificaron utilizando columnas de proteína A (GE Healthcare/cat # 11-0034-95/de acuerdo con las instrucciones del fabricante) y se eluyeron en regulador de citrato 0,1 M, pH 3,0, y se neutralizaron inmediatamente en un volumen igual de Tris-HCl 1,0 M pH 8,0 o se regulan nuevamente directamente con PBS usando una columna de desalinización. Alternativamente, se podría purificar la IgG utilizando perlas de proteína A (perlas de sefarosa CL-4B, GE Healthcare cat # 170780-01)

Ejemplo 5: ELISA específicos de Ag

Se realizaron ELISA específicos de antígeno para establecer la actividad de unión contra los antígenos y se llevaron a cabo ELISA de captura para demostrar la actividad de unión de los anticuerpos biespecíficos. El segundo antígeno biotinilado se usó para la detección del complejo (de Kruij et al., Biotech Bioeng. 2010)

Ejemplo 6: SDS-PAGE

Las mezclas de IgG purificadas se analizaron por SDS-PAGE (NuPAGE® 4-12% bis-tris gel/Invitrogen/cat # NP0323BOX) en condiciones reducidas y no reductoras de acuerdo con los procedimientos estándar, y la tinción de proteínas en gel fue llevado a cabo con azul coloidal (solución de tinción de proteínas PageBlue^{MR}/Fermentas/cat # RO571).

5 Ejemplo 7: desglucosilación enzimática de IgG1

Como existe heterogeneidad en la glicosilación de las IgG, las proteínas se desglucosilaron para crear un producto único con una masa distinta, adecuado para el análisis espectrométrico de masas. Se incubó una unidad de N-glicosidasa F (PNGasa F; Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) por 10 µg de IgG1, durante la noche a 37 °C. Se realizó un intercambio de regulador utilizando columnas de filtro centrífugo MWCO de 10 kDa (Millipore) para eliminar el regulador de purificación original (regulador de citrato 0,1 M pH 3,0/Tris-HCl 1,0 M pH 8,0) y para regular nuevamente con PBS. Se realizaron procedimientos de intercambio de regulador similares para eliminar las cadenas de glicano desprendidas y para cambiar el regulador a acetato de amonio 150 mM, pH 7,5. Los filtros se lavaron con 200 µL de acetato de amonio 150 mM, pH 7,5, durante 12 minutos a 11.000 rpm y 4 °C. Después del lavado, se cargaron 50 µL de IgG desglucosilada en el filtro y se agregaron 450 µL de acetato de amonio 150 mM, pH 7,5, seguido de otra ronda de centrifugación de 12 minutos a 11.000 rpm a 4 °C. En total, la centrifugación se repitió 5 veces, cada vez que se añadió un regulador de acetato de amonio 150 mM nuevo a pH 7,5 hasta un volumen total de 500 µL. Después de la última etapa de centrifugación, el regulador restante intercambiado con IgG1 desglucosilado, aproximadamente 25 µL, se recogió y se transfirió a un tubo eppendorf, listo para el análisis espectrométrico de masas.

Ejemplo 8: Análisis espectrométrico de masas nativo

20 Se usó la espectrometría de masas para identificar las diferentes especies de IgG en las mezclas de IgG purificadas y para establecer en qué relaciones están presentes estas especies de IgG. Brevemente, se cargaron 2-3 µL a una concentración de 1 µM en acetato de amonio 150 mM, pH 7,5 de IgG, en capilares de borosilicato chapados en oro fabricados internamente (utilizando un extractor Sutter P-97 [Sutter Instruments Co., Novato, CA, EE. UU.] y un recubridor de 6 por emisión catódica Edwards Scancoat [Edwards Laboratories, Milpitas, CA, EE. UU.]) para el análisis en un espectrómetro de masas LCT 1 (Waters Corp., Milford, MA, EE. UU.), ajustado para un rendimiento óptimo en alta detección de masa (Tahallah et al., RCM 2001). Se utilizó un voltaje capilar de 1300 V y un voltaje de cono de muestreo de 200 V; sin embargo, estos ajustes se realizaron cuando se requería una resolución más alta de la relación 'señal a ruido'. La presión de respaldo de la fuente se elevó para promover el enfriamiento por colisión a aproximadamente 7,5 mbar. Para medir las IgG1 en condiciones de desnaturalización, las proteínas se atomizaron a una concentración de 1 µM en ácido fórmico al 5%.

Ejemplo 9: Procesamiento y cuantificación de datos.

El procesamiento de los espectros adquiridos se realizó utilizando el software MassLynx 4.1 (Waters Corp., Milford, MA, EE. UU.). Se utilizó un suavizado mínimo, después de lo cual los espectros se centraron. La masa de la especie se calculó utilizando cada estado de carga en una serie. Las intensidades correspondientes de cada estado de carga fueron asignadas por MassLynx y sumadas. Este enfoque permitió la cuantificación relativa de todas las especies en una muestra. Alternativamente, la cuantificación de los picos se puede realizar utilizando métodos de área bajo la curva (AUC), conocidos en la técnica. Todos los análisis se repitieron tres veces para calcular las desviaciones estándar de las masas de las IgG y su abundancia relativa.

Ejemplo 10: mezclas de 2 o 3 anticuerpos monoespecíficos de una sola célula

40 Se usaron varias regiones VH del anticuerpo con especificidades conocidas y capacidad conocida para emparejarse con la cadena ligera IGKV1-39 humana (Figura 3) para la nueva clonación en los vectores del constructo de tipo silvestre MV1057, o en el constructo 4 o constructo 5 de la Tabla 1, resultando en los vectores I-III (Tabla 2). Los vectores resultantes I, II y III, cada uno de los cuales contiene secuencias de ácido nucleico que codifican la cadena ligera humana común, así como una cadena pesada de Ig con diferente región CH3 y diferente especificidad de VH, se transfectaron posteriormente en las células, ya sea solas para demostrar la formación de anticuerpos monoespecíficos intactos solamente, o en combinación con uno o dos vectores del constructo diferentes para obtener mezclas de dos o tres anticuerpos monoespecíficos. La Tabla 3 muestra el cronograma de transfección y los resultados.

Tabla 2: Especificidad de VH insertada en diferentes constructos

Vector	Gen de VH	Especificidad del antígeno	Masa de VH (Da)	Designación de Merus	Clonado en el constructo #
I	IGHV 1.08	Tétanos (A)	13703	MF1337	tipo silvestre
II	IGHV 3.23	Tiroglobulina (B)	12472	MF1025	4
III	IGHV 3.30	Fibrinógeno (C)	12794	MF1122	5

Tabla 3: Cronograma de transfección y resultados

# de monoespecíficos producidos	Transfección de	Código y relación de transfección	Especies esperadas	Masa calculada de 2LYS	Masa experimental	AA encontrado (%)	BB encontrado (%)	CC encontrado (%)	Otras moléculas (%)
1	Solo vector I	A	AA	146521	146503	100			
1	Solo vector II	G	BB	144032	144087		100		
1	Solo vector III	H	CC	144647	144656			100	
2	Vector I y II	M (I:II=1:1)	AA BB	146521 144032	146518 144030	51	45		4
2	Vector I y III	N (I:III=1:1)	AA CC	146521 144647	146509 144633	88		9	3
		U (I:III= 1:5)	AA CC	146521 144647	146522 144643	47		48	5
2	Vector II y III	nd	BB CC						
3	Vector I, II y III	O (I:II:III=1: 1:1)	AA BB CC	146521 144032 144647	146525 144032 144650	66	4	30	
		V (I:II:III=1: 1:10)	AA BB CC	146521 144032 144647	146531 144043 144654	8	81	9	2
nd: no realizado									

Se observó que las transfecciones A, G y H dieron lugar a la formación de homodímeros solamente, y se recuperó el 100% de AA, BB o CC mono-específicos bivalentes de las células transfectadas con uno cualquiera de los vectores I, II o III (Figura 4). Aunque esto era de esperar y demostrarse previamente para la transfección A, en realidad ahora se muestra por primera vez que la homodimerización de las cadenas pesadas de Ig modificadas por CH3 que contienen la sustitución triple de aminoácido del constructo 4 (es decir, K392D, D399K, K409D) o la sustitución cuádruple de aminoácidos del constructo 5 (es decir, E356K, E357K, K439D, K370D) se reporta (transfecciones G y H).

A continuación, se realizaron experimentos de coexpresión de dos vectores en una sola célula. Curiosamente, las transfecciones M y N muestran que las cadenas pesadas de Ig de tipo silvestre y con modificación de CH3 pueden expresarse conjuntamente en una sola célula junto con una cadena ligera común que produce mezclas de dos especies de anticuerpos mono-específicos sin la presencia de anticuerpos biespecíficos no deseados y con tan poco como 4-5% de "otras moléculas" contaminantes presentes en la mezcla. "Otras moléculas" se define como todas las moléculas que no tienen la masa de una IgG intacta, e incluye la mitad de las moléculas que consisten en un solo par de cadenas pesada y ligera. Es importante destacar que la fracción 'otra' no incluye el producto biespecífico. En la transfección M, la relación de AA:BB era cercana a 1:1 luego de la transfección de relaciones iguales de ADN del vector. Sin embargo, la transfección de N dio como resultado una relación de casi 10:1 de AA:CC. Por lo tanto, esta transfección se repitió con relaciones ajustadas de ADN (transfección U). De hecho, una relación 1:5 del vector ADN I:III igualó la relación del producto de anticuerpo AA:CC en la mezcla hacia una relación de casi 1:1. Por lo tanto, las transfecciones M y U muestran que es posible expresar dos anticuerpos mono-específicos diferentes, esencialmente puros en una sola célula, sin productos no deseados (es decir, sin presencia abundante de AC o medias moléculas A o C) (Figura 5). Las nuevas modificaciones de CH3 de los constructos 4 y 5 difieren sustancialmente de CH3 de tipo silvestre, de modo que no se produce una heterodimerización entre tipo silvestre y 4, o tipo silvestre y 5, lo que es ventajoso para la aplicación a gran escala de mezclas de anticuerpos mono-específicos de células individuales.

De manera análoga a estos resultados, también se espera que la transfección de dos cadenas pesadas de Ig diferentes con modificación de CH3 (constructos 4 y 5) dé como resultado mezclas de dos anticuerpos mono-específicos diferentes únicamente, sin la presencia de otras especies no deseadas. Se razonó que las modificaciones de CH3 del constructo 4 difieren sustancialmente de las modificaciones de CH3 de los constructos 5, de modo que no se produce la heterodimerización. En ese caso, la coexpresión de las cadenas pesadas con modificación de CH3 de los constructos 4 y 5, junto con las cadenas pesadas de CH3 de tipo silvestre en una sola célula daría como resultado 3 anticuerpos mono-específicos solamente.

De hecho, se observó que este era el caso, ya que se encontró que también se podía obtener una mezcla de tres anticuerpos mono-específicos puros mediante la expresión de tres cadenas pesadas diferentes de Ig, diseñadas para formar homodímeros sobre heterodímeros, junto con una cadena ligera común en una sola célula, sin contaminaciones presentes en la mezcla (transfección O) (Figura 6). Como se desprende de la Tabla 3, con relaciones iguales de ADN del vector utilizado durante la transfección O, no se obtuvo una relación 1:1:1 de anticuerpos AA:BB:CC. Las transfecciones con relaciones de ADN del vector alteradas (1:1:10, transfección V) demostraron que las relaciones de AA:BB:CC en las mezclas pueden dirigirse hacia las relaciones deseadas. En conjunto, estos experimentos muestran que dos o tres anticuerpos mono-específicos esencialmente puros pueden expresarse en una sola célula sin subproductos no deseados, ofreciendo ventajas para la producción a gran escala de mezclas de anticuerpos terapéuticos mono-específicos.

Ejemplo 11: Mezclas de 2 anticuerpos biespecíficos de una sola célula

Mientras que el uso de cadenas pesadas con modificación de CH3 para la producción de anticuerpos biespecíficos individuales se ha informado en otra parte, este experimento fue diseñado para investigar si es posible producir mezclas de 2 anticuerpos biespecíficos diferentes a partir de una sola célula.

Se usaron regiones VH del anticuerpo con especificidades conocidas y capacidad conocida para emparejarse con la cadena ligera humana IGKV1-39 (Figura 3) para clonar nuevamente en vectores que contienen los constructos 1-3 o 6-7 de la Tabla 1 dando como resultado los vectores IV-X (tabla 4). Los vectores IV-X, cada uno de los cuales contenía secuencias de ácido nucleico que codifican la cadena ligera humana común, así como una cadena pesada de Ig con diferente región CH3 y diferente especificidad de VH, se transfectaron posteriormente en las células, ya sea solo para demostrar que la formación de anticuerpos mono-específicos intactos se vio obstaculizada, o en combinación con otro vector del constructo para obtener anticuerpos biespecíficos o mezclas de dos anticuerpos biespecíficos. La Tabla 5 muestra el cronograma de transfección y los resultados.

Tabla 4: Especificidad de VH insertada en diferentes constructos

Vector	Gen de VH	Especificidad del antígeno	Masa de VH (Da)	Clonado en el constructo #
IV	IGHV 3.23	Tiroglobulina (B)	12472	1
V	IGHV 3.30	Fibrinógeno (C)	12794	2

ES 2 740 749 T3

VI	IGHV 1.08	Tétanos (A)	13703	2
VII	IGHV 3.30	Fibrinógeno (C)	12794	3
VIII	IGHV 1.08	Tétanos (A)	13703	3
IX	IGHV 1.08	Tétanos (A)	13703	6
X	IGHV 3.23	Tiroglobulina (B)	12472	7

Tabla 5

# de biespecíficos producidos	Transfección de	Código y relación de transfección	Especie esperada	Masa calculada - 2LYS	Masa experimental	Medias moléculas encontradas (%)	IgG completa encontrada (%)	Biespecífico encontrado (%)	Otras moléculas (%)
0	Vector IV	B	B	144082	144066	40	60		
0	Vector V	C	C	144651	144622	77	23		
0	Vector VI	D	A	146469	146459	23	77		
0	Vector VII	E	C	144625	144643	76	24		
0	Vector VIII	F	A	146443	146468	64	36		
0	Vector IX	P	A	146691	146677	82	18		
0	Vector X	Q	B	143818	143844	58	42		
1	Vector IV y V	I(1:1)	BC	144367	144352			96	4
1	Vector IV y VII	J(1:1)	BC	144354	144382			96	4
2	Vector IV, V y VI	K(1:1:1)	BC + AB	144367 + 145276	144351 + 145260			38 + 47	15 (A + C)
		S(2:1:1)	BC + AB	144367 + 145276	144371 + 145277			42 + 55	3 (BB)
2	Vector IV, VII y VIII	L(1:1:1)	BC + AB	144354 + 145263	144346 + 145255			16 + 60	24 (A + C)
		T(2:1:1)	BC + AB	144354 + 145263	144385 + 145292			58 + 39	3 (BB)

Anteriormente, se demostró que las cadenas pesadas de Ig con modificación de CH3 codificadas por los constructos 1 y 2 todavía pueden formar homodímeros cuando se expresan solas en células individuales (documento WO2009/089004). Sin embargo, el documento WO2009/089004 informa además que los dominios CH3 que son modificados para comprender mutaciones de pares de carga triple, tales como los presentes en el constructo 3, ya no son capaces de formar homodímeros cuando se expresan solos.

En el presente estudio, estos hallazgos se confirmaron solo en parte. De hecho, los resultados de las transfecciones B, C y D demostraron la presencia de IgG completas, además de una alta relación de medias moléculas no pareadas, lo que demuestra cierta homodimerización de los dominios CH3 codificados por los constructos 1 y 2. Las transfecciones E y F también dieron como resultado la producción de IgG completas además de medias moléculas no pareadas, lo que demuestra que las mutaciones de triple carga del constructo 3 no impiden completamente la homodimerización.

Además, se demostró que también las variantes CH3 de 'botón' y 'ojal' de los constructos 6 y 7 forman homodímeros (18% de homodímeros para 'botón-botón' y 42% de homodímeros para 'ojal-ojal').

Se prefieren las variantes de CH3 que evitan totalmente la homodimerización cuando se expresan solas, para prevenir o minimizar los subproductos no deseados (homodímeros) tras la coexpresión con una segunda variante de CH3 para la heterodimerización.

De manera interesante, los experimentos presentes demuestran por primera vez que también pueden expresarse mezclas de anticuerpos biespecíficos en células individuales sin virtualmente homodímeros en la mezcla. Las transfecciones K y L muestran claramente que las especies biespecíficas esperadas BC + AB se obtienen efectivamente (38% + 47% en transfección K, y 16% + 60% en transfección L). En ambas transfecciones se observó un porcentaje relativamente alto de medias moléculas no deseadas (15% de media molécula A + media molécula C en transfección K y 24% de media molécula A + media molécula C en transfección L). El porcentaje relativamente alto de la mitad de las moléculas todavía presentes se atribuyó a bajas cantidades de cadenas pesadas coincidentes del vector IV debido a la expresión desequilibrada de cadenas pesadas en un par emparejado. Por lo tanto, las transfecciones se repitieron con una relación ajustada de vector de ADN, 2:1:1, en las transfecciones S y T. Esto dio lugar a cantidades iguales de cadenas pesadas de IgG que constituyen un par pareado y mezclas puras de IgG biespecifica sin la presencia de la mitad de moléculas de IgG y con tan poco como 3% de BB homodimérico presente. Idealmente, esta baja relación de producto monoespecífico contaminante debería reducirse a prácticamente cero. Por lo tanto, se desea encontrar mutantes de CH3 adicionales que darían como resultado mezclas de anticuerpos biespecíficos con presencia mínima de anticuerpos monoespecíficos contaminantes.

El presente estudio demuestra por primera vez que pueden producirse mezclas esencialmente puras de dos anticuerpos biespecíficos que reconocen 3 epítomos objetivo diferentes en una sola célula, con una presencia mínima de anticuerpos monoespecíficos en la mezcla.

Ejemplo 12: variedades de mezclas

Como se demostró que la producción de mezclas de 2 anticuerpos biespecíficos que reconocen 3 epítomos de una sola célula, o la producción de mezclas de 2 o 3 anticuerpos monoespecíficos de una sola célula es técnicamente factible, a continuación se exploró la posibilidad de producción controlada de una variedad de otras mezclas. Se utilizará una cuarta región VH del anticuerpo con una especificidad conocida y una capacidad conocida para emparejarse con la cadena ligera IGKV1-39 humana para la nueva clonación en vectores que contienen los constructos 1-3 o 7 de la Tabla 1, lo que da como resultado los vectores I', II', III' o X '(la ' que indica una especificidad diferente en comparación con los números de vector correspondientes). Los vectores resultantes I'-III', X' y IV-IX, cada uno de los cuales contiene secuencias de ácido nucleico que codifican la cadena ligera humana común, así como una cadena pesada de Ig con diferente región CH3 y diferente especificidad VH, se transfectarán posteriormente en las células, en combinación con otros vectores de constructo para obtener una variedad de mezclas de anticuerpos biespecíficos y/o monoespecíficos. La variedad de mezclas que se obtendrán incluyen mezclas de 2 anticuerpos biespecíficos que reconocen 4 epítomos, 2 anticuerpos biespecíficos y un anticuerpo monoespecífico, o mezclas de 1 anticuerpo biespecífico y uno monoespecífico de una sola célula. La Tabla 6 muestra el cronograma de transfección y los resultados esperados.

Tabla 6

Variedad de la mezcla	Transfección de	Código y relación de transfección	Especies esperadas	% Esperado de IgG monoespecífica	% Esperado biespecífico
2 BsAbs, 4 epítomos	IV+V+IX+ X'	ZA (1:1:1:1)	BC + AD	0	50 + 50
2 BsAbs, 4 epítomos	IV+VII+IX +X'	ZB (1:1:1:1)	BC + AD	0	50 + 50
2 bsAbs + 1 mAb	IV+V+VI+ wt'	ZC (2:1:1:2)	BC + AB + DD	33	33 + 33

ES 2 740 749 T3

2 bsAbs + 1 mAb	IV+V+VI+ II'	ZD (2:1:1:2)	BC + AB + DD	33	33 + 33
2 bsAbs + 1 mAb	IV+V+VI+ III'	ZE (2:1:1:2)	BC + AB + DD	33	33 + 33
1 bsAb + 1 mAb	IV+V+wt'	ZF (1:1:2)	BC + DD	50	50
1 bsAb + 1 mAb	IV+V+II'	ZG(1:1:2)	BC + DD	50	50
1 bsAb + 1 mAb	IV+V+III'	ZH(1:1:2)	BC + DD	50	50
1 bsAb + 1 mAb	IV+VII+wt'	ZI (1:1:2)	BC + DD	50	50
1 bsAb + 1 mAb	IV+VII+II'	ZJ (1:1:2)	BC + DD	50	50
1 bsAb + 1 mAb	IV+VII+III'	ZK (1:1:2)	BC + DD	50	50
1 bsAb + 1 mAb	IX+X+wt'	ZL (1:1:2)	AB + DD	50	50
1 bsAb + 1 mAb	IX+X+II'	ZM (1:1:2)	AB + DD	50	50
1 bsAb + 1 mAb	IX+X+III'	ZN (1:1:2)	AB + DD	50	50

Aunque, en teoría, la producción de todas las mezclas debería ser factible, se sabe por el trabajo anterior de otros que la producción a gran escala de variantes clásicas de botón en ojal se ve obstaculizada por problemas de inestabilidad. Por lo tanto, se espera que las mezclas resultantes de las transfecciones ZA, ZB, ZL, ZM y ZN se vuelvan problemáticas cuando se transfieran a una producción a mayor escala.

5

Por lo tanto, el conjunto actual de constructos presentes en la Tabla 1 no permitiría la producción de todas las mezclas teóricas a partir de células individuales a mayor escala, ya que se informa que las variantes de botón en ojal son inestables, y no se puede excluir que los dominios CH3 que comprenden un 'botón' o un 'ojal' se dimerizarán con variantes de carga o dominios CH3 de tipo silvestre. Por lo tanto, se desea diseñar nuevas variantes de CH3 que se modifiquen para formar preferentemente homodímeros o heterodímeros solamente y que no se homo o heterodimericen con los constructos 1 a 5 de la Tabla 1 para permitir la coexpresión en células individuales.

10

Ejemplo 13: identificación de nuevos mutantes de par de carga

El objetivo de este estudio fue modificar la región CH3 de IgG para dar lugar a la producción de solo heterodímeros o solo homodímeros tras la expresión mixta de diferentes cadenas pesadas de IgG en una sola célula, en donde los nuevos dominios CH3 modificados no homodimerizarán o heterodimerizarán con dominios CH3 modificados conocidos, o con dominios CH3 de tipo silvestre. Por lo tanto, como primer etapa en la identificación de nuevos dominios CH3 modificados que cumplirían los criterios, muchos residuos de contacto de interfaz en el dominio CH3 de IgG se escanearon uno por uno o en grupos en busca de sustituciones que resultarían en la repulsión de cadenas pesadas idénticas, es decir, formación reducidas de homodímeros a través de interacciones electrostáticas. El objetivo era obtener una lista de residuos que, cuando están sustituidos por un residuo cargado, darían lugar a la repulsión de cadenas idénticas, de modo que estas mutaciones se puedan usar para impulsar la formación de homo y/o heterodímeros tras la expresión mixta de diferentes cadenas pesadas de IgG, por lo que las IgG de longitud completa obtenidas son estables y se producen con altas proporciones. En un seguimiento, las sustituciones identificadas se utilizarán para generar anticuerpos biespecíficos o mezclas de anticuerpos biespecíficos o monoespecíficos mediante la modificación de pares emparejados de residuos de CH3 en una o más cadenas pesadas de IgG - regiones CH3. Además, los pares de mutantes de carga recientemente identificados pueden combinarse con los pares existentes, de modo que múltiples moléculas de ácido nucleico que codifican diferentes cadenas pesadas, todas con mutaciones de CH3 diferentes y complementarias, se pueden usar para la expresión en células de manera que solo mezclas de anticuerpos monoespecíficos, o anticuerpos biespecíficos de modo que se pueden obtener preferencialmente mezclas de solamente anticuerpos monoespecíficos o solamente anticuerpos biespecíficos definidos, o mezclas de anticuerpos. Los residuos que se prueban en el presente estudio son residuos de contacto como se identificó previamente (Deisenhofer J., 1981; Miller S., 1990; Padlan, 1996, Gunasekaran, 2010). El fundamento de este enfoque es que las cargas repulsivas se modifican en cada par disponible de residuos de contacto. Las muestras se analizan posteriormente en SDS-PAGE no reductor para identificar pares en los que se reduce la formación de dímeros, como se visualiza por la presencia de bandas de aproximadamente 72 kD. Todos los pares disponibles se seleccionarán como mutaciones individuales o en combinación con otra mutación individual, ya que la interacción electrostática repulsiva entre un par no coincidente puede o no ser suficiente para dar lugar a cantidades suficientes de medias moléculas para su detección por este método, las mutaciones también se combinan.

15

20

25

30

35

Las sustituciones de aminoácidos se introdujeron en el vector del constructo MV1057 por Geneart de acuerdo con la Tabla 7 y la expresión de los constructos se realizó por transfección en células HEK293T, de acuerdo con los

40

ES 2 740 749 T3

procedimientos estándar. Los niveles de expresión de IgG se midieron en el sistema Octet. Cuando la producción falló dos veces, la mutación se consideró perjudicial para la expresión y la mutación no se continuó.

Tabla 7: Lista de sustituciones de aminoácidos en los diversos constructos que se realizaron (numeración de la UE)

Sustituciones de AA en CH3	constructo #	Efecto sobre la formación de homodímeros (- = sin efecto; +++ = inhibición máx.; NT= no se probó en gel)
Q347K	8	-
Y349D	9	+-
Y349K	10	+-
T350K	11	-
T350K, S354K	12	+-
L351K, S354K	13	+-
L351K, T366K	14	++
L351K, P352K	15	+-
L351K, P353K	16	++
S354K, Y349K	17	++
D356K	18	-
E357K	19	-
S364K	20	++
T366K, L351K	21	++
T366K, Y407K	22	+++
L368K	23	NT
L368K, S364K	24	++
N390K, S400K	25	+-
T394K, V397K	26	+
T394K, F405K	27	+++
T394K, Y407K	28	+++
P395K, V397K	29	+-
S400K	30	-
F405K	31	+++
Y407K	32	++
Q347K, V397K, T394K	33	+
Y349D, P395K, V397K	34	+
T350K, T394K,	35	NT
V397K		

ES 2 740 749 T3

L351K, S354K, S400K	36	+
S354K, Y349K, Y407K	37	+/-
T350K, N390K, S400K	38	+/-
L368K, F405K	39	++
D356K, T366K, L351K	40	+++
Q347K, S364K	41	+++
L368D, Y407F	42	+
T366K	43	+
L351K, S354K, T366K	44	+
Y349D, Y407D	45	+
Y349D, S364K, Y407D	46	+
Y349D, S364K, S400K, T407D	47	+
D399K	48	+/-
D399R	49	+/-
D399H	50	+/-
K392D	51	+/-
K392E	52	+/-
K409D	53	+

5 Los sobrenadantes que contenían $\geq 5 \mu\text{g/mL}$ de IgG se analizaron en SDS-PAGE y la IgG se purificó usando proteína A. Las proteínas se tiñeron usando azul coloidal. Los homodímeros eran visibles como una banda de aproximadamente 150 kD. Bandas más pequeñas de aproximadamente 75 kD representaron la presencia de medias moléculas (véase el control negativo: K392D, K409D). Las transferencias se muestran en la Figura 7.

10 Los resultados de los geles SDS-PAGE se analizaron y puntuaron como se presenta en la Tabla 7, columna de la derecha. Varios residuos se consideraron prometedores para pruebas adicionales en combinación, incluidos los residuos Q347, S354, Y349, L351, K360, T366, T394 y V397. La elección se basó en puntuaciones altas en la inhibición de la formación de homodímeros combinada con la disponibilidad de residuos de contacto que se pueden modificar sin tener que enfrentar problemas como otras cargas no complementarias. Por ejemplo, se sabe que los residuos F405 e Y407 tienen múltiples interacciones en la interfaz CH3-CH3, incluidas las interacciones con residuos que ya están cargados, lo que puede ser problemático después de la introducción de múltiples mutaciones de carga entre estos residuos que interactúan (véase la Tabla A). Se hicieron nuevos constructos en el vector MV1057 (Tabla 8), y se usaron regiones VH de anticuerpo con especificidades conocidas y capacidad conocida para emparejarse con la cadena ligera IGKV1-39 humana para volver a clonarse en vectores que contienen estos nuevos constructos (véase la Tabla 9) de manera que podrían probarse además esas combinaciones. La tabla 10 muestra los cronogramas y resultados de la transfección.

Tabla 8:

Sustituciones de AA en CH3	constructo #
L351K	61
T394K	62
L351D	63

ES 2 740 749 T3

T366D	64
S354D, Y349D	65
V397D	66
K360D	67

Tabla 9: Especificidad de VH insertada en diferentes constructos

Vector	Gen de VH	Especificidad del antígeno	Masa de VH (Da)	Clonado en el constructo #
XI	IGHV 1.08	Tétanos (A)	13703	8
XII	IGHV 1.08	Tétanos (A)	13703	17
XIII	IGHV 1.08	Tétanos (A)	13703	43
XIV	IGHV 1.08	Tétanos (A)	13703	61
XV	IGHV 1.08	Tétanos (A)	13703	62
XVI	IGHV 3.30	Fibrinógeno (C)	12794	63
XVII	IGHV 3.30	Fibrinógeno (C)	12794	64
XVIII	IGHV 3.30	Fibrinógeno (C)	12794	65
XIX	IGHV 3.30	Fibrinógeno (C)	12794	66
XX	IGHV 3.30	Fibrinógeno (C)	12794	67

Tabla 10:

Transfección de	Código de transfección (relación)	Especie esperada	AA encontrado (%)	AC encontrado (%)	CC encontrado (%)	Media A encontrada (%)	Media C encontrada (%)	otras (%)
XIII + XVI	ZO (1:1)	AC	0	69	7	24	0	0
	ZT (3:1)	AC	10	45	16	27	0	0
	ZU (1:1)	AC	5	61	10	13	0	0
	ZV (1:3)	AC	3	61	23	13	0	0
	ZW (1:1)	AC	0	88,3	2,4	7	0	2,3
XIV + XVII	ZP	AC	30	52	13	0	0	5
XII + XVIII	ZQ	AC	4	51	33	2	1	8
XV + XIX	ZR	AC	20	42	11	0	1	26
XI+XX	zs	AC	34	41	15	0	0	10

5

Se expresaron combinaciones de variantes de CH3 y se analizaron en SDS-PAGE (datos no mostrados) y en espectrometría de masas nativa (MS). Los resultados se resumen en la Tabla 10. La transfección de ZO dio como resultado la mayor relación de heterodímeros en las mezclas (69% de AC). Curiosamente, en la transfección de ZO,

el homodímero AA no estaba presente, mientras que el homodímero CC comprendía una pequeña proporción (7%). El análisis espectrométrico de masas reveló que la proteína restante en la mezcla consistía en la mitad de las moléculas A, probablemente como resultado de la expresión desigual de las cadenas pesadas A y C. Los datos brutos de MS de la muestra de transfección ZO se muestran en la Figura 8.

5 Sorprendentemente, mientras que la transfección de ZO dio lugar a cantidades razonables de producto biespecífico, el par de carga inversa de la transfección de ZP (L351K/T366'D versus T366K/L351'D de ZO) no produjo resultados similares, y solo se observó el 52% de producto biespecífico, con cantidades considerables de los dos homodímeros presentes (30% de AA y 13% de CC). Una explicación para esto puede ser que la D cargada negativamente se parece mucho a la T, por lo que la T366D puede no ser lo suficientemente potente como para rechazarse y la T366D seguirá formando homodímeros, como en realidad se observó.

Se puede prever que las variantes sutiles del par T366K/L351'D recién descubierto (por ejemplo, probando todas las permutaciones, incluidos los nuevos constructos T366R y L351E) pueden dar como resultado porcentajes similares de BsAbs.

Ejemplo 14: HADDOCK para el diseño de nuevos mutantes de CH3 para impulsar una heterodimerización eficiente

15 Como se describe en el ejemplo 13, el nuevo par de carga T366K/L351'D encontrado aumenta la relación de heterodímeros en la mezcla (69%) con una pequeña fracción de homodímeros CC no deseados (7%) (L351D/L351'D) y una fracción sustancial de la mitad de las moléculas A (24%) 'que contamina' la mezcla. En este ejemplo, se usó un enfoque *in silico* para generar una visión adicional de los residuos de aminoácidos implicados en las interacciones de la interfaz CH3, para probar las sustituciones complementarias en las regiones opuestas de CH3 y para encontrar nuevos pares de CH3 que contengan sustituciones complementarias que aumenten aún más la heterodimerización eficiente mientras previenen la formación eficiente de homodímeros de las dos cadenas pesadas.

HADDOCK (acoplamiento proteína-proteína impulsada por alta ambigüedad) es un enfoque de acoplamiento flexible basado en información para el modelado de complejos biomoleculares. HADDOCK se distingue de los métodos de acoplamiento desde el inicio en el hecho de que codifica información de interfaces de proteínas identificadas o predichas en restricciones de interacción ambiguas (AIR) para impulsar el proceso de acoplamiento (de Vries et al., 2010).

La entrada para el servidor web HADDOCK consiste en un archivo de estructura de proteínas, que puede ser una estructura cristalina, un grupo de estructuras de RMN o una estructura modelada. Después del acoplamiento o el refinamiento, HADDOCK devuelve el llamado puntaje HADDOCK, que es un promedio ponderado de la energía de VanderWaals, la energía electrostática, el área de superficie enterrada y la energía de desolvatación. La puntuación de HADDOCK se puede interpretar como una indicación de energía de enlace o afinidad, aunque a menudo es difícil lograr una traducción directa a datos experimentales. Además de esto, HADDOCK proporciona archivos de estructura para las "cuatro principales" estructuras que resultaron de la ejecución del acoplamiento. Estos archivos de estructura se pueden descargar y visualizar, lo que permite el análisis detallado de las interacciones de los residuos individuales.

35 En este ejemplo, se estudiaron las interacciones entre los dominios CH3 de las cadenas pesadas de IgG1. Se utilizó una estructura cristalina de alta resolución de la parte Fc de la IgG (estructura 1L6X) como estructura de inicio (<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1l6x>; Idusogie, EE et al., JI 2000 (164) 4178-4184).

En el ejemplo 13, se encontró que la cotransfección de los vectores XIII y XVI daba como resultado la formación del contaminante homodimérico CC (Tabla 10). HADDOCK se utilizó para buscar mutaciones adicionales en el par T366K/L351'D que impiden la homodimerización.

La salida HADDOCK consiste en un conjunto de energías calculadas, una puntuación de HADDOCK (que es un promedio ponderado de las energías) y cuatro archivos de estructura correspondientes a las cuatro estructuras de energía más bajas encontradas por el programa. Las puntuaciones de HADDOCK se utilizan para comparar diferentes estructuras; las otras energías se utilizan simplemente para obtener una indicación de lo que está sucediendo en las estructuras (por ejemplo, buenas interacciones electrostáticas, superficie enterrada más pequeña, alta energía de Van der Waals). Cuanto menor sea la puntuación de HADDOCK, mejor. Para cada par de mutaciones, las puntuaciones se calcularon para los dímeros AA, AB y BB.

Los conjuntos de pares de mutaciones del ejemplo 12 se ejecutaron en HADDOCK para ver si las energías calculadas se correlacionarían con los datos experimentales. La Tabla 11 presenta todas las energías teóricas, que se visualizan en la Figura 9.

Tabla 11:

Combinaciones de constructos	Puntuación HADDOCK	Energía VdW	Energía electrostática	Energía de desolvatación	Área superficial enterrada

ES 2 740 749 T3

Tipo silvestre-tipo silvestre	-208,2	-62,8	-773	9,2	2505,8
1-2 (E356KD399K - K392DK409D)	-225,8	-56,4	-862	3	2458,3
2-2 (K392DK409D - K392DK409D)	-180,3	-67,9	-562,1	0,1	2312,5
1-1 (E356KD399K - E356KD399K)	-176,7	-75,5	-469,3	-7,3	2349,6
1-3 (E356KD399K - K392DK409DK439D)	-220,6	-67,9	-793,8	6,1	2499,8
3-3 (K392DK409DK439D - K392DK409DK439D)	-150,1	-76,6	-387,6	4,1	2261,2
6-7 (T366W - T366SL368AY407V)	-221,3	-65,8	-735,5	-8,3	2509,0
6-6 (T366W - T366W)	1916,9*	2072,3	-681,3	-19,2	2499,9
7-7 (T366SL368AY407V - T366SL368AY407V)	-191,9	-55,0	-683,2	-0,2	2427,2
43-63 (T366K - L351D)	-210,6	-64	-758,4	5,1	2456,5
43-43 (T366K - T366K)	-191,7	-71,2	-634,1	6,3	2533,5
63-63 (L351D - L351D)	-212,5	-60,4	-774	2,6	2445,6
*este valor es inusualmente alto debido a la alta puntuación de energía de VanderWaals, probablemente debido al choque estérico de T366W/T366'W					

Con 2 dominios CH3 de tipo silvestre, las puntuaciones de HADDOCK son las mismas para AA, AB y BB porque las regiones A y B de CH3 son idénticas. En la mayoría de los otros casos, el par AB tiene la puntuación más baja, que es lo esperado. Para el par T366K/L351D el puntaje BB es ligeramente mejor que el puntaje AB (-210,6 vs. -212,5), pero esta diferencia está dentro del error de los cálculos. Usando HADDOCK, se visualizaron las estructuras de los heterodímeros de estos pares. Por ejemplo, las combinaciones de los constructos 1-2, 1-1 y 2-2 se presentan en la Figura 10. A partir de estas visualizaciones, es evidente que se forman puentes salinos en el heterodímero (panel de la izquierda de la Figura 10A) mientras que la repulsión electrostática se produce entre residuos de cadenas idénticas (Figura 10B y C, panel medio y de la derecha). Las puntuaciones más altas de HADDOCK para los homodímeros pueden explicarse por la repulsión electrostática de los residuos de la interfaz mutada. Estos residuos deben separarse entre sí y no interactúan con los residuos de la otra cadena, lo que provoca una caída en la afinidad.

La Tabla 11 y la Figura 9 confirman lo que se observó en el ejemplo 13. El heterodímero AC T366K/L351'D y el homodímero CC L351D/L351'D con una energía similar, explican la presencia tanto del heterodímero como del homodímero en la mezcla. El homodímero AA T366K/T366'K, por otro lado, es apenas detectable en la mezcla, aunque medias moléculas A T366K están presentes. La Tabla 11 y la Figura 9 muestran en realidad que la puntuación de HADDOCK para el homodímero AA T366K/T366'K es más alta que la puntuación para el heterodímero AC; de ahí que la formación de este homodímero sea energéticamente menos favorable.

Ejemplo 15: variaciones 366/351

En el ejemplo 13, se plantea la hipótesis de que se pueden diseñar alternativas para el par de carga mutante T366K/L351'D que pueden tener resultados similares en términos de porcentaje de anticuerpos biespecíficos en la mezcla. Las alternativas pueden incluir las sustituciones T366R, T366D, T366E, L351E, L351K y L351R. La proporción de homodímeros CC de L351D/L351'D se puede disminuir creando variantes del par 366/351. Todos los pares de mutaciones posibles se ejecutaron en HADDOCK y las puntuaciones resultantes se presentan en la Tabla 12 y se visualizan en la Figura 11.

Tabla 12

Combinaciones de constructos	Puntuación HADDOCK	Energía VdW	Energía electrostática	Energía de desolvatación	Área superficial enterrada
T366K - L351D	-210,6	-64	-758,4	5,1	2456,5

T366K - T366K	-191,7	-71,2	-634,1	6,3	2533,5
L351D - L351D	-212,5	-60,4	-774	2,6	2445,6
T366K - L351E	-216,9	-55,7	-854,7	9,8	2532,7
L351E - L351E	-217,9	-65,5	-802,2	8	2532
T366R - L351D	-210,5	-68,8	-760,8	10,4	2514,5
T366R - T366R	-201,8	-77,4	-626,4	0,9	2608
T366R - L351E	-225,8	-56,2	-874,8	5,4	2579,2
T366D - L351R	-211,2	-71,3	-723,6	4,8	2455,6
T366D - T366D	-198,1	-58,1	-713,4	2,1	2477
L351R - L351R	-220,7	-75,5	-806,5	16,1	2552,2
T366D - L351K	-223,9	-62,1	-810,1	0,3	2487,8
L351K - L351K	-224,4	-75,6	-812,1	13,6	204,5
T366E - L351R	-222,3	-69	-783	3,4	2557,2
T366E - T366E	-201,9	-57,6	-741	4	2487,5
T366E - L351K	-215,9	-58,4	-808,9	4,3	2486

5 Cuando se observaron las puntuaciones de HADDOCK, se observó que algunas de las mutaciones tienen un "patrón" similar cuando se comparan con T366K/L351'D. Para la mayoría de las permutaciones, se encontró que el homodímero AA tenía una puntuación de HADDOCK más alta que el heterodímero AB, pero el homodímero BB parecía tan favorable como el heterodímero AB. Aunque se sabe que el residuo 351 es un "vecino" para sí mismo en la otra cadena, es decir, el residuo 351 de la cadena A se empareja con el residuo 351 de la cadena B en la interfaz CH3-CH3, apenas hay una influencia negativa de las cargas idénticas cuando se forma el dímero BB. Al observar la estructura L351D/L351'D, esto se explica por los ácidos aspárticos que se doblan entre sí y la influencia estabilizadora de al menos la arginina natural en la posición 355 y también una cierta estabilización de carga negativa por la serina natural en la posición 354. (Véase la Figura 12A). La mutación de estos residuos (S354A y R355D) proporciona solo una pequeña mejora. A partir de la Figura 12B está claro que el hidrógeno de la cadena principal de A354 provoca la estabilización del homodímero. De esta serie, el par T366R/L351'E parece ser el más favorable, con la puntuación de HADDOCK más baja para la molécula biespecífica.

Ejemplo 16: mutaciones alrededor de T366K/L351'D

15 En la serie de análisis de HADDOCK en este ejemplo, el par T366K/L351'D o T366K/L351'E se tomó como una estructura de partida. Para identificar mutaciones adicionales que aumentarían aún más el porcentaje previsto de biespecíficos de estas cadenas A y B, se utilizaron mutaciones adicionales en la cadena B para calcular las puntuaciones y las energías de HADDOCK. Cuando se estudia la estructura del dominio CH3 con un visor para visualizar estructuras de proteínas a nivel molecular (YASARA, www.yasara.org), se pueden calcular las distancias entre los residuos individuales. Al hacer esto, se observó que los dos residuos Y349 y L368 son residuos vecinos que pueden contribuir positiva o negativamente a las interacciones del dímero y que se han mutado en este ejemplo, además de la mutación L351D, para estudiar el resultado sobre la formación de dímeros. Los homo y heterodímeros (véase la Figura 13). Ambos residuos parecen aumentar la estabilidad del heterodímero (puntuaciones de HADDOCK más bajas), así como la desestabilización del dímero BB (puntuaciones de HADDOCK más altas). Los ácidos glutámicos (E) en las posiciones 349 y 368 parecen ser más favorables que los ácidos aspárticos (D). Por lo tanto, la introducción de una segunda sustitución de aminoácidos en la cadena B, que ya comprende la sustitución de aminoácidos en la posición 351, parece favorecer aún más la heterodimerización.

30 En un siguiente conjunto de análisis HADDOCK, el par T366K/L351'D se tomó nuevamente como estructura de partida. Además de las sustituciones en la cadena B que aumentaron aún más la heterodimerización (es decir, Y349D/E y L368E), se agregaron mutaciones adicionales a la cadena A que ya comprende la sustitución T366K. Como se muestra en la Figura 14, hay varios pares de mutaciones que parecen favorables hacia la formación de heterodímeros biespecíficos. En el par T366K-L351K/L351'D-Y349'D, los cuatro residuos mutados están involucrados en el

- 5 emparejamiento heterodimérico, que no es el caso para T366K-L351K/L351'E-L368'E en el que K351 no está directamente involucrado en la unión. Sin embargo, el puntaje HADDOCK para este último heterodímero es -228,9; significativamente más bajo que el -214,2 para el T366K/L351'E-L368'E, lo que puede explicarse por las interacciones de enlace de hidrógeno de la K en la posición 351 (véase la Figura 15). El par T366K-L351K/L351'D-Y349'D puede ser mejorado aún más por la mutación R355'D en la cadena B, lo que resulta en una mayor puntuación de HADDOCK de BB, pero también la puntuación de HADDOCK de AB es ligeramente superior. En general, los resultados adicionales de L351K en puntuaciones de AB más bajas y puntuaciones de AA y BB similares en comparación con la única mutación T366K en la cadena A. En teoría, esto daría lugar a mayores cantidades de heterodímeros biespecíficos en las muestras.
- 10 Como se observa en la Figura 11, tener una R en lugar de una K en la posición 366 puede ser más potente para impulsar la heterodimerización. Por lo tanto, algunos de los análisis HADDOCK que se muestran en la Figura 13 se repitieron, pero ahora con T366R en lugar de T366K en la cadena A. Se demostró que no es favorable combinar un R366 en la cadena A con mutaciones dobles en la cadena B (Figura 16). Esto puede deberse al gran tamaño de este residuo, que interfiere con otras interacciones de interfaz, aunque todos los puentes de sal esperados con R366 están presentes en las estructuras. Además, la puntuación de HADDOCK para el homodímero AA es más baja para R366 que para K366, que tampoco contribuye favorablemente a la formación de heterodímeros. Por lo tanto, no se realizaron más análisis HADDOCK utilizando R366 en la interfaz.
- 15

20 Se han seleccionado un total de 14 pares con el mejor rendimiento, de acuerdo con las predicciones de HADDOCK (véase la Tabla 13 y la Figura 17). En algunos pares, se incluye una sustitución R355D para eliminar la influencia estabilizadora del R355 natural en la interacción L351/L351'D.

Tabla 13:

Combinaciones de constructos	Puntuación de HADDOCK de AB	Puntuación de HADDOCK de AA	Puntuación de HADDOCK de BB
Tipo silvestre-tipo silvestre	-208,2	-208,2	-208,2
T366K - L351D	-210,6	-191,7	-212,5
T366K - L351E	-216,9	-191,7	-217,9
T366R - L351E	-225,8	-201,8	-217,9
T366E - L351R	-222,3	-201,9	-220,3
T366K - L351DY349E	-215,9	-191,7	-190
T366K - L351DL368E	-223,3	-191,7	-198,9
T366K - L351EY349E	-214,5	-191,7	-187,5
T366KL351K - L351D	-233,2	-205	-212,5
T366K - L351DY349EL368E	-207,5	-191,7	-179,5
T366KL351K - L351DY349D	-255,2	-205	-204,3
T366KL351K - L351DY349E	-227,2	-205	-190
T366KL351K - L351DL368E	-243,9	-205	-198,9
T366KL351K - L351DR355D	-233,6	-205	-211,9
T366KL351K - L351DY349DR355D	-242,8	-205	-183,5
T366D - L351KY349K	-237,9	-198,1	-228,4

Ejemplo 17: expresión *in vitro* de biespecíficos utilizando mutantes de CH3 basados en las predicciones de HADDOCK

- 25 El análisis en el ejemplo 16 sugirió que algunas variantes de CH3 con mutaciones adicionales alrededor del par T366K/L351'D producirían mezclas con mayores proporciones del componente biespecífico y proporciones potencialmente más bajas del componente homodimérico. Estos pares de mejor desempeño fueron seleccionados para producción y análisis adicional. Además, también se generaron los constructos T366R y L351E. La Tabla 14

5 enumera los constructos que se hicieron y que se usaron para clonar nuevamente las regiones VH de los anticuerpos con especificidades conocidas y capacidad conocida para emparejarse con la cadena ligera de IGKV1-39 humana. La expresión de las IgG que contienen los constructos individuales se informó previamente en el Ejemplo 13, y se repitió para los constructos que se enumeran en la Tabla 14. El objetivo fue evaluar cuál de los constructos se homodimeriza en ausencia de un compañero de heterodimerización correspondiente. Idealmente, se formarían altos porcentajes de medios cuerpos y bajos porcentajes de homodímeros. Como control, se utilizaron también los constructos que contienen las mutaciones de carga informadas previamente y los constructos que contienen las mutaciones de botón en ojal reportadas previamente para la expresión como IgG completa por células recombinantes. Los sobrenadantes purificados de proteína A se analizaron en SDS-PAGE; Los resultados fueron analizados y calificados como se presenta en la Tabla 14.

10

Tabla 14:

Sustituciones de AA en CH3	Constructo #	% de IgG	% de medias moléculas
E356K, D399K	1	64,2	35,8
K392D, K409D	2	30,9	69,1
K392D, K409D, K439D	3	24,5	75,5
T366W	6	27,6	72,4
T366S, L368A, Y407V	7	58,6	41,4
T366K	43	32,9	67,1
L351D	63	89,8	10,2
T366D	64	89,6	10,4
T366K, L351K	68	34,7	65,3
L351D, L368E	69	83,7	16,3
L351E, Y349E	70	67,8	32,2
L351D, Y349E	71	79,7	20,3
L351D, R355D	72	100	-
L351D, Y349E, L368E	73	79,3	20,7
L351D, Y349D	74	88,6	11,4
L351D, Y349D, R355D	75	89,9	10,1
L351K, L368K	76	56,6	43,4
L351R	77	100	-
T366E	78	44,4	55,6
T366R	79	29,6	70,4
L351E	80	100	-

15 Los resultados de la coexpresión de una cadena ligera común y dos cadenas pesadas diferentes que portan las sustituciones de aminoácidos de los constructos mostradas en la Tabla 14 o las cadenas pesadas que portan las sustituciones de aminoácidos de constructos anteriores se presentan en la Tabla 15. La expresión de dos diferentes cadenas pesadas que comprenden las sustituciones de aminoácidos T366K y L351'D:L368'E, respectivamente, dieron como resultado aproximadamente el 87% del heterodímero AB biespecífico en la mezcla sin homodímeros AA o BB presentes (combinación nº 3 de la Tabla 15). Se observó aproximadamente el 12% de la mitad de las moléculas (la mitad A) que comprenden la sustitución T366K. Además, se encontró que el porcentaje de heterodímero AB

ES 2 740 749 T3

biespecífico aumentó cuando se introdujo la sustitución de aminoácido adicional L351K en la primera cadena pesada. Por ejemplo, la coexpresión de dos cadenas pesadas diferentes que comprenden las sustituciones de aminoácidos T366K: L351K y L351'D:L368'E, respectivamente, dio como resultado aproximadamente el 92% de heterodímero AB biespecífico, mientras que los homodímeros AA y BB están esencialmente ausentes en la mezcla (combinación n° 12 de la Tabla 15). Las combinaciones 10 y 11 también dieron como resultado distribuciones favorables de altos porcentajes de heterodímeros y prácticamente ausencia de homodímeros.

La ausencia de homodímeros es ventajosa, porque la fracción que contiene las moléculas de IgG intactas se compone de heterodímero AB solamente. Para la purificación y la posterior aplicación terapéutica, las medias moléculas pueden eliminarse mediante enfoques estándar, tal como mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Por lo tanto, la aplicación de estos mutantes de carga recientemente identificados en el proceso de producción para generar anticuerpos biespecíficos proporciona ventajas sobre los mutantes de carga conocidos y los mutantes de botones en ojales donde no se excluye la presencia de anticuerpos homodiméricos "contaminantes". Además, los pares de carga T366K/L351'D:L368'E y T366K:L351K/L351'D:L368'E tienen una ventaja adicional sobre los pares de inversión de carga E356K:D399K/K392'D y K409'D y E356K:D399K/K392'D:K409'D:K439'D previamente descritos, en el sentido de que las variantes de carga descritas anteriormente se basan en la inversión de las cargas existentes dentro de la interfaz CH3-CH3 mientras que las variantes de carga recién identificadas están agregando pares de carga adicionales (interacciones carga-carga) a la interfaz CH3-CH3. La introducción de pares de carga adicionales en la interfaz CH3-CH3 puede aumentar aún más la estabilidad de la interfaz y, por lo tanto, del anticuerpo intacto. Lo mismo se aplica a las mutaciones utilizadas en las combinaciones nos. 4, 5, 6, 9, 10 y 11, que también dieron como resultado proporciones favorables de heterodímero biespecífico con proporciones extremadamente bajas de homodímeros AA y BB presentes en las mezclas.

Tabla 15:

Combinación de 2 cadenas pesadas diferentes	cadena A* / mutaciones (constructo #)	cadena B**/ mutaciones (constructo #)	% encontrado de AA	% encontrado de AB	% encontrado de BB	% encontrado de media A	% encontrado de media B
1	T366E (78)	L351R (77)	3	81	2	13	0
2	T366K (43)	L351D (63)	0	88	3	9	0
3	T366K (43)	L351D,L368E (69)	0	87	0	12	0
4	T366K (43)	L351E,Y349E (70)	2	85	0	11	0
5	T366K (43)	L351D,Y349E (71)	2	92	1	5	0
6	T366K (43)	L351D,Y349E, L368E (73)	0	96	1	4	0
7	T366K, L351K (68)	L351D (63)	0	77	12	10	1
8	T366K, L351K (68)	L351D,R355D (72)	0	79	8	10	1
9	T366K, L351K (68)	L351D,Y349D, R355D (75)	1	93	2	4	1
10	T366K, L351K (68)	L351D,Y349D (74)	1	95	1	3	0
11	T366K, L351K (68)	L351D,Y349E (71)	1	95	0	3	1
12	T366K, L351K (68)	L351D,L368E (69)	0	92	0	8	0
13	T366K (43)	L351E (80)	0	70	10	18	2
14	T366R (79)	L351E (80)	4	38	36	21	1
15	T366D (64)	L351K, L368K (76)	3	92	2,5	2,5	0
16	T366D (64)	L351R (77)	30	69	1	0	0

* la cadena A porta la especificidad de MF1337 (= toxoide tetánico); ** la cadena B porta la especificidad de MF1122 (= fibrinógeno)

MS nativa

Se realizó una MS nativa en todas las muestras biespecíficas. Los gráficos obtenidos se analizaron para determinar las relaciones relativas de las especies presentes de dos maneras: por altura de pico y por área de pico. El área de pico es la forma de análisis más científicamente correcta, pero como todos los análisis anteriores para otros estudios se realizaron con base en la altura de pico, ambos métodos se incluyeron en el análisis, a efectos de comparación. Las diferencias entre los métodos estaban dentro del error de medición y, por lo tanto, solo se utilizaron los valores de área de pico para mediciones futuras. En la Figura 18 se muestran dos espectros típicos. En la Figura 19 se muestra gráficamente una visión general de los resultados, los valores numéricos se pueden encontrar en la Tabla 15. En aproximadamente la mitad de las muestras, la contaminación total de IgG mono-específica es inferior al 5%, y solo en tres casos es > 10% mientras que para IgG de tipo silvestre se espera encontrar alrededor del 50% de IgG mono-específica en la mezcla.

Se seleccionó un panel de diez combinaciones de 2 cadenas pesadas diferentes de la Tabla 15 para análisis adicionales. Estas diez combinaciones incluyeron las combinaciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11 y 12 (Tabla 15). La selección de estos diez se basó en bajos porcentajes de homodímeros presentes en las mezclas de acuerdo con lo determinado por nMS, pero también en función de sus propiedades fisicoquímicas generales, incluidos los rendimientos de producción, SDS-PAGE, así como el número de mutaciones presentes en el dominio CH3.

Ejemplo 18: análisis de estabilidad de IgG

En este estudio, una serie de pares de mutaciones de CH3 que dieron como resultado altas proporciones de heterodímeros biespecíficos en la fracción de IgG intacta y cantidades muy bajas (< 5%) de IgG parentales se analizarán adicionalmente para determinar la estabilidad de la parte Fc de la molécula de IgG. Los dominios CH3 mutados que se utilizan para promover la heterodimerización de las cadenas pesadas pueden tener efectos desestabilizadores inesperados en la región Fc de la IgG, lo que puede resultar en propiedades indeseables como la reducción de la vida media *in vivo*, la reducción de la función efectora y/o un aumento de la inmunogenicidad. Los pares de carga recientemente identificados se compararán con los biespecíficos de tipo silvestre y un biespecífico que contiene mutaciones de carga previamente identificadas (la cadena A comprende el constructo 1 y la cadena B comprende el constructo 2). Todos los biespecíficos en este estudio contendrán las mismas regiones variables de las cadenas pesada y ligera, asegurando que los efectos observados sean causados por mutaciones en la parte Fc de la molécula y no por la variación en las regiones variables.

Se realizarán una serie de estudios de estabilidad en estos biespecíficos. Estos estudios incluyen análisis espectroscópicos (absorbancia UV-Vis, fluorescencia y dispersión de la luz) y microscópicos (microscopía de luz y fluorescencia con tinción con Rojo Nilo) que brindan información sobre el estado de agregación de las variantes de CH3.

Los espectros de absorbancia UV-Vis se registrarán con un haz doble, bioespectrofotómetro Cary 300 con dos monocromadores a 25 °C. Los espectros se controlarán entre 250 y 400 nm utilizando una longitud de trayectoria de 1 cm. La absorbancia a longitudes de onda de 320 nm y más largas proporciona información sobre el estado de agregación de la IgG.

Los espectros de fluorescencia intrínseca se controlarán a 25 °C utilizando un espectrofluorímetro FluoroMax. El método de fluorescencia será optimizado. La emisión de fluorescencia proporcionará información sobre las propiedades de conformación y agregación. Los espectros de dispersión de luz a 90° se controlarán a 25 °C utilizando un espectrofluorímetro FluoroMax llevando a cabo un escaneo sincronizado ($\lambda_{em} = \lambda_{ex}$) entre 400 nm y 750 nm con un tiempo de integración de 0,01 s. Se optimizarán las rendijas de excitación y emisión. Por ejemplo, la dispersión de la luz en ángulo recto puede distinguir entre muestras de IgG que no tienen ni un 5% de dímeros.

Para la microscopía de fluorescencia con tinción de Rojo Nilo, justo antes de las mediciones, se agregará Rojo Nilo en etanol a la muestra. Las muestras se colocarán en un portaobjetos para microscopía y se analizarán mediante microscopía de fluorescencia. Las partículas serán contadas. El límite inferior de tamaño de las partículas que se pueden observar mediante microscopía de fluorescencia es de aproximadamente 0,5 μm .

La aplicación de estrés, como la temperatura, el pH, el estrés mecánico o los desnaturalizantes en proteínas, puede dar como resultado un cambio de conformación (por ejemplo, despliegue) y/o agregación. Como se informó anteriormente que los anticuerpos biespecíficos con modificación de carga han reducido la temperatura de fusión del CH3 modificado (Gunasekaran 2010), estos estudios tienen como objetivo discriminar entre los nuevos mutantes de carga de la presente invención y los mutantes de carga existentes conocidos.

Se exploran los estudios de termoestabilidad utilizando el sistema Octet, tanto con biosensores de proteína A como utilizando la unión de FcRn a IgG. Para examinar la estabilidad térmica de las IgG con modificación de CH3, las

muestras se incubarán a una concentración de 100 µg/mL (en PBS) a 4, 50, 55, 60, 65, 70 y 75 °C durante 1 hora utilizando una máquina de PCR. Después de esto, las muestras se enfriarán lentamente durante un período de 15 minutos a 25 °C y se mantendrán a esta temperatura durante 2 horas, después de lo cual se almacenarán durante la noche a 4 °C. Los anticuerpos precipitados se eliminarán por centrifugación, después de lo cual la concentración total de IgG de los anticuerpos solubles se determinará mediante el sistema Octet utilizando el Biosensor de proteína A (dilución 1/10 en PBS). Se están explorando los ensayos que miden la unión de la IgG con modificación de CH3 a FcRn utilizando el sistema Octet. Se usan biosensores de proteína L para unir la cadena ligera de IgG al sensor, seguido de incubación con FcRn en solución, o se usan biosensores anti-penta-HIS para unir la proteína FcRn etiquetada con His, seguido de incubación con la IgG de interés. Estos métodos pueden ser más sensibles que usar el Biosensor de proteína A y también pueden usarse para estudios de estabilidad térmica. Todas las muestras también serán analizadas para la estabilidad en suero. En resumen, las muestras de IgG (modificadas) se incubarán a 37 °C en suero humano, las muestras de control se mantendrán a 4 °C. Después de 1, 2, 3 y 4 semanas, las muestras se centrifugan para eliminar la IgG precipitada. Posteriormente, la muestra se valora en ELISA específico de antígeno para determinar las cantidades relativas de IgG funcional. Se utilizará como referencia el anticuerpo de control purificado recién añadido en suero humano.

Ejemplo 19: análisis de estabilidad

En experimentos previos, se obtuvieron altos porcentajes de anticuerpos biospecíficos mediante la coexpresión de dos cadenas pesadas diferentes que comprenden mutaciones de CH3 y una cadena ligera común (ejemplo 17).

Se seleccionó un panel de ocho combinaciones de 2 cadenas pesadas diferentes de la Tabla 15 para análisis adicionales. Estas ocho combinaciones incluyeron las combinaciones 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11 y 12 (Tabla 15). En este estudio, se analizaron estas ocho combinaciones, con un fuerte enfoque en la estabilidad de la parte Fc de la IgG. Como controles, se incluyeron biospecíficos de tipo silvestre (es decir, sin mutaciones de CH3) y/o biospecíficos basados en mutaciones de carga de CH3 informadas previamente. Téngase en cuenta que para los biospecíficos de tipo silvestre, 2 cadenas pesadas y la cadena ligera común se expresan conjuntamente sin medios para una dirección preferencial hacia los heterodímeros. Estos 'biospecíficos de tipo silvestre' representan una mezcla de AA, AB y BB. Todos los biospecíficos en este estudio fueron diseñados para portar las mismas combinaciones de VH/VL, asegurando que los efectos observados sean causados por mutaciones en la parte Fc de la molécula y no por variaciones en las partes Fab.

Se planteó la hipótesis de que los pares mutacionales que se usaron para promover el emparejamiento heterodimérico de las dos cadenas pesadas diferentes podrían asociarse con efectos estructurales inesperados o bien desestabilizadores en la región Fc de la IgG. Esto podría posteriormente resultar en problemas no deseados que dificultarían un mayor desarrollo clínico, tal como una reducción de la vida media *in vivo*, una función efectora reducida y/o un aumento de la inmunogenicidad debido a la presencia de estas mutaciones.

Estabilidad térmica

La aplicación de estrés, tal como aumentos o disminuciones en la temperatura, podría resultar en un cambio de conformación (por ejemplo, despliegue) y/o agregación de proteínas. Para examinar la estabilidad térmica de las IgG con modificación de CH3, las moléculas biospecíficas de las combinaciones 3-6 y 9-12 (Tabla 15), así como las biospecíficas de tipo silvestre y las moléculas biospecíficas obtenidas al usar los constructos 1 y 2 (la combinación E356K:D399K/K392D':K409D', también denominada par de 'inversión de carga') se incubaron a una concentración de 100 µg/mL (en PBS) a 4, 60, 62,5, 65, 67,5, 70 y 72,5 °C durante 1 hora usando una máquina de PCR. Después de esto, las muestras se enfriaron lentamente durante un período de 15 minutos a 25 °C y se mantuvieron a esta temperatura durante 2 horas, después de lo cual se almacenaron durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, los anticuerpos precipitados se eliminaron por centrifugación (18.000 rpm; 4 °C, 20 min), después de lo cual la concentración total de IgG de los anticuerpos solubles se determinó mediante el sistema Octet utilizando el Biosensor de proteína A (dilución 1/10 en PBS). Los resultados se muestran en la Figura 20. Se observó que el anticuerpo biospecífico de control con modificación de CH3 (la inversión de carga de la combinación E356K:D399K/K392D':K409D' (triángulos)) tiene una estabilidad térmica reducida en comparación con el biospecífico de tipo silvestre (cuadrados). Las moléculas biospecíficas de las combinaciones 3-6 y 9-12 (diamantes) también demostraron una estabilidad térmica reducida en comparación con el tipo silvestre. Sorprendentemente, tres combinaciones, sin embargo, demostraron una estabilidad mejorada en comparación con el anticuerpo biospecífico de control con modificación de CH3. Los biospecíficos de las combinaciones 9, 10 y 11 son significativamente más estables que los otros biospecíficos con modificación de CH3 (inversión de carga) y son tan estables como los biospecíficos de tipo silvestre a la temperatura más alta medida.

Estabilidad de congelación y descongelación

Para examinar la estabilidad de las IgG con modificación de CH3 después de la congelación y descongelación repetitivas, las moléculas biospecíficas de las combinaciones 3-6 y 9-12 (Tabla 15), así como las biospecíficas de tipo silvestre y las moléculas biospecíficas obtenidas cuando se usan los constructos 1 y 2 (la combinación E356K:D399K/K392D':K409D' (par de inversión de carga)) se expusieron a diez ciclos subsiguientes de congelación y descongelación colocando las muestras a -80 °C durante al menos 15 minutos hasta que quedaron completamente

congeladas. Posteriormente, las muestras se descongelaron a temperatura ambiente. Cuando se descongelaron completamente, se repitió el ciclo de congelación y descongelación. Después de 10 ciclos de congelación y descongelación, los anticuerpos precipitados se eliminaron mediante centrifugación (18.000 rpm; 4 °C, 20 min), después de lo cual la concentración total de IgG de anticuerpos solubles se determinó mediante el sistema Octet utilizando el Biosensor de proteína A (dilución 1/10 en PBS). La prueba de estabilidad de congelación y descongelación se repitió tres veces. Los resultados se muestran en la Figura 21. Se observó que la inversión de carga de control del anticuerpo biespecífico con modificación de CH3 parece tener una estabilidad ligeramente reducida en comparación con el biespecífico de tipo silvestre. Por el contrario, las moléculas biespecíficas de las combinaciones 3, 4 y 9 parecían tener una estabilidad ligeramente mejorada en comparación con el biespecífico de tipo silvestre. En general, se puede concluir que las condiciones rigurosas de los ciclos de congelación y descongelación no causan problemas de estabilidad importantes para las variantes con modificación de CH3.

Estabilidad en suero *in vitro*

Para examinar la estabilidad de las IgG con modificación de CH3 en suero mantenidas a 37 °C, se incubaron las moléculas biespecíficas de las combinaciones 3-6 y 9-12 (Tabla 15), así como los biespecíficos de tipo silvestre y las moléculas biespecíficas de inversión de carga a 37 °C en suero humano al 10%. Las muestras de control se mantuvieron en suero humano a 4 °C. Después de 1, 2 o 5 días, los anticuerpos precipitados se eliminaron por centrifugación. Después de eso, las muestras se valoraron en un ELISA específico de fibrinógeno, para determinar las cantidades relativas de IgG funcional. Se usó como referencia el anticuerpo de control purificado recién añadido en suero humano.

Los datos del ELISA de fibrinógeno muestran que todas las muestras fueron bastante estables en suero humano al 10% a 37 °C durante 5 días. En la concentración más baja de IgG, las moléculas biespecíficas de las combinaciones 4 y 5 parecen ser ligeramente menos estables, especialmente a T = 1 y T = 2, pero la diferencia es mínima en el punto final de este experimento (véase la Figura 22).

Ejemplo 20: Pruebas de estabilidad adicionales

Se usó una serie adicional de métodos analíticos para evaluar la estabilidad de las variantes de IgG. Moléculas biespecíficas de las combinaciones 3-6 y 9-12 (Tabla 15), así como biespecíficos de tipo silvestre (AA, AB, BB), los anticuerpos parentales individuales (AA y BB) y las moléculas biespecíficas obtenidas cuando se usan los constructos 1 y 2 (la combinación E356K:D399K/K392D':K409D' (par de inversión de carga)) se usaron como muestras en estos ensayos de estabilidad. Todas las IgG se diluyeron hasta 0,2 mg/mL y se aplicaron varias condiciones de estrés (2 días a 50 °C, 2 semanas a 40 °C, congelación-descongelación 5 veces), para poder discriminar entre las diferentes muestras. Es de destacar que estos altos niveles de estrés dieron lugar a condiciones en las que uno de los anticuerpos parentales (el parental BB, que portaba dos Fab 1122) como se usó en todos los biespecíficos se volvió inestable. A los 2 días a 50 °C, se detectó la agregación de esta proteína por absorbancia UV. Esto sugirió que esta condición de estrés puede no diferenciar entre la inestabilidad del Fab y el CH3 en el biespecífico y los datos resultantes de la incubación a 50 °C deben usarse con precaución.

Los resultados se resumen en la Tabla 16. Los métodos analíticos que se usaron incluyeron:

- Microscopía de fluorescencia con Rojo Nilo ("partículas de Rojo Nilo" en la Tabla 16); para observar la cantidad de partículas > 0,5 µm después de la adición del colorante Rojo Nilo.
- Espectrometría UV a 350 nm ('UV 350 nm'); un cambio en la absorción a longitudes de onda > 320 nm proporciona información sobre el estado de agregación de la proteína.
- Dispersión de la luz a 90° a 400 nm ('LS 400 nm'); una técnica sensible para observar cambios en la agregación de proteínas, por ejemplo, la diferencia entre monómeros y dímeros de IgG.
- Fluorescencia intrínseca; la longitud de onda máxima y de intensidad de fluorescencia de los residuos aromáticos en un cambio de proteína tras los cambios en el entorno (por ejemplo, despliegue).
- Espectroscopia de fluorescencia de 1,8-ANS; 1,8-ANS se une a través de interacciones electrostáticas a grupos catiónicos a través de la formación de pares de iones y se pueden detectar los cambios en la estructura y/o conformación de la proteína

Espectroscopia UV-VIS

Los espectros de absorbancia UV-Vis se midieron a 25 °C con un haz doble, Bioespectrofotómetro Cary 300 con dos monocromadores de Varian en diferentes cubetas de cuarzo (tal como cubetas Hellma negras de bajo volumen con una longitud de recorrido de 1,0 cm y cubetas Hellma transparentes de 0,2 cm x 1,0 cm). Los espectros se monitorizaron entre 220 y 450 nm utilizando una longitud de trayectoria de 1,0 cm. La absorbancia alrededor de 280 nm proporciona información sobre la concentración de la proteína. La región entre 320 nm y 450 nm puede proporcionar información sobre el estado de agregación de las muestras.

Dispersión de la luz a 90°

5 El método espectral de dispersión de luz a 90° se desarrolló para estudiar la agregación de proteínas y se realizó como se describe en Capelle, 2005; Demeule, 2007a. Los espectros de dispersión de luz a 90° se monitorizaron a 25 °C usando un espectrofluorímetro FluoroMax (Spex, Instruments S.A., Inc. RU) realizando un barrido sincrónico ($\lambda_{em} = \lambda_{ex}$) entre 400 nm y 750 nm con un tiempo de integración de 0,01 s. Se probaron diferentes ajustes de rendija para encontrar las condiciones óptimas. Después de la optimización, se utilizaron los mismos ajustes de rendija para todas las mediciones.

Emisión de fluorescencia en estado estacionario

10 La emisión de fluorescencia de los residuos de triptófano, tirosina y fenilalanina proporciona información sobre el entorno local de estos fluoróforos. Se miden los cambios o diferencias en la hidrofobicidad y/o rigidez. Típicamente, un ambiente más hidrófobo y rígido conduce a un aumento en la intensidad de la fluorescencia y un desplazamiento hacia el azul del máximo de emisión. La espectroscopia de fluorescencia intrínseca puede proporcionar información sobre el estado actual de la proteína y monitorizar los cambios en las propiedades físicas y químicas. Se puede encontrar más información sobre la fluorescencia de la tirosina y el triptófano en el libro de Lakowicz [Lakowicz, 2006].

15 Los espectros de emisión y de excitación de fluorescencia se registraron a 25°C en diferentes cubetas de cuarzo. Las muestras se excitaron a diferentes longitudes de onda. Los tiempos de integración y la configuración de la rendija fueron optimizados. Después de la optimización, se aplicaron los mismos tiempos de integración y configuración de rendija para todas las muestras.

Microscopía de fluorescencia con tinción con Rojo Nilo

20 El método de tinción con Rojo Nilo se desarrolló para visualizar agregados de proteínas y se realizó como se describe en Demeule et al., 2007b.

25 Las observaciones microscópicas se realizaron en un microscopio Leica DM RXE (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania) equipado con una lámpara de mercurio. Las imágenes fueron adquiridas con una cámara Sony NEX-5 y su firmware. Los objetivos fueron 10x, 20x y 40x. Para las investigaciones microscópicas, se utilizaron portaobjetos con una distancia fija de 0,1 mm entre el portaobjetos y el cubreobjetos de vidrio. El tamaño de las rejillas 4x4 es de 1 mm x 1 mm y corresponde a 0,1 µL.

Espectroscopia de fluorescencia con 1,8-ANS

El ácido 1-anilinoftaleno-8-sulfónico (1,8-ANS) es una pequeña sonda fluorescente hidrófoba no cargada (Pm 299,34 Da) utilizada para estudiar tanto las superficies como las proteínas de la membrana.

30 1,8-ANS es esencialmente no fluorescente en agua y solo se vuelve apreciablemente fluorescente cuando se une a las membranas (rendimientos cuánticos ~0,25) o proteínas (rendimientos cuánticos ~0,7). Esta propiedad de 1,8-ANS lo convierte en un indicador sensible del plegamiento de proteínas, cambios conformacionales y otros procesos que modifican la exposición de la sonda al agua. Las referencias sobre 1,8-ANS se pueden encontrar en la página de Internet de Molecular Probes, www.probes.com.

35 Los espectros de emisión de fluorescencia de 1,8-ANS se registraron usando un espectrómetro FluoroMax. No se realizará una comparación directa de la fluorescencia de 1,8-ANS entre las IgG. Cada IgG puede tener un número diferente de sitios de unión de 1,8-ANS y, por lo tanto, no pueden compararse. En principio, cuanto más baja es la fluorescencia de 1,8-ANS, menos moléculas de 1,8-ANS se unen al anticuerpo. Se evaluarán los cambios en la intensidad de fluorescencia de 1,8-ANS y la longitud de onda de emisión debida al estrés.

40 Tabla 16: Visión general de los diferentes resultados de degradación forzada en varias muestras de IgG después de la dilución hasta 0,2 mg/mL. El color de las células indica las variaciones entre T = 0 y después del estrés: gris oscuro = cambio grande, gris claro = cambio pequeño y sin color = sin cambio (= estable).

45 * 'combi. #' se refiere a la combinación de mutaciones que se enumeran en la Tabla 15; ** partículas muy pequeñas por microscopía de fluorescencia, relevancia de estas partículas desconocida; 2d4 °C = 2 días a 4 °C; 2d50 °C = 2 días a 50 °C; 2w4 °C = 2 semanas a 4 °C; 2w40 °C = 2 semanas a 40 °C; T0 = inicio del experimento; 5FT = 5 ciclos de congelación y descongelación

Muestra proteína	Estrés	Partículas de Rojo	UV	LS 400	Fluorescencia intrínseca	Fluorescencia de 1,8-ANS
------------------	--------	--------------------	----	--------	--------------------------	--------------------------

ES 2 740 749 T3

		Nilo	350 nm	nm (10 ⁷ cps)	Int. de fluorescencia (10 ⁶ cps)	λ Max. (nm)	Int. de 1,8- ANS (10 ⁶ cps)	λ Máx. (nm)	Desplaza- miento (nm)
BB	2d4°C	0-10	0,001	0,7	4,2	335			
	2d50°C	0-10	0,013	0,8	4,2	335			
AA	2d4°C	10-20	0	1,2	5,7	338			
	2d50°C	10-20	0,002	1,0	5,5	338			
Biespecífico de tipo silvestre (AA AB BB)	2d4°C	30-50	0,003	0,9	5,1	336	7,1	507	
	2d50°C	>10.000**	0,007	0,9	5,0	336	7,1	507	
	2w4°C		0	0,9	5,0	336			
	2w40°C	>2.000**	0	0,8	5,0	336			
	T0		0,001	0,8	5,0	336			
	5FT	>2.000**	0,009	1,2	4,8	336			
Biespecífico de inversión de carga (E356K,D399K/ K392D,K409D)	2d4°C	10-20	0,001	1,3	5,9	336	7,0	507	
	2d50°C	10-20	0,002	1,2	5,7	336	7,0	507	
	2w4°C	>2.000**	0	1,1	5,5	336			
	2w40°C	>2.000**	0,002	1,1	5,5	336			
	T0		0,001	1,3	5,7	336			
	5FT	30-50	0,007	1,8	5,5	336			
Combi. # 3*	2d4°C	30-50	0	0,9	5,0	337			
	2d50°C	30-50	0,001	0,8	4,9	337			
Combi. # 4	2d4°C	20-30	0	1,0	6,2	337	7,5	505	
	2d50°C	>3.000**	0,001	1,0	6,2	337	7,5	505	
	2w4°C		0,001	1,0	6,3	337			
	2w40°C	>2.000**	0,003	0,9	6,3	337			
	T0		0,002	1,1	6,3	337			
	5FT	>2.000**	0,003	1,2	6,0	337			
Combi. # 5	2d4°C	>2.000**	0,001	1,1	4,9	337			
	2d50°C	>10.000**	0,001	0,9	5,0	337			
Combi. # 6	2d4°C	10-20	0	0,7	4,3	337			
	2d50°C	20-30	0,001	0,7	4,3	337			
Combi. # 9	2d4°C	30-50	0	1,0	5,5	337	7,5	507	
	2d50°C	50-100	0	1,0	5,5	337	8,1	500	-7
	2w4°C	>2.000**	0	0,9	5,1	337			

ES 2 740 749 T3

	2w40°C	>2.000**	0	0,9	5,2	337			
	T0		0,002	0,8	5,1	337			
	5FT	>2.000**	0,007	1,4	4,9	337			
Combi. # 10	2d4°C	30-50	0,002	1,0	5,6	337	7,0	505	
	2d50°C	150-200	0,001	1,1	5,9	337	8,7	499	-6
	2w4°C	>2.000**	0	0,9	5,2	337			
	2w40°C	>2.000**	0	0,9	5,4	337			
	T0		0,005	1,0	5,3	337			
	5FT	20-30	0,004	1,1	5,4	337			
Combi. # 11	2d4°C	20-30	0	0,9	4,9	337			
	2d50°C	30-50	0,002	0,9	5,1	337			
	2w4°C	>2.000**	0	0,8	5,0	337			
	2w40°C	>2.000**	0	0,8	5,1	337			
	T0		0,004	1,1	5,0	337			
	5FT	>2.000**	0,002	1,2	5,0	337			
Combi. # 12	2d4°C	10-20	0,001	0,8	3,8	337	6,2	511	
	2d50°C	10-20	0,002	0,7	3,8	337	6,5	508	-3
	2w4°C	>2.000**	0,003	0,6	3,6	337			
	2w40°C	>2.000**	0,001	0,5	3,5	337			
	T0		0,005	0,6	3,7	337			
	5FT		0,004	0,7	3,6	337			

Tomados en conjunto, estos datos indican que las diversas muestras de IgG son notablemente estables. Se necesitaron condiciones de estrés riguroso (por ejemplo, 2 días a 50 °C) para generar diferencias medibles entre las muestras analizadas. En estas condiciones, las muestras de las combinaciones # 9 y # 10 parecen agregarse más que otras muestras.

5

Los factores más discriminatorios para la estabilidad entre las proteínas son los ciclos de congelación y descongelación y el aumento de la temperatura. Teniendo en cuenta el factor de estrés muy riguroso de incubación a 50 °C, las variantes T366K/L351E,Y349E (combi. # 4) y T366K,L351K/L351D,Y349E (combi. # 11) son las dos proteínas más estables dentro del panel, seguidas de cerca por T366K,L351K/L351D,Y349D (combi. # 10) y T366K,L351K/L351D, L368E (combi. # 12).

10

Ejemplo 21: MS nativa en experimentos de relación; relación de transfección de 1:5 a 5:1

Para conocer mejor el comportamiento de las IgG mutadas en CH3 en mezclas de transfección asimétricas, en particular sobre la combinación T366K:L351K/L351D':L368E' (de ahora en adelante denominada KK/DE o DEKK), se realizó un experimento de relación más elaborado.

Las regiones VH del anticuerpo previamente utilizadas con capacidad conocida para emparejarse con la cadena ligera común IGKV1-39 se usaron para clonar nuevamente en los constructos 1, 2, 68 y 69, dando como resultado vectores I-V de la Tabla 17. Los vectores I-V, cada uno de los cuales contiene secuencias de ácido nucleico que codifican la cadena ligera humana común así como una cadena pesada de Ig con diferente región CH3 y diferente especificidad de antígeno, se transfectaron posteriormente en células con diferentes relaciones de transfección como se indica en la Tabla 18. Los resultados se muestran en la Figura 23.

20

Tabla 17:

Vector	gen de VH	Especificidad del antígeno	Masa de VH (Da)	Designación de Merus	Clonado en el constructo #
I	IGHV 3.30	Fibrinógeno (A)	12794	MF1122	69 (L351D, L368E)
II	IGHV 3.23	RSV (C)	13941	MF2729	69 (L351D, L368E)
III	IGHV 1.08	Tétanos (B)	13703	MF1337	68 (T366K, L351K)
IV	IGHV 3.30	Fibrinógeno (A)	12794	MF1122	1 (E356K, D399K)
V	IGHV 1.08	Tétanos (B)	13703	MF1337	2 (K392D, K409D)

Tabla 18:

Transfección nº	vectores	relación
1	I y III	5:1
2	I y III	3:1
3	I y III	1:1
4	I y III	1:3
5	I y III	1:5
6	II y III	5:1
7	II y III	3:1*
8	II y III	1:1
9	II y III	1:3
10	II y III	1:5
11	IV y V	5:1
12	IV y V	3:1
13	IV y V	1:1
14	IV y V	1:3
15	IV y V	1:5
* debido a un error técnico, esta muestra no ha sido medida.		

5 Las Figuras 23A y B muestran que para la combinación de mutaciones DEKK, cuando está presente un exceso de A o C (A o C están en el 'lado DE' y B está en el 'lado KK'), AB o BC se forman pero el excedente de A o C está presente como una mezcla de homodímeros y medios cuerpos en todos los casos. Sin embargo, cuando hay un exceso de B (B está en el 'lado KK' y A o C está en el 'lado DE'), hay una clara diferencia. AB o BC todavía se forma pero el excedente de B está esencialmente ausente como homodímero y solo se forman los medios cuerpos. Los porcentajes fueron nuevamente medidos por la altura del pico. Nótese bien: los picos detectados en el intervalos de 2% o menores están por debajo del umbral de la tecnología nMS como la aplicada, puede medirse con precisión. Las mediciones de <2% se consideran dentro del nivel de ruido del análisis y, por lo tanto, se ignoran. Es sorprendente que el exceso de B dé como resultado altos porcentajes de la mitad del cuerpo B solamente. Especialmente en las relaciones 1:3 y 1:5 de A:B, se observaron altos porcentajes de la mitad del cuerpo B (Figura 23A y 23B) en ausencia del homodímero BB, lo que indica que las mutaciones de CH3 del lado KK desfavorecen la homodimerización. La ausencia de homodímeros ofrece una ventaja crucial, ya que este 'lado KK' de la combinación DEKK puede elegirse para incorporar una especificidad que puede tener efectos adversos conocidos cuando se presenta como un homodímero (por ejemplo,

10

15

se sabe que los anticuerpos cMET o CD3 tienen efectos adversos no deseados cuando están presentes como homodímeros bivalentes en composiciones terapéuticas).

Los hallazgos observados para las diferentes relaciones de DE:KK están en contraste con las mutaciones de CH3 de inversión de carga de control en los vectores IV y V. La Figura 23C muestra que para la combinación de mutaciones E356K:D399K/K392D':K409D' cuando está presente un exceso de A (A está en el 'lado K392D':K409D'), el excedente de A está presente como una mezcla de ambos homodímeros y medios cuerpos en todos los casos, pero también cuando está presente un exceso de B (B está en el 'lado E356K:D399K'), el excedente de B está presente como una mezcla de ambos homodímeros y medios cuerpos en todos los casos. Incluso en las relaciones más altas 1:3 y 1:5 no se observan medios cuerpos B, aunque hay homodímeros, lo que indica que el lado E356K:D399K no desfavorece la homodimerización tanto como el lado KK de la combinación DEKK.

Tomados en conjunto, la combinación de mutaciones DEKK ofrece un beneficio claro sobre las mutaciones de CH3 de inversión de carga, en el sentido de que una de las cadenas del heterodímero no forma homodímeros.

Ejemplo 22: variedades de mezclas usando la combinación DEKK

Como se demostró que la combinación de mutaciones DEKK conduce a la formación de moléculas de IgG biespecíficas ('AB') con alta pureza, a continuación se exploró la factibilidad de la producción controlada de mezclas de anticuerpos más complejas de una célula, tal como las mezclas 'AB y AA' o 'AB y AC'. Los modelos Fab utilizados anteriormente se incorporaron en vectores que contenían el 'constructo DE' o el 'constructo KK' y varias combinaciones de estos vectores se expresaron conjuntamente para crear mezclas, para demostrar la versatilidad de la tecnología. Los Fab modelo MF1337 (toxoides tetánico), MF1122 (fibrinógeno) y MF1025 (tiroglobulina) se seleccionaron de acuerdo con su comportamiento estable general, buenos niveles de expresión y diferencias de masa entre las IgG que contienen estos Fab (véase la Tabla 19)

Tabla 19:

Especificidad	Nombre de Fab	Masa de IgG	Δ-masa de MF1122
Tétanos (A)	(MF)*1337	146747,03	+1842,05
Fibrinógeno (B)	(MF)1122	144904,98	0
Tiroglobulina (C)	(MF)1025	144259,87	-645,11

* MF = Fab de Merus, designaciones como MF1337 y 1337 se usan indistintamente.

Tabla 20: Cronograma de transfección:

Tr. #	Cadena pesada 1	Cadena pesada 2	Cadena pesada 3	Relación de Tr.	Especies esperadas (%)	Especies observadas (%)
1	1337-KK	1122-DE	1025-DE	2:1:1	AB (50%) AC (50%)	AB (43%) AC (57%)
2	1337-DE	1122-KK	1025-KK	2:1:1	AB (50%) AC (50%)	AB (40%) AC (54%) AA (6%)
3	1337-KK	1122-DE	1025-KK	1:2:1	AB (50%) BC (50%)	AB (54%) BC (46%)
4	1337-KK	1122-KK	1025-DE	1:1:2	AC (50%) BC (50%)	AC (66%) BC (33%) CC (1%)
5	1337-KK	1337-DE	1122-DE	2:1:1	AA (50%) AB (50%)	AA (57%) AB (43%)
6	1337-KK	1122-KK	1122-DE	1:1:2	AB (50%) BB (50%)	AB (75%) BB (25%)
7	1337-KK	1337-DE	1025-DE	2:1:1	AA (50%) AC (50%)	AA (46%) AC (54%)
8	1337-KK	1025-KK	1025-DE	1:1:2	AC (50%) CC (50%)	AC (60%) CC (40%)
9	1337-KK	1122-DE		1:1	AB (100%)	AB (>98%)
10	1337-KK	1025-DE		1:1	AC (100%)	AC (>98%)
11	1122-KK	1025-DE		1:1	BC (100%)	AC (>98%)

El análisis de SDS-PAGE demostró que la mayoría de las muestras consistían en IgG predominantemente completas y, en algunos casos, la mitad de los cuerpos estaban presentes en pequeños porcentajes. Además, muchas de las muestras mostraron dos bandas de aproximadamente 150 kDa en geles no reducidos, lo que refleja la presencia de dos especies de IgG distintas en la muestra. También en los geles reducidos, dos bandas de cadena pesada fueron visibles en algunas muestras (datos no mostrados).

La MS nativa se realizó en todas las muestras y los porcentajes de las especies observadas se calcularon en función de la altura máxima (% de especies observadas en la Tabla 20). Los resultados se presentan en la Figura 24. En las ocho muestras donde se coexpresaron tres cadenas pesadas, se observaron dos picos principales que correspondían a las especies esperadas. En dos de estas muestras (transfecciones 2 y 4), y en la transfección 11, se observó una pequeña cantidad de homodímero DE-DE contaminante. La mitad de los cuerpos se detectaron en cantidades muy pequeñas en la mayoría de las muestras (menos del 2%), lo que no es problemático, ya que se pueden separar fácilmente de la fracción de IgG de longitud completa como se mencionó anteriormente. Después de nMS, se descubrió que la masa observada de la IgG en la muestra 11 correspondía a una especie diferente de la esperada, y se concluyó que esto se debía a un error de transfección, es decir, en la muestra 11, aparentemente se cotransfectó 1025-DE con 1337-KK en lugar de 1122-KK.

Las muestras de IgG se analizaron adicionalmente en un ELISA de tipo sándwich para confirmar la presencia funcional de las especificidades deseadas. El recubrimiento de las placas de ELISA se realizó con fibrinógeno o tiroglobulina y la detección se realizó con tiroglobulina marcada con fluoresceína o toxoide tetánico. Los antígenos de detección se marcaron con fluoresceína (kit de marcación de anticuerpos con fluoresceína NHS de Pierce catálogo # 53029) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los antígenos marcados con fluoresceína podrían detectarse posteriormente mediante un anticuerpo antifluoresceína conjugado con FITC (Roche diagnostics, cat. # 11426346910). Los resultados del ELISA biespecífico (valores de OD450) se resumen en la Tabla 21. Las celdas en gris indican las especies esperadas para cada transfección. En general, los resultados cumplen con el resultado esperado con excepciones observadas como se indica en cursiva o negrita. En las transfecciones 1-3, el supuesto pozo 'negativo' para la especie BC (tr. # 1 y 2) o AC (tr. # 3) demostró una señal de fondo significativa. Se sabe por estudios anteriores que los ELISA biespecíficos pueden sufrir de altos niveles de fondo. Estos niveles de fondo también pueden ser causados por la presencia potencial de medio cuerpo en la muestra. Es de destacar que los resultados del ELISA biespecífico confirmaron que se había producido un error en la transfección # 11, ya que se detectó la especie AC (valor en negrita) en lugar de BC.

Tabla 21: valores de OD450 para ELISA biespecífico

Tr#	Especies de IgG detectadas		
	AB (tet-Fib)	AC (Tet-Tir)	BC (Fib-Tir)
1	0,989	1,792	0,438
2	1,085	1,852	0,418
3	1,419	0,775	1,547
4	0,205	1,795	1,22
5	1,367	0,047	0,057
6	1,359	0,043	0,06
7	0,054	1,779	0,054
8	0,04	1,338	0,052
9	1,588	0,048	0,051
10	0,044	1,805	0,055
11	0,043	1,821	0,056

Ejemplo 23: mezclas mejoradas de dos anticuerpos biespecíficos que reconocen 4 epítopos diferentes (AB y CD) de una sola célula

En el ejemplo 12, se planteó la hipótesis de que las mezclas resultantes de las transfecciones ZA o ZB se volverían problemáticas cuando se transfirieran a una producción a mayor escala, ya que se informa que las variantes de botón en ojal son inestables y no se puede excluir que los dominios CH3 comprendan un 'botón' o un 'ojal' se dimerizarán con dominios CH3 con modificación de carga. Como se demostró en los ejemplos anteriores que se han encontrado

nuevos mutantes de pares de carga que conducen preferentemente a la heterodimerización prácticamente sin formación de homodímeros, las cadenas polipeptídicas que comprenden un dominio CH3 que comprenden estos nuevos mutantes de pares de carga pueden expresarse en células junto con las cadenas polipeptídicas que comprenden un dominio CH3 con modificación de carga o potencialmente con cuerpos de SEED, y es probable que resulten en la formación preferencial de dos moléculas biespecíficas solamente.

De los ejemplos anteriores, quedó claro que la combinación de mutaciones DEKK es excelente para la producción de un biespecífico (AB) o dos biespecíficos (AB más AC) por las células clonales donde la dimerización de las cadenas pesadas es impulsada por los dominios CH3. Sin embargo, el uso de un solo conjunto de vectores de mutaciones complementarias de CH3 limita el número de posibilidades de las variedades de mezcla que se pueden producir. Sería posible producir mezclas más complejas de IgG y/o biespecíficos, como las mezclas 'AB y CD' o 'AB y CC' si se pudiera usar un segundo conjunto de vectores 'ortogonales' en combinación con DEKK. Cuando se combinan dos conjuntos de vectores, un requisito importante es que las cadenas pesadas expresadas a partir de los dos conjuntos diferentes de vectores con modificación de CH3 no pueden formar dímeros "cruzados", es decir, que las cadenas pesadas producidas por uno de los conjuntos de vectores se dimerizan en IgG completa con cadenas expresadas por el otro conjunto de vectores.

Para probar dicha formación potencial de dímeros "cruzados", se realizó un análisis *in silico* utilizando HADDOCK para obtener información adicional sobre si se produciría un posible emparejamiento entre los dominios CH3 de tipo silvestre y los dominios CH3 que contienen mutaciones de DE o KK. Del mismo modo, se analizaron los emparejamientos potenciales entre los dominios CH3 de tipo silvestre y los dominios CH3 que contienen E356K, D399K o K392D, K409D, así como los emparejamientos potenciales entre los dominios CH3 de tipo silvestre y los dominios CH3 que contienen mutaciones de botón en orificio y cualquier combinación de las anteriores. Las combinaciones de mutantes de CH3 que se analizaron en HADDOCK se enumeran en la Tabla 22 y las puntuaciones de HADDOCK resultantes se resumen en la Figura 25.

Tabla 22: Variantes de CH3 analizadas en HADDOCK, con códigos de una letra asignados para cada cadena pesada que porta una variante de CH3. * Las cadenas de tipo silvestre se designan 'C' y 'D' por cuestiones de coherencia; ** Las variantes de inversión de carga se designan como 'A' y 'B' cuando se combinan con variantes de botón en orificio, y se designan como 'C' y 'D' cuando se combinan con variantes de DE/KK.

Combinación de CH3	Mutaciones	Código de una letra en HADDOCK
DEKK	Cadena 1: T366K,L351K	A
	Cadena 2: L351D,L368E	B
Tipo silvestre (WT)	Cadena 1: ninguna	C*
	Cadena 2: ninguna	D*
Inversión de carga (CR)	Cadena 1: K392D,K409D	A/C**
	Cadena 2: E356K,D399K	B/D**
Botón en ojal (KIH)	Cadena 1: T366W	C
	Cadena 2: T366S,L368A,Y407V	D

La Figura 25 muestra que, con base en estas predicciones de HADDOCK, la combinación de las combinaciones de DEKK en CH3 con las combinaciones de CH3 de inversión de carga es más probable que tenga éxito en la formación de la combinación deseada de dos biespecíficos (AB y CD) sin subproductos contaminantes (especialmente AC, AD, BC, BD) cuando se cotransfectan en una sola célula. Como se puede observar en la Figura 25, estas especies biespecíficas no deseadas AC, AD, BC y BD tienen puntuaciones de HADDOCK relativamente altas, mientras que las especies AB y CD deseadas tienen las puntuaciones de HADDOCK más bajas. Por supuesto, cuando las combinaciones de DEKK en CH3 o la inversión de carga se colocarán en un constructo que tenga la misma especificidad (por ejemplo, 'C' en el lado DE, 'C' en el lado KK, 'A' en el lado E356K,D399K y 'B' en el lado E356K,D399K o 'A' en el lado DE, 'B' en el lado KK, 'C' en el lado E356K,D399K y 'C' en el lado E356K,D399K) esto resultará en la producción predominantemente de CC y AB tras la coexpresión en una célula.

En contraste, cuando se observan las predicciones para la coexpresión de DEKK con el tipo silvestre, se puede observar que las puntuaciones de HADDOCK para AC y AD son más bajas que la puntuación de HADDOCK para CD, lo que indica que AC y AD son contaminantes muy probables cuando se intenta producir una mezcla de AB y CD mediante la coexpresión de vectores que codifican combinaciones de DEKK en CH3 junto con vectores que codifican CH3 de tipo silvestre. Por último, las predicciones para la coexpresión de variantes de DEKK o de inversión de carga

ES 2 740 749 T3

junto con las variantes de botón en ojal dan como resultado variantes biespecíficas no deseadas con puntuaciones de HADDOCK relativamente bajas, es decir, una alta probabilidad de que estas especies no deseadas se produzcan después de la coexpresión.

5 Se concluye así que la combinación de las combinaciones de DEKK en CH3 con las combinaciones de CH3 de inversión de carga (E356K,D399K/K392'D,K409D') es ideal para obtener mezclas de anticuerpos 'AB y CD' y/o 'AB y CC' esencialmente puros.

10 A continuación, se crearon mezclas de 2 biespecíficos que reconocían 4 objetivos/epítomos (AB y CD) y mezclas de un anticuerpo biespecífico y 1 anticuerpo monoespecífico que reconocían 3 objetivos/epítomos (AB y CC) poniendo en práctica lo anterior. Estas mezclas se crearon utilizando 4 VH diferentes que son capaces de emparejarse con la cadena ligera común IGVK1-39, pero las combinaciones individuales de VH/VL tienen diferentes especificidades. Para permitir el análisis de MS nativo, la diferencia de masa entre las especies (esperadas) debe ser suficiente, es decir, > 190 Da. Se seleccionaron cuatro VH individuales y las masas de éstas fueron tales que las especies esperadas después de la cotransfección podrían identificarse y separarse mediante nMS. Además, las diferencias de masa entre las 4 VH seleccionadas también son lo suficientemente grandes como para identificar la mayoría de los posibles contaminantes en las mezclas, además de las dos especies deseadas. Las VH seleccionadas se enumeran en la Tabla 23.

Tabla 23:

VH (objetivo)	Mass como IgG de tipo silvestre
A (RTK1)	146736,78
B (toxide tetánico)	146106,20
C (fibrinógeno)	144904,98
D (RTK2)	145421,37

20 Los 4 VH diferentes se clonaron en vectores que contenían los constructos 'DE' o 'KK' o los constructos de inversión de carga, y se realizaron varias cotransfecciones como se indica en la Tabla 24. NB: como siempre, todos los vectores también contenían ácido nucleico que codifica la cadena ligera común IGKV1-39. Como se indicó anteriormente, cuando se combinan dos conjuntos de vectores, un requisito importante es que las cadenas pesadas expresadas a partir de los dos conjuntos diferentes de vectores con modificación de CH3 no pueden hacer dímeros "cruzados", que es que las cadenas pesadas producidas por uno de los conjuntos de vectores se dimerizan en IgG completa con cadenas pesadas expresadas por el otro conjunto de vectores. Para probar la posible formación de dímeros "cruzados" entre las cadenas pesadas que contienen mutaciones de inversión de carga y las cadenas pesadas que contienen mutaciones DE o KK, se realizaron las transfecciones de control.

Tabla 24:

Tr. #	Primera VH / constructo #	Segunda VH / constructo #	Especies esperadas
1	D / 68	A / 68	no coincidencia 'KK' con 'KK'; Sobre todo medio cuerpo esperado
2	D / 68	A / 69	hacen coincidir 'KK' con 'DE'; Producto AD esperado
3	D / 68	A/1	Discrepancia esperada 'KK' con 'E356K: D399K'
4	D / 68	A/2	Discrepancia esperada 'KK' con 'K392D: K409D'
5	D / 69	A / 68	hacen coincidir 'DE' con 'KK'; Producto AD esperado
6	D / 69	A / 69	no coincidencia 'DE' con 'DE'; Mezcla de medios cuerpos, AA, AD y DD esperados.
7	D / 69	A/1	Discrepancia esperada 'DE' con 'E356K: D399K'
8	D / 69	A/2	Discrepancia esperada 'DE' con 'K392D: K409D'

ES 2 740 749 T3

Tr. #	Primera VH / constructo #	Segunda VH / constructo #	Tercera VH / constructo #	Cuarta VH / constructo #	Especies esperadas
9	A / 68	B / 69	C/1	D/2	AB y CD
10	A / 68	A / 69	C/1	D/2	AA y CD
11	A / 68	B / 69	C/1	C/2	AB y CC

La Tabla 25 proporciona una visión general adicional de las masas de las especies esperadas, y los posibles contaminantes, de las transfecciones # 9-11 de la Tabla 24.

- 5 Tabla 25: Para cada una de las transfecciones # 9-11, las especies se clasifican por masa, la diferencia de masa se calcula con la masa anterior. Celdas grises: especies esperadas (y deseadas); cursiva: diferencia de masa muy pequeña para separarse en un análisis de nMS. *Especies: las letras individuales representan medios cuerpos; el código de dos letras IgG intacta

Tabla 25:

Transfección # 9		
Especie*	Masa	Diferencia de masa
C	72464,62	
D	72684,53	219,90
B	73070,99	386,47
A	73410,46	339,47
CC	144929,2	71518,78
CD	145149,2	219,90
DD	145369,1	219,90
BC	145535,6	166,56
BD	145755,5	219,90
AC	145875,1	119,57
AD	146095	219,90
BB	146142	47,00
AB	146481,5	339,47
AA	146820,9	339,47
Transfección # 10		
Especie*	Masa	Diferencia de masa
C	72464,62	
D	72684,53	219,90
A	73410,46	725,94
CC	144929,2	71518,78
CD	145149,2	219,90
DD	145369,1	219,90

AC	145875,1	506,03
AD	146095	219,90
AA	146820,9	725,94
Transfección # 11		
Especie*	Masa	Diferencia de masa
C	72464,62	
B	73070,99	606,37
A	73410,46	339,47
CC	144890,95	71480,49
BC	145535,61	644,66
AC	145875,08	339,47
BB	146141,98	266,90
AB	146481,45	339,47
AA	146820,92	339,47

5 Todas las muestras de proteínas purificadas obtenidas de las transfecciones # 1-11 se analizaron en SDS-PAGE, y se incluyeron tres muestras de control (Figura 26). Además, se realizó un análisis de nMS en muestras de proteínas de las transfecciones # 9-11 para identificar todas las especies en las muestras. Como se puede observar en la Figura 26, las transfecciones # 3 y # 4 resultaron en el desajuste esperado entre los constructos 'KK' y 'E356K:D399K' o 'K392D: K409D' y la cantidad de medios cuerpos en muestras de proteína de estas transfecciones excedió la cantidad de moléculas de IgG completas. Las transfecciones # 7 y # 8 dieron como resultado muestras de proteínas en las que tanto la mitad de los cuerpos como la IgG completa están presentes en cantidades aproximadamente iguales. Sin embargo, a partir de SDS-PAGE no se puede deducir si la IgG completa representa un dímero DE/DE, un dímero DE/E356K: D399K o un dímero DE/K392D:K409D. Sorprendentemente, virtualmente no se observaron medios cuerpos en las muestras de las transfecciones # 9-11.

15 En la Figura 27, se presenta el análisis nMS de las transfecciones # 9 y # 11. Los porcentajes de las especies esperadas y las especies contaminantes se calcularon por altura de pico. Se demostró que, para la transfección # 9, las especies esperadas 'AB y CD' están representadas por el 97% en la mezcla (30% de AB y 67% de CD), mientras que solo está presente tan poco como aproximadamente el 3% de BD contaminante (Figura 27A). Para la transfección # 11, las especies esperadas 'AB y CC' están representadas por el 94% en la mezcla (33% de AB y 61% de CC) mientras que solo tan poco como aproximadamente el 6% de BC contaminante (4,1%) y AC (1,8%) está presente (Figura 27B). Estos datos muestran que, de hecho, es posible producir mezclas más complejas de IgG y/o biespecíficos, tal como las mezclas 'AB y CD' o 'AB y CC' cuando se usa un segundo conjunto de vectores 'ortogonales' en combinación con DEKK. La combinación de los constructos de inversión de carga junto con los constructos DEKK da como resultado una formación muy limitada de dímeros "cruzados". Al ajustar la relación de transfección, se espera que los bajos porcentajes de estos subproductos contaminantes puedan reducirse aún más.

Ejemplo 24: estudio farmacocinético de dosis única en ratones.

25 Para estudiar el comportamiento farmacocinético (pK) de anticuerpos biespecíficos que portan la combinación DEKK de mutaciones en sus regiones CH3, en este estudio, se determinaron y compararon los parámetros de pK para tres lotes diferentes de IgG.

30 Los tres lotes de IgG incluían 1) anticuerpo parental anti-toxoide tetánico de tipo silvestre 1337:1337 (dos Fab MF1337 en un esqueleto de Fc de tipo silvestre); 2) anticuerpo parental anti-toxoide tetánico de tipo silvestre 1516:1516 (dos Fab MF1516 en un esqueleto de Fc de tipo silvestre); 3) anticuerpo anti-toxoide tetánico biespecífico con modificación de CH3 1516:1337 que transporta la combinación de DEKK de mutaciones en su región Fc (Fab MF1516 en el lado DE, Fab MF1337 en el lado KK).

35 Los anticuerpos parentales 1337:1337 y 1516:1516 se seleccionaron como especificidades para ser incluidos en el producto biespecífico DEKK, ya que se sabía, de acuerdo con estudios anteriores, que en varias cepas de ratones no estaba presente una respuesta en suero previo a la dosis contra estos anticuerpos. NB: la presencia de una respuesta en suero previo a la dosis, por supuesto, invalidaría el estudio. Además, existe una diferencia de masa suficiente entre

los anticuerpos parentales para permitir la identificación de las especies 1337:1337 (Fc de tipo silvestre), 1516:1337 (Fc de DEKK) y 1516:1516 (Fc de tipo silvestre) por nMS. Los tres lotes de IgG se prepararon como se describió anteriormente, pero el ADN utilizado para la transfección se elaboró utilizando un kit MaxiPrep sin endotoxinas para asegurar que la cantidad de endotoxinas sea lo más baja posible. Los lotes se analizaron posteriormente para determinar la concentración de proteínas, los niveles de agregados, los niveles de endotoxinas y el porcentaje de producto biespecífico. Se demostró que se cumplieron los criterios de aceptación para el uso posterior de los lotes de IgG en un estudio de pK, es decir, la concentración de IgG después de la filtración en gel fue $> 0,3$ mg/mL, los niveles de agregados fueron $< 5\%$, los niveles de endotoxinas fueron < 3 EU/mg de proteína y el lote de DEKK contenían $> 90\%$ de IgG biespecífica. La espectrometría de masas nativa de las muestras filtradas en gel mostró que las especies esperadas estaban presentes en altos porcentajes. En la muestra 1516:1337 se detecta una pequeña cantidad del homodímero DE:DE, que se estima que es aproximadamente 2% (Figura 28). Se concluyó que los 3 lotes de IgG están calificados para ser utilizados en el estudio de pK.

Para la comparación de los parámetros de pK entre los tres lotes, se administró a 3 grupos de ratones C57BL/6J hembra (Harlan, Países Bajos) 1 mg/kg de IgG humana (5 mL/kg de solución de inmunoglobulina/kg de peso corporal). En el momento de la dosificación, los animales tenían entre 7-8 semanas de edad y tenían un peso corporal de aproximadamente 18-20 gramos. Las muestras de sangre se recogieron antes de la dosis y a los 15, 60 minutos, y 2, 4, 8, 24, 48, 96, 168, 268 y 336 h después de la dosificación. Las muestras de suero se prepararon y almacenaron a < -20 °C hasta el análisis. Cada grupo constaba de 3 subgrupos de 4 ratones, es decir, 12 ratones/grupo. De cada ratón se tomaron muestras en 6 puntos de tiempo. El bienestar de los animales se mantuvo de acuerdo con los principios generales que regulan el uso de animales en experimentos de las Comunidades Europeas (Directiva 86/609/CEE) y la legislación holandesa (Ley de Experimentos en Animales, 1997). Este estudio también se realizó de conformidad con los Estándares para el Cuidado Humano y el Uso de Animales de Laboratorio, de acuerdo con lo publicado por la Oficina de Bienestar de Animales de Laboratorio de los Institutos Nacionales de la Salud de los Estados Unidos. Con el número de identificación 45859-01 (fecha de caducidad: 30 de abril de 2015).

Los ratones del grupo 1 recibieron el anticuerpo IgG 1516:1516 mono específico de longitud completa (triángulos); los ratones del grupo 2 recibieron el anticuerpo IgG 1337:1337 mono específico de longitud completa (cuadrados); los ratones del grupo 3 recibieron el anticuerpo IgG 1516:1337 biespecífico de longitud completa (diamantes), con regiones CH3 con modificación de DEKK (1516 en el lado DE y 1337 en el lado KK).

Se aplicó un ensayo ELISA para el análisis cuantitativo de anticuerpos humanos monoclonales en suero de ratón utilizando un ELISA de IgG humana cuantitativo (ZeptoMetrix, NY, EE. UU., kit de ELISA nº 0801182). En resumen, el ensayo ELISA se basa en el principio de que el anticuerpo monoclonal humano se une a IgG antihumana recubierta en una placa de ELISA de 96 pocillos. El anticuerpo unido se visualizó posteriormente usando un anticuerpo policlonal anti-IgG humano conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP). La densidad óptica (OD) de cada pocillo es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpo en la muestra de suero. Los resultados se muestran en la Figura 29, y se observó que los niveles en suero de ambos anticuerpos IgG de longitud completa biespecíficos que portan la combinación de mutaciones DEKK y sus anticuerpos mono específicos parentales son sorprendentemente similares. Se concluye que las mutaciones de CH3 presentes en el anticuerpo biespecífico de DEKK no alteran la estabilidad ni la semividua, y la variante de DEKK se comporta como IgG de tipo silvestre.

Referencias

Deisenhofer J., *Biochemistry* 1981 (20) 2361- 2370;

Miller S., *J. Mol. Biol.* 1990 (216) 965-973;

Padlan, *Advances in Protein Chemistry* 1996 (49) 57-133

Ellerson JR., et al., *J. Immunol* 1976 (116) 510 - 517;

Lee and Richards *J. Mol. Biol.* 1971 (55) 379.

Gunasekaran et al *J. Biol. Chem.* 2010 (285) 19637-19646

De Vries *Nature Protocols* 2010 (5) 883

Kabat et al, (1991) *Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach* (M. Butler, ed., IRL Press, 1991 Merchant *Nature BioTechnology* 1998 (16) 677

Ridgeway *Protein Engineering* 1996 (9) 617- 621

Davis JH. et al., *Protein Engineering, Design & Selection* 2010 (23) 195 - 202

Papadea y Check. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 1989; 27 (1): 27- 58.

Tissue Culture, Academic Press, Kruse y Paterson, editores (1973)

Ionescu et al., J. Pharm. Sci. 2008 (97) (1414)

Current protocols in Protein Science 1995, Coligan JE et al., Wingfield PT, ISBN 0-471-11184-8, Bendig 1988.

Capelle, M.A.H., Brugger, P., Arvinte, T. Vaccine 23 (2005), 1686 -1694

Demeule, B., Lawrence, M.J., Drake, A.F., Gurny, R., Arvinte, T. Biochim. Biophys. Acta 1774 (2007a), 146-153

5 Demeule, B., Gurny, R., Arvinte, T., Int. J. Pharm 329 (2007b), 37-45

Lakowicz, J.R., Principles of fluorescence spectroscopy; Second Edition Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow, (2006) ISBN 0-306-46093-9.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una molécula heterodimérica que comprende un dominio CH3 a partir de una única célula, en donde dicha molécula comprende dos dominios CH3 de IgG humana que son capaces de formar una interfaz, comprendiendo dicho método proporcionar en dicha célula
- 5 a. Una primera molécula de ácido nucleico que codifica una primera cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 de la IgG humana,
- b. Una segunda molécula de ácido nucleico que codifica una segunda cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 de la IgG humana,
- 10 en donde dicha primera cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 comprende un residuo de lisina (K) en la posición del aminoácido 366 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE y en donde la segunda cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 comprende un residuo de ácido aspártico (D) en la posición del aminoácido 351 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE, y dicho método comprende además la etapa de cultivar dicha célula huésped y permitir la expresión de dichas dos moléculas de ácido nucleico y la recolección de dicha molécula heterodimérica que comprende un dominio CH3 del cultivo.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, que comprende además proporcionar a dicha célula huésped una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena ligera común.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que dicha primera cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 comprende además un residuo de lisina (K) en la posición del aminoácido 351 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE.
- 20 4. El método de la reivindicación 1 o 2 o 3, en el que dicha segunda cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 comprende además un residuo de ácido glutámico (E) o un residuo de ácido aspártico (D) en la posición del aminoácido 349 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE, y/o un residuo de ácido glutámico (E) en la posición del aminoácido 368 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE.
- 25 5. El método de la reivindicación 4, en el que dicha segunda cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 comprende además un residuo de ácido glutámico (E) en la posición del aminoácido 368 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE.
6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la presencia de homodímeros contaminantes es menos del 5%, preferiblemente menos del 2%, más preferiblemente menos del 1%, y lo más preferiblemente los homodímeros contaminantes están esencialmente ausentes.
- 30 7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que cada una de las cadenas polipeptídicas que comprenden un dominio CH3 comprende además una región variable que reconoce un epítipo objetivo.
8. El método de la reivindicación 7, en el que cada una de las 2 regiones variables de las cadenas polipeptídicas que comprenden un dominio CH3 reconoce un epítipo objetivo diferente.
- 35 9. Una molécula heterodimérica que comprende un dominio CH3 obtenible por los métodos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
10. Un anticuerpo heterodimérico que comprende dos dominios CH3 de IgG humana, en donde uno de dichos dos dominios CH3 comprende un residuo de ácido aspártico (D) en la posición del aminoácido 351 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE y un residuo de ácido glutámico (E) en la posición del aminoácido 368 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE y en el que el otro de dichos dos dominios CH3 comprende un residuo de lisina (K) en la posición del aminoácido 366 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE y un residuo de lisina (K) en la posición del aminoácido 351 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE.
- 40 con el sistema de numeración de la UE y en el que el otro de dichos dos dominios CH3 comprende un residuo de lisina (K) en la posición del aminoácido 366 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE y un residuo de lisina (K) en la posición del aminoácido 351 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE.
- 45 11. Una célula huésped recombinante que comprende secuencias de ácido nucleico que codifican al menos una primera y una segunda cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 de la IgG humana, en la que dicha primera cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 comprende un residuo de lisina (K) en la posición del aminoácido 366 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE y en la que dicha segunda cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 comprende un residuo de ácido aspártico (D) en la posición del aminoácido 351 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE.
- 50 12. Una composición farmacéutica que comprende una molécula heterodimérica que comprende un dominio CH3 de acuerdo con la reivindicación 9 o un anticuerpo heterodimérico de acuerdo con la reivindicación 10, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
13. Un método para elaborar una célula huésped para la producción de una molécula heterodimérica que comprende un dominio CH3, comprendiendo el método la etapa de introducir en dicha célula huésped las secuencias de ácido

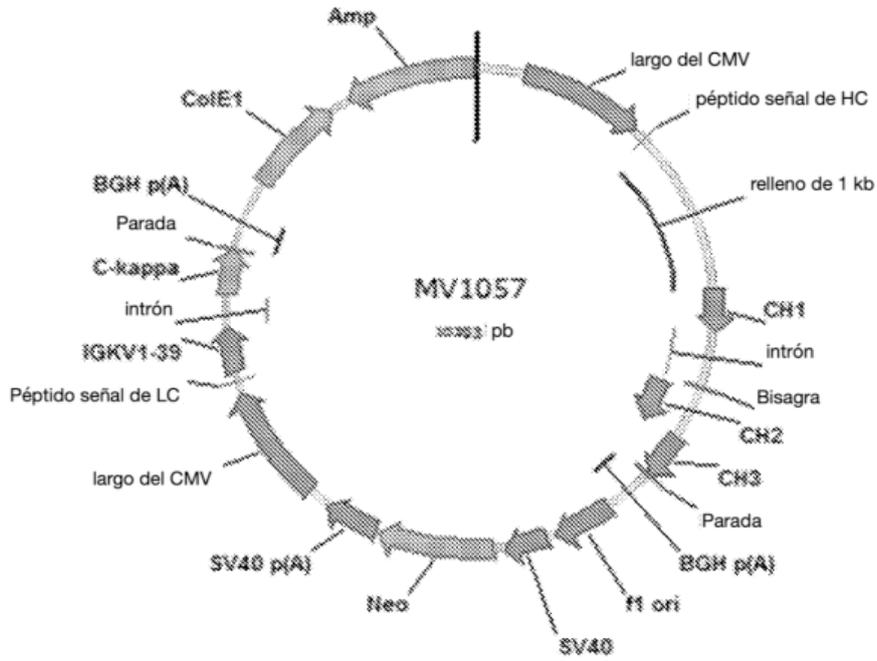
5 nucleico que codifican al menos una primera y una segunda cadena polipeptídica que comprende el dominio CH3 de IgG humana, en el que dicha primera cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 comprende un residuo de lisina (K) en la posición del aminoácido 366 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE y en el que dicha segunda cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 comprende un residuo de ácido aspártico (D) en la posición del aminoácido 351 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE, en el que dichas secuencias de ácido nucleico se introducen de forma consecutiva o concomitante.

14. Las células huésped recombinantes de acuerdo con la reivindicación 11, o las células huésped recombinantes obtenidas por un método de acuerdo con la reivindicación 13, que producen una molécula heterodimérica que comprende un dominio CH3 de IgG humana.

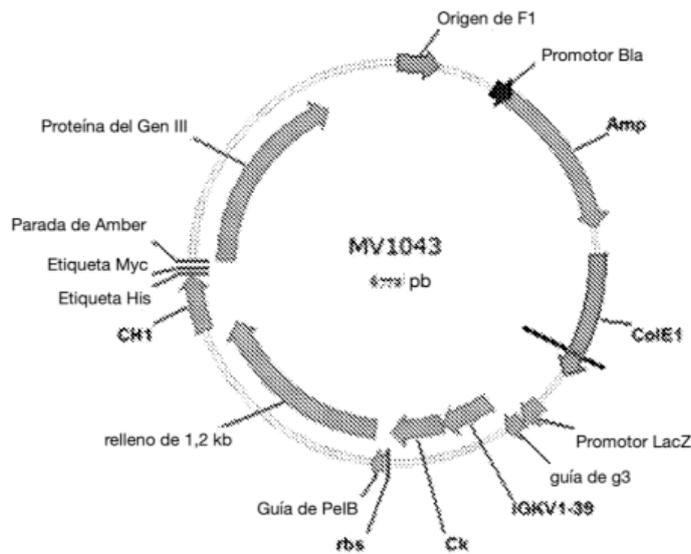
10

Figura 1:

A) representación esquemática del vector del constructo MV1057



B) representación esquemática del vector de despliegue en fagos MV1043



ES 2 740 749 T3

Figura 2: secuencia de aminoácidos de Fc de IgG de tipo silvestre, como está presente en el vector del constructo MV1057 (esquema de numeración de la UE aplicado)

131	141	151	161	171	181
SSKSTSGGTA	ALGCLVKDYF	PEPVTVSWNS	GALTSGVHTF	PAVLQSSGLY	SLSSVVTVPS
191	201	211	221	231	241
SSLGTQTYIC	NVNHKPSNTK	VDKRVEPKSC	DKTHTCPPCP	APELLGGPSV	FLFPPKPKDT
251	261	271	281	291	301
LMISRTPEVT	CVVVDVSHED	PEVKFNWYVD	GVEVHNAKTK	PREEQYNSTY	RVVSVLTVLH
311	321	331	341	351	361
QDWLNGKEYK	CKVSNKALPA	PIEKTISKAK	GQPREPQVYT	LPPSREEMTK	NQVSLTCLVK
371	381	391	401	411	421
GFYPSDIAVE	WESNGQPENN	YKTTTPVLDS	DGSFFLYSKL	TVDKSRWQQG	NVFSCSVMHE
431	441				
ALHNHYTQKS	LSLSPGK				

Figura 3: secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de las regiones VH utilizadas

MF1025_VH

gaggtgcagctggtggagtctggggaggcttggtagcagcctggggggtccctgagactctcctgtgcag
cctctggattcacctttagcagctatgcatgagctgggtccgccaggctccaggaaggggctggagtg
ggtctcagctattagtggtagtggtggtagcacatactacgcagactccgtgaagggccggttcaccatc
tccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgt
attactgtgcaagggccgattggtgggcgacttttgactactggggccaaggtaccctggtcacc

MF1025_VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYMSWVRQAPCKGLEWVSAISCSGSGSTYYADSVKGRFTI
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARADWWAIFDYWGQGLVT

MF1122_VH

gaggtgcagctggtggagtctggggaggcgtggtagcagcctggggagggtccctgagactctcctgtgcag
cctctggattcaccttcagtagctatggcatgactgggtccgccaggctccaggaaggggctggagtg
ggtggcagttatcatatgatggaagtaataaatactatgcagactccgtgaagggccgattcaccatc
tccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagctgaggacacggccgtgt
attactgtgcaagagccctcttcacgaccatcgccatggactattggggccaaggtaccctggtcacc

MF1122_VH

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPCKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTI
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARALFTTIAMDYWGQGLVT

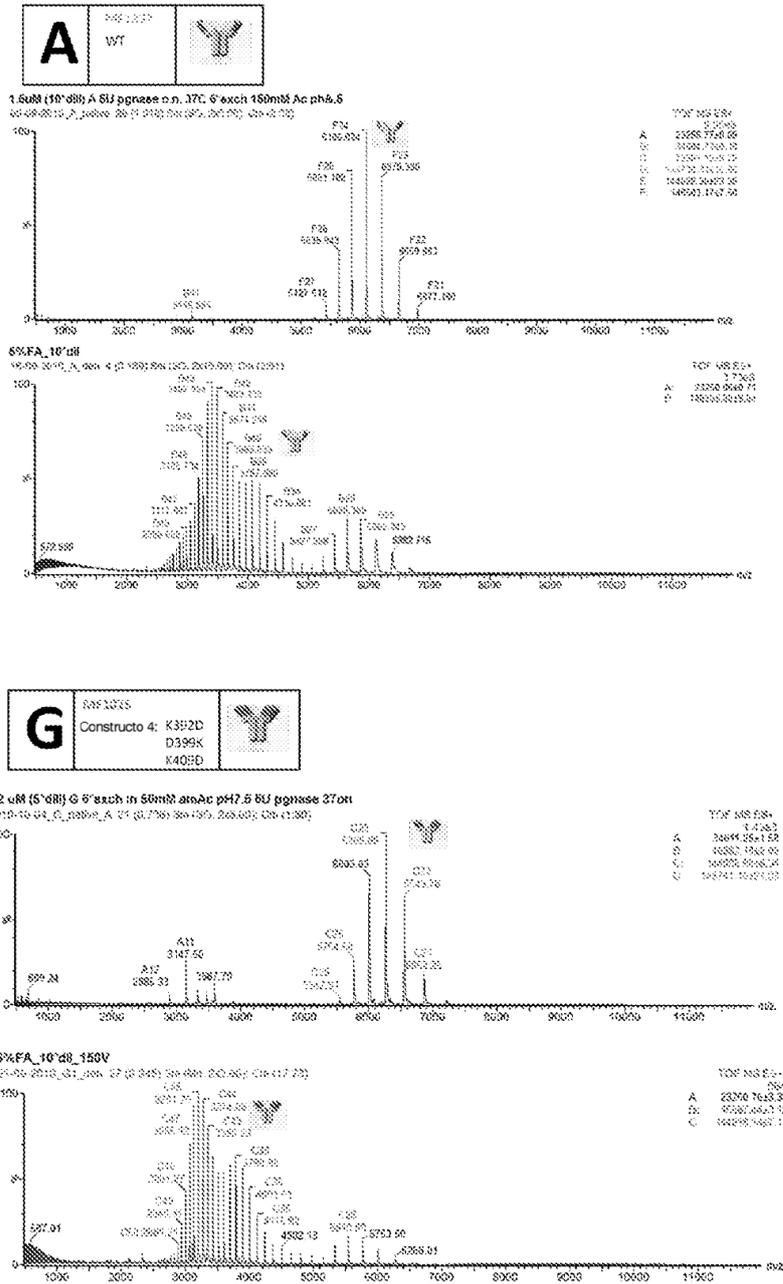
MF1337 VH

gaggtgcagctggtggagactggggctgaggtgaagaagccgggggctcagtgaaaggtctcctgcaagcctct
gactacatcttcaccaaataatgacatcaactgggtgcccaggccctggacaagggcttgaatggatgggatgg
atgagcgtaacactggaaacacgggctatgcacagaagttccagggcagagtcaccatgaccagggacacgtcc
ataaacacagcctacatggagctgagcagcctgacatctggtgacacggccgtttatctgtgagaggagtagt
cttttcaagacagagacggcgcctactatcacttcgctctggacgtctggggccaagggaccacgggtcacc

MF1337

VHEVQLVETGAEVKPKGASVKVSKASDYIFTKYDINWVRQAPQGLEWMCWMSANTGNTGYAQKFQGRVTMTRD
TSINTAYMELSSLTSGDTAVYFCARSSLFKTETAPYYHFALDVWGQGLTIVT

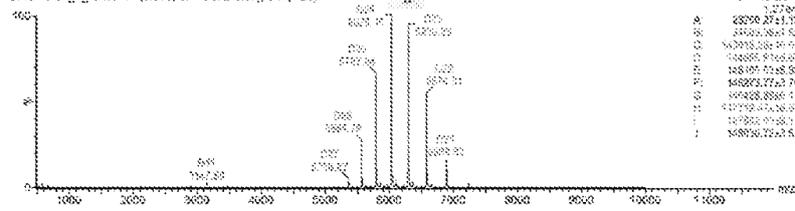
Figura 4: datos del espectro de masas de transfecciones A, G y H



H	MS1127	
	Constructo 5:	
	E356K	
	E357K	
	K439C	
K570Q		

2.2 uM (5'dB) H⁺ exch in 50mM amAc pH7.5 5U pgmase 37on

21-10-10-01_H_puMw: 11 (3.89): SM (2%, 2:5.00), DM (1.20)

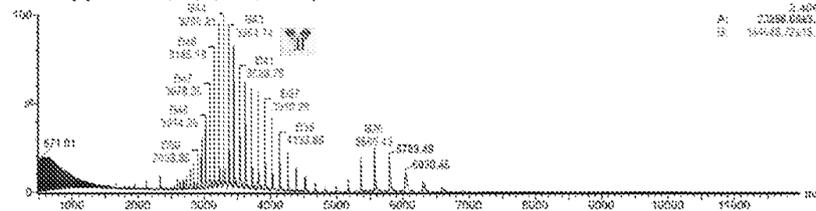


YOM MS ESI+

A:	23290.2741.12
B:	24420.2841.52
C:	563915.2841.92
D:	100005.9169.02
E:	148191.5242.58
F:	145292.7743.70
G:	149428.8844.12
H:	419192.4154.52
I:	147292.9169.12
J:	148936.7243.51

5%FA_10'dB_180V

21-08-2010_H_000: 12 (3.420): SM (2%), DM (1.20), DM (1.20)



YOM MS ESI+

A:	23290.2741.12
B:	144448.2941.52

Figura 6:

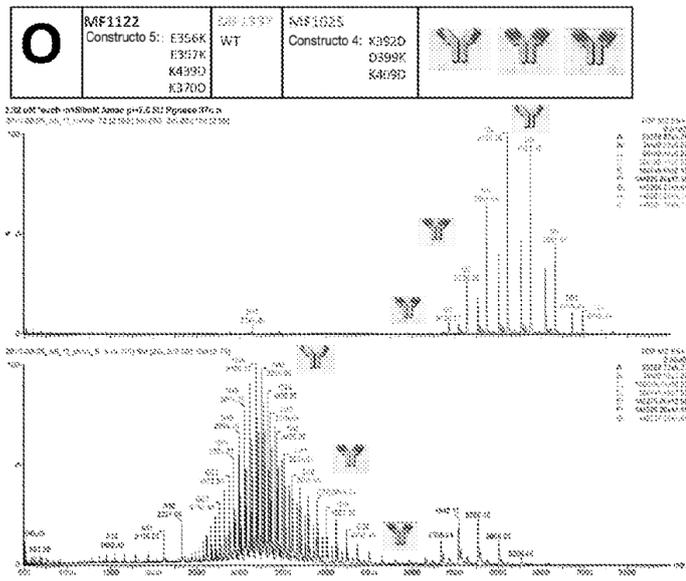
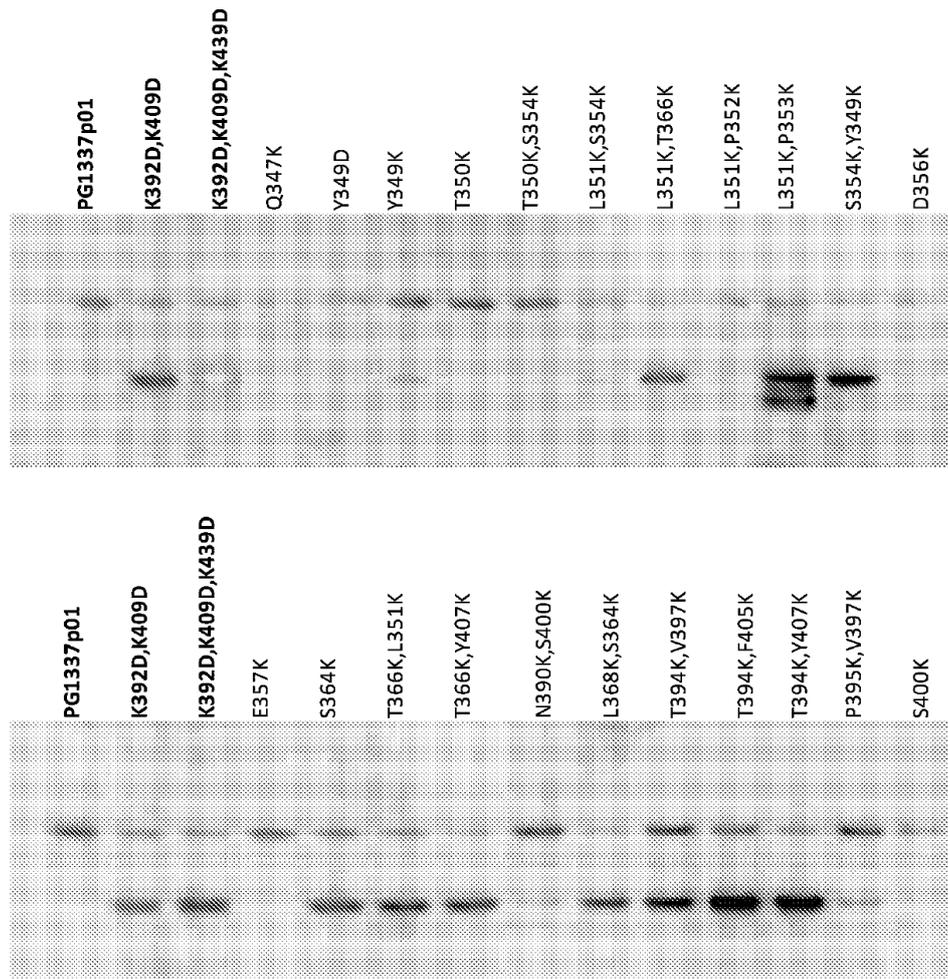


Figura 7:



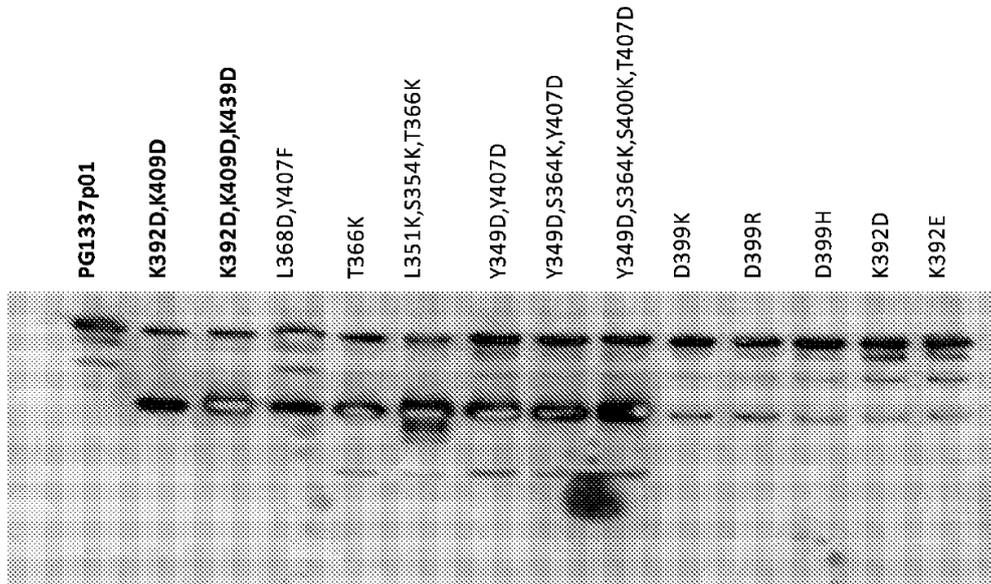
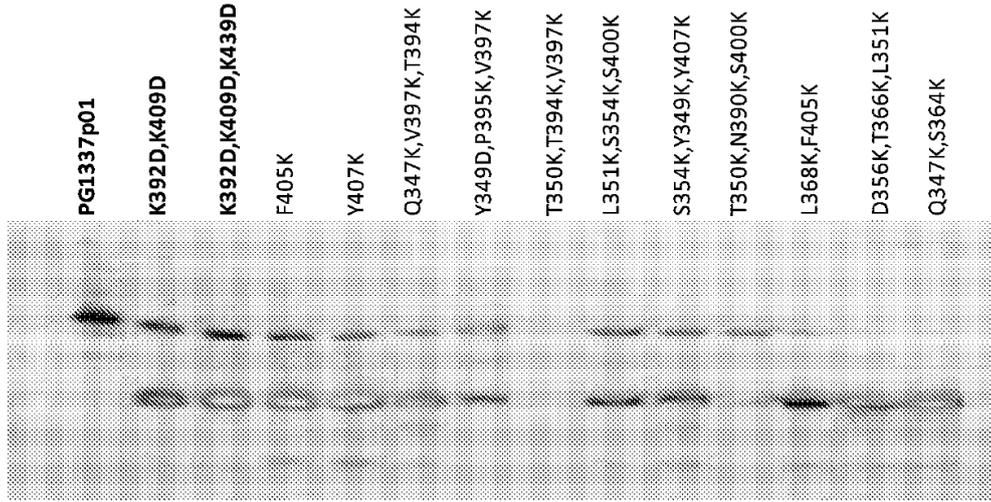
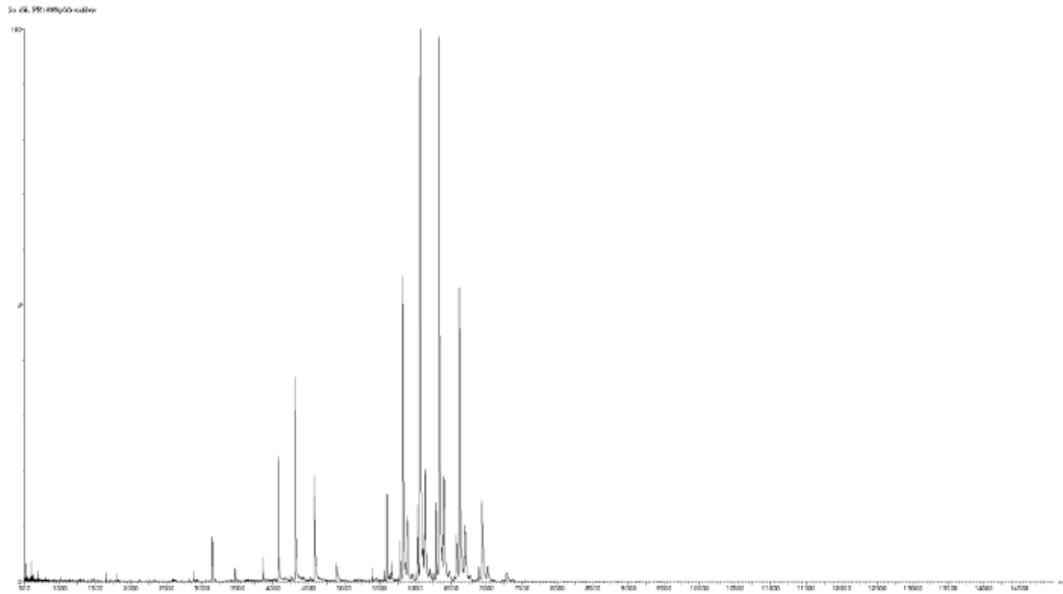
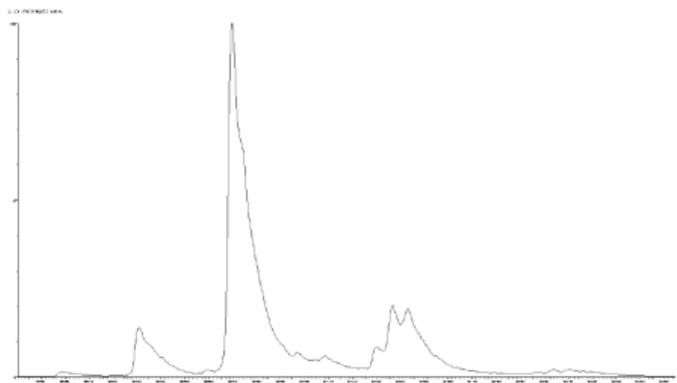


Figura 8:



A) Espectro de MS nativo de la muestra de transfección ZO (T366K/L351'D)



B) Espectro de MS complejo de la muestra de transfección ZO (T366K/L351'D). El pico segundo/principal representa la molécula biespecífica.

Figura 9:

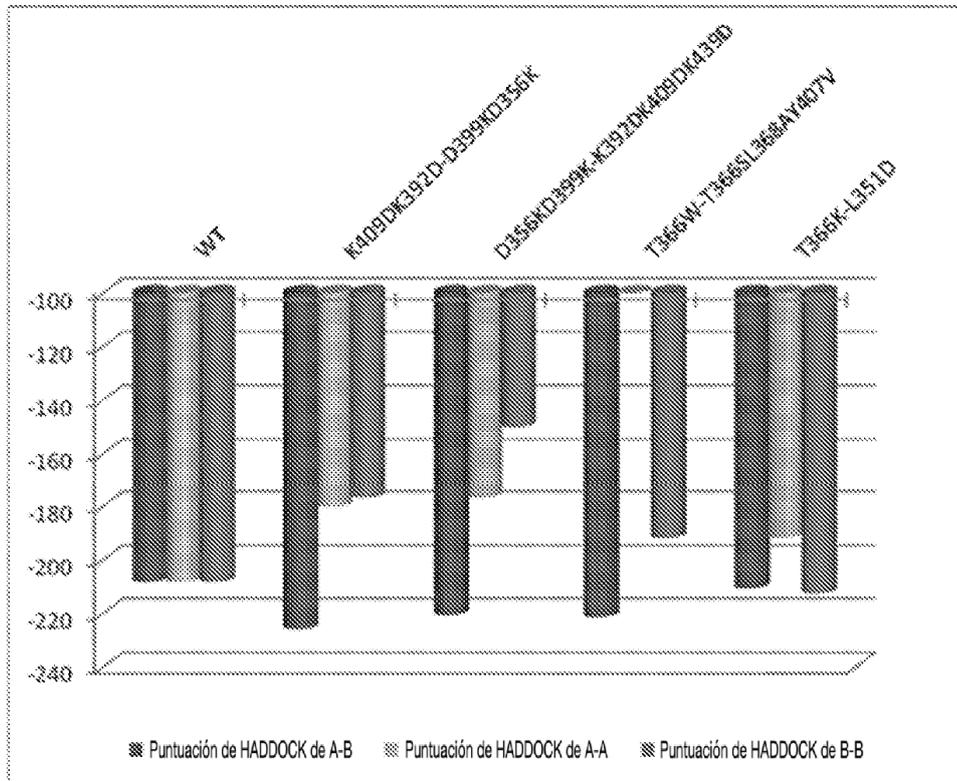


Figura 11:

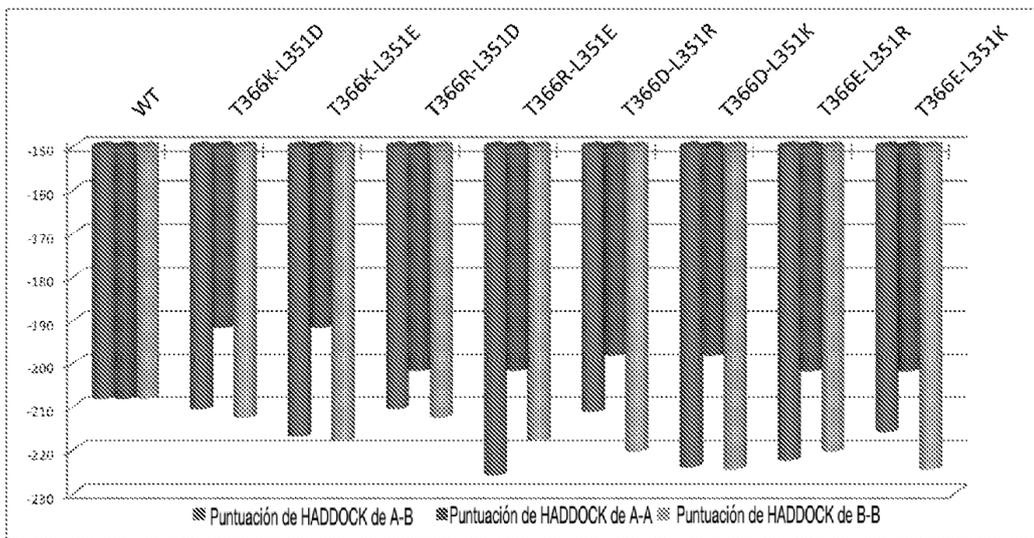
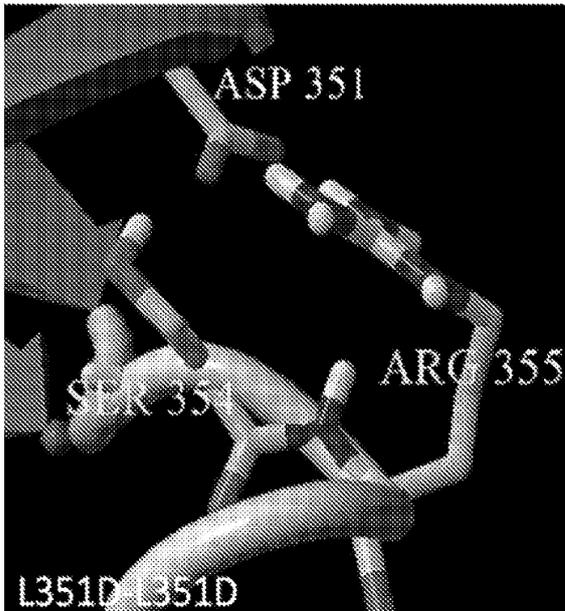


Fig 12:

A



B

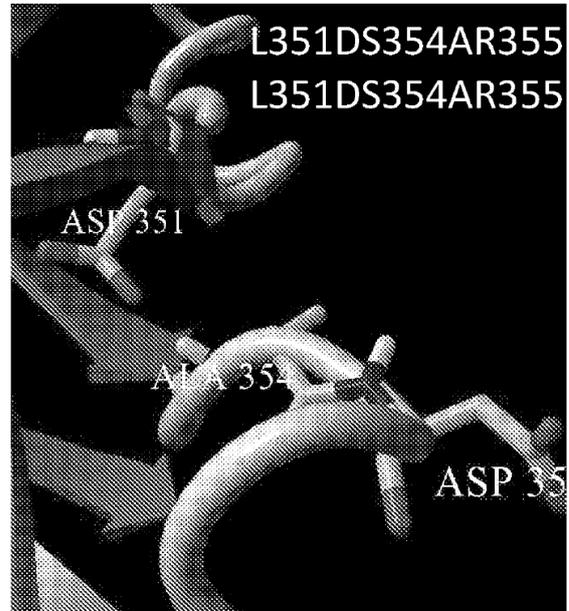


Figura 13:

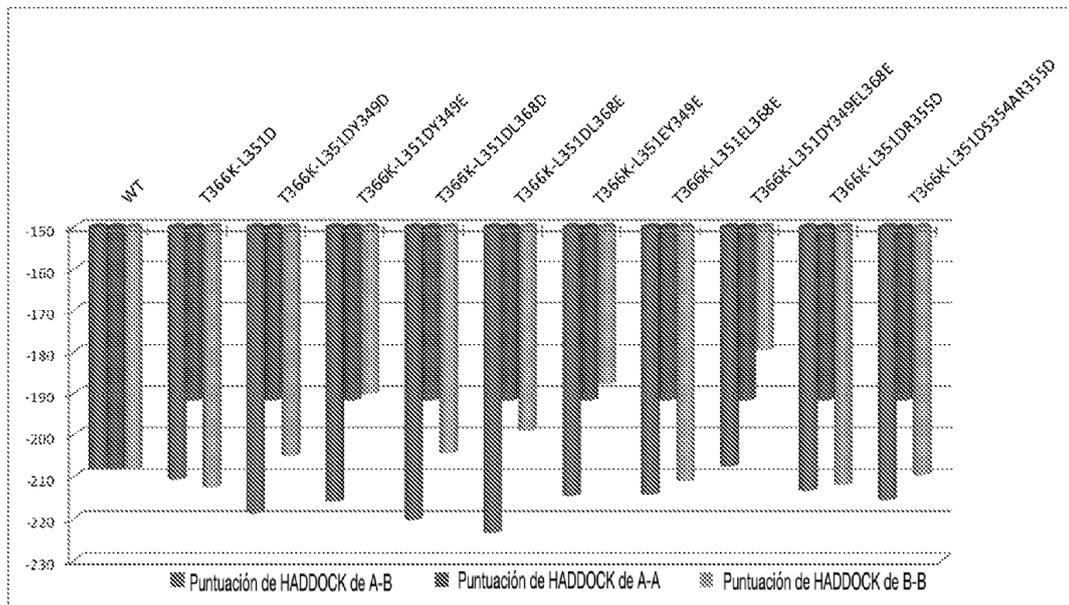


Figura 14:

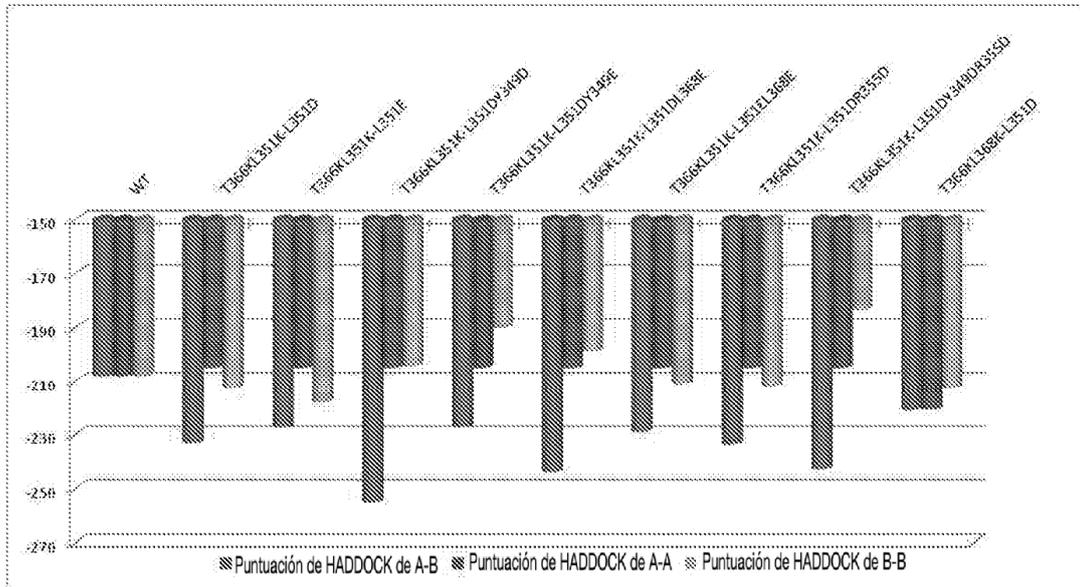


Figura 15:

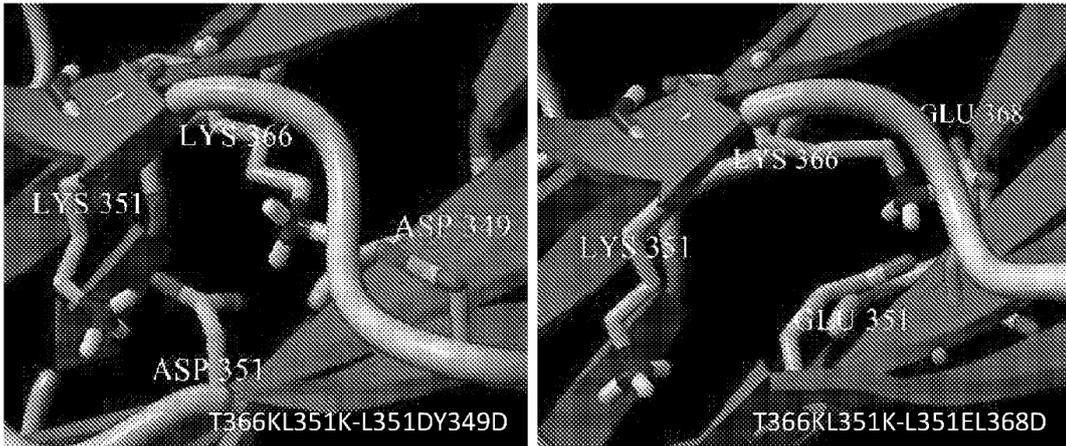


Figura 16:

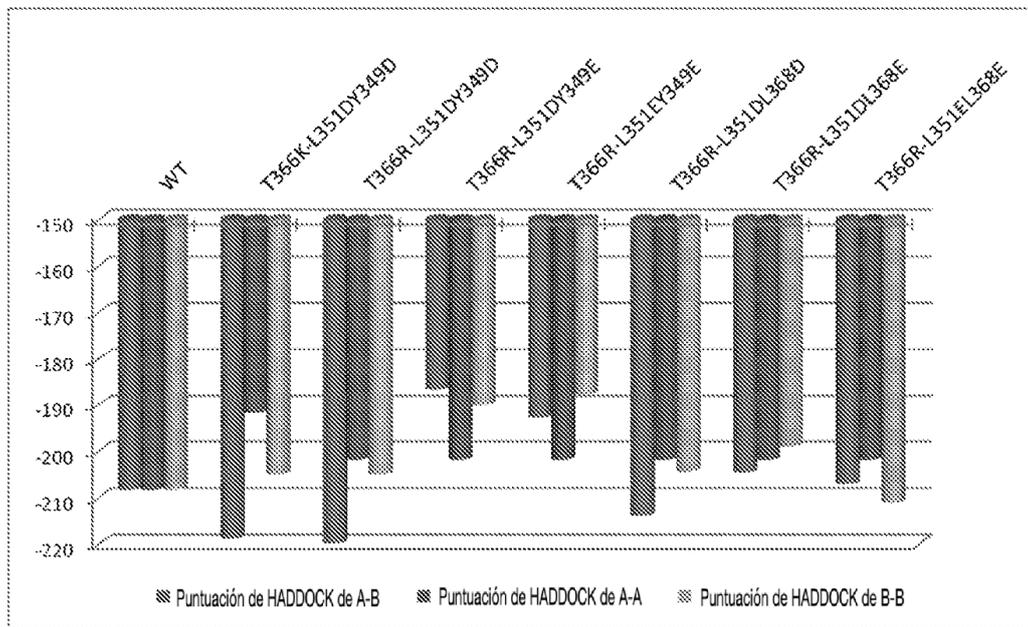


Figura 17:

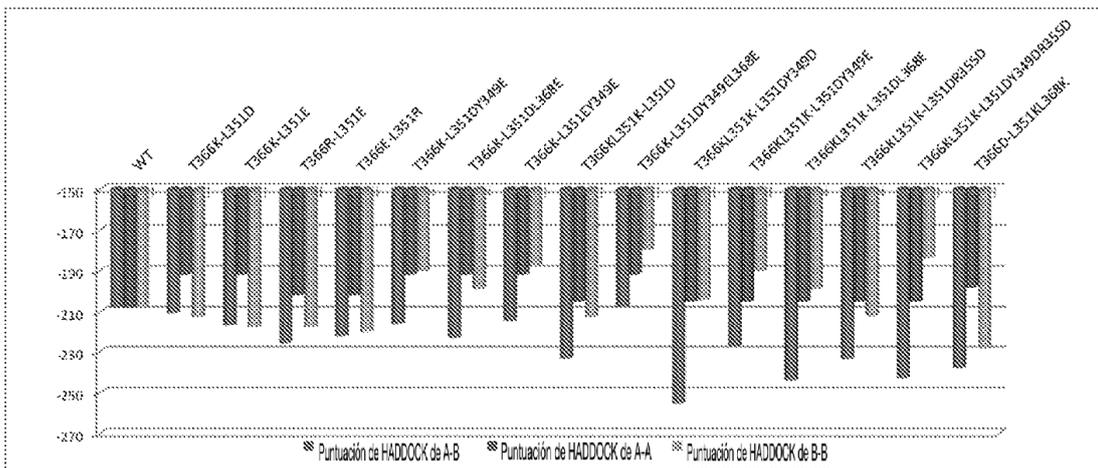


Figura 18:

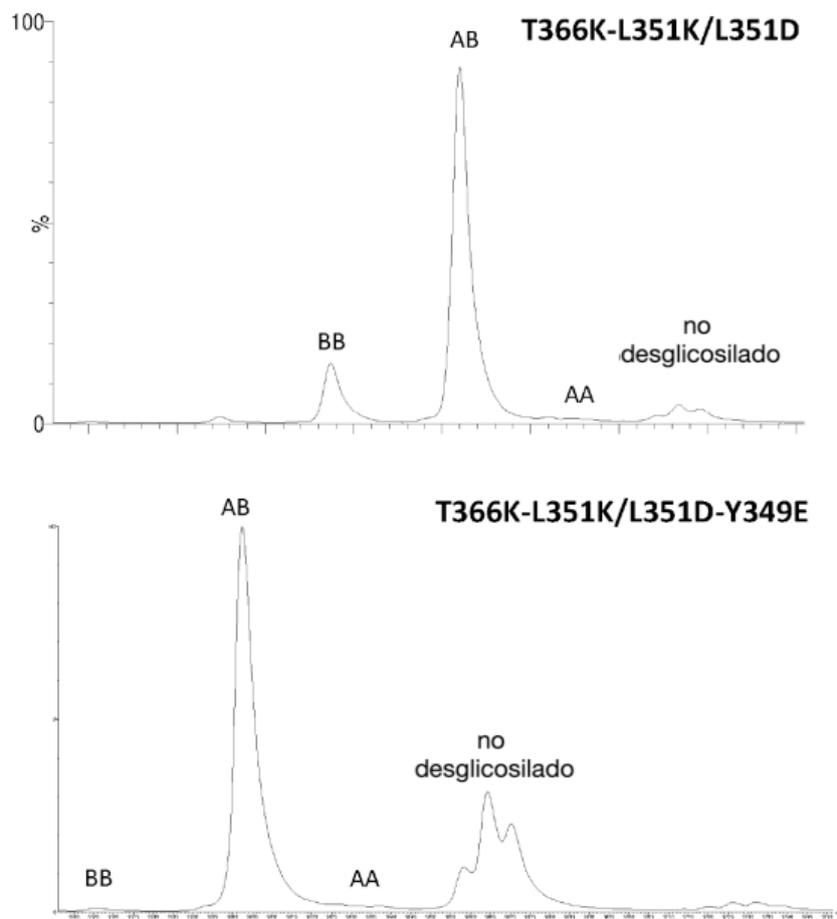


Figura 19A:

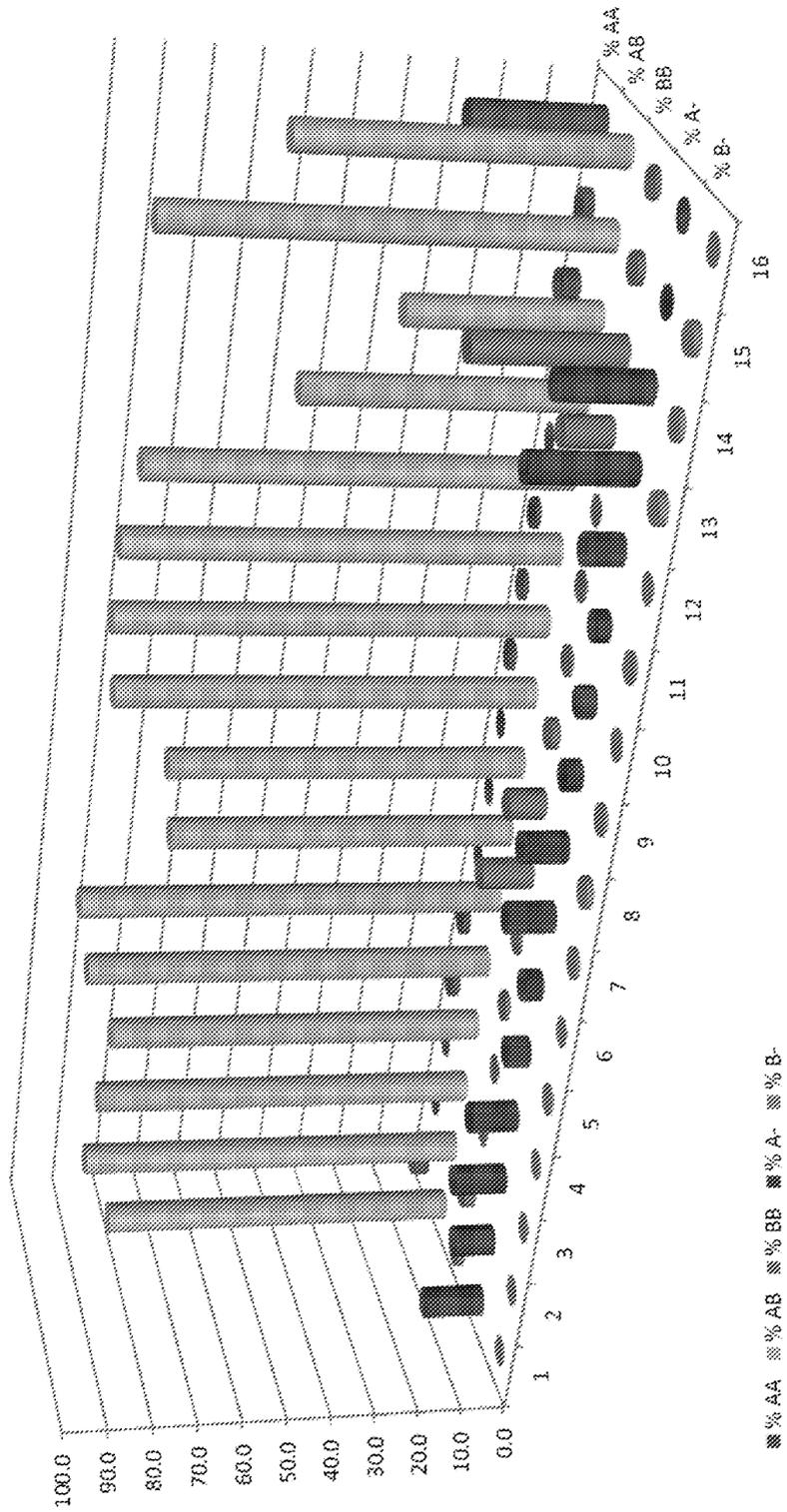


Figura 19B:

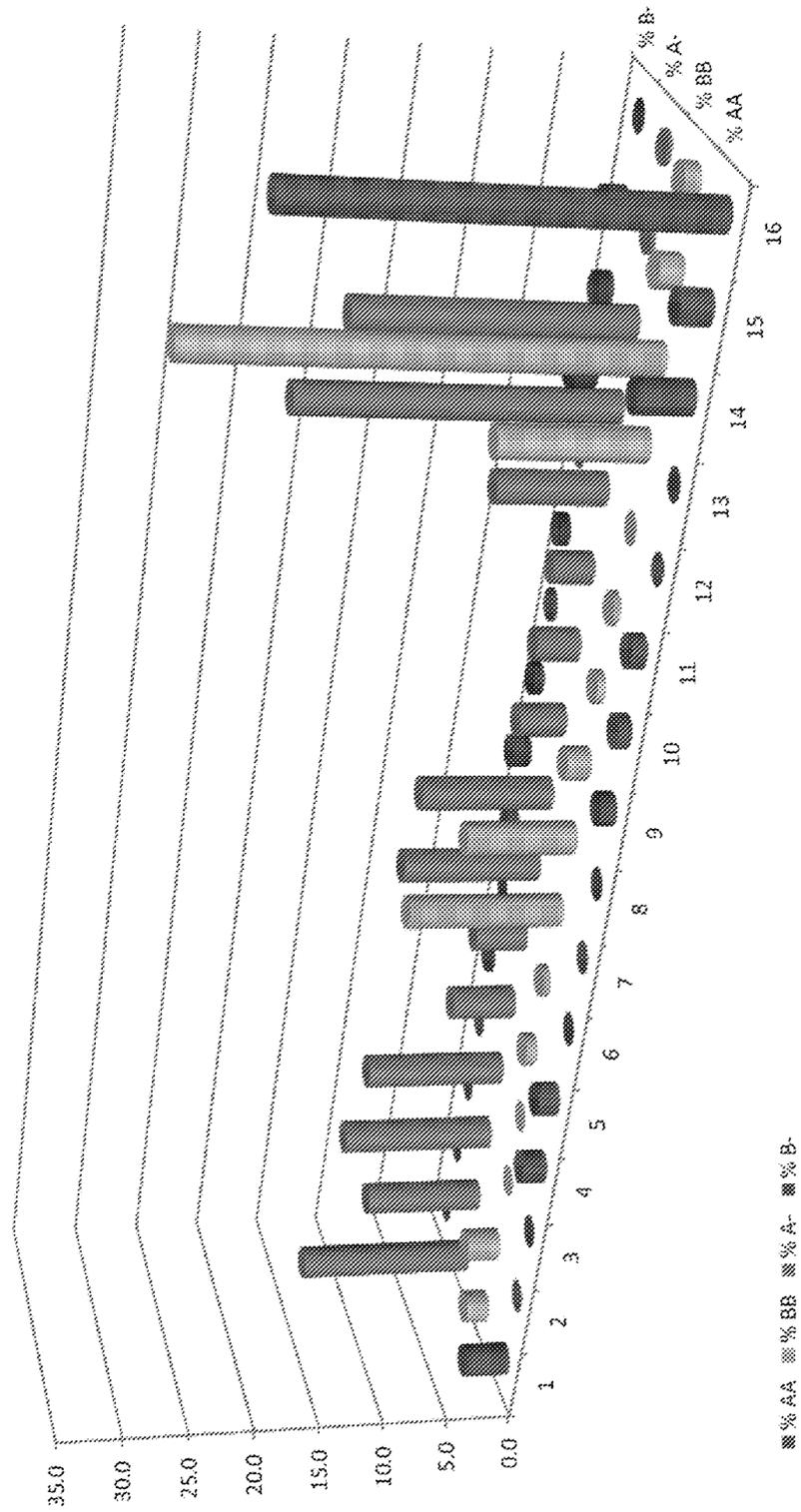
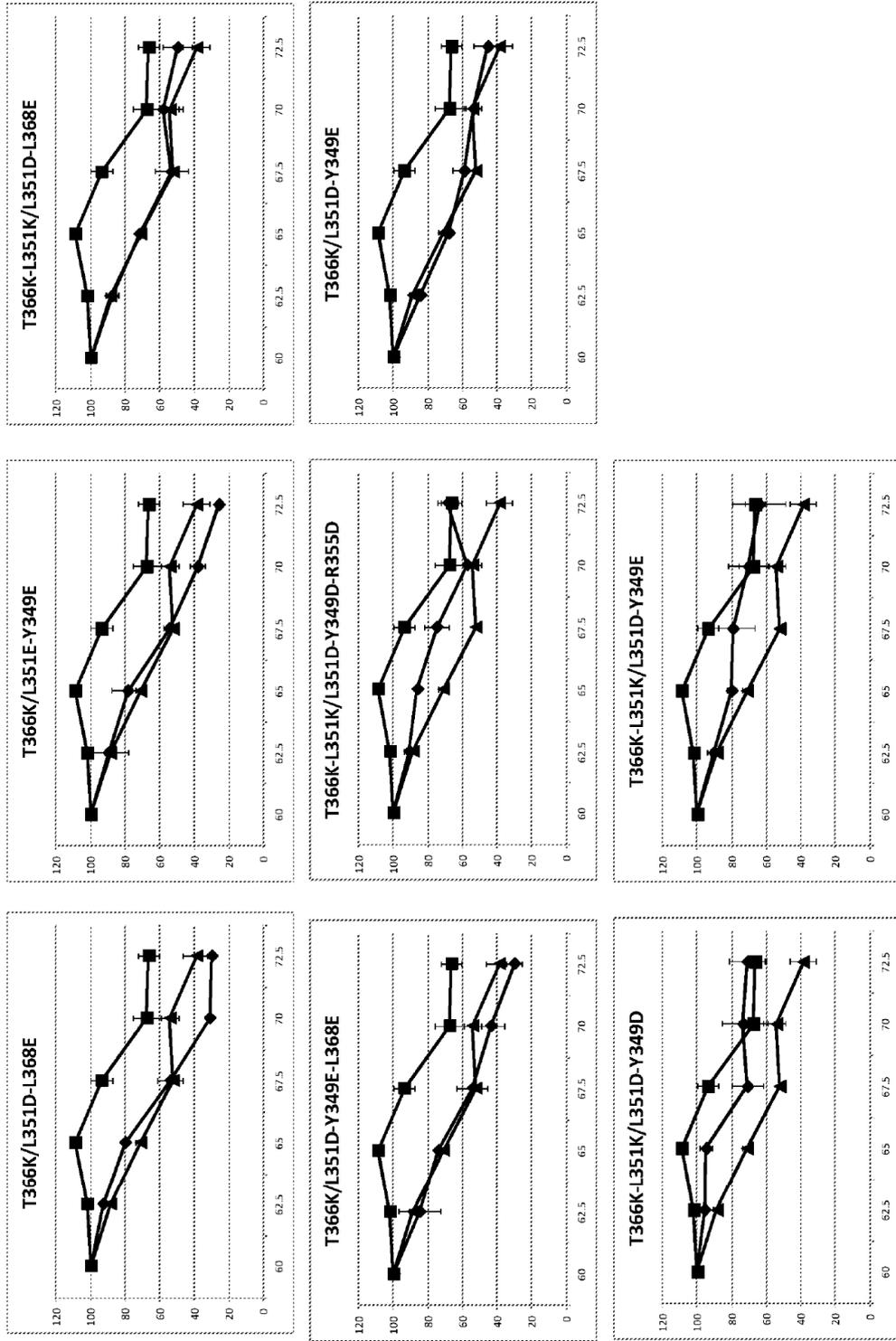


Figura 20:



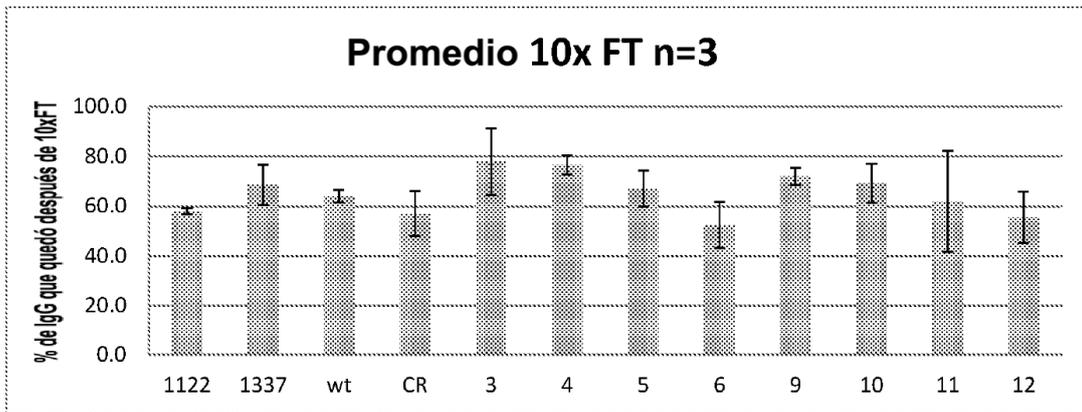
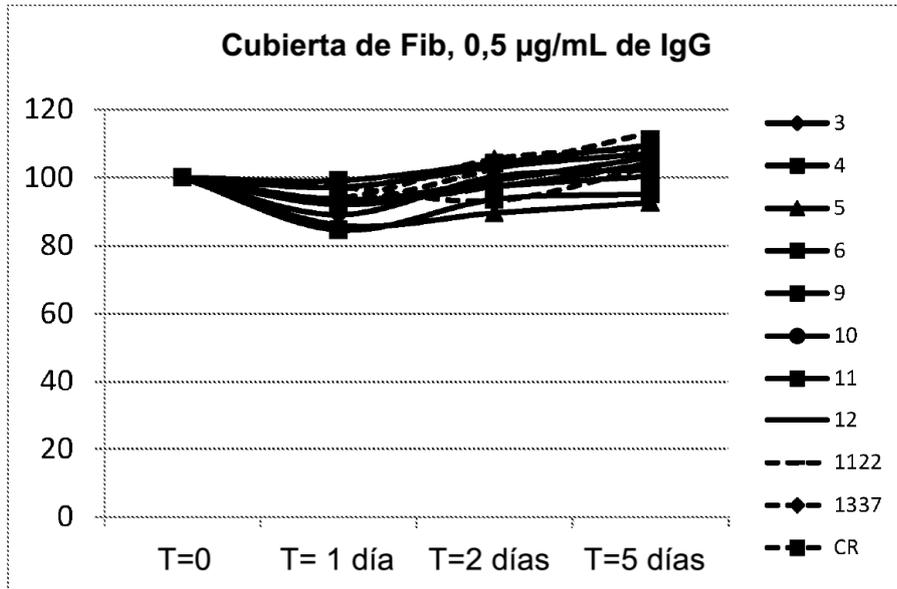


Figura 22:

A



B

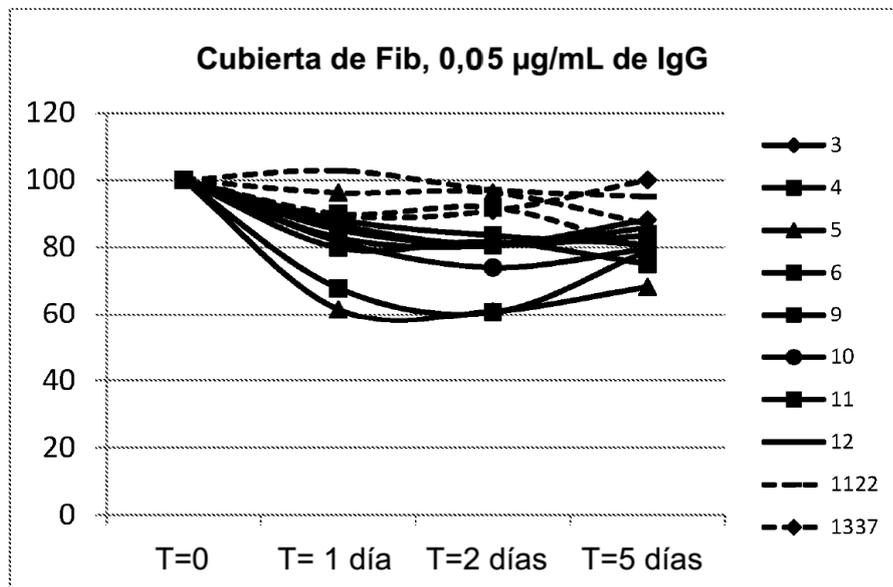


Figura 23:

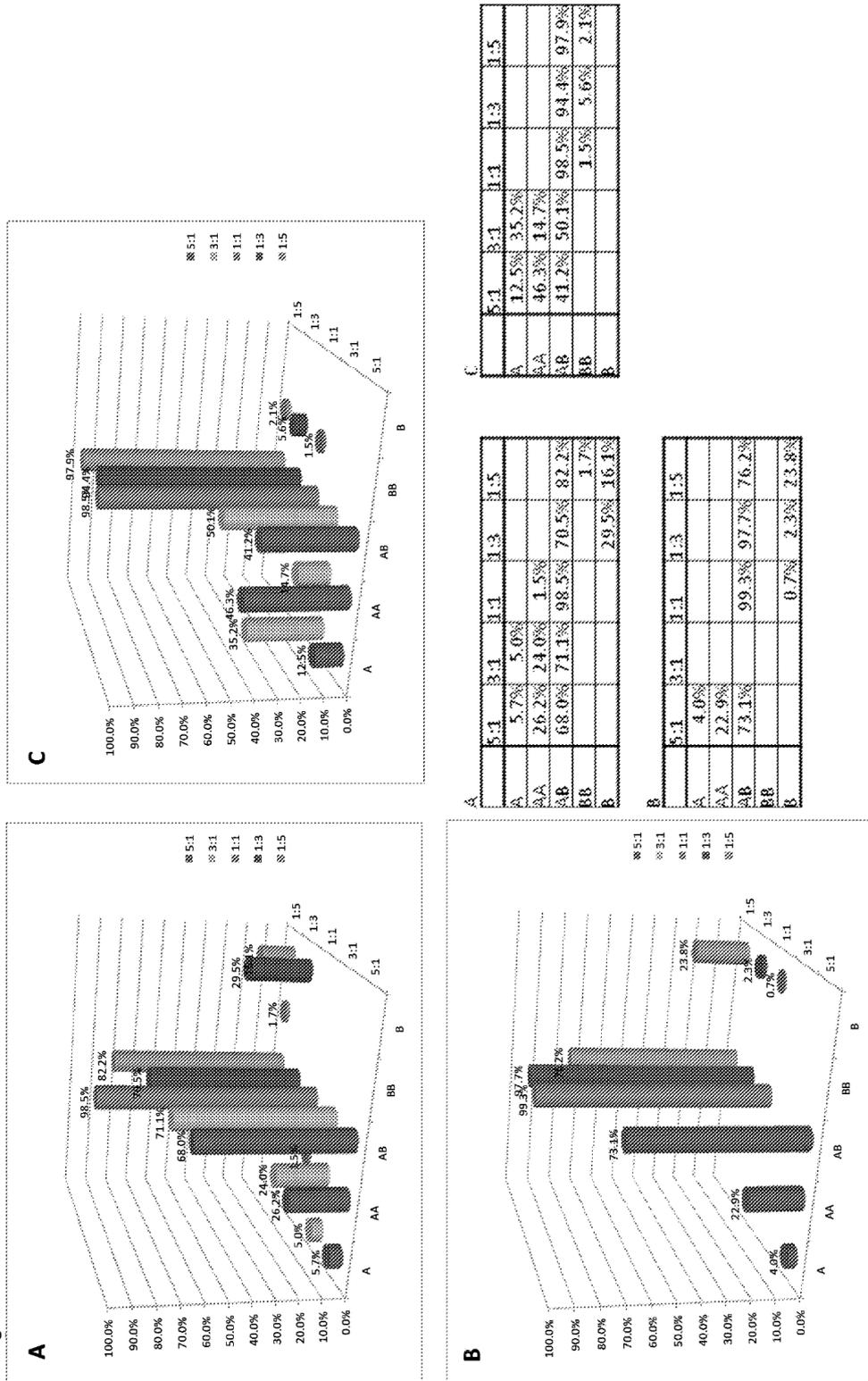


Figura 24:

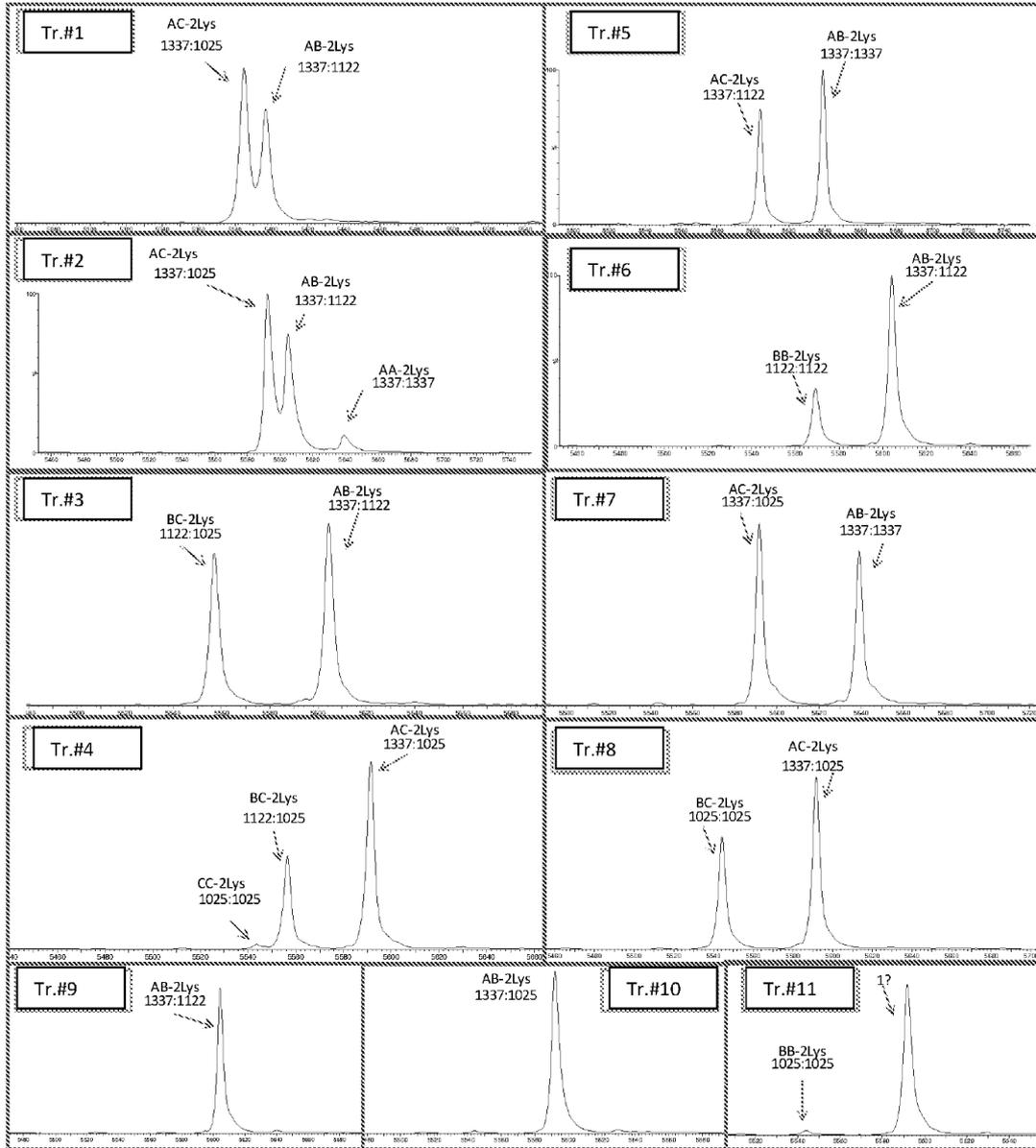


Figura 25:

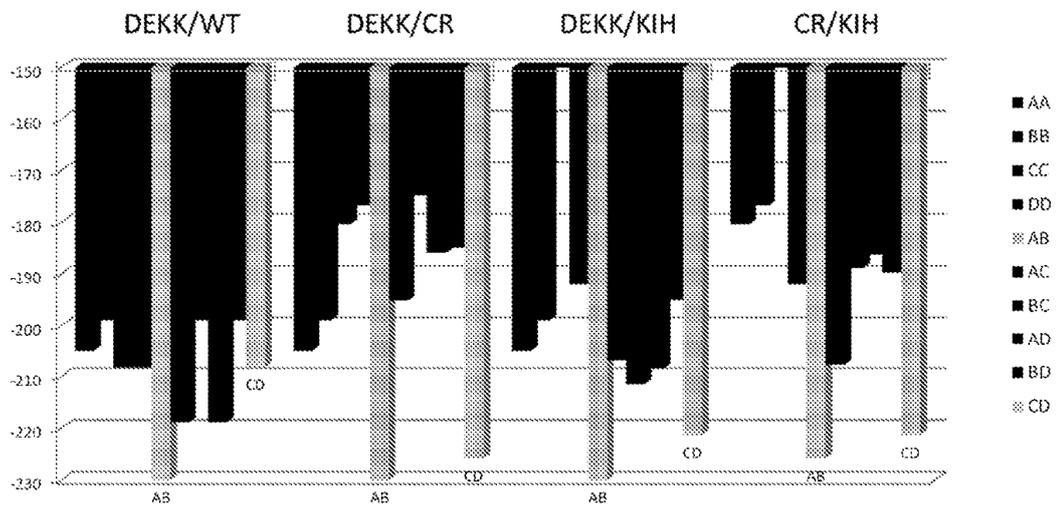


Figura 26:

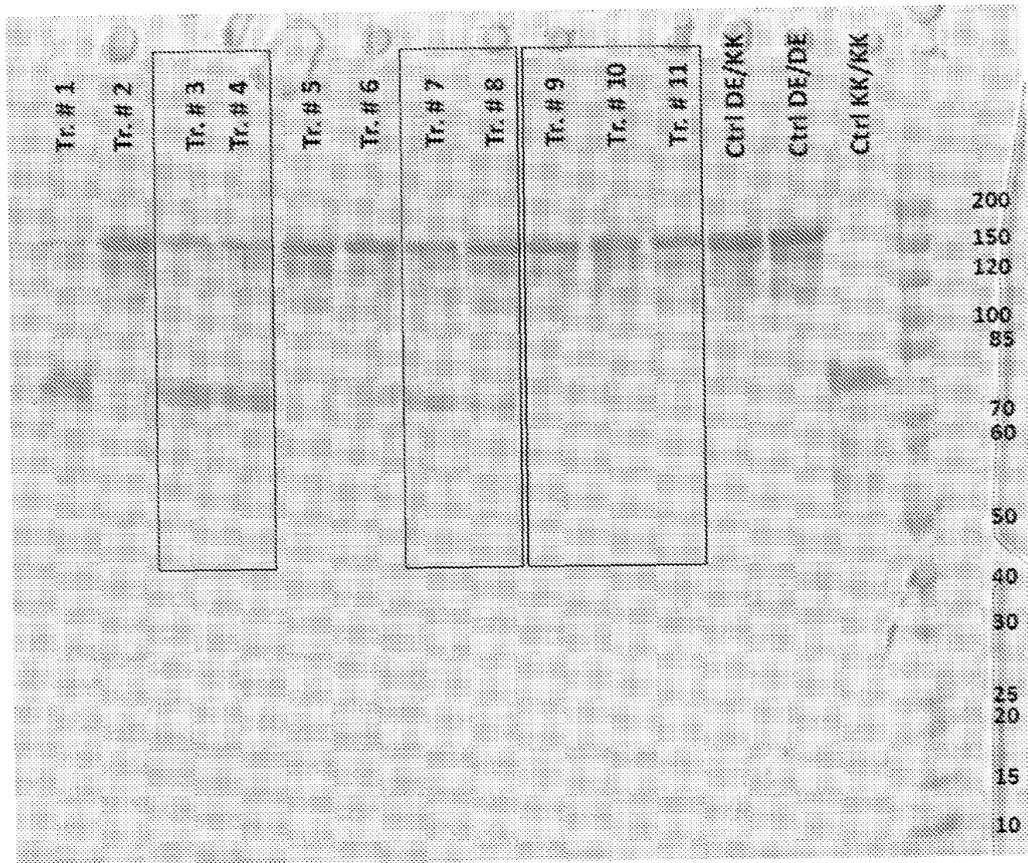


Figura 27A:

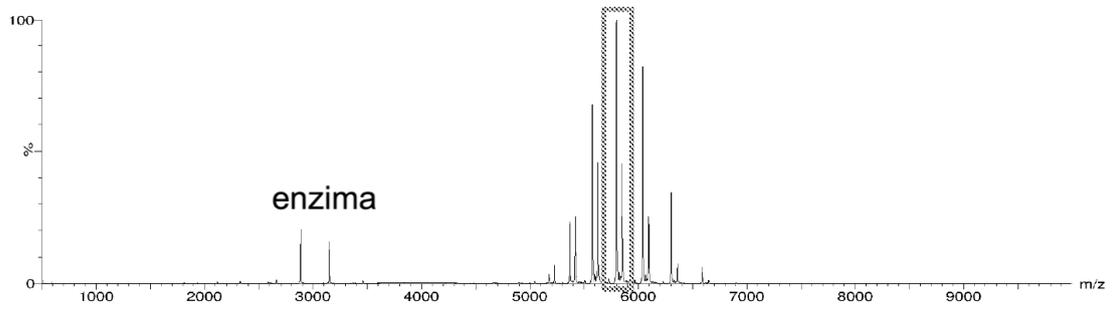
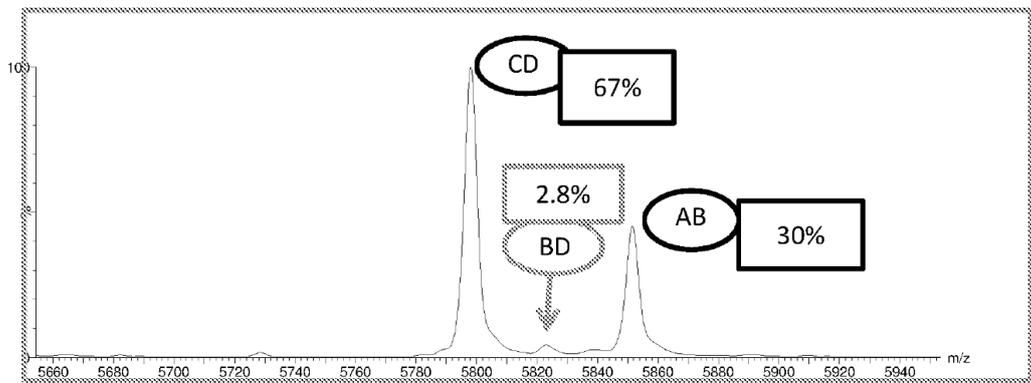


Figura 27B:

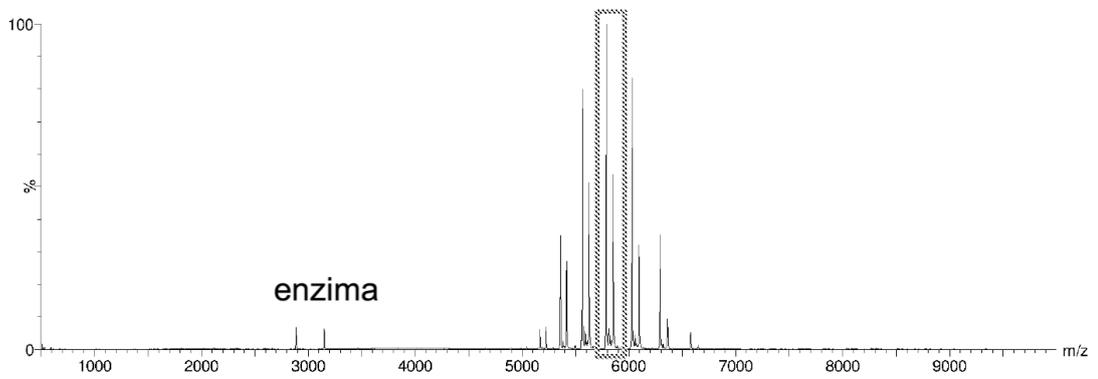
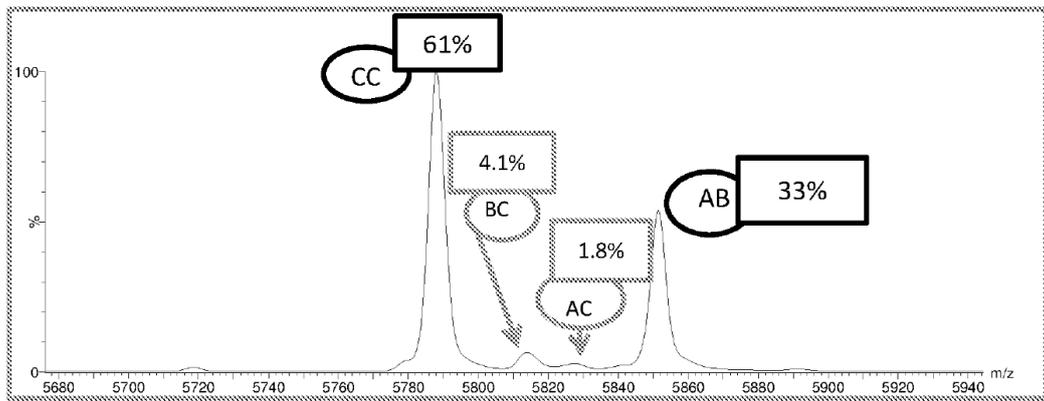


Figura 28:

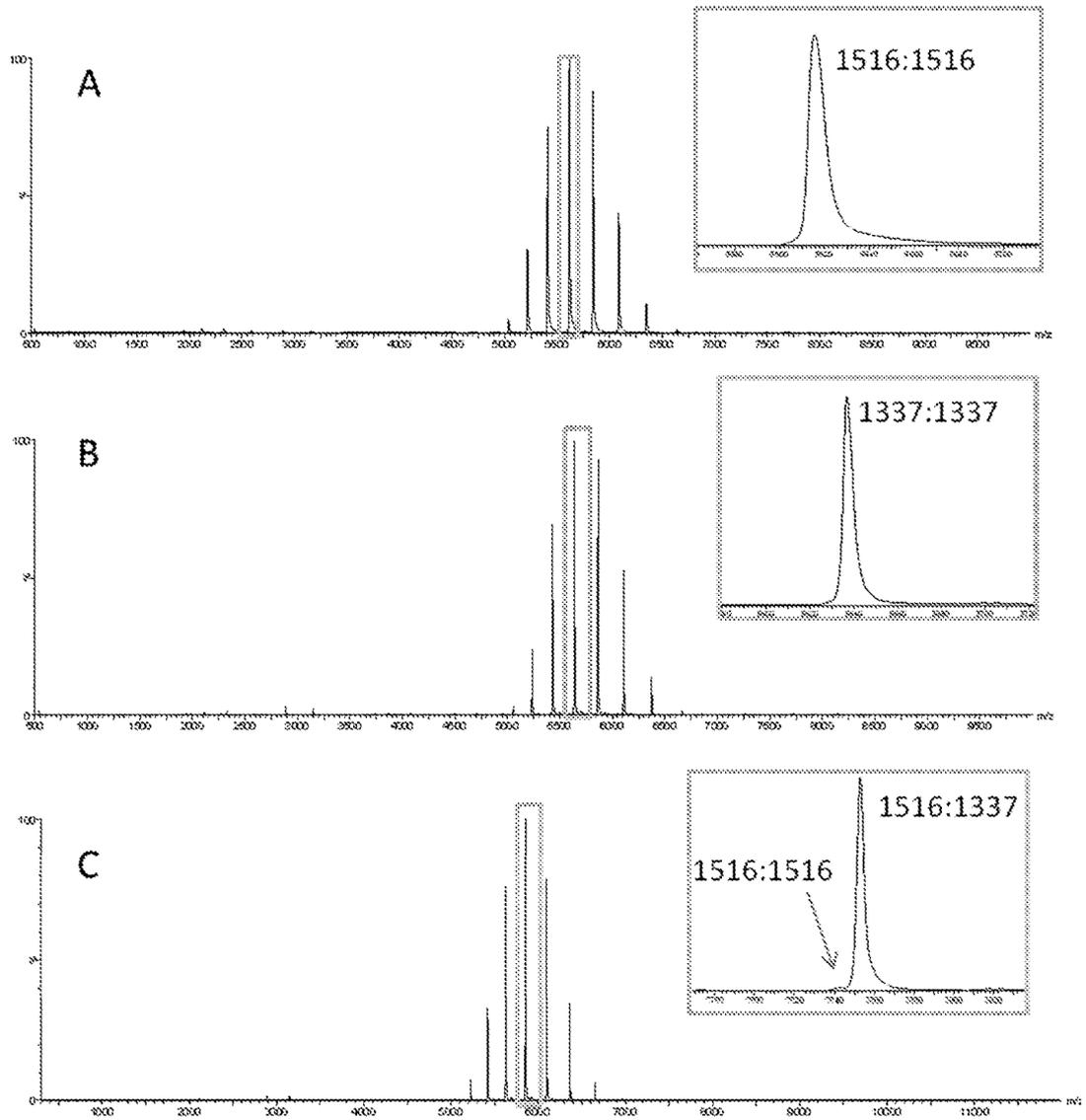


Figura 29:

