

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 399**

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/NL2013/050293**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **24.10.2013 WO13157953**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.04.2013 E 13720614 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2019 EP 2838917**

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:

19.02.2020

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 2 743 399 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

5 Campo

La invención se refiere a los campos de la biología molecular, la medicina y los agentes terapéuticos biológicos. Se refiere particularmente al campo de los anticuerpos terapéuticos para el tratamiento de diversas enfermedades.

10 Antecedentes

Muchos agentes terapéuticos biológicos usados 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 los procesos de la enfermedad 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 por una propiedad funcional conveniente tal como, por ejemplo, la destrucción de células tumorales, el bloqueo de las interacciones receptor-ligando o la neutralización de virus. Hoy en día, existen alrededor de 30 anticuerpos monoclonales aprobados por la FDA, los cuales se producen típicamente en grandes cantidades y sus características biofísicas y bioquímicas pueden analizarse en gran detalle para garantizar la consistencia lote a lote, lo cual facilita la aceptabilidad regulatoria. A pesar de estas características favorables, los anticuerpos monoclonales tienen varias desventajas, algunas de las cuales se relacionan con su naturaleza mono-específica y la complejidad de las enfermedades. Los procesos de las enfermedades a menudo son de naturaleza multifactorial e implican una acción redundante o sinérgica de los mediadores de la enfermedad o la regulación positiva de diferentes receptores, lo que incluye la interrelación entre sus redes de señalización. En consecuencia, el bloqueo de múltiples y diferentes factores y vías implicadas en la patología puede resultar en una mejora de la eficacia terapéutica. Por la naturaleza de su mono-especificidad, los anticuerpos monoclonales solo pueden interferir con una sola etapa dentro de los procesos complejos de la enfermedad, lo cual a menudo no tiene un efecto óptimo. Además de no abordar por completo los múltiples aspectos de un proceso de enfermedad, ha quedado claro que dirigirse a un epítipo único en una proteína celular o soluble o patógeno únicos a menudo no será suficiente para tratar de manera eficiente la enfermedad, debido a que el epítipo objetivo podría no 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 mediante la regulación 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 una vía diferente, lo cual conduce a un crecimiento continuo y a la metástasis. De manera similar, los virus y otros patógenos mutan frecuentemente y pierden o protegen el epítipo objetivo, por lo que escapan de esta manera del tratamiento con anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales que se unen a un epítipo único a menudo no reclutan el espectro completo de mecanismos efectores evocados por los anticuerpos policlonales, lo que incluye, entre otras cosas, la opsonización (aumento de la fagocitosis de los antígenos), el impedimento estérico (los antígenos recubiertos con anticuerpos están impedidos de unirse a las células huésped o a las superficies mucosas), neutralización de toxinas, aglutinación o precipitación (los anticuerpos que se unen a varios antígenos solubles causan la agregación y posterior eliminación), activación del complemento y 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 combinado. Dichos anticuerpos policlonales terapéuticos derivados del suero pueden usarse, por ejemplo, para tratar o evitar infecciones causadas por virus tales como el virus de la rabia, el citomegalovirus y el virus sincitial respiratorio, para neutralizar toxinas tales como la toxina tetánica y la toxina botulínica o para prevenir la inmunización con aloinjerto de Rhesus D. Se ha impedido un uso más extendido de preparaciones de anticuerpos policlonales derivados del suero, por el hecho de que este plasma fuente solo está disponible para una gama limitada de objetivos tales 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 idoneidad, lo que resulta en una variación considerable entre los lotes. Además, las tecnologías de detección no logran mantenerse al día con los virus en constante evolución, por lo tanto, los productos de inmunoglobulina conllevan un riesgo potencial de transmisión de enfermedades infecciosas. Finalmente, el largo proceso de recolección de sangre, el tamizaje y la purificación de inmunoglobulinas significa que las inmunoglobulinas derivadas de plasma son caras de producir.

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 de suero. En la técnica, se han probado combinaciones de dos anticuerpos monoclonales humanos o humanizados en modelos preclínicos y en ensayos clínicos (por ejemplo, mezclas de 2 anticuerpos monoclonales contra el receptor de 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 pueden reclutar mecanismos efectores que no se asocian con ninguno de los anticuerpos por separado. Por ejemplo, se demostró que las mezclas de 2 anticuerpos monoclonales contra el EGFR o el HER2 destruyen más potentemente las células tumorales basado en una combinación de actividades, lo que incluye una internalización del receptor aumentada, un bloqueo mejorado de las vías de señalización aguas abajo de los receptores, así como también una citotoxicidad mediada por efectores inmunitarios

aumentada. Para las terapias combinadas basadas en 2 anticuerpos monoclonales, los anticuerpos componentes pueden producirse separadamente y combinarse al nivel de proteína. Un inconveniente de este enfoque es el costo abrumador de desarrollar los 2 anticuerpos individualmente en ensayos clínicos y repetir (parcialmente) ese proceso con la combinación. Esto conduciría a un costo inaceptable de los tratamientos basados en combinaciones de anticuerpos. Alternativamente, las 2 líneas celulares recombinantes que producen los anticuerpos monoclonales componentes pueden mezclarse en un fermentador y la mezcla resultante de anticuerpos puede purificarse como una preparación única (documento WO 2004/061104). Un inconveniente de este enfoque es el pobre control sobre la composición y, por lo tanto, sobre la reproducibilidad de la preparación de anticuerpos policlonal recombinante resultante, especialmente cuando se considera que dichas composiciones pueden cambiar en el tiempo a medida que se cultivan las células.

Durante la última década, los anticuerpos biespecíficos han emergido 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 epítopos diferentes en los mismos o diferentes objetivos, en un anticuerpo biespecífico esto se logra mediante una única molécula de inmunoglobulina. Al unirse a 2 epítopos 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 epítopos. Además, dado que los anticuerpos biespecíficos del formato IgG combinan 2 regiones de unión monovalente diferentes en una molécula única y las mezclas de 2 anticuerpos IgG combinan 2 moléculas de unión bivalente diferentes en una preparación única, se han observado también efectos diferentes 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 molécula única. Por lo tanto, las terapias basadas en un anticuerpo biespecífico único se facilitan por un proceso de desarrollo del fármaco menos complicado y rentable, a la vez que proporcionan terapias con anticuerpos más eficaces.

Los anticuerpos biespecíficos basados en el formato IgG, que consisten en 2 cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, se han producido mediante una variedad de métodos. Por ejemplo, pueden producirse anticuerpos biespecíficos mediante la fusión de dos líneas celulares secretoras de anticuerpos para crear una nueva línea celular o mediante la expresión de dos anticuerpos en una sola célula mediante el uso de la tecnología de ADN recombinante. Estos enfoques producen múltiples especies de anticuerpos, ya que las cadenas pesadas respectivas de cada anticuerpo pueden formar dímeros monoespecíficos (también llamados homodímeros), los cuales contienen dos cadenas pesadas apareadas idénticas con la misma especificidad, y dímeros biespecíficos (también llamados heterodímeros) los cuales contienen dos cadenas pesadas apareadas diferentes con especificidad diferente. Además, las cadenas ligeras y las cadenas pesadas de cada anticuerpo pueden emparejarse aleatoriamente para formar combinaciones inapropiadas no funcionales. Este problema, conocido como errores de emparejamiento de cadena pesada y ligera, puede resolverse mediante la elección de anticuerpos que comparten una cadena ligera común para su expresión como biespecíficos. Pero aun cuando se usa una cadena ligera común, la expresión de dos cadenas pesadas y una cadena ligera común en una sola célula resultará en 3 especies de anticuerpos diferentes, es decir, dos anticuerpos 'parentales' monoespecíficos y el anticuerpo biespecífico, de manera que el anticuerpo biespecífico de interés necesita purificarse a partir 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 con error de emparejamiento, se mantiene la necesidad de formatos biespecíficos que eliminen o minimicen algunas de las desventajas mencionadas anteriormente.

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 describió 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 agentes terapéuticos biológicos en forma de mezclas o enfoques biespecíficos para dirigirse a múltiples moléculas modificadoras de la enfermedad.

Descripción de la invención

La invención proporciona métodos y medios para tecnologías alternativas y/o mejoradas para producir agentes terapéuticos biológicos en forma de mezclas o enfoques biespecíficos para dirigirse a múltiples moléculas modificadoras de la enfermedad, así como también productos y usos resultantes a partir de estos métodos y medios.

Se describen en la técnica diversos enfoques para promover la formación de un determinado anticuerpo biespecífico de interés, lo que reduce de esta manera el contenido de anticuerpos no deseados en la mezcla resultante.

Para los anticuerpos, se conoce bien que la interacción CH₃-CH₃ es el principal impulsor de la dimerización de Fc (Ellerson JR., y otros, J. Immunol 1976 (116) 510-517; Deisenhofer J. biochemistry 1981 (20) 2361-2370). Además, se conoce bien 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 (preferentemente 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 fuerzas de Van der Waals, enlaces de hidrógeno, enlaces de hidrógeno mediados por agua, puentes salinos u otras fuerzas electrostáticas, interacciones de atracción entre cadenas laterales aromáticas, enlaces disulfuro u otras fuerzas conocidas por un experto 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 la IgG1 humana puede representar la mayoría de las contribuciones al plegamiento y la asociación del dominio. Puede preverse además que otros residuos de aminoácidos (vecinos) pueden afectar las interacciones en la interfaz proteína-proteína.

Se han empleado en la técnica enfoques para interferir con la dimerización de las cadenas pesadas de anticuerpos. Se aplicó manipulación genética específica en los dominios CH3 para favorecer la heterodimerización por sobre la homodimerización. Los ejemplos de dicha manipulación genética de la interfaz CH3-CH3 incluyen la introducción de mutaciones de protuberancia y cavidad complementarias, conocidas, además, como enfoques de 'botón en ojal' como se describe, por ejemplo, en el documento WO1998/050431, Ridgeway y otros, 1996 y Merchant y otros, 1998.

Generalmente, el método implica introducir 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 pueda colocarse en la cavidad para promover la formación de heteromultímeros y dificultar la formación de homomultímeros. Las "protuberancias" o "botones" se construyen mediante el reemplazo de pequeñas cadenas laterales de aminoácidos de la interfaz del primer polipéptido con cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Las "cavidades" u "ojales" compensatorias de tamaño idéntico o similar a las protuberancias se crean en la interfaz del segundo polipéptido mediante el reemplazo de las cadenas laterales de aminoácidos grandes con otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). La protuberancia y la cavidad pueden fabricarse por medios sintéticos tales como alterar el ácido nucleico que codifica los polipéptidos o mediante síntesis de péptidos.

Mediante el uso de solamente la tecnología de botón en ojal, la proporción de un anticuerpo biespecífico de interés es, en el mejor de los casos, el 87 % de la mezcla de los 2 anticuerpos parentales y biespecíficos. Merchant y otros tuvieron éxito en elevar la proporción de anticuerpos biespecíficos hasta el 95 % de la mezcla mediante la introducción de un enlace disulfuro adicional entre los dos dominios CH3 en la interfaz CH3-CH3. Aun así, para usar dicho anticuerpo biespecífico como un medicamento, el anticuerpo biespecífico tiene que purificarse (separarse) de los homodímeros y formularse en un diluyente o excipiente aceptable farmacéuticamente. La purificación de heterodímeros a partir de dichas mezclas plantea un desafío importante debido a la similitud en las propiedades fisicoquímicas de los homodímeros y los heterodímeros. Es un objeto de la presente invención proporcionar métodos para producir un anticuerpo biespecífico en un clon celular único con una proporción mejorada adicional del anticuerpo biespecífico en la mezcla. De acuerdo con la invención, la tecnología de botón en ojal puede usarse, por lo tanto, como uno de los medios, junto con otros medios, para lograr dicha proporción biespecífica mejorada adicionalmente en una mezcla.

Otro ejemplo de dicha manipulación genética de la interfaz CH3-CH3 se proporciona por una tecnología de Fc heterodimérica que soporta el diseño de proteínas de fusión biespecíficas y asimétricas mediante el diseño de heterodímeros CH3 con dominio modificado por intercambio de cadenas (SEED). Estos heterodímeros CH3 SEED se derivan de dominios CH3 de IgG e IgA humanas que se componen de segmentos alternos de secuencias CH3 de IgA e IgG humanas que resultan en pares de heterodímeros CH3 SEED humanos complementarios, los llamados cuerpos SEED (Davis JH. y otros, Protein Engineering, Design & Selection 2010(23)195-202; documento WO2007/110205).

Aún otro enfoque para la producción de un anticuerpo biespecífico dado de interés se basa en la manipulación electrostática de los residuos de contacto dentro de la interfaz CH3-CH3 que se cargan naturalmente, como se describe, por ejemplo, en el documento EP01870459 o en los documentos US2010/0015133, WO2007/147901, WO2010/129304, Gunasekaran y otros, (2010) y el documento WO 2009/089004. Estas publicaciones describen mutaciones en los dominios CH3 de las cadenas pesadas en donde los residuos de contacto de aminoácidos cargados de origen natural 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 manera que la coexpresión de cadenas Fc compatibles electrostáticamente soporta interacciones de atracción favorables, lo que promueve de esta manera 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 cuatro pares de residuos de cargas únicos se involucran en la interacción dominio-dominio. Estos son D356/K439', E357/K370', K392/D399' y D399/K409' (numerados de acuerdo con Kabat (1991) donde los residuos en la primera cadena se separan de los residuos en la segunda cadena por '/' y donde el apóstrofo (') indica la numeración del residuo en la segunda cadena). Como la interfaz CH3-CH3 muestra una simetría doble, cada par de carga único se representa dos veces en la IgG intacta (es decir, también se presentan en la interfaz las interacciones de carga K439/D356', K370/E357', D399/K392' y K409/D399'). Al tomar ventaja de esta simetría doble, se demostró que una reversión de carga única, por ejemplo, K409D en la primera cadena, o D399'K en la segunda cadena, resultó en una formación disminuida de homodímeros debido a la repulsión de cargas idénticas. La combinación de diferentes reversiones de carga potenció aún más este efecto repulsivo. Se demostró que la expresión de diferentes dominios CH3 que comprenden reversiones de carga complementarias diferentes, podría conducir a la heterodimerización, lo que resulta en una proporción aumentada de las especies biespecíficas en la mezcla.

Mediante el uso del enfoque descrito anteriormente, es posible producir un anticuerpo biespecífico en una única célula con proporciones que varían entre aproximadamente 76 % y aproximadamente 96 %.

5 En un aspecto, la presente invención proporciona un método de acuerdo con las reivindicaciones para producir al menos dos anticuerpos diferentes a partir de una única célula huésped.

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

10 Además, una mezcla de más de un anticuerpo biespecífico es particularmente útil para el tratamiento de ciertas enfermedades. Por ejemplo, las células tumorales usan 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 cánceres que aborden simultáneamente dichas múltiples moléculas asociadas a la enfermedad y al escape. En caso de que se involucren 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. Preferentemente, dichas mezclas de anticuerpos biespecíficos se producen mediante una célula individual para facilitar un proceso de desarrollo de fármacos que es menos complicado desde un punto de vista regulatorio y rentable y factible desde un punto de vista de fabricación de fármacos y de desarrollo clínico. En un enfoque basado en una célula individual, es conveniente usar métodos que permitan la producción controlada y eficiente de los anticuerpos biespecíficos, lo que por lo tanto reduce, o incluso anula completamente la necesidad de separar la mezcla deseada de moléculas de IgG biespecíficas de las moléculas de IgG mono-específicas no deseadas. En la técnica anterior, se han producido mezclas de anticuerpos mono-específicos y biespecíficos mediante una única célula (documento WO2004/009618), pero estas mezclas representan mezcolanzas complejas de varias especies de anticuerpos biespecíficos y mono-específicos diferentes. Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar medios y métodos para producir mezclas definidas de anticuerpos biespecíficos en células individuales. Preferentemente, se proporcionan métodos que resultan en mezclas de anticuerpos (biespecíficos) con una proporción de al menos 95 %, al menos 97 % o incluso más del 99 % de moléculas de IgG dimericas, independientemente de la cantidad de subproductos monoméricos, ver en la presente descripción más abajo. Típicamente, en una célula donde se producen múltiples moléculas de IgG intactas, pueden presentarse semimoléculas (subproductos monoméricos) que pueden eliminarse simplemente mediante la cromatografía de exclusión por tamaño conocida en la técnica.

35 En una modalidad, la presente invención proporciona métodos para producir una mezcla definida de al menos dos moléculas similares a Ig diferentes en células individuales, en lugar de un anticuerpo (biespecífico) único de interés, en donde la formación de otras especies de anticuerpos dimericos indeseados disminuye o incluso está ausente. La mezcla resultante se define bien y su composición se controla mediante el diseño de mutantes del dominio CH3. Además, la regulación de los niveles de expresión y/o las relaciones de transfección diferentes usadas para la expresión afectan la composición de la mezcla. En un método de acuerdo con la invención, una primera molécula de ácido nucleico codifica un dominio CH3 que se empareja, preferentemente, con un dominio CH3 codificado por una segunda molécula de ácido nucleico, y una tercera molécula de ácido nucleico codifica un dominio CH3 que se empareja, preferentemente, con un dominio CH3 codificado por una cuarta molécula de ácido nucleico. La presente invención proporciona, además, mezclas de al menos dos moléculas similares a Ig diferentes que pueden obtenerse mediante los métodos de la invención.

45 Como se usa en la presente, el término "emparejamiento preferencial de dichos 1^{er} y 2^{do} polipéptidos que comprenden el dominio CH3" significa que esencialmente todos los dímeros resultantes que comprenden el 1^{er} polipéptido que comprende el dominio CH3 y/o el 2^{do} polipéptido que comprende el dominio CH3 serán dímeros que consisten en un 1^{er} polipéptido que comprende el dominio CH3 emparejado con un 2^{do} polipéptido que comprende el dominio CH3. Igualmente, el término "emparejamiento preferencial de dichos 3^{er} y 4^{to} polipéptidos que comprenden el dominio CH3" significa que esencialmente todos los dímeros resultantes que comprenden el 3^{er} polipéptido que comprende el dominio CH3 y/o el 4^{to} polipéptido que comprende el dominio CH3 serán dímeros que consisten en un 3^{er} polipéptido que comprende el dominio CH3 emparejado con un 4^{to} polipéptido que comprende el dominio CH3. Como resultado, cuando las moléculas de ácido nucleico que codifican cuatro polipéptidos diferentes que comprenden el dominio CH3 (A, B, C, D) se introducen en una célula individual, en lugar de una mezcla de 10 dímeros similares a Ig diferentes (AA, AB, AC, AD, BB, BC, BD, CC, CD y DD), se produce una mezcla de predominantemente dos moléculas similares a Ig específicas.

60 Como se explica en la presente descripción más abajo con más detalle, la primera cadena polipeptídica que comprende el dominio CH3 comprende un residuo de lisina (K) en la posición de aminoácido 366 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE, y la segunda cadena polipeptídica que comprende el dominio CH3 comprende un residuo de ácido aspártico (D) en la posición de aminoácido 351 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE. Estos cambios de aminoácidos son medios para el emparejamiento preferencial de dichas primera y segunda cadenas polipeptídicas que comprenden el dominio CH3. La primera cadena polipeptídica que comprende el dominio CH3 comprende además, preferentemente, un residuo de lisina (K) en la posición de aminoácido 351 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE. Además, la segunda cadena polipeptídica que comprende el dominio CH3 comprende además, preferentemente, un residuo de ácido glutámico (E) o un residuo de ácido aspártico (D) en la posición de aminoácido 349 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE, y/o un residuo de ácido glutámico (E) en la posición de aminoácido 368 de acuerdo

5 con el sistema de numeración de la UE, con la máxima preferencia, un residuo de ácido glutámico (E) en la posición de aminoácido 368 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE. En aún otra modalidad preferida, la tercera cadena polipeptídica que comprende el dominio CH3 comprende un residuo de lisina (K) en la posición de aminoácido 356 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE y un residuo de lisina (K) en la posición de aminoácido 399 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE, y la cuarta cadena polipeptídica que comprende el dominio CH3 comprende un residuo de ácido aspártico (D) en la posición de aminoácido 392 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE y un residuo de ácido aspártico (D) en la posición de aminoácido 409 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE.

10 En un método de acuerdo con la presente invención, cada una de las cadenas polipeptídicas que comprenden el dominio CH3 comprende además, preferentemente, una región variable que reconoce un epítipo objetivo. Las regiones variables que forman parte de las cadenas polipeptídicas que comprenden el dominio CH3 comparten, preferentemente, una cadena ligera común. En ese caso solo difieren las VH de las regiones variables, mientras que la VL en todas las regiones variables es esencialmente la misma. Por lo tanto, en un aspecto preferido, se proporciona un método de acuerdo con la invención, que comprende además, proporcionar dicha célula huésped con una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena ligera común. En una modalidad preferida particularmente, cada una de dichas 4 regiones variables de las 4 cadenas polipeptídicas que comprenden dominios CH3 reconocen un epítipo objetivo diferente. Por ejemplo, si la primera molécula de ácido nucleico codifica una cadena pesada que contiene, además, un dominio variable con especificidad por el antígeno A, la segunda molécula de ácido nucleico codifica una cadena pesada que contiene, además, un dominio variable con especificidad por el antígeno B, la tercera molécula de ácido nucleico codifica una cadena pesada que contiene, además, un dominio variable con especificidad por el antígeno C, y la cuarta molécula de ácido nucleico codifica una cadena pesada que contiene, además, un dominio variable con especificidad por el antígeno D, se producirá entonces una mezcla que contiene moléculas similares a Ig biespecíficas que son específicas para AB y moléculas similares a Ig biespecíficas que son específicas para CD. La formación de anticuerpos monoespecíficos (con especificidad AA, BB, CC o DD) o anticuerpos biespecíficos con especificidad para AC, AD, BC o BD se reduce o incluso está ausente debido a los medios para el emparejamiento preferencial de dichos 1^{er} y 2^{do} polipéptidos que comprenden el dominio CH3 y dichos 3^{er} y 4^{to} polipéptidos que comprenden el dominio CH3. Por supuesto, es posible usar moléculas de ácido nucleico adicionales, por ejemplo, que codifican un 5^{to} y un 6^{to} polipéptido que comprende el dominio CH3, para producir mezclas definidas que comprenden más de dos moléculas similares a Ig diferentes.

30 Es de destacar que la relación de los ácidos nucleicos usada en un método de acuerdo con la invención no necesita ser 1:1:1:1, y la relación de las moléculas similares a Ig resultantes que se expresan no necesita ser 1:1. Es posible usar medios conocidos en la técnica para producir mezclas de anticuerpos con relaciones optimizadas. Por ejemplo, los niveles de expresión de moléculas de ácido nucleico y, por lo tanto, las relaciones de las moléculas similares a Ig resultantes producidas pueden regularse mediante el uso de diferentes elementos genéticos tales como promotores, potenciadores y represores o mediante el control del sitio de integración genómica del número de copias de los constructos de ADN que codifican anticuerpos.

40 Dichos medios para el emparejamiento preferencial pueden comprender, preferentemente, mutaciones de botón en ojal complementarias manipuladas genéticamente, puentes disulfuro, mutaciones de carga lo que incluye mutaciones de inversión de carga, o sus combinaciones. El experto apreciará que dichos medios para el emparejamiento preferencial pueden elegirse dentro de un cierto tipo de mutaciones, es decir, todas las al menos 4 moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas polipeptídicas que comprenden el dominio CH3 pueden comprender, por ejemplo, mutaciones de carga como medios para el emparejamiento preferencial. Adicionalmente, también el CH3 de tipo silvestre no manipulado genéticamente puede usarse en ciertos casos para el emparejamiento preferencial de dos cadenas polipeptídicas que comprenden el dominio CH3 de tipo silvestre. En un aspecto preferido particularmente, dichos medios para el emparejamiento preferencial comprenden al menos una mutación CH3 seleccionada de la Tabla B, como se explica en otra parte en esta solicitud. Por lo tanto, una modalidad preferida proporciona un método de acuerdo con las reivindicaciones, en donde todas las 4 de dichas moléculas de ácido nucleico se proveen de medios para el emparejamiento preferencial de dichos 1^{er} y 2^{do} polipéptidos que comprenden el dominio CH3 y dichos 3^{er} y 4^{to} polipéptidos que comprenden el dominio CH3, en donde dichos medios para el emparejamiento preferencial de dichos 1^{er} y 2^{do} polipéptidos que comprenden el dominio CH3 son diferentes de los medios para el emparejamiento preferencial de dichos 3^{er} y 4^{to} polipéptidos que comprenden el dominio CH3.

55 Un aspecto de la presente invención proporciona un método de acuerdo con las reivindicaciones, en donde dichos medios para el emparejamiento preferencial de dichos 1^{er} y 2^{do} polipéptidos que comprenden el dominio CH3 son diferentes de dichos medios para el emparejamiento preferencial de dichos 3^{er} y 4^{to} polipéptidos que comprenden el dominio CH3. Por 'diferente' se entiende que los medios para el emparejamiento preferencial de dichos 1^{er} y 2^{do} polipéptidos que comprenden el dominio CH3 se diseñan de manera que se favorece el emparejamiento preferencial de la 1^{ra} y la 2^{da} cadena. El diseño es de manera que esencialmente no tendrá lugar ninguna interacción entre la 1^{ra} y la 3^{ra} y/o 4^{ta} cadena polipeptídica que comprende el dominio CH3. En otras palabras, la dimerización entre dicho 1^{er} polipéptido que comprende el dominio CH3 y dicho 3^{er} o 4^{to} polipéptido se reduce esencialmente a cero y así sucesivamente. El 3^{er} y el 4^{to} polipéptidos que comprenden el dominio CH3 pueden ser de tipo silvestre o pueden comprender medios para el emparejamiento preferencial que son diferentes de los medios para el emparejamiento preferencial de los 1^{er} y 2^{do} dominios CH3. Los estudios actuales se han centrado en la producción de un anticuerpo biespecífico único, mediante el uso, por ejemplo, de la tecnología de botón en ojal o mutaciones (reversiones) de aminoácidos de contacto cargados presentes en los dominios

CH3. Sin embargo, la producción de mezclas definidas de al menos dos moléculas similares a Ig (bienespecificas), sin una coproducción significativa de otros subproductos diméricos, no se había realizado antes de la presente invención.

La presente invención proporciona métodos para la producción eficiente y controlada de una mezcla bien definida de moléculas similares a Ig, con una alta proporción de moléculas bienespecificas en la mezcla. Incluso una proporción de (dos) bienespecificos de al menos 95 %, al menos 97 % o más se obtiene en un sistema donde se desean dos bienespecificos. Esto significa que solo se obtienen a lo máximo 5 %, a lo máximo 3 % o menos de subproductos bivalentes mono-especificos. Es de destacar que la cantidad de subproductos monoméricos, es decir, semimoléculas, es menos importante ya que estas semimoléculas se separan fácilmente de los dímeros mediante el uso de su diferencia de tamaño.

En otra modalidad preferida, las regiones variables de la 1^{ra} y la 2^{da} cadenas polipeptídicas que comprenden el dominio CH3 reconocen epítomos objetivo diferentes, mientras que las regiones variables de las 3^{ra} y la 4^{ta} cadenas polipeptídicas que comprenden el dominio CH3 reconocen los mismos epítomos objetivo. Esto resultará en la producción predominante de un tipo de molécula similar a Ig bienespecifica y un tipo de molécula similar a Ig mono-especifica. Por ejemplo, si las regiones variables de la 1^{ra} y la 2^{da} cadenas polipeptídicas que comprenden el dominio CH3 reconocen epítomos objetivo diferentes y si las regiones variables de la 3^{ra} y la 4^{ta} cadenas polipeptídicas que comprenden el dominio CH3 reconocen el mismo epítomo objetivo que es diferente de los epítomos objetivo reconocidos por el 1^{er} y el 2^{do} dominios CH3, se formará una mezcla de moléculas similares a Ig que tienen especificidad para AB o CC. Por lo tanto, se proporciona además un método de acuerdo con la invención, en donde el epítomo objetivo reconocido por las regiones variables de la 3^{ra} y la 4^{ta} cadena polipeptídica que comprende el dominio CH3 es el mismo, pero diferente del epítomo objetivo reconocido por la región variable de la 1^{ra} o la 2^{da} cadena polipeptídica que comprende el dominio CH3.

Alternativamente, cuando las regiones variables de la 1^{ra} y la 2^{da} cadenas polipeptídicas que comprenden el dominio CH3 reconocen diferentes epítomos objetivo y cuando las regiones variables de la 3^{ra} y la 4^{ta} cadenas polipeptídicas que comprenden el dominio CH3 reconocen el mismo epítomo que la 1^{ra} o la 2^{da} cadenas polipeptídicas que comprenden el dominio CH3, se formará una mezcla de moléculas similares a Ig que tienen especificidad para AB y AA, o para AB y BB. Por lo tanto, se proporciona además en la presente un método de acuerdo con la invención, en donde el epítomo objetivo reconocido por las regiones variables de la 3^{ra} y 4^{ta} cadena polipeptídica que comprende el dominio CH3 es el mismo que el epítomo objetivo reconocido por la región variable de la 1^{ra} o la 2^{da} cadena polipeptídica que comprende el dominio CH3.

Es otro objeto de la presente invención, proporcionar medios y métodos para producir mezclas definidas de anticuerpos bienespecificos y anticuerpos mono-especificos en un cultivo celular único. Un ejemplo no limitante de dicha mezcla bien definida es una mezcla de anticuerpos bienespecificos con especificidad AB y anticuerpos mono-especificos con especificidad AA. Otro ejemplo es una mezcla de anticuerpos bienespecificos con especificidad AB y anticuerpos mono-especificos con especificidad BB. Aún otro ejemplo es una mezcla de anticuerpos bienespecificos con especificidad AB y anticuerpos mono-especificos con especificidad CC. Nuevamente, se proporcionan, preferentemente, medios y métodos que producen mezclas de los anticuerpos de interés con al menos 90 %, con mayor preferencia, al menos 95 % y, con la máxima preferencia, al menos 97 % o incluso más del 99 % de los anticuerpos deseados.

En aún otra modalidad, se proporciona un método de acuerdo con la invención en donde las regiones variables de las 1^{ra} y 2^{da} cadenas polipeptídicas que comprenden el dominio CH3 reconocen el mismo epítomo objetivo, mientras que las regiones variables de las 3^{ra} y 4^{ta} cadenas polipeptídicas que comprenden el dominio CH3 reconocen un segundo epítomo objetivo que difiere del epítomo objetivo reconocido por dicha 1^{ra} y 2^{da} regiones variables. Esto resultará en la producción predominante de moléculas mono-especificas similares a Ig que tienen ya sea especificidad por AA o especificidad por BB. La formación de moléculas bienespecificas similares a Ig disminuye o incluso se evita. En varias modalidades, se prefiere producir mezclas de anticuerpos mono-especificos en una sola célula, en lugar de mezclas de anticuerpos bienespecificos. Por ejemplo, cuando se desea la reticulación de dos moléculas objetivo idénticas, o cuando dos objetivos se ubican demasiado lejos el uno del otro de manera que no se les puede unir un solo anticuerpo bienespecifico. Además, puede ser ventajoso producir mezclas de anticuerpos mono-especificos en una sola célula, ya que la mezcla puede considerarse como un producto terapéutico único. En la técnica, ya se ha probado la eficacia terapéutica y la seguridad de diversos anticuerpos mono-especificos y se ha obtenido la autorización para su comercialización. La producción de mezclas de anticuerpos mono-especificos en una célula individual facilitará de esta forma la prueba de eficacia y seguridad de varias de dichas mezclas y reducirá los esfuerzos y los costos para la aprobación regulatoria y la fabricación. Sin embargo, actualmente no existen métodos disponibles para producir mezclas específicas de anticuerpos mono-especificos en una sola célula en donde la formación de subproductos bienespecificos se reduce a menos del 5 %. Es otro objeto de la presente invención proporcionar medios y métodos para producir dichas mezclas de anticuerpos homodiméricos bien definidas en células individuales en donde la formación de anticuerpos bienespecificos se reduce a menos del 5 %.

Por lo tanto, un método de acuerdo con la presente invención es adecuado para la producción de cualquier mezcla deseada de moléculas similares a Ig bienespecificas y/o mono-especificas. Nuevamente, es posible usar otras moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, al codificar un 5^{to} y un 6^{to} (y un 7^{mo} y un 8^{vo} y así sucesivamente) polipéptido que comprende el dominio CH3, para producir mezclas definidas que comprenden más de dos moléculas similares a Ig diferentes.

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. Mediante estas mutaciones se forman nuevas

interacciones específicas entre dos dominios CH3. Estas mutaciones de acuerdo con la presente invención se analizan más abajo con más detalle.

5 El término 'molécula similar a Ig', como se usa en la presente, significa una molécula proteínica 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, preferentemente, la secuencia comprende un dominio CH3 de IgG1. Las moléculas proteicas que poseen al menos un dominio CH3 pueden equiparse además con restos de unión específicos. De esta forma, los dominios CH3 de la presente invención, que contienen medios para el emparejamiento preferencial, pueden usarse para el emparejamiento preferencial de dos moléculas proteicas que comprenden dominio CH3 para diseñar moléculas de unión heterodiméricas deseadas o mezclas de moléculas de unión. Los restos de unión que pueden manipularse genéticamente para las moléculas proteicas que comprenden el dominio CH3 pueden ser cualquier agente de unión, lo que incluye, entre otros, Fv de cadena simple, diacuerpos de cadena única o en tándem (TandAb®), VHHs, Anticalinas®, Nanocuerpos®, un BiTE®, un Fab, proteínas de repetición de anquirina o DARPIN®, Avimeros®, un DART, un anticuerpo tipo TCR, Adnectinas®, Afilinas®, Trans-cuerpos®, Aficuerpos®, un TrimerX®, MicroProteínas, Fynómeros®, Centirinas® o un KALBITOR®. En una modalidad preferida, los restos de unión son regiones variables de anticuerpo (es decir, combinaciones VH/VL). Las regiones variables que forman parte de las cadenas polipeptídicas que comprenden el dominio CH3 comparten, preferentemente, una cadena ligera común. En ese caso, solo las VH de las regiones variables difieren, mientras que la VL en todas las regiones variables es esencialmente la misma.

20 Alternativamente, o adicionalmente, pueden manipularse genéticamente otras moléculas para los dominios CH3 de la presente invención, lo que incluye citocinas, hormonas, ligandos solubles, receptores y/o péptidos.

En un método de acuerdo con la invención, las moléculas similares a Ig son anticuerpos. Las regiones variables de estos anticuerpos comparten, preferentemente, una cadena ligera común, pero pueden diferir en sus regiones VH. El término 'anticuerpo', como se usa en la presente, 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 o comparten homología de secuencia con la región variable de un anticuerpo. Los anticuerpos se conocen 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 una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Se producen moléculas similares a Ig 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, tales como anticuerpos completamente humanos, o pueden tener secuencias de más de un origen, lo que resulta, por ejemplo, en anticuerpos quiméricos o humanizados. Los anticuerpos para uso terapéutico son, preferentemente, tan cercanos a los anticuerpos naturales del sujeto a tratar como sea posible (por ejemplo, anticuerpos humanos para sujetos humanos). La unión de anticuerpos puede expresarse en términos de especificidad y afinidad. La especificidad determina qué antígeno o epítipo de este se une mediante el dominio de unión. La afinidad es una medida de la fuerza de unión a un antígeno o epítipo en particular. La unión específica se define como la unión con afinidades (K_D) de al menos $1 \times 10^{-5} M$, con mayor preferencia, $1 \times 10^{-7} M$, con mayor preferencia, superior a $1 \times 10^{-9} M$. Típicamente, los anticuerpos monoclonales para aplicaciones terapéuticas tienen afinidades de hasta $1 \times 10^{-10} M$ o incluso mayores.

El término 'antígeno', como se usa en la presente, significa una sustancia o molécula que, cuando se introduce en el cuerpo, desencadena la producción de un anticuerpo por el sistema inmunitario. 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 de unirse al sitio de unión a antígeno de un anticuerpo. También las mezclas de antígenos pueden considerarse como 'antígeno', es decir, el experto apreciará que a veces un lisado de células tumorales o partículas virales puede indicarse como 'antígeno', mientras que dicho lisado de células tumorales o preparación de partículas virales posee muchos determinantes antigénicos. Un antígeno comprende al menos uno, pero a menudo más, epítopos. El término 'epítipo', como se usa en la presente, significa una parte de un antígeno que se reconoce por el sistema inmunitario, 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 se clasifican también como epítopos.

El término 'dominio CH3' se conoce bien en la técnica. La estructura de la IgG tiene cuatro cadenas, dos cadenas ligeras y dos pesadas; cada cadena ligera tiene dos dominios, la cadena ligera variable y la 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 dominio CH2 y CH3 de la cadena pesada se denomina porción Fc (fragmento cristalizante), fragmento Fc, cadena principal Fc o simplemente Fc. La molécula de IgG es un heterotetrámero que tiene dos cadenas pesadas que se mantienen unidas mediante enlaces disulfuro (-S-S-) en la región bisagra y dos cadenas ligeras. Las cadenas pesadas se dimerizan mediante interacciones en la interfaz del dominio CH3-CH3 y mediante interacciones en la región bisagra. El número de enlaces disulfuro de la región 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 C-terminales, es decir, los dominios CH2 y CH3, de la cadena pesada. Entre sus funciones fisiológicas están las interacciones con el sistema del complemento y con receptores específicos sobre la superficie de una variedad de células. Se conoce que las

interacciones entre los dominios CH3 de dos cadenas pesadas individuales juegan un papel importante en la conducción de la dimerización de la cadena pesada. De esta forma, los dominios CH3 dirigen la asociación de las cadenas pesadas del anticuerpo, y se conoce que la interfaz entre los dominios CH3 contiene más de 20 residuos de contacto de cada cadena que juegan 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 CH3 de la presente invención pueden usarse, por lo tanto, en asociación con otros dominios de anticuerpos para generar anticuerpos de longitud completa que sean biespecíficos o monoespecíficos. La especificidad del anticuerpo según lo definido por las combinaciones VH/VL típicamente no afecta el comportamiento de dimerización de la cadena pesada que se dirige por los dominios CH3.

Los términos 'residuo de contacto', 'aminoácido de contacto', 'residuo de interfaz' y 'aminoácido de interfaz', como se usan en la presente, se refieren típicamente a cualquier residuo de aminoácido presente en el dominio CH3 que pueda involucrarse en contactos interdominios, como puede calcularse mediante tecnologías conocidas en la técnica, lo que incluye el cálculo del área de superficie accesible por 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) 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).

Tabla A: Lista de residuos de interfaz del dominio CH3

Residuos 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 o bien aminoácidos cargados o residuos de aminoácidos neutros. El término 'residuo de aminoácido cargado' o 'residuo cargado', como se usa en la presente, significa residuos de aminoácido con cadenas laterales cargadas eléctricamente. Estas pueden ser cadenas laterales cargadas positivamente, tales como las presentes en arginina (Arg, R), histidina (His, H) y lisina (Lys, K) o pueden ser cadenas laterales cargadas negativamente, tales como las presentes en ácido aspártico (Asp, D) y ácido glutámico (Glu, E). El término 'residuo de aminoácido neutro' o residuo neutro, como se usa en la presente, se refiere a todos los otros aminoácidos que no portan 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 CH3', 'emparejamiento CH3-CH3', 'interfaz de dominio' o simplemente 'interfaz', como se usa en la presente, se refiere a la asociación entre dos dominios CH3 de polipéptidos que comprenden dominio CH3 separados, que son 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 de atracción entre cadenas laterales aromáticas, la formación de enlaces disulfuro u otras fuerzas conocidas por un experto en la técnica.

Como se usa en la presente, dichos medios para el emparejamiento preferencial del primer y segundo polipéptidos que comprenden el dominio CH3 y dicho tercer y cuarto polipéptido que comprenden el dominio CH3 pueden ser cualquier medio conocido en la técnica. En una modalidad, al menos una molécula de ácido nucleico codifica un dominio CH3 que contiene en una posición de residuo de contacto un residuo de aminoácido grande (es decir, un "botón" o "protuberancia") tal como, por ejemplo, R, F, Y, W, I o L, mientras que al menos otra molécula de ácido nucleico codifica un dominio CH3 que contiene en una posición de residuo de contacto complementario un residuo de aminoácido pequeño (es decir, un "ojal" o "cavidad") como, por ejemplo, G, A, S, T o V. Los dominios CH3 resultantes se emparejarán, preferentemente, entre sí, debido a la conformación estérica de dichos aminoácidos de contacto. La tecnología de botón en ojal se describe en la presente descripción anteriormente con más detalle. En una modalidad adicional de la presente invención, al menos una molécula de ácido nucleico codifica un dominio CH3 que contiene en una posición de residuo de contacto que está cargada naturalmente, es decir, un K, H, R, D o E de origen natural, un aminoácido que ahora porta la carga opuesta en comparación con el de tipo silvestre, mientras que al menos otra molécula de ácido nucleico codifica un dominio CH3 que contiene en una posición de residuo de contacto complementaria que está cargada naturalmente, un aminoácido que ahora porta la carga opuesta en comparación con el de tipo silvestre. Los dominios CH3 manipulados genéticamente resultantes se emparejarán entre sí, preferentemente, debido a las cargas opuestas de dichos aminoácidos de contacto, mientras que el emparejamiento de dominios CH3 idénticos disminuirá debido a la repulsión electrostática. En una modalidad, se usan las mutaciones CH3 como se describe en los documentos EP01870459, WO 2009/089004, Gunasekaran y otros (2010)). Preferentemente, ambos medios para el emparejamiento preferencial de dichos 1^{er} y 2^{do} polipéptidos que comprenden el dominio CH3 y dichos 3^{er} y 4^{to} polipéptidos que comprenden el dominio CH3 son aminoácidos con carga manipulada genéticamente. En una modalidad, se manipulan genéticamente diferentes residuos de aminoácidos para el emparejamiento preferencial de dichos 1^{er} y 2^{do} polipéptidos que comprenden el dominio CH3 en comparación con los residuos de aminoácidos que se manipulan genéticamente para el emparejamiento preferencial de dichos 3^{er} y 4^{to} polipéptidos que comprenden el dominio CH3. En un método de acuerdo con la invención, al menos una primera y una segunda molécula de ácido nucleico codifican dominios CH3 con mutaciones novedosas proporcionadas por la presente invención. Como se describe en la presente descripción más abajo en más detalle, la presente invención proporciona mutaciones de CH3 novedosas que permiten la producción de ciertas moléculas similares a Ig biespecíficas de interés sin una cantidad significativa de subproductos no deseados (diméricos). La presente invención proporciona, además, mutaciones CH3 novedosas que permiten la producción de ciertas moléculas monoespecíficas similares a Ig de interés sin una cantidad significativa de subproductos no deseados (diméricos). Por lo tanto, se prefiere el uso de al menos una de estas mutaciones de CH3 de acuerdo con la presente invención.

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

El término "molécula de ácido nucleico", como se usa en la presente, se define como una molécula que comprende una cadena de nucleótidos, con mayor preferencia, ADN y/o ARN. En una modalidad, se usa ARN bicatenario. En otras modalidades, una molécula de ácido nucleico de la invención puede comprender 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" abarca, además, 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.

La presente invención proporciona, además, un método de acuerdo con las reivindicaciones para fabricar una célula huésped para la producción de al menos dos anticuerpos diferentes. Dichos métodos para fabricar dichas células huésped comprenden preferentemente, además, la etapa de introducir en dicha célula huésped una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera común.

Además, se proporciona en la presente descripción una célula huésped recombinante de acuerdo con las reivindicaciones que comprende secuencias de ácido nucleico que codifican al menos una primera, una segunda, una tercera y una cuarta cadena polipeptídica que comprenden un dominio CH3.

Una célula huésped recombinante de acuerdo con la invención comprende, además, preferentemente, una secuencia de ácidos 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, lo que incluye bacterias tales como, por ejemplo, *Escherichia* (por ejemplo, *E. coli*), *Enterobacterias*, *Salmonella*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, levaduras tales como *S. cerevisiae*, *K. lactis*, *P. pastoris*, *Candida* o *Yarrowia*, hongos filamentosos tales como *Neurospora*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus nidulans* y *Aspergillus niger*, células de insectos tales como células SF-9 o SF-21 de *Spodoptera frugiperda* y, preferentemente, células de mamíferos tales como células de ovario de hámster chino (CHO), células BHK, células de ratón lo que incluye células SP2/0 y células de mieloma NS-0, células de primates tales como células COS y Vero, células MDCK, células BRL 3A, hibridomas, células tumorales, células primarias inmortalizadas, células humanas tales como W138, HepG2, HeLa, HEK293, HT1080 o células de retina embrionarias tales como PER. C6 y similares. A menudo, el sistema de expresión de elección implicará un vector de expresión de células de mamífero y un huésped para que los anticuerpos puedan glicosilarse apropiadamente. Una línea celular humana, preferentemente PER.C6, puede usarse ventajosamente para obtener anticuerpos con un patrón de glicosilación completamente humano. Las condiciones para el crecimiento o la multiplicación de las células (ver, 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 se realiza generalmente para aumentar las proporciones del producto y/o el crecimiento de las células con respecto a la otra, de acuerdo con métodos conocidos generalmente por el experto en la técnica. En general, los principios, protocolos y técnicas prácticas para maximizar la productividad de los cultivos de células de mamíferos pueden encontrarse en Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach (M. Butler, ed., IRL Press, 1991). La expresión de anticuerpos en células huésped recombinantes se ha descrito ampliamente en la técnica (ver, por ejemplo, documentos EP0120694; EP0314161; EP0481790; EP0523949; Patente de EE.UU. 4,816,567; documento WO 00/63403). Las moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas ligeras y pesadas pueden presentarse como copias extracromosómicas y/o integradas de manera estable en el cromosoma de la célula huésped; se prefiere esta última.

Es un aspecto adicional de la presente invención proporcionar un cultivo de células huésped recombinantes de acuerdo con la invención, o un cultivo de células huésped recombinantes obtenido o que puede obtenerse mediante un método de acuerdo con la invención, donde dicho cultivo produce al menos dos anticuerpos diferentes.

Para obtener la expresión de secuencias de ácido nucleico que codifican los polipéptidos que comprenden el dominio CH3, los expertos en la técnica conocen bien que las secuencias capaces de dirigir dicha expresión pueden unirse funcionalmente a las secuencias de ácido nucleico que codifican los polipéptidos que comprenden el dominio CH3. Unido funcionalmente significa que las secuencias de ácido nucleico que codifican los polipéptidos que comprenden el dominio CH3 o sus precursores se unen a las secuencias capaces de controlar la expresión de manera que estas secuencias pueden controlar la expresión de los polipéptidos o precursores que comprenden el dominio CH3. Se dispone en la técnica de vectores de expresión útiles, por ejemplo, la serie de vectores pcADN de Invitrogen. Cuando la secuencia que codifica el polipéptido de interés se inserta apropiadamente con referencia a las secuencias que rigen la transcripción y traducción del polipéptido codificado, el casete de expresión resultante es útil para producir el polipéptido de interés, denominado como expresión. Las secuencias que controlan la expresión pueden incluir promotores, potenciadores y sus combinaciones. Estos deberían ser capaces de funcionar en la célula huésped, lo que controla de esta manera la expresión de las secuencias de ácido nucleico que se unen funcionalmente a ellas. Los promotores pueden ser constitutivos o regulados, y pueden obtenerse de diversas fuentes, lo que incluye virus, fuentes procariotas o eucariotas, o diseñarse artificialmente. La expresión de ácidos nucleicos de interés puede ser a partir del promotor natural o un derivado de este o a partir de un promotor completamente heterólogo. Algunos promotores bien conocidos y muy usados 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 inmediato temprano (IE) de CMV y promotores derivados del Virus de Simio 40 (SV40). Los promotores adecuados pueden derivarse, además, a partir de células eucariotas, tales como los promotores de metalotioneína (MT), el promotor del factor de elongación 1 α (EF-1 α), el promotor de actina, un promotor de inmunoglobulina y los promotores de choque térmico. Cualquier promotor o potenciador/promotor capaz de controlar la expresión de la secuencia de interés en la célula huésped es adecuado en la invención. En una modalidad, la secuencia capaz de controlar la expresión comprende una región de un promotor de CMV, preferentemente, la región que comprende los nucleótidos -735 a +95 del potenciador/promotor del gen inmediato temprano de CMV. El experto en la técnica 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 y elementos STAR (documento WO 03/004704). 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 puede lograrse mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica e incluye, pero no se limita a, proporcionar nutrientes para la célula. Los métodos comprenden el crecimiento adherido a superficies, crecimiento en suspensión o sus combinaciones. Pueden optimizarse varias condiciones de cultivo mediante métodos bien conocidos en la técnica, para optimizar los rendimientos de producción de proteínas. El cultivo puede hacerse, por ejemplo, en placas, botellas rotatorias o en biorreactores, mediante el uso de lotes, sistemas de alimentación por lotes, sistemas continuos, fibra hueca y similares. Para lograr la producción a gran escala (continua) de proteínas recombinantes mediante cultivo celular, se prefiere en la técnica tener células capaces de crecer en suspensión, y se prefiere tener células capaces de cultivarse en ausencia de suero derivado de animales o humanos o componentes de suero derivados de animales o humanos. De esta forma, la purificación es más fácil y se mejora la seguridad debido a la ausencia de proteínas animales o humanas adicionales derivadas del medio de cultivo, mientras que el sistema es, además, muy confiable ya que los medios sintéticos son los mejores en cuanto a reproducibilidad.

Las moléculas similares a Ig se expresan en células huésped y se cosechan a partir de las células o, preferentemente, del medio de cultivo celular mediante métodos que se conocen generalmente por el experto en la técnica. Después de la recolección, estas moléculas similares a Ig pueden purificarse mediante el uso de 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, y cromatografía de interacción hidrófoba. Para una mezcla de anticuerpos que comprende moléculas de IgG, puede usarse adecuadamente la cromatografía de afinidad con proteína A o proteína G (ver, por ejemplo, Patentes de EE.UU. 4,801,687 y 5,151,504).

Las moléculas similares a Ig, y/o sus mezclas, producidas con métodos de acuerdo con la presente invención tienen, preferentemente, una cadena ligera común. Además, se proporciona, por lo tanto, un método de acuerdo con la invención, que comprende además proporcionar a la 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, lo que forma de esta manera dominios funcionales de unión a antígeno. Un dominio de unión a antígeno funcional es capaz de unirse específicamente a un antígeno. Preferentemente, 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, lo que forma de esta manera dominios funcionales de unión a antígeno, de manera que se evita el emparejamiento erróneo de cadenas pesadas y ligeras no compatibles. En un aspecto, solo se usan cadenas ligeras comunes con una secuencia de aminoácidos idéntica. Alternativamente, los expertos en la técnica reconocerán que "común" se refiere, además, 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 donde se presentan mutaciones (deleciones, sustituciones, adiciones) que no influyen materialmente en la formación de regiones de unión funcionales. Por lo tanto, dichas variantes también son capaces de unir diferentes cadenas pesadas y formar dominios de unión a antígeno funcionales. Por lo tanto, el término 'cadena ligera común', como se usa en la presente, se refiere a cadenas ligeras que pueden ser idénticas o tener algunas diferencias en la secuencia de aminoácidos, a la vez que retienen 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 son idénticas pero que son funcionalmente equivalentes, por ejemplo, al introducir y probar cambios conservadores de aminoácidos y/o cambios de aminoácidos en regiones que no contribuyen, o solo contribuyen parcialmente, a la especificidad de unión cuando se emparejan con la cadena pesada. Una combinación de una cierta cadena ligera común y dichas variantes funcionalmente equivalentes se abarca dentro del término "cadena ligera común". Se hace referencia al documento WO 2004/009618 para una descripción detallada del uso de cadenas ligeras comunes. Preferentemente, se usa una cadena ligera común en la presente invención que es una cadena ligera similar a la línea germinal, con mayor preferencia, una cadena ligera de línea germinal, preferentemente, una cadena ligera kappa humana de la línea germinal reorganizada, con la máxima preferencia, la cadena ligera kappa humana de la línea germinal reorganizada IgVκ1-39/Jκ o IGvκ3-20/Jκ.

Alternativamente, el experto puede seleccionar, como alternativa al uso de una cadena ligera común y para evitar el emparejamiento erróneo de cadenas pesadas y ligeras no compatibles, 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/o WO2009/080253.

La presente invención proporciona nuevos dominios CH3 manipulados genéticamente, así como también nuevas combinaciones de mutaciones CH3. Antes de la presente invención, los aminoácidos de contacto cargados de los dominios CH3 que se conocía se involucraban en el emparejamiento CH3-CH3 se sustituían por aminoácidos de carga opuesta (inversión de carga), lo que influía de esta manera en el emparejamiento CH3-CH3. Las mutaciones de acuerdo con la presente invención son una alternativa inventiva a este enfoque, porque ahora los aminoácidos CH3 que no se cargan o son neutros en el CH3 de tipo silvestre se sustituyen con residuos cargados. La presente invención en esta modalidad no intercambia aminoácidos de contacto cargados por aminoácidos de carga opuesta, sino que sustituye los aminoácidos CH3 no cargados por los cargados. El enfoque de la presente invención proporciona no solo un método para dirigir eficientemente la dimerización de dominios CH3, sino que, además, tiene la ventaja de que se crea al menos una interacción carga-carga adicional en la interfaz CH3. En vista de esta interacción 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

CH3 manipulado genéticamente por el contrario a sus homodímeros parentales (AA o BB)). Además, se ha hecho posible sorprendentemente aumentar aún más la proporción de una o más moléculas similares a Ig de interés en una mezcla. Como se describió en la presente descripción anteriormente, los métodos conocidos en la técnica para la producción preferencial de un anticuerpo biespecífico implican típicamente la producción de algunos productos secundarios diméricos no deseados. Por ejemplo, la proporción de un anticuerpo biespecífico de interés mediante el uso de la tecnología de botón en ojal es, en el mejor de los casos, del 87 %, mientras que el enfoque de manipulación electrostática en donde los aminoácidos de contacto cargados se sustituyen por aminoácidos de carga opuesta, también resulta en proporciones de hasta al 96 % (ver, por ejemplo, el ejemplo 11). Sorprendentemente, los presentes inventores han tenido éxito en introducir mutaciones que mejoran aún más la proporción de una molécula similar a Ig de interés en una mezcla. Por ejemplo, el Ejemplo 17 describe un método que usa mutaciones de acuerdo con la presente invención, en donde la proporción de un anticuerpo biespecífico de interés se aumentó hasta tal punto que no se detectó ningún subproducto dimérico en la mezcla resultante en absoluto. Las semimoléculas no emparejadas que consisten solo en una cadena pesada emparejada con una cadena ligera común se presentaron en cierta medida en las mezclas, pero estas son el resultado de la expresión no equilibrada de las cadenas pesadas y pueden separarse fácilmente de la mezcla mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Por lo tanto, con dichas mutaciones de acuerdo con la presente invención, puede producirse una molécula biespecífica similar a Ig en una célula individual con una alta proporción sin esencialmente la presencia de subproductos diméricos contaminantes, lo que es adecuado particularmente para la producción de una composición farmacéutica.

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 se ubican lo suficientemente cerca entre sí en la conformación tridimensional de la molécula similar a Ig resultante para poder ser capaz de interactuar entre sí. Por lo tanto, el primer dominio CH3 se emparejará, preferentemente, con el segundo dominio CH3.

En un método de acuerdo con la invención, la treonina (T) en la posición 366 de un primer dominio CH3 se reemplaza por lisina (K) y la leucina (L) en la posición 351 de un segundo dominio CH3 se reemplaza por ácido aspártico (D). Si el primer polipéptido que comprende el dominio CH3, que porta una lisina (K) en la posición 366, comprende, además, un dominio variable que tiene especificidad por el antígeno A, y si el segundo polipéptido que comprende el dominio CH3, que porta un ácido aspártico (D) en la posición 351, comprende, además, un dominio variable que tiene especificidad por el antígeno B, se formarán predominantemente moléculas similares a Ig biespecíficas con una especificidad AB. Por lo tanto, se proporciona un método de acuerdo con la presente invención, en donde dichos medios para el emparejamiento preferencial de dichos 1^{er} y 2^{do} polipéptidos que comprenden el dominio CH3 o dichos medios para el emparejamiento preferencial de dichos 3^{er} y 4^{to} polipéptidos que comprenden el dominio CH3 son una sustitución de treonina en la posición 366 de dicho 1^{er} o 3^{er} dominio CH3 por lisina (K) y la sustitución de la leucina en la posición 351 de dicho 2^{do} o 4^{to} dominio CH3 por ácido aspártico (D).

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 primer polipéptido que comprende un 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 segundo polipéptido que comprende un dominio CH3 que comprende además un dominio variable (por ejemplo, con especificidad B). Esto se indica como una mutación de par T366K/L351'D. Como se explicó anteriormente, 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 manera que estos aminoácidos se atraerán electrostáticamente entre sí. Por lo tanto, el primer dominio CH3 atraerá, preferentemente, el segundo dominio CH3 y se formarán predominantemente moléculas similares a Ig que comprenden un primer dominio CH3 que contiene lisina en la posición 366 emparejado con un segundo dominio CH3 que contiene ácido aspártico en la posición 351. Si el primer polipéptido que comprende el dominio CH3 tiene especificidad por el antígeno A, y si el segundo polipéptido que comprende el dominio CH3 tiene especificidad por el antígeno B, se formarán predominantemente moléculas similares a Ig biespecíficas con especificidad 'AB'. Nótese bien que, en algunas modalidades, la especificidad de los dominios variables de las cadenas polipeptídicas que comprenden dichos primer y segundo dominio CH3 puede ser la misma, lo que resultará en la formación de moléculas mono-específicas similares a Ig (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 recién introducido de aminoácidos cargados, en lugar de reemplazar las interacciones existentes de aminoácidos cargados. Esto no se describió o sugirió previamente. Por lo tanto, un aspecto de la invención proporciona un método de acuerdo con la presente invención para producir al menos dos anticuerpos diferentes a partir de una única célula huésped, en donde dicha 1^{ra} cadena polipeptídica que comprende el dominio CH3 comprende un residuo de lisina (K) en la posición de aminoácido 366 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE, y dicha 2^{da} cadena polipeptídica que comprende el dominio CH3 comprende un residuo de ácido aspártico (D) en la posición de aminoácido 351 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE.

Mediante el uso de las sustituciones de aminoácidos mencionadas anteriormente de acuerdo con la presente invención, es posible producir una molécula heterodimérica similar a Ig a partir de una sola célula, por lo que la presencia de homodímeros contaminantes es inferior al 5 %, preferentemente, inferior al 2 %, con mayor preferencia, inferior al 1 %, o, con la máxima preferencia, de manera que los homodímeros contaminantes están esencialmente ausentes.

Preferentemente, se proporciona un método de acuerdo con la presente invención para producir al menos dos anticuerpos diferentes, en donde la primera cadena polipeptídica que comprende el dominio CH3 comprende además un residuo de lisina (K) en la posición de aminoácido 351 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE. Se prefiere, además, que la segunda cadena polipeptídica que comprende el dominio CH3 comprenda además un residuo de ácido glutámico (E) o un residuo de ácido aspártico (D) en la posición de aminoácido 349 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE, y/o un residuo de ácido glutámico (E) en la posición de aminoácido 368 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE. Con la máxima preferencia, la segunda cadena polipeptídica que comprende el dominio CH3 comprende además un residuo de ácido glutámico (E) en la posición de aminoácido 368 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE.

Por lo tanto, en una modalidad preferida, las mutaciones T366K/L351'D mencionadas anteriormente de acuerdo con la presente invención, se combinan posteriormente con la sustitución de leucina (L) por ácido glutámico (E) en la posición 368 del segundo dominio CH3. Esto, por ejemplo, se indica como una mutación T366K/L351'D,L368'E (pero también son posibles formas alternativas de indicar, tales 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 primer polipéptido que comprende el dominio CH3 con especificidad por el antígeno A, y un segundo polipéptido que comprende el dominio CH3 con especificidad por el antígeno B resulta en una buena proporción particular de moléculas similares a Ig biespecíficas con doble especificidad AB. Con este par mutacional, incluso es posible obtener anticuerpos biespecíficos sin que se forme ninguna cantidad detectable de homodímeros.

En aún otra modalidad preferida, la treonina (T) se sustituye por lisina (K) en la posición 366 de un primer dominio CH3 y la leucina (L) se sustituye por ácido aspártico (D) en la posición 351 de un segundo dominio CH3 y la tirosina (Y) se sustituye 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 indicar estas mutaciones pueden incluir, por ejemplo, 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 ayuda a la estabilidad del heterodímero (puntuaciones in silico más bajas), así como también a la desestabilización del monodímero (puntuaciones in silico más altas) y el ácido glutámico (E) en la posición 349 es más favorable que el ácido aspártico (RE). Por lo tanto, la introducción de una segunda sustitución de aminoácidos en el segundo polipéptido que comprende el dominio CH3, que comprende ya la sustitución de aminoácido en la posición 351, favorece aún más la heterodimerización.

En aún otra modalidad preferida, la treonina (T) se sustituye por lisina (K) en la posición 366 de un primer dominio CH3 y la leucina (L) se sustituye por ácido aspártico (D) en la posición 351 de un segundo dominio CH3 y la tirosina (Y) se sustituye por ácido glutámico (E) en la posición 349 de dicho segundo dominio CH3 y la leucina (L) se sustituye por ácido glutámico (E) en la posición 368 de dicho segundo dominio CH3. Esto se indica 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 ayudan a la estabilidad del heterodímero (puntuaciones in silico más bajas), así como también a la desestabilización del dímero BB (puntuaciones in silico más altas) y los 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.

En aún otra modalidad preferida, la treonina (T) se sustituye por lisina (K) en la posición 366 de un primer dominio CH3 y la leucina (L) se sustituye por lisina (K) en la posición 351 de dicho primer dominio CH3 y la leucina (L) se sustituye por ácido aspártico (D) en la posición 351 de un segundo dominio CH3 y la leucina (L) se sustituye por ácido glutámico (E) en la posición 368 de dicho segundo dominio CH3. Esto se indica como una mutación T366K,L351K/L351'D,L368'E. Esta mutación aumenta, además, la proporción del anticuerpo (biespecífico) de interés, como se muestra en los Ejemplos. Además, con esta mutación es posible obtener anticuerpos biespecíficos sin que se forme ninguna cantidad detectable de homodímeros.

En aún otra modalidad preferida, la treonina (T) se sustituye por lisina (K) en la posición 366 de un primer dominio CH3 y la leucina (L) se sustituye por lisina (K) en la posición 351 de dicho primer dominio CH3 y la leucina (L) se sustituye por ácido aspártico (D) en la posición 351 de un segundo dominio CH3 y la tirosina (Y) se sustituye por ácido aspártico (D) en la posición 349 de dicho segundo dominio CH3 y la arginina (R) se sustituye por ácido aspártico (D) en la posición 355 de dicho segundo dominio CH3. Esto se indica como una mutación T366K,L351K/L351'D,Y349'D,R355'D. El par T366K-L351K/L351'D-Y349'D puede mejorarse aún más mediante la mutación R355'D en la cadena B, lo que resulta en una puntuación in silico de BB más alta, pero también la puntuación in silico de AB es ligeramente más alta.

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 AA en CH3	Núm. Constructo	Se empareja preferentemente con
5	- (tipo silvestre)	-	Tipo silvestre
	E356K, D399K	1	Constructo 2 o 3
	K392D, K409D	2	Constructo 1
10	K392D, K409D, K439D	3	Constructo 1
	K392D, D399K, K409D	4	Constructo 4
	E356K, E357K, K439D, K370D	5	Constructo 5
	T366W	6	Constructo 7
15	T366S, L368A, Y407V	7	Constructo 6
	T366K	43	Constructo 63, 69, 70, 71, 73
	L351D	63	Constructo 43, 68
20	T366K, L351K	68	Constructo 63, 69, 70, 71, 72, 75
	L351D, L368E	69	Constructo 43, 68
	L351E, Y349E	70	Constructo 43, 68
25	L351D, Y349E	71	Constructo 43, 68
	L351D, R355D	72	Constructo 43, 68
	L351D, Y349E, L368E	73	Constructo 43
30	L351D, Y349D, R355D	75	Constructo 68

Por lo tanto, también se describe en la presente un método de acuerdo con la presente invención para producir al menos dos anticuerpos diferentes, en donde dichos medios para el emparejamiento preferencial de dichos 1^{er} y 2^{do} polipéptidos que comprenden el dominio CH3 y/o dichos medios para el emparejamiento preferencial de dichos 3^{er} y 4^{to} polipéptidos que comprenden el dominio CH3 comprenden al menos una combinación de mutaciones como se representa en la Tabla B. Preferentemente, dichos medios para el emparejamiento preferencial de dichos 1^{er} y 2^{do} polipéptidos que comprenden el dominio CH3 y dichos medios para el emparejamiento preferencial de dichos 3^{er} y 4^{to} polipéptidos que comprenden el dominio CH3 comprenden al menos dos combinaciones de mutaciones como se representa en la Tabla B.

La presente invención describe, además, nuevas combinaciones de mutaciones CH3 con las cuales se ha vuelto posible producir una mezcla de al menos dos moléculas mono-específicas similares a Ig en una sola célula, en donde las moléculas contaminantes similares a Ig biespecíficas son inferiores al 5 %, preferentemente, superiores al 2 %, aún con mayor preferencia, inferiores al 1 % y, con la máxima preferencia, incluso esencialmente ausentes. Estas mutaciones de acuerdo con la invención son, por lo tanto, adecuadas particularmente para la producción de una mezcla de anticuerpos mono-específicos, lo que es ventajoso, por ejemplo, cuando se desea un alto nivel de reticulación de dos moléculas objetivo idénticas, cuando la densidad de anticuerpos en las células objetivo necesita ser lo suficientemente alta como para reclutar ciertas funciones efectoras, tales como la lisis mediada por el complemento de una célula tumoral, o cuando dos objetivos se encuentran demasiado lejos entre sí como para que no puedan unirse por un solo anticuerpo biespecífico, o para simplificar los procedimientos de aprobación regulatoria. En dichos casos, a menudo se desea optimizar la plataforma de producción para dichos anticuerpos mono-específicos. Como se muestra en el Ejemplo 10, la presente invención proporciona la idea de que cuando la lisina (K) en la posición 392 de un primer polipéptido que comprende un dominio CH3 (por ejemplo, que tiene especificidad A) se sustituye por ácido aspártico (D) y cuando el ácido aspártico (D) en la posición 399 de dicho primer polipéptido que comprende el dominio CH3 se sustituye por lisina (K) y cuando la lisina (K) en la posición 409 de dicho primer polipéptido que comprende el dominio CH3 se sustituye por ácido aspártico (D), es posible producir una mezcla de al menos dos moléculas similares a Ig mono-específicas diferentes en una sola célula, lo que incluye moléculas similares a Ig mono-específicas con especificidad AA, en donde la formación de subproductos biespecíficos (moléculas similares a Ig biespecíficas) se reduce a menos del 5 %, o incluso por debajo del 3 %, o incluso no es esencialmente detectable en absoluto. Por lo tanto, la combinación de mutaciones mencionada anteriormente (indicada en la presente descripción como K392D, D399K, K409D) se prefiere particularmente para la producción de una mezcla de moléculas mono-específicas similares a Ig. El experto apreciará que las variantes funcionales de estos, es decir, K392E, D399R, K409E, pueden resultar en efectos similares. Adicionalmente, los mutantes dobles que comprenden sustituciones D399K y K409D, u otras variantes funcionales tales como, por ejemplo, K392D y K409D, D399R y K409E, etcétera, también pueden resultar en efectos similares.

65

- Lo mismo es válido para una combinación de mutaciones en donde el ácido glutámico (E) en la posición 356 de un primer polipéptido que comprende el dominio CH3 se sustituye por lisina (K) y en donde el ácido glutámico (E) en la posición 357 de dicho primer polipéptido que comprende el dominio CH3 se sustituye por lisina (K) y en donde la lisina (K) en la posición 439 de dicho primer polipéptido que comprende el dominio CH3 se sustituye por ácido aspártico (D) y en donde la lisina (K) en la posición 370 de dicho primer polipéptido que comprende el dominio CH3 se sustituye por ácido aspártico (D). Esta combinación de mutaciones (indicada en la presente descripción como E356K, E357K, K439D, K370D) también se prefiere particularmente para la producción de una mezcla de moléculas monoespecíficas similares a Ig. El experto apreciará que sus variantes funcionales, es decir, E356R, E357R, K439E, K370E, pueden resultar en efectos similares. Además, los mutantes triples o dobles que comprenden E356K y K439D, y las sustituciones E357K y K370D, u otras variantes funcionales también pueden resultar en efectos similares. Por lo tanto, se describe además un método para producir al menos dos moléculas monoespecíficas similares a Ig a partir de una única célula huésped, en donde cada una de dichas dos moléculas similares a Ig comprende dos dominios CH3 que son capaces de formar una interfaz, el método comprende proporcionar en dicha célula
- 5 a) una primera molécula de ácido nucleico que codifica una 1^{ra} cadena polipeptídica que comprende el dominio CH3 que tiene una especificidad A,
b) una segunda molécula de ácido nucleico que codifica una 2^{da} cadena polipeptídica que comprende el dominio CH3 que tiene una especificidad B,
- 10 en donde la primera cadena polipeptídica que comprende el dominio CH3 comprende una mutación K392D, D399K, K409D y la segunda cadena polipeptídica que comprende el dominio CH3 comprende o bien un dominio CH3 de tipo silvestre o comprende una mutación E356K, E357K, K439D, K370D, el método comprende, además, la etapa de cultivar dicha célula huésped y permitir la expresión de dichas moléculas de ácido nucleico y recolectar dichas al menos dos moléculas similares a Ig diferentes del cultivo.
- 25 Un aspecto alternativo describe un método para producir al menos dos moléculas monoespecíficas similares a Ig a partir de una única célula huésped, en donde cada una de dichas dos moléculas similares a Ig comprende dos dominios CH3 que son capaces de formar una interfaz, el método comprende proporcionar en dicha célula
- 30 a) una primera molécula de ácido nucleico que codifica una 1^{ra} cadena polipeptídica que comprende el dominio CH3 que tiene una especificidad A,
b) una segunda molécula de ácido nucleico que codifica una 2^{da} cadena polipeptídica que comprende el dominio CH3 que tiene una especificidad B,
- 35 en donde la primera cadena polipeptídica que comprende el dominio CH3 comprende un dominio CH3 de tipo silvestre o comprende una mutación K392D, D399K, K409D y la segunda cadena polipeptídica que comprende el dominio CH3 comprende una mutación E356K, E357K, K439D, K370D, el método comprende, además, la etapa de cultivar dicha célula huésped y permitir la expresión de dichas moléculas de ácido nucleico y recolectar dichas al menos dos moléculas similares a Ig diferentes del cultivo.
- 40 Como se muestra en el Ejemplo 10, pueden producirse dos moléculas monoespecíficas similares a Ig en una sola célula, en donde la formación de moléculas biespecíficas similares a Ig es esencialmente indetectable. El experto puede seleccionar una 3^{ra} molécula de ácido nucleico que codifica una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 de tipo silvestre o manipulado genéticamente para proporcionar a la célula huésped de manera que se produce una mezcla de 3 anticuerpos monoespecíficos, y así sucesivamente.
- 45 En un aspecto de la invención, se proporciona un método de acuerdo con la invención para producir al menos dos anticuerpos diferentes en donde cada una de las cadenas polipeptídicas que comprenden el dominio CH3 comprende además una región variable que reconoce un epítipo objetivo diferente, en donde los epítipos objetivo se ubican 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 donde solo se señala como objetivo un epítipo. Por ejemplo, una molécula heterodimérica similar a Ig puede unirse simultáneamente a 2 epítipos presentes en, por ejemplo, receptores de factor de crecimiento o moléculas solubles fundamentales para que proliferen las células tumorales, lo que bloquea de esta manera eficazmente varias vías de señalización independientes que conducen a una proliferación no controlada, 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 de factor de crecimiento o moléculas solubles.
- 50 En una modalidad preferida, la molécula objetivo es una molécula soluble. En otra modalidad preferida, la molécula objetivo es una molécula unida a la membrana.
- 60 En otro aspecto de la invención, se proporciona un método de acuerdo con la invención para producir al menos dos anticuerpos diferentes en donde cada una de las cadenas polipeptídicas que comprenden el dominio CH3 comprende además una región variable que reconoce un epítipo objetivo, en donde los epítipos objetivo se ubican en moléculas diferentes. En este caso, cada una de las diferentes moléculas objetivo puede ser o bien una molécula soluble o una molécula unida a la membrana. En una modalidad, las diferentes moléculas objetivo son moléculas solubles. Alternativamente, una molécula objetivo es una molécula soluble, mientras que la segunda molécula objetivo es una
- 65

molécula unida a la membrana. En aún otra alternativa, ambas moléculas objetivo son moléculas unidas a la membrana. En una modalidad, las diferentes moléculas objetivo se expresan en las mismas células, mientras que en otras modalidades, las diferentes moléculas objetivo se expresan en células diferentes. Como ejemplo no limitante, cualquier molécula heterodimérica similar a Ig o cualquier combinación de al menos dos moléculas similares a Ig pueden ser adecuadas para bloquear simultáneamente múltiples receptores unidos a la membrana, lo que neutraliza múltiples moléculas solubles tales como las citocinas o factores de crecimiento para células tumorales o para neutralizar diferentes serotipos virales o cepas virales.

Una modalidad preferida proporciona un método de acuerdo con la invención para producir al menos dos anticuerpos diferentes, en donde al menos uno de dichos epítopos objetivo se encuentra sobre una célula tumoral. Alternativamente, o adicionalmente, al menos uno de dichos epítopos objetivo se encuentra sobre 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 inmunitarias, preferentemente, células efectoras inmunitarias humanas, al unirse específicamente a una molécula objetivo localizada en células efectoras inmunitarias. En una modalidad adicional, dicha célula efectora inmunitaria se activa al unirse la molécula similar a Ig a la molécula objetivo. El reclutamiento de mecanismos efectores puede abarcar, por ejemplo, la redirección de la citotoxicidad inmunomodulada 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 tal como el receptor de células T o un receptor gamma Fc, lo que activa de esta manera las vías efectoras inmunitarias aguas abajo. El término 'célula efectora inmunitaria' o 'célula efectora', como se usa en la presente, se refiere a una célula dentro del repertorio natural de células en el sistema inmunitario de mamíferos que puede activarse para afectar la viabilidad de una célula objetivo. Las células efectoras inmunitarias incluyen células del linaje linfóide, tales como las células asesinas naturales (NK), las células T, lo que incluye las células T citotóxicas, o las células B, pero además, las células del linaje mielóide pueden considerarse células efectoras inmunitarias, tales como los monocitos o los macrófagos, células dendríticas y granulocitos neutrófilos. Por lo tanto, dicha célula efectora es, preferentemente, 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 inmunitarias pueden incluir CD3, CD16, CD25, CD28, CD64, CD89, NKG2D y NKp46. Por lo tanto, se proporciona, además, un método de acuerdo con la invención para producir al menos dos anticuerpos diferentes, en donde dicho epítipo objetivo se encuentra en una molécula CD3, CD16, CD25, CD28, CD64, CD89, NKG2D o NKp46.

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

En una modalidad preferida, se proporciona un método de acuerdo con la invención para producir al menos dos anticuerpos diferentes, en donde dichos al menos dos anticuerpos diferentes son anticuerpos del isotipo IgG1, como se describió anteriormente en la presente descripción.

Además, se proporciona una mezcla de al menos dos anticuerpos, que puede obtenerse por un método de acuerdo con la presente invención. Dicha mezcla de anticuerpos comprende, preferentemente, al menos una mutación CH3 como se representa en la Tabla B. Además, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una mezcla de al menos dos anticuerpos de acuerdo con la presente invención. En una modalidad, dicho anticuerpo es un anticuerpo biespecífico. En otra modalidad, dicho anticuerpo es un anticuerpo mono-específico. Una modalidad preferida proporciona una mezcla de al menos dos anticuerpos diferentes que pueden obtenerse mediante un método de acuerdo con la invención, en donde dichos al menos dos anticuerpos diferentes se unen a diferentes epítopos en el mismo antígeno y/o a diferentes epítopos en antígenos diferentes. Las ventajas y los usos preferidos de dichas mezclas y anticuerpos se describen en la presente descripción anteriormente. La invención proporciona, además, una mezcla de al menos dos anticuerpos diferentes que pueden obtenerse mediante un método de acuerdo con la invención, en donde dichos al menos dos anticuerpos diferentes comprenden al menos un anticuerpo heterodimérico. En una modalidad, dos de dichos al menos dos anticuerpos diferentes son anticuerpos heterodiméricos. Aún otra modalidad preferida proporciona mezclas que comprenden un anticuerpo heterodimérico que comprende dos dominios CH3, en donde uno de dichos dos dominios CH3 comprende las sustituciones de aminoácidos L351D y L368E y en donde 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 se denominan juntas 'combinación de mutaciones DEKK', 'variante DEKK', 'par DEKK', 'dominios CH3 manipulados genéticamente con DEKK', 'DEKK' o se usan 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 llama 'el lado KK'.

Además, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una mezcla de al menos dos anticuerpos que pueden obtenerse mediante cualquier método de acuerdo con la invención. Dicha composición farmacéutica puede comprender una mezcla que comprende anticuerpos mono-específicos o biespecíficos, o una combinación de anticuerpos mono-específicos y biespecíficos. Además, una composición farmacéutica de acuerdo con la invención comprende un

- portador aceptable farmacéuticamente. Como se usa en la presente, dicho 'portador aceptable farmacéuticamente' incluye cualquiera y todos los solventes, sales, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos o que retardan la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. En dependencia de la vía de administración (por ejemplo, la vía intravenosa, subcutánea o intraarticular), los anticuerpos pueden recubrirse con un material para protegerlos de la acción de los ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar los anticuerpos. En un aspecto, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una mezcla de al menos dos anticuerpos que pueden obtenerse mediante cualquier método de acuerdo con la invención, en donde dichos al menos dos anticuerpos diferentes se han producido por células huésped recombinantes de acuerdo con la presente invención.
- Además, se describe una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3 que comprende al menos una mutación como se representa en la Tabla B, así como también 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 además mediante los siguientes ejemplos. Estos ejemplos no limitan la invención de ninguna forma, sino que simplemente sirven para aclarar la invención.

Breve descripción de las figuras

- Figura 1: A) representación esquemática del vector de constructo MV1057. La región de relleno es la región en la cual se clona una región VH de anticuerpo. B) representación esquemática del vector de presentación de fagos MV1043.
- Figura 2: secuencia de aminoácidos de Fc de IgG1 de tipo silvestre, como se presenta en el vector de constructo MV1057 (se aplica el esquema de numeración de la UE).
- Figura 3: secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las regiones VH usadas para la clonación en los diversos constructos.
- Figura 4: datos de espectrometría de masa de las transfecciones A, G y H.
- Figura 5: datos de espectrometría de masa de las transfecciones M y U.
- Figura 6: datos de espectrometría de masa de la transfección O.
- Figura 7: prevención de la homodimerización mediante la sustitución de aminoácidos neutros por aminoácidos cargados.
- Figura 8: Espectro de MS nativa de la muestra de transfección ZO (T366K/L351'D) (A) y espectro de MS convuldo de la muestra de transfección ZO (T366K/L351'D). El segundo pico/principal representa la molécula biespecífica (B).
- Figura 9: Puntuaciones de HADDOCK en pares de mutaciones verificados experimentalmente
- Figura 10: Dibujos de las 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 diversos mutantes de carga 366/351'
- Figura 12: Dibujos de las 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
- 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 con o bien el constructo L351D (panel izquierdo) o el L351D,Y349E (panel derecho), ampliada en un solo estado de carga de la IgG completa (no se muestran los semicuerpos)
- Figura 19: A) Resultados de la MS nativa que muestran las abundancias relativas de AA, AB, BB, A y B (el total de todas las especies es el 100 %); B) ídem 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 gráfico.
- Figura 21: Resultados del experimento de congelación-descongelación 10x. 1122 = 1^{er} anticuerpo parental BB; 1337 = 2^{do} 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 a partir de las combinaciones 3-6 y 9-12 de la Tabla 15.
- Figura 22: Resultados de estabilidad del suero, medido por ELISA mediante el uso de 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 temporal T=0 días (100 %). 1337 = 2^{do} 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 a partir de las combinaciones 3-6 y 9-12 de la Tabla 15.
- 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 mutaciones de inversión de carga, con especificidad 'A' en el lado E356K:D399K y 'B' en el lado K392D:K409D
- Figura 24: resultados de nMS de las transfecciones núms. 1-11 de la Tabla 20.

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

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

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

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

Figura 29: niveles séricos de muestras de anticuerpo manipulado genéticamente con DEKK y sus dos anticuerpos parentales (estudio pK).

10 EJEMPLOS

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

Para tener una amplia variedad de moléculas similares a Ig que difieren en sus dominios CH3 de manera que el emparejamiento de las moléculas similares a Ig que comprenden el dominio CH3 se promueve preferentemente o se inhibe, una serie de sustituciones de aminoácidos que se conoce que promueven la formación de heterodímeros, así como también una serie de sustituciones de aminoácidos alternativas que no se informaron ni probaron previamente, pero que se eligieron para promover la formación de homodímeros, se introdujeron en un vector de constructo (vector de constructo MV1057; Figura 1A). El vector de constructo MV1057 comprende secuencias de ácido nucleico que codifican la parte Fc de la IgG1 de tipo silvestre normal, como se representa en la Figura 2. La Tabla 1 enumera las sustituciones de aminoácidos que se introdujeron en este Fc de tipo silvestre, lo que resultó en una serie de siete constructos. Todos los constructos se hicieron en Geneart. Los constructos 1, 2 y 3, o alternativas de estos, se han descrito previamente para controlar la heterodimerización (documentos EP01870459, WO2009/089004) como lo hacen los constructos 6 y 7 (documento WO98/50431). Los constructos 4 y 5 son nuevos y se diseñan para promover la homodimerización.

Tabla 1

Sustituciones CH3	AA en	Núm. Constructo	Se emparejará con	% de producto biespecífico informado
- (tipo silvestre)	-	-	- (tipo silvestre)	~50%
E356K, D399K		1	Constructo 2 or 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%

45 Ejemplo 2: clonación de VH en constructos con mutaciones CH3

Se usaron varias regiones VH de anticuerpos 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 pueden usarse en asociación con otros dominios de anticuerpos para generar anticuerpos de longitud completa que son ya sea biespecíficos o monoespecíficos. La especificidad del anticuerpo según lo definido por las combinaciones VH/VL no afectará el comportamiento de dimerización de la cadena pesada que se controla por los dominios CH3. Se usaron combinaciones modelo VH/VL 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 de anticuerpos usadas a lo largo de los estudios. La codificación MF se refiere a la designación interna Merus para diversas VH, por ejemplo, VH MF1337 tiene especificidad para el toxoide tetánico, MF1025 para la tiroglobulina porcina, MF1122 para el fibrinógeno bovino. Las regiones VH presentes en el vector de presentación de fagos MV1043 (Figura 1B) se digieren con las enzimas de restricción SfiI y BstEII (New England Biolabs/núm. de 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 SfiI 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/núm. de cat. V3125/de acuerdo con las instrucciones del fabricante) para aislar el vector de corte y los insertos de genes de VH. Ambos se combinan mediante ligadura, después de lo cual la ligadura se transforma hacia E. coli DH5α (Invitrogen/núm. de cat. 12297-016/de acuerdo con las instrucciones del fabricante). Después del tamizaje durante toda la noche, se seleccionan colonias individuales y los vectores con un inserto correcto se identifican 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 vueltas a clonar, y que codifican adicionalmente la cadena ligera común hulgKV1-39 en células HEK293T, se realizó de acuerdo con procedimientos estándar de manera que la IgG pudiera expresarse (de Kruif y otros, Biotech Bioeng. 2010). Después de la transfección, se midieron los niveles de expresión de IgG en los sobrenadantes mediante el uso del sistema Octet-QK de ForteBIO, 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 detalles ver www.fortebio.com. Cuando se midieron niveles de expresión superiores a 5 µg/ml, la IgG se purificó mediante el uso de purificación por afinidad de proteína A.

Ejemplo 4: purificación de IgG

Los sobrenadantes de cultivo se purificaron mediante el uso de columnas de proteína A (GE Healthcare/núm. cat. 11-0034-95/de acuerdo con las instrucciones del fabricante) y se eluyeron en tampón 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 volvieron a tamponar directamente en PBS mediante el uso de una columna de desalación. Alternativamente, podría purificarse la IgG mediante el uso de perlas de proteína A (perlas de sefarosa CL-4B, GE healthcare núm. 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 Kruif y otros, Biotech Bioeng. 2010)

Ejemplo 6: SDS-PAGE

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

Ejemplo 7: Desglicosilación enzimática de IgG1

Como existe heterogeneidad en la glicosilación de las IgG, las proteínas se desglicosilaron para crear un solo producto con una masa distintiva, 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 toda la noche a 37 °C. Se realizó intercambio de tampón mediante el uso de columnas de filtro centrífugas MWCO de 10 kDa (Millipore) para eliminar el tampón de purificación original (tampón citrato 0,1 M pH 3,0/Tris-HCl 1,0 M pH 8,0) y para volver a tamponar en PBS. Se realizaron procedimientos similares de intercambio de tampones para eliminar las cadenas de glicano desprendidas y para cambiar el tampón 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, 11 000 rpm y 4 °C. Después del lavado, se cargaron 50 µl de IgG desglicosilada en el filtro y se añadieron 450 µl de acetato de amonio 150 mM, pH 7,5, seguido posteriormente por 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 nuevo tampón de acetato de amonio 150 mM pH 7,5 para un volumen total de 500 µl. Después de la última etapa de centrifugación, el resto de la IgG1 desglicosilada con tampón intercambiado, aproximadamente 25 µl, se recogió y se transfirió a un tubo eppendorf, listo para el análisis espectrométrico de masas.

Ejemplo 8: Análisis de espectrometría de masas nativa

Se usó espectrometría de masas para identificar las diferentes especies de IgG en las mezclas de IgG purificadas y para establecer en qué relaciones se presentan estas especies de IgG. En resumen, 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 recubiertos de oro elaborados internamente (mediante el uso de un extractor Sutter P-97 [Sutter Instruments Co., Novato, CA, EE.UU.] y un pulverizador catódico Edwards Scancoat Six [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 la detección de masa alta (Tahallah y otros, RCM 2001). Se usó un voltaje capilar de 1300 V y un voltaje del cono de muestreo de 200 V; sin embargo, estas configuraciones se ajustaron cuando se requirió una resolución más alta de la relación 'señal con respecto 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 desnaturalizantes, se atomizaron las proteínas 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 mediante el uso del programa informático MassLynx 4.1 (Waters Corp., Milford, MA, EE.UU.). Se usó un suavizado mínimo, después de lo cual se centraron los espectros. La masa de la especie se calculó mediante el uso de cada estado de carga en una serie. Las intensidades correspondientes de cada

estado de carga se asignaron por MassLynx y se sumaron. Este enfoque permitió la cuantificación relativa de todas las especies en una muestra. Alternativamente, la cuantificación de los picos puede realizarse mediante el uso de métodos de área bajo la curva (AUC), conocidos en la técnica. Todos los análisis se repitieron tres veces para calcular las desviaciones estándar tanto de las masas de las IgG así como también de su abundancia relativa.

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

10 Se usaron varias regiones VH de anticuerpos con especificidades conocidas y capacidad conocida para emparejarse con la cadena ligera IGKV1-39 humana (Figura 3) para volver a clonarse en el vector de constructo de tipo silvestre MV1057, o en el constructo 4 o el constructo 5 de la Tabla 1, lo que resultó en los vectores I-III (Tabla 2). Los vectores resultantes I, II y III, que contienen cada uno secuencias de ácido nucleico que codifican la cadena ligera humana común, así como también una cadena pesada de Ig con una región CH3 diferente y diferente especificidad de VH, se transfectaron posteriormente en células, ya sea solas para demostrar la formación de solo anticuerpos monoespecíficos intactos, o en combinación con uno o dos otros vectores de constructo para obtener mezclas de dos anticuerpos monoespecíficos o tres monoespecíficos. La Tabla 3 representa el programa de transfección y los resultados.

15 Tabla 2: especificidad de la VH insertada en diferentes constructos

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

Tabla 3: programa de transfección y resultados

Núm. de los diferentes monoespecíficos producidos	Transfección de	Código y relación de la transfección	Especies y esperadas	Masa calculada -2LYS	Masa experimental	AA encontrado (%)	BB encontrado (%)	CC encontrado (%)	Otras moléculas (%)
1	Solo el vector I	A	AA	146521	146503	100			
1	Solo el vector II	G	BB	144032	144087		100		
1	Solo el vector III	H	CC	144647	144656			100	
2	Vector I y II	M (I:II=1:1)	AA	146521	146518	51	45		4
			BB	144032	144030				
2	Vector I y III	N (I:III=1:1)	AA	146521	146509	88		9	3
			CC	144647	144633				
		U (I:III= 1:5)	AA	146521	146522	47		48	5
			CC	144647	144643				
2	Vector II y III	nd	BB CC						
3	Vector I, II y III	O (I:II:III=1:1:1)	AA	146521	146525	66	4	30	
			BB	144032	144032				
			CC	144647	144650				
		V (I:II:III=1:1:10)	AA	146521	146531	8	81	9	2
			BB	144032	144043				
			CC	144647	144654				

nd= no se hizo.

Se observó que las transfecciones A, G y H resultaron en la formación de homodímeros solamente, y se recuperó el 100 % de AA, BB o CC mono-específicos bivalentes a partir de las células transfectadas con cualquiera de los vectores I, II o III (Fig. 4). Aunque esto era de esperar y se demostró previamente para la transfección A, en realidad ahora se muestra por primera vez que se informa la homodimerización de cadenas pesadas de Ig con CH3 manipulados genéticamente que contienen o bien la sustitución triple de aminoácidos del constructo 4 (es decir, K392D, D399K, K409D) o la sustitución cuádruple de aminoácidos del constructo 5 (es decir, E356K, E357K, K439D, K370D) (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 con CH3 manipulados genéticamente pueden coexpresarse en una sola célula junto con una cadena ligera común, lo que resulta en mezclas de dos especies de anticuerpos mono-específicos sin la presencia de anticuerpos bispecíficos 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 las semimoléculas que consisten en un solo par de cadena pesada y ligera. Es importante destacar que la fracción 'otro' no incluye producto bispecífico. En la transfección M, la relación AA:BB fue cercana a 1:1 tras la transfección de relaciones iguales del vector de ADN. Sin embargo, la transfección N resultó en una relación 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 de ADN de I:III iguala 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 indeseados (es decir, sin presencia abundante de AC o semimoléculas A o C) (fig. 5). Las nuevas modificaciones de CH3 de los constructos 4 y 5 difieren sustancialmente del CH3 de tipo silvestre, de manera que no se produce heterodimerización entre el tipo silvestre y 4, o entre el tipo silvestre y 5, lo cual es ventajoso para su aplicación en la producción a gran escala de mezclas de anticuerpos mono-específicos a partir de células individuales.

De manera análoga a estos resultados se espera, además, que la transfección de dos diferentes cadenas pesadas de Ig con CH3 manipulado genéticamente (constructos 4 y 5) resulte en mezclas de dos anticuerpos mono-específicos diferentes solamente, sin otras especies no deseadas presentes. Se razona que las modificaciones de CH3 del constructo 4 difieren sustancialmente de las modificaciones de CH3 de los constructos 5, de manera que no se produce heterodimerización. En ese caso, la coexpresión de cadenas pesadas con CH3 manipulado genéticamente de los constructos 4 y 5, junto con cadenas pesadas de CH3 de tipo silvestre en una sola célula resultaría en solo 3 anticuerpos mono-específicos.

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

Ejemplo 11: mezclas de 2 anticuerpos bispecíficos a partir de una sola célula

Mientras que el uso de cadenas pesadas con CH3 manipulado genéticamente para la producción de anticuerpos bispecíficos individuales se ha informado en otra parte, este experimento se diseñó para investigar si es factible producir mezclas de 2 anticuerpos bispecíficos diferentes a partir de una sola célula.

Se usaron regiones VH de anticuerpo con especificidades conocidas y capacidad conocida para emparejarse con la cadena ligera de IGKV1-39 humana (Figura 3) para volver a clonarse en vectores que contienen constructos 1-3 o 6-7 de la Tabla 1 que resultan en los vectores IV-X (Tabla 4). Los vectores IV-X, cada uno de los cuales contiene secuencias de ácido nucleico que codifican la cadena ligera humana común, así como también una cadena pesada de Ig con región CH3 diferente y especificidad de VH diferente, se transfectaron posteriormente en células, ya sea solas para demostrar que se obstaculizó la formación de anticuerpos mono-específicos intactos, o en combinación con otro vector de constructo para obtener anticuerpos bispecíficos o mezclas de dos anticuerpos bispecíficos. La Tabla 5 muestra el programa de transfección y los resultados.

Tabla 4: Especificidad de VH insertada en diferentes constructos

Vector	Gen de VH	Especificidad de antígeno	Masa de VH (Da)	Clonado en el Constructo Núm.
IV	IGHV 3.23	Tiroglobulina (B)	12472	1
V	IGHV 3.30	Fibrinógeno (C)	12794	2
VI	IGHV 1.08	Tétano (A)	13703	2

ES 2 743 399 T3

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

Tabla 5:

Núm. de diferentes biespecíficos producidos	Transfección de	Código y relación de la transfección	Especies esperadas	Masa calculada -2LYS	Masa experimental	Semimoléculas encontradas (%)	IgG completa (%)	Biespecífico encontrado (%)	Otras moléculas (%)
0	vector IV	B	Half B	144082	144066	40	60		
0	vector V	C	Half C	144651	144622	77	23		
0	vector VI	D	Half A	146469	146459	23	77		
0	vector VII	E	Half C	144625	144643	76	24		
0	vector VIII	F	Half A	146443	146468	64	36		
0	vector IX	P	Half A	146691	146677	82	18		
0	vector X	Q	Half 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)

Se demostró anteriormente que las cadenas pesadas de Ig con CH3 manipulado genéticamente codificadas por los constructos 1 y 2 todavía son capaces de 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 se manipulan genéticamente 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 proporción de semimoléculas no apareadas, lo que demuestra cierta homodimerización de los dominios CH3 codificados por los constructos 1 y 2. Las transfecciones E y F también resultaron en la producción de IgG completas además de semimoléculas no apareadas, lo que demuestra que las mutaciones de carga triple del constructo 3 no perjudican completamente la homodimerización.

Además, se demostró que también las variantes CH3 '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 completamente 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.

Curiosamente, los presentes experimentos demuestran por primera vez que, además, pueden expresarse mezclas de anticuerpos biespecíficos en células individuales prácticamente sin homodímeros en la mezcla. Las transfecciones K y L muestran claramente que se obtienen de hecho las especies biespecíficas esperadas BC + AB (38 % + 47 % en la transfección K, y 16 % + 60 % en la transfección L). En ambas transfecciones se observó un porcentaje relativamente alto de semimoléculas no deseadas (15 % de semimolécula A + semimolécula C en la transfección K, y 24 % de semimolécula A + semimolécula C en la transfección L). El porcentaje relativamente alto de semimoléculas 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 resultó en cantidades iguales de cadenas pesadas de IgG que constituyen un par emparejado y mezclas puras de IgG biespecífica sin la presencia de semimoléculas de IgG y con tan solo 3 % de BB homodimérico presente. Idealmente, esta baja proporción de producto monoespecífico contaminante debería reducirse a esencialmente cero. Por lo tanto, se desea encontrar mutantes CH3 adicionales que resulten en mezclas de anticuerpos biespecíficos con una 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 a partir de una sola célula es técnicamente factible, a continuación exploramos la factibilidad de la producción controlada de una variedad de otras mezclas. Se usará una cuarta región VH de anticuerpo con especificidad conocida y capacidad conocida para emparejarse con la cadena ligera IGKV1-39 humana para volver a clonarla en vectores que contienen constructos 1-3 o 7 de la Tabla 1, lo que resulta en los vectores I', II', III' o X' (el' indica una especificidad diferente en comparación con los números de vectores 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 también una cadena pesada de Ig con diferente región CH3 y diferente especificidad de VH, se transfectarán posteriormente en 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 incluye 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 a partir de una sola célula. La Tabla 6 representa el programa de transfección y los resultados esperados.

Tabla 6

Variedad de la mezcla	Transfección de	Código y relación de la transfección	Especies esperadas	% de IgG monoespecíficas esperadas	% de biespecíficos esperados
2 AcB, 4 epítomos	IV+V+IX+ X'	ZA (1:1:1:1)	BC + AD	0	50 + 50
2 AcB, 4 epítomos	IV+VII+IX +X'	ZB (1:1:1:1)	BC + AD	0	50 + 50
2 AcB + 1 AcM	IV+V+VI+ ts'	ZC (2:1:1:2)	BC + AB + DD	33	33 + 33

	2 AcB + 1 AcM	IV+V+VI+ II'	ZD (2:1:1:2)	BC + AB + DD	33	33 + 33
	2 AcB + 1 AcM	IV+V+VI+ III'	ZE (2:1:1:2)	BC + AB + DD	33	33 + 33
5	1 AcB + 1 AcM	IV+V+ts'	ZF (1:1:2)	BC + DD	50	50
	1 AcB + 1 AcM	IV+V+II'	ZG(1:1:2)	BC + DD	50	50
	1 AcB + 1 AcM	IV+V+III'	ZH(1:1:2)	BC + DD	50	50
10	1 AcB + 1 AcM	IV+VII+ts'	ZI (1:1:2)	BC + DD	50	50
	1 AcB + 1 AcM	IV+VII+II'	ZJ (1:1:2)	BC + DD	50	50
	1 AcB + 1 AcM	IV+VII+III'	ZK (1:1:2)	BC + DD	50	50
15	1 AcB + 1 AcM	IX+X+ts'	ZL (1:1:2)	AB + DD	50	50
	1 AcB + 1 AcM	IX+X+II'	ZM (1:1:2)	AB + DD	50	50
	1 AcB + 1 AcM	IX+X+III'	ZN (1:1:2)	AB + DD	50	50

20 Aunque, en teoría, la producción de todas las mezclas debería ser factible, se conoce por trabajos previos obtenidos por 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.

25 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 una escala mayor, ya que se informa que las variantes de botón en ojal son inestables, y no puede excluirse 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 manipulan genéticamente para formar, preferentemente, solamente homodímeros o heterodímeros y las cuales no se homodimericen o heterodimericen con los constructos 1-5 de la Tabla 1 como para permitir la coexpresión en células individuales.

Ejemplo 13: identificación de nuevos mutantes de par de carga

35 El objetivo de este estudio fue manipular genéticamente la región CH3 de la IgG para resultar en 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 manipulados genéticamente no se homodimerizarán o heterodimerizarán con dominios CH3 diseñados conocidos, o con dominios CH3 de tipo silvestre. Por lo tanto, como primer paso en la identificación de nuevos dominios CH3 manipulados genéticamente que cumplirían con los criterios, muchos residuos de contacto de interfaz en el dominio CH3 de IgG se escanearon uno por uno o en grupos para las sustituciones que resultarían en la repulsión de cadenas pesadas idénticas, es decir, reducción de la formación de homodímeros, mediante interacciones electrostáticas. El objetivo era obtener una lista de residuos que, cuando se sustituyeran por un residuo cargado, resultarían en la repulsión de cadenas idénticas de manera que estas mutaciones puedan usarse para dirigir la formación de homo y/o heterodímeros tras la expresión mixta de diferentes cadenas pesadas de IgG, de manera que las IgG de longitud completa obtenidas son estables y se producen con altas proporciones. Como continuidad, las sustituciones identificadas se usarán para generar anticuerpos biespecíficos o mezclas de anticuerpos biespecíficos o mono-específicos mediante la manipulación genética de pares coincidentes de residuos CH3 en una o más cadenas pesadas de IgG - regiones CH3. Adicionalmente, los pares mutantes de carga recientemente identificados pueden combinarse con pares existentes, de manera que múltiples moléculas de ácido nucleico que codifican diferentes cadenas pesadas, todas portadoras de mutaciones CH3 diferentes y complementarias, pueden usarse para la expresión en células de manera que puedan obtenerse, preferentemente, mezclas de anticuerpos mono-específicos solamente, o anticuerpos biespecíficos solamente, o mezclas de anticuerpos mono-específicos y biespecíficos definidos. Los residuos que se analizarán en el presente estudio son residuos de contacto identificados previamente (Deisenhofer J., 1981; Miller S., 1990; Padlan, 1996, Gunasekaran, 2010). La razón de este enfoque es que las cargas repulsivas se manipulan genéticamente en cada par de residuos de contacto disponibles. Posteriormente, las muestras se analizan en SDS-PAGE no reductora para identificar pares en los cuales se reduce la formación de dímeros, tal como se visualiza por la presencia de bandas de aproximadamente 72 kD. Todos los pares disponibles se tamizarán como mutaciones individuales o en combinación con una sola otra mutación, ya que la interacción electrostática repulsiva entre un par no coincidente puede o no ser suficiente para resultar en cantidades suficientes de semimoléculas para la detección mediante este método. Las mutaciones también se combinan.

60 Las sustituciones de aminoácidos se introdujeron en el vector de 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 procedimientos estándar. Los niveles de expresión de IgG se midieron en Octet. Cuando la producción falló dos veces, se consideró que la mutación era perjudicial para la expresión y la mutación no se buscó más.

65

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

	Sustituciones AA en CH3	Núm. Constructo	Efecto sobre la formación de homodímeros (- = sin efecto; +++ = inhibición máx.; NT= no se probó en gel)
5	Q347K	8	-
	Y349D	9	+-
	Y349K	10	+-
10	T350K	11	-
	T350K, S354K	12	+-
	L351K, S354K	13	+-
15	L351K, T366K	14	++
	L351K, P352K	15	+-
	L351K, P353K	16	++
20	S354K, Y349K	17	++
	D356K	18	-
	E357K	19	-
25	S364K	20	++
	T366K, L351K	21	++
	T366K, Y407K	22	+++
30	L368K	23	NT
	L368K, S364K	24	++
	N390K, S400K	25	+-
35	T394K, V397K	26	+
	T394K, F405K	27	+++
	T394K, Y407K	28	+++
	P395K, V397K	29	+-
40	S400K	30	-
	F405K	31	+++
	Y407K	32	++
45	Q347K, V397K, T394K	33	+
	Y349D, P395K, V397K	34	+
	T350K, T394K, V397K	35	NT
50	L351K, S354K, S400K	36	+
	S354K, Y349K, Y407K	37	+-
	T350K, N390K, S400K	38	+-
55	L368K, F405K	39	++
	D356K, T366K, L351K	40	+++
	Q347K, S364K	41	+++
60	L368D, Y407F	42	+
	T366K	43	+
	L351K, S354K, T366K	44	+

65

5	Y349D, Y407D	45	+
	Y349D, S364K, Y407D	46	+
	Y349D, S364K, S400K, T407D	47	+
	D399K	48	+ -
10	D399R	49	+ -
	D399H	50	+ -
	K392D	51	+ -
	K392E	52	+ -
15	K409D	53	+

20 Los sobrenadantes que contenían $\geq 5 \mu\text{g/ml}$ de IgG se analizaron en SDS-PAGE y la IgG se purificó mediante el uso de la proteína A. Las proteínas se tiñeron con azul coloidal. Los homodímeros fueron visibles como una banda de aproximadamente 150 kD. Las bandas más pequeñas de aproximadamente 75 kD representaban la presencia de semimoléculas (ver control negativo: K392D, K409D). Las transferencias se muestran en la Figura 7.

25 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, lo que incluye 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 pueden modificarse sin encontrarse con problemas tales como otras cargas no complementarias. Por ejemplo, se conoce que los residuos F405 e Y407 tienen múltiples interacciones en la interfaz CH3-CH3, lo que incluye las interacciones con residuos que ya tienen carga, lo cual puede ser problemático después de la introducción de mutaciones de carga múltiple entre estos residuos que interactúan (ver Tabla A). Se realizaron nuevos constructos en el vector MV1057 (Tabla 8), y se usaron regiones VH de anticuerpos con especificidades conocidas y capacidad conocida para emparejarse con la cadena ligera IGKV1-39 humana para volver a clonarlos en vectores que contenían estos nuevos constructos (ver Tabla 9) de manera que las combinaciones pudieran probarse posteriormente. La Tabla 10 representa los programas y resultados de transfección.

35 Tabla 8:

40	Sustituciones AA en CH3	Núm. Constructo
	L351K	61
	T394K	62
	L351D	63
45	T366D	64
	S354D, Y349D	65
	V397D	66
50	K360D	67

Tabla 9: Especificidad de VH insertada en diferentes constructos

Vector	Gen de VH	Especificidad de antígeno	Masa de VH (Da)	Clonado en Constructo núm.
XI	IGHV 1.08	Tétano (A)	13703	8
XII	IGHV 1.08	Tétano (A)	13703	17
XIII	IGHV 1.08	Tétano (A)	13703	43
XIV	IGHV 1.08	Tétano (A)	13703	61
XV	IGHV 1.08	Tétano (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)	Especies esperadas	AA encontrado (%)	AC encontrado (%)	CC encontrado (%)	Semi encontrado (%)	A encontrado (%)	Semi C encontrado (%)	Otros (%)
XIII + XVI	ZO (1:1)	AC	0	69	7	24	0	0	0
	ZT (3:1)	AC	10	45	16	27	0	0	0
	ZU (1:1)	AC	5	61	10	13	0	0	0
	ZV (1:3)	AC	3	61	23	13	0	0	0
	ZW (1:1)	AC	0	88.3	2.4	7	0	0	2.3
XIV + XVII	ZP	AC	30	52	13	0	0	0	5
XII + XVIII	ZQ	AC	4	51	33	2	1	0	8
XV + XIX	ZR	AC	20	42	11	0	1	0	26
XI+XX	zs	AC	34	41	15	0	0	0	10

Las combinaciones de variantes de CH3 se expresaron y analizaron en SDS-PAGE (datos no mostrados) y en espectrometría de masas nativa (MS). Los resultados se resumen en la Tabla 10. La transfección ZO resultó en la mayor proporción de heterodímeros en las mezclas (69 % de AC). Curiosamente, en la transfección 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 semimoléculas A, probablemente como resultado de la expresión desigual de las cadenas pesadas A y C. Los datos primarios de MS de la muestra de transfección ZO se muestran en la Figura 8.

Sorprendentemente, mientras que la transfección ZO resultó en cantidades razonables de producto biespecífico, el par de inversión de carga de transfección ZP (L351K/T366'D frente a T366K/L351'D de ZO) no resultó en similares, y solo se observó el 52 % del producto biespecífico, con la presencia de cantidades considerables de dos homodímeros (30 % AA y 13 % CC). Una explicación para esto puede ser que el D cargado negativamente se parece estructuralmente mucho a T, por lo tanto, el T366D puede no ser lo suficientemente potente como para repelerlo y, por lo tanto, el T366D aún formará homodímeros, como se observó de hecho.

Puede preverse que las variantes sutiles del par T366K/L351'D recientemente encontrado (por ejemplo, al probar todas las permutaciones, lo que incluye los nuevos constructos T366R y L351E) pueden resultar en porcentajes similares de anticuerpos biespecíficos.

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

Como se describe en el ejemplo 13, el nuevo par de carga T366K/L351'D aumenta la proporción de heterodímeros en la mezcla (69 %) con una pequeña fracción de homodímeros CC no deseados (7 %) (L351D/L351'D) y una fracción

5 sustancial de semimoléculas A (24 %) que 'contaminan' la mezcla. En este ejemplo, se usó un enfoque in silico para generar una mayor visión de los residuos de aminoácidos involucrados en las interacciones de la interfaz CH3, para probar sustituciones complementarias en regiones CH3 opuestas y para encontrar nuevos pares CH3 que contienen sustituciones complementarias que aumentan aún más una heterodimerización eficiente al tiempo que evitan la formación eficiente de homodímeros de las dos cadenas pesadas.

10 HADDOCK (acoplamiento proteína-proteína dirigido 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 ab-initio en el hecho de que codifica información de interfaces de proteínas identificadas o predichas en restricciones ambiguas de interacción (AIR) para controlar el proceso de acoplamiento. (de Vries y otros, 2010).

15 La entrada para el servidor web HADDOCK consiste en un archivo de estructura de proteínas, el cual puede ser una estructura cristalina, un conglomerado de estructura por RMN o una estructura modelada. Después del acoplamiento o refinamiento, HADDOCK devuelve la llamada puntuación HADDOCK, que es un promedio ponderado de energías de VanderWaals, energía electrostática, área de superficie enterrada y energía de desolvatación. La puntuación HADDOCK puede interpretarse como una indicación de energía o afinidad de enlace, a pesar de que una traducción directa a datos experimentales es a menudo difícil de lograr. Además de esto, HADDOCK proporciona archivos de estructura para las 'cuatro principales' estructuras que resultan de la ejecución del acoplamiento. Estos archivos de estructura pueden descargarse y visualizarse, lo que permite el análisis detallado de las interacciones de los residuos individuales.

20 En este ejemplo, se estudiaron las interacciones entre los dominios CH3 de las cadenas pesadas de IgG1. Se usó una estructura cristalina de alta resolución de la parte Fc de la IgG (estructura 1L6X) como estructura de partida (<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1L6x>; Idusogie, E.E. y otros, J.I. 2000(164)4178-4184).

25 En el ejemplo 13, se encontró que la cotransfección de los vectores XIII y XVI resultó en la formación del contaminante homodimérico CC (Tabla 10). Se usó HADDOCK para buscar mutaciones adicionales en el par T366K/L351'D que eviten la homodimerización.

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

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

Tabla 11:

Combinaciones de constructo	Puntuación de HADDOCK	Energía deVdW	Energía electrostática	Energía de desolvatación	Área de superficie enterrada
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

Combinaciones de constructo	Puntuación de HADDOCK	Energía deVdW	Energía electrostática	Energía de desolvatación	Área de superficie enterrada
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 elevado debido a una puntuación de energía de VanderWaals elevada, 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 CH3 A y B son idénticas. En la mayoría de los otros casos, el par AB tiene la puntuación más baja, que es como se esperaba. Para el par T366K/L351D, la puntuación BB es ligeramente mejor que la puntuación AB (-210,6 frente a -212,5), pero esta diferencia está dentro del error de los cálculos. Mediante el uso de HADDOCK, se visualizaron las estructuras de los heterodímeros de estos pares. Por ejemplo, las combinaciones de 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 (Figura 10A *panel izquierdo*) mientras que se produce repulsión electrostática entre residuos de cadenas idénticas (Figura 10B y C, *panel medio y derecho*). Las puntuaciones de HADDOCK más altas para los homodímeros pueden explicarse por la repulsión electrostática de los residuos de la interfaz mutada. Estos residuos tienen que alejarse entre sí y no tienen interacción con los residuos en la otra cadena, lo que causa una caída en la afinidad.

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

Ejemplo 15: Variaciones 366/351

En el ejemplo 13, se plantea la hipótesis de que pueden diseñarse 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 sustituciones T366R, T366D, T366E, L351E, L351K y L351R. La proporción de homodímeros CC de L351D/L351'D puede disminuir mediante la creación de 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	puntuaciones de HADDOCK	Energía VdW	Energía Electroestática	Energía de desolvatación	Área de superficie enterrada
5	T366K - L351D	-210.6	-64	-758.4	5.1	2456.5
	T366K - T366K	-191.7	-71.2	-634.1	6.3	2533.5
10	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
15	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
20	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
25	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
30	T366E - T366E	-201.9	-57.6	-741	4	2487.5
	T366E - L351K	-215.9	-58.4	-808.9	4.3	2486

Al observar las puntuaciones de HADDOCK, se observó que algunas de las mutaciones tienen un 'patrón' similar en comparación con T366K/L351'D. Para la mayoría de las permutas, 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 conoce que el residuo 351 es un 'vecino' de 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 existe 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 separan entre sí y la influencia estabilizadora de al menos la arginina de origen natural en la posición 355 y también cierta estabilización de la carga negativa por la serina de origen natural en la posición 354 (Ver Figura 12A). La mutación de estos residuos (S354A y R355D) proporciona solo una pequeña mejora. De la Figura 12B se deduce claramente que los enlaces de hidrógeno de la cadena principal de A354 provocan 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

En la serie de análisis HADDOCK en este ejemplo, el par T366K/L351'D o T366K/L351'E se tomaron como estructura de partida. Para identificar mutaciones adicionales que aumentarían aún más el porcentaje predicho de biespecíficos de estas cadenas A y B, se usaron mutaciones adicionales en la cadena B para calcular las puntuaciones de HADDOCK y las energías. Cuando se estudia la estructura del dominio CH3 mediante el uso de un visor para la visualización de estructuras de proteínas a nivel molecular (YASARA, www.yasara.org), pueden calcularse 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 estos se han mutado en este ejemplo, además de la mutación L351D, para estudiar el resultado en la formación de dímeros de los homo y heterodímeros (ver Figura 13). Ambos residuos parecen colaborar con la estabilidad del heterodímero (puntuaciones de HADDOCK más bajas) así como a 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 comprende ya la sustitución de aminoácidos en la posición 351, parece favorecer aún más la heterodimerización.

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 añadieron mutaciones adicionales a la cadena A la cual ya comprende la sustitución T366K. Como se muestra en la Figura 14, existen varios pares de mutaciones que parecen favorables a la formación de heterodímeros biespecíficos. En

el par T366K-L351K/L351'D-Y349'D, los cuatro residuos mutados se involucran en el emparejamiento heterodimérico, lo cual no es el caso para T366K-L351K/L351'E-L368'E en el cual K351 no se involucra directamente en la unión. Sin embargo, la puntuación de HADDOCK para este último heterodímero es -228,9; significativamente menor que la -214,2 para el T366K/L351'E-L368'E, lo cual puede explicarse por las interacciones de enlace de hidrógeno de la K en la posición 351 (ver Figura 15).

El par T366K-L351K/L351'D-Y349'D puede mejorarse aún más mediante la mutación R355'D en la cadena B, lo que resulta en una puntuación de HADDOCK de BB más alta, pero también la puntuación de HADDOCK de AB es ligeramente más alta. En general, el L351K adicional resulta en puntuaciones AB más bajas y puntuaciones AA y BB similares en comparación con la única mutación T366K en la cadena A. Teóricamente, esto daría lugar a cantidades mayores de heterodímeros biespecíficos en las muestras.

Como se desprende de la figura 11, tener una R en lugar de una K en la posición 366 puede ser más potente para dirigir 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 en la interfaz, a pesar de que todos los puentes salinos esperados con R366 se presentan en las estructuras. Además, la puntuación de HADDOCK para el homodímero AA es menor para R366 que para K366, lo cual tampoco contribuye favorablemente a la formación de heterodímeros. Por lo tanto, no se realizaron más análisis HADDOCK mediante el uso de R366 en la interfaz.

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

Tabla 13:

Combinaciones de Constructos	puntuaciones de HADDOCK AB	puntuaciones de HADDOCK AA	puntuaciones de HADDOCK BB
Silvestre-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 mediante el uso de mutantes CH3 basados en predicciones de HADDOCK

El análisis en el ejemplo 16 sugirió que algunas variantes de CH3 con mutaciones adicionales alrededor del par T366K/L351'D producirían mezclas con proporciones más altas del componente biespecífico y proporciones potencialmente más bajas del componente homodimérico. Estos pares de mejor rendimiento se seleccionaron para producción y análisis posterior. Además, también se generaron los constructos T366R y L351E. La Tabla 14 enumera los constructos que se hicieron y que se usaron para volver a clonar regiones VH de anticuerpos con especificidades conocidas y capacidad conocida para emparejarse con la cadena ligera 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 como se enumeran en la Tabla 14. El objetivo fue evaluar cuál de los constructos se homodimeriza en ausencia del compañero de heterodimerización correspondiente. Idealmente, se formarían altos porcentajes de semicuerpos y bajos porcentajes de homodímeros. Como control, los constructos que contienen mutaciones de carga previamente informadas y los constructos que contienen las mutaciones de botón en ojal previamente informadas también se usaron para la expresión como IgG completa por células recombinantes. Los sobrenadantes purificados de proteína A se analizaron en SDS-PAGE; los resultados se analizaron y puntuaron como se presenta en la Tabla 14

Tabla 14:

Sustituciones AA en CH3	Constructo #	% IgG	% semimoléculas
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	-

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 porta las sustituciones de aminoácidos de los constructos anteriores se presentan en la Tabla 15. La expresión de dos cadenas pesadas diferentes que comprenden las sustituciones de aminoácidos T366K y L351'D:L368'E, respectivamente, resultaron en aproximadamente 87 % del heterodímero AB biespecífico en la mezcla sin homodímeros AA o BB presentes (combinación núm. 3 de la Tabla 15). Se observó aproximadamente un 12 % de semimoléculas (mitad A) que comprenden la sustitución T366K. Además, se encontró que el porcentaje de heterodímero biespecífico AB aumentó cuando se introdujo la sustitución adicional de aminoácidos 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, resultó en aproximadamente 92 % del heterodímero AB biespecífico, mientras que los homodímeros AA y BB están esencialmente ausentes en la mezcla (combinación núm. 12 de la Tabla 15). Las combinaciones 10 y 11

resultaron, además, en distribuciones favorables de altos porcentajes de heterodímeros y virtualmente la ausencia de homodímeros. La ausencia de homodímeros es ventajosa, porque la fracción que contiene las moléculas de IgG intactas se compone solo de heterodímero AB. Para la purificación y la posterior aplicación terapéutica, las semimoléculas pueden eliminarse mediante enfoques estándar, tal como la 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 con respecto a los mutantes de carga conocidos y 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:K409'D y E356K:D399K/K392'D:K409'D:K439'D descritos anteriormente, 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 recientemente identificadas añaden 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 es válido para las mutaciones usadas en las combinaciones núms. 4, 5, 6, 9, 10 y 11, que también resultaron en 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 #)	% AA encontrado	% AB encontrado	% BB encontrado	% semi A encontrado	% semi B encontrado
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

cadena A porta especificidad de vMF1337 (=toxide tetánico); cadena B porta especificidad de MF1122 (=fibrinogeno)

MS nativa

La MS nativa se realizó en todas las muestras biespecíficas. Los gráficos obtenidos se analizaron para determinar las relaciones relativas de las especies presentes de dos formas: por altura de pico y por área de pico. El área de pico es la forma de análisis más científicamente correcta, pero dado que todos los análisis anteriores para otros estudios se realizaron basados en la altura del pico, ambos métodos se incluyeron en el análisis, para fines de comparación. Las diferencias entre los métodos estaban dentro del error de medición y, por lo tanto, solo se usaron los valores de área de pico para mediciones futuras. Dos espectros típicos se muestran en la Figura 18. Una visión general de los resultados se muestra gráficamente en la Figura 19, los valores numéricos pueden encontrarse en la Tabla 15. En aproximadamente la mitad de las muestras, la contaminación total de IgG monoespecífica es inferior al 5 %, y solo en tres casos es > 10 %, mientras que para la IgG de tipo silvestre se espera encontrar aproximadamente el 50 % de IgG monoespecífica 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 estas diez se basó en los porcentajes bajos de homodímeros presentes en las mezclas según lo determinado por nMS, pero también en sus propiedades fisicoquímicas generales, lo que incluye los rendimientos de producción, SDS-PAGE, así como también 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 CH3 que resultaron en 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 usan para promover la heterodimerización de las cadenas pesadas pueden tener efectos desestabilizadores inesperados sobre la región Fc de la IgG, que pueden resultar en propiedades inconvenientes, tales como una reducción de la vida media *in vivo*, reducción de la función efectora y/o aumento de la inmunogenicidad. Los pares de carga identificados recientemente se compararán con biespecíficos de tipo silvestre y un biespecífico que contiene mutaciones de carga identificadas anteriormente (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 la cadena pesada y ligera, lo que asegura 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 de fluorescencia con tinción de Rojo Nilo) que proporcionan información sobre el estado de agregación de las variantes de CH3.

Los espectros de absorbancia UV-Vis se registrarán con un espectrofotómetro Cary 300 Bio con doble haz y dos monocromadores a 25 °C. Los espectros se monitorearán entre 250 y 400 nm mediante el uso de una longitud de trayectoria de 1 cm. La absorbancia a longitudes de onda de 320 nm y mayores proporciona información sobre el estado de agregación de la IgG.

Los espectros de fluorescencia intrínseca se monitorearán a 25 °C mediante el uso de un espectrofluorímetro FluoroMax. Se optimizará el método de fluorescencia. La emisión de fluorescencia proporcionará información sobre la conformación y las propiedades de agregación.

Los espectros de dispersión de luz de 90 ° se monitorearán a 25 °C mediante el uso de un espectrofluorímetro FluoroMax al ejecutar un barrido sincrónico ($\lambda_{em} = \lambda_{ex}$) entre 400 nm y 750 nm con un tiempo de integración de 0,01 s. Se optimizarán las ranuras de excitación y emisión. Por ejemplo, la dispersión de la luz en ángulo recto puede distinguir entre muestras de IgG que no tienen dímeros y las que tienen un 5 %.

Para la microscopía de fluorescencia con tinción de Rojo Nilo, justo antes de las mediciones, se añadirá Rojo Nilo en etanol a la muestra. Las muestras se colocarán en un portaobjetos de microscopía y se analizarán mediante microscopía de fluorescencia. Se contarán las partículas. El límite de tamaño inferior de las partículas que puede observarse por microscopía de fluorescencia es de aproximadamente 0,5 μm .

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

Se exploran los estudios de estabilidad térmica que usan el Octet, tanto con biosensores de proteína A como mediante el uso de la unión de FcRn a la IgG. Para examinar la estabilidad térmica de las IgG con CH3 manipulado genéticamente, las muestras se incubarán a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ (en PBS) a 4, 50, 55, 60, 65, 70 y 75 °C durante 1 hora mediante el uso de una máquina de PCR. Después de esto, las muestras se enfriarán lentamente durante un período de

15 minutos hasta 25 °C y se mantendrán a esta temperatura durante 2 horas, después de lo cual se almacenarán durante toda la noche a 4 °C.

Los anticuerpos precipitados se eliminarán mediante centrifugación, después de lo cual Octet determinará la concentración total de IgG de los anticuerpos solubles mediante el uso del biosensor de proteína A (dilución 1/10 en PBS). Actualmente se exploran ensayos que miden la unión de la IgG con CH3 manipulado genéticamente a FcRn mediante el uso de Octet. Se usan ya sea 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 el uso del biosensor de proteína A y, además, pueden usarse para estudios de estabilidad térmica.

Todas las muestras se analizarán, además, para determinar la estabilidad del suero. Brevemente, las muestras de IgG (manipuladas genéticamente) se incubarán a 37 °C en suero humano, las muestras 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 titula en un ELISA específico de antígeno para determinar las cantidades relativas de IgG funcional. El anticuerpo control purificado recién añadido a suero humano se usará como referencia.

Ejemplo 19: análisis de estabilidad

En experimentos previos, se obtuvieron altos porcentajes de anticuerpos biespecíficos mediante la coexpresión de dos cadenas pesadas diferentes que comprenden mutaciones CH3 y una cadena ligera comunes (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 biespecíficos de tipo silvestre (es decir, sin mutaciones CH3) y/o biespecíficos basados en mutaciones de carga CH3 informadas previamente. Tenga en cuenta que para los biespecíficos de tipo silvestre, las 2 cadenas pesadas y la cadena ligera común se coexpresan sin medios para el direccionamiento preferencial hacia heterodímeros. Por lo tanto, estos 'biespecíficos de tipo silvestre' representan una mezcla de AA, AB y BB. Todos los biespecíficos en este estudio se diseñaron para transportar las mismas combinaciones VH/VL, lo que asegura que los efectos observados se producen 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 apareamiento heterodimérico de las dos cadenas pesadas diferentes podrían asociarse con efectos estructurales inesperados o de cualquier otra manera desestabilizadores en la región Fc de la IgG. Posteriormente, esto podría resultar en problemas no deseados que dificultarían un desarrollo clínico posterior, tal como una reducción de la vida media *in vivo*, una función efectora reducida y/o una inmunogenicidad aumentada debido a la presencia de estas mutaciones.

Estabilidad térmica

La aplicación de estrés, tal como aumentos o disminuciones de temperatura, puede resultar en un cambio de conformación (por ejemplo, despliegue) y/o agregación de proteínas. Para examinar la estabilidad térmica de las IgG con CH3 manipuladas genéticamente, las moléculas biespecíficas de las combinaciones 3-6 y 9-12 (Tabla 15), así como también los biespecíficos de tipo silvestre y las moléculas biespecíficas obtenidas cuando se usa la combinación de los constructos 1 y 2 (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 mediante el uso de una máquina de PCR. Después de esto, las muestras se enfriaron lentamente durante un período de 15 minutos hasta 25 °C y se mantuvieron a esta temperatura durante 2 horas, después de lo cual se almacenaron durante toda 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 se determinó por Octet la concentración de IgG total de los anticuerpos solubles mediante el uso del biosensor de proteína A (dilución 1/10 en PBS). Los resultados se muestran en la Figura 20. Se observó que el anticuerpo biespecífico con CH3 manipulado genéticamente control (la combinación de inversión de carga E356K:D399K/K392D':K409D' (triángulos)) tiene una estabilidad térmica reducida en comparación con el biespecífico (cuadrados) de tipo silvestre. Las moléculas biespecíficas 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 biespecífico con CH3 manipulado genéticamente control. Los biespecíficos de las combinaciones 9, 10 y 11 son significativamente más estables que los otros biespecíficos con CH3 manipulado genéticamente (inversión de carga) y son tan estables como los biespecíficos de tipo silvestre a la temperatura más alta medida.

Estabilidad de congelación-descongelación

Para examinar la estabilidad de las IgG con CH3 manipulado genéticamente tras congelaciones y descongelaciones repetitivas, las moléculas biespecíficas de las combinaciones 3-6 y 9-12 (Tabla 15), así como los biespecíficos de tipo silvestre y las moléculas biespecíficas obtenidas cuando se usan los constructos 1 y 2 (combinación E356K:D399K/K392D':K409D' (par de inversión de carga)) se expusieron a diez ciclos posteriores de congelación-

descongelación al colocar las muestras a -80 °C durante al menos 15 minutos hasta que se congelaron por completo. Posteriormente, las muestras se descongelaron a temperatura ambiente. Cuando se descongelaron por completo, se repitió el ciclo de congelación-descongelación. Después de 10 ciclos de congelación-descongelación, los anticuerpos precipitados se eliminaron por centrifugación (18 000 rpm; 4 °C, 20 min), después de lo cual se determinó por Octet la concentración total de IgG de los anticuerpos solubles mediante el uso del biosensor de proteína A (dilución 1/10 en PBS). La prueba de estabilidad de congelación-descongelación se repitió tres veces. Los resultados se muestran en la Figura 21. Se observó que el anticuerpo biespecífico con CH3 manipulado genéticamente de inversión de carga control parecía 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 las biespecíficas de tipo silvestre. En general, puede concluirse que las estrictas condiciones de los ciclos de congelación-descongelación no causan problemas importantes de estabilidad para las variantes con CH3 manipulado genéticamente.

Estabilidad sérica in vitro

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

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. A la concentración más baja de IgG, las moléculas biespecíficas de las combinaciones 4 y 5 parecen ser ligeramente menos estables, especialmente en T=1 y T=2, pero la diferencia es mínima en el criterio de valoración de este experimento (ver Figura 22).

Ejemplo 20: Pruebas de estabilidad adicionales

Se usó una serie adicional de métodos analíticos para evaluar la estabilidad de las IgG variantes. Las moléculas biespecíficas de las combinaciones 3-6 y 9-12 (Tabla 15), así como también los 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 a 0,2 mg/ml y se aplicaron varias condiciones de estrés (2 días a 50 °C, 2 semanas a 40 °C, 5x congelación-descongelación), con el objetivo de ser capaces de discriminar entre las diferentes muestras. Es de destacar que estos altos niveles de estrés resultaron en condiciones en las cuales uno de los anticuerpos parentales (el parental BB, que portaba dos Fabs 1122) como el usado 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.
- 90 ° de dispersión de luz 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 de fluorescencia máxima y la intensidad de los residuos aromáticos en una proteína cambian con los cambios en el medio ambiente (por ejemplo, despliegue)
- Espectroscopía de fluorescencia 1,8-ANS; el 1,8-ANS se une a través de interacciones electrostáticas a grupos catiónicos mediante la formación de pares de iones y pueden detectarse cambios en la estructura y/o conformación de las proteínas

Espectroscopía UV-VIS

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

Dispersión de luz a 90°

El método espectral de dispersión de la 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 monitorearon a 25 °C mediante el uso de un espectrofluorímetro FluoroMax (Spex, Instruments SA, Inc. Reino Unido) al ejecutar 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 configuraciones de ranuras para encontrar las condiciones óptimas. Después de la optimización, se usaron las mismas configuraciones de ranura para todas las mediciones.

Emisión de fluorescencia en estado estacionario

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 fluorescencia y un desplazamiento al azul del máximo de emisión. La espectroscopía de fluorescencia intrínseca puede proporcionar información sobre el estado actual de la proteína y monitorear los cambios en las propiedades físicas y químicas. Puede encontrarse más información sobre la fluorescencia de la tirosina y el triptófano en el libro de Lakowicz [Lakowicz, 2006].

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

Microscopía de fluorescencia con tinción de Rojo Nilo

El método de tinción de Rojo Nilo se desarrolló para visualizar los agregados de proteínas y se realizó como se describe en Demeule y otros, 2007b.

Las observaciones de microscopía se realizaron en un microscopio Leica DM RXE (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania) equipado con una lámpara de mercurio. Las imágenes se adquirieron con una cámara Sony NEX-5 y su microprograma. Los objetivos fueron 10x, 20x y 40x. Para las investigaciones de microscopía, se usaron láminas portaobjetos con una distancia fija de 0,1 mm entre la lámina portaobjetos y el cubreobjetos. El tamaño de las rejillas 4x4 es de 1 mm x 1 mm y corresponde a 0,1 μ l.

Espectroscopía de fluorescencia con 1,8-ANS

El ácido 1-anilinaftaleno-8-sulfónico (1,8-ANS) es una pequeña sonda fluorescente hidrófoba sin carga (PM 299,34 Da) que se usa para estudiar tanto las superficies de membrana como las proteínas.

El 1,8-ANS es esencialmente no fluorescente en agua y solo se vuelve apreciablemente fluorescente cuando se une a las membranas (rendimientos cuánticos $\sim 0,25$) o proteínas (rendimientos cuánticos $\sim 0,7$). Esta propiedad del 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 pueden encontrarse en la página de inicio en Internet de Molecular Probes, www.probes.com.

Los espectros de emisión de fluorescencia del 1,8-ANS se registraron mediante el uso de un espectrómetro FluoroMax. No se realizará una comparación directa de la fluorescencia con 1,8-ANS entre las IgG. Cada IgG puede tener un número diferente de sitios de unión al 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 debidos al estrés.

Tabla 16: Panorámica de los diferentes resultados de degradación forzada en varias muestras de IgG después de la dilución a 0.2 mg/ml. El color de las células indica que la variación entre T=0 y después del estrés: gris oscuro = gran cambio, gris claro = cambio pequeño y sin color = sin cambio (=estable).

*combi.# se refiere a la combinación de mutaciones como se enumeran en la Tabla 15; **partículas muy pequeñas por microscopia fluorescente, relevancia de estas partículas desconocida; 2d4°C=2 días a 4 °C; 2d a 5 °C; 2w4 °C= 2 semanas a 4 °C; 2w40 °C= 2 semanas a 40 °C; T0= inicio del experimento; 5FT= 5 ciclos de congelación descongelación

Muestra de proteína	Estrés	Partículas rojas	UV 350 nm	LS 400 nm (10 ⁷ cps)	Fluorescencia intrínseca		1,8-Fluorescencia ANS		
					fluo.int. (10 ⁶ cps)	λ Max. (nm)	1,8-ANS int. (10 ⁶ cps)	λ Max. (nm)	cambio (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			
Biespecíficas silvestre (AA AB BB)	2d4°C	30-50	0.003	0.9	5.1	336	7.1	507	
	2d50°C	>10000**	0.007	0.9	5.0	336	7.1	507	
	2w4°C		0	0.9	5.0	336			
	2w40°C	>2000**	0	0.8	5.0	336			
	T0		0.001	0.8	5.0	336			
	5FT	>2000**	0.009	1.2	4.8	336			
Biespecíficas 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	>2000**	0	1.1	5.5	336			
	2w40°C	>2000**	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	>3000**	0.001	1.0	6.2	337	7.5	505	
	2w4°C		0.001	1.0	6.3	337			
	2w40°C	>2000**	0.003	0.9	6.3	337			
	T0		0.002	1.1	6.3	337			
	5FT	>2000**	0.003	1.2	6.0	337			
Combi. # 5	2d4°C	>2000**	0.001	1.1	4.9	337			
	2d50°C	>10000**	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	>2000**	0	0.9	5.1	337			
	2w40°C	>2000**	0	0.9	5.2	337			
	T0		0.002	0.8	5.1	337			
	5FT	>2000**	0.007	1.4	4.9	337			

5	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	>2000**	0	0.9	5.2	337			
10		2w40°C	>2000**	0	0.9	5.4	337			
		T0		0.005	1.0	5.3	337			
		5FT	20-30	0.004	1.1	5.4	337			
15	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	>2000**	0	0.8	5.0	337			
20		2w40°C	>2000**	0	0.8	5.1	337			
		T0		0.004	1.1	5.0	337			
		5FT	>2000**	0.002	1.2	5.0	337			
25	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	>2000**	0.003	0.6	3.6	337			
30		2w40°C	>2000**	0.001	0.5	3.5	337			
		T0		0.005	0.6	3.7	337			
35		5FT		0.004	0.7	3.6	337			

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

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

50 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 con CH3 mutado 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.

55 Las regiones VH de anticuerpos usadas previamente con capacidad conocida para emparejarse con la cadena ligera común IGKV1-39 se usaron para volver a clonarse en los constructos 1, 2, 68 y 69, lo que resulta en los vectores I-V de la Tabla 17. Los vectores IV, que contienen cada uno secuencias de ácido nucleico que codifican la cadena ligera humana común, así como también 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.

65

Tabla 17:

Vector	Gen VH	Especificidad de antígeno	Masa VH (Da)	Designación de Merus	Clonado en Constructo núm.
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	Tétano (B)	13703	MF1337	68 (T366K, L351K)
IV	IGHV 3.30	Fibrinógeno (A)	12794	MF1122	1 (E356K, D399K)
V	IGHV 1.08	Tétano (B)	13703	MF1337	2 (K392D, K409D)

Tabla 18:

Transfección núm.	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.		

Las Figuras 23A y B muestran que para la combinación de mutaciones DEKK, cuando existe un exceso de A o C (A o C están en el 'lado DE' y B está en el 'lado KK'), se forma AB o BC pero el excedente de A o C se presenta como una mezcla de homodímeros y semicuerpos en todos los casos. Sin embargo, cuando hay un exceso de B (B está en el 'lado KK' y A o C están en el 'lado DE'), existe una clara diferencia. Todavía se forman AB o BC, pero el excedente de B está esencialmente ausente como homodímero y solo se forman semicuerpos. Los porcentajes se midieron nuevamente por la altura del pico. Nótese bien: los picos detectados en el intervalo de 2 % o menos están por debajo del umbral de lo que la tecnología nMS aplicada puede medir con precisión. Por lo tanto, las mediciones de <2 % se consideran dentro del nivel de ruido de análisis y, por lo tanto, se ignoran. Es sorprendente que el exceso de B resulte en porcentajes altos de sólo semicuerpos B. Especialmente en las relaciones 1:3 y 1:5 de A:B, se observaron porcentajes altos de semicuerpo B (Fig. 23A y 23B) en ausencia de homodímero BB, lo que indica que las mutaciones 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, se conoce que los anticuerpos cMET o CD3 tienen efectos secundarios adversos no deseados cuando se presentan como homodímeros bivalentes en composiciones terapéuticas).

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

En conjunto, la combinación de mutaciones DEKK ofrece un claro beneficio con respecto a las mutaciones CH3 de inversión de carga, ya que una de las cadenas del heterodímero no forma homodímeros.

Ejemplo 22: variedades de mezclas mediante el uso de la combinación DEKK

Como se demostró que la combinación de mutaciones DEKK controla la formación de moléculas de IgG biespecíficas ('AB') con alta pureza, exploramos a continuación la viabilidad de la producción controlada de mezclas de anticuerpos más complejas de una célula, tales como mezclas 'AB y AA' o 'AB y AC'. Los Fab modelos usados anteriormente se incorporaron en vectores que contienen tanto el 'constructo DE' como el 'constructo KK' y se coexpresaron diversas combinaciones de estos vectores para crear mezclas, para demostrar la versatilidad de la tecnología. Los Fab modelo MF1337 (toxoides tetánico), MF1122 (fibrinógeno) y MF1025 (tiroglobulina) se eligieron en función de su comportamiento estable general, buenos niveles de expresión y diferencias de masa entre las IgG que contienen estos Fab (ver Tabla 19)

Tabla 19:

Especificidad	Nombre Fab	Masa IgG	Δ-masa MF1122
Tétano (A)	(MF)*1337	146747.03	+1842.05
Fibrinógeno (B)	(MF)1122	144904.98	0
Tiroglobulina (C)	(MF)1025	144259.87	-645.11

* MF=Designaciones Fab Merus, tales como MF1337 y 1337 se usan indistintamente

Tabla 20: Programa de transfección:

Tr núm.	Cadena pesada1	Cadena pesada2	Cadena pesada3	Relación Tr.	Especies esperadas (%)	Especies Observadas (%)
1	1337-KK	1122-DE	1025-DE	2:1:1	AB (50%) AC (50%)	AB (43%) AC (57%)
	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%)

5

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

15

20 Se realizó MS nativa en todas las muestras y los porcentajes de especies observadas se calcularon en base a 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 lo cuales correspondieron 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. Se detectaron semicuerpos en cantidades muy pequeñas en la mayoría de las muestras (menos del 2 %), lo cual no es problemático ya que pueden separarse fácilmente de la fracción de IgG de longitud completa como se analizó anteriormente. Después de la nMS se descubrió que la masa observada de IgG en la muestra 11 correspondía a una especie diferente a la esperada, y se concluyó que esto se debió a un error de transfección, es decir, en la muestra 11 aparentemente se cotransfectó 1025-DE con 1337-KK en lugar de 1122-KK.

25

30 Las muestras de IgG se analizaron posteriormente en un ELISA intercalado para confirmar la presencia funcional de las especificidades deseadas. El recubrimiento de las placas ELISA se realizó con fibrinógeno o tiroglobulina y la detección se realizó con tiroglobulina marcada con fluoresceína o toxoide tetánico marcado con fluoresceína. Los antígenos de detección se marcaron con fluoresceína (kit Pierce NHS-fluorescein Antibody Labeling, núm. cat. 53029) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los antígenos marcados con fluoresceína podrían detectarse posteriormente mediante un anticuerpo anti-fluoresceína conjugado con FITC (Roche diagnostics, núm. 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. Generalmente, los resultados cumplen con los resultados esperados con las excepciones indicadas en cursiva o negrita. En las transfecciones 1-3, el supuesto pocillo 'negativo' para las especies BC (tr. núm. 1 y 2) o AC (tr. núm. 3) demostró una señal de fondo significativa. Se conoce por estudios previos que los ELISA biespecíficos pueden experimentar altos niveles de fondo. Estos niveles de fondo también pueden provocarse por la posible presencia de semicuerpos en la muestra. Es de destacar que los resultados del ELISA biespecífico confirmaron que se había producido un error en la transfección núm. 11, ya que se detectó la especie AC (valor en negrita) en lugar de BC.

35

40 Tabla 21: Valores OD450 de ELISA biespecífico

Núm. Tr	Especies de IgG detectadas		
	AB (Tet-Fib)	AC (Tet-Tir)	BC (Fib-Tir)
1	0.989	1.792	<i>0.438</i>
2	1.085	1.852	<i>0.418</i>
3	1.419	<i>0.775</i>	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

45

50

55

60

65

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

5 En el ejemplo 12 se planteó la hipótesis de que se espera que las mezclas resultantes de las transfecciones ZA o ZB se vuelvan problemáticas cuando se transfieran a una producción a mayor escala, ya que se informa que las variantes de botón en ojal son inestables y no puede excluirse que los dominios CH3 que comprenden un 'botón' o un 'ojal' se dimerizarán con dominios CH3 con carga manipulada genéticamente. Como se demostró en los ejemplos anteriores que se han encontrado mutantes de pares de carga novedosos que controlan, preferentemente, la heterodimerización
10 prácticamente sin formación de homodímeros, las cadenas polipeptídicas que comprenden el dominio CH3 que comprenden estos mutantes de pares de carga novedosos pueden expresarse en células junto con cadenas polipeptídicas que comprenden el dominio CH3 con carga manipulada genéticamente conocidas previamente o potencialmente con cuerpos SEED, y es probable que resulten en la formación preferencial de dos moléculas biespecíficas solamente.

15 A partir 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 células clonales donde la dimerización de las cadenas pesadas se controla por los dominios CH3. Sin embargo, el uso de un solo conjunto de vectores de mutaciones CH3 complementarias limita el número de posibilidades de variedades mixtas que pueden producirse. Sería posible producir mezclas más complejas de IgG y/o biespecíficos, tales como las mezclas 'AB y CD' o 'AB y CC' si pudiera usarse un
20 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 CH3 manipulados genéticamente no pueden fabricar dímeros 'cruzados', que es que las cadenas pesadas producidas por uno de los conjuntos de vectores se dimerizan en una IgG completa con cadenas expresadas por el otro conjunto de vectores.

25 Para probar dicha formación potencial de dímeros 'cruzados', se realizó un análisis *in silico* mediante el uso de HADDOCK para obtener información adicional sobre si se produciría un posible emparejamiento entre dominios CH3 de tipo silvestre y dominios CH3 que contienen mutaciones DE o KK. De manera similar, se analizaron los posibles emparejamientos entre los dominios CH3 de tipo silvestre y los dominios CH3 que contienen mutaciones E356K,D399K o K392D,K409D, así como también los posibles emparejamientos entre los dominios CH3 de tipo silvestre y los dominios CH3 que contienen mutaciones de botón en ojal y cualquier combinación de las anteriores. Las combinaciones de mutantes CH3 que se analizaron en HADDOCK se enumeran en la Tabla 22 y las puntuaciones de HADDOCK resultantes se resumen en la
30 Figura 25.

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

40

Combinación CH3	Mutaciones	Un código de letra en HADDOCK
DEKK	Cadena 1: T366K,L351K	A
	Cadena 2: L351D,L368E	B
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

50

55 La Figura 25 muestra que, basado en estas predicciones de HADDOCK, la combinación de las combinaciones CH3 DEKK con las combinaciones CH3 de inversión de carga es más probable que tenga éxito en formar la combinación deseada de dos biespecíficos (AB y CD) sin subproductos contaminantes (especialmente AC, AD, BC, BD) cuando se cotransfecta en una sola célula. Como puede verse 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 CH3 DEKK o de inversión de carga se coloquen en un constructo que porte 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
60 lado E356K,D399K) esto resultará en la producción de predominantemente CC y AB tras la coexpresión en una célula.

Por el contrario, cuando se observan las predicciones para coexpresar DEKK con tipo silvestre, puede verse 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 CH3 DEKK junto con vectores que codifican CH3 de tipo silvestre. Por último, las predicciones para coexpresar ya sea DEKK o variantes de inversión de carga junto con las variantes de botón en ojal resultan en variantes biespecíficas no deseadas con puntuaciones de HADDOCK relativamente bajas, es decir, una alta probabilidad de que estas especies no deseadas se produzcan tras la coexpresión.

Por lo tanto, se concluye que la combinación de las combinaciones CH3 de DEKK con combinaciones CH3 de inversión de carga (E356K,D399K/K392'D,K409D') es adecuada idealmente para obtener mezclas de anticuerpos 'AB y CD' y/o 'AB y CC' esencialmente puras.

A continuación, se crearon mezclas de 2 biespecíficos que reconocen 4 objetivos/epítomos (AB y CD) y mezclas de un anticuerpo biespecífico y 1 mono-específico que reconocen 3 objetivos/epítomos (AB y CC) al poner en práctica lo anterior. Estas mezclas se crearon mediante el uso de 4 VH diferentes que son capaces de emparejarse con la cadena ligera común IGVK1-39, pero las combinaciones VH/VL individuales tienen diferentes especificidades. Para permitir el análisis de MS nativa, la diferencia de masa entre las especies (esperadas) debe ser suficiente, es decir, > 190 Da. Se seleccionaron cuatro VH individuales y las masas de estos fueron de manera que las especies esperadas en la cotransfección pudieran identificarse y separarse por 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)	Masa como IgG silvestre
A (RTK1)	146736.78
B (toxide tetánico)	146106.20
C (Fibrinógeno)	144904.98
D (RTK2)	145421.37

Las 4 VH diferentes se clonaron en vectores que contienen 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 el 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 CH3 manipulado genéticamente 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 dicha formación potencial de dímeros 'cruzados' entre cadenas pesadas que contienen mutaciones de inversión de carga y cadenas pesadas que contienen mutaciones DE o KK, se realizaron transfecciones de control.

Tabla 24:

Núm.Tr.	1 ^{er} VH / Constructo núm.	2 ^{do} VH / Constructo núm.	Especies esperadas
1	D / 68	A / 68	Error de emparejamiento 'KK' con 'KK'; Mayormente semicuerpos esperados
2	D / 68	A / 69	Emparejamiento 'KK' con 'DE'; producto AD esperado
3	D / 68	A / 1	Error de emparejamiento esperado 'KK' con 'E356K:D399K'
4	D / 68	A / 2	Error de emparejamiento esperado 'KK' con 'K392D:K409D'
5	D / 69	A / 68	emparejamiento 'DE' con 'KK'; producto AD esperado

6	D / 69	A / 69	Error de emparejamiento 'DE' con 'DE'; mezcla de semicuerpos, AA, AD y DD esperado		
7	D / 69	A / 1	Error de emparejamiento esperado 'DE' con 'E356K:D399K'		
8	D / 69	A / 2	Error de emparejamiento esperado 'DE' con 'K392D:K409D'		
Núm. Tr.	1^{er} VH / Constructo #	2^{do} VH / Constructo #	3rd VH / Constructo #	4^{to} 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 núms. 9-11 de la Tabla 24.

Tabla 25: Para cada una de las transfecciones núm.9-11, las especies se clasifican en masa, la diferencia de masa se calcula con la masa anterior. Células grises: especies esperadas (y deseadas); itálicas: diferencia de masa demasiado pequeña para separar en análisis nMS. *Especies: una sola letra representa semicuerpos; código de dos letras IgG intacto

Transfección núm. 9		
Especies*	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	<i>166,56</i>
BD	145755,5	219,90
AC	145875,1	<i>119,57</i>
AD	146095	219,90
BB	146142	<i>47,00</i>
AB	146481,5	339,47
AA	146820,9	339,47
Transfección núm. 10		
Especies*	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 núm. 11		
Especies*	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

10

15

20

25

30

35

40

Todas las muestras de proteínas purificadas obtenidas a partir de las transfecciones núms. 1-11 se analizaron en SDS-PAGE, y se incluyeron tres muestras control (Figura 26). Además, se realizó un análisis de nMS en muestras de proteínas de las transfecciones núms. 9-11 para identificar todas las especies en las muestras. Como puede verse en la Figura 26, las transfecciones núm. 3 y núm. 4 resultaron en el error de emparejamiento esperado entre los constructos 'KK' y tanto 'E356K:D399K' como 'K392D:K409D' y la cantidad de semicuerpos en las muestras de proteínas de estas transfecciones excedió la cantidad de moléculas de IgG completas. Las transfecciones núm. 7 y núm. 8 resultaron en muestras de proteínas en donde tanto los semicuerpos como la IgG completa se presentan en cantidades aproximadamente iguales. Sin embargo, del SDS-PAGE no puede deducirse si la IgG completa representa un dímero DE/DE, un dímero DE/E356K:D399K o un dímero DE/K392D:K409D. Sorprendentemente, prácticamente no se observaron semicuerpos en las muestras de las transfecciones núms. 9-11.

En la Figura 27, se presentan los análisis de nMS de las transfecciones núm. 9 y núm. 11. Los porcentajes de las especies esperadas y de las especies contaminantes se calcularon por la altura del pico. Se demostró que, para la transfección núm. 9, las especies esperadas 'AB y CD' se representan en un 97 % en la mezcla (30 % de AB y 67 % de CD), mientras que solo se presenta tan poco como aproximadamente 3 % de BD contaminante (Figura 27A). Para la transfección núm. 11, las especies esperadas 'AB y CC' se representan en un 94 % en la mezcla (33 % de AB y 61 % de CC), mientras que solo se presenta tan poco como aproximadamente el 6 % de BC (4,1 %) y AC (1,8 %) contaminantes (Figura 27B). Estos datos muestran que, de hecho, es posible producir mezclas más complejas de IgG y/o biespecíficos, tales 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 resulta en solo 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

45

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

50

Los tres lotes de IgG incluyeron 1) anticuerpo parental anti-toxoide tetánico de tipo silvestre 1337:1337 (dos Fab MF1337 sobre una cadena principal de Fc de tipo silvestre); 2) anticuerpo parental anti-toxoide tetánico de tipo silvestre 1516:1516 (dos Fab MF1516 sobre una cadena principal de Fc de tipo silvestre); 3) anticuerpo anti-toxoide tetánico biespecífico con CH3 manipulado genéticamente 1516:1337 que porta la combinación de mutaciones DEKK en su región Fc (Fab MF1516 en el lado DE, Fab MF1337 en el lado KK).

55

60

65

Los anticuerpos parentales 1337:1337 y 1516:1516 se eligieron como especificidades para incluirse en el producto biespecífico DEKK, ya que se conocía en base a estudios previos que no había respuesta sérica previa a la dosis contra estos anticuerpos en varias cepas de ratones. NB: la presencia de una respuesta sérica previa a la dosis invalidaría por supuesto 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 DEKK) y 1516:1516 (Fc de tipo silvestre) mediante nMS. Los tres lotes de IgG se prepararon como se describió anteriormente, pero el ADN usado para la transfección se fabricó mediante el uso de un kit maxiprep libre de endotoxinas para garantizar que la cantidad de endotoxinas sea lo más baja posible. Posteriormente, se analizaron los lotes para determinar la concentración de proteínas, los niveles de agregados, los niveles de endotoxinas y el porcentaje de producto biespecífico. Se demostró que los criterios de aceptación para el uso posterior de los lotes de IgG en un estudio de pK se cumplieron, 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 endotoxina fueron <3 EU/mg de proteína y el lote DEKK contenía > 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 califican para usarse en el estudio de pK.

5 Para la comparación de los parámetros de pK entre los tres lotes, se dosificaron 3 grupos de ratones hembras C57BL/6J (Harlan, Países Bajos) con 1 mg/kg de IgG humana (5 ml/kg de solución de inmunoglobulina/kg de peso corporal). En el momento de la administración de la dosis, 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 administración de la dosis y a los 15, 60 minutos, y 2, 4, 8, 24, 48, 96, 168, 268 y 336 horas después de la administración de la dosis. Se prepararon muestras de suero y se almacenaron a < -20 °C hasta el análisis. Cada grupo constaba de 3 subgrupos de 4 ratones, es decir, 12
10 ratones/grupo. De cada ratón se tomaron muestras de 6 puntos temporales. El bienestar de los animales se mantuvo de acuerdo con los principios generales que rigen el uso de animales en experimentos de las Comunidades Europeas (Directiva 86/609/CEE) y la legislación holandesa (The Experiments on Animals Act, 1997). Este estudio se realizó de conformidad, además, con los Standards for Humane Care and Use of Laboratory Animals, emitidos por la Oficina de Bienestar de los Animales de Laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud de EE.UU. con el número de identificación
15 45859-01 (fecha de vencimiento: 30 de abril de 2015).

Los ratones del Grupo 1 recibieron el anticuerpo monoespecífico IgG 1516:1516 de longitud completa (triángulos); los ratones del Grupo 2 recibieron el anticuerpo monoespecífico IgG 1337:1337 de longitud completa (cuadrados); los ratones del Grupo 3 recibieron el anticuerpo biespecífico IgG 1516:1337 de longitud completa (diamantes), con regiones CH3 manipulado genéticamente con DEKK (1516 en el lado DE y 1337 en el lado KK).
20

Se aplicó un ensayo ELISA para el análisis cuantitativo de anticuerpos monoclonales humanos en suero de ratón mediante el uso de un ELISA IgG humano cuantitativo (ZeptoMetrix, NY EE.UU.; Kit ELISA núm. 0801182). Brevemente, el ensayo ELISA se basa en el principio de que el anticuerpo monoclonal humano se une a la IgG anti-humano recubierta en una
25 placa ELISA de 96 pocillos. El anticuerpo unido se visualizó posteriormente mediante el uso de un anticuerpo policlonal IgG antihumano conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP). La densidad óptica (DO) 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 séricos tanto del anticuerpo IgG biespecífico de longitud completa que porta la combinación de mutaciones DEKK como de sus anticuerpos monoespecíficos parentales son sorprendentemente
30 similares. Se concluye que las mutaciones CH3 presentes en el anticuerpo biespecífico DEKK no alteran la estabilidad ni la vida media, y la variante DEKK se comporta como IgG de tipo silvestre.

Referencias

- 35 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., y otros, *J. Immunol* 1976 (116) 510-517;
Lee and Richards *J. Mol. Biol.* 1971(55)379.
40 Gunasekaran y otros *J. Biol. Chem.* 2010(285)19637-19646
De Vries *Nature Protocols* 2010(5)883
Kabat y otros, (1991)
Mammalian Cell Biotechnology : a Practical Approach (M. Butler, ed., IRL Press, 1991)
Merchant *Nature biotechnology* 1998(16)677
45 Ridgeway *Protein Engineering* 1996(9)617-621.
Davis JH. y otros, *Protein Engineering, Design & Selection* 2010(23)195-202
Papadea and Check. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 1989;27(1):27-58.
Tissue Culture, Academic Press, Kruse and Paterson, editors (1973)
Ionescu y otros, *J. Pharm. Sci.* 2008 (97)1414)
50 *Current protocols in Protein Science* 1995, coligan JE y otros, 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.
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, Nueva
55 York, Boston, Dordrecht, Londres, Moscú, (2006) ISBN 0-306-46093-9

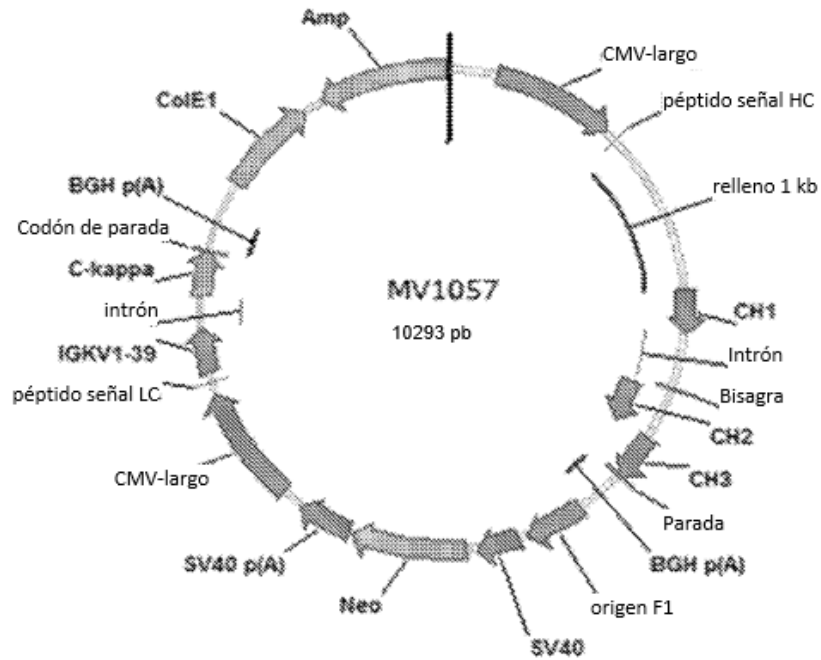
REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para producir al menos dos anticuerpos diferentes a partir de una única célula huésped, en donde cada uno de los dos anticuerpos comprende dos dominios CH3 que son capaces de formar una interfaz, el método comprende proporcionar en dicha célula
- 10 a. Una primera molécula de ácido nucleico que codifica una 1^{ra} cadena polipeptídica que comprende el dominio CH3 de IgG humana que comprende un residuo de lisina (K) en la posición de aminoácido 366 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE,
- 10 b. Una segunda molécula de ácido nucleico que codifica una 2^{da} cadena polipeptídica que comprende el dominio CH3 de la IgG humana que comprende un residuo de ácido aspártico (D) en la posición de aminoácido 351 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE,
- 15 c. Una tercera molécula de ácido nucleico que codifica una 3^{ra} cadena polipeptídica que comprende el dominio CH3, y
- 15 d. Una cuarta molécula de ácido nucleico que codifica una 4^{ta} cadena polipeptídica que comprende el dominio CH3, el método comprende, además, la etapa de cultivar dicha célula huésped y permitir la expresión de dichas al menos cuatro moléculas de ácido nucleico y cosechar dichos al menos dos anticuerpos diferentes a partir del cultivo.
- 20 2. El método de la reivindicación 1, que comprende, además, proporcionar a la célula huésped una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena ligera común.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la primera cadena polipeptídica que comprende el dominio CH3 comprende, además, un residuo de lisina (K) en la posición de aminoácido 351 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE.
- 25 4. El método de la reivindicación 1 o 2 o 3, en donde la segunda cadena polipeptídica que comprende el dominio CH3 comprende, además, un residuo de ácido glutámico (E) o un residuo de ácido aspártico (D) en la posición de aminoácido 349 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE, y/o un residuo de ácido glutámico (E) en la posición de aminoácido 368 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE.
- 30 5. El método de la reivindicación 4, en donde la segunda cadena polipeptídica que comprende el dominio CH3 comprende, además, un residuo de ácido glutámico (E) en la posición de aminoácido 368 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE.
- 35 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la tercera cadena polipeptídica que comprende el dominio CH3 comprende un residuo de lisina (K) en la posición de aminoácido 356 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE y un residuo de lisina (K) en la posición de aminoácido 399 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE, y la cuarta cadena polipeptídica que comprende el dominio CH3 comprende un residuo de ácido aspártico (D) en la posición de aminoácido 392 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE y un residuo de ácido aspártico (D) en la posición de aminoácido 409 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE.
- 40 7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde cada una de las cadenas polipeptídicas que comprenden el dominio CH3 comprende, además, una región variable que reconoce un epítipo objetivo.
- 45 8. El método de la reivindicación 7, en donde cada una de las 4 regiones variables de las 4 cadenas polipeptídicas que comprenden el dominio CH3 reconoce diferentes epítipos objetivo.
- 50 9. El método de la reivindicación 7, en donde las regiones variables de la 1^{ra} y la 2^{da} cadenas polipeptídicas que comprenden el dominio CH3 reconocen diferentes epítipos objetivo, mientras que las regiones variables de la 3^{ra} y 4^{ta} cadenas polipeptídicas que comprenden el dominio CH3 reconocen los mismos epítipos objetivo.
- 55 10. El método de la reivindicación 9, en donde el epítipo objetivo reconocido por las regiones variables de la 3^{ra} y 4^{ta} cadena polipeptídica que comprende el dominio CH3 es el mismo que el epítipo objetivo reconocido por la región variable de la 1^{ra} o la 2^{da} cadena polipeptídica que comprende el dominio CH3.
- 60 11. El método de la reivindicación 9, en donde el epítipo objetivo reconocido por las regiones variables de la 3^{ra} y 4^{ta} cadena polipeptídica que comprende el dominio CH3 es diferente del epítipo objetivo reconocido por la región variable de la 1^{ra} o la 2^{da} cadena polipeptídica que comprende el dominio CH3.
- 65 12. El método de la reivindicación 7, en donde las regiones variables de la 1^{ra} y la 2^{da} cadenas polipeptídicas que comprenden el dominio CH3 reconocen el mismo epítipo objetivo, mientras que las regiones variables de la 3^{ra} y la 4^{ta} cadenas polipeptídicas que comprenden el dominio CH3 reconocen un segundo epítipo objetivo que difiere del epítipo objetivo reconocido por dichas 1^{ra} y 2^{da} regiones variables.

13. Una mezcla de al menos dos anticuerpos diferentes que pueden obtenerse mediante los métodos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12.
- 5 14. Una célula huésped recombinante que comprende secuencias de ácido nucleico que codifican al menos dos anticuerpos diferentes, en donde cada uno de los dos anticuerpos comprende dos dominios CH3 que son capaces de formar una interfaz, dichas secuencias de ácido nucleico codifican al menos una primera, una segunda, una tercera y una cuarta cadena polipeptídica que comprende el dominio CH3, en donde la primera cadena polipeptídica que comprende el dominio CH3 comprende un dominio CH3 de IgG humana que comprende un residuo de lisina (K) en la posición de aminoácido 366 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE y en donde dicho segundo dominio CH3 que comprende la cadena polipeptídica comprende un dominio CH3 de IgG humana que comprende un residuo de ácido aspártico (D) en la posición de aminoácido 351 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE.
- 10
15. Una composición farmacéutica que comprende al menos dos anticuerpos diferentes de la reivindicación 13 y un portador aceptable farmacéuticamente.
- 15
16. Un método para fabricar una célula huésped para la producción de al menos dos anticuerpos diferentes, el método comprende la etapa de introducir en dicha célula huésped secuencias de ácido nucleico que codifican al menos una primera, una segunda, una tercera y una cuarta cadena polipeptídica que comprenden el dominio CH3, en donde la primera cadena polipeptídica que comprende el dominio CH3 comprende un dominio CH3 de IgG humana que comprende un residuo de lisina (K) en la posición de aminoácido 366 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE y en donde la segunda cadena polipeptídica que comprende el dominio CH3 comprende un dominio CH3 de IgG humana que comprende un residuo de ácido aspártico (D) en la posición de aminoácido 351 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE, en donde dichas secuencias de ácido nucleico se introducen consecutiva o concomitantemente.
- 20
- 25
17. Las células huésped recombinantes de la reivindicación 14, o las células huésped recombinantes obtenidas mediante el método de la reivindicación 16, que producen al menos dos anticuerpos diferentes.

Figura 1:

A) representación esquemática del vector de constructo MV1057



B) representación esquemática del vector de presentación de fagos MV1043

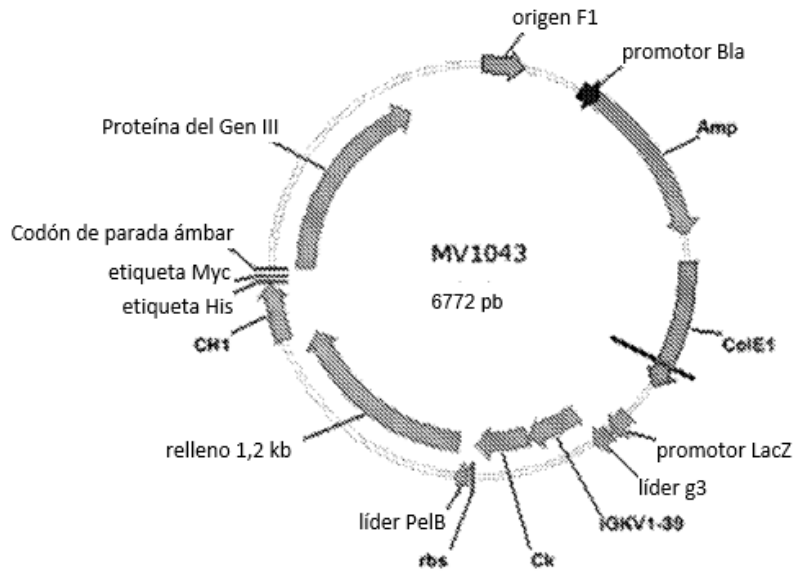


Figura 2: secuencia de aminoácidos de Fc de IgG1 de tipo silvestre, como se presenta en el vector de constructo MV1057 (se aplicó el esquema de numeración de la UE)

131	141	151	161	171	181
SSKSTSGGTA	ALGCLVKDYF	PEPVTVSWNS	GALTSGVHTF	PAVLQSSGLY	SLSSVTVPS
191	201	211	221	231	241
SSLGTQTYIC	NVNHKPSNIK	VDKRVEPKSC	DKTHICPPCP	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				

ES 2 743 399 T3

Figura 3: secuencia de aminoácidos y nucleótidos de las regiones VH usadas

MF1025_VH

gaggtgcagctggtggagtctgggggaggccttggtacagcctggggggtccctgagactctcctgtgcag
cctctggattcaccttttagcagctatgccatgagctgggtccgccaggctccaggaaggggctggagtg
ggtctcagctattagtggtagtggtagcacaactacgcagactccgtgaagggccggttcaccatc
tccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgt
attactgtgcaagggccgattggtgggcgacttttgactactggggccaaggtaccctggtcacc

MF1025_VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTI
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARADWWATFDYWGQGLVT

MF1122_VH

gaggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggagggtccctgagactctcctgtgcag
cctctggattcaccttcagtagctatggcatgcactgggtccgccaggctccaggcaaggggctggagtg
ggtggcagttatatcatatgatggaagtaataaataactatgcagactccgtgaagggccgattcaccatc
tccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagctgaggacacggccgtgt
attactgtgcaagagccctcttcacgacctcgccatggactattggggccaaggtaccctggtcacc

MF1122_VH

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTTFSSYGMHWVRQAPGKLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTI
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARALFTTIAMDYWGQGLVT


MF1337_VH

gaggtgcagctggtggagactggggctgaggtgaagaagccggggcctcagtgaaggtctcctgcaaggcttct
gactacatcttcaccaaataatgacatcaactgggtgcccaggccctggacaagggcttgaatggatgggatgg
atgagcgttaaacactggaaacacgggctatgcacagaagttccagggcagagtcaccatgaccagggacacgtcc
ataaacacagcctacatggagctgagcagcctgacatctggtgacacggccggtttatttctgtgagaggagtgt
cttttcaagacagagacggcgcctactatcacttcgctctggacgtctggggccaagggaccacgggtcacc

MF1337

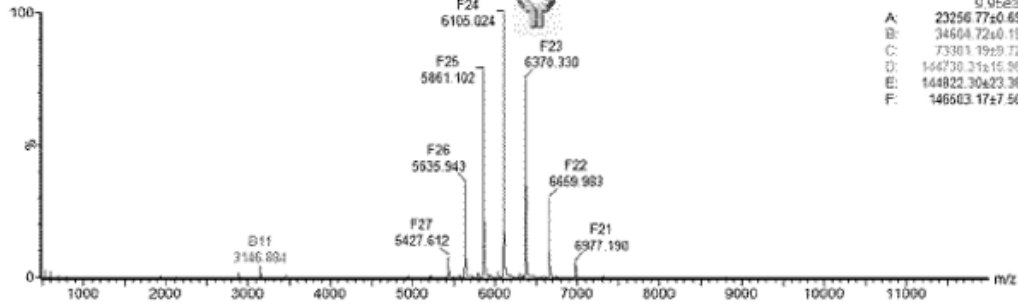
VHEVQLVETGAEVKKPGASVKVSKASDYIFTKYDINWVRQAPGQGLEWVGWMSANTGNTGYAQKFQGRVTMTRD
TSINTAYMELSSLTSGDTAVYFCARSSLFKTETAPYYHFALDVWGQGLT

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

A	MF1337	
	silvestre	

1.5µM (10⁴dil) A 5U pgnase o.n. 37C 6^hexch 150mM Ac pH8.5

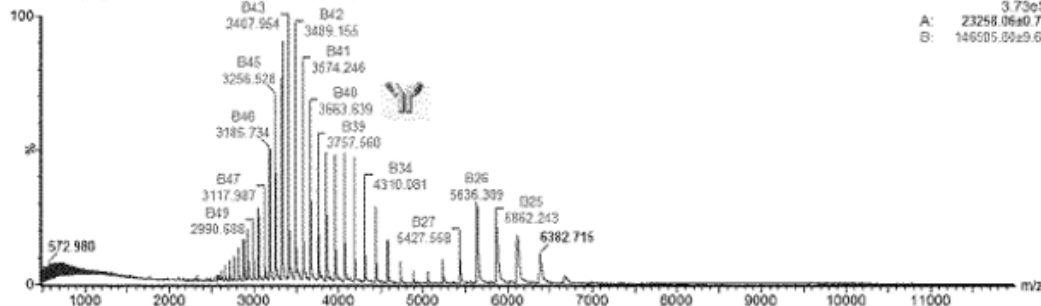
09-09-2010_A_nativa 29 (1.016) Sm (SG, 2x5.00); Cm (2.38)




TOF MS ES+
0.95e3
A: 23256.77±0.69
B: 34604.72±0.19
C: 73303.19±9.72
D: 144730.31±15.96
E: 144822.30±23.36
F: 146503.17±7.50

5%FA_10⁴dil

16-09-2010_A_den 4 (0.139) Sm (SG, 2x15.00); Cm (2.51)

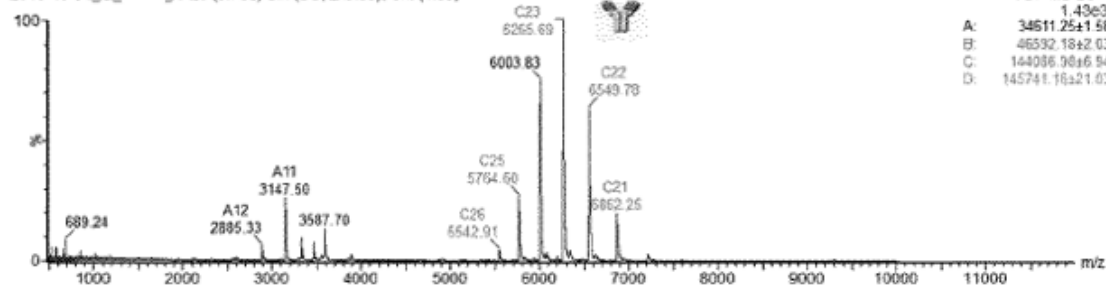


TOF MS ES+
3.73e3
A: 23258.06±0.71
B: 146505.89±9.64

G	MF1025	
	Constructo 4:K392D	
	D399K	
	K409D	

2.2 µM (5⁴dil) G 6^hexch in 50mM amAc pH7.5 5U pgnase 37on

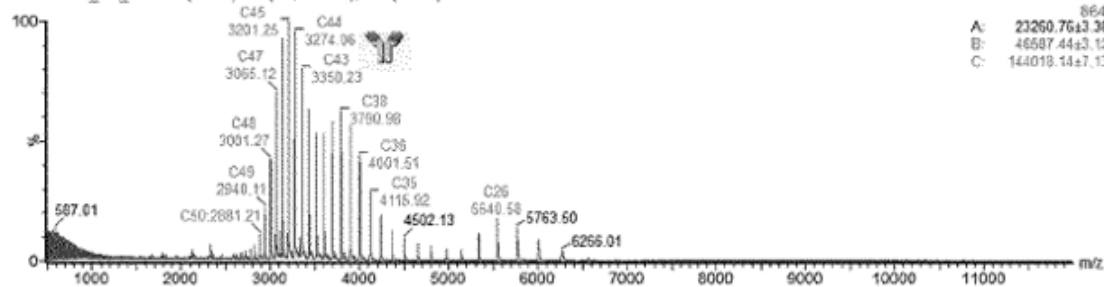
2010-10-04_G_nativa_A 21 (0.736) Sm (SG, 2x5.00); Cm (1.30)



TOF MS ES+
1.43e3
A: 34511.25±1.58
B: 46592.18±2.03
C: 144086.98±6.54
D: 145741.16±21.03

5%FA_10⁴dil_150V

21-09-2010_G1_den 27 (0.945) Sm (Mn, 2x2.00); Cm (17.73)

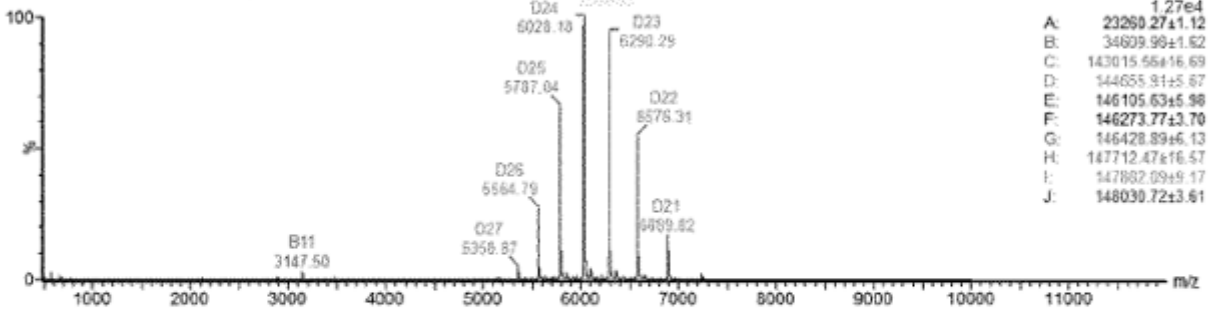


TOF MS ES+
864
A: 21260.76±3.36
B: 46587.44±3.12
C: 144019.14±7.13

H	MF1122	
	Constructo 5: E356K	
	E357K	
	K439D	
	K370D	

2.2 uM (5*dil) H 6*exch in 50mM amAc pH7.5 5U pgnase 37on

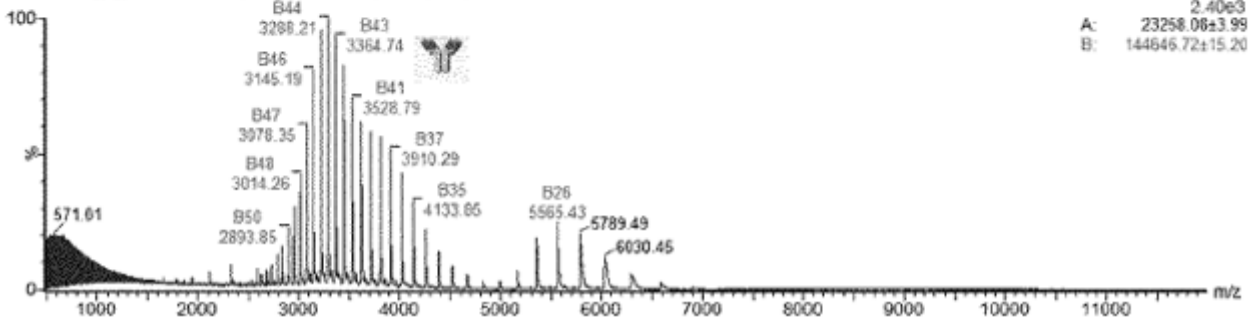
2010-10-04_H_nativa 11 (0.388) Sm (SG, 2x5.00); Cm (1.25)



TOF MS ES+
 1.27e4
 A: 23260.27±1.12
 B: 34609.98±1.82
 C: 143015.56±16.69
 D: 144655.91±5.87
 E: 146195.63±5.98
 F: 146273.77±3.70
 G: 146428.89±6.13
 H: 147712.47±16.57
 I: 147882.09±9.17
 J: 148030.72±3.61


5%FA_10*dil_150V

21-09-2010_H_den 12 (0.420) Sm (Mn, 2x2.00); Cm (7.53)

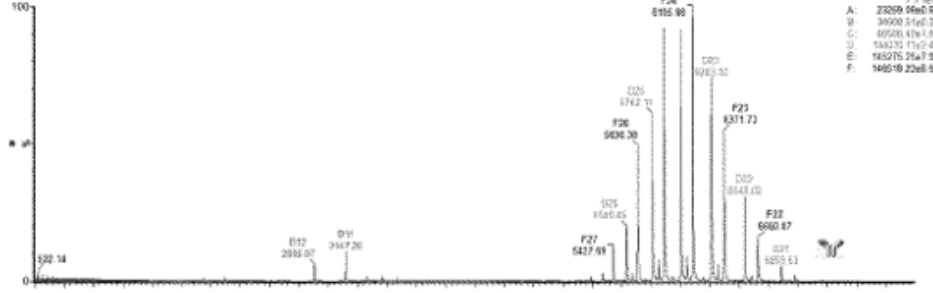


TOF MS ES+
 2.40e3
 A: 23258.08±3.99
 B: 144646.72±15.20

Figura 5

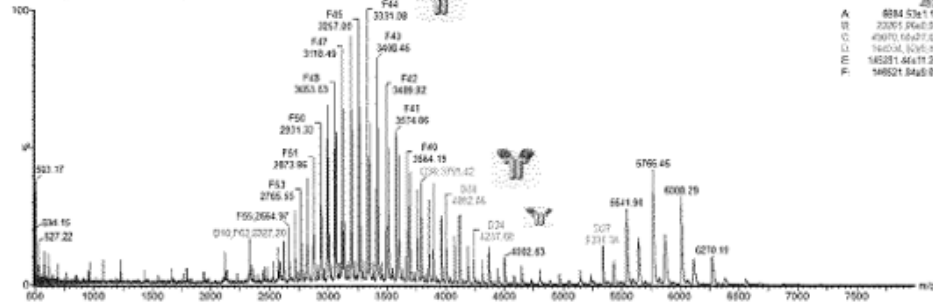
M	MF1025	MF1337 silvestre	
	Constructo 4: K392D D399K K409D		

ca 2uM (6' diH) M BU PCNase 37a.n. 6' excb e150m Amac pH7.5
2010-09-31_M_n25V35 (9.967) Sm (86, 265.00) Cm (1.37)




TOF MS ES+
A: 23208 9660.38
B: 36500 5160.38
C: 60500 4161.33
D: 136272 7162.43
E: 165275 2567.86
F: 146510 2268.84

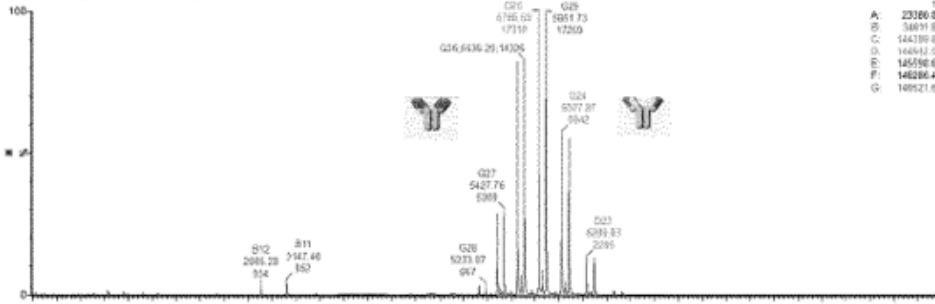
2010-09-31_M_base 37 (1.298) Sm (SG: 265.00) Cm (1.40)



TOF MS ES+
A: 8284 5361.19
B: 23201 9660.38
C: 49070 16427.62
D: 146508 3366.89
E: 146521 4411.26
F: 146521 8460.89

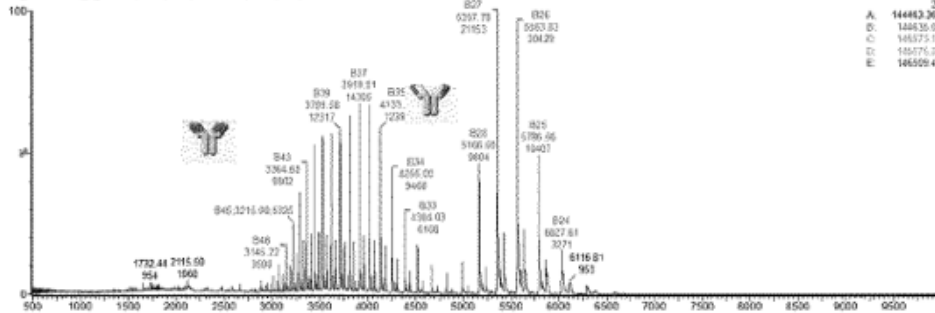
U	MF1122	MF1337 silvestre	
	Constructo 5: E356K E357K K439D K370D		

SR_2011-01-21_U_naf 44 (1.542) Sm (Mn: 262.00) Cm (1.54)



TOF MS ES+
A: 1.7364
B: 23360 8165.31
C: 54811 8646.89
D: 144389 8464.89
E: 146442 6362.91
F: 146508 5168.75
G: 146521 4263.00
H: 146521 8963.31

SR_2011-01-21_U_om 1 (0.839) Sm (Mn: 262.00) Cm (1.54)



TOF MS ES+
A: 144482 36418.91
B: 144835 9525.42
C: 146521 7168.12
D: 146576 5264.02
E: 146509 4462.89

Figura 6

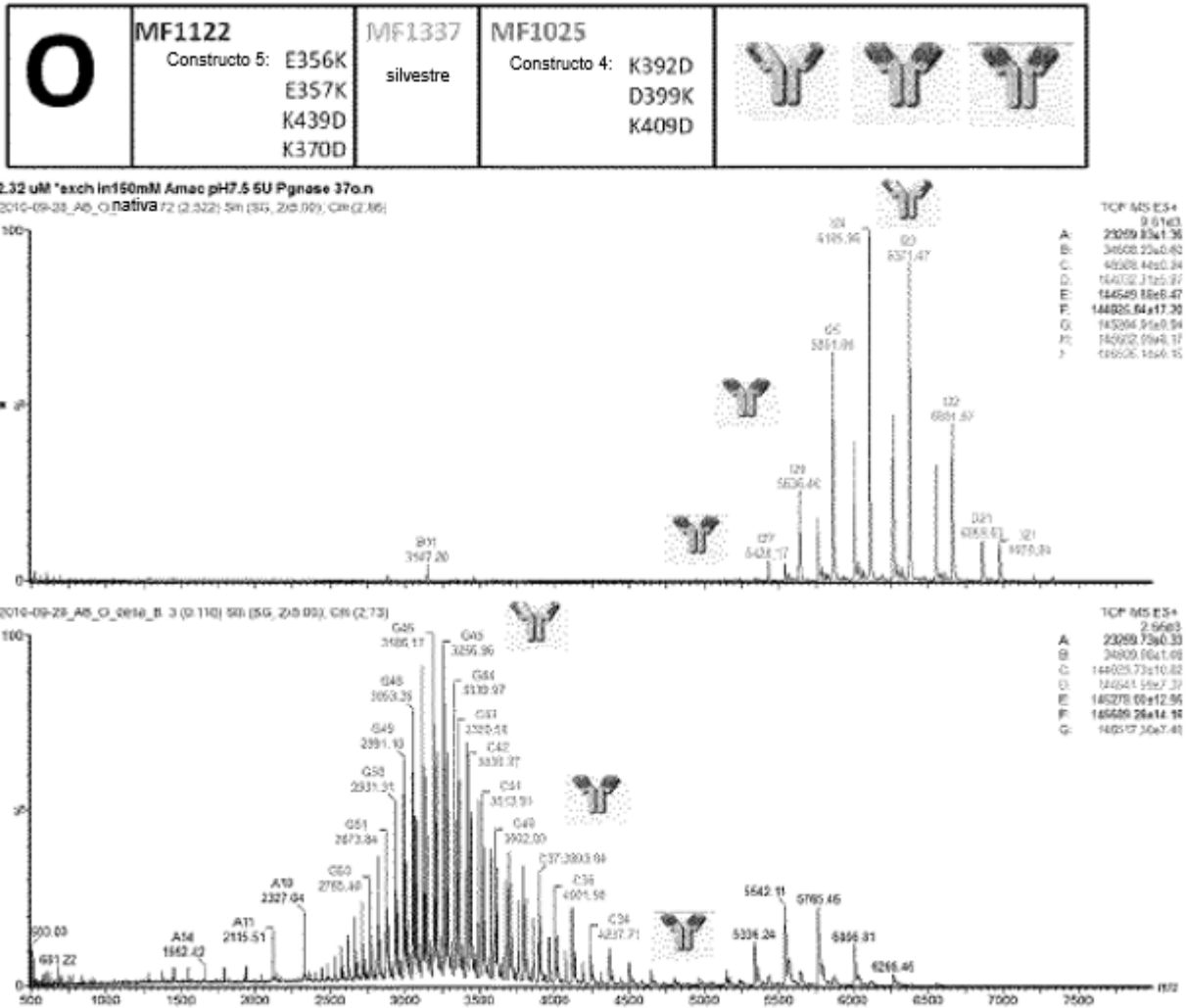
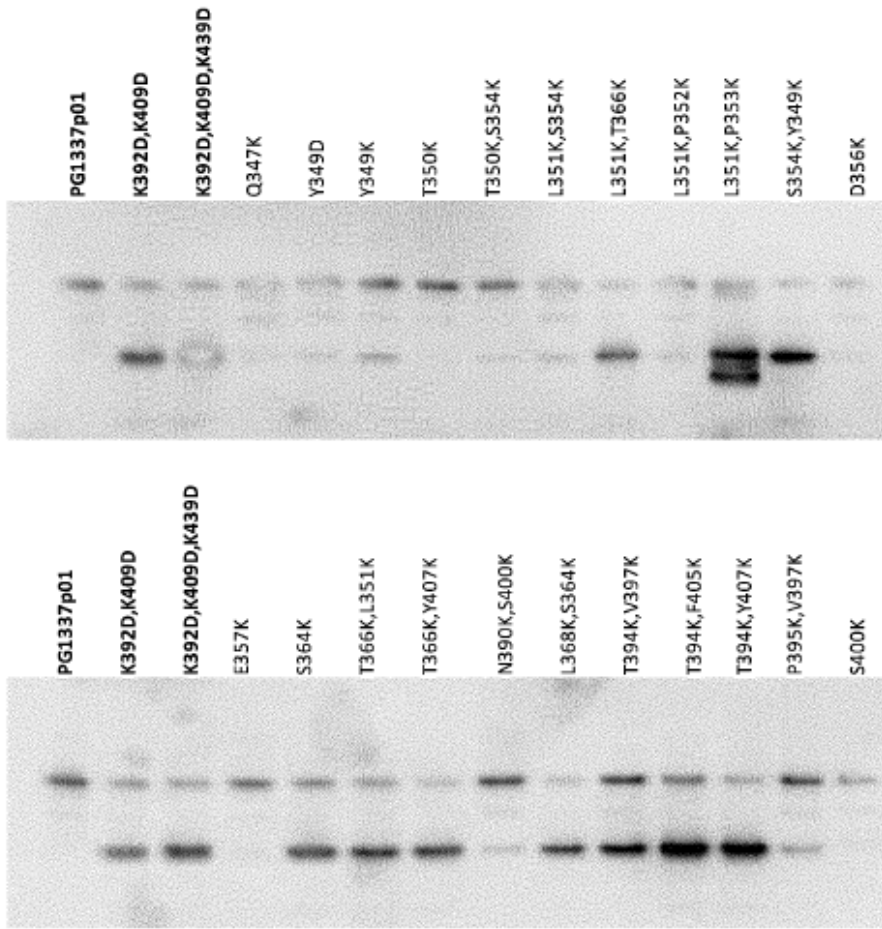


Figura 7:



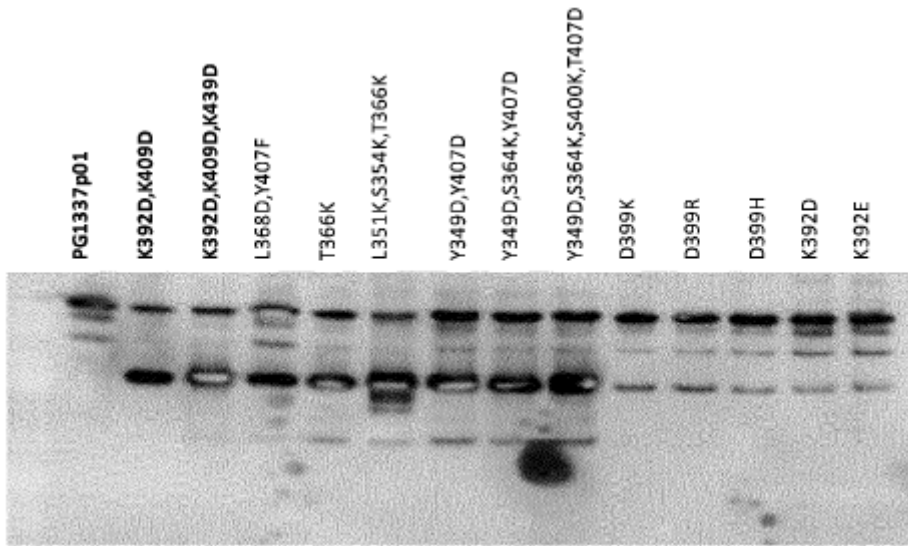
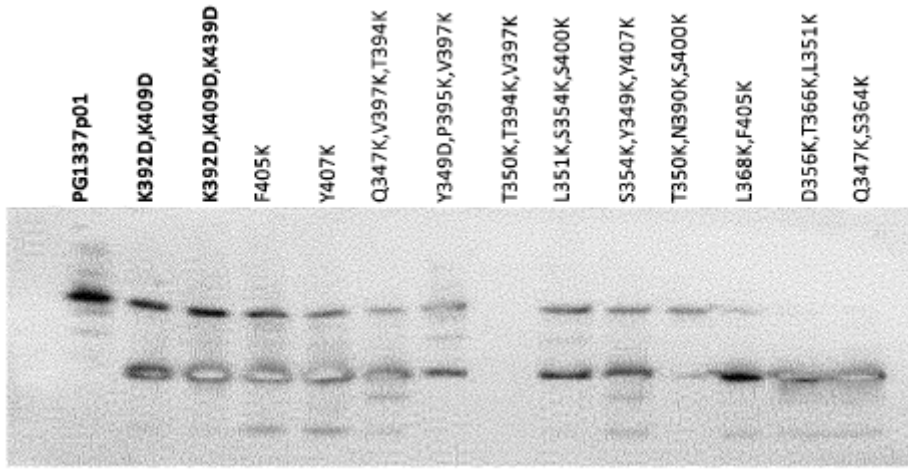
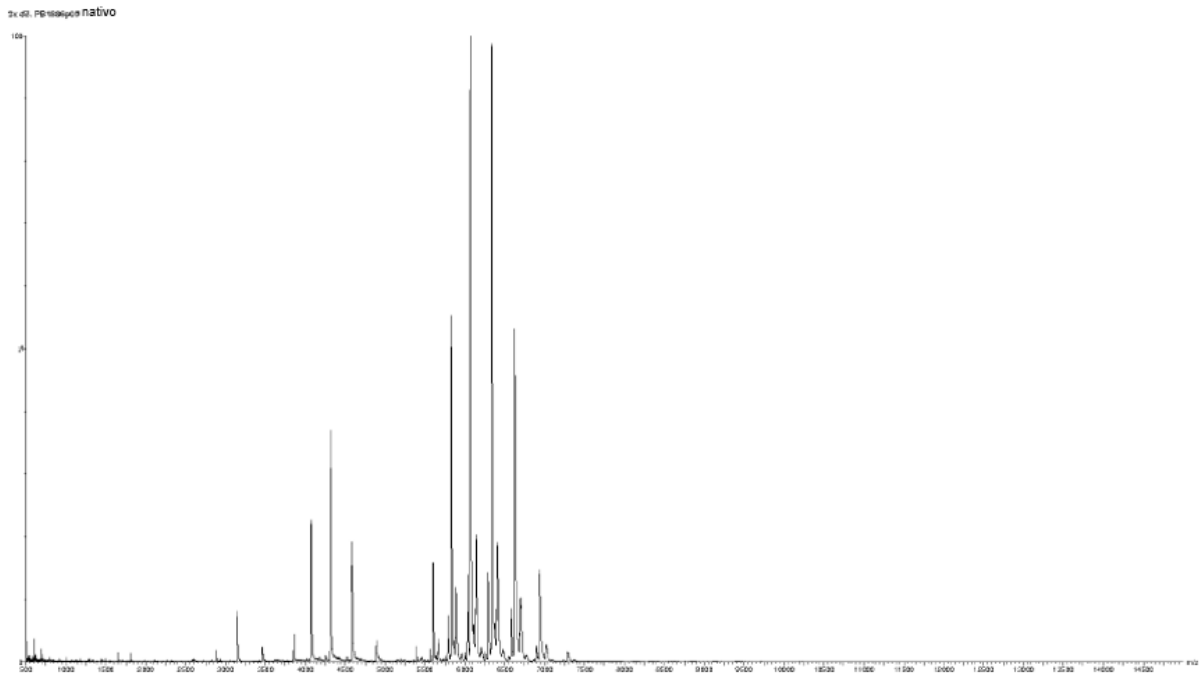
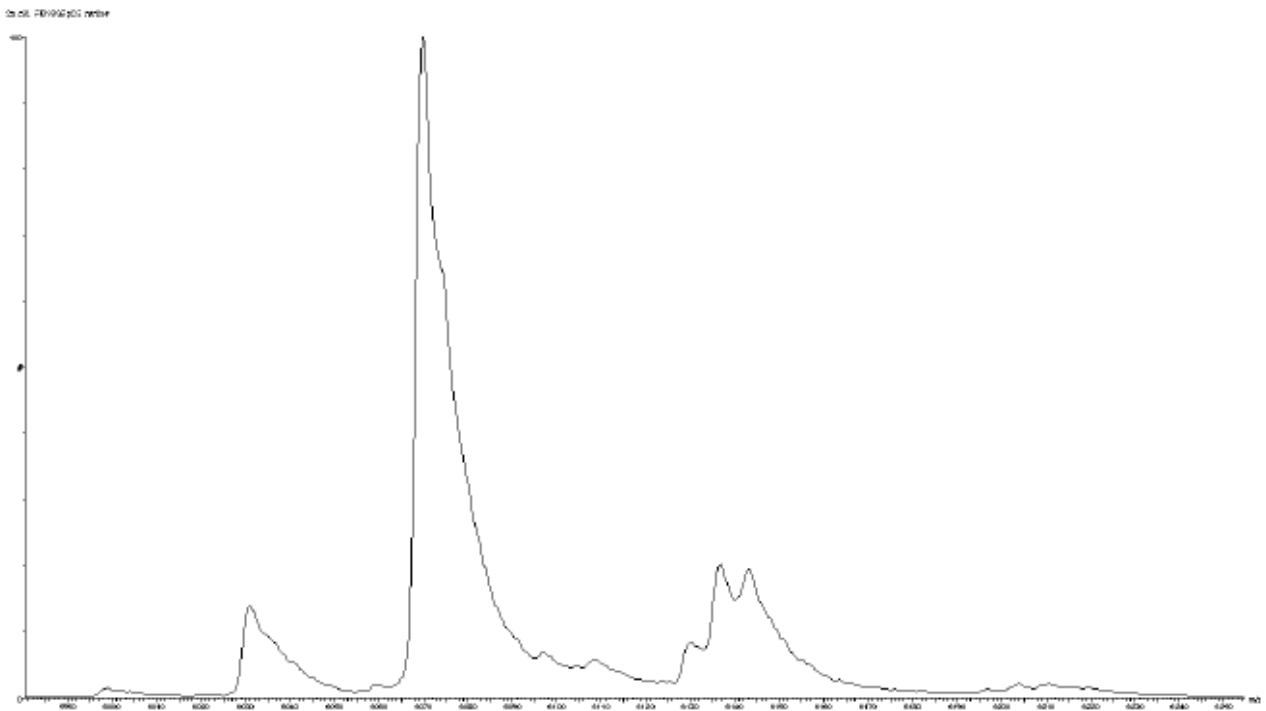


Figura 8:



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



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

Figura 9:

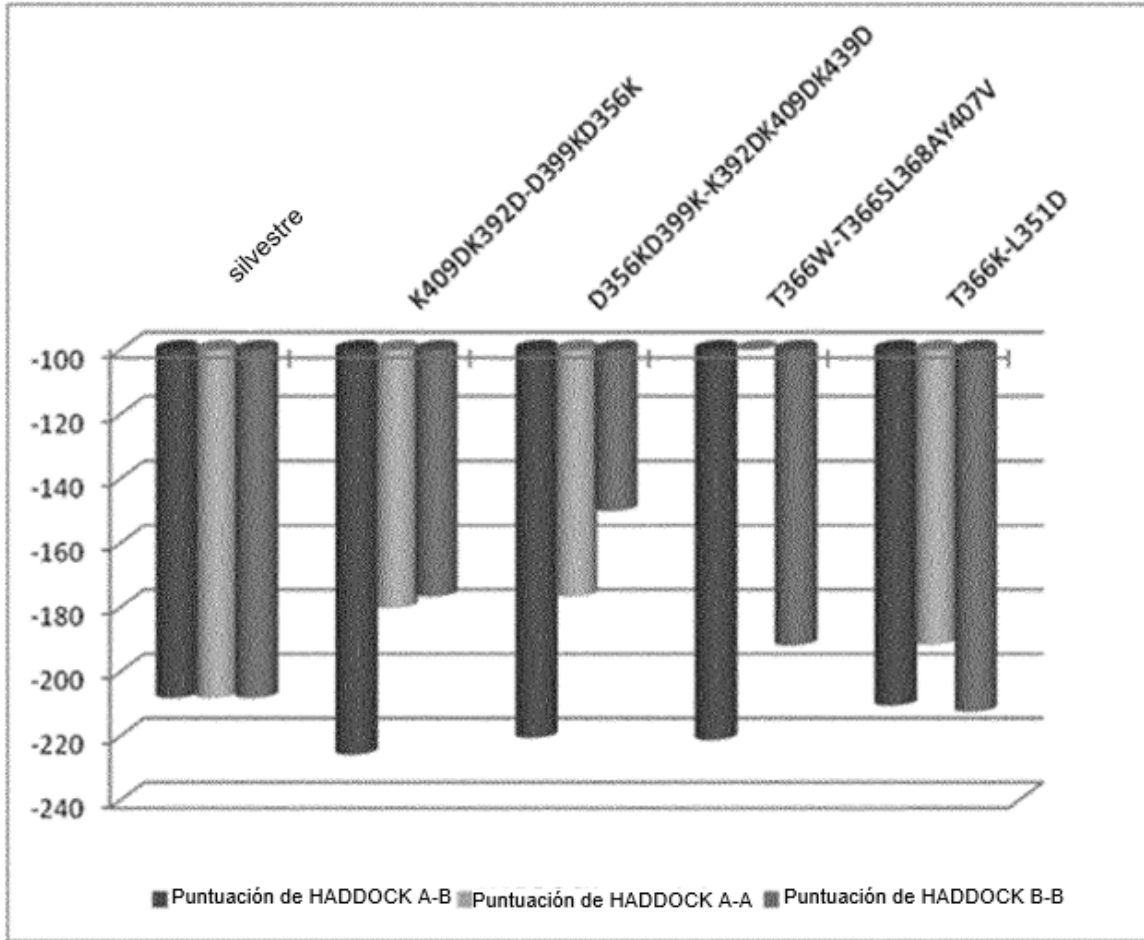
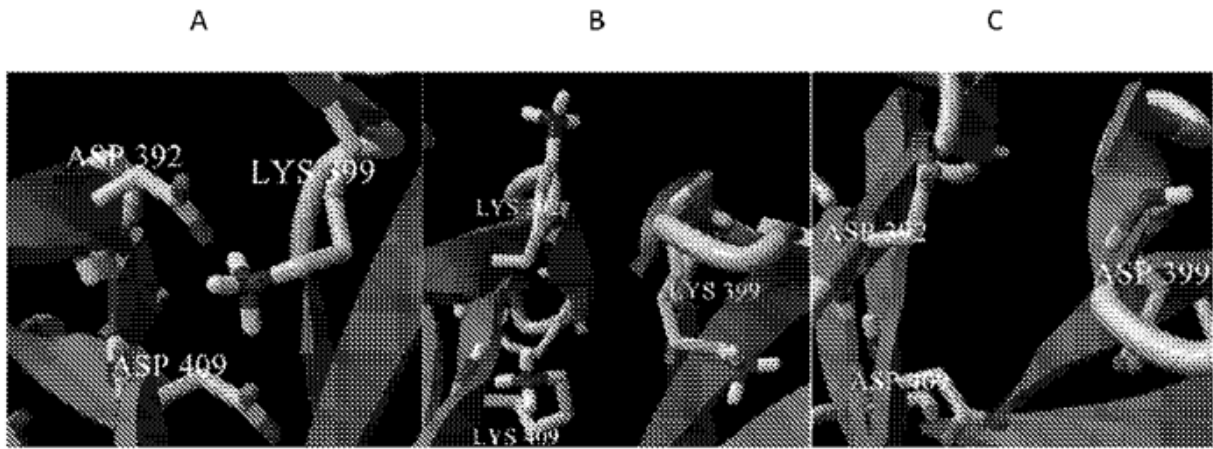


Figura 10:



A K409D:K392D/D399'K:E356'K

B D399K:E356K/D399'K:E356'K

C K409D:K392D/K409'D:K392'D

Figura 11:

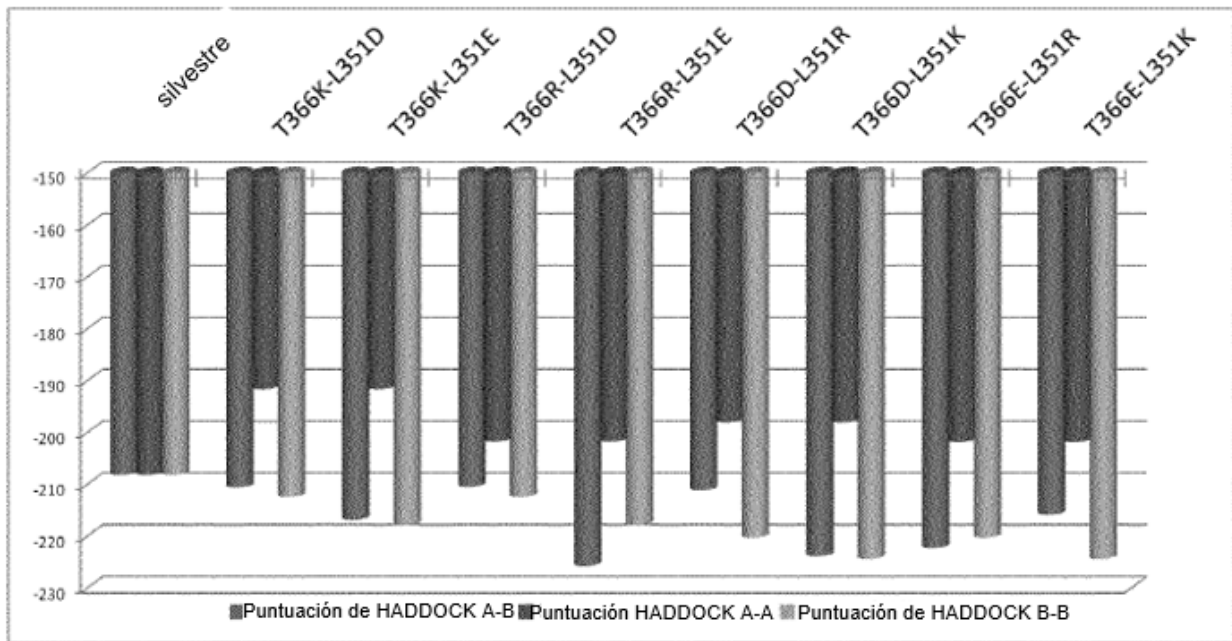
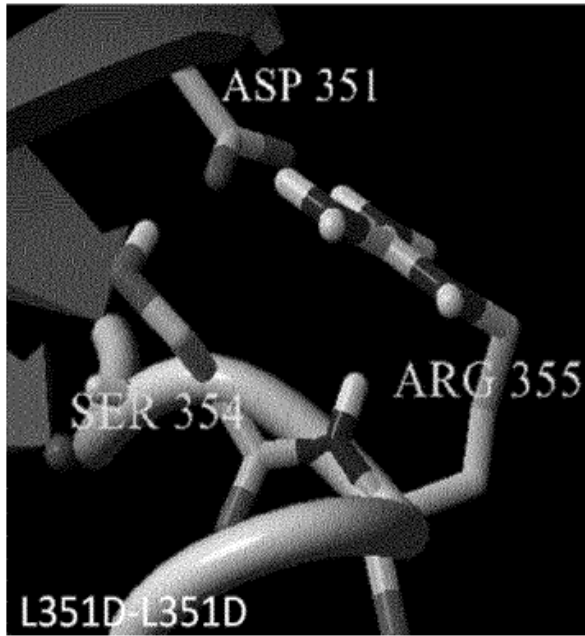


Fig 12:

A



B

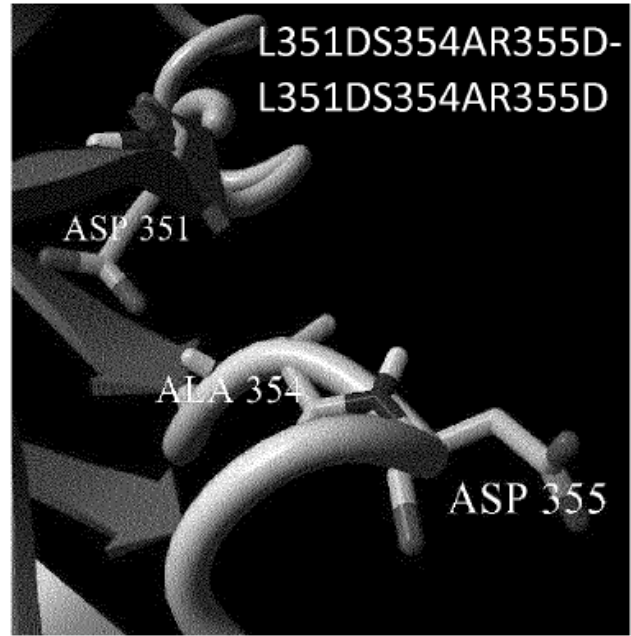


Figura 13:

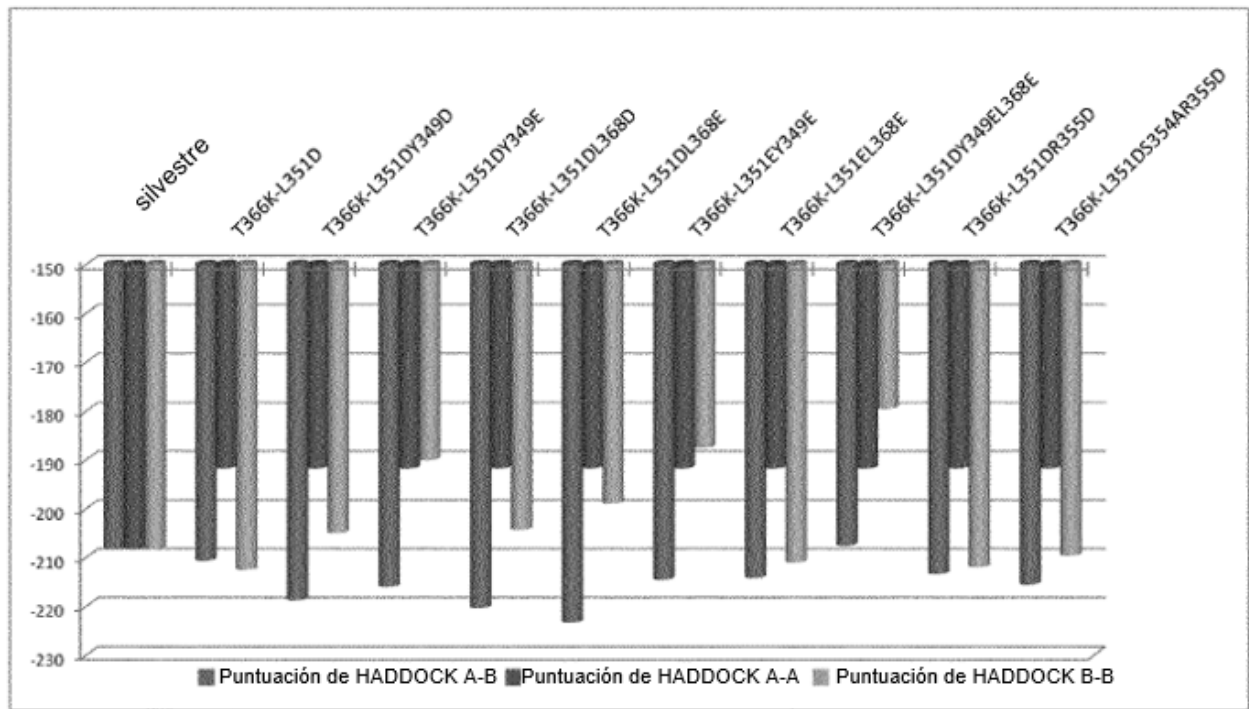


Figura 14:

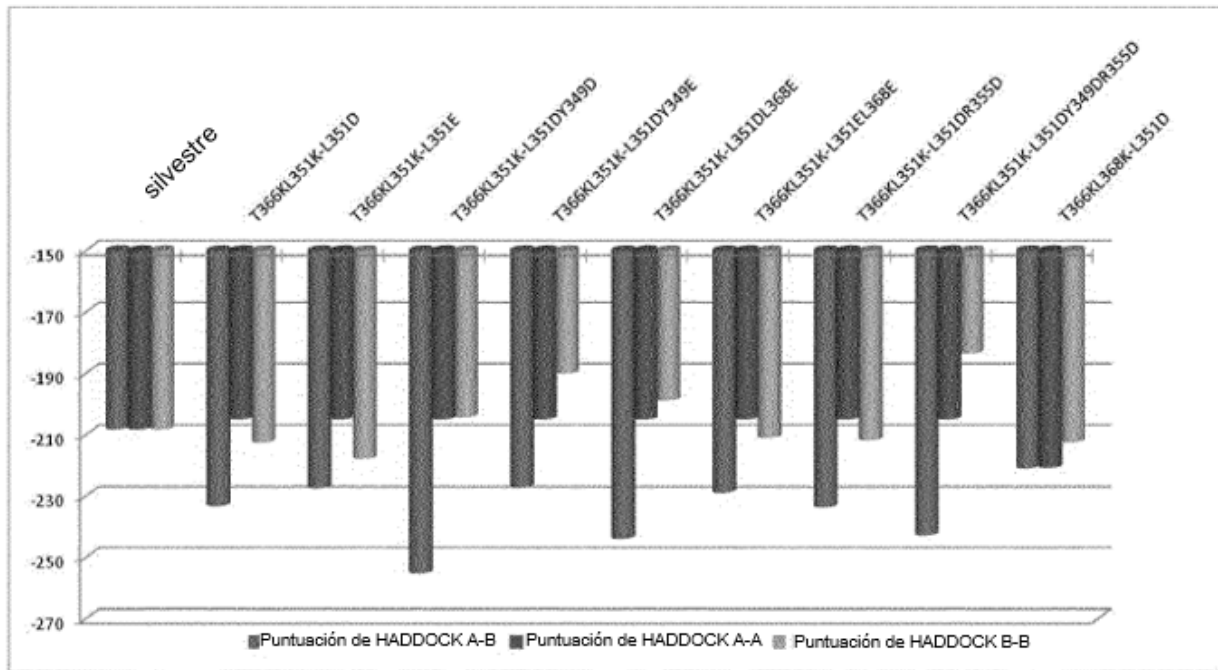


Figura 15:

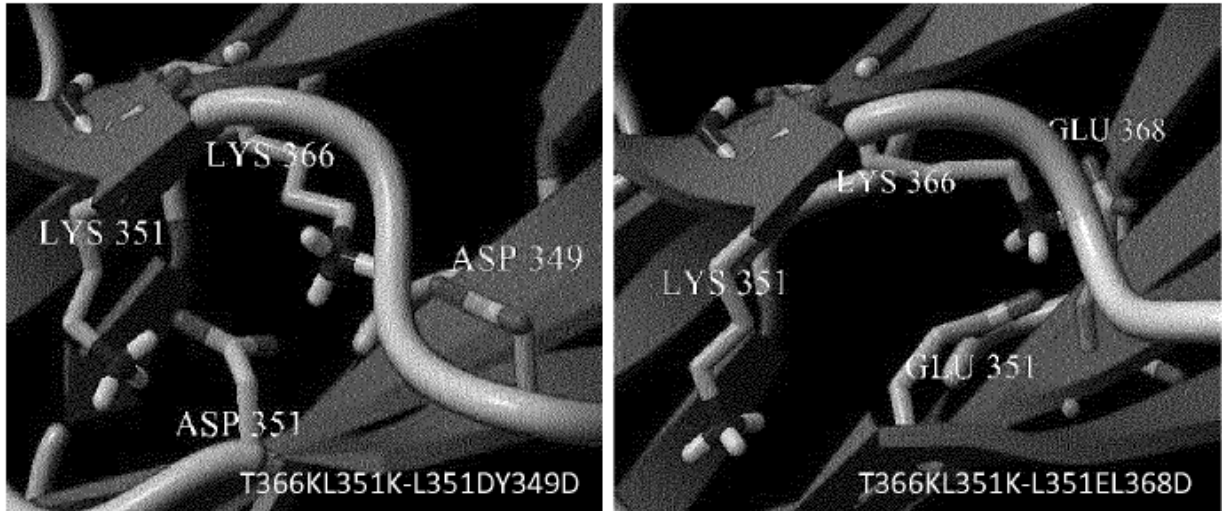


Figura 16:

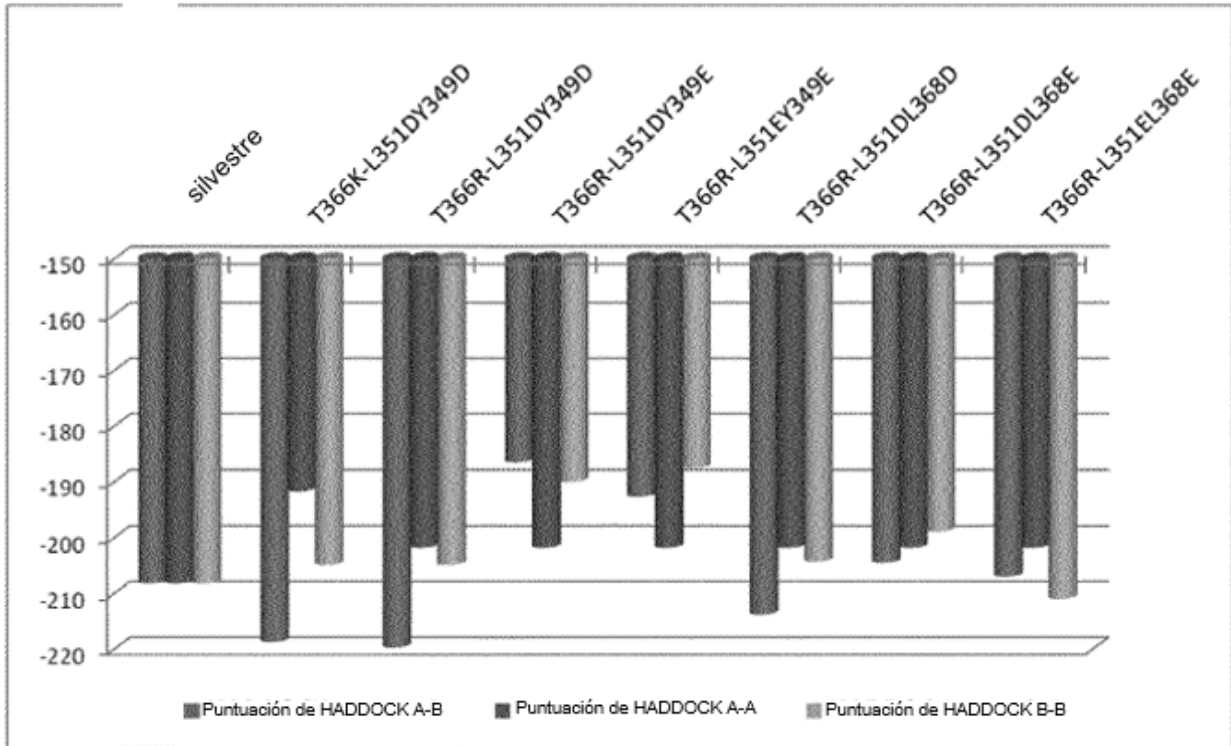


Figura 17:

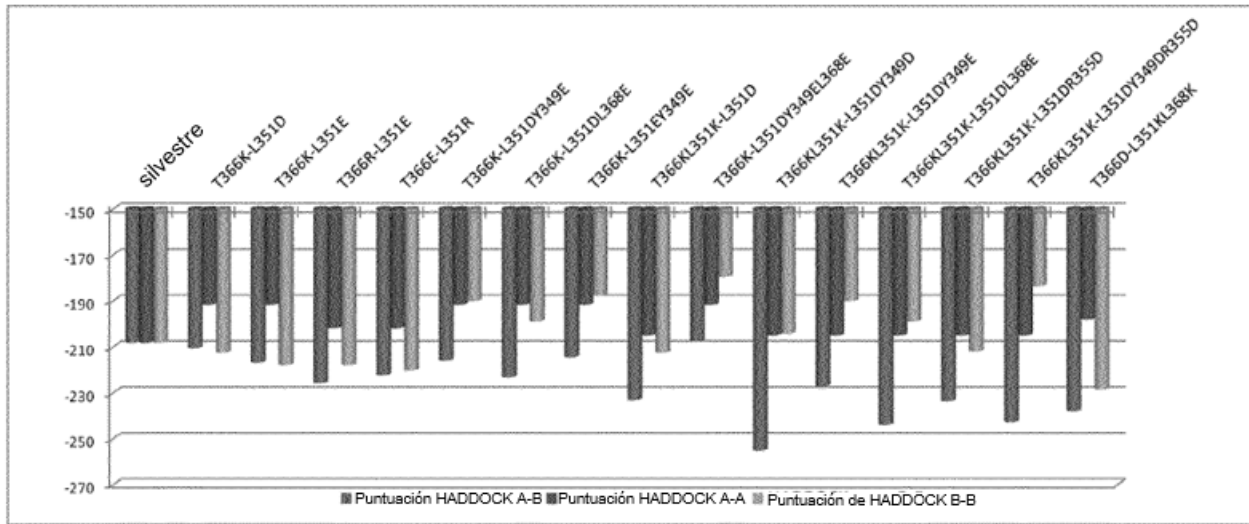


Figura 18:

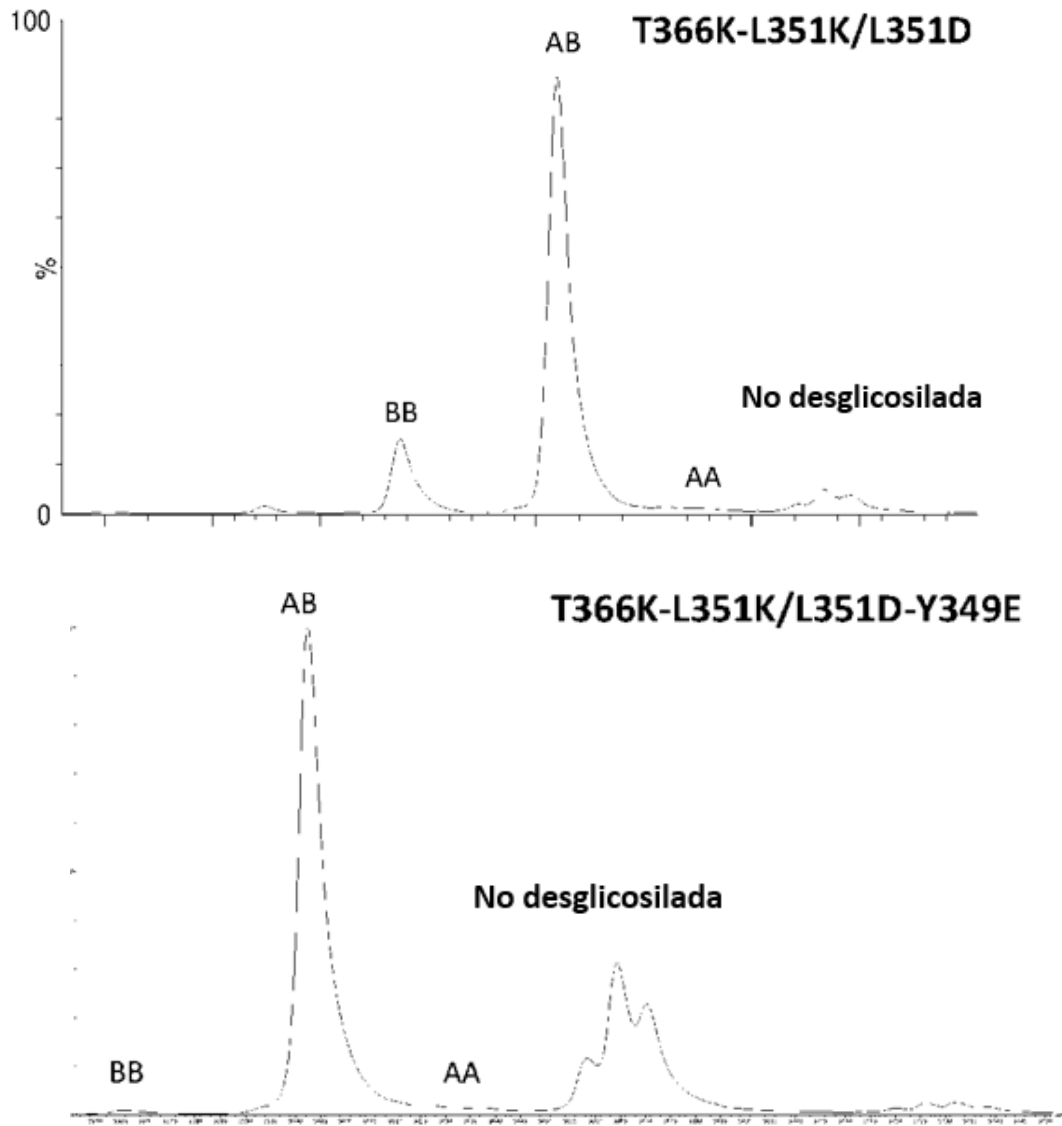


Figura 19 A:

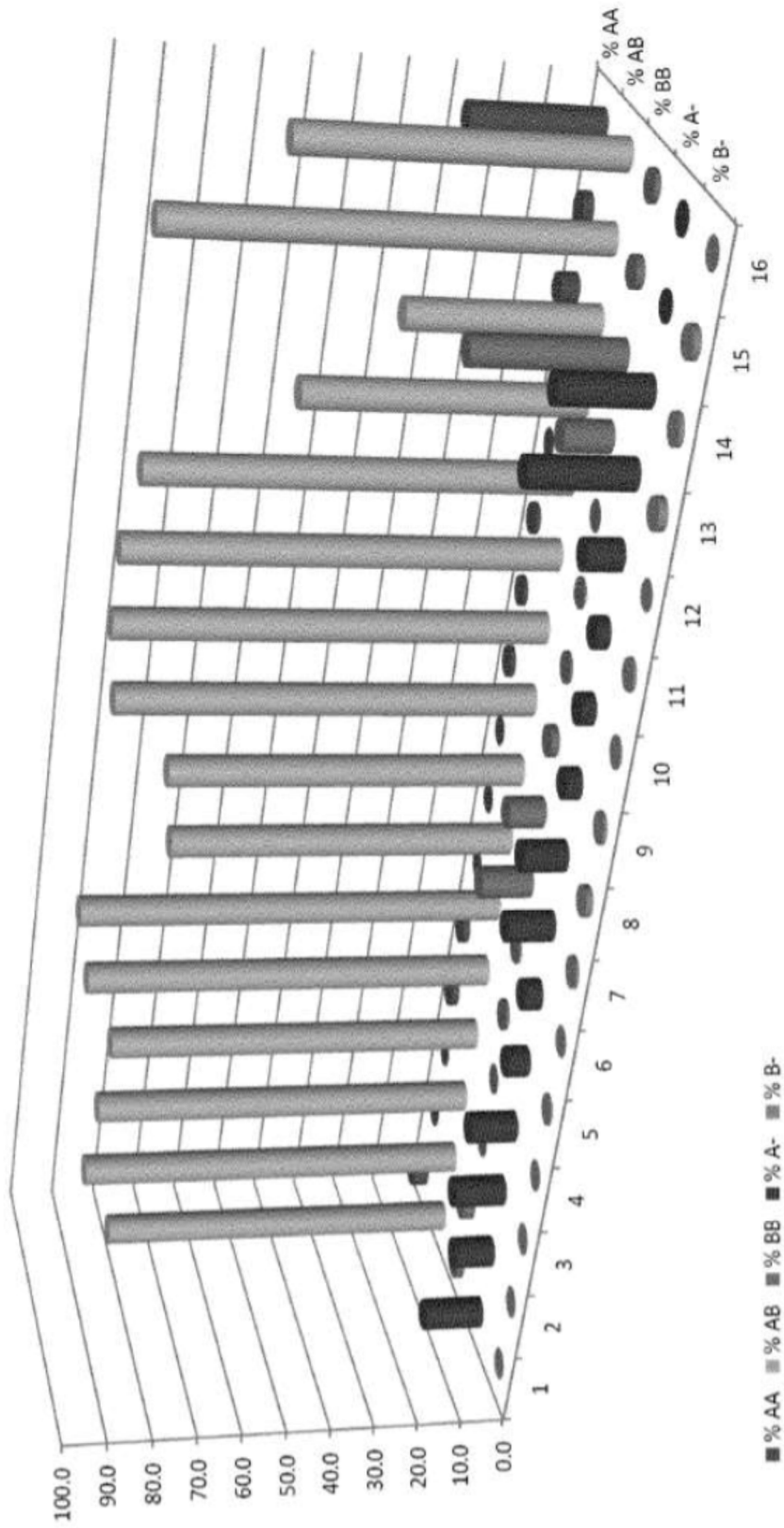


Figura 19 B:

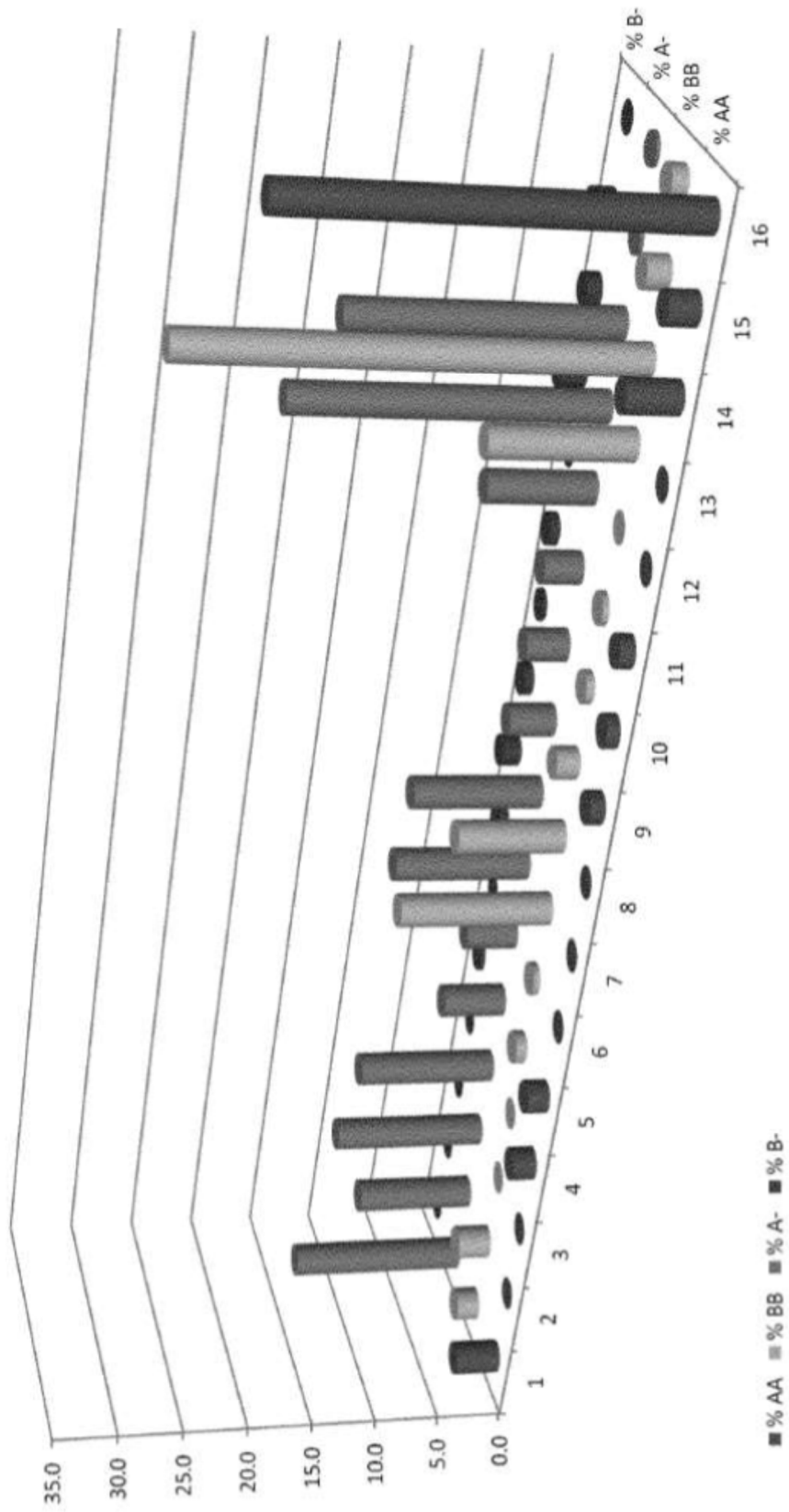


Figura 20:

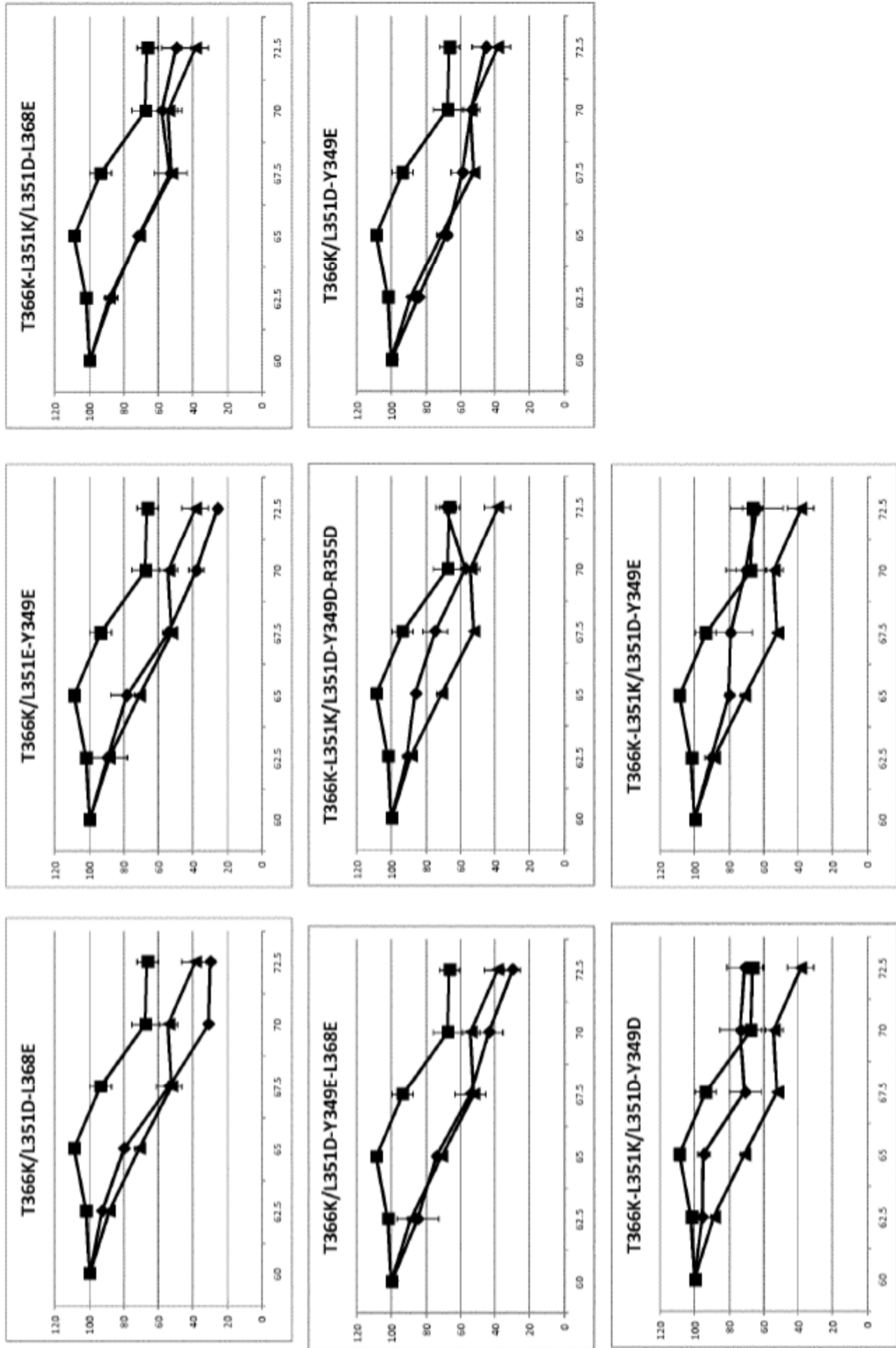


Figura 21:

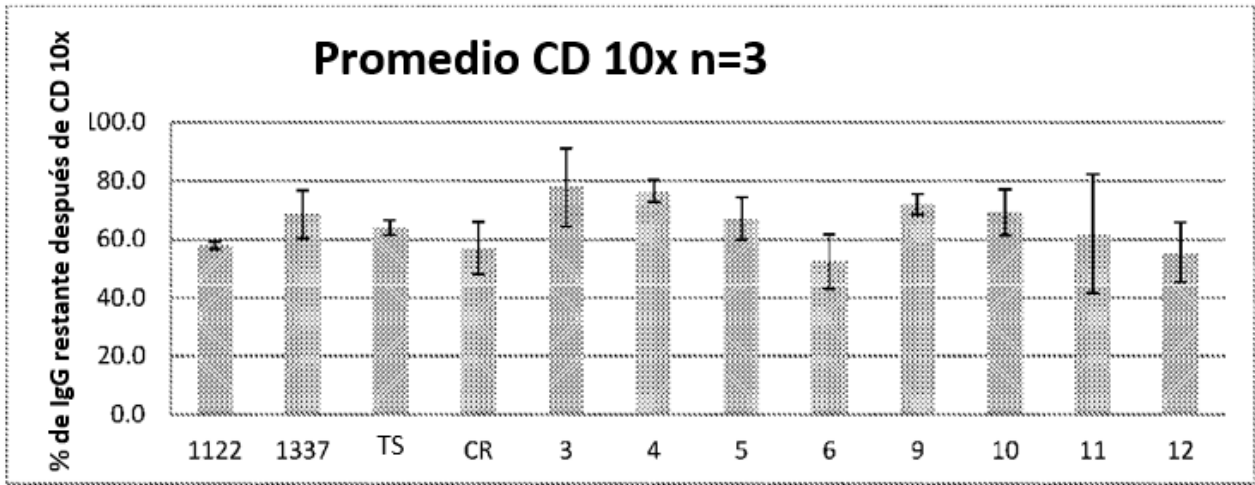
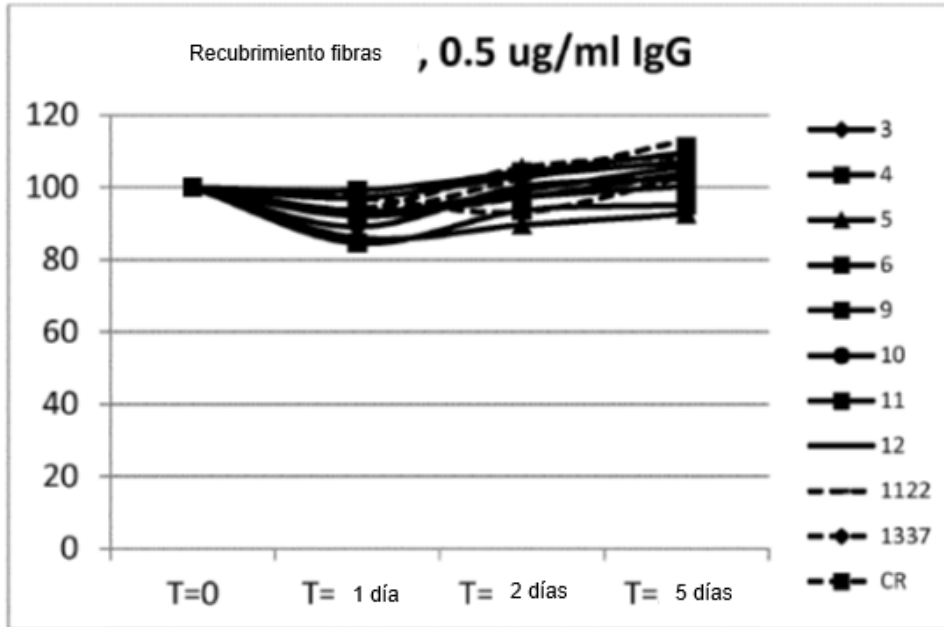


Figura 22:

A



B

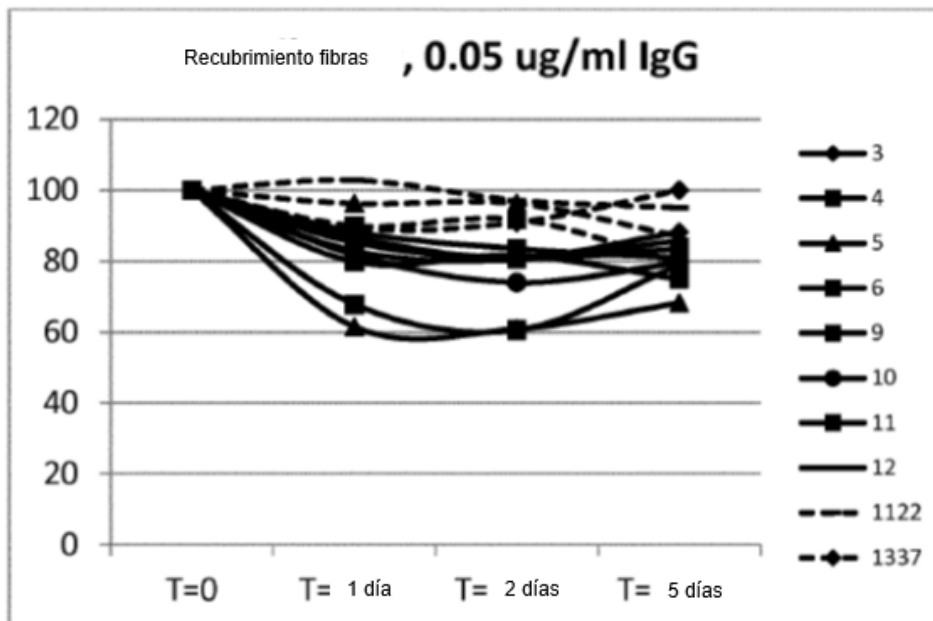


Figura 23:

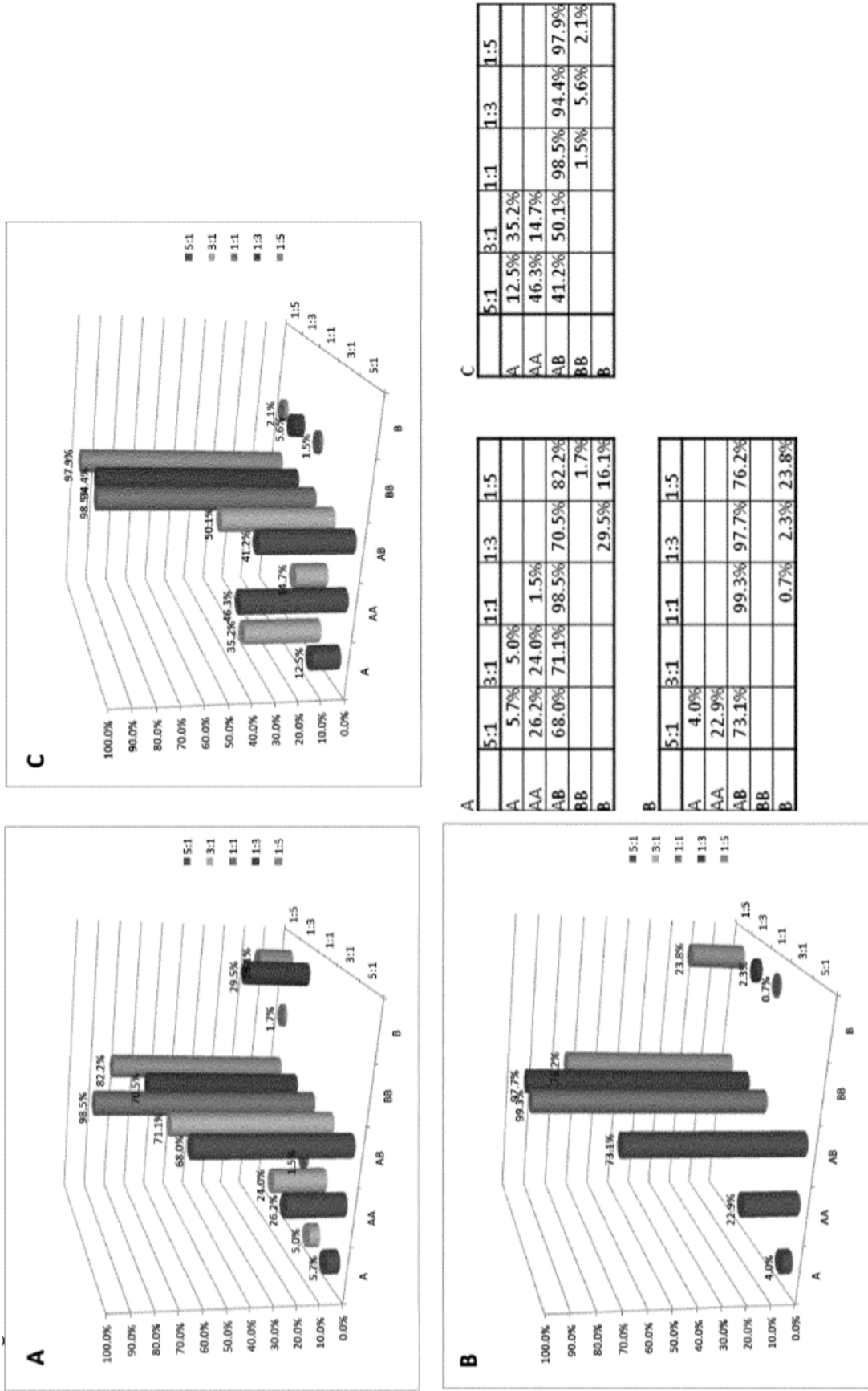


Figura 24:

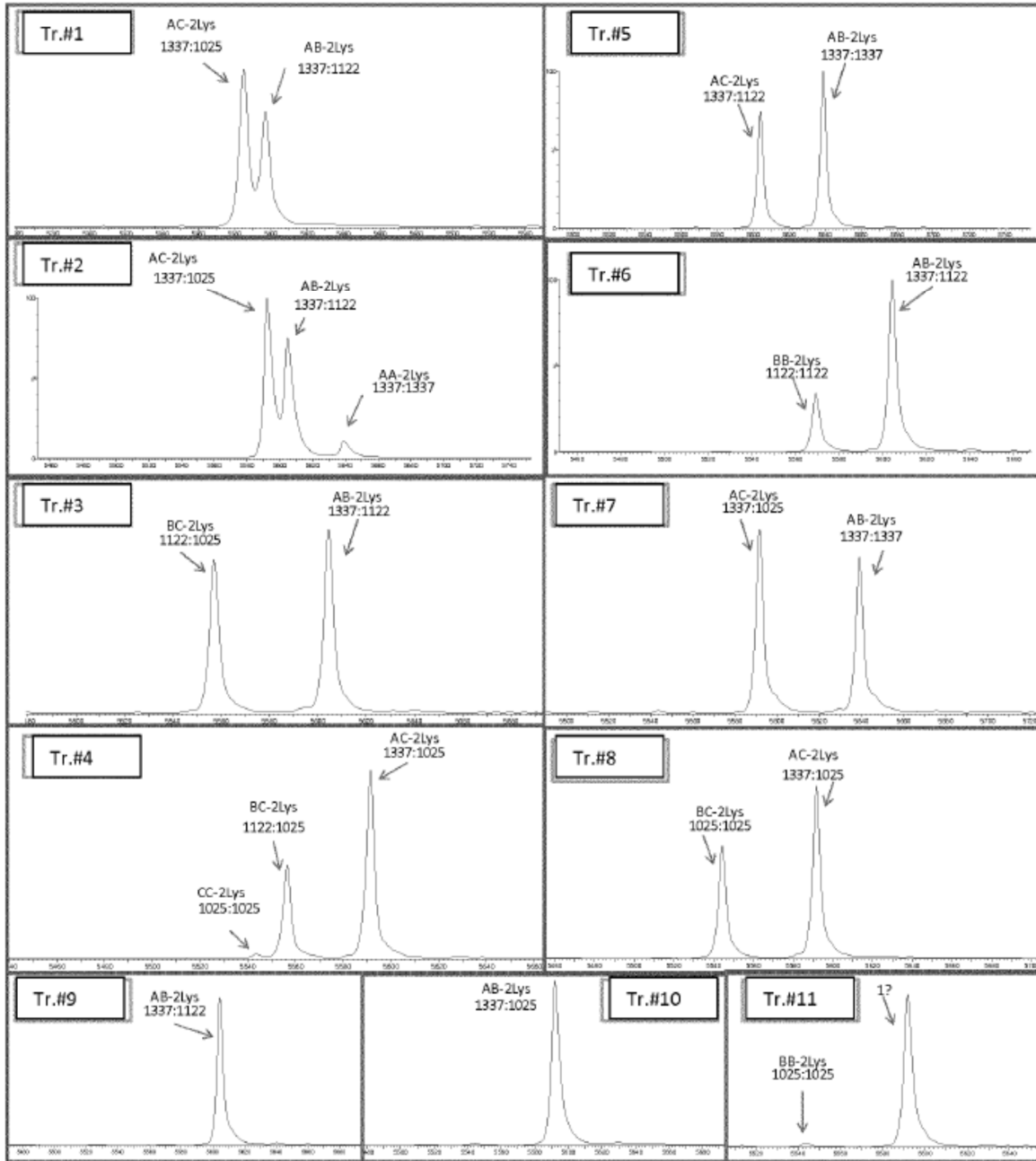


Figura 25:

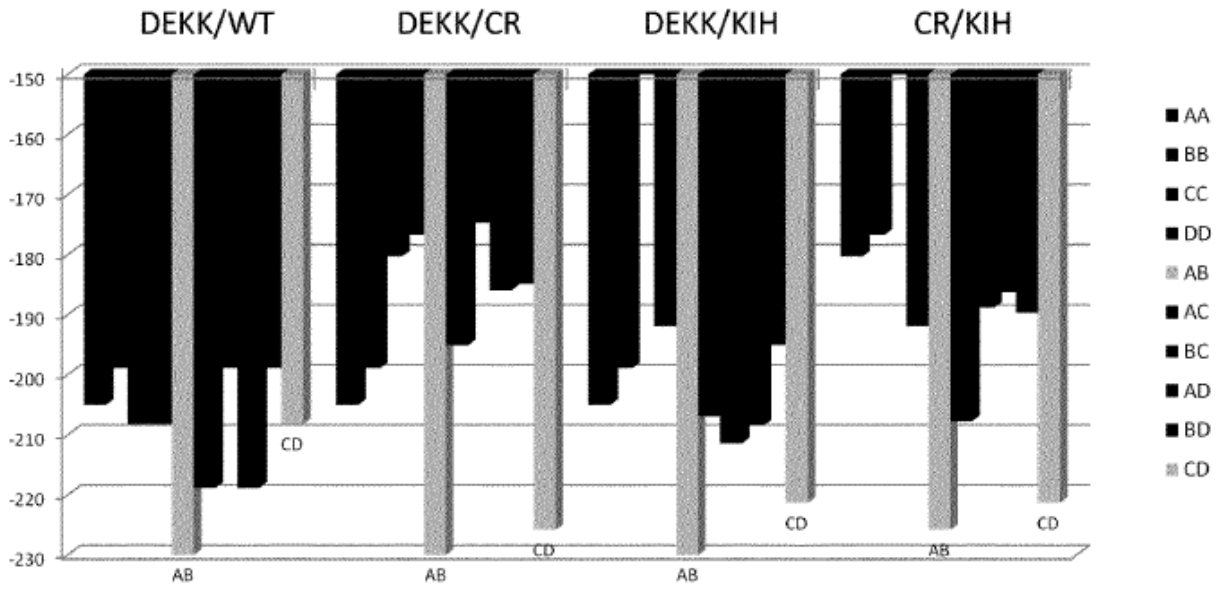


Figura 26:

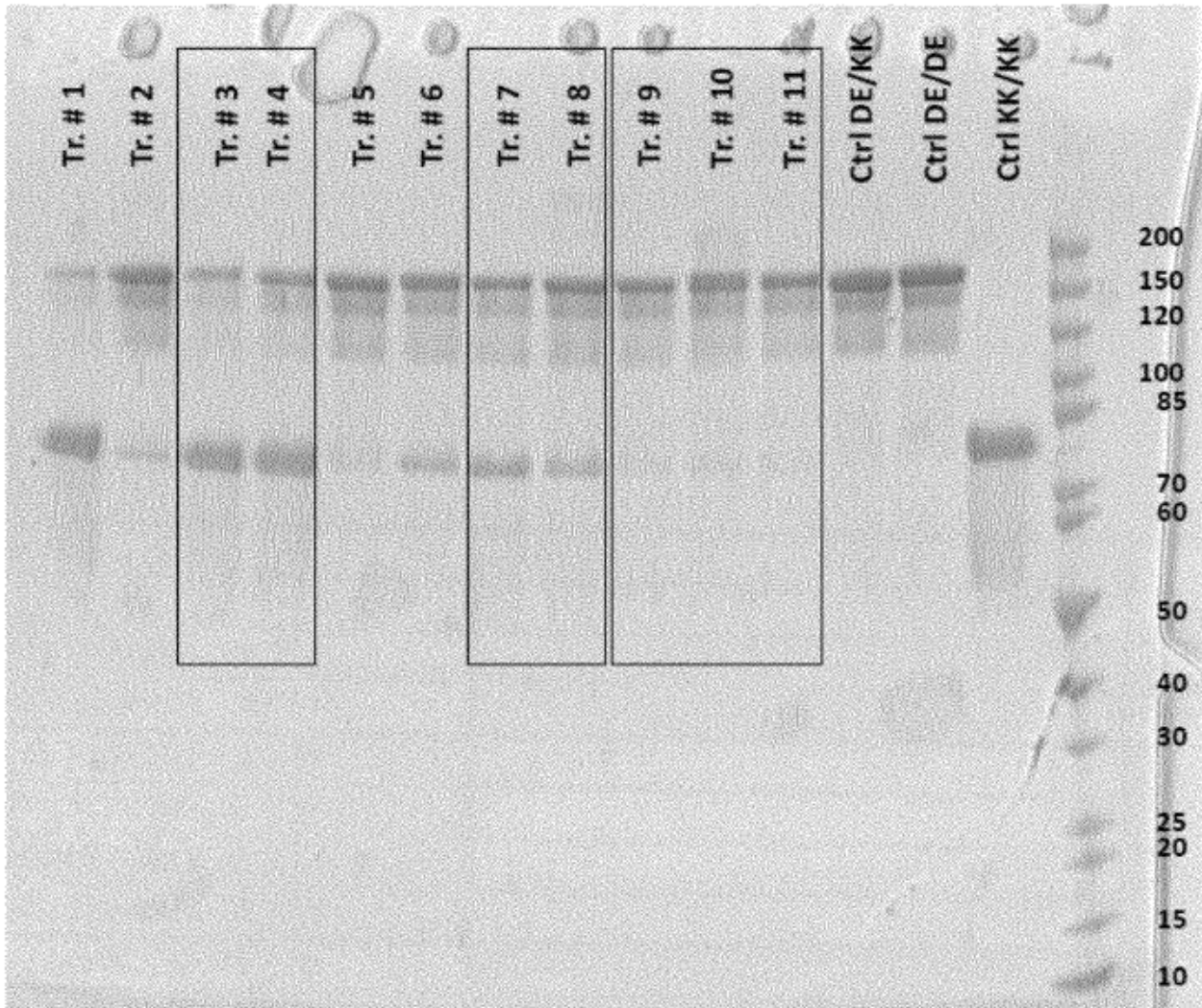


Figura 27A:

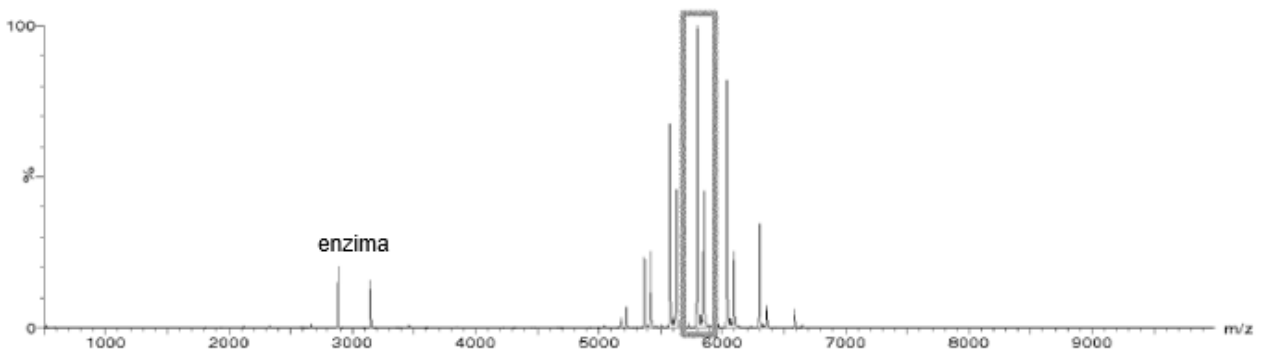
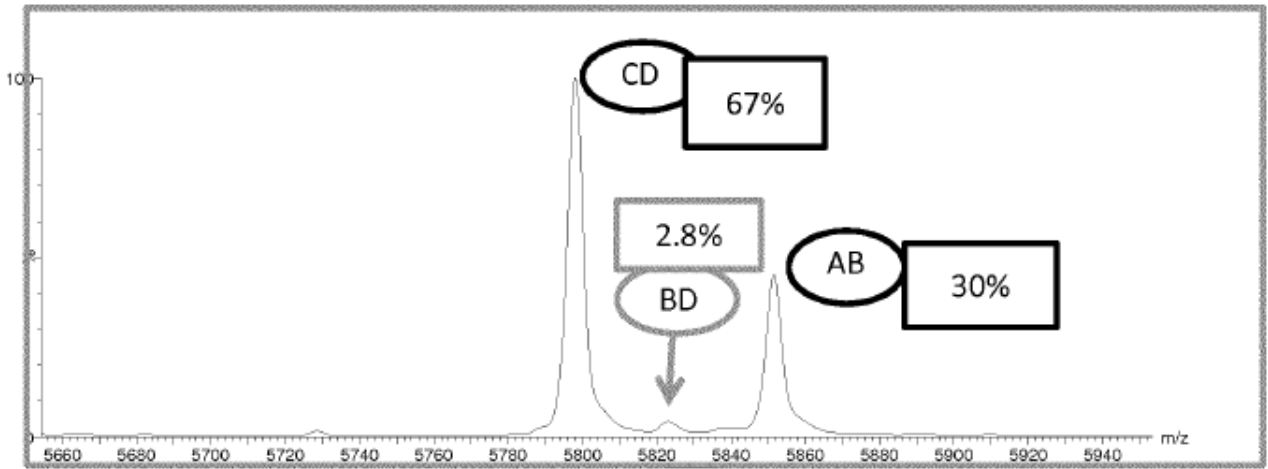


Figura 27B:

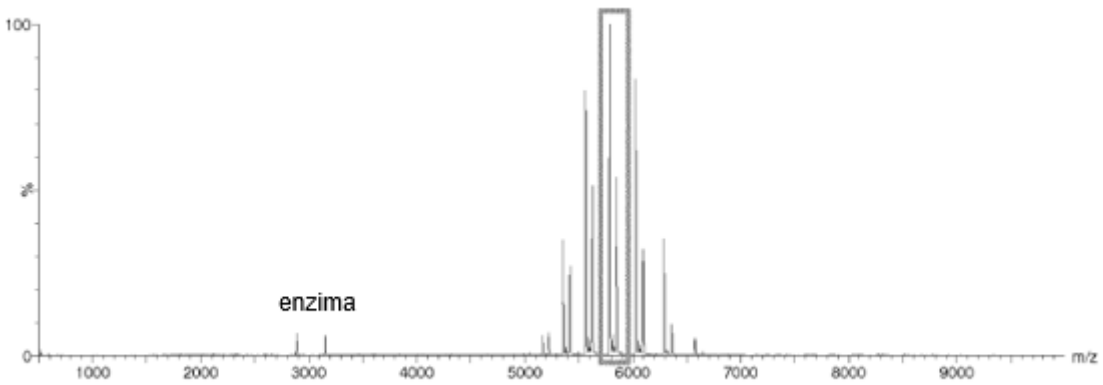
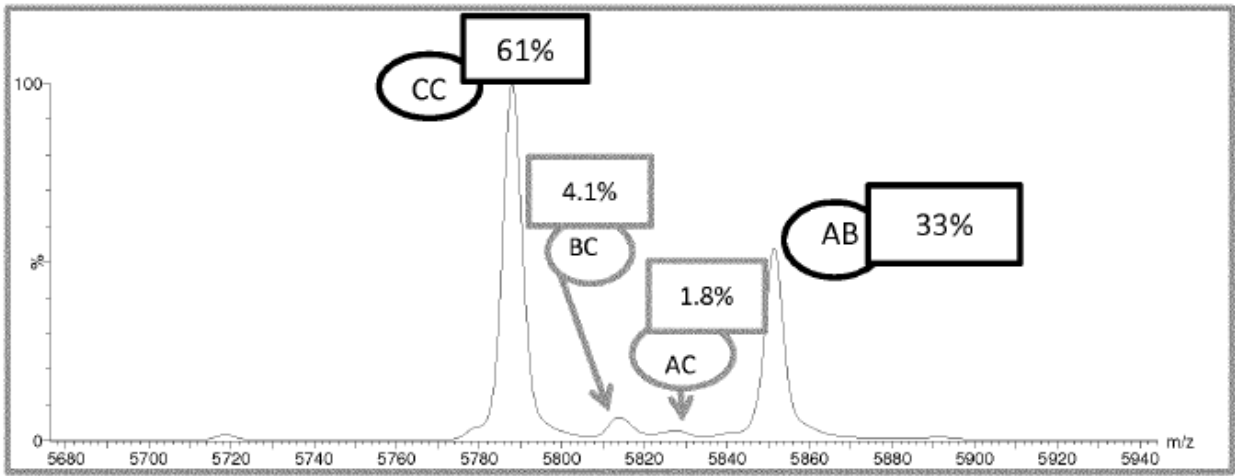


Figura 28:

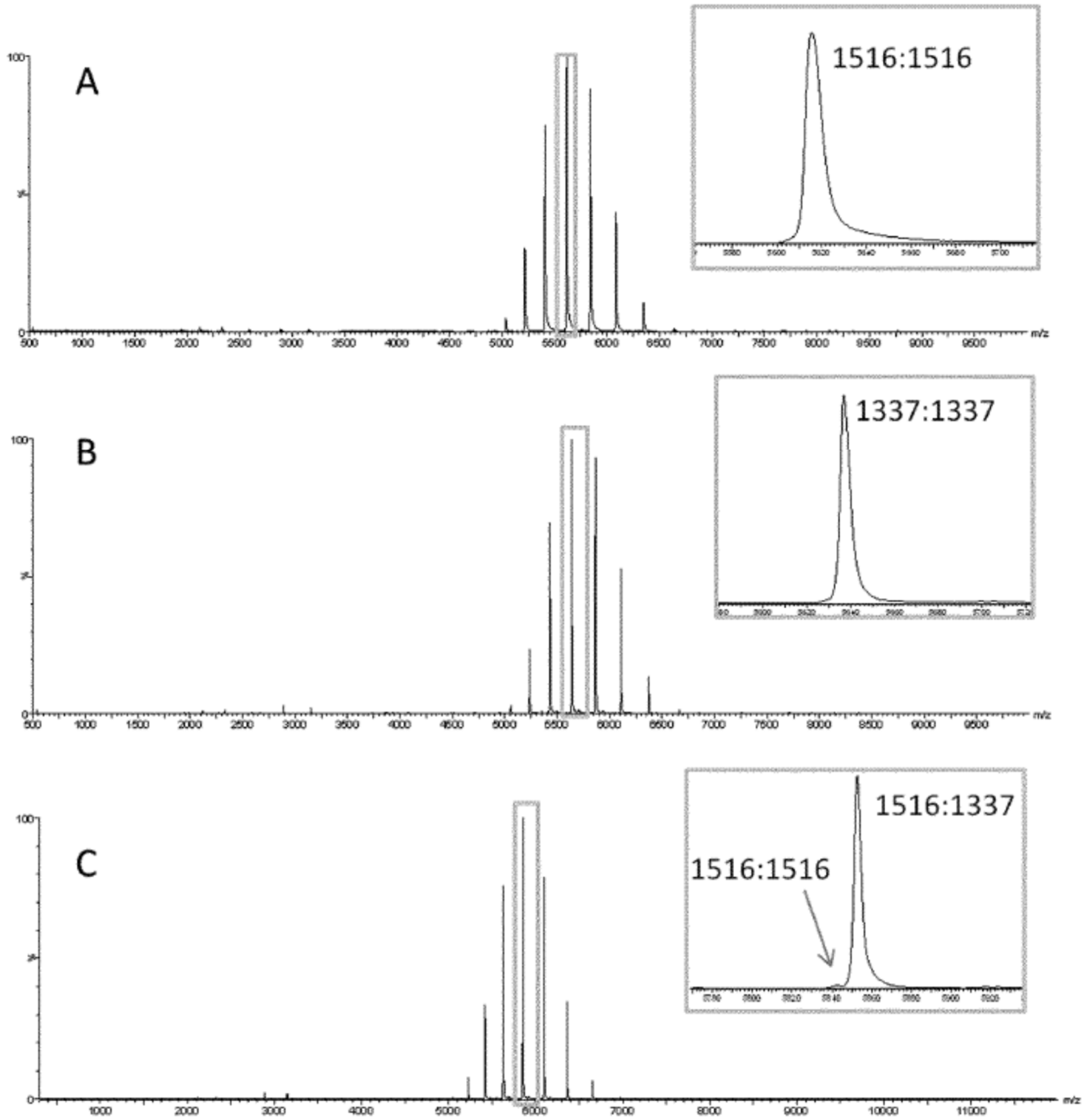


Figura 29:

