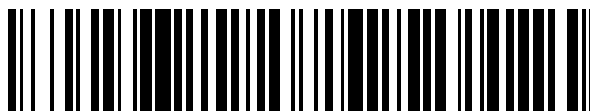


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 752 054**

51 Int. Cl.:

C12N 15/67 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.03.2016 PCT/EP2016/057147**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.10.2016 WO16156537**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2016 E 16715820 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2019 EP 3277821**

54 Título: **Método para optimizar el ensamble y producción de complejos de proteínas heteromultiméricas**

30 Prioridad:

31.03.2015 US 201562141009 P

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

02.04.2020

73 Titular/es:

**NOVIMMUNE SA (100.0%)
14 ch. des Aulx 1228 Plan-Les-Ouates
Geneva, CH**

72 Inventor/es:

**MAGISTRELLI, GIOVANNI;
MALINGE, PAULINE;
POITEVIN, YVES y
FISCHER, NICOLAS**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 752 054 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para optimizar el ensamble y producción de complejos de proteínas heteromultiméricas

5 Campo de la invención

Se proporcionan métodos para mejorar la expresión de complejos de proteínas al ajustar los niveles de expresión de cada componente requerido para el ensamble del complejo. Estos métodos son efectivos para limitar la expresión de la cadena dominante y, por lo tanto, equilibrar su abundancia relativa. Los métodos proporcionados en el presente documento conducen a un aumento significativo en la productividad y en los rendimientos biespecíficos finales tanto en sistemas de expresión transitoria como en células de mamífero transfectadas de forma estable.

Antecedentes de la invención

15 La expresión recombinante en células bacterianas, de levadura, de insectos, de plantas o de mamíferos es fundamental para la producción de proteínas que se utilizan para la investigación, así como para aplicaciones terapéuticas. Recientemente, el rendimiento de la expresión de proteínas recombinantes en células de ovario de hámster chino (CHO) se ha mejorado significativamente al optimizar múltiples parámetros, tal como la composición del medio de cultivo, los parámetros de fermentación, así como la optimización de las construcciones que se utilizan para impulsar la expresión del gen que codifica la proteína recombinante de interés.

25 Algunas proteínas están compuestas de varios polipéptidos que pueden asociarse en complejos que pueden estar unidos covalentemente o no covalentemente. Los anticuerpos son un ejemplo de dicha clase de proteínas, ya que están compuestos por cuatro polipéptidos (es decir, dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras) que están unidas por enlaces disulfuro. Debido a su importancia comercial y terapéutica, la expresión de anticuerpos en células CHO ha sido objeto de intensos esfuerzos de optimización, con el objetivo de maximizar la expresión de las dos cadenas que componen el anticuerpo. Sin embargo, se pueden observar grandes diferencias ya que los niveles de expresión pueden variar hasta 200 veces entre los anticuerpos.

30 El documento WO2012/023053 describe la producción de anticuerpos en células CHO, en la que el nivel de expresión de la cadena ligera se altera mediante el uso de diferentes elementos IRES. Meng Jia et al. MBIO, 5:5, pp. E1704-1714 (2014), explica que para el virus sincitial respiratorio (RSV), la expresión de los genes de virulencia NS1 y NS2 podría reducirse mediante la desoptimización del codón. A.D. Westwood et al. Biotechnology Progress, 26: 6, pp. 1558-1566 (2010) describe que la desoptimización de codones del gen marcador seleccionable dhfr de ratón se utilizó para aumentar la rigurosidad de la selección. Strutzenberger K et al. J. of Biotechnology, 69: 2-3, pp. 215-226 (1999) enseña que la expresión de una cadena ligera en una estirpe celular CHO recombinante, y con ella, la tasa de secreción del anticuerpo completo disminuye con el tiempo.

40 Los enfoques de optimización previos apuntaban a aumentar los niveles de expresión de polipéptidos para lograr mayores rendimientos de producción. En el caso de los complejos de proteínas compuestos por múltiples polipéptidos, la expresión desequilibrada puede limitar el ensamble de la molécula deseada, promover la producción de productos no deseados y limitar el rendimiento general de producción. De acuerdo con lo anterior, subsiste la necesidad de métodos para mejorar la expresión de complejos de proteínas.

45 Resumen de la invención

La invención se define por las reivindicaciones adjuntas. Los métodos de la divulgación mejoran la expresión de complejos de proteínas al ajustar los niveles de expresión de cada componente requerido para el ensamble del complejo. A diferencia de los enfoques descritos anteriormente, la reducción de la expresión de uno o varios polipéptidos en el complejo proteico mejora el ensamble y el rendimiento del complejo proteico. El método es particularmente adecuado para optimizar la expresión y el rendimiento de anticuerpos biespecíficos que a menudo se basan en la coexpresión de múltiples polipéptidos. La expresión desequilibrada (demasiado alta o demasiado baja) de uno de los componentes puede conducir a una disminución significativa del producto final deseado y a un aumento en la producción de productos secundarios no deseados. Esta limitación puede afectar tanto a los formatos biespecíficos de tipo IgG así como a los formatos basados en fragmentos de anticuerpos.

El método es en particular aplicable para la optimización de la expresión de anticuerpos biespecíficos denominados cuerpos $\kappa\lambda$ (Fischer et al., Exploiting light chains for the scalable generation and platform purification of native human bispecific IgG. Nat. Comms, 6: 6113 (2015)). Esta tecnología produce un anticuerpo biespecífico completamente humano (BsAb), compuesto por una cadena pesada común y dos cadenas ligeras diferentes (una kappa y una lambda) (véase, por ejemplo, el documento WO 2012/023053). Se introduce un vector tricistónico patentado que incluye estas tres cadenas en células de mamífero para producir los anticuerpos biespecíficos (cuerpos $\kappa\lambda$) que contienen una cadena κ y una λ además de los dos anticuerpos mono-específicos IgG κ e IgG λ .

65 En principio, si las dos cadenas ligeras se expresan a la misma tasa y se ensamblan de manera similar, la proporción para las tres moléculas debería ser 25% de IgG κ , 25% de IgG λ y 50% de IgG $\kappa\lambda$. Sin embargo, a veces se

observa un nivel de expresión desequilibrado de las dos cadenas, lo que conduce a una disminución en el rendimiento biespecífico. Una solución podría ser aumentar la expresión de la cadena menos expresada para restablecer el equilibrio. Sin embargo, este enfoque no ha tenido éxito (como se muestra en los ejemplos de trabajo proporcionados en este documento).

5 Por el contrario, los métodos de la divulgación son eficaces para limitar la expresión de la cadena dominante y, por lo tanto, equilibrar su abundancia relativa. Los métodos divulgados en este documento conducen a un aumento significativo en la productividad y en los rendimientos biespecíficos finales tanto en sistemas de expresión transitoria como en células CHO transfectadas de manera estable. Por lo tanto, la reducción de la expresión de uno o varios polipéptidos puede conducir a un aumento general de la productividad. Si bien los ejemplos proporcionados en el presente documento utilizan cuerpos $\kappa\lambda$, los métodos divulgados en este documento son aplicables a otros formatos de anticuerpos biespecíficos y a cualquier otro complejo de proteínas compuesto por varios polipéptidos diferentes.

15 En algunas realizaciones, la divulgación proporciona métodos para aumentar el rendimiento de producción de un complejo de proteínas compuesto de varios polipéptidos al reducir la tasa de expresión de uno o varios de los polipéptidos. En algunas realizaciones, la reducción en la expresión de uno de los polipéptidos se logra mediante la modificación de la tasa de transcripción, tasa de traducción, o estabilidad del ARNm. En algunas realizaciones, la reducción en la tasa de expresión de uno de los polipéptidos se logra mediante la modificación de la estructura secundaria del ARNm. En algunas realizaciones, la reducción en la expresión de uno de los polipéptidos se logra al modificar la tasa de transcripción, modificar la tasa de traducción, modificar la estabilidad del ARNm, modificar la estructura secundaria del ARNm o mediante una combinación de cualquiera de estos factores.

25 En algunas realizaciones, la reducción en la expresión de uno de los polipéptidos en el complejo de proteínas se logra al modificar la tasa de traducción. En algunas realizaciones, la reducción en la expresión de uno de los polipéptidos en el complejo de proteínas se logra al alterar la composición de codón de ese polipéptido. En algunas realizaciones, la reducción en la expresión de uno de los polipéptidos en el complejo de proteínas se logra al modificar la tasa de traducción y alterar la composición de codón de ese polipéptido.

30 En algunas realizaciones, la reducción en la expresión de uno de los polipéptidos en el complejo de proteínas se logra al modificar la tasa de traducción. En algunas realizaciones, la reducción en la expresión de uno de los polipéptidos en el complejo de proteínas se logra al alterar la composición de codón de ese polipéptido a través del reemplazo de ciertos codones con codones que se utilizan con menos frecuencia en la célula anfitriona que se utiliza para la expresión del complejo de proteínas. En algunas realizaciones, la reducción en la expresión de uno de los polipéptidos en el complejo de proteínas se logra al modificar la tasa de traducción, y alterar la composición de codón de ese polipéptido a través del reemplazo de ciertos codones con codones que se utilizan con menos frecuencia en la célula anfitriona que se utiliza para la expresión del complejo de proteínas.

40 En algunas realizaciones, la reducción en la expresión de uno de los polipéptidos en el complejo de proteínas se logra al modificar la tasa de traducción. En algunas realizaciones, la reducción en la expresión de uno de los polipéptidos en el complejo de proteínas se logra al alterar la composición de codón de ese polipéptido a través del reemplazo de ciertos codones con codones que se utilizan con menos frecuencia en una célula anfitriona de mamífero utilizada para la expresión del complejo de proteínas. En algunas realizaciones, la reducción en la expresión de uno de los polipéptidos en el complejo de proteínas se logra al modificar la tasa de traducción y alterar la composición de codón de ese polipéptido a través del reemplazo de ciertos codones con codones que se utilizan con menos frecuencia en una célula anfitriona de mamífero utilizada para la expresión del complejo de proteínas.

50 En algunas realizaciones, el complejo de proteínas es un anticuerpo multiespecífico. En algunas realizaciones, el complejo de proteínas es un anticuerpo biespecífico. En algunas realizaciones, el anticuerpo biespecífico se compone de dos cadenas ligeras diferentes y una cadena pesada común.

En algunas realizaciones, el anticuerpo biespecífico incluye una cadena ligera lambda humana y una cadena ligera kappa humana.

55 En algunas realizaciones, el anticuerpo biespecífico incluye una primera y la segunda regiones de unión a antígeno cada una comprende al menos una región determinante de complementariedad (CDR). En algunas realizaciones, la primera y la segunda regiones de unión a antígeno cada una comprende al menos dos CDR. En algunas realizaciones, las CDR son de una cadena pesada de inmunoglobulina. En algunas realizaciones, la cadena pesada es una cadena pesada humana. En algunas realizaciones, las CDR son de una cadena ligera lambda. En algunas realizaciones, las CDR son de una cadena ligera kappa.

60 En algunas realizaciones, la primera región de unión a antígeno comprende un primer dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina, y la segunda región de unión a antígeno comprende un segundo dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina.

65

- 5 En algunas realizaciones, el primer y el segundo dominios variables de la cadena pesada de inmunoglobulina comprenden independientemente una CDR humana, una CDR de ratón, una CDR de rata, una CDR de conejo, una CDR de mico, una CDR de mono, una CDR sintética, y/o una CDR humanizada En algunas realizaciones, la CDR es humana y está mutada somáticamente.
- 10 En algunas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos comprenden una región marco humana (FR). En algunas realizaciones, la FR humana es una FR humana mutada somáticamente.
- 15 En algunas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos se obtienen al cribar una biblioteca de fagos que comprende regiones variables de anticuerpos para la reactividad hacia un antígeno de interés.
- En algunas realizaciones, la primera y/o la segunda regiones de unión a antígeno de los anticuerpos biespecíficos se obtienen al inmunizar un animal no humano tal como un ratón, una rata, un conejo, un mico o un mono con un antígeno de interés e identificar una secuencia de ácido nucleico de región variable de anticuerpo que codifica una región variable específica para el antígeno de interés.
- 20 En algunas realizaciones, el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo biespecífico completamente humano y tiene una afinidad para cada epítipo, independientemente, en el rango micromolar, nanomolar o picomolar.
- 25 En algunas realizaciones, el anticuerpo biespecífico es no inmunogénico o sustancialmente no inmunogénico en un humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo biespecífico carece de un epítipo de células T humanas no nativas. En algunas realizaciones, la modificación de la región CH1 es no inmunogénica o sustancialmente no inmunogénica en un humano.
- 30 En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígeno comprende una cadena pesada, en la que la cadena pesada es no inmunogénica o sustancialmente no inmunogénica en un humano.
- 35 En algunas realizaciones, la cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos que no contiene un epítipo de células T no nativas. En algunas realizaciones, la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos cuya proteólisis no puede formar una secuencia de aminoácidos de aproximadamente 9 aminoácidos que es inmunogénica en un humano. En una realización específica, el humano es un ser humano tratado con la proteína de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos cuya proteólisis no puede formar una secuencia de aminoácidos de aproximadamente 13 a aproximadamente 17 aminoácidos que es inmunogénica en un humano. En una realización específica, el humano es un ser humano tratado con la proteína de unión a antígeno.
- 40 En algunas realizaciones, se coexpresa más de un complejo de proteínas. En algunas realizaciones, se coexpresa más de un anticuerpo.
- 45 Breve descripción de las figuras
- La Figura 1 es una ilustración que representa las mutaciones introducidas en la cadena ligera lambda para modular su expresión. VLCL2, secuencia de tipo silvestre; VLCL2_0, secuencia optimizada; VLCL2_1, VLCL2_2, VLCL2_3, secuencias con mayores niveles de desoptimización.
- 50 La Figura 2 es un gráfico que indica la concentración de anticuerpos IgG1 obtenidos en el sobrenadante de las células Peak productoras medidas con la tecnología OCTET.
- La Figura 3A es un gráfico del perfil de HIC de IgG total purificada.
- 55 La Figura 3B es un gráfico que muestra el porcentaje diferente de anticuerpo kappa mono específico, anticuerpo lambda mono específico e IgG biespecífica para las diferentes construcciones y que se derivaron de los perfiles de HIC.
- 60 La Figura 4 es un gel de poliacrilamida con enfoque isoeléctrico que muestra la expresión de anticuerpos monoclonales y biespecíficos después de la purificación por afinidad con resina CaptureSelect IgG Fc XL.
- La Figura 5 es una serie de gráficos que indican la productividad total de IgG para diferentes construcciones de varios grupos de células CHO.
- 65 La Figura 6A es una representación de imagen similar a gel de una serie de chips Agilent protein 80 que controla los tamaños de las cadenas pesadas y ligeras de la IgG purificada en condiciones reductoras y desnaturizantes.
- La Figura 6B es un gráfico que muestra la relación de las cadenas ligeras kappa y lambda totales para varios grupos de CHO para cada construcción.

La Figura 7 es una serie de gráficos que muestran la distribución en % para anticuerpos mono Kappa, mono Lambda y biespecíficos expresados por varios grupos de células CHO.

5 La Figura 8 es un gráfico que muestra los resultados de un ELISA que muestra la unión específica de cada brazo del anticuerpo biespecífico contra dos objetivos (hCD19 y hCD47), así como una proteína de control irrelevante (hIL6R).

Descripción detallada

10 La expresión recombinante en células bacterianas, de levadura, de insectos, de plantas o de mamíferos es fundamental para la producción de proteínas que se utilizan para la investigación, así como para aplicaciones terapéuticas. Recientemente, el rendimiento de la expresión de proteínas recombinantes en células de ovario de hámster chino se ha mejorado significativamente al optimizar múltiples parámetros, tales como la composición del medio de cultivo, los parámetros de fermentación, así como la optimización de las construcciones que se utilizan para impulsar la expresión del gen que codifica la proteína recombinante de interés. Estos incluyen las mejoras a niveles transcripcionales y traducciónles, así como las estructuras secundarias de ARNm y la estabilidad. Otro elemento importante es la optimización del uso de codones para que coincida con el anfitrión de expresión y evite la limitación debido a los ARNt de baja abundancia. El proceso de optimización también puede incluir la eliminación de repeticiones de secuencia, motivos asesinos y sitios de empalme y se evitan las estructuras secundarias de ARN estables. El uso de codones y el contenido de GC se pueden adaptar simultáneamente para la expresión en células CHO u otras células anfitrionas. El objetivo de dichas modificaciones es maximizar la traducción y la estabilidad del ARN para que la traducción y, por lo tanto, la expresión del polipéptido deseado sean máximas.

25 Algunas proteínas están compuestas de varios polipéptidos que pueden asociarse en complejos que pueden estar unidos covalentemente o no covalentemente. Los anticuerpos son un ejemplo de dicha clase de proteínas, ya que están compuestos por cuatro polipéptidos (es decir, dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras) que están unidas por enlaces disulfuro. Los anticuerpos tienen una especificidad única para un antígeno objetivo que es impulsado por la porción Fab, mientras que se pueden acoplar con el sistema inmunitario a través de su porción Fc. Una serie de terapias biológicas para el cáncer utilizadas actualmente son los anticuerpos monoclonales dirigidos contra los antígenos que se sobreexpresan por las células cancerosas objetivadas. Cuando dichos anticuerpos se unen a las células tumorales, se pueden desencadenar varios procesos, tales como la toxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Debido a su importancia comercial y terapéutica, la expresión de anticuerpos en células CHO ha sido objeto de intensos esfuerzos de optimización, con el objetivo de maximizar la expresión de las dos cadenas que componen el anticuerpo. Sin embargo, se pueden observar grandes diferencias ya que los niveles de expresión pueden variar hasta 200 veces entre los anticuerpos. El nivel de expresión está determinado por varios factores que incluyen el nivel de síntesis de la cadena ligera y la compatibilidad de la cadena ligera y pesada para el ensamble. Parece que la alta expresión de la cadena ligera es beneficiosa para las tasas de secreción generales de anticuerpos completos (Strutzenberger et al., *Changes during subclone development and ageing of human antibody-producing recombinant CHO cells*, *J. Biotechnol.*, vol. 69(2-3): 215-16 (1999)). De hecho, la reducción de la expresión de la cadena ligera conduce a la acumulación de la cadena pesada en el retículo endoplásmico y limita la productividad.

45 El direccionamiento o neutralización de una proteína única con un anticuerpo monoclonal no siempre es suficiente para lograr la eficacia y esto limita el uso terapéutico de los anticuerpos monoclonales. Cada vez está más claro que en una serie de enfermedades la neutralización de un componente de un sistema biológico no es suficiente para proporcionar un efecto beneficioso. Por lo tanto, se han desarrollado anticuerpos multispecíficos capaces de acoplar más de un antígeno, por ejemplo, anticuerpos biespecíficos. Se han descrito una gran cantidad de formatos de anticuerpos biespecíficos y hasta ahora se han aprobado dos anticuerpos biespecíficos, mientras que muchos otros se encuentran actualmente en ensayos clínicos (Kontermann RE, Brinkmann U., *Bispecific antibodies*, *Drug Discover Today*, (2015), disponible en [dx. doi.org/10.1016/j.drudis.2015.02.2008](https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.02.2008)). En muchos casos, el anticuerpo biespecífico está compuesto por más de dos polipéptidos. El ensamble correcto puede basarse en el emparejamiento aleatorio de las cadenas, lo que lleva a una mezcla de moléculas a partir de las cuales se puede purificar el anticuerpo biespecífico. Alternativamente, la interfaz de las cadenas se puede diseñar para que se pueda obtener preferiblemente el emparejamiento deseado. En cualquier caso, la coexpresión de múltiples cadenas implica una mayor complejidad y las tasas de expresión relativas y, por lo tanto, la abundancia de las cadenas que componen la molécula biespecífica puede tener potencialmente un impacto importante en el rendimiento general y la eficiencia en el ensamble.

60 Los enfoques de optimización previos apuntaban a aumentar los niveles de expresión de polipéptidos para lograr mayores rendimientos de producción. En el caso de los complejos de proteínas compuestos por múltiples polipéptidos, la expresión desequilibrada puede limitar el ensamble de la molécula deseada, promover la producción de productos no deseados y limitar el rendimiento de producción general.


65 Los métodos de la divulgación mejoran la expresión de complejos de proteínas al ajustar los niveles de expresión de cada componente requerido para el ensamble del complejo. Los métodos de la divulgación son efectivos para limitar la expresión de la cadena dominante y, por lo tanto, equilibrar su abundancia relativa. Los métodos divulgados en

este documento conducen a un aumento significativo en la productividad y en los rendimientos biespecíficos finales tanto en sistemas de expresión transitoria como en células CHO transfectadas de manera estable. Por lo tanto, la reducción de la expresión de uno o varios polipéptidos puede conducir a un aumento general de la productividad.

- 5 La Tabla 1 es una tabla que representa las construcciones generadas con diferentes niveles de optimización y desoptimización de secuencia.

Tabla 1

Clon	VKCK	VHCH	VLCL
44	WT	WT	WT
15	OPT	OPT	OPT
17	OPT	OPT	WT
3	OPT	OPT	Deopt_1
13	OPT	OPT	Deopt_2
19	OPT	OPT	Deopt_3



nivel de desoptimización

- 10 Las secuencias utilizadas se muestran a continuación en las Tablas 1.1, 1.2 y 1.3.

Tabla 1.1. Secuencias de VHCH WT (SEQ ID NO: 1) y VHCH OPT (SEQ ID NO: 2)

VHCH	1	ATGGAATGGAGCTGGGTCTTTCTTCTTCCTGTCAGTAACTACAGGTGT
VHCH OPT	1	ATGGAATGGTCTGCGGTGTTCTTCTTCCTGTCCGTGACCACCGGCGT
VHCH	51	CCACTCCGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTG
VHCH OPT	51	CCACTCCGAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTCCAGCCTG
VHCH	101	GGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCAGC
VHCH OPT	101	GAGGCTCCCTGAGACTGTCTTGCGCCGCTCCGGCTTCACCTTCTCCAGC
VHCH	151	TATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGT
VHCH OPT	151	TACGCCATGTCCTGGGTGCGACAGGCCCTGGCAAGGGACTGGAATGGGT
VHCH	201	CTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGA

ES 2 752 054 T3

(continuación)

VHCH OPT	201	GTCCGCCATCTCCGGCTCCGGCGGCTCTACCTACTACGCCGACTCCGTGA
VHCH	251	AGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTG
VHCH OPT	251	AGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGGACAACCTCCAAGAACACCCTGTACCTG
VHCH	301	CAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAA
VHCH OPT	301	CAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAA
VHCH	351	AAGTTATGGTGCTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTACAGTCT
VHCH OPT	351	GTCCTACGGCGCCTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACAGTGT
VHCH	401	CGAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCC
VHCH OPT	401	CCTCCGCCTCCACCAAGGGCCCATCCGTGTTCCCTCTGGCCCCCTCCAGC
VHCH	451	AAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTA
VHCH OPT	451	AAGTCCACCTCTGGCGGAACCGCTGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAAGACTA
VHCH	501	CTTCCCCGAACCGGTGACAGTCTCGTGGAACCTCAGGAGCCCTGACCAGCG
VHCH OPT	501	CTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAACCTCTGGCGCCCTGACCAGCG
VHCH	551	GCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTC
VHCH OPT	551	GAGTGACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCTCAGGCGCTGTACTCCCTG
VHCH	601	AGCAGCGTGGTACTGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACAT
VHCH OPT	601	TCCTCCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACAT
VHCH	651	CTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTG
VHCH OPT	651	CTGCAACGTGAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGG
VHCH	701	AGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCCGTGCCAGCACCT
VHCH OPT	701	AACCCAAGTCTGCGACAAGACCCACACCTGTCTCCCTGCCCTGCCCT
VHCH	751	GAACTCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGA
VHCH OPT	751	GAACTGCTGGGCGGACCCCTCCGTGTTTCTGTTCCCCCAAAGCCCAAGGA
VHCH	801	CACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACG
VHCH OPT	801	CACCCTGATGATCTCCCGGACCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACG
VHCH	851	TGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTG
VHCH OPT	851	TGTCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTG
VHCH	901	GAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC
VHCH OPT	901	GAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCAC
VHCH	951	GTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATG
VHCH OPT	951	CTATCGGGTGGTGTCTGTGCTGACCGTGTGCACCAGGACTGGCTGAACG
VHCH	1001	GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATC
VHCH OPT	1001	GCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCCTGCCTGCCCCCCATC
VHCH	1051	GAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTA
VHCH OPT	1051	GAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAACCCAGGTCTA
VHCH	1101	TACCCTGCCCCCATCTCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACGCTGA
VHCH OPT	1101	CACACTGCCACCTAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCTGA
VHCH	1151	CTTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG
VHCH OPT	1151	CCTGTCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAG
VHCH	1201	AGCAACGGGCAGCCGGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGA
VHCH OPT	1201	TCCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGA
VHCH	1251	CTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCCA
VHCH OPT	1251	CTCCGACGGCTCATTCTTCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCC
VHCH	1301	GGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG
VHCH OPT	1301	GGTGGCAGCAGGGGAACGTGTTCTCCTGCAGCGTATGCACGAGGCCCTG
VHCH	1351	CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA (SEQ ID NO:1)
VHCH OPT	1351	CACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCCCGGCTAA (SEQ ID NO:2)

Tabla 1.2. Secuencias VKCK WT (SEQ ID NO: 3) y VKCK OPT (SEQ ID NO: 4)

VKCK	1	ATGAGTGTGCCCACTCAGGTCCCTGGGGTTGCTGTGGCTTACAGATGCCAGATGTGACATCCAG/
VKCK OPT	1	ATGTCCGTGCCCAACCAGGTGCTGGGACTGCTGTGGCTGACCCGACGCCAGATCGGACATCCAG/
VKCK	71	TGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTACCATCACTTGGCCAGGCGAGTCT/
VKCK OPT	71	TGACCCAGAGCCCTCCAGCCCTGAGCCCTCCCTGGCGACAGAGTGACCCATCACCTGTCAAGCCCTCCCA
VKCK	141	GTCCATTAGTAGTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAAGCCCTAAAGCTCCTGATCTACGC`
VKCK OPT	141	GTCCATCTCCTCACCTGAACCTGGTATCAGCAGAAAGCCCGGCAAGCCCTAAGCTGCTGATCTACGGC
VKCK	211	GCATCCTCGTTGGAAACAGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGAAAGTGATCTGGACAGATTTTACTTTTC/
VKCK OPT	211	GCCTCCTCCCTGGAAACCCGGCGTGCCCTCCAGATTCTCCGGCTCCGGCTCTGGCACCCGACTTCACCTTCA
VKCK	281	CCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATA TTGCAACATA TTACTGT CAGCAGAAAGCACCCTCCGGGGCCGAC
VKCK OPT	281	CCATCTCAGCCTGCAGCCCCGAGGATATCGCCACCTACTACTGCCAGCAGAAAGCACCCTCGGGGGCCCTAC
VKCK	351	GACCTTCGGCCAAAGGACCAAGGTGAAATCAAAAGTACGTTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCG
VKCK OPT	351	AACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGAAATCAAGCGGACCGTGGCCCGCTCCCTCCCGTTCATCTTCCCC/
VKCK	421	CCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC TGCCTCTGTTGTGTGCCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAC
VKCK OPT	421	CCCTCCGACGAGCAGCTGAAAGTCCGGCACCCGCCAGCGTGTGTGCCCTGTGAACAACCTTACCCACGGCC
VKCK	491	AGGCCAAAGTACAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTCCAAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCA
VKCK OPT	491	AGGCCAAAGGTGCAGTGGAAAGTGGACAAAGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAAGGAATCCGTCAACCGAGC/
VKCK	561	GGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCCTCAGCAGCACCCCTGACCGTGAGCAAAAGCAGACTACGAGAAACAC
VKCK OPT	561	GGACTCCAAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCTCCACCCCTGACCCTGTCAAGGGCCGACTACGAGAAGCAC
VKCK	631	AAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCAACCCATCAGGGCCCTGAGCTCGCCCCGTACAAAAGAGCTTCAACAGGGGAC
VKCK OPT	631	AAGGTGTACGCCCTGCGAAGTGAACCCAGGGCCCTGTCCAGCCCCCTGACCAAGTCCCTTCAACCGGGGGCC
VKCK	701	AGTGTTAA (SEQ ID NO: 3)
VKCK OPT	701	AGTGCTAA (SEQ ID NO: 4)

Tabla 1.3. Secuencias para VLCL2 WT (SEQ ID NO: 5, mostrada en la fila1 de la alineación), VLCL2 OPT (SEQ ID NO: 6, mostrada en la fina 2 de la alineación), VLCL2 DEOPT_1 (SEQ ID NO: 7, mostrada en la fila 3 de la alineación), VLCL2 DEOPT_2 (SEQ ID NO: 8 mostrada en la fila 4 de la alineación), y VLCL2 DEOPT_3 (SEQ ID NO: 9, mostrada en la fila 5 de la alineación)

VLCL2	1	ATGAGTGTGCCCACACTCAGGTCCCTGGGGTTGCTGTGCTGTGGCTTACAGATGCCAGATGCAATTTT/ TGCTGACTCAGCCCCACTCTGTG
VLCL2OPT	1	ATGTCCGTGCCTACCCAGGTGCTGGCCTGCTGTGGCTGACCCGACGCCCGGTGCAACTTC ATGCTGACCCAGCCCCACTCCGTG
VLCL2DEOPT_1	1	ATGTCCGTGCCTACCCAGGTCTTAGGCCCTTCTGCTGCTGTTGACAGACGCCCGGTGCAACTTC/ TGCTGACTCAGCCCCACAGTGT
VLCL2DEOPT_2	1	ATGAGTGTACCGACTCAAGTACTTGGGCTTCTTCTTGGCTTACCGACGCACGTTGCAACTTCA/ GCTTACTCAACCCGACTCAGTA
VLCL2DEOPT_3	1	ATGTGGTTCCGACGCAAGTATTAGGGCTCCTATTACTATGGTTAACGGACGCGCCTTGCAACTTCAT GTTAACGCAACCGCATTCGGTA
VLCL2	91	TGGAGTCTCCGGGGAAGACGGTAAACCATCTCCTGCACCCCGCAGCAGTGGCTCTATCGAAGATAAG/ ATGTGCAGTGGTACCAGCAGCGC
VLCL2OPT.	91	TCCGAGTCCCAGGCAAGACCCGTGACCATCTCCTGCACCCCGTCCCTCCGGCTCCATCGAGGACAA/ TACGTGCAGTGGTATCAGCAGCGG
VLCL2DEOPT_1	91	AGCGAGTCTCCGGGAAAGACCCGTGACAACTCTCTGTACTAGATCCTCTGGGAGCATTGAGGACAAA/ ACGTACAGTGGTATCAGCAAAGG
VLCL2DEOPT_2	91	TCAGAGTCAACGGGAAACTGTAAACCATATCATGCACTCGTAGCAGTGGGAGCATAGAGGACAAA/ ACGTCCAATGGTATCAACAACGT
VLCL2DEOPT_3	91	TCGGAATCGCCGGGAAACGGTTACGATATCGTGTACGCGTTCGTCGGGCTCGATAGAGGACAAA/ ACGTCCAATGGTATCAACAACGT
VLCL2	181	CCGGGCAGTCCCCACCATTGTGATCTATTATGATAACGAAAGACCCCTCTGGGGTCCCCTGATCGGT TCTCTGGCTCCATCGACAGCTCC
VLCL2 OPT.	181	CCTGGCTCCTCCCTACCATCGTGTACTACGACAACGAGCGGCCCTCCGGCGGTGCCCGACCCGC TTCTGTGGCTCTATCGACTCCTCC
VLCL2DEOPT_1	181	CCCGGTAGTTCGCCAACCCATCGTGATATATTACGATAATGAACGCCCTTCCGGCGTCCCAGATCGTT/ TTCAGGATCTATTGACTCCAGT
VLCL2DEOPT_2	181	CCGGGTCAATCACCCACCATAGTCAATATATTACGACAACGAAACGTCCTCCGTACCCGGATCGT/ TCTCAGGTTCAATAGACTCATCA
VLCL2DEOPT_3	181	CCGGGTCTGCGCCGACGATAGTCAATATATTACGATAACGAAACGTCCTCCGTCCGGGTGACCCGGATCGT/ TTTCGGGTTCAATAGATTCTGTCG
VLCL2	271	TCCAACTCTGCCTCCCTACCCATCTCTGGACTGAAGACTGAGGACGAGGCTGACTA(FACTGTGTCAGA CCTACGACCAGAGCCTGTATGGT
CL2OPT.	271	TCCAACTCCGCCTCCCTGACCCATCAGCGGCCCTGAAAACCCGAGGACGAGGCCGACTACTACTGCCAC ACCTACGACCAGTCCCTGTACCGC

(continuación)

VLC12DEOPT_1 271 AGCAACTGTCTTCACTAACGATCAGCGGGCTCAAGACA GAGGACGAAGCAGATTACTACTGCC.
GA CCTACGATCAATCCCTGTATGGC

VLC12DEOPT_2 271 AGCAACAGCGCCTCACTACCATATCAGGGCTTAAAAACCGAGGACGAAGCCGACTACTATTGCCA
AA CTTACGACCAAAAGCCTCTACGGA

VLC12DEOPT_3 271 TCGAACTCGCGAGTCTAACGATATCGGGCTAAAAACGGAAAGATGAGGCGGACTATTACTGCI
AAA CGTACGACCAATCGCTACGGA

VLC12 361 TGGGTGTTCCGGCGGAGGACCAAGCTGACCGTCCCTAGGTGAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGT
ACT CTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAG

VLC12OPT. 361 TGGGTGTTCCGGCGGAGGACCAAGCTGACCGTCCCTAGGTGAGCCCAAGGCTGCCCTCCCTCCGT
ACC CTGTTCCCTCCATCCTCCGAGGAA

VLC12DEOPT_1 361 TGGGTGTTCCGGTGGCGGAAGCTGACCGTCCCTAGGTCAACCCCAAGCCCGTCTCTTCTGTTA
TT TGTTTTCCCAAGTAGCGAGGAA

VLC12DEOPT_2 361 TGGGTATTCGGGGTGGTACAAAACTTACTGTCTAGGTCAACCCGAAAGCAGCACCCGTCAGTAC
AC TTTTCCGCCGTCATCAGAGGAA

VLC12DEOPT_3 361 TGGGTATTCGGTGGTGAACGANAACCTAACGGTCCCTAGGTCAACCCGAAAGCCGACCCGTCGGTT.
CG CTATTTCCGCCGTCGCGAAGAA

VLC12 451 CTTCAAGCCAAACGAGCCACACTGGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAG
GG CTTGGAAGCAGATAGCAGCCCC

VLC12OPT. 451 CTGAGGCCAAACGAGCCACCCCTGGTCTGCCTGATCTCCG/CTTCTACCCCTGGCGCCGTGACCG
TG GCCTGGAAGCCGACAGCTCTCCT

VLC12DEOPT_1 451 CTTCAGGCCAAACGAGCCACACTCGTGTCTGATCTCCGACTTCTATCCTGGGGGTTACCG
GG CCTGGAAA GCTGATAGCTCTCCA

VLC12DEOPT_2 451 CTCCAAGCAAACAAGCAACCCCTCGTATGCCTCATATCAGACTTCTATCCGGGGGCGAGTAACCG
AG CATGGAAA GCGAGATTCATCACCG

VLC12DEOPT_3 451 TTACAAGCGAACAAGCGACCGTCTGCTGCCTCATATCGGATTTTATCCGGGTGCAGTAACGGT
AG CGTGGAAA GCGGATTCGTCGCCG

VLC12 541 GTC AAGCGGGAGTGGAGACCACCCACCCCTCCAAAACAAGCAACAACAGTACGCGGCCAGC.
GC TATCTGAGCCTGACGCC TGAGCAG

VLC12OPT. 541 GTGAAGCCGGCGTGGAAAACCAACCACCCCTTCCAAGCAGTCCAACAACAATAACGCGCCCTCC
CCT ACCGTCCCTGACCCCTGAGCAG

VLC12DEOPT_1 541 GTAAAGCAGCGCTGAGACAACCACTCCCTCAAAGCAGTCCAACAACAATAACGCGCTTCG.
GCT ATCTGTCTTTGACGCCTGAACAG

VLC12DEOPT_2 541 GTC A AAGCAGGGGTAGAAAACCTACCACCCCTCAAAGCAGCAACAACAATAACGCAAGC
CAT ACCTCAGCCTTACCCCGGAACAA

VLC12DEOPT_3 541 GTC A AAGCGGGGTGAGAAAACGACGCGCCGTCGAAAGCAATCGAACAACAATAATGCGGGCTCG
CAT ACCTATCGCTAACCGCCGGAACAA

(continuación)

VLCL2	631	TGGAAGTCCCACAGAAAGCTACAGCTGCCAGGTCCAGCATGAAGGGAGCACCCGTGGAGAAGACAGTCCGCCCCTACAGAAATGTTCAATAA
CL2OPT	631	TGGAAGTCCCACCCGGTCCCTACAGCTGCCAGGTCCAGGTCCACACACGAGGGCTCCACCCGTGGAAAAAGACCCGTCGCCCTACCCGAGTGCTCCTAA
VLCL2DEOPT_1	631	TGGAAGAGTCA TCGAAGCTACTCATGCCAAAGTGACCCACGAGGGATCTACAGTCGAGAAAAACCCGTGCCTCCAACTGAGTGTTCC.TAA
VLCL2DEOPT_2	631	TGGAATCACACCCGTAGCTACTCATGCCAAAGTAACCCACGAAAGGGTCAACCCGTAGAAAAAACTGTACCACCGACCCGAGTGCAGCTAA
VLCL2DEOPT_3	631	TGGAATCGCATCGTTCGTATTGGTGCCAAAGTAACGCATGAAGGGTCGACGGTAGAAAAAACCCGGTAGCGCCGACGGAAATGTTTCGTAA

La tabla 2 es una tabla que muestra los siguientes datos para cada construcción: IgG total y cantidad de anticuerpos biespecíficos después de la purificación, así como la relación de biespecíficos determinada por HIC.

5 Tabla 2

Clon	VKCK 5a3M3	VHCH ficticio	VLCL C2	Cantidad de IgG total (µg)	Cantidad de κλ- cuerpo™ (µg)	% de κλ-cuerpo™ (µg) por HIC
44	WT	WT	WT	1467	272	21.60
15	OPT	OPT	OPT	1160	120	14.43
17	OPT	OPT	WT	1430	292	29.41
3	OPT	OPT	Deopt_1	1463	442	38.14
13	OPT	OPT	Deopt_2	1458	444	42.93
19	OPT	OPT	Deopt_3	1000	310	39.69

La Tabla 3 representa la productividad total de IgG, el % biespecífico por HIC después de la purificación de proteína A, y la cantidad de biespecífico purificado del sobrenadante de cultivo celular CHO para grupos representativos para cada construcción.

10

Tabla 3

Nombre	Productividad (IgG total en supernadante mg/mL)	% de HIC Bi Post PA	Bi purificado mg/mL de cultivo
44	0.8	34.7	0.28
15	0.8	18.1	0.13
17	1.3	17.5	0.29
3	1.2	39.9	0.43
13	1.9	38.5	0.69
19-	1.6	20.9	0.45

Los polinucleótidos y las construcciones de los mismos utilizados en los métodos proporcionados en el presente documento pueden generarse sintéticamente mediante una serie de diferentes protocolos conocidos por los expertos en la materia. Las construcciones de polinucleótidos apropiadas se purifican utilizando técnicas estándar de ADN recombinante como se describe en, por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., (1989) Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, y en virtud de las regulaciones actuales en el Departamento de Estados Unidos del HHS, Directrices del Instituto Nacional de Salud (NIH) para la investigación del ADN recombinante.

15

20

También se proporcionan en este documento construcciones que comprenden los ácidos nucleicos descritos insertados en un vector, en los que dichas construcciones se pueden utilizar para una serie de aplicaciones de exploración diferentes como se describe con mayor detalle a continuación. En algunas realizaciones, un solo vector (por ejemplo, un plásmido) contendrá una secuencia codificante de ácidos nucleicos para un armazón de presentación de péptido único. En otras realizaciones, un solo vector (por ejemplo, un plásmido) contendrá una secuencia codificante de ácidos nucleicos para dos o más andamios de presentación de péptidos.

25

Se pueden preparar y utilizar vectores virales y no virales, que incluyen los plásmidos, que proporcionan la replicación del ADN que codifica el biosensor y/o la expresión en una célula anfitriona. La elección del vector dependerá del tipo de célula en la que se desea la propagación y el propósito de la propagación. Algunos vectores son útiles para amplificar y hacer grandes cantidades de la secuencia de ADN deseada. Otros vectores son adecuados para la expresión en células en cultivo. Todavía otros vectores son adecuados para la transformación y expresión en células en un animal o persona completo. La elección del vector apropiado está dentro de la habilidad de la técnica. Muchos de estos vectores están disponibles comercialmente. Para preparar las construcciones, el polinucleótido parcial o de longitud completa se inserta en un vector normalmente por medio de unión de ligasa de ADN a un sitio de enzima de restricción dividido en el vector. Alternativamente, la secuencia de nucleótidos deseada se puede insertar por recombinación homóloga in vivo. Normalmente, esto se logra uniendo regiones de homología al vector en los flancos de la secuencia de nucleótidos deseada. Las regiones de homología se agregan mediante ligamiento de oligonucleótidos, o mediante reacción en cadena de la polimerasa utilizando cebadores que comprenden tanto la región de homología como una porción de la secuencia de nucleótidos deseada, por ejemplo.

35

40

También se proporcionan casetes de expresión o sistemas que encuentran uso, entre otras aplicaciones, en la síntesis de los andamios de presentación de péptidos. Para la expresión, el producto génico codificado por un polinucleótido de la divulgación se expresa en cualquier sistema de expresión conveniente, que incluye, por ejemplo, sistemas bacterianos, de levadura, de insectos, anfibios y mamíferos. Los vectores adecuados y las células anfitrionas se describen en la Patente de los Estados Unidos No. 5,654,173. En el vector de expresión, un polinucleótido se une a una secuencia reguladora según sea apropiado para obtener las propiedades de expresión deseadas. Estas secuencias reguladoras pueden incluir promotores (unidos en el extremo 5' de la cadena sentido o

45

en el extremo 3' de la cadena antisentido), potenciadores, terminadores, operadores, represores e inductores. Los promotores pueden ser regulados o constitutivos. En algunas situaciones, puede ser deseable utilizar promotores condicionalmente activos, tales como promotores específicos del tejido o específicos de la etapa de desarrollo. Estos están ligados a la secuencia de nucleótidos deseada utilizando las técnicas descritas anteriormente para la unión a vectores. Se puede utilizar cualquier técnica conocida en la materia. En otras palabras, el vector de expresión proporcionará una región de inicio transcripcional y traduccional, que puede ser inducible o constitutiva, en la que la región codificante está operativamente ligada bajo el control transcripcional de la región de inicio transcripcional, y una región de terminación transcripcional y traduccional. Estas regiones de control pueden ser nativas de la especie de la que se obtiene el ácido nucleico, o pueden derivarse de fuentes exógenas.

Los promotores eucariotas adecuados para uso incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: el promotor de la secuencia del gen de la metalotioneína I de ratón (Hamer et al., J. Mol. Appl. Gen. 1: 273-288, 1982); el promotor TK del virus del herpes (McKnight, Cell 31: 355-365, 1982); el promotor temprano SV40 (Benoist et al., Nature (Londres) 290: 304-310, 1981); el promotor de la secuencia del gen gall de levadura (Johnston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79: 6971-6975, 1982); Silver et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 81: 5951-5955, 1984), el promotor CMV, el promotor EF-1, el promotor o los promotores sensibles a ecdisona, el promotor sensible a la tetraciclina y similares.

Adicionalmente, los promotores pueden ser, constitutivos o regulables. Los elementos inducibles son elementos de secuencia de ADN que actúan en conjunción con los promotores y pueden unirse a represores (por ejemplo, sistema represor lacO/LAC Iq en *E. coli*) o inductores (por ejemplo, sistema inductor gall/GAL4 en levadura). En dichos casos, la transcripción está virtualmente "inactiva" hasta que el promotor se despresurice o se induzca, momento en el cual la transcripción se "activa".

Los vectores de expresión generalmente tienen sitios de restricción convenientes ubicados cerca de la secuencia promotora para proporcionar la inserción de secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas heterólogas. Puede estar presente un marcador seleccionable operativo en el anfitrión de expresión. Los vectores de expresión se pueden utilizar, entre otras cosas, para los métodos de cribado descritos con mayor detalle a continuación.

Se pueden preparar casetes de expresión que comprenden una región de inicio de la transcripción, el gen o fragmento del mismo, y una región de terminación de la transcripción. Después de la introducción del ADN, las células que contienen la construcción se pueden seleccionar mediante un marcador seleccionable, las células se expanden y luego se utilizan para la expresión.

Los sistemas de expresión descritos anteriormente pueden emplearse con procariontes o eucariotas de acuerdo con formas convencionales, dependiendo del propósito de la expresión. En algunas realizaciones, un organismo unicelular, tales como *E. coli*, *B. subtilis*, *S. cerevisiae*, células de insecto en combinación con vectores de baculovirus, o células de un organismo superior como vertebrados, por ejemplo, células COS 7, HEK 293, CHO, Oocitos de *Xenopus*, etc., se pueden utilizar como células anfitrionas de expresión. En otras situaciones, es deseable utilizar células eucariotas, en las que la proteína expresada se beneficiará del plegamiento nativo y las modificaciones postraduccionales.

Los sistemas de expresión específicos de interés incluyen sistemas de expresión derivados de células bacterianas, levaduras, células de insectos y células de mamíferos. Los sistemas de expresión en bacterias incluyen aquellos descritos en Chang et al., Nature (1978) 275:615; Goeddel et al., Nature (1979) 281:544; Goeddel et al., Nucleic Acids Res. (1980) 8:4057; EP 0 036,776; Patente de Estados Unidos No. 4,551,433; DeBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1983) 80:21-25; y Siebenlist et al., Cell (1980) 20:269.

La expresión en mamíferos se realiza como se describe en Dijkema et al., EMBO J. (1985) 4:761, Gorman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1982) 79:6777, Boshart et al., Cell (1985) 41:521 y Patente de Estados Unidos No. 4,399,216. Otras características de la expresión de mamíferos se facilitan como se describe en Ham and Wallace, Meth. Enz. (1979) 58:44, Barnes and Sato, Anal. Biochem. (1980) 102:255, Patentes de Estados Unidos Nos. 4,767,704, 4,657,866, 4,927,762, 4,560,655, WO 90/103430, WO 87/00195, y U.S. RE 30,985.

Como lo apreciarán aquellos expertos en la técnica, el tipo de células anfitrionas adecuadas para su uso puede variar ampliamente. En algunas realizaciones, la célula es una célula bacteriana, una célula de levadura o una célula de mamífero. En algunas realizaciones, la entidad biológica es una célula bacteriana. En algunas realizaciones, la célula bacteriana es *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhii*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens*, *Yersinia pestis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, o *Klebsiella pneumoniae*.

Las construcciones pueden introducirse en la célula anfitriona por cualquiera de los medios estándar practicados por un experto en la técnica para producir una estirpe celular de la divulgación. Las construcciones de ácido nucleico pueden administrarse, por ejemplo, con lípidos catiónicos (Goddard, et al, Gene Therapy, 4:1231-1236, 1997; Gorman, et al, Gene Therapy 4:983-992, 1997; Chadwick, et al, Gene Therapy 4:937-942, 1997; Gokhale, et al, Gene Therapy 4:1289-1299, 1997; Gao, and Huang, Gene Therapy 2:710-722, 1995), utilizando vectores virales

(Monahan, et al, Gene Therapy 4:40-49, 1997; Onodera, et al, Blood 91:30-36, 1998), mediante la absorción de "ADN desnudo", y similares.

Definiciones

5 A menos que se defina lo contrario, los términos científicos y técnicos utilizados en relación con la presente divulgación tendrán los significados que comúnmente entienden aquellos expertos en la técnica. Adicionalmente, a menos que el contexto requiera lo contrario, los términos singulares incluirán pluralidades y los términos plurales incluirán el singular. Generalmente, las nomenclaturas utilizadas en relación con técnicas de cultivo de células y tejidos, biología molecular y química e hibridación de proteínas y oligo o polinucleótidos descritas en el presente documento son bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica. Se utilizan técnicas estándar para la síntesis de ADN recombinante y oligonucleótidos, así como para el cultivo y transformación de tejidos (por ejemplo, electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como se logra comúnmente en la técnica o como se describe aquí. Las técnicas y procedimientos anteriores generalmente se realizan de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en varias referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la presente especificación. Véase, por ejemplo, Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Las nomenclaturas utilizadas en relación con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de química analítica, química orgánica sintética y química medicinal y farmacéutica descritas en el presente documento son aquellas bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica. Las técnicas estándar se utilizan para síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación, administración y tratamiento de pacientes.

25 Como se utiliza de acuerdo con la presente divulgación, se entenderá que los siguientes términos, a menos que se indique lo contrario, tienen los siguientes significados:

30 El término "polinucleótido" como se hace referencia en el presente documento significa un boro polimérico de nucleótidos de al menos 10 bases de longitud, ya sea ribonucleótidos o desoxinucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas de ADN de cadena sencilla y de cadena doble.

El término "polipéptido" se utiliza en el presente documento como un término genérico para referirse a proteínas nativas, fragmentos o mutantes de una secuencia de polipéptidos. Por lo tanto, los fragmentos de proteínas nativas y mutantes son especies del género de polipéptidos. Los polipéptidos preferidos de acuerdo con la divulgación comprenden citoquinas y anticuerpos.

35 Como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina (Ig), es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une específicamente (inmunoreacciona con) un antígeno. Dichos anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, fragmentos policlonales, monoclonales, quiméricos, de cadena sencilla, F_{ab} , F_{ab}' y $F_{(ab)2}$, y anticuerpos en una biblioteca de expresión de F_{ab} . Por "unirse específicamente" o "inmunoreaccionar con" se entiende que el anticuerpo reacciona con uno o más determinantes antigénicos del antígeno deseado y no reacciona (es decir, se une) con otros polipéptidos o se une con una afinidad mucho menor ($K_d > 10^{-6}$) con otros polipéptidos.

45 Se sabe que la unidad estructural de anticuerpo básica comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas de polipéptidos, cada par tiene una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). La porción amino terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento de antígeno. La porción carboxi-terminal de cada cadena define una región constante principalmente responsable de la función efectora. Las cadenas ligeras humanas se clasifican como cadenas ligeras kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como mu, delta, gamma, alfa o epsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas ligeras y pesadas, las regiones variables y constantes están unidas por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, y la cadena pesada también incluye una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos más. Véase generalmente, Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ea., 2^a ed. Raven Press, NY (1989)). Las regiones variables de cada par de cadena ligera/pesada forman el sitio de unión del anticuerpo.

60 El término "anticuerpo monoclonal" (MAb) o "composición de anticuerpo monoclonal", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una población de moléculas de anticuerpo que contienen solo una especie molecular de molécula de anticuerpo que consiste en un único producto génico de cadena ligera y un único producto génico de cadena pesada. En particular, las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal son idénticas en todas las moléculas de la población. Los MAb contienen un sitio de unión a antígeno capaz de inmunoreaccionar con un epítipo particular del antígeno caracterizado por una afinidad de unión única por él.

65 En general, las moléculas de anticuerpos obtenidas de humanos se relacionan con cualquiera de las clases IgG, IgM, IgA, IgE e IgD, que difieren entre sí por la naturaleza de la cadena pesada presente en la molécula. Ciertas

clases también tienen subclases, tales como IgG1, IgG2 y otras. Adicionalmente, en humanos, la cadena ligera puede ser una cadena kappa o una cadena lambda.

El término “fragmentos de los mismos” como se utiliza en el presente documento significará un segmento de una secuencia de polinucleótidos o una secuencia de polipéptidos que es menor que la longitud de la secuencia completa. Los fragmentos como se utilizan en el presente documento comprenden regiones funcionales y no funcionales. Los fragmentos de diferentes secuencias de polinucleótidos o polipéptidos se intercambian o se combinan para crear una molécula híbrida o “quimérica”. Los fragmentos también se utilizan para modular las características de unión de polipéptidos a secuencias de polinucleótidos u otros polipéptidos.

El término “secuencia promotora”, como se utiliza en el presente documento, significará una secuencia de polinucleótidos que comprende una región de un gen a la que se controla el inicio y la tasa de transcripción. Una secuencia promotora comprende un sitio de unión de ARN polimerasa, así como sitios de unión para otros elementos reguladores positivos y negativos. Los elementos reguladores positivos promueven la expresión del gen bajo control de la secuencia promotora. Los elementos reguladores negativos reprimen la expresión del gen bajo control de la secuencia promotora. Las secuencias promotoras utilizadas en este documento se encuentran en dirección ascendente o internas al gen que se regula. Específicamente, el término “primera secuencia promotora” versus “segunda secuencia promotora” se refiere a la posición relativa de la secuencia promotora dentro del vector de expresión. La primera secuencia promotora está en dirección ascendente de la segunda secuencia promotora.

El término “gen de selección” como se utiliza en el presente documento significará una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido que es necesario para la supervivencia de la célula en las condiciones de cultivo dadas. Si una célula ha incorporado con éxito el vector de expresión que porta el gen de interés, junto con el gen de selección, esa célula producirá un elemento que le permitirá sobrevivir selectivamente bajo condiciones de cultivo hostiles. Las células “seleccionadas” son aquellas que sobreviven bajo presión selectiva y deben haber incorporado el vector de expresión. El término “presión selectiva” como se utiliza en el presente documento significará la adición de un elemento al medio de cultivo celular que inhibe la supervivencia de las células que no reciben la composición de ADN.

El término “gen endógeno” como se utiliza en el presente documento significará un gen abarcado dentro de la secuencia genómica de una célula. El término “gen exógeno” como se utiliza en el presente documento significará un gen no abarcado dentro de la secuencia genómica de una célula. Los genes exógenos se introducen en las células mediante los métodos instantáneos. El término “transgen”, como se utiliza en el presente documento, significará un gen que se ha transferido desde un organismo hasta otro.

Como se utiliza en el presente documento, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Véase *Immunology - A Synthesis* (2nd Edition, ES Golub y DR Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland Mass. (1991)). Los estereoisómeros (por ejemplo, D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales, aminoácidos no naturales tales como los aminoácidos α,α -disustituidos, N-alkil aminoácidos, ácido láctico y otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes adecuados para polipéptidos de la presente divulgación. Ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: 4-hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, ϵ -N,N,N-trimetilisina, ϵ -N-acetilsina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxisilina, σ -N-metilarginina y otros aminoácidos e iminoácidos similares (por ejemplo, 4-hidroxiprolina). En la notación de polipéptidos utilizada en el presente documento, la dirección hacia la izquierda es la dirección del terminal amino y la dirección hacia la derecha es la dirección del terminal carboxilo, de acuerdo con el uso y la convención estándar.

De manera similar, a menos que se especifique lo contrario, el extremo izquierdo de las secuencias de polinucleótidos de cadena sencilla es el extremo 5', la dirección izquierda de las secuencias de polinucleótidos de cadena doble se denomina dirección 5'. La dirección de la adición de 5' a 3' de las transcripciones de ARN nacientes se conoce como las regiones de secuencia de dirección de transcripción en la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que son 5' al extremo 5' de la transcripción de ARN como “secuencias en dirección ascendente”, las regiones de secuencia en la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que están en el extremo 3' al 3' de la transcripción de ARN se denominan “secuencias en dirección descendente”.

Las sustituciones de aminoácidos silenciosas o conservadoras se refieren a la intercambiabilidad de residuos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas-hidroxilo es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Los grupos de sustitución de aminoácidos conservadores preferidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, valina alanina, glutámico-aspártico y asparagina-glutamina.

Los reemplazos silenciosos o conservadores son aquellos que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Los aminoácidos codificados genéticamente se dividen

generalmente en familias: (1) los aminoácidos ácidos son aspartato, glutamato; (2) los aminoácidos básicos son lisina, arginina, histidina; (3) los aminoácidos no polares son alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano, y (4) los aminoácidos polares no cargados son glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. Los aminoácidos hidrofílicos incluyen arginina, asparagina, aspartato, glutamina, glutamato, histidina, lisina, serina y treonina. Los aminoácidos hidrofóbicos incluyen alanina, cisteína, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, triptófano, tirosina y valina. Otras familias de aminoácidos incluyen (i) serina y treonina, que son la familia alifática-hidroxi; (ii) asparagina y glutamina, que son la familia que contiene amida; (iii) alanina, valina, leucina e isoleucina, que son la familia alifática; y (iv) fenilalanina, triptófano y tirosina, que son la familia aromática. Por ejemplo, es razonable esperar que un reemplazo aislado de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina o un reemplazo similar de un aminoácido con un aminoácido estructuralmente relacionado no tenga un efecto importante sobre la unión o las propiedades de la molécula resultante, especialmente si el reemplazo no involucra un aminoácido dentro de un sitio marco. Se puede determinar fácilmente si un cambio de aminoácido da como resultado un péptido funcional al ensayar la actividad específica del derivado de polipéptido. Los ensayos se describen en detalle en este documento. Aquellos expertos en la técnica pueden preparar fácilmente fragmentos o análogos de anticuerpos o moléculas de inmunoglobulina. Los extremos amino y carboxi preferidos de fragmentos o análogos se producen cerca de los límites de los dominios funcionales. Los dominios estructurales y funcionales pueden identificarse mediante la comparación de los datos de la secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos con bases de datos de secuencias públicas o patentadas. Preferiblemente, los métodos de comparación computarizados se utilizan para identificar motivos de secuencia o dominios de conformación de proteínas pronosticados que ocurren en otras proteínas de estructura y/o función conocidas. Se conocen métodos para identificar secuencias de proteínas que se pliegan en una estructura tridimensional conocida. Bowie et al. *Science* 253: 164 (1991). Por lo tanto, los ejemplos anteriores demuestran que aquellos expertos en la técnica pueden reconocer motivos de secuencia y conformaciones estructurales que se pueden utilizar para definir dominios estructurales y funcionales de acuerdo con la divulgación.

Una sustitución de aminoácidos silenciosa o conservadora no debería cambiar sustancialmente las características estructurales de la secuencia progenitora (por ejemplo, un aminoácido de reemplazo no debería tender a romper una hélice que se produce en la secuencia progenitora, o interrumpir otros tipos de estructura secundaria que caracteriza la secuencia progenitora). Se describen ejemplos de estructuras secundarias y terciarias de polipéptidos reconocidos en *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); and Thornton et al. *Nature* 354:105 (1991).

Otros términos químicos en el presente documento se utilizan de acuerdo con el uso convencional en la técnica, como se ejemplifica por *The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms* (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)).

Ejemplos

Ejemplo 1. Mutaciones introducidas en la cadena ligera lambda para la optimización y desoptimización de codones en células de mamíferos

El anticuerpo biespecífico anti-CD19 x anti-CD47 44, que se basa en la tecnología del cuerpo $\kappa\lambda$, está compuesto por una cadena pesada común y dos cadenas ligeras diferentes. Estas cadenas están codificadas por la construcción del plásmido 44 (Tabla 1). Cuando este plásmido de expresión se transfecta en células de mamífero, se producen tres moléculas mediante ensamble aleatorio de las tres cadenas: una IgG κ monoespecífica (que contiene dos cadenas ligeras κ idénticas), una IgG λ monoespecífica (que contiene dos cadenas ligeras λ idénticas) y una IgG $\kappa\lambda$ biespecífica, (que contiene una cadena ligera κ y una cadena ligera λ). Si las dos cadenas ligeras se expresan a la misma tasa y se ensamblan por igual, la relación teórica para las tres moléculas debe ser 25% de IgG κ , 25% de IgG λ y 50% de IgG $\kappa\lambda$. En el caso de la construcción 44, existe una expresión preferencial de las cadenas ligeras λ que conduce a una expresión y rendimiento subóptimos de anticuerpos biespecíficos. Con el fin de mejorar esta situación, se ha realizado la optimización y la desoptimización de las diferentes cadenas para ajustar las relaciones relativas de las cadenas.

La optimización de codones se ha realizado con el software GeneOptimizer® (GeneArt), sobre cadenas pesadas, kappa y lambda. Se generaron diferentes candidatos al clonar las cadenas optimizadas o no en el plásmido de tipo silvestre que codifica el anticuerpo biespecífico 44.

Se realizaron tres niveles diferentes de desoptimización de codones sobre la cadena lambda que se expresa en exceso. Se generaron tres construcciones (3, 13 y 19 cadenas lambda desoptimizadas) y se combinaron con cadenas pesadas y kappa optimizadas. Se aplicaron diferentes grados de desoptimización a la cadena ligera λ . Las construcciones 3, 13, y 19 contenían secuencias cada vez más desoptimizadas (VLCL2-1, VLCL2-2 y VLCL2-3 respectivamente, véase Figura 1). También se generaron las construcciones 17 y 15 con una cadena lambda optimizada (Tabla 1).

Ejemplo 2. Clonación y caracterización de IgG expresada en células Peak

La cadena pesada común y dos cadenas ligeras (una kappa y una lambda) de tipo silvestre, codón optimizado o desoptimizado se clonaron en un solo vector pNOVI de expresión de mamífero bajo tres promotores CMV independientes. Después de la verificación de la secuencia, se evaluó la productividad de IgG para cada construcción en células Peak mediante dos transfecciones transitorias independientes utilizando Lipofectamine 2000. Siete días después de la transfección, se evaluó la expresión de IgG total mediante la tecnología Octet. Excepto para el candidato 15, no se observó ninguna diferencia importante entre los candidatos en términos de productividad total de IgG. Se observó una tendencia a una disminución en la productividad con la construcción 15 en la que todas las cadenas se habían optimizado (Figura 2). Después de 10 días de producción en células PEAK, las IgG totales se purificaron sobre la resina Fc XL.

La distribución de las tres formas diferentes de IgG, lambda mono-específica, kappa mono-específica y anticuerpo bispecífico, se determinó mediante análisis HIC-HPLC utilizando la columna ProPac HIC-10 (Dionex) (Figura 3A). Se aplicaron un gradiente de fase móvil A (tampón fosfato 0.001 M + sulfato de amonio 1 M, pH 3.5) del 85 al 35% y un gradiente creciente de fase móvil B (tampón fosfato 0.001 M + acetonitrilo 10%, pH 3.5) del 15% al 100%. Se realizó un blanco con la fase móvil A, pH 7. El análisis del pico del área HIC (Figura 3B) muestra una tendencia con incremento del porcentaje de bispecífico para los candidatos desoptimizados 3, 13 y 19 en comparación con el tipo silvestre 44 y el optimizado 15 y 17. La relación de kappa y lambda mono-específica para 3, 13 y 19 fue significativamente diferente en comparación con 44.

También se realizó un IEF 7-11% para evaluar la distribución de IgG total (Figura 4). Los candidatos con optimización lambda muestran un incremento de lambda mono-específica en comparación con el clon 44 y menos kappa mono-específica y bispecífica. Los candidatos 3, 13 y 19 mostraron un aumento significativo en mono-específico kappa y bispecífico.

La tabla 2 resume los datos obtenidos para candidatos expresados en células PEAK. Para los candidatos 3, 13 y 19, el porcentaje final de bispecífico obtenido fue mayor, con un aumento de la relación bispecífica de 21.6% para 44 a 42.9% para el candidato 13. Curiosamente, el nivel más alto de desoptimización de codones (construcción 19) de la cadena lambda aumenta la productividad del anticuerpo bispecífico.

Ejemplo 3. Expresión de IgG en células CHO transfectadas de forma estable

Después de la transfección por electroporación y selección con MSX, se realizó un cribado por FACS. Los grupos de mayor producción se seleccionaron para la producción en condiciones de tanda cargada. La productividad de IgG total se evaluó para diferentes grupos mediante la tecnología Octet (Figura 5). Después de la purificación por la proteína A, la relación de las diferentes cadenas se evaluó mediante electroforesis en un chip Agilent protein 80 que monitoriza los tamaños de las cadenas pesadas y ligeras en condiciones de reducción y desnaturalización.

Como se muestra en el análisis de Agilent (Figura 6A), para 44, la cadena lambda estaba más representada que la cadena kappa. Para varios grupos de CHO, las construcciones 3 y 13 mejoraron el equilibrio entre las dos cadenas ligeras. Con el aumento de la desoptimización de la cadena lambda, la relación se invirtió en comparación con la construcción inicial (44 frente a 19). Esto se confirmó al calcular la relación entre las dos cadenas ligeras (Figura 6B). Así, el equilibrio entre las dos cadenas ligeras, que estaba a favor de la cadena lambda para 44, se invirtió gradualmente, correlacionando con el nivel de desoptimización. Cuando se analizan todos los grupos productivos, se puede observar una diferencia significativa entre los candidatos 13, 19 y el candidato 44, con más cadena ligera kappa y menos cadena ligera lambda. En base a estos resultados, los candidatos 3 y 13 deberían mostrar un aumento en la expresión de BsAb, ya que las dos cadenas ligeras se expresan en niveles más equivalentes. Después de la purificación por la proteína A, la relación de las diferentes formas de IgG se evaluó mediante HIC para todos los grupos productores de IgG (Figura 7). Los datos muestran que el nivel de lambda mono-específica disminuye gradualmente con el nivel de desoptimización y se observa el patrón inverso para kappa mono-específico. Los niveles bispecíficos alcanzan un máximo de aproximadamente el 40% con una distribución muy homogénea para las construcciones 3 y 13. Por el contrario, la expresión desequilibrada de una de las dos cadenas (como en 44 o 19) conduce a un nivel reducido de producción bispecífica.

Con el fin de confirmar la unión específica contra sus objetivos, se evaluó la unión de todos los candidatos a hCD19 y hCD47 mediante ELISA (Figura 8). Los dos objetivos específicos de los anticuerpos bispecíficos y una proteína irrelevante a 2 µg/mL en PBS se recubrieron durante la noche a 4°C en una microplaca recubierta con estreptavidina de 96 pozos. Después de 3 lavados con PBS Tween al 0.05% (v/v) (PBST), los anticuerpos purificados, diluidos a 2 µg/mL en PBST BSA al 1%, se incubaron 30 minutos a 37°C en la placa. Los pozos se lavaron 3 veces con PBST, y luego se agregó un anticuerpo secundario (Fc de IgG anti humano acoplado a peroxidasa de rábano picante) y se incubó 1 h a 37°C. Se utilizó tetrametilbencidina para revelar ELISA y se bloqueó con ácido sulfúrico. La absorbancia se leyó a 450 nm.

La expresión de cada candidato se amplió y los sobrenadantes se recogieron después de 10 días y se clarificaron por centrifugación a 1.300 g durante 10 minutos. El proceso de purificación estuvo compuesto por tres etapas de afinidad. Primero, la matriz de afinidad Capture-Select IgG-CH1 (Life Technologies) se lavó con PBS y luego se

agregó al sobrenadante clarificado. Después de la incubación durante la noche a 4°C, los sobrenadantes se centrifugaron a 1000 g durante 10 minutos, el sobrenadante se desechó y la resina se lavó dos veces con PBS. Luego, la resina se transfirió a columnas giratorias y se utilizó una solución que contenía glicina 50 mM a pH 2.7 para la elución.

5 Se recogieron, agruparon y desalaron varias fracciones de elución contra PBS utilizando unidades de filtro ultra centrífugo Amicon de 50 kDa (Merck KGaA). El producto final, que contenía IgG humana total del sobrenadante, se cuantificó utilizando un espectrofotómetro Nanodrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) y se incubó durante 10 15 minutos a temperatura ambiente y 20 rpm con el volumen apropiado de resina de afinidad KappaSelect (GE Healthcare). Las etapas de incubación, recuperación de resina, elución y desalación se realizaron como se describió anteriormente (Fischer et al., Nature Comms. 2015). La última etapa de purificación por afinidad se realizó utilizando la resina de afinidad LambdaFabSelect. La IgG total, el porcentaje de anticuerpos biespecíficos medidos por HIC y la productividad biespecífica purificada de los grupos de células CHO se resumen en la Tabla 3. Los datos muestran que la desoptimización y la expresión reducida de la cadena lambda conducen a un aumento de la productividad de 15 IgG total y del producto biespecífico. El método de optimización generó un aumento en el rendimiento del anticuerpo biespecífico de 2.5 veces.

REIVINDICACIONES

1. Un método para aumentar el rendimiento de producción de un complejo de proteínas que comprende:

- 5 (a) identificar uno o más polipéptidos en el complejo que se expresan más abundantemente en una célula en comparación con los otros polipéptidos en el complejo;
(b) modificar al menos una molécula de ácido nucleico que codifica los polipéptidos más abundantemente expresados en el complejo, en el que las moléculas de ácido nucleico se modifican al alterar la composición de codón de las moléculas de ácido nucleico que resulta en una reducción de la expresión de los polipéptidos que
10 codifica;
(c) introducir las moléculas de ácido nucleico en una célula; y
(d) cultivar la célula bajo condiciones que permiten la expresión de todos los polipéptidos del complejo de proteínas;

15 en el que dicha reducción de la expresión se logra mediante el reemplazo de ciertos codones con codones que se utilizan con menos frecuencia en la célula, al codificar un cambio en la estructura secundaria del ARNm o codificar un cambio en la tasa de traducción, y
en el que el complejo de proteínas es un anticuerpo biespecífico.

20 2. El método de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo biespecífico se compone de dos cadenas ligeras diferentes y una cadena pesada común.

3. El método de la reivindicación 1, en el que se coexpresa más de uno del complejo de proteínas.

Figura 1

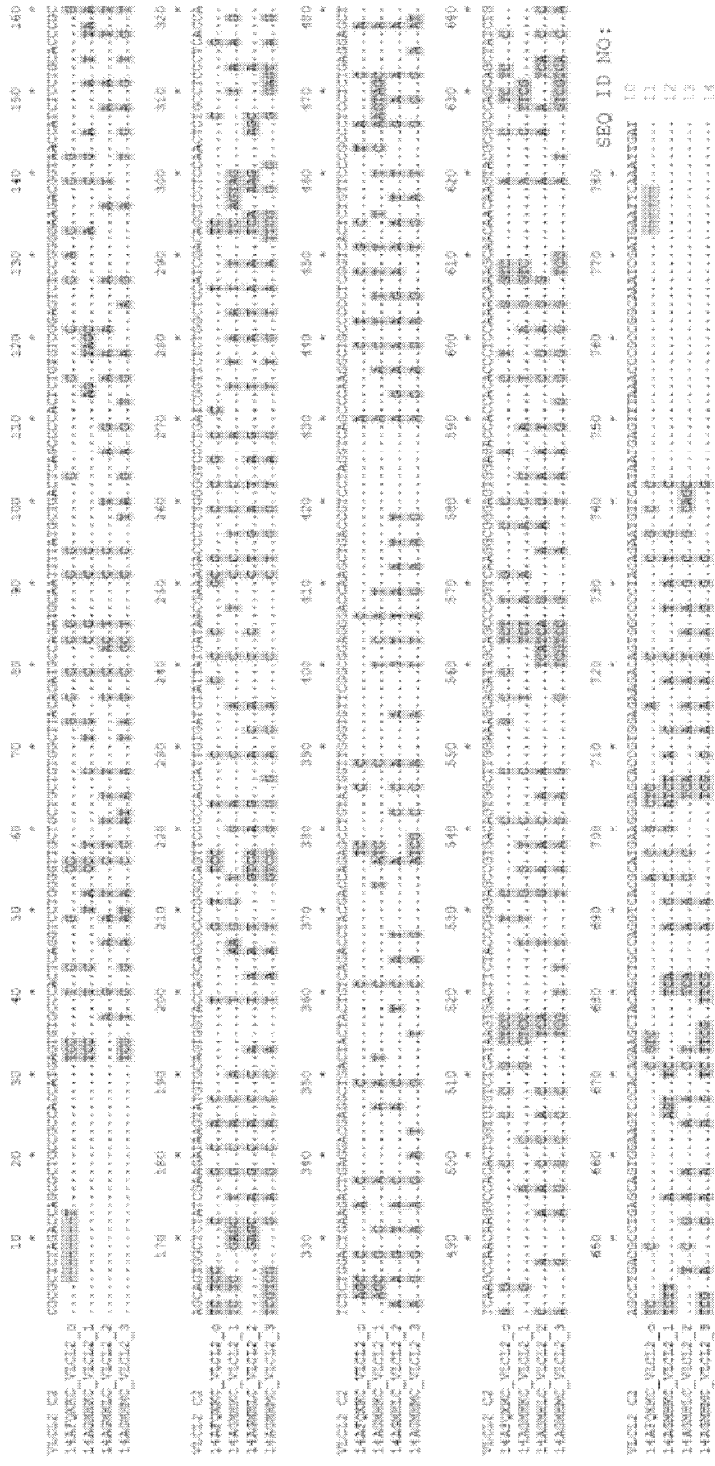


Figura 2

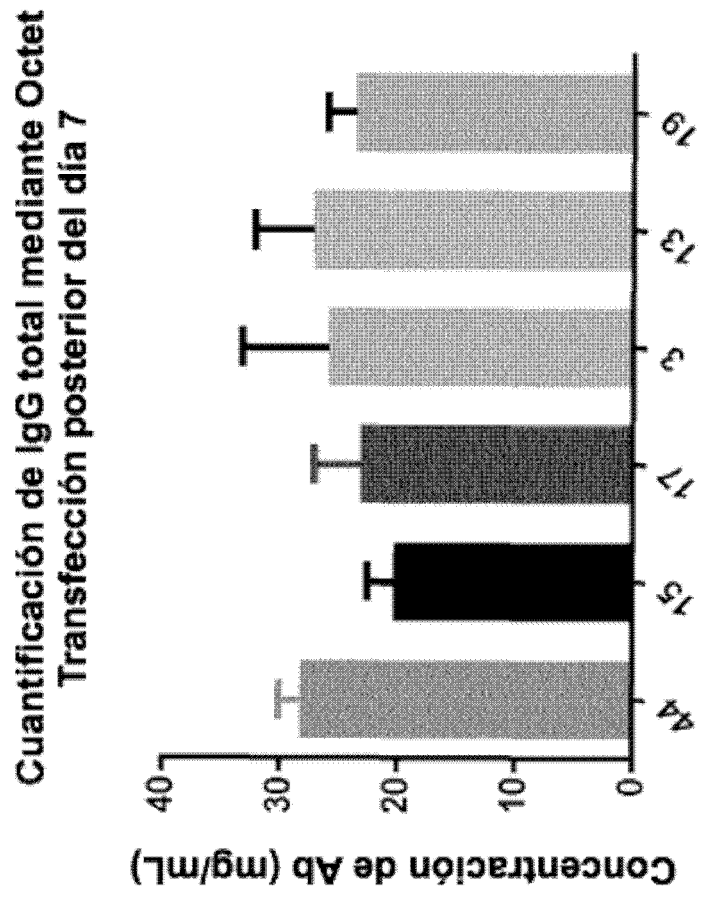


Figura 3A

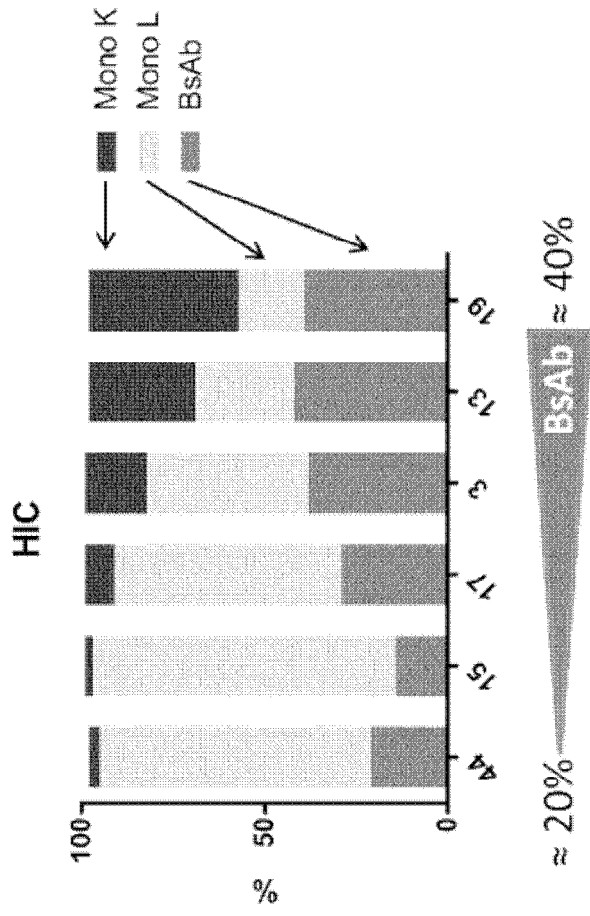
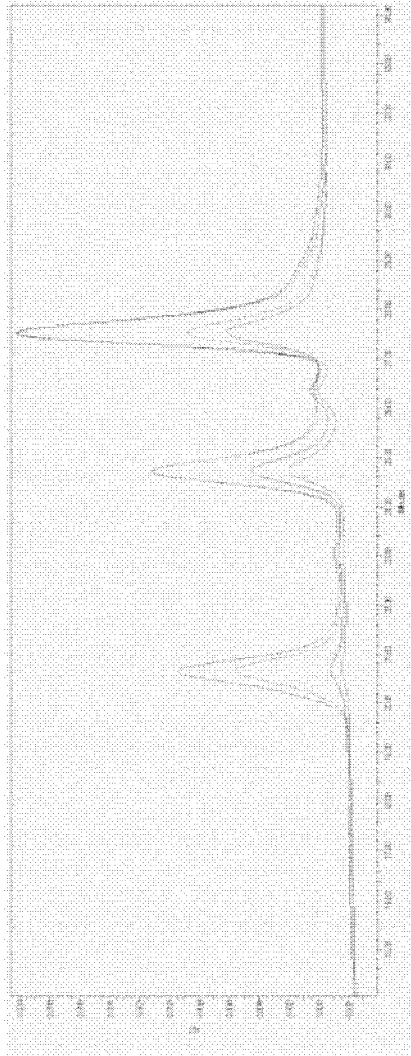


Figura 3B

Figura 4

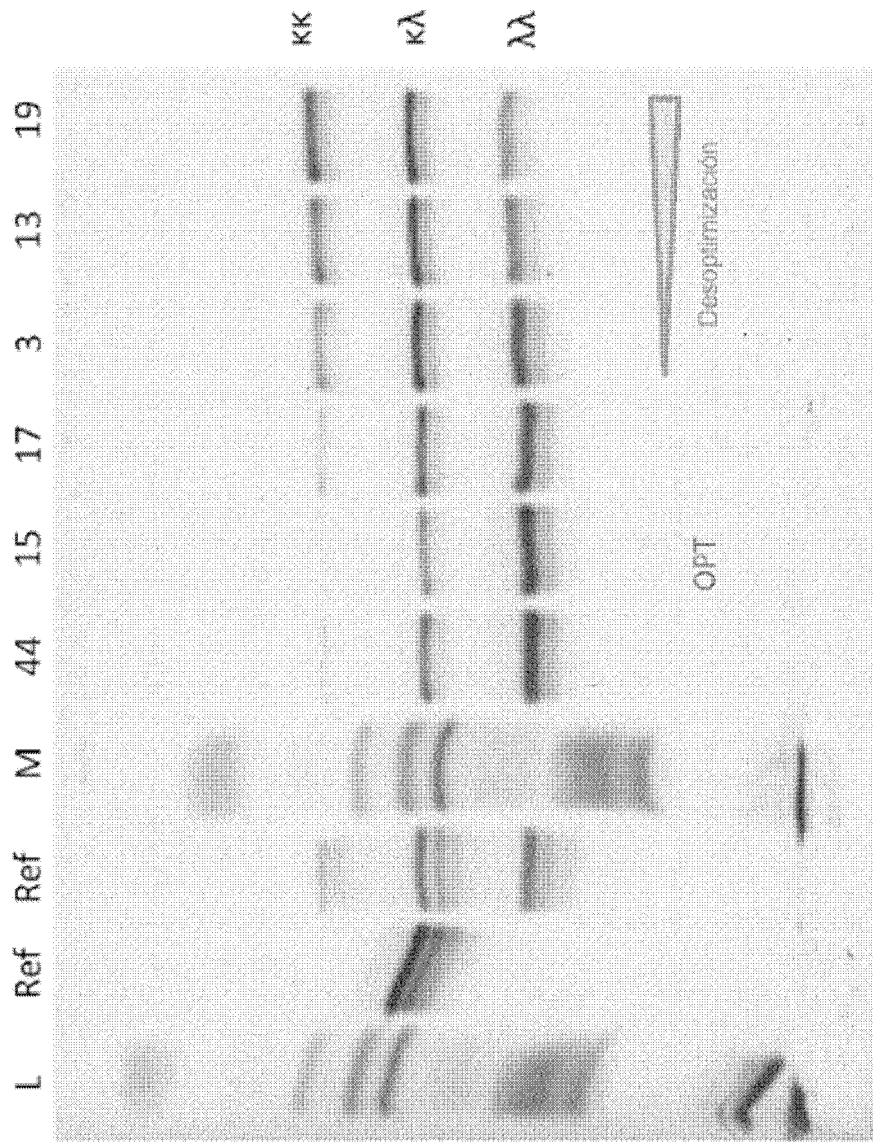
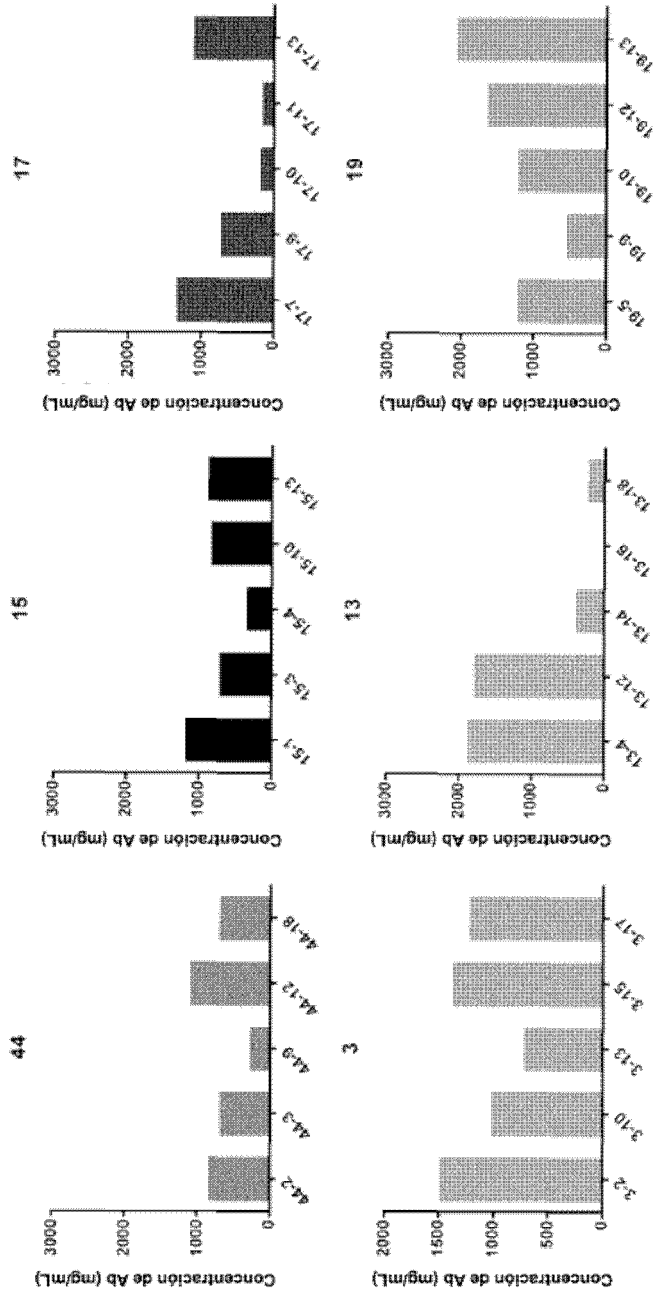


Figura 5



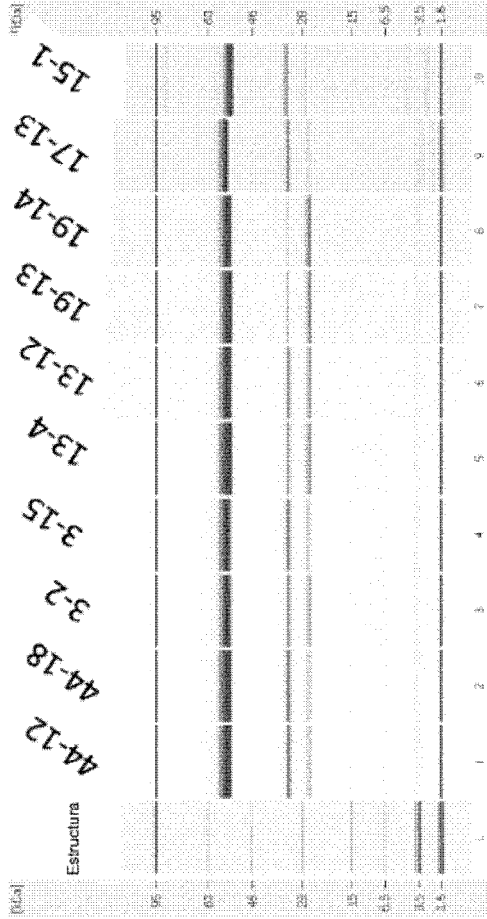


Figura 6A

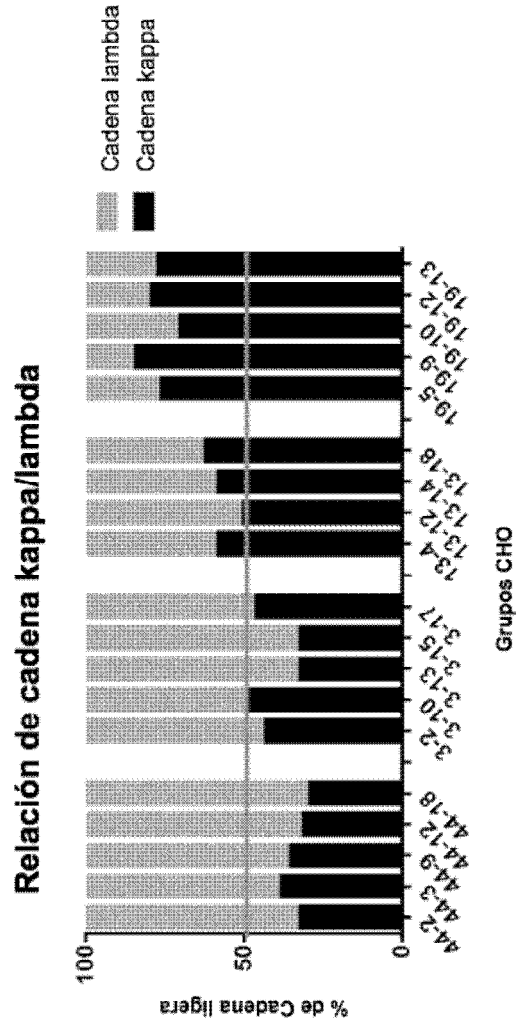
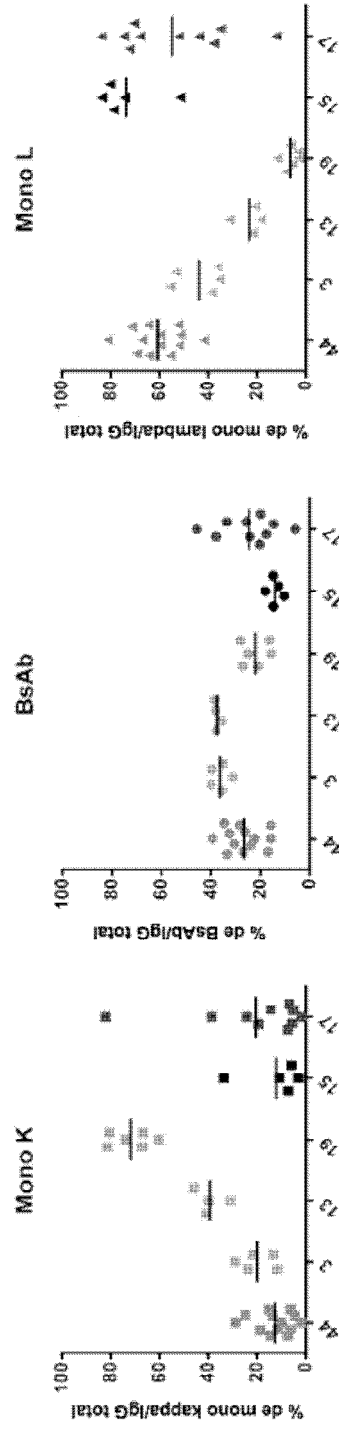


Figura 6B

Figura 7



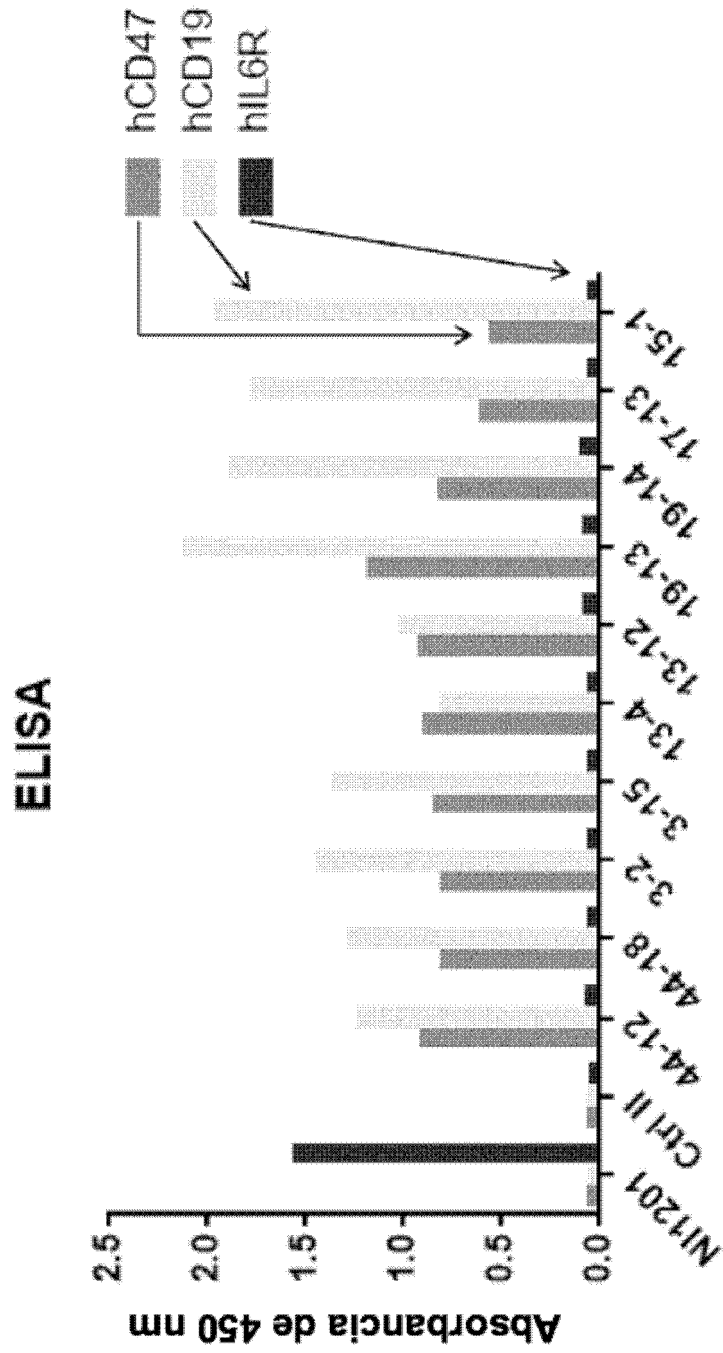


Figura 8