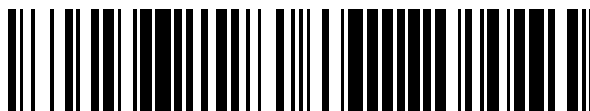


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 774 337**

51 Int. Cl.:

C07K 16/46

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.01.2009 E 15187984 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2019 EP 3061770**

54 Título: **Método para fabricación de moléculas heterodímeras Fc de anticuerpos utilizando efectos de conducción electrostática**

30 Prioridad:

07.01.2008 US 19569 P

05.12.2008 US 120305 P

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

20.07.2020

73 Titular/es:

AMGEN INC. (100.0%)

One Amgen Center Drive

Thousand Oaks, CA 91320-1799, US

72 Inventor/es:

KANNAN, GUNASEKARAN y

WITTEKIND, MICHAEL

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 774 337 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 fabricación de moléculas heterodímeras Fc de anticuerpos utilizando efectos de conducción electrostática.

ANTECEDENTES

- 5 Los anticuerpos se han convertido en la modalidad de elección en la industria biofarmacéutica debido a que poseen varias características que son atractivas para quienes desarrollan moléculas terapéuticas. Junto con la posibilidad de direccionar estructuras o células específicas, los anticuerpos hacen su diana susceptible de fagocitosis y destrucción mediada por receptores celulares Fc (Raghavan y Bjorkman 1996). Adicionalmente, la capacidad del anticuerpo para interactuar con el receptor Fc neonatal (FcRn) de manera dependiente del pH le confiere una semivida prolongada en suero (Ghetie y Ward 2000). Esta característica singular de los anticuerpos permite extender la semivida de la proteína o péptido terapéutico en el suero mediante el diseño de moléculas de fusión de Fc.

- 15 Los anticuerpos pertenecen a la clase de proteínas inmunoglobulina que incluye IgG, IgA, IgE, IgM, e IgD. La clase de inmunoglobulinas más abundante en el suero humano es IgG, cuya estructura esquemática se muestra en la Figura 1 (Deisenhofer 1981, Huber 1984; Roux 1999). La estructura de IgG tiene 4 cadenas, 2 cadenas ligeras y 2 pesadas; cada cadena ligera tiene 2 dominios y cada cadena pesada tiene 4 dominios. El sitio de fijación de antígeno está localizado en la región Fab (Fragmento de fijación de antígeno) que contiene un dominio variable de cadena ligera (VL) y un dominio variable de cadena pesada (VH) así como dominios constantes de cadena ligera (LC) y de cadena pesada (CH1). La región de dominio CH2 y CH3 de la cadena pesada se conoce como Fc (Fragmento cristizable). La molécula IgG puede considerarse como un heterotetrámero que tiene dos cadenas pesadas que se mantienen unidas por enlaces disulfuro (-S-S-) en la región bisagra y dos cadenas ligeras. El número de enlaces disulfuro de la bisagra varía entre las subclases de inmunoglobulina (Papadea y Check 1989). El sitio de fijación de FcRn está localizado en la región Fc del anticuerpo (Martin, West et al. 2001), y por tanto la propiedad de semivida prolongada en suero del anticuerpo está retenida en el fragmento Fc. La región Fc sola puede considerarse como un homodímero de cadenas pesadas que comprende los dominios CH2 y CH3.

- 25 En ciertos casos, es deseable crear una molécula que contiene la porción Fc de un anticuerpo pero comprende un heterodímero. Una aplicación importante de moléculas Fc heterodímeras es la generación de anticuerpos biespecíficos (BsAbs). El término anticuerpo biespecíficos se refiere a anticuerpos que tienen especificidades para al menos dos antígenos diferentes (Nolan y O'Kennedy 1990; Leij, Molema et al. 1998, Carter 2001). En lugar de tener secuencia idéntica en ambos Fabs, los anticuerpos biespecíficos llevan secuencias diferentes en los dos Fabs de tal modo que cada rama de la molécula en forma de Y puede fijarse a antígenos diferentes. El documento WO 2007/110205 describe una proteína de múltiples dominios diseñada que incluye al menos dos dominios diseñados no idénticos, cada uno de los cuales contiene una interfaz de interacción proteína-proteína que contiene segmentos de la secuencia de aminoácidos derivados de dos o más dominios progenitores homólogos existentes, con lo que se confieren a los dominios diseñados unas especificidades de ensamblaje distintas a las especificidades de ensamblaje de los dominios progenitores.

- El uso de anticuerpos biespecíficos para inmunoterapia del cáncer ha sido revisado extensamente en la bibliografía (véase por ejemplo (Nolan y O'Kennedy 1990; de Leij, Molema et al. 1998, Carter 2001)). Por tener la posibilidad de fijarse a dos epítopos o moléculas diferentes, los BsAbs proporcionan medios tanto para disparar una célula efectora inmune como para fijar un antígeno de superficie en una célula tumoral diana. Esto contribuye a hacer uso del sistema inmunitario para destruir las células del cáncer. Otras aplicaciones de anticuerpos biespecíficos se abarcan extensamente en las patentes U.S. Nos. 5.731.168 y 7.183.076.

- El método clásico de producción de BsAbs por co-expresión de dos IgGs diferentes en hibridomas híbridos conduce a hasta 10 combinaciones posibles de cadenas pesada y ligera. Esto pone en compromiso el rendimiento e impone un reto de purificación. Carter y colaboradores han diseñado cadenas pesadas para heterodimerización utilizando una estrategia de "botones-en-ojales" (Ridgway, Presta et al. 1996; Atwell, Ridgway et al. 1997; Merchant, Zhu et al. 1998; Carter 2001). El concepto botones-en-ojales fue propuesto originalmente por Crick como modelo para empaquetamiento de cadenas laterales de aminoácidos entre hélices α adyacentes (Crick 1952). Carter y colaboradores crearon un botón en la interfaz del dominio CH3 de la primera cadena por reemplazamiento de una cadena lateral de aminoácido más pequeña con una mayor (por ejemplo, T366Y); y se creó un ojal en la posición yuxtapuesta en la interfaz CH3 de la segunda cadena por reemplazamiento de una cadena lateral de aminoácido mayor en una región mayor con una más pequeña (por ejemplo, Y407T). La base para la creación de botón y ojal en las posiciones yuxtapuestas es que la interacción botón y ojal favorecerá la formación de heterodímeros, mientras que la interacción botón-botón y la ojal-ocal dificultarán la formación de homodímeros debido a impedimento estérico y delección de interacciones favorables, respectivamente. Las mutaciones de botones-en-ojales se combinaron también con el diseño de enlaces disulfuro inter-dominios CH3 para aumentar la formación de heterodímeros (Sowdhamini, Srinivasan et al. 1989; Atwell, Ridgway et al. 1997). Además de estas mutaciones, la ratio de DNA de entrada se modificó también para maximizar el rendimiento (Merchant, Zhu et al. 1998). La técnica de "botones-en-ojales" se describe en las Patentes U.S. Nos. 5.731.168 y 7.183.076. La remodelización de la interfaz de los dominios basada en mutaciones estéricamente complementarias o enlaces de disulfuro entre las cadenas puede facilitar la producción de un

heterodímero que sea un diacuerpo funcional (Zhu Z et al: "Remodeling domain interfaces to enhance heterodimer formation", Protein Science, Wiley, EE. UU., vol. 6, n.º 4, 1 de abril de 1997, páginas 781-788).

La electrostática desempeña un papel principal a la hora de definir los mecanismos de la formación de complejos proteína-proteína, reconocimientos moleculares, estabilidades térmicas, adaptabilidades conformacionales y movimientos de las proteínas (Sinha Neeti et al: "Electrostatics in protein binding and function", Current Protein and Peptide Science, Bentham Science Publishers, Países Bajos, vol. 3, n.º 6, 1 de diciembre de 2002, páginas 601-614).

SUMARIO

La presente invención proporciona una célula hospedadora *in vitro* para la preparación de una proteína heterodímera. La célula hospedadora comprende un ácido nucleico que codifica un primer polipéptido que contiene CH3 de IgG y un ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido que contiene CH3 de IgG, en la cual dicho primer polipéptido que contiene CH3 de IgG comprende la sustitución de los aminoácidos en las posiciones 392 y 409 o en las posiciones 370, 392 y 409 con un aminoácido cargado negativamente, y dicho segundo polipéptido que contiene CH3 de IgG comprende la sustitución de los aminoácidos en las posiciones 356 y 399 o en las posiciones 356, 357 y 399 con un aminoácido cargado positivamente.

La célula hospedadora *in vitro* que comprende ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos que contienen los CH3 de IgG primero y segundo puede ser cultivada de tal modo que los polipéptidos son co-expresados por la célula. Los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos que contienen el primer CH3 de IgG y el segundo CH3 de IgG pueden ser proporcionados a la célula hospedadora en cierta ratio, por ejemplo 1:1, 1:2, 2:1, 1:3, 3:1, 1:4, 4:1, 1:5, 5:1, 1:6, 6:1, 1:7,7:1, 1:8, 8:1, 1:9,9:1, 1:10, 10:1. Se contempla que la alteración de la ratio de ácidos nucleicos puede aumentar la producción de moléculas heterodímeras frente a moléculas homodímeras.

Las moléculas heterodímeras pueden purificarse a partir del cultivo de células hospedadoras utilizando técnicas estándar. Por ejemplo, cuando la proteína heterodímera comprende un Fc, la proteína puede purificarse utilizando una columna de Proteína A. Las técnicas de purificación incluyen, pero sin carácter limitante, métodos cromatográficos tales como cromatografía de exclusión de tamaños, de intercambio iónico y basada en afinidad, y ultracentrifugación.

Las moléculas heterodímeras comprenden un primer polipéptido que contiene CH3 de IgG y un segundo polipéptido que contiene CH3 de IgG que se encuentran juntos para formar una interfaz diseñada con el fin de propiciar la formación del heterodímero. El primer polipéptido que contiene CH3 de IgG y el segundo polipéptido que contiene CH3 de IgG se diseñan, tal como se reivindica, para que comprendan aminoácidos cargados dentro de la interfaz que son electrostáticamente desfavorables para la formación de homodímeros pero electrostáticamente favorables para la formación de heterodímeros.

En ciertas realizaciones, el polipéptido que contiene CH3 de IgG comprende una región Fc de IgG, derivada preferiblemente de una región Fc de IgG humana de tipo salvaje. Por Fc de IgG humana "tipo salvaje" se entiende una secuencia de aminoácidos que existe naturalmente en la población humana. Por supuesto, del mismo modo que la secuencia Fc puede variar ligeramente entre individuos, pueden hacerse una o más alteraciones en una secuencia de tipo salvaje y permanecer todavía dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, la región Fc puede contener alteraciones adicionales que no están relacionadas con la presente invención, tales como una mutación en un sitio de glicosilación, inclusión de un aminoácido no natural, o una mutación de "botones-en-ojales".

El polipéptido que contiene la región CH3 es una molécula de IgG y puede contener adicionalmente un dominio CH1 y CH2. Secuencias ilustrativas de IgG humana comprenden las regiones constantes de IgG1 (v.g., SEQ ID NO:3; CH1 = aminoácidos 1-98, CH2 = aminoácidos 111-223, CH3 = 224-330), IgG2 (v.g., SEQ ID NO:4; CH1 = aminoácidos 1-94, CH2 = aminoácidos 111-219, CH3 = 220-326), IgG3 (v.g., SEQ ID NO:5; CH1 = aminoácidos 1-98, CH2 = aminoácidos 161-270, CH3 = 271-377), e IgG4 (v.g., SEQ ID NO:6; CH1 = aminoácidos 1-98, CH2 = aminoácidos 111-220, CH3 = 221-327). Los expertos en la técnica pueden diferir en su comprensión de los aminoácidos exactos que corresponden a los diversos dominios de la molécula IgG. Así, el término N o el término C de los dominios arriba reseñados pueden prolongarse o acortarse en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o incluso 10 aminoácidos. Téngase también en cuenta que el esquema de numeración utilizado en este caso para designar los dominios difiere del esquema de numeración EU de Kabat que se utiliza en el resto de esta solicitud de patente. Por ejemplo, IgG1 "CH3 = 224-230" corresponde a "CH3 = 341-447" en el esquema de numeración EU.

La región Fc puede estar comprendida también dentro de la región constante de una cadena pesada IgA (v.g., SEQ ID NO:7), IgD (v.g., SEQ ID NO:8), IgE (v.g., SEQ ID NO:9), e IgM (v.g., SEQ ID NO: 10).

El polipéptido que contiene la región CH3 puede ser una cadena pesada de anticuerpo y la célula hospedadora puede expresar adicionalmente una o más cadenas ligeras de anticuerpo. En realizaciones en las que se co-expresan más de una cadena pesada y cadenas ligeras (v.g., anticuerpo bivalente), cada cadena pesada puede comprender una mutación en la región CH1 y cada cadena ligera puede comprender una mutación en la región constante para fijarse preferentemente una a otra, pero no se une a la otra cadena ligera o pesada, respectivamente.

Tales mutaciones implican alteración de la carga de uno o más aminoácidos en la interfaz entre la región CH1 y la región constante de una cadena ligera.

Realizaciones preferidas de la invención incluyen, pero sin carácter limitante, un anticuerpo, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo monoespecífico monovalente, un maxicuerpo biespecífico (maxicuerpo se refiere a scFv-Fc), un monocuerpo, un pepticuerpo, un pepticuerpo biespecífico, un pepticuerpo monovalente (un péptido fusionado a una rama de una molécula Fc heterodímera), y una proteína de fusión receptor-Fc. Véase FIG. 2.

Ejemplos de células hospedadoras de mamífero que pueden utilizarse incluyen, pero sin carácter limitante, CHO, 293, y linajes de células de mieloma. La célula hospedadora puede ser también levadura o un procariota, tal como *E. coli*.

10 Tal como se describe en la presente, las proteínas heterodímeras pueden ser particularmente útiles en composiciones terapéuticas. Puede formularse una proteína heterodímera en una composición que incluye uno o más tampones o excipientes farmacéuticamente aceptables. Tal como se describe en la presente, dichas composiciones terapéuticas pueden administrarse a un individuo para tratar una enfermedad o puede administrarse para prevenir una enfermedad o prevenir el progreso de los síntomas de una enfermedad.

15 La presente invención proporciona una célula hospedadora *in vitro* para producir una proteína heterodímera, comprendiendo dicha célula hospedadora un ácido nucleico que codifica un primer polipéptido que contiene CH3 de IgG y un ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido que contiene CH3 de IgG, donde dicho primer polipéptido que contiene CH3 de IgG comprende la sustitución de los aminoácidos en las posiciones 392 y 409 o en las posiciones 370, 392 y 409 con un aminoácido cargado negativamente, y dicho segundo polipéptido que contiene CH3 de
20 IgG comprende la sustitución de los aminoácidos en las posiciones 356 y 399 o en las posiciones 356, 357 y 399 con un aminoácido cargado positivamente.

El aminoácido cargado negativamente puede ser ácido aspártico.

El aminoácido cargado positivamente puede ser lisina.

La proteína heterodímera puede comprender una región Fc de IgG humana.

25 La región Fc de IgG humana puede comprender una región Fc de IgG1, una región Fc de IgG2, una región Fc de IgG3 o una región Fc de IgG4.

El primer y/o segundo polipéptido que contiene CH3 de IgG puede ser una cadena pesada de anticuerpo.

La proteína heterodímera puede comprender adicionalmente una o más cadenas ligeras de anticuerpo.

30 La proteína heterodímera se puede seleccionar del grupo constituido por un anticuerpo, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo monoespecífico monovalente, un maxicuerpo biespecífico, un monocuerpo, un pepticuerpo, un pepticuerpo biespecífico, un pepticuerpo monovalente, y una proteína de fusión de receptores.

La célula hospedadora puede ser una célula hospedadora de mamífero y opcionalmente la célula hospedadora de mamífero puede ser una línea celular de ovario de hámster chino (CHO).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

35 Figura 1. Diagrama esquemático del anticuerpo IgG 1 con los dominios indicados. El anticuerpo IgG 1 es un tetrámero en forma de Y con dos cadenas pesadas (longitud mayor) y dos cadenas ligeras (longitud menor). Las dos cadenas pesadas están unidas por enlaces disulfuro (-S-S-) en la región bisagra. Fab - fragmento de fijación de antígeno, Fc - fragmento cristalizante, VL - dominio variable de cadena ligera, VH - dominio variable de cadena pesada, CL - dominio constante (sin variación de secuencia) de cadena ligera, CH1 -
40 dominio constante 1 de cadena pesada, CH2 - dominio constante 2 de cadena pesada, CH3 - dominio constante 3 de cadena pesada.

Figura 2. La figura representa algunas de las realizaciones que incluyen moléculas Fc heterodímeras. Éstas incluyen anticuerpos biespecíficos (que tienen especificidad para dos o más antígenos) hasta moléculas de fusión receptor-Fc. Preferiblemente, el Fc retiene su capacidad para interactuar con el receptor FcRn, incluso sin los dominios Fab, conduciendo a una semivida en suero más larga para proteínas/dominios que
45 están fusionados a las cadenas pesadas Fc, scFv - fragmento variable monocatenario, Pep. - pepticuerpo, A y B representa proteínas o receptores o dominios.

Figura 3. Se representa la estructura de interfaz de dominio CH3 con residuos implicados en la interacción dominio-dominio. Los residuos de interfaz se identificaron utilizando un método de punto de corte por distancia. Los residuos estructuralmente conservados y ocultos (área de superficie accesible al disolvente < 10%) se representan en el modelo de puntos y rayas. Los residuos expuestos al disolvente o no conservados estructuralmente se muestran en la representación de rayas. El análisis está basado en la estructura
50

cristalina de IgG 1 (código PDB: 1L6X) que está determinada a alta resolución (1,65 Å) (Idusogie, Presta et al., 2000).

Figura 4. Comparación de secuencias de subclases IgG de (a) humana y (b) de ratón. Únicamente se muestra la secuencia de cadena pesada correspondiente al dominio CH3. El asterisco (*) indica las posiciones de residuos implicados en la interacción de dominios CH3-CH3 identificada basada en la estructura cristalina del Fc de IgG 1 humana (1L6X). Las posiciones marcadas con rectángulos son residuos preferidos para mutación a fin de aumentar la formación de heterodímeros. Puede observarse aquí que los residuos cargados están muy conservados entre las IgGs. (c) Comparación de secuencias de dominio CH3 de otras clases de anticuerpos (IgA, IgE, IgD, e IgM). Las posiciones de los residuos de interfaz (indicadas por "**") en (b) y (c) se identificaron basándose en comparación de secuencia con la secuencia Hu IgG1 que se muestra también. En (a), las secuencias derivadas de IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4 humanas corresponden a SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, y SEQ ID NO: 14, respectivamente. En (b), las secuencias derivadas de IgG1 humana, IgG1 de ratón, IgG2a de ratón, IgG2b de ratón, e IgG3 de ratón corresponden a SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO:18, y SEQ ID NO: 19, respectivamente. En (c), las secuencias derivadas de IgG1 humana, IgA humana, IgE humana, IgD humana, e IgM humana corresponden a SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, y SEQ ID NO:24, respectivamente.

Figura 5. Estructura cristalina del homodímero del dominio CH3 con un dominio que se muestra en representación de cinta y el otro dominio representado en modelo de hilo. Los residuos Lys409 (Lys409' en el segundo dominio) y Asp399 (Asp399' en el segundo) se representan en modelo de puntos y rayas a fin de ilustrar cada interacción por pares se representan dos veces en la estructura. Esto es debido a la simetría doble presente en la interacción de dominios CH3-CH3. La figura se creó utilizando las coordenadas 1L6X depositadas en el PDB.

Figura 6. Esquemas que muestran interacciones electrostáticas en el tipo salvaje y en los mutantes diseñados como ejemplo para aumentar la formación de heterodímeros y dificultar la formación de homodímeros. (a) En el caso de WT, las interacciones electrostáticas favorecen tanto la formación de heterodímeros como la de homodímeros, confiriendo a ambas igual probabilidad. (b) En el caso del mutante simple (K409E), uno de los homodímeros está desfavorecido por ambas interacciones y al mismo tiempo el heterodímero está desfavorecido también por una de las interacciones. (c) En el caso del mutante doble, ambas interacciones electrostáticas favorecen la formación de heterodímero y desincentivan la formación de homodímero. (d) Mutaciones adicionales que implican cambio de carga (por ejemplo, K360E) podrían utilizarse también para aumentar los efectos de conducción electrostática sobre la formación de heterodímero y homodímero.

Figura 7. Esta figura muestra que podrían utilizarse también interacciones electrostáticas para favorecer la formación de homodímeros y desincentivar la de heterodímeros, cuando se expresan dos cadenas diferentes.

Figura 8. La figura muestra (a) el dibujo esquemático de los constructos utilizados en el Ejemplo. La primera cadena del Fc tiene un maxicuerpo (fragmento variable de cadena simple scFv enlazado covalentemente, y la segunda cadena, denominada Fc simulado, no tiene dominio o funcionalidad alguno fijado(a) a ella. (b) Ilustración de la movilidad relativa esperada en la SDS-PAGE. Dado que la cadena Fc unida al maxicuerpo tiene un peso molecular mayor que el Fc simulado, los homodímeros y heterodímeros tienen movilidad diferente en la SDS-PAGE. El grosor de la banda en la SDS-PAGE puede utilizarse como medida de la fracción de rendimiento de heterodímero y homodímero. El tipo salvaje se incluye como control y para monitorizar la mejora relativa en el rendimiento de heterodímero debida a diversas mutaciones.

Figura 9. Análisis SDS-PAGE que muestra los efectos de mutaciones en el par de interacción D399'-K409.

Figura 10. Análisis SDS-PAGE de las mutaciones de residuos de carga (enumeradas en la Tabla 6) además de las mutaciones de par D399'K-K409D. Se muestran también el tipo salvaje (pista primera) y las mutaciones de botones-en-ojales (pista última) para comparación. En este caso se utilizó una ratio DNA de entrada 1:2 de Fc simulado y maxicuerpo M315.

Figura 11. Transferencia Western que demuestra que ciertas combinaciones de mutante alcanzan selectividad alta para formación de heterodímeros. Las moléculas Fc se detectaron utilizando anticuerpo de cabra anti-Fc humana, conjugado con HRP a 1:10.000.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Esta solicitud describe, en general, una estrategia para alterar la interacción de dominios de anticuerpo, v.g. alterar un dominio CH3 a fin de reducir la capacidad del dominio para interaccionar consigo mismo, es decir, formar homodímeros. En particular, uno o más residuos que constituyen la interfaz CH3-CH3 se reemplaza(n) con un aminoácido cargado de tal modo que la interacción se vuelve electrostáticamente desfavorable. Un aminoácido cargado positivamente en la interfaz, tal como una lisina, arginina, o histidina, se reemplaza con un aminoácido con carga negativa, tal como ácido aspártico o ácido glutámico. Un aminoácido cargado negativamente en la interfaz se

reemplaza con un aminoácido cargado positivamente. El aminoácido puede ser reemplazado con un aminoácido no natural que tiene la característica de carga deseada.

Se describe adicionalmente en esta memoria una estrategia para alteración de un par de dominios CH3 a fin de reducir la capacidad de cada dominio para interactuar consigo mismo pero para aumentar la capacidad de los dominios para interactuar uno con otro, es decir, formar heterodímeros. Esto puede conseguirse por reemplazamiento de uno o más residuos que constituyen la interfaz CH3-CH3 en ambos dominios CH3 con un aminoácido cargado tal que la formación de homodímeros es electrostáticamente desfavorable, pero la heterodimerización es electrostáticamente favorable. En ciertas realizaciones, un aminoácido cargado en cada dominio CH3 se reemplaza con un aminoácido de carga opuesta. Por ejemplo, un aminoácido con carga positiva puede reemplazarse con un aminoácido con carga negativa en el primer dominio CH3, y un aminoácido con carga negativa puede reemplazarse con un aminoácido con carga positiva en el segundo dominio CH3. Por inversión de la carga del aminoácido, se reduce la formación de homodímeros. Cuando los reemplazamientos se coordinan adecuadamente, las cargas inversas son electrostáticamente favorables, es decir cargas opuestas en la interfaz, para formación de heterodimerización.

Un total de 48 estructuras cristalinas de anticuerpos que tenían coordenadas correspondientes a la región Fc se identificaron a partir del Banco de Datos de Proteínas (PDB) (Bernstein, Koetzle et al. 1977) utilizando un algoritmo de búsqueda basado en estructura (Ye y Godzik 2004). El examen de las estructuras cristalinas Fc identificadas reveló que la estructura determinada a resolución máxima corresponde al fragmento Fc de RITUXIMAB unido a una versión minimizada del dominio B de la proteína A denominado Z34C (código PDB = 1L6X). La estructura del homodímero Fc biológico para 1L6X se generó utilizando las coordenadas de monómeros Fc depositadas y simetría cristalina. Se utilizaron dos métodos para identificar los residuos implicados en la interacción de dominios CH3-CH3: (i) contacto como se determinó por el criterio del límite de distancia y (ii) análisis del área de la superficie accesible al disolvente.

Conforme al método basado en contacto, los residuos de la interfaz se definen como residuos cuyos átomos pesados de la cadena lateral están posicionados más próximos que un límite especificado de los átomos pesados de cualesquiera residuos en la segunda cadena. Aunque se prefiere un límite de distancia de 4,5 Å, podría utilizarse también un límite de distancia más largo (por ejemplo, 5,5 Å) a fin de identificar los residuos de interfaz (Bahar y Jernigan 1997).

El segundo método implica el cálculo del área de la superficie accesible al disolvente (ASA) de los residuos del dominio CH3 en presencia y ausencia de la segunda cadena (Lee y Richards 1971). Los residuos que muestran diferencia ($> 1 \text{ Å}^2$) en ASA entre los dos cálculos se identifican como residuos de interfaz. Ambos métodos identificaron un conjunto similar de residuos de interfaz. Adicionalmente, los mismos eran consistentes con el trabajo publicado (Miller 1990).

La Tabla 1 enumera 24 residuos de interfaz identificados basándose en el método del criterio de contacto, utilizando el límite de distancia de 4,5 Å. Estos residuos se examinaron ulteriormente en cuanto a conservación estructural. Para este propósito, 48 estructuras cristalinas Fc identificadas por el PDB se superpusieron y se analizaron calculando la desviación cuadrática media para los átomos pesados de la cadena lateral. Las designaciones de los residuos están basadas en el esquema de numeración EU de Kabat, que corresponde también a la numeración en el Banco de Datos de Proteínas (PDB).

La Figura 3 muestra la interfaz de dominio CH3 junto con las posiciones estructuralmente conservadas, ocultas (% ASA ≤ 10), y expuestas (% ASA > 10) (% ASA se refiere a la ratio de ASA observada frente a la ASA estándar de los aminoácidos; (Lee y Richards 1971)). La conservación de residuos de interfaz entre las subclases IgG Humana y Ratón así como entre otras clases de Ig se examinó también por comparaciones de secuencia (Figura 4).

Tabla 1: Lista de residuos de interfaz de dominio CH3 en la primera cadena (A) y sus residuos de contacto en la segunda cadena (B)^a

Res. de Interfaz en la Cadena A	Residuos de Contacto en la Cadena B
GLN A 347	LYS B 360'
TYR A 349	SER B 354' ASP B 356' GLU B 357' LYS B 360'
THR A 350	SER B 354' ARG B 355'
LEU A 351	LEU B 351' PRO B 352' PRO B 353' SER B 354' THR B 366'
SER A 354	TYR B 349' THR B 350' LEU B 351'
ARG A 355 ^b	THR B 350'

ASP A 356	TYR B 349' LYS B 439'
GLU A 357	TYR B 349' LYS B 370'
<i>LYS A 360^b</i>	GLN B 347' TYR B 349'
SER A 364	LEU B 368' LYS B 370'
THR A 366	LEU B 351' TYR B 407'
LEU A 368	SER B 364' LYS B 409'
LYS A 370	GLU B 357' SER B 364'
ASN A 390	SER B 400'
LYS A 392	LEU B 398' ASP B 399' SER B 400' PHE B 405'
THR A 394	THR B 394' VAL B 397' PHE B 405' TYR B 407'
PRO A 395	VAL B 397'
VAL A 397	THR B 393' THR B 394' PRO B 395'
ASP A 399	LYS B 392' LYS B 409'
SER A 400	ASN B 390' LYS B 392'
PHE A 405	LYS B 392' THR B 394' LYS B 409'
TYR A 407	THR B 366' THR B 394' TYR B 407' SER B 408' LYS B 409'
LYS A 409	LEU B 368' ASP B 399' PHE B 405' TYR B 407'
LYS A 439	ASP B 356'
^a Las posiciones que implican interacción entre residuos de carga opuesta se indican en negrilla. Debido a la simetría doble presente en la interacción de dominios CH3-CH3, cada interacción por pares se representa dos veces en la estructura (por ejemplo, Asp A 356 --- Lys B 439' & Lys A 439 --- Asp B 356'; Figura 5). ^b Las posiciones Arg355 y Lys360 (representadas en cursiva) podrían utilizarse también para aumento de los efectos de conducción electrostática aunque las mismas no están implicadas en interacción con residuos de carga opuesta.	

A pH neutro (= 7,0), los residuos Asp y Glu están cargados negativamente, y Lys, Arg e His están cargados positivamente. Estos residuos cargados pueden utilizarse para promover la formación de heterodímeros y dificultar al mismo tiempo los homodímeros. Tiene lugar una interacción atractiva entre cargas opuestas, y ocurre interacción repulsiva entre cargas iguales. El método aquí presentado hace uso de las interacciones atractivas y repulsivas para promover los heterodímeros y dificultar los homodímeros, respectivamente, por realización de mutagénesis orientada de residuos de interfaz cargados.

El examen de los residuos de interfaz de dominios CH3 identificados (Tabla 1) revela cuatro pares de residuos de carga singulares implicados en la interacción dominio-dominio (Asp356---Lys439', Glu357-Lys370', Lys392---Asp399', Asp399---Lys409'; la numeración de residuos en la segunda cadena se indica por el signo prima '). Estos pares de carga no están implicados necesariamente en la interacción carga-carga en la estructura cristalina aquí utilizada (1L6X), dado que la estructura cristalina es un producto final en el mecanismo de reacción de plegamiento de las proteínas y representa la estructura en el estado cristalino. Se supone aquí que para contar con efectos de conducción electrostática es suficiente que los residuos estén próximos en el espacio como se define por el criterio de límite de distancia (4,5 Å). Debe indicarse también aquí que, debido a la simetría doble presente en la interacción de dominios CH3-CH3, cada interacción singular se representará dos veces en la estructura (por ejemplo, Asp399---Lys409' y Lys409---Asp399'; Figura 5).

Los cuatro pares se clasificaron conforme a la extensión de la accesibilidad al disolvente (análisis ASA) (Lee y Richards 1971). En el caso de Lys 409 -- Asp399', ambos residuos estaban conservados estructuralmente y ocultos. En el caso de otros 3 pares, al menos uno de los miembros del par está expuesto al disolvente (% ASA > 10). Por esta razón, para el Ejemplo presente, el par Lys 409 -- Asp 399' se seleccionó para mutagénesis orientada. La estrategia se muestra esquemáticamente en la Figura 6.

En el tipo salvaje, la interacción K409 -- D399' favorece la formación tanto de heterodímeros como de homodímeros. Una sola mutación que cambia la polaridad de carga (K409E; carga positiva a negativa) en la primera cadena conduce a interacciones desfavorables para la formación del homodímero de la primera cadena. Las interacciones desfavorables se presentan debido a las interacciones repulsivas que existen entre cargas iguales (negativa -- negativa; D399 -- K409E & K409E -- D399). Una mutación similar de cambio de la polaridad de carga (D399'K; carga negativa a positiva) en la segunda cadena conduce a interacciones desfavorables (K409' -- D399'K & D399'K -- K409') para la formación de homodímeros de la segunda cadena. Sin embargo, al mismo tiempo, estas dos mutaciones (K409E & D399'K) conducen a interacciones favorables (K409E -- D399'K & D399 -- K409') para la formación de heterodímeros.

Los efectos de conducción electrostática sobre la formación de heterodímeros y la desincentivación de homodímeros, pueden aumentarse por mutación de residuos de carga adicionales que pueden estar apareados o no con un residuo de carga opuesta en la segunda cadena, tales como Arg355 y Lys 360, como se muestra en la Figura 6d. Las mutaciones representadas en la Figura 6 tienen por objeto únicamente servir de ilustración. La Tabla 2 enumera muchas mutaciones posibles que implican residuos de carga, y las mutaciones pueden combinarse para aumentar los efectos electrostáticos.

Tabla 2a: Lista de algunas posibles mutaciones de residuos de carga por pares a fin de aumentar la formación de heterodímeros^a

Posición en la Primera Cadena	Mutación en la Primera Cadena	Posición Interactiva en la Segunda Cadena	Mutación Correspondiente en la Segunda Cadena
Lys409	Asp o Glu	Asp399'	Lys o Arg ^b
Lys392	Asp o Glu	Asp399'	Lys o Arg ^b
Lys439	Asp o Glu	Asp356'	Lys o Arg ^b
Lys370	Asp o Glu	Glu357'	Lys o Arg ^b
Asp399	Lys o Arg ^b	Lys409'	Asp o Glu
Asp399	Lys o Arg ^b	Lys392'	Asp o Glu
Asp356	Lys o Arg ^b	Lys439'	Asp o Glu
Glu357	Lys o Arg ^b	Lys370'	Asp o Glu

^a Podrían utilizarse también combinaciones de las mutaciones de residuos de carga por pares indicadas anteriormente. Por ejemplo, las mutaciones del par de interacción Lys409 -- Asp399' podrían combinarse con mutaciones del par Lys439 -- Asp 356'.

^b Podría añadirse también histidina (His) a esta lista de residuos cargados positivamente; sin embargo, el aumento en el volumen de la cadena lateral y la dependencia del pH deberían ser tenidos en cuenta en el diseño.

Tabla 2b: Mutaciones de residuos de carga simple adicionales que aumentan los efectos de conducción electrostática^a

Posición en la Cadena 1	Mutación	Posición en la Cadena 2	Mutación
Arg355	Asp o Glu	Arg355'	Asp o Glu
Lys360	Asp o Glu	Lys360'	Asp o Glu

^a Estas mutaciones de residuos simples podrían combinarse con las mutaciones por pares de la Tabla 2a para aumentar la formación de heterodímeros (Figura 6d)

Cada residuo cargado positivamente (Lys y Arg) puede mutarse en dos residuos cargados negativamente (Asp o Glu) y *viceversa*, y como resultado, el método aquí descrito proporciona numerosas combinaciones. Debe indicarse aquí que diferentes combinaciones tendrán diverso efecto sobre la formación de estructura cuaternaria (homodímero/heterodímero) dependiendo de los residuos circundantes en el sitio de mutación y el papel de las moléculas de agua. El aminoácido histidina (His) está cargado positivamente a pH neutro y por tanto se contempla también la mutación de His. Sin embargo, la mutación de residuos cargados negativamente (Asp o Glu) a His conducirá a aumento en el volumen de la cadena lateral, lo cual puede causar problemas estéricos. Adicionalmente, la forma donante y aceptora del promotor de histidina depende del entorno localizado. Estos problemas deberían tenerse en cuenta durante la estrategia de diseño.

Dado que los residuos de interfaz están altamente conservados en las subclases IgG Humana y de Ratón, los efectos de la conducción electrostática pueden aplicarse a IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 Humana o de Ratón. Esta estrategia puede extenderse también a la modificación de residuos sin carga a residuos cargados en la interfaz del dominio CH3. Una estrategia similar concerniente a permutaciones de residuos de carga puede utilizarse también para aumentar la formación de homodímeros e impedir la de heterodímeros cuando se co-expresan dos cadenas pesadas diferentes (Figura 7).

Con objeto de evaluar la estabilidad de los mutantes de residuos cargados, se utilizó software EGAD para estimar la energía libre de enlace de dominios CH3-CH3. Por optimización de los parámetros utilizados en el cálculo, Pokala y Handel pudieron predecir los efectos de aproximadamente 400 mutaciones en la formación de complejos proteína-proteína dentro de un error de 1,0 kcal/mol (Pokala y Handel 2005). Se utilizó EGAD para comparar groseramente la energía libre de enlace de diversas mutaciones realizadas en la interfaz del dominio CH3.

La Tabla 3 enumera la energía libre de enlace calculada ($\Delta\Delta G$) para los mutantes residuales de carga de la interfaz. La energía libre de enlace de un mutante se define como $\Delta\Delta G_{mut} = \mu(\Delta G_{mut} - \Delta G_{wt})$; donde μ ($= 0,1$, en general) es el factor de escalación utilizado para normalizar los cambios predichos en la afinidad de enlace de modo que tengan una pendiente de 1 cuando se comparan con las energías experimentales (Pokala y Handel 2005). La energía libre de disociación (ΔG) se define como la diferencia en energía entre los estados complejo ($\Delta G_{combinado}$) y libre (ΔG_{libre}). La comparación muestra que las mutaciones de residuos cargados afectan a la estabilidad en mucho menor grado comparadas con las mutaciones de botones-en-ojales. Para comparación, se dan las temperaturas de fusión consignadas para el tipo salvaje y los mutantes de botones-en-ojales. Las temperaturas de fusión fueron medidas por Carter y colaboradores utilizando únicamente el constructo del dominio CH3 (Atwell, Ridgway et al. 1997). Para los mutantes de botones-en-ojales, se observó también disminución de entalpía en los experimentos por calorimetría de barrido diferencial.

Tabla 3: Energía libre de enlace del dominio CH3-CH3 para diversos mutantes diseñados a fin de aumentar la formación de heterodímeros, calculada utilizando el programa EGAD (Pokala y Handel 2005^a)

Proteína	Descripción	ΔG (en kcal/mol)	$\Delta\Delta G_{mut}$ (en kcal/mol)	Temp. de Fusión T_m (en °C)
WT	Tipo Salvaje	-30,69	0	80,4
T366W-Y407'A	Botón-en-ojal	-24,60	6,09	65,4
T366W-T366'S-L368'A-Y407'V	Botón-en-ojal	-28,57	2,12	69,4
K409E-D399'K	Carga -Carga	-29,56	1,13	ND
K409E-D399'R	Carga-Carga	-29,47	1,22	ND
K409D-D399'K	Carga-Carga	-28,16	2,53	ND
K409D-D399'R	Carga-Carga	-27,69	3,00	ND
K392E-D399'R	Carga-Carga	-29,27	1,42	ND
K392E-D399'K	Carga-Carga	-29,87	0,82	ND
K392D-D399'R	Carga-Carga	-28,82	1,87	ND

Proteína	Descripción	ΔG (en kcal/mol)	$\Delta\Delta G_{mut}$ (en kcal/mol)	Temp. de Fusión T_m (en °C)
K392D-D399'R	Carga-Carga	-29,42	1,27	ND

^a No todos los pares carga-carga posibles se consideraron para el cálculo de energía libre de enlace. El tipo salvaje se incluye para comparación. ΔG se define como la diferencia de energía entre los estados complejo y libre. La energía de enlace de un mutante ($\Delta\Delta G_{mut}$) se define como diferencia entre las energías libres del mutante (ΔG_{mut}) y el tipo salvaje (ΔG_{wt})

La Figura 2 representa varias realizaciones que comprenden moléculas heterodímeras Fc, desde anticuerpos biespecíficos a complejos de receptores heterodímeros. Las dos cadenas pesadas de las moléculas Fc heterodímeras pueden fusionarse con proteínas y/o dominios que tienen funcionalidades diferentes. Por ejemplo, la fusión de Fabs que se fijan a antígenos diferentes conducirá a anticuerpos biespecíficos (BsAbs). La fusión de dos dominios Fv de cadena simple diferentes (scFv; cadena ligera y pesada variables unidas por un enlazador peptídico flexible) conducirá a maxicuerpos biespecíficos. Adicionalmente, los dominios o proteínas que interaccionan por razones funcionales pueden fusionarse también con Fc heterodímero para el propósito de desarrollar ensayos funcionales o para usos terapéuticos. Por ejemplo, en la familia de receptores hematopoyéticos gp130 es conocido por interaccionar con otros receptores tales como el Receptor del Factor Inhibidor de la Leucemia (LIFR). El dominio celular adicional (ECD) de gp130 puede fusionarse a la primera cadena pesada de Fc, y el ECD de LIFR puede fusionarse a la segunda cadena pesada de Fc, lo cual puede conducir a la formación de complejo gp130-LIFR que mimetiza probablemente el estado biológico. Dado que el sitio de enlace de FcRn está localizado en la región Fc, es probable que las moléculas de fusión Fc tengan semivida en suero prolongada - una característica que distingue las moléculas heterodímeras Fc de otras moléculas heterodímeras tales como las proteínas de fusión de cremallera de leucina (Liu, Caderas et al. 2001). No es esencial tener funcionalidades diferentes unidas a las dos cadenas pesadas del heterodímero Fc. Puede crearse también un monocuerpo (Figura 2).

En ciertas realizaciones, v.g., cuando se producen anticuerpos biespecíficos, cadenas ligeras diferentes múltiples pueden coexpresarse con las cadenas pesadas diferentes múltiples. Para aumentar la fidelidad de cada cadena ligera que se fija a la cadena pesada apropiada manteniendo con ello la especificidad de la "rama" del anticuerpo, los dominios CH1 de una o más de las cadenas pesadas y la región constante de una o más de las cadenas ligeras pueden diseñarse para favorecer la dimerización. Preferiblemente, esto se realiza utilizando una técnica de conducción electrostática similar a la arriba descrita para los dominios CH3.

Se analizó la interacción de la secuencia de la cadena ligera kappa correspondiente al código de deposición del Banco de Datos de Proteínas (PDB) 1N0X (SEQ ID NO: 25) y la cadena ligera lambda correspondiente al código de deposición (PDB) 7FAB (SEQ ID NO: 26) con la secuencia de cadena pesada correspondiente al dominio CH1 de IgG1 (SEQ ID NO: 27). Los contactos cadena ligera lambda-cadena pesada dentro de la interfaz se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4: Lista de residuos de interfaz cadena ligera lambda y sus residuos de contacto en la cadena pesada^a

<i>Res. de Interfaz en la Cadena Ligera Lambda</i>	<i>Residuos de Contacto en la Cadena Pesada</i>
THR L 112	ALA H 141
PHE L 114	LEU H 128 ALA H 129 ALA H 141 LEU H 142 GLY H 143 VAL H 185
SER L 117	PHE H 126 PRO H 127
GLU L 119	VAL H 125 PHE H 126 PRO H 127 LYS H 213
GLU L 120	PHE H 126
LYS L 125	LYS H 147 ASP H 148
THR L 127	LEU H 145 LYS H 147
VAL L 129	LEU H 128 LEU H 145 SER H 183

<i>Res. de Interfaz en la Cadena Ligera Lambda</i>	<i>Residuos de Contacto en la Cadena Pesada</i>
LEU L 131	PHE H 170 SER H 183 VAL H 185
SER L 133	HIS H 168 PHE H 170
GLU L 156	VAL H 173 LEU H 174 GLN H 175 SER H 176
THR L 158	PRO H 171 ALA H 172 VAL H 173
SER L 161	PRO H 171
GLN L 163	HIS H 168
ALA L 169	HIS H 168 PHE H 170
SER L 171	PHE H 170 PRO H 171
TYR L 173	LEU H 145 VAL H 173 SER H 181 LEU H 182 SER H 183
^a Los residuos de contacto se identificaron utilizando el criterio del límite de distancia 4,5 Å. El esquema de numeración de las cadenas ligera y pesada corresponde al del archivo de coordenadas depositado (código PDB: 7FAB).	

Los contactos cadena ligera kappa-cadena pesada dentro de la interfaz se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5: Lista de residuos de interfaz cadena ligera kappa y sus residuos de contacto en la cadena pesada^a

<i>Res. de Interfaz en la Cadena Ligera Kappa</i>	<i>Residuos de Contacto en la Cadena Pesada</i>
PHE 116	THR H 139 ALA H 140 ALA H 141
PHE 118	LEU H 128 ALA H 129 PRO H 130 ALA H 141 LEU H 142
SER 121	PHE H 126 PRO H 127
ASP 122	LYS H 218
GLU 123	VAL H 125 PHE H 126 LYS H 213
GLN 124	PHE H 126 LEU H 145 LYS H 147
SER 131	LEU H 145 LYS H 147
VAL 133	LEU H 128
LEU 135	ALA H 141 PHE H 170 VAL H 185
ASN 137	HIS H 168 THR H 187
ASN 138	HIS H 168
GLN 160	VAL H 173 LEU H 174 GLN H 175
SER 162	PHE H 170 PRO H 171 VAL H 173

<i>Res. de Interfaz en la Cadena Ligera Kappa</i>	<i>Residuos de Contacto en la Cadena Pesada</i>
THR 164	THR H 169 PHE H 170 PRO H 171
SER 174	HIS H 168 PHE H 170
SER 176	PHE H 170 SER H 183

^a Los residuos de contacto se identificaron utilizando el criterio del límite de distancia 4,5 Å. El esquema de numeración de la cadena ligera corresponde al del archivo de coordenadas depositado (código PDB: 1N0X). El esquema de numeración de la cadena pesada corresponde al de la Tabla 4.

Lys125 de la cadena lambda puede mutarse a un aminoácido cargado negativamente, y una mutación correspondiente puede realizarse en una cadena pesada en Asp148, cambiando el residuo a un aminoácido con carga positiva. Alternativa o adicionalmente, Glu119 de la cadena lambda puede mutarse a un aminoácido con carga positiva, una mutación correspondiente puede realizarse en una cadena pesada en Lys213, que cambia el residuo a un aminoácido cargado negativamente.

El análisis de la interacción cadena ligera-cadena pesada revelaba posiciones en las cuales podrían introducirse pares de carga en la secuencia para aumentar la fijación de un par específico de cadenas ligera y pesada. Estas posiciones incluyen Thr112 de lambda y Ala141 de la cadena pesada, Glu156 de lambda y Ser176 de la cadena pesada, y Ser171 de lambda y Ser183 de la cadena pesada y otras posiciones representadas en las Tablas 4 y 5 en negrilla.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Este ejemplo demuestra que pueden diseñarse dominios CH3 para favorecer la heterodimerización al mismo tiempo que se desincentiva la homodimerización utilizando efectos de conducción electrostática. Se fabricó un constructo Fc simulado - maxicuerpo como se muestra en la Figura 8(a) que tenía mutaciones de residuos de carga en la interfaz del dominio CH3. La formación de rendimiento de homodímero y heterodímero se evaluó por electroforesis en gel SDS-poliacrilamida. Dado que el maxicuerpo tiene un peso molecular mayor comparado con el Fc simulado, el heterodímero (Fc simulado - maxicuerpo) y los homodímeros (maxicuerpo-maxicuerpo y Fc simulado - Fc simulado) tienen movilidad diferente en la SDS-PAGE, lo que facilita la identificación de los diversos pares (FIG. 8(b)).

Se generó un anticuerpo NKG2D de rata anti-ratón, diseñado M315, por fusiones de hibridoma convencionales y se utilizaron las secuencias de DNA que codificaban la cadena pesada variable (VH) y la cadena ligera variable (VL) para construir M315 scFv-Fc utilizando un método descrito previamente (Gilliland, Norris et al. 1996).

La secuencia de M315 scFv-Fc (SEQ ID NO: 1) y hulG1Fc (SEQ ID NO: 2) se clonaron en el vector de expresión de mamífero pTT5 y los dos constructos se utilizaron para co-transfectar células 293-6E a fin de evaluar la formación de heterodímero Fc/scFv-Fc con relación a homodímero Fc y homodímero scFv-Fc.

SEQ ID NO: 1

M315scFv-huFc

HMAEVQLQQSGAELVKPGSSVKISCKASGYTFANNFMHWIKQQPGNGLEW
IGWIYPGDGDTEYNQKFSKGATLTADKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYFCI
RLTEGTTYWGQGVMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGQFVLTQPNVSTNLGS
TVKLSCKRSTGNIGSNVNWYQQHEGRSPTTMIYRDDKRPDGVDPDRFSGS
IDGSSNSALLTINNVTQTEDEADYFCQSYSRGVSPVFGGGTKLTVLAAAEF
KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTQ
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 2

huIgG1-Fc

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPDTLMISRTPEVTCVVDVDS

HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK

EYKCKVSNKALPAPAEKTKISKAKCQPREPPQVATLPPSRSEEMTKNOVSETC

LVKGFYPSDIAVEWESNCPENNYKATPPVALDSECSFELMSKGTVDKSRW

QCGNVEFSCSYMHEALHNHYTOKSLFSLSPCK

5

(El sombreado corresponde a la región Fc).

Los pares de residuos de carga en la región CH3 identificada por análisis computacional se cambiaron a aminoácido de polaridad de carga opuesta en los constructos humanos IgG1Fc (simulado) o M315 scFv-Fc (mx). Las mutaciones, que se enumeran en la Tabla 6, se generaron utilizando el kit de mutagénesis QuikChange® de Stratagene y se comprobaron por secuenciación de DNA. Las mutaciones se designan por el residuo de tipo salvaje seguido por la posición utilizando el sistema de numeración de Kabat (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, Md., ed. 5. [1991]), que es consistente con el esquema de numeración de la estructura cristalina (código PDB: 1L6X), y luego con el residuo de sustitución en código de una sola letra. La secuencia Fc utilizada en estos dos constructos se derivaba de IgG1 humana alotipo "no-(a)", que tiene un Glu en posición 356 y un Met en posición 358. Las secuencias CH3 de la estructura cristalina son de un alotipo IgG1 diferente, que tiene un Asp en posición 356 y un Leu en posición 368.

TABLA 6: Lista de mutaciones de residuos de carga

huIgG1Fc (simulado)	M315 scFv-Fc(mx)
Fc-WT	M315 scFv-Fc(WT)
K409D	D399'K
K409E	D399'R
K409D&K360D	D399'K&E356'K
K409D&K370D	D399'K&E357'K
K409D&K392D	D399'K&E356'K&E357'K
K409D&K439D	

Se transfectó DNA en el linaje de células de riñón de embrión humano 293-6E utilizando reactivo Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen). El sobrenadante de cultivo de células se cosechó 3-4 días después de la transfección y se analizó en Geles SDS-PAGE en condición no reducida. El gel se transfirió luego a una membrana de nitrocelulosa y se sometió a análisis Western utilizando el anticuerpo IgG anti-humana de cabra conjugado con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch Laboratories) y los resultados se muestran en Fig. 10.

La co-transfección del vector de expresión para M315 scFv-Fc (mx) junto con Fc simulado dio como resultado la formación de heterodímero scFv-Fc/Fc así como homodímero scFv-Fc y homodímero Fc. La ratio de heterodímero scFv-Fc/Fc a homodímero scFv-Fc y homodímero Fc está próxima a 1:1:1, cuando se utiliza la secuencia CH3 de tipo salvaje.

La introducción de una mutación de par de cargas K409D en Fc simulado y D399'K en el maxicuerpo M315 aumentaba significativamente la ratio de heterodímero scFv-Fc con relación al homodímero scFv-Fc así como al homodímero Fc. Se observó también un aumento similar de la formación heterodímero para otras variantes mutantes tales como K409D/D399'R, K409E/D399'K y K409E/D399'R (Fig. 9), que subrayaba adicionalmente la importancia de la complementación de la polaridad de carga para la formación de heterodímeros de Fc. (El

constructo M315 scFv-Fc de tipo salvaje utilizado en este estudio tiene una etiqueta extra en el terminal carboxilo de Fc, por lo que migra más lentamente en el gel SDS-PAGE.)

- 5 Cuando se introdujeron mutaciones adicionales en los residuos de carga que están localizados cerca de K409, tales como K360 y K392, se observó un aumento adicional de la formación de heterodímeros (Fig. 10). Por ejemplo, la combinación K409D; K392D en Fc simulado con D399'K en el maxicuerpo M315 demostró que aumentaba la ratio de heterodímero a homodímeros, debido probablemente a la disrupción del homodímero Fc. Una banda de 25 KD correspondiente al tamaño del monómero Fc se detectaba en todas las transfecciones utilizando K409D; K392D Fc simulado (datos no presentados). La adición de otra mutación tal como D356'K o D357'K encima de la variante D399'K del maxicuerpo M315 exhibía una mejora adicional. La combinación de K409D; K392D en Fc simulado con D399'K; D356'K en el maxicuerpo M315 daba como resultado una formación casi exclusiva de heterodímero. Otras combinaciones tales como K409D; K392D/D399'K; D357'K y K409D; K370D/D399'K; D357'K ofrecían también una mejora significativa con respecto a la variante K409D/D399'K.
- 10

Tabla 7: Cuantificación del porcentaje de rendimientos de homodímero y heterodímero para la SDS-PAGE representada en la Figura 10^a.

Fc simulado	WT	K409D;K360D	K409D;K392D	K409D;K392D	K409D;K392D	K409D;K439D	K409D;K370D	T366S;L368A;Y407V (Botón)
M315 scFv-Fc	WT	D399'K	D399'K	D399'K;E356'K	D399'K;E357'K	D399'K;E356'K	D399'K;E357'K	T366'W (Ojal)
M315 scFv-Fc Homodímero	25,5	16,8	23,1	ND	ND	ND	ND	13,3
M315 scFv-Fc – Fc simulado Heterodímero	32,4	55,1	76,9	100	79,1	92,3	85,2	86,7
Fc simulado Homodímero	42,1	28,1	ND	ND	20,9	7,7	14,8	ND

5 ^aND significa No Detectable en el análisis basado en densidad.

Ejemplo 2

Este ejemplo demuestra que los dominios CH3 que contienen ciertas mutaciones triples de par de carga eran incapaces de formar homodímeros cuando se expresaban solos, pero eran capaces de formar heterodímeros cuando se co-expresaban. Se produjeron mutantes y las células se transfectaron como se describe en el Ejemplo 1. Cuando los constructos se sometieron a co-transfección, se utilizó una ratio de plásmidos 1:1. Los resultados se muestran en la Figura 11. Los heterodímeros y homodímeros se detectaron por transferencia Western utilizando anticuerpo anti-Fc humano de cabra conjugado con HRP. Es interesante que las moléculas que contenían Fc que tenían mutaciones triples en las que los residuos cargados positivamente se cambiaron a residuos cargados negativamente (K409D, K392D, K370D o K409D, K392D, K439D) no podían ser detectadas cuando se expresaban solas. Análogamente, las moléculas que contenían Fc que tenían mutaciones triples en las que residuos con carga negativa se cambiaban a residuos con carga positiva (D399K, E356K, E357K) no podían detectarse cuando se expresaban solas. En cambio, cuando se co-expresaban con una molécula que contenía Fc que tenía mutaciones de polaridad de carga opuesta, se detectaban únicamente heterodímeros.

A todo lo largo de esta solicitud de patente de invención, debe entenderse que el uso de un término en singular puede implicar, en caso apropiado, el uso del término respectivo en plural, y *viceversa*.

- Atwell, S., J. B. Ridgway, et al. (1997). "Stable heterodimers from remodeling the domain interface of a homodimer using a phage display library." J Mol Biol 270(1): 26-35.
- 5 Bahar, I. y R. L. Jernigan (1997). "Inter-residue potentials in globular proteins and the dominance of highly specific hydrophilic interactions at close separation." J Mol Biol 266(1): 195-214.
- Bernstein, F. C., T. F. Koetzle, et al. (1977). "The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures." J Mol Biol 112(3): 535-42.
- Bogan, A. A. y K. S. Thorn (1998). "Anatomy of hot spots in protein interfaces." J Mol Biol 280(1): 1-9.
- 10 Carter, P. (2001). "Bispecific human IgG by design." J Immunol Methods 248(1-2): 7-15.
- Crick, F. H. (1952). "Is alpha-keratin a coiled coil?" Nature 170(4334): 882-3.
- de Leij, L., G. Molema, et al. (1998). "Bispecific antibodies for treatment of cancer in experimental animal models and man." Adv Drug Deliv Rev 31(1-2): 105-129.
- 15 Deisenhofer, J. (1981). "Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from Staphylococcus aureus at 2.9- and 2.8-A resolution." Biochemistry 20(9): 2361-70.
- Gabdoulline, R. R. y R. C. Wade (2002). "Biomolecular diffusional association." Curr Opin Struct Biol 12(2): 204-13.
- 20 Ghetie, V. y E. S. Ward (2000). "Multiple roles for the major histocompatibility complex class I-related receptor FcRn." Annu Rev Immunol 18: 739-66.
- Gilliland, L. K., N. A. Norris, et al. (1996). "Rapid and reliable cloning of antibody variable regions and generation of recombinant single chain antibody fragments." Tissue Antigens 47(1): 1-20
- Halperin, I., H. Wolfson, et al. (2004). "Protein-protein interactions; coupling of structurally conserved residues and of hot spots across interfaces. Implications for docking." Structure 12(6): 1027-38.
- 25 Huber, R. (1984). "Three-dimensional structure of antibodies." Behring Inst Mitt(76): 1-14.
- Idusogie, E. E., L. G. Presta, et al. (2000). "Mapping of the C1q binding site on rituxan, a chimeric antibody with a human IgG1 Fc." J Immunol 164(8): 4178-84.
- Joachimiak, L. A., T. Kortemme, et al. (2006). "Computational design of a new hydrogen bond network and at least a 300-fold specificity switch at a protein-protein interface." J Mol Biol 361(1): 195-208.
- 30 King, D. J., J. R. Adair, et al. (1992). "Expression, purification and characterization of a mouse-human chimeric antibody and chimeric Fab' fragment." Biochem J 281 (Pt 2): 317-23.
- Kortemme, T. y D. Baker (2004). "Computational design of protein-protein interactions." Curr Opin Chem Biol 8(1): 91-7.
- 35 Kortemme, T., L. A. Joachimiak, et al. (2004). "Computational redesign of protein-protein interaction specificity." Nat Struct Mol Biol 11(4): 371-9.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature 227(5259): 680-5.
- Lee, B. y F. M. Richards (1971). "The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility." J Mol Biol 55(3): 379-400.
- 40 Liu, N., G. Caderas, et al. (2001). "Fusion proteins from artificial and natural structural modules." Curr Protein Pept Sci 2(2): 107-21.
- Maizel, J. V., Jr., D. F. Summers, et al. (1970). "SDS-acrylamide gel electrophoresis and its application to the proteins of poliovirus- and adenovirus-infected human cells." J Cell Physiol 76(3): 273-87.
- 45 Martin, W. L., A. P. West, Jr., et al. (2001). "Crystal structure at 2.8 Å of an FcRn/heterodimeric Fc complex: mechanism of pH-dependent binding." Mol Cell 7(4): 867-77.

- Marvin, J. S. y H. B. Lowman (2003). "Redesigning an antibody fragment for faster association with its antigen." *Biochemistry* 42(23): 7077-83.
- Matthews, B. W. (1995). "Studies on protein stability with T4 lysozyme." *Adv Protein Chem* 46: 249-78.
- 5 Merchant, A. M., Z. Zhu, et al. (1998). "An efficient route to human bispecific IgG." *Nat Biotechnol* 16(7): 677-81.
- Miller, S. (1990). "Protein-protein recognition and the association of immunoglobulin constant domains." *J Mol Biol* 216(4): 965-73.
- Nolan, O. y R. O'Kennedy (1990). "Bifunctional antibodies: concept, production and applications." *Biochim Biophys Acta* 1040(1): 1-11.
- 10 Papadea, C. y I. J. Check (1989). "Human immunoglobulin G and immunoglobulin G subclasses: biochemical, genetic, and clinical aspects." *Crit Rev Clin Lab Sci* 27(1): 27-58.
- Pokala, N. y T. M. Handel (2005). "Energy functions for protein design: adjustment with protein-protein complex affinities, models for the unfolded state, and negative design of solubility and specificity." *J Mol Biol* 347(1): 203-27.
- 15 Raghavan, M. y P. J. Bjorkman (1996). "Fc receptors and their interactions with immunoglobulins." *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 181-220.
- Ridgway, J. B., L. G. Presta, et al. (1996). "'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization." *Protein Eng* 9(7): 617-21.
- 20 Roux, K. H. (1999). "Immunoglobulin structure and function as revealed by electron microscopy." *Int Arch Allergy Immunol* 120(2): 85-99.
- Schreiber, G., Y. Shaul, et al. (2006). "Electrostatic design of protein-protein association rates." *Methods Mol Biol* 340: 235-49.
- Selzer, T., S. Albeck, et al. (2000). "Rational design of faster associating and tighter binding protein complexes." *Nat Struct Biol* 7(7): 537-41.
- 25 Sheinerman, F. B., R. Norel, et al. (2000). "Electrostatic aspects of protein-protein interactions." *Curr Opin Struct Biol* 10(2): 153-9.
- Sondermann, P., R. Huber, et al. (2000). "The 3.2-A crystal structure of the IgG1 Humana Fc fragment-Fc gammaRIII complex." *Nature* 406(6793): 267-73.
- 30 Sowdhamini, R., N. Srinivasan, et al. (1989). "Stereochemical modeling of disulfide bridges. Criteria for introduction into proteins by site-directed mutagenesis." *Protein Eng* 3(2): 95-103.
- Szczepek, M., V. Brondani, et al. (2007). "Structure-based redesign of the dimerization interface reduces the toxicity of zinc-finger nucleases." *Nat Biotechnol* 25(7): 786-93.
- Ye, Y. y A. Godzik (2004). "FATCAT: a web server for flexible structure comparison and structure similarity searching." *Nucleic Acids Res* 32(Web Server issue): W582-5.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> AMGEN INC.

KANNAN, Gunasekaran

WITTEKIND, Michael

YAN, Wei

PENTONY, Martin

<120> MÉTODO PARA FABRICACIÓN DE MOLÉCULAS HETERODÍMERAS FC DE ANTICUERPOS
UTILIZANDO EFECTOS DE CONDUCCIÓN ELECTROSTÁTICA

<130> A-1392-WO-PCT

<140> PCT/US2009/000071

<141> 2009-01-06

<150> 61/019,569

<151> 2008-01-07

<150> 61/120,305

<151> 2008-12-05

<160> 27

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 480

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> M315scFv-huFc

<400> 1

ES 2 774 337 T3

His	Met	Ala	Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Lys
1				5					10					15	
Pro	Gly	Ser	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe
			20					25					30		
Ala	Asn	Asn	Phe	Met	His	Trp	Ile	Lys	Gln	Gln	Pro	Gly	Asn	Gly	Leu
		35					40					45			
Glu	Trp	Ile	Gly	Trp	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Glu	Tyr	Asn
	50					55					60				
Gln	Lys	Phe	Ser	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser
65					70					75					80
Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Asn	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val
				85					90					95	
Tyr	Phe	Cys	Ile	Arg	Leu	Thr	Glu	Gly	Thr	Thr	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
			100					105					110		

ES 2 774 337 T3

Val Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Phe Val Leu Thr Gln Pro Asn Ser Val
130 135 140

Ser Thr Asn Leu Gly Ser Thr Val Lys Leu Ser Cys Lys Arg Ser Thr
145 150 155 160

Gly Asn Ile Gly Ser Asn Tyr Val Asn Trp Tyr Gln Gln His Glu Gly
165 170 175

Arg Ser Pro Thr Thr Met Ile Tyr Arg Asp Asp Lys Arg Pro Asp Gly
180 185 190

Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ile Asp Gly Ser Ser Asn Ser Ala
195 200 205

Leu Leu Thr Ile Asn Asn Val Gln Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe
210 215 220

Cys Gln Ser Tyr Ser Arg Gly Val Ser Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr
225 230 235 240

Lys Leu Thr Val Leu Ala Ala Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
245 250 255

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
260 265 270

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
275 280 285

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
290 295 300

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
305 310 315 320

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
325 330 335

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
340 345 350

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr

ES 2 774 337 T3

355 360 365
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 370 375 380
 Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 385 390 395 400
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 405 410 415
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 420 425 430
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 435 440 445
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 450 455 460
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470 475 480

<210> 2

<211> 232

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 65 70 75 80
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95

ES 2 774 337 T3

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 3

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

ES 2 774 337 T3

65					70						75				80
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
				85					90					95	
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
			100					105					110		
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
		115					120					125			
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
	130					135					140				
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
145						150				155					160
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
				165					170					175	
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
			180					185					190		
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
		195					200					205			
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
	210					215					220				
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu
225					230					235					240
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
				245					250					255	
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
			260					265					270		
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
		275					280					285			
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
	290					295					300				
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
305						310				315					320
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
					325				330						

<210> 4

<211> 326

ES 2 774 337 T3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	1	5	10	15
Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	20	25	30	
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	35	40	45	
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	50	55	60	
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	65	70	75	80
Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	85	90	95	
Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	100	105	110	
Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	115	120	125	
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	130	135	140	
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	145	150	155	160
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	165	170	175	
Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	180	185	190	

ES 2 774 337 T3

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 195 200 205
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270
 Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

<210> 5

<211> 377

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

ES 2 774 337 T3

Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
 100 105 110

Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
 115 120 125

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
 130 135 140

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
 145 150 155 160

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 165 170 175

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 180 185 190

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
 195 200 205

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 210 215 220

Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 225 230 235 240

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 245 250 255

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
 260 265 270

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 275 280 285

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 290 295 300

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 305 310 315 320

ES 2 774 337 T3

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
325 330 335

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
340 345 350

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
355 360 365

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
370 375

<210> 6

<211> 327

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp

ES 2 774 337 T3

145		150		155		160									
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe
				165					170					175	
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp
			180					185					190		
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu
		195					200					205			
Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg
	210					215					220				
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys
225					230					235					240
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp
				245					250					255	
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys
			260					265					270		
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser
		275					280					285			
Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser
	290					295					300				
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser
305					310					315					320
Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys									
				325											

<210> 7

<211> 353

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Ala	Ser	Pro	Thr	Ser	Pro	Lys	Val	Phe	Pro	Leu	Ser	Leu	Cys	Ser	Thr
1				5					10					15	
Gln	Pro	Asp	Gly	Asn	Val	Val	Ile	Ala	Cys	Leu	Val	Gln	Gly	Phe	Phe
			20					25					30		

ES 2 774 337 T3

Pro Gln Glu Pro Leu Ser Val Thr Trp Ser Glu Ser Gly Gln Gly Val
 35 40 45
 Thr Ala Arg Asn Phe Pro Pro Ser Gln Asp Ala Ser Gly Asp Leu Tyr
 50 55 60
 Thr Thr Ser Ser Gln Leu Thr Leu Pro Ala Thr Gln Cys Leu Ala Gly
 65 70 75 80
 Lys Ser Val Thr Cys His Val Lys His Tyr Thr Asn Pro Ser Gln Asp
 85 90 95
 Val Thr Val Pro Cys Pro Val Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro
 100 105 110
 Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Cys Cys His Pro Arg Leu Ser
 115 120 125
 Leu His Arg Pro Ala Leu Glu Asp Leu Leu Leu Gly Ser Glu Ala Asn
 130 135 140
 Leu Thr Cys Thr Leu Thr Gly Leu Arg Asp Ala Ser Gly Val Thr Phe
 145 150 155 160
 Thr Trp Thr Pro Ser Ser Gly Lys Ser Ala Val Gln Gly Pro Pro Glu
 165 170 175
 Arg Asp Leu Cys Gly Cys Tyr Ser Val Ser Ser Val Leu Pro Gly Cys
 180 185 190
 Ala Glu Pro Trp Asn His Gly Lys Thr Phe Thr Cys Thr Ala Ala Tyr
 195 200 205
 Pro Glu Ser Lys Thr Pro Leu Thr Ala Thr Leu Ser Lys Ser Gly Asn
 210 215 220
 Thr Phe Arg Pro Glu Val His Leu Leu Pro Pro Pro Ser Glu Glu Leu
 225 230 235 240
 Ala Leu Asn Glu Leu Val Thr Leu Thr Cys Leu Ala Arg Gly Phe Ser
 245 250 255
 Pro Lys Asp Val Leu Val Arg Trp Leu Gln Gly Ser Gln Glu Leu Pro
 260 265 270

ES 2 774 337 T3

Arg Glu Lys Tyr Leu Thr Trp Ala Ser Arg Gln Glu Pro Ser Gln Gly
275 280 285

Thr Thr Thr Phe Ala Val Thr Ser Ile Leu Arg Val Ala Ala Glu Asp
290 295 300

Trp Lys Lys Gly Asp Thr Phe Ser Cys Met Val Gly His Glu Ala Leu
305 310 315 320

Pro Leu Ala Phe Thr Gln Lys Thr Ile Asp Arg Leu Ala Gly Lys Pro
325 330 335

Thr His Val Asn Val Ser Val Val Met Ala Glu Val Asp Gly Thr Cys
340 345 350

Tyr

<210> 8

<211> 384

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Ala Pro Thr Lys Ala Pro Asp Val Phe Pro Ile Ile Ser Gly Cys Arg
1 5 10 15

His Pro Lys Asp Asn Ser Pro Val Val Leu Ala Cys Leu Ile Thr Gly
20 25 30

Tyr His Pro Thr Ser Val Thr Val Thr Trp Tyr Met Gly Thr Gln Ser
35 40 45

Gln Pro Gln Arg Thr Phe Pro Glu Ile Gln Arg Arg Asp Ser Tyr Tyr
50 55 60

Met Thr Ser Ser Gln Leu Ser Thr Pro Leu Gln Gln Trp Arg Gln Gly
65 70 75 80

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

Ile Phe Arg Trp Pro Glu Ser Pro Lys Ala Gln Ala Ser Ser Val Pro
100 105 110

Thr Ala Gln Pro Gln Ala Glu Gly Ser Leu Ala Lys Ala Thr Thr Ala
115 120 125

ES 2 774 337 T3

Pro Ala Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys
 130 135 140
 Glu Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu
 145 150 155 160
 Cys Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val Tyr Leu Leu Thr Pro Ala
 165 170 175
 Val Gln Asp Leu Trp Leu Arg Asp Lys Ala Thr Phe Thr Cys Phe Val
 180 185 190
 Val Gly Ser Asp Leu Lys Asp Ala His Leu Thr Trp Glu Val Ala Gly
 195 200 205
 Lys Val Pro Thr Gly Gly Val Glu Glu Gly Leu Leu Glu Arg His Ser
 210 215 220
 Asn Gly Ser Gln Ser Gln His Ser Arg Leu Thr Leu Pro Arg Ser Leu
 225 230 235 240
 Trp Asn Ala Gly Thr Ser Val Thr Cys Thr Leu Asn His Pro Ser Leu
 245 250 255
 Pro Pro Gln Arg Leu Met Ala Leu Arg Glu Pro Ala Ala Gln Ala Pro
 260 265 270
 Val Lys Leu Ser Leu Asn Leu Leu Ala Ser Ser Asp Pro Pro Glu Ala
 275 280 285
 Ala Ser Trp Leu Leu Cys Glu Val Ser Gly Phe Ser Pro Pro Asn Ile
 290 295 300
 Leu Leu Met Trp Leu Glu Asp Gln Arg Glu Val Asn Thr Ser Gly Phe
 305 310 315 320
 Ala Pro Ala Arg Pro Pro Pro Gln Pro Gly Ser Thr Thr Phe Trp Ala
 325 330 335
 Trp Ser Val Leu Arg Val Pro Ala Pro Pro Ser Pro Gln Pro Ala Thr
 340 345 350
 Tyr Thr Cys Val Val Ser His Glu Asp Ser Arg Thr Leu Leu Asn Ala
 355 360 365
 Ser Arg Ser Leu Glu Val Ser Tyr Val Thr Asp His Gly Pro Met Lys
 370 375 380

<210> 9

<211> 428

<212> PRT

ES 2 774 337 T3

<213> Homo sapiens

<400> 9

Ala	Ser	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Thr	Arg	Cys	Cys	Lys
1				5					10					15	
Asn	Ile	Pro	Ser	Asn	Ala	Thr	Ser	Val	Thr	Leu	Gly	Cys	Leu	Ala	Thr
			20					25					30		
Gly	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Met	Val	Thr	Trp	Asp	Thr	Gly	Ser	Leu
		35					40					45			
Asn	Gly	Thr	Thr	Met	Thr	Leu	Pro	Ala	Thr	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Gly
	50					55					60				
His	Tyr	Ala	Thr	Ile	Ser	Leu	Leu	Thr	Val	Ser	Gly	Ala	Trp	Ala	Lys
65					70					75					80
Gln	Met	Phe	Thr	Cys	Arg	Val	Ala	His	Thr	Pro	Ser	Ser	Thr	Asp	Trp
				85					90					95	
Val	Asp	Asn	Lys	Thr	Phe	Ser	Val	Cys	Ser	Arg	Asp	Phe	Thr	Pro	Pro
			100					105					110		
Thr	Val	Lys	Ile	Leu	Gln	Ser	Ser	Cys	Asp	Gly	Gly	Gly	His	Phe	Pro
		115					120					125			
Pro	Thr	Ile	Gln	Leu	Leu	Cys	Leu	Val	Ser	Gly	Tyr	Thr	Pro	Gly	Thr
	130					135					140				
Ile	Asn	Ile	Thr	Trp	Leu	Glu	Asp	Gly	Gln	Val	Met	Asp	Val	Asp	Leu
145					150					155					160
Ser	Thr	Ala	Ser	Thr	Thr	Gln	Glu	Gly	Glu	Leu	Ala	Ser	Thr	Gln	Ser
				165					170					175	
Glu	Leu	Thr	Leu	Ser	Gln	Lys	His	Trp	Leu	Ser	Asp	Arg	Thr	Tyr	Thr
			180					185					190		
Cys	Gln	Val	Thr	Tyr	Gln	Gly	His	Thr	Phe	Glu	Asp	Ser	Thr	Lys	Lys

ES 2 774 337 T3

195					200					205					
Cys	Ala	Asp	Ser	Asn	Pro	Arg	Gly	Val	Ser	Ala	Tyr	Leu	Ser	Arg	Pro
210						215					220				
Ser	Pro	Phe	Asp	Leu	Phe	Ile	Arg	Lys	Ser	Pro	Thr	Ile	Thr	Cys	Leu
225					230					235					240
Val	Val	Asp	Leu	Ala	Pro	Ser	Lys	Gly	Thr	Val	Asn	Leu	Thr	Trp	Ser
				245					250					255	
Arg	Ala	Ser	Gly	Lys	Pro	Val	Asn	His	Ser	Thr	Arg	Lys	Glu	Glu	Lys
			260					265					270		
Gln	Arg	Asn	Gly	Thr	Leu	Thr	Val	Thr	Ser	Thr	Leu	Pro	Val	Gly	Thr
		275					280					285			
Arg	Asp	Trp	Ile	Glu	Gly	Glu	Thr	Tyr	Gln	Cys	Arg	Val	Thr	His	Pro
	290					295					300				
His	Leu	Pro	Arg	Ala	Leu	Met	Arg	Ser	Thr	Thr	Lys	Thr	Ser	Gly	Pro
305					310					315					320
Arg	Ala	Ala	Pro	Glu	Val	Tyr	Ala	Phe	Ala	Thr	Pro	Glu	Trp	Pro	Gly
				325					330					335	
Ser	Arg	Asp	Lys	Arg	Thr	Leu	Ala	Cys	Leu	Ile	Gln	Asn	Phe	Met	Pro
			340					345					350		
Glu	Asp	Ile	Ser	Val	Gln	Trp	Leu	His	Asn	Glu	Val	Gln	Leu	Pro	Asp
		355					360					365			
Ala	Arg	His	Ser	Thr	Thr	Gln	Pro	Arg	Lys	Thr	Lys	Gly	Ser	Gly	Phe
	370					375					380				
Phe	Val	Phe	Ser	Arg	Leu	Glu	Val	Thr	Arg	Ala	Glu	Trp	Glu	Gln	Lys
385					390					395					400
Asp	Glu	Phe	Ile	Cys	Arg	Ala	Val	His	Glu	Ala	Ala	Ser	Pro	Ser	Gln
				405					410					415	
Thr	Val	Gln	Arg	Ala	Val	Ser	Val	Asn	Pro	Gly	Lys				
			420					425							

<210> 10

<211> 452

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

ES 2 774 337 T3

Gly	Ser	Ala	Ser	Ala	Pro	Thr	Leu	Phe	Pro	Leu	Val	Ser	Cys	Glu	Asn
1				5					10					15	
Ser	Pro	Ser	Asp	Thr	Ser	Ser	Val	Ala	Val	Gly	Cys	Leu	Ala	Gln	Asp
			20					25					30		
Phe	Leu	Pro	Asp	Ser	Ile	Thr	Leu	Ser	Trp	Lys	Tyr	Lys	Asn	Asn	Ser
		35					40					45			
Asp	Ile	Ser	Ser	Thr	Arg	Gly	Phe	Pro	Ser	Val	Leu	Arg	Gly	Gly	Lys
	50					55					60				
Tyr	Ala	Ala	Thr	Ser	Gln	Val	Leu	Leu	Pro	Ser	Lys	Asp	Val	Met	Gln
65					70					75					80
Gly	Thr	Asp	Glu	His	Val	Val	Cys	Lys	Val	Gln	His	Pro	Asn	Gly	Asn
				85					90					95	
Lys	Glu	Lys	Asn	Val	Pro	Leu	Pro	Val	Ile	Ala	Glu	Leu	Pro	Pro	Lys
			100					105					110		
Val	Ser	Val	Phe	Val	Pro	Pro	Arg	Asp	Gly	Phe	Phe	Gly	Asn	Pro	Arg
		115					120					125			
Lys	Ser	Lys	Leu	Ile	Cys	Gln	Ala	Thr	Gly	Phe	Ser	Pro	Arg	Gln	Ile
	130					135					140				
Gln	Val	Ser	Trp	Leu	Arg	Glu	Gly	Lys	Gln	Val	Gly	Ser	Gly	Val	Thr
145					150					155					160
Thr	Asp	Gln	Val	Gln	Ala	Glu	Ala	Lys	Glu	Ser	Gly	Pro	Thr	Thr	Tyr
				165					170					175	
Lys	Val	Thr	Ser	Thr	Leu	Thr	Ile	Lys	Glu	Ser	Asp	Trp	Leu	Gly	Gln
			180					185					190		
Ser	Met	Phe	Thr	Cys	Arg	Val	Asp	His	Arg	Gly	Leu	Thr	Phe	Gln	Gln
		195					200					205			
Asn	Ala	Ser	Ser	Met	Cys	Val	Pro	Asp	Gln	Asp	Thr	Ala	Ile	Arg	Val
	210					215					220				

ES 2 774 337 T3

Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr
 225 230 235 240
 Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu Thr Thr Tyr Asp Ser Val Thr
 245 250 255
 Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu Ala Val Lys Thr His Thr Asn
 260 265 270
 Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala
 275 280 285
 Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr
 290 295 300
 Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg
 305 310 315 320
 Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro
 325 330 335
 Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu
 340 345 350
 Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg
 355 360 365
 Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro
 370 375 380
 Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val
 385 390 395 400
 Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Ala His
 405 410 415
 Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser Thr
 420 425 430
 Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala
 435 440 445
 Gly Thr Cys Tyr
 450

<210> 11

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 774 337 T3

<400> 11

Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser
1				5					10					15	
Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys
			20					25					30		
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln
		35					40					45			
Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly
	50					55					60				
Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln
65					70				75						80
Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn
				85					90					95	
His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys			
			100					105							

<210> 12

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser
1				5					10					15	
Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys
			20					25					30		
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln
		35					40					45			
Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly
	50					55					60				
Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln
65					70				75						80

ES 2 774 337 T3

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

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

<210> 13

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

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

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

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

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

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

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

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

<210> 14

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

ES 2 774 337 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 15

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

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

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

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

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

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

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

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

<210> 16

ES 2 774 337 T3

<211> 106

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 16

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

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

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

Pro	Ala	Glu	Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr	Gln	Pro	Ile	Met	Asn	Thr	Asn	Gly
	50					55					60				

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

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

His	His	Thr	Glu	Lys	Ser	Leu	Ser	His	Ser
			100					105	

<210> 17

<211> 106

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 17

ES 2 774 337 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 18

<211> 106

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 18

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 774 337 T3

<210> 19

<211> 106

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 19

```

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

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

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

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

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

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

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

```

<210> 20

<211> 105

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

ES 2 774 337 T3

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

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

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

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

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

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

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
100 105

<210> 21

<211> 114

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

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

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

Gly Phe Ser Pro Lys Asp Val Leu Val Arg Trp Leu Gln Gly Ser Gln
35 40 45

ES 2 774 337 T3

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

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

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

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

Gly Lys

<210> 22

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

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

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

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

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

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

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

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

<210> 23

<211> 114

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 774 337 T3

<400> 23

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

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

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

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

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

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

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

Val Thr

<210> 24

<211> 115

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

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

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

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

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

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

ES 2 774 337 T3

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

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

Thr Gly Lys
115

<210> 25

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Arg Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 26

<211> 105

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

ES 2 774 337 T3

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
1 5 10 15

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val
35 40 45

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
65 70 75 80

His Lys Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
85 90 95

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

<210> 27

<211> 100

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro
100

REIVINDICACIONES

1. Una célula hospedadora *in vitro* para la preparación de una proteína heterodímera, comprendiendo dicha célula hospedadora un ácido nucleico que codifica un primer polipéptido que contiene CH3 de IgG y un ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido que contiene CH3 de IgG, en la cual dicho primer polipéptido que contiene CH3 de IgG comprende la sustitución de los aminoácidos en las posiciones 392 y 409 o en las posiciones 370, 392 y 409 con un aminoácido cargado negativamente, y dicho segundo polipéptido que contiene CH3 de IgG comprende la sustitución de los aminoácidos en las posiciones 356 y 399 o en las posiciones 356, 357 y 399 con un aminoácido de carga positiva.
2. La célula hospedadora de la reivindicación 1, en la cual el aminoácido con carga negativa es ácido aspártico.
3. La célula hospedadora de la reivindicación 1, en la cual el aminoácido cargado positivamente es lisina.
4. La célula hospedadora de la reivindicación 1, en la cual la proteína heterodímera comprende una región Fc de IgG humana.
5. La célula hospedadora de la reivindicación 4, en la cual la región Fc de IgG humana comprende una región Fc de IgG1, una región Fc de IgG2, una región Fc de IgG3 o una región Fc de IgG4.
6. La célula hospedadora de la reivindicación 1, en la cual el primer y/o el segundo polipéptido que contiene CH3 de IgG es una cadena pesada de anticuerpo.
7. La célula hospedadora de la reivindicación 1, en la cual la proteína heterodímera comprende adicionalmente una o más cadenas ligeras de anticuerpo.
8. La célula hospedadora de la reivindicación 1, en la cual la proteína heterodímera se selecciona del grupo constituido por un anticuerpo, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo monoespecífico monovalente, un maxicuerpo biespecífico, un monocuerpo, un pepticuerpo, un pepticuerpo biespecífico, un pepticuerpo monovalente, y una proteína de fusión de receptores.
9. La célula hospedadora de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la célula hospedadora es una célula hospedadora de mamífero y opcionalmente en la que la célula hospedadora de mamífero es una línea celular de ovario de hámster chino (CHO).

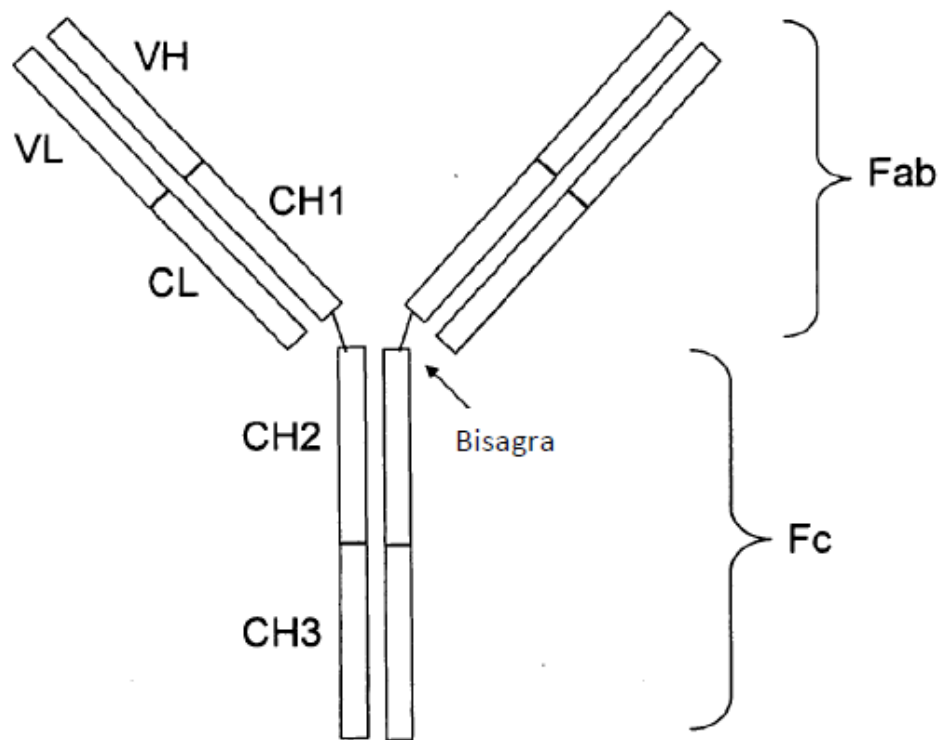


Figura 1

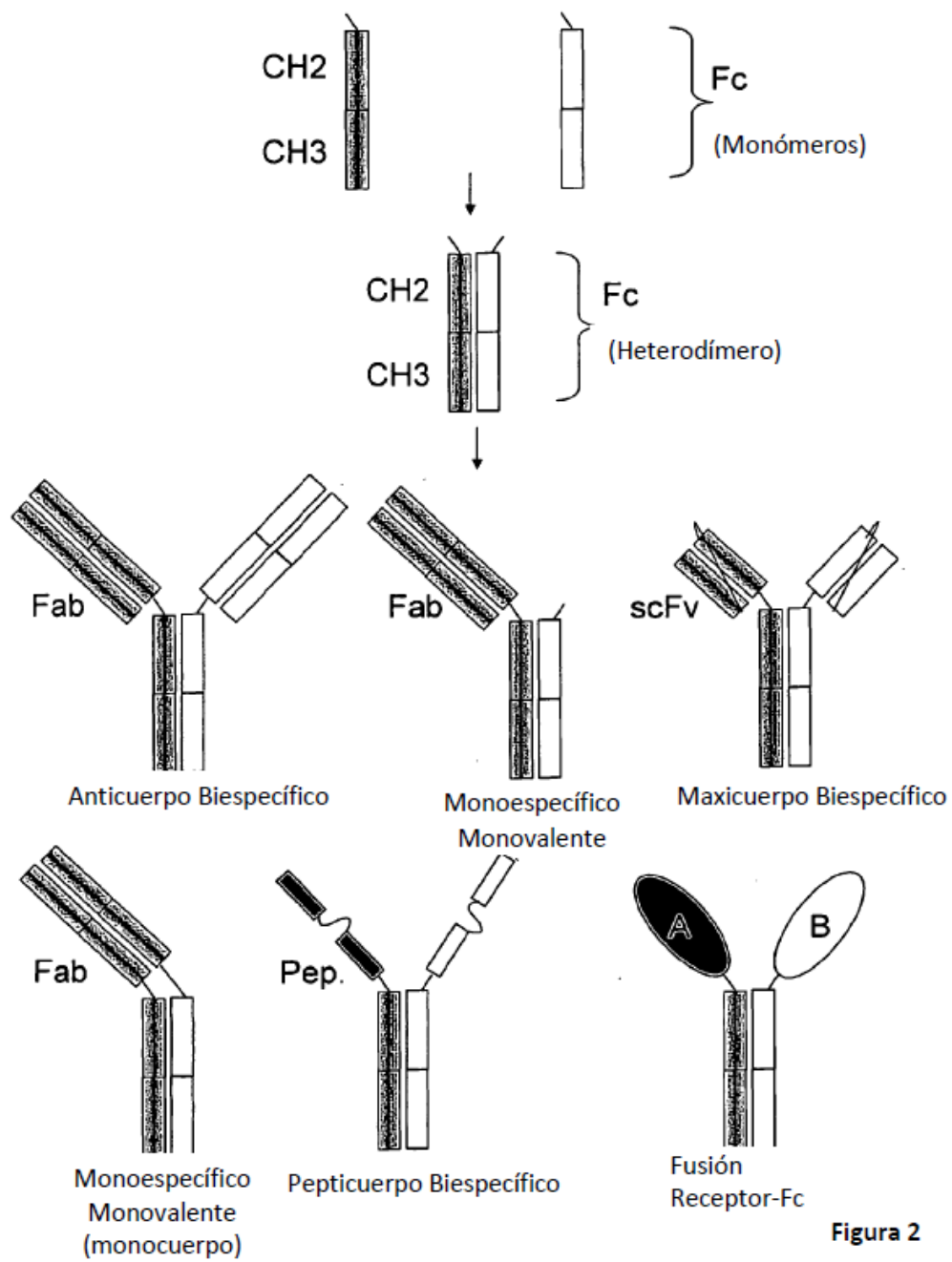


Figura 2

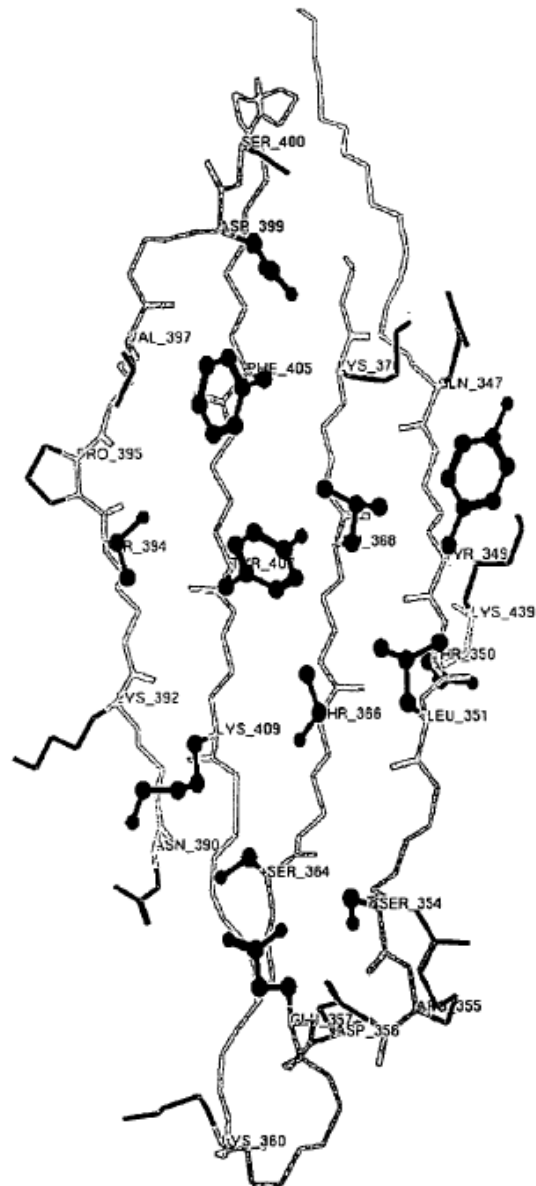


Figura 3

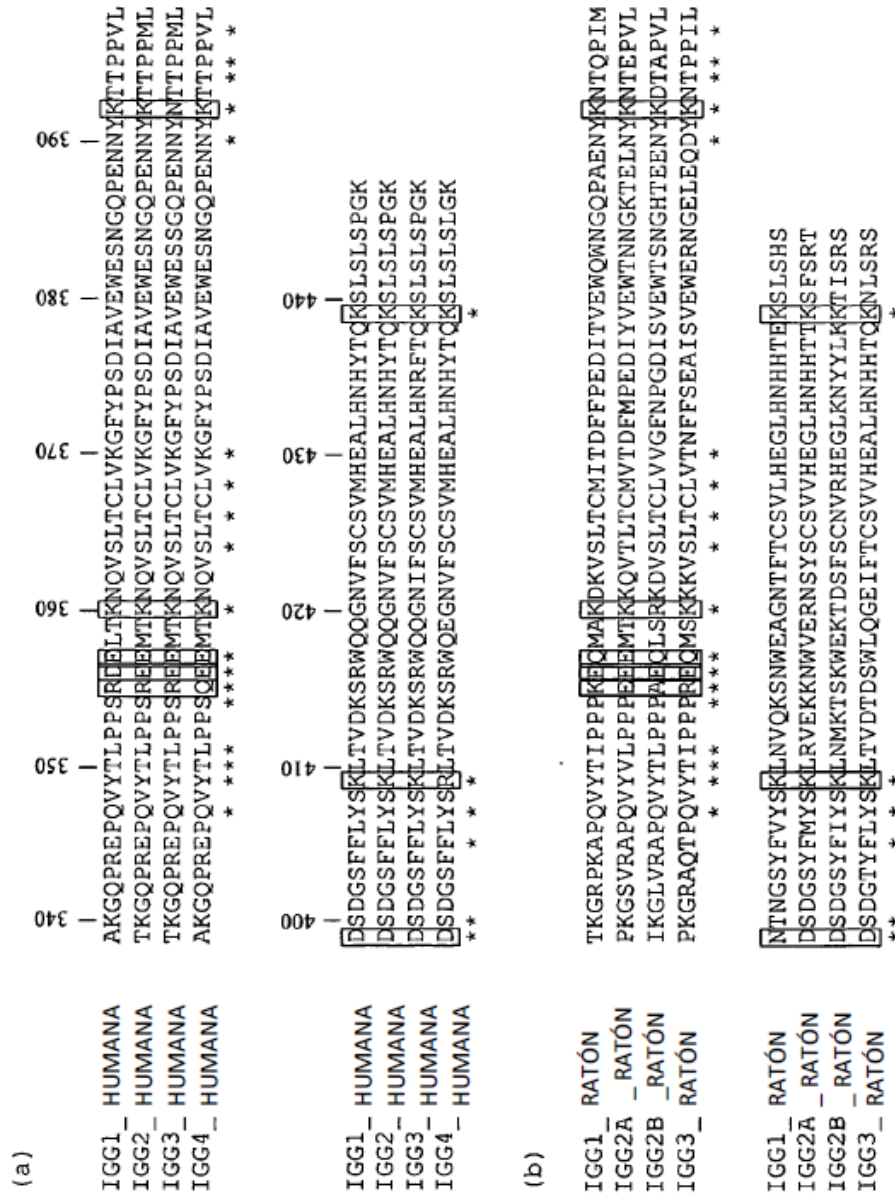


Figura 4

Figure 4

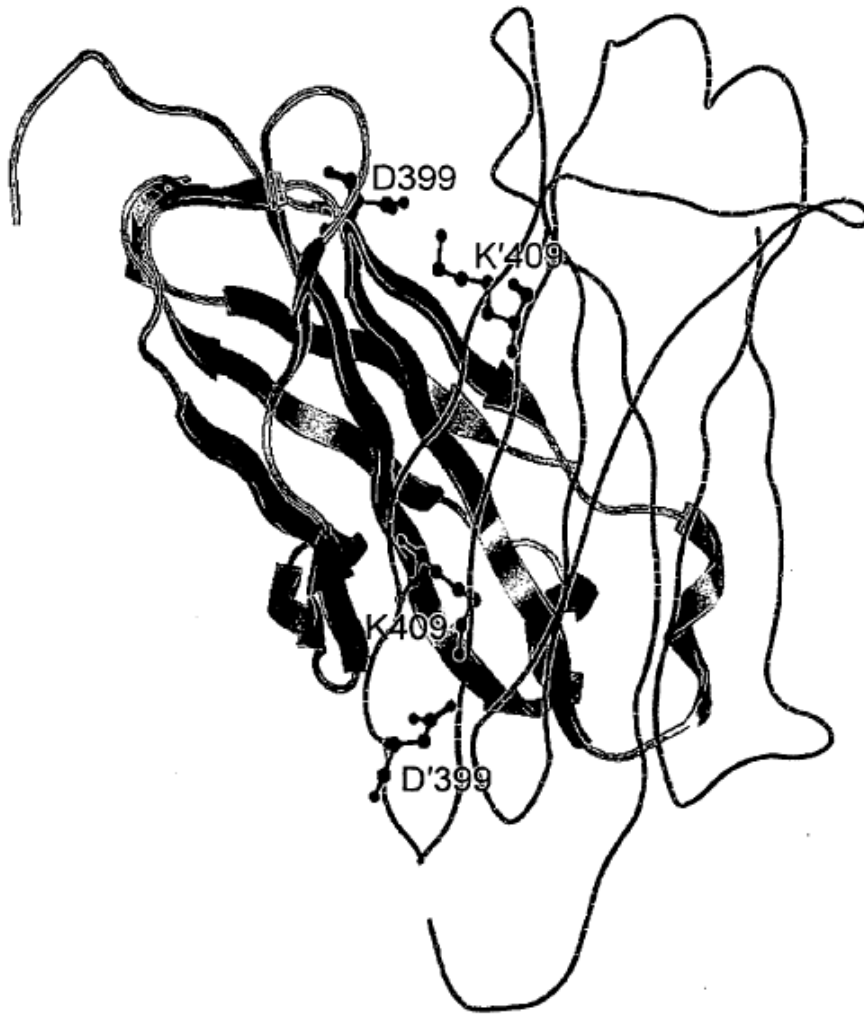


Figura 5

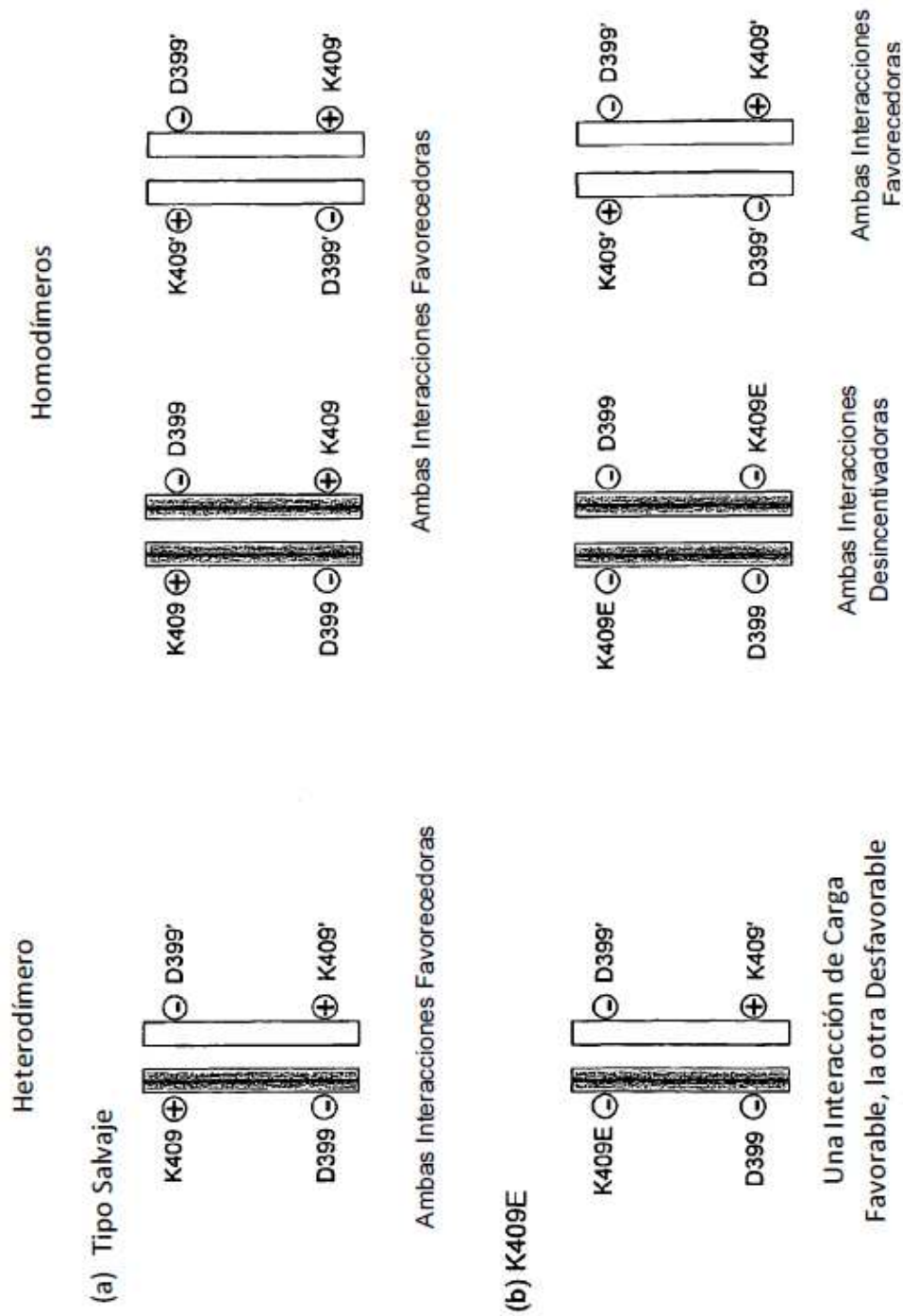
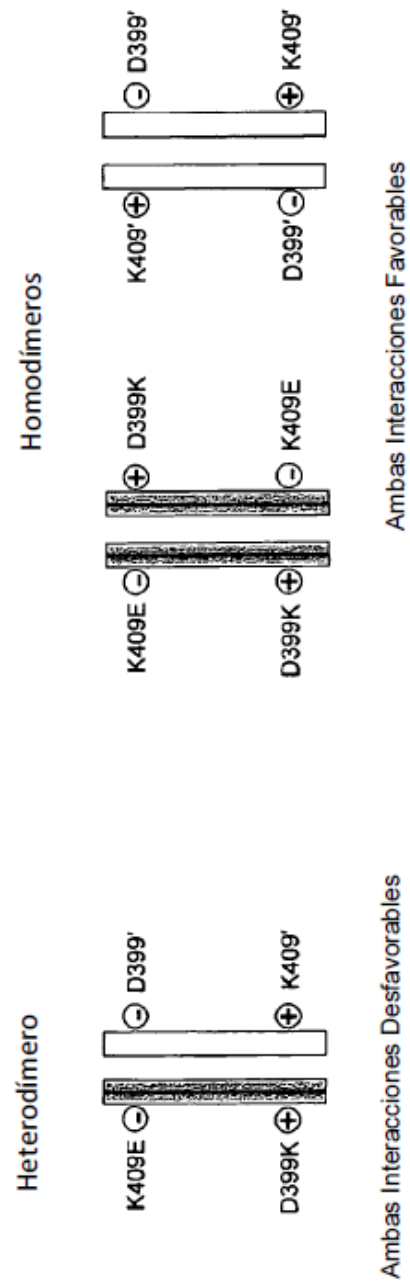


Figura 6



Mutaciones K409E y D399K como Ejemplo para Promoción de Homodímeros

Figura 7

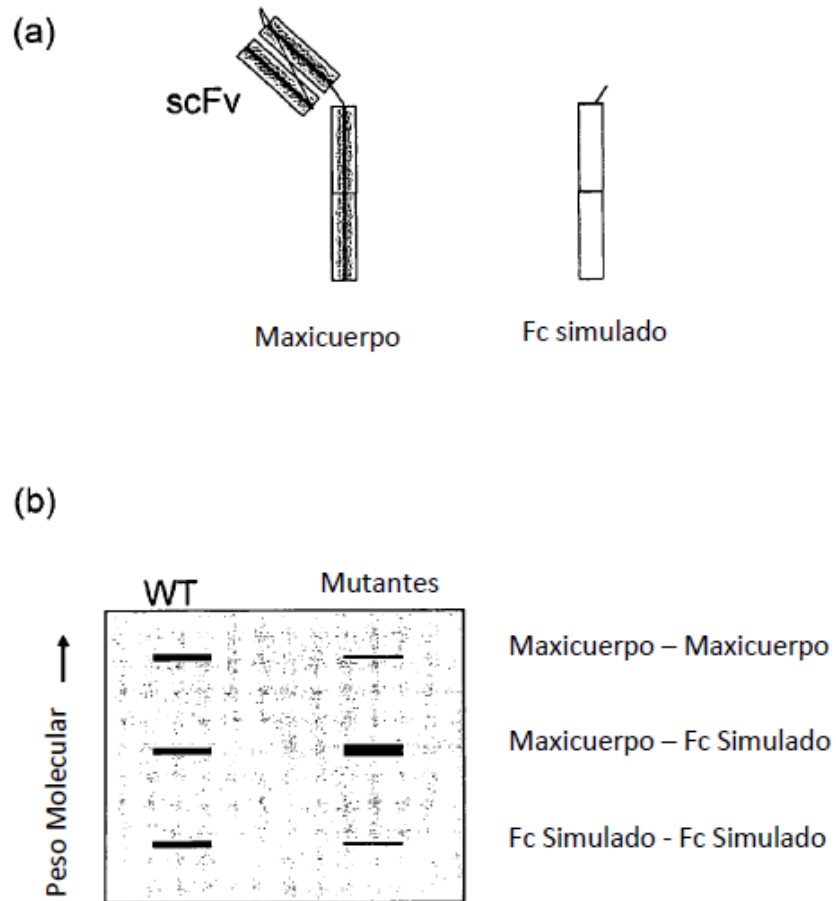


Figura 8

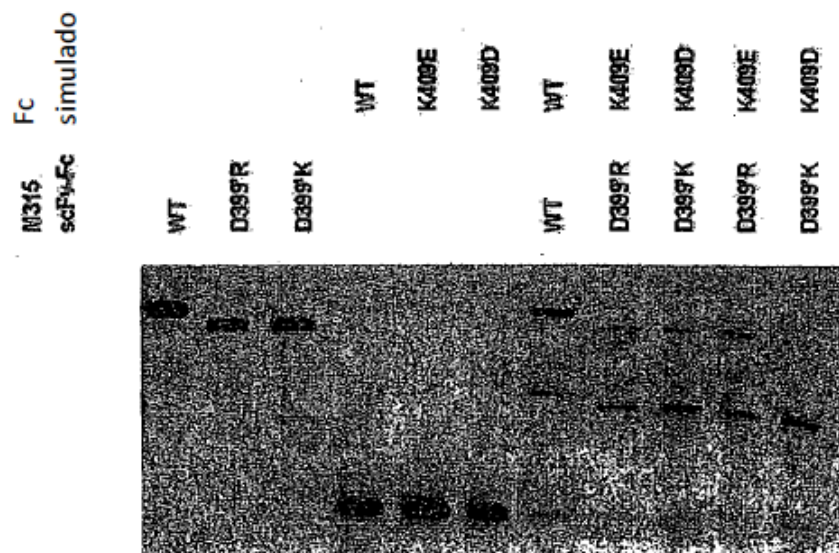


Figura 9

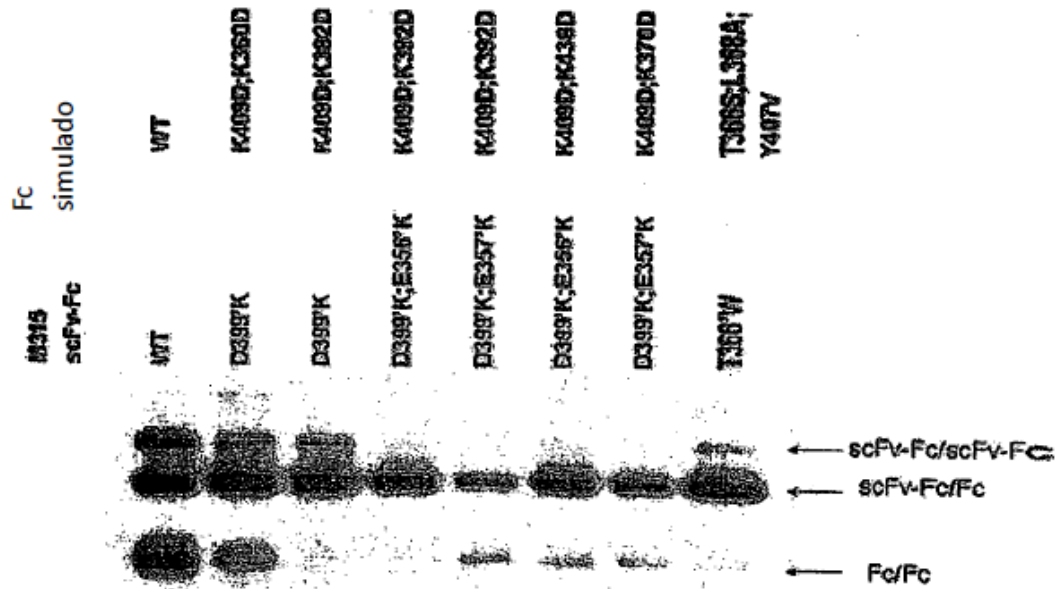


Figura 10

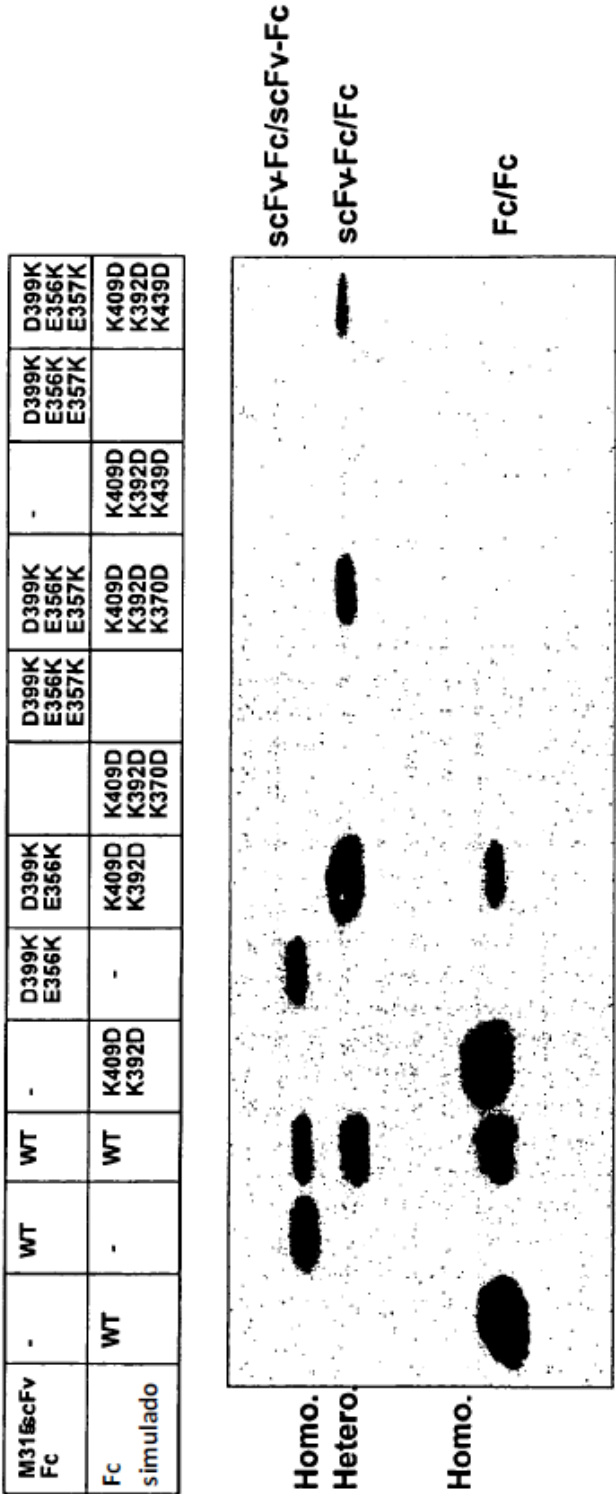


Figura 11