

TRADUZIONE DEL TESTO DEL BREVETTO EUROPEO N. 2838917

DAL TITOLO:

"METODI E MEZZI PER LA PRODUZIONE DI MOLECOLE SIMILI A IG ETERODIMERICHE"

Depositata il:

*** **

DESCRIZIONE

CAMPO

L'invenzione si riferisce ai campi della biologia molecolare, della medicina e degli agenti terapeutici biologici. Essa si riferisce in maniera particolare al campo degli anticorpi terapeutici per il trattamento di svariate malattie.

STATO DELL'ARTE

Molte agenti terapeutici biologici attualmente usati sono anticorpi monoclonali ricombinanti, umani o umanizzati isolati che intensificano la capacità del sistema immunitario del corpo di neutralizzare o eliminare cellule e/o molecole coinvolte in processi patologici o di eradicare patogeni o agenti infettivi invadenti. Anticorpi monoclonali si legano a una singola area specifica, o epitopo, di un antigene e, per l'uso in terapia, vengono spesso selezionati per una proprietà funzionale desiderabile come ad esempio uccisione di cellule tumorali, blocco di interazioni di recettore-ligando o neutralizzazione di virus. Al giorno d'oggi, ci sono circa 30 anticorpi monoclonali approvati dalla FDA, che vengono tipicamente prodotti in grandi quantità e le loro caratteristiche biofisiche e biochimiche possono essere analizzate in grande dettaglio per garantire la consistenza da lotto a lotto, cosa che facilita l'accettabilità normativa. Nonostante queste caratteristiche favorevoli, anticorpi monoclonali hanno svariati svantaggi, alcuni dei quali correlano con la loro natura monospecifica e la complessità di malattie. I processi patologici sono spesso di natura multifattoriale, e coinvolgono un'azione ridondante o sinergica di mediatori di malattia o regolazione verso l'alto di differenti recettori, inclusa interferenza tra le loro reti di trasmissione del segnale. Di conseguenza, il blocco di molteplici, differenti fattori e percorsi coinvolti in una patologia può dare come risultato una efficacia terapeutica migliorata. Per natura della loro monospecificità, anticorpi monoclonali possono interferire solamente con un singolo passaggio all'interno dei complessi processi patologici cosa che spesso non ha un effetto ottimale. Oltre a non affrontare completamente molteplici aspetti di un processo patologico, è diventato chiaro che il targeting di un singolo epitopo su una singola proteina cellulare o solubile o singolo patogeno spesso non sarà sufficiente a trattare in maniera efficace la malattia dal momento che l'epitopo bersaglio può non essere più disponibile per l'anticorpo monoclonale per legarsi ed esercitare l'effetto desiderato. Ad esempio, cellule tumorali spesso sfuggono alla terapia con anticorpi monoclonali

mediante regolazione verso il basso, mutazione o schermatura dell'epitopo bersaglio presente su un recettore di fattore di crescita. Attivando recettori alternativi e/o loro ligandi, cellule tumorali possono sfruttare un percorso differente che porta a una crescita continua e a metastasi. Allo stesso modo, virus e altri agenti patogeni frequentemente mutano e perdono o schermano l'epitopo bersaglio, sfuggendo in tal modo al trattamento con anticorpi monoclonali. Anticorpi monoclonali che si legano a un singolo epitopo spesso non reclutano l'intero spettro di meccanismi effettori evocati da anticorpi policlonali, inclusi, tra gli altri, opsonizzazione (intensificazione della fagocitosi di antigeni), impedimento sterico (ad antigeni rivestiti con anticorpi viene impedito di attaccarsi a cellule ospite o superfici di mucosa), neutralizzazione di tossina, agglutinazione o precipitazione (anticorpi che legano svariati antigeni solubili causano aggregazione e successiva eliminazione), attivazione di citotossicità cellulare dipendente da complemento e anticorpo (anticorpi consentono l'uccisione di cellule bersaglio da parte di cellule assassine naturali e neutrofili).

Anticorpi policlonali per applicazioni terapeutiche possono essere ottenuti da siero umano riunito. Tali anticorpi policlonali terapeutici derivati da siero possono ad esempio essere usati per trattare o prevenire infezioni causate da virus come il virus della rabbia, il citomegalovirus e il virus respiratorio sinciziale, per neutralizzare tossine come tossina tetanica e tossina botulinica o per prevenire l'immunizzazione di alloinnesto di Rhesus D. Un uso più diffuso di preparazioni di anticorpo policlonale derivato da siero è stato impedito dal fatto che il plasma di origine è disponibile solamente per una gamma limitata di bersagli come malattie infettive e tossine. Inoltre, i prodotti sono fortemente dipendenti da disponibilità di sangue di donatore, sia in termini di quantità che di adeguatezza, dando come risultato una considerevole variazione tra lotti. In aggiunta, tecnologie di screening non riescono a tenere il passo con i virus in costante evoluzione, pertanto, prodotti di immunoglobulina comportano un rischio potenziale di trasmissione di malattia infettiva. Infine, il lungo processo di raccolta di sangue, screening e purificazione di immunoglobulina significa che immunoglobuline derivate da plasma sono costose da produrre.

Miscele di anticorpi monoclonali possono migliorare l'efficacia di anticorpi monoclonali evitando nel contempo i limiti associati con anticorpi policlonali derivati da siero. Nell'arte, combinazioni di due anticorpi monoclonali umani o umanizzati sono state testate in modelli preclinici e in sperimentazioni cliniche (ad esempio miscele di 2 anticorpi monoclonali contro il recettore di HER2, miscele di 2 anticorpi contro il recettore di EGFR e, 2 anticorpi monoclonali contro il virus della rabbia). Nell'arte, è stato mostrato che combinazioni di 2 anticorpi monoclonali possono avere effetti additivi o sinergici e reclutare meccanismi effettori che non sono associati a un anticorpo da solo. Ad esempio, miscele di 2 anticorpi monoclonali contro l'EGFR o l'HER2 sono state mostrate uccidere in maniera più potente cellule tumorali sulla base di una combinazione di attività che includono internalizzazione di recettore intensificata, blocco migliorato di percorsi di trasmissione del segnale a valle dei recettori, così come citotossicità mediata da effettori immunitari intensificata. Per terapie di combinazione basate su 2 anticorpi monoclonali, gli anticorpi componenti

possono essere prodotti separatamente e combinati al livello di proteina. Uno svantaggio di questo approccio è il costo sbalorditivo di sviluppo dei 2 anticorpi individualmente in sperimentazioni cliniche e di (parzialmente) ripetizione di questo processo con la combinazione. Questo comporterebbe costi inaccettabili di trattamenti basati su combinazioni di anticorpi. In alternativa, le 2 linee cellulari ricombinanti che producono gli anticorpi monoclonali componenti possono essere miscelate in un fermentatore e la miscela risultante di anticorpi può essere purificata come una singola preparazione (WO 2004/061104). Uno svantaggio di questo approccio è lo scarso controllo sulla composizione e quindi la riproducibilità della preparazione di anticorpo policlonale ricombinante risultante, specialmente quando si considera che tali composizioni possono cambiare nel tempo man mano che si stanno coltivando le cellule.

Durante l'ultimo decennio, anticorpi bispecifici sono emersi come una alternativa all'uso di combinazioni di 2 anticorpi. Mentre una combinazione di 2 anticorpi rappresenta una miscela di 2 molecole di immunoglobulina differenti che si legano a epitopi differenti sullo stesso bersaglio o su bersagli differenti, in un anticorpo bispecifico questo viene realizzato attraverso una singola molecola di immunoglobulina. Mediante legame a 2 epitopi sullo stesso bersaglio o su bersagli differenti, anticorpi bispecifici possono avere effetti simili rispetto a una combinazione di 2 anticorpi che si legano agli stessi epitopi. Inoltre, dal momento che anticorpi bispecifici del formato di IgG combinano 2 differenti regioni di legame monovalente in una singola molecola e miscele di 2 anticorpi di IgG combinano 2 differenti molecole di legame bivalente in una singola preparazione, sono stati anche osservati effetti differenti di questi formati. Da un punto di vista tecnologico e normativo, questo rende meno complesso uno sviluppo di un singolo anticorpo bispecifico dal momento che fabbricazione, test preclinico e clinico coinvolgono una singola molecola. Pertanto, terapie basate su un singolo anticorpo bispecifico sono facilitate da un processo di sviluppo di farmaco meno complicato ed economico, fornendo nel contempo terapie di anticorpo più efficaci.

Anticorpi bispecifici basati sul formato di IgG, costituiti da 2 catene pesanti e due catene leggere, sono stati prodotti mediante una varietà di metodi. Ad esempio, anticorpi bispecifici possono essere prodotti fondendo due linee cellulari che secernono anticorpi per creare una nuova linea cellulare o esprimendo due anticorpi in una singola cellula usando la tecnologia del DNA ricombinante. Questi approcci hanno prodotto più specie di anticorpo siccome le rispettive catene pesanti di ciascun anticorpo possono formare dimeri monospecifici (chiamati anche omodimeri), che contengono due catene pesanti accoppiate identiche con la stessa specificità, e dimeri bispecifici (chiamati anche eterodimeri) che contengono due catene pesanti accoppiate differenti con specificità differente. In aggiunta, catene leggere e catene pesanti da ciascun anticorpo possono accoppiarsi casualmente per formare combinazioni inappropriate, non funzionali. Questo problema, noto come accoppiamenti errati di catena pesante e leggera, può essere risolto scegliendo anticorpi che condividono una catena leggera comune per l'espressione come bispecifici. Ma anche quando viene usata

una catena leggera comune, l'espressione di due catene pesanti e una catena leggera comune in una singola cellula darà come risultato 3 differenti specie di anticorpo, vale a dire due anticorpi "parentali" monospecifici e l'anticorpo bispecifico, per cui l'anticorpo bispecifico di interesse deve essere purificato dalla miscela di anticorpi risultante. Sebbene siano state impiegate tecnologie per aumentare ulteriormente la percentuale di anticorpi bispecifici nelle miscele di anticorpi parentali e bispecifici e per ridurre la percentuale di catene pesanti e leggere accoppiate erroneamente, rimane la necessità di formati bispecifici che eliminino o minimizzino alcuni degli svantaggi menzionati sopra.

Nel loro insieme, l'arte fornisce una varietà di tecnologie e metodi per generare anticorpi monoclonali, anticorpi bispecifici, miscele di anticorpi monoclonali, o miscele di anticorpi monospecifici e bispecifici che possono essere successivamente usati per applicazione terapeutica in pazienti. Tuttavia, come discusso sopra, ciascuna di queste tecnologie e ciascuno di questi metodi esistenti ha i suoi svantaggi e le sue limitazioni.

Pertanto c'è la necessità di tecnologie migliorate e/o alternative per la produzione di agenti terapeutici biologici nella forma di miscele o approcci bispecifici per il targeting di più molecole modificanti la malattia.

DESCRIZIONE DELL'INVENZIONE

L'invenzione fornisce metodi e mezzi per tecnologie migliorate e/o alternative per la produzione di agenti terapeutici biologici nella forma di miscele o approcci bispecifici per il targeting di più molecole modificanti la malattia, così come prodotti e usi derivanti da questi metodi e mezzi.

Vengono descritti svariati approcci nell'arte al fine di promuovere la formazione di un certo anticorpo bispecifico di interesse, riducendo in tal modo il contenuto di anticorpi indesiderati nella miscela risultante.

Per anticorpi, è ben noto che l'interazione di CH₃-CH₃ è il motore principale per la dimerizzazione di Fc (Ellerson JR., Et al., J. Immunol 1976 (116) 510-517; Deisenhofer J. biochemistry 1981 (20) 2361-2370). È inoltre ben noto che quando due domini di CH₃ interagiscono tra loro essi si incontrano in un'interfaccia di proteina-proteina che comprende residui di "contatto" (chiamati anche amminoacidi di contatto, residui di interfaccia o amminoacidi di interfaccia). Gli amminoacidi di contatto di un primo dominio di CH₃ interagiscono con uno o più amminoacidi di contatto di un secondo dominio di CH₃. Gli amminoacidi di contatto sono tipicamente entro 5,5 Å (preferibilmente entro 4,5 Å) l'uno dall'altro nella struttura tridimensionale di un anticorpo. L'interazione tra residui di contatto da un dominio di CH₃ e residui di contatto da un dominio di CH₃ differente può ad esempio essere tramite forze di Van der Waals, legami a idrogeno, legami a idrogeno mediati da acqua, ponti salini o altre forze elettrostatiche, interazioni attrattive tra catene laterali aromatiche, legami di disolfuro o altre forze note a un tecnico del ramo. È stato precedentemente mostrato che approssimativamente un terzo delle catene laterali di amminoacido di contatto all'interfaccia di dominio di CH₃ di IgG1 umana possono rappresentare la maggior parte dei contributi al ripiegamento e all'associazione di dominio. Può essere inoltre previsto che altri residui di amminoacidi (vicini)

possano influenzare le interazioni nell'interfaccia di proteina-proteina.

Sono stati impiegati nell'arte approcci per interferire con la dimerizzazione di catene pesanti di anticorpo. È stata applicata un'ingegnerizzazione specifica nei domini di CH3 al fine di favorire l'eterodimerizzazione rispetto all'omodimerizzazione. Esempi di tale ingegnerizzazione dell'interfaccia di CH3-CH3 includono l'introduzione di mutazioni di protuberanza e cavità complementari, nota anche come approcci 'sporgenza-in-buco' come descritto ad esempio in WO1998/050431, Ridgeway et al., 1996 e Merchant et al. 1998. Generalmente, il metodo coinvolge l'introduzione di una protuberanza all'interfaccia di un primo polipeptide e una cavità corrispondente nell'interfaccia di un secondo polipeptide, in modo tale che la protuberanza possa essere posizionata nella cavità in modo tale da promuovere la formazione di eteromultimero e ostacolare la formazione di omomultimero. Le "protuberanze" o "sporgenze" sono costruite sostituendo piccole catene laterali di amminoacidi dall'interfaccia del primo polipeptide con catene laterali più grandi (ad esempio tirosina o triptofano). "Cavità" o "buchi" compensativi di dimensioni identiche o simili alle protuberanze vengono creati nell'interfaccia del secondo polipeptide sostituendo grandi catene laterali amminoacidiche con quelle più piccole (per esempio alanina o treonina). La protuberanza e la cavità possono essere fabbricate mediante mezzi sintetici come alterazione dell'acido nucleico che codifica per i polipeptidi o mediante sintesi peptidica.

Usando la tecnologia sporgenza-in-buco da sola, la proporzione di un anticorpo bispecifico di interesse è al massimo l'87% della miscela dei 2 anticorpi parentali e bispecifici. Merchant et al., sono riusciti a innalzare la proporzione di anticorpi bispecifici al 95% della miscela mediante introduzione di un legame di disolfuro addizionale tra i due domini di CH3 nell'interfaccia di CH3-CH3. Eppure, al fine di usare tale anticorpo bispecifico come un medicinale, l'anticorpo bispecifico deve essere purificato (separato) dagli omodimeri e formulato in un diluente o eccipiente farmaceuticamente accettabile. Purificazione di eterodimeri da tali miscele rappresenta una grande sfida a causa della similarità in proprietà fisico-chimiche degli omodimeri e degli eterodimeri. Uno scopo della presente invenzione è quello di fornire metodi per produrre un anticorpo bispecifico in un clone di singola cellula con una proporzione ulteriormente migliorata dell'anticorpo bispecifico nella miscela. Secondo l'invenzione, la tecnologia sporgenza-in-buco può quindi essere usata come uno dei mezzi, insieme ad altri mezzi, per raggiungere detta proporzione bispecifica ulteriormente migliorata in una miscela.

Un altro esempio di tale ingegnerizzazione dell'interfaccia di CH3-CH3 è fornito da una tecnologia di Fc eterodimerica che supporta il disegno di proteine di fusione bispecifiche e asimmetriche mediante la concezione di eterodimeri di CH3 a dominio ingegnerizzato per scambio di filamento (SEED). Questi eterodimeri di CH3 SEED sono derivati di domini di CH3 di IgG e IgA umane che sono composti da segmenti alternati di sequenze di CH3 di IgA e IgG umane che danno come risultato coppie di eterodimeri di CH3 SEED umani complementari, i cosiddetti SEED-body (Davis JH.

Et al., Protein Engineering, Design & Selection 2010(23)195-202; WO2007/110205). Ancora un altro approccio per la produzione di un dato anticorpo bispecifico di interesse è basato sull'ingegnerizzazione elettrostatica di residui di contatto all'interno dell'interfaccia di CH3-CH3 che sono naturalmente carichi, come ad esempio descritto in EP01870459 o US2010/0015133, WO2007/147901, WO2010/129304, Gunasekaran et al (2010) e WO 2009/089004. Queste pubblicazioni descrivono mutazioni nei domini di CH3 di catene pesanti in cui residui di contatto di amminoacidi carichi presenti in natura sono sostituiti da residui di amminoacidi di carica opposta (vale a dire una strategia di inversione di carica). Questo crea una polarità di carica alterata in tutta l'interfaccia di dimero di Fc in modo tale che la co-espressione di catene di Fc elettrostaticamente abbinate supporti interazioni attrattive favorevoli promuovendo in tal modo la formazione di eterodimero di Fc desiderato, mentre interazioni di carica repulsive sfavorevoli sopprimano la formazione di omodimero di Fc indesiderata.

È stato descritto che all'interno dell'interfaccia di CH3-CH3 quattro coppie di residui di cariche uniche sono coinvolte nell'interazione di dominio-dominio. Queste sono D356/K439', E357/K370', K392/D399' e D399/K409' (numerazione secondo Kabat (1991) in cui residui nella prima catena sono separati da residui nella seconda catena da ' e dove il primo (') indica la numerazione di residuo nella seconda catena). Siccome l'interfaccia di CH3-CH3 mostra una simmetria doppia, ogni coppia di carica unica è rappresentata due volte in IgG intatta (vale a dire, sono presenti anche interazioni di carica di K439/D356', K370/E357', D399/K392' e K409/D399' nell'interfaccia). Sfruttando questa doppia simmetria, è stato dimostrato che una singola inversione di carica, ad esempio K409D nella prima catena o D399'K nella seconda catena, ha dato come risultato una formazione di omodimero diminuita a causa della repulsione di cariche identiche. La combinazione di differenti inversioni di carica ha ulteriormente intensificato questo effetto repulsivo. È stato dimostrato che l'espressione di differenti domini di CH3 comprendenti inversioni di carica complementari, differenti, ha potuto guidare l'eterodimerizzazione, dando come risultato una proporzione aumentata delle specie bispecifiche nella miscela.

Usando l'approccio descritto sopra, è possibile produrre un anticorpo bispecifico in una singola cellula con proporzioni comprese tra circa il 76% e circa il 96%.

In un aspetto, la presente invenzione fornisce un metodo secondo le rivendicazioni per produrre almeno due anticorpi differenti da una singola cellula ospite.

Spesso viene desiderato produrre più di un anticorpo (bispecifico), ad esempio al fine di interferire in modo più efficiente con più percorsi biologici coinvolti in un processo patologico o con l'invasione, la replicazione e/o la diffusione di un patogeno.

Una miscela di più di un anticorpo bispecifico è anche particolarmente utile per il trattamento di alcune malattie. Ad esempio, cellule tumorali

usano molte strategie differenti per sviluppare resistenza durante il trattamento con anticorpi o farmaci a piccole molecole. La resistenza può coinvolgere più recettori di superficie cellulare e molecole solubili e viene considerato utile sviluppare trattamenti basati su anticorpi per cancro che si rivolgono simultaneamente contro più di tali molecole associate a malattia e fuga. Nel caso in cui siano coinvolti più di 2 di tali molecole o epitopi bersaglio correlati a malattia e a fuga, una miscela di anticorpi bispecifici fornisce un formato terapeutico innovativo e interessante. Preferibilmente, tali miscele di anticorpi bispecifici sono prodotte da una singola cellula per facilitare un processo di sviluppo di farmaco che è meno complicato da un punto di vista normativo ed economico e attuabile da un punto di vista di fabbricazione e di sviluppo clinico di farmaci. In un approccio basato su una singola cellula, è desiderabile usare metodi che consentano una produzione degli anticorpi bispecifici controllata ed efficiente, riducendo così o addirittura abrogando completamente la necessità di separare la desiderata miscela di molecole di IgG bispecifiche da molecole di IgG monospecifiche non desiderate. Nell'arte antecedente, miscele di anticorpi monospecifici e bispecifici sono state prodotte da una singola cellula (WO2004/009618), ma queste miscele rappresentano miscugli complessi di svariate specie differenti di anticorpi bispecifici e monospecifici. Un ulteriore scopo della presente invenzione è quello di fornire mezzi e metodi per produrre miscele definite di anticorpi bispecifici in singole cellule. Preferibilmente, vengono forniti metodi che danno come risultato miscele di anticorpi (bispecifici) con una proporzione di almeno il 95%, almeno il 97% o anche più del 99% di molecole di IgG dimeriche, indipendentemente dalla quantità di sottoprodotti monomerici, vedere qui sotto. Tipicamente, in una cellula in cui vengono prodotte più molecole di IgG intatte, possono essere presenti mezze molecole (sottoprodotti monomerici) che possono essere rimosse semplicemente mediante cromatografia a esclusione dimensionale nota nell'arte.

In una forma di realizzazione la presente invenzione fornisce metodi per produrre una miscela definita di almeno due differenti molecole simili a Ig in singole cellule, invece di un singolo anticorpo (bispecifico) di interesse, in cui la formazione di altre specie di anticorpi dimerici indesiderate è diminuita o persino assente. La miscela risultante è ben definita e la sua composizione è controllata dal disegno di mutanti di dominio di CH3. Inoltre, la regolazione di livelli di espressione e/o differenti rapporti di trasfezione usati per l'espressione influisce sulla composizione della miscela. In un metodo secondo l'invenzione, una prima molecola di acido nucleico codifica per un dominio di CH3 che si accoppia preferenzialmente con un dominio di CH3 codificato da una seconda molecola di acido nucleico, e una terza molecola di acido nucleico codifica per un dominio di CH3 che si accoppia preferenzialmente con un dominio di CH3 codificato da una quarta molecola di acido nucleico. La presente invenzione fornisce anche miscele di almeno due differenti molecole simili a Ig ottenibili mediante i metodi dell'invenzione.

Come usato qui, il termine "accoppiamento preferenziale di detto 1° e 2° polipeptide comprendente un dominio di CH3" significa che essenzialmente tutti i dimeri risultanti comprendenti il 1° polipeptide comprendente un dominio di CH3 e/o il 2° polipeptide comprendente un dominio

di CH3 saranno dimeri costituiti da un 1° polipeptide comprendente un dominio di CH3 accoppiato con un 2° polipeptide comprendente un dominio di CH3. Analogamente, il termine accoppiamento preferenziale di detti 3° e 4° polipeptide comprendente un dominio di CH3" significa che essenzialmente tutti i dimeri risultanti comprendenti il 3° polipeptide comprendente un dominio di CH3 e/o il 4° polipeptide comprendente un dominio di CH3 saranno dimeri costituiti da un 3° polipeptide comprendente un dominio di CH3 accoppiato con un 4° polipeptide comprendente un dominio di CH3. Come risultato, quando molecole di acido nucleico che codificano per quattro differenti polipeptidi (A, B, C, D) comprendenti un dominio di CH3 vengono introdotte in una singola cellula, invece di una miscela di 10 differenti dimeri simili a Ig (AA, AB, AC, AD, BB, BC, BD, CC, CD e DD), viene prodotta una miscela prevalentemente di due molecole simili a Ig specifiche.

Come spiegato di seguito in maggior dettaglio, detta prima catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3 comprende un residuo di lisina (K) in posizione amminoacidica 366 secondo il sistema di numerazione EU, e detta seconda catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3 comprende un residuo di acido aspartico (D) in posizione amminoacidica 351 secondo il sistema di numerazione EU. Questi cambiamenti amminoacidici sono mezzi per un accoppiamento preferenziale di dette prima e seconda catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3. Detta prima catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3 preferibilmente comprende inoltre un residuo di lisina (K) in posizione amminoacidica 351 secondo il sistema di numerazione EU. Inoltre, detta seconda catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3 preferibilmente comprende inoltre un residuo di acido glutammico (E) o un residuo di acido aspartico (D) in posizione amminoacidica 349 secondo il sistema di numerazione EU e/o un residuo di acido glutammico (E) in posizione amminoacidica 368 secondo il sistema di numerazione EU, più preferibilmente un residuo di acido glutammico (E) in posizione amminoacidica 368 secondo il sistema di numerazione EU. In ancora un'altra forma di realizzazione preferita, detta terza catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3 comprende un residuo di lisina (K) in posizione amminoacidica 356 secondo il sistema di numerazione EU e un residuo di lisina (K) in posizione amminoacidica 399 secondo il sistema di numerazione EU, e detta quarta catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3 comprende un residuo di acido aspartico (D) in posizione amminoacidica 392 secondo il sistema di numerazione EU e un residuo di acido aspartico (D) in posizione amminoacidica 409 secondo il sistema di numerazione EU.

In un metodo secondo la presente invenzione, ciascuna delle catene polipeptidiche comprendenti un dominio di CH3 preferibilmente comprende inoltre una regione variabile che riconosce un epitopo bersaglio. Le regioni variabili che fanno parte delle catene polipeptidiche comprendenti un dominio di CH3 condividono preferibilmente una catena leggera comune. In tal caso, solamente le VH delle regioni variabili differiscono, mentre la VL in tutte le regioni variabili è essenzialmente la stessa. Quindi, in un aspetto preferito viene fornito un metodo secondo l'invenzione, che comprende inoltre fornire a detta cellula ospite una molecola di acido nucleico che codifica per una catena leggera comune. In una

forma di realizzazione particolarmente preferita, ciascuna di dette 4 regioni variabili delle catene polipeptidiche comprendenti un dominio di CH3 riconosce un epitopo bersaglio differente. Ad esempio, se la prima molecola di acido nucleico codifica per una catena pesante che contiene inoltre un dominio variabile con specificità per un antigene A, la seconda molecola di acido nucleico codifica per una catena pesante che contiene inoltre un dominio variabile con specificità per un antigene B, la terza molecola di acido nucleico codifica per una catena pesante che contiene inoltre un dominio variabile con specificità per un antigene C, e la quarta molecola di acido nucleico codifica per una catena pesante che contiene inoltre un dominio variabile con specificità per un antigene D, verrà quindi prodotta una miscela contenente molecole simili a Ig bispecifiche che sono specifiche per AB e molecole simili a Ig bispecifiche che sono specifiche per CD. La formazione di anticorpi monospecifici (con specificità AA, BB, CC o DD) o anticorpi bispecifici con specificità per AC, AD, BC o BD è abbassata o addirittura assente a causa dei mezzi per un accoppiamento preferenziale di detti 1° e 2° polipeptide comprendente un dominio di CH3 e detti 3° e 4° polipeptide comprendente un dominio di CH3. È naturalmente possibile usare ulteriori molecole di acido nucleico, per esempio codificanti per un 5° e un 6° polipeptide comprendente un dominio di CH3, al fine di produrre miscele definite comprendenti più di due differenti molecole simili a Ig.

Di rilievo, il rapporto degli acidi nucleici usati in un metodo secondo l'invenzione non deve essere necessariamente 1:1:1:1 e il rapporto delle molecole simili a Ig risultanti che sono espresse non deve essere necessariamente 1:1. È possibile usare mezzi noti nell'arte per produrre miscele di anticorpi con rapporti ottimizzati. Ad esempio, livelli di espressione di molecole di acido nucleico e quindi i rapporti delle molecole simili a Ig risultanti prodotte possono essere regolati usando elementi genetici differenti come promotori, intensificatori e repressori o controllando il sito di integrazione genomica del numero di copie dei costrutti di DNA codificanti per anticorpi.

Detti mezzi per un accoppiamento preferenziale preferibilmente possono comprendere mutazioni di sporgenza-in-buco complementari ingegnerizzate, ponti di disolfuro, mutazioni di carica incluse mutazioni di inversione di carica, o loro combinazioni. Il tecnico competente nel ramo si renderà conto che detti mezzi per un accoppiamento preferenziale possono essere scelti all'interno di un certo tipo di mutazioni, vale a dire tutte le almeno 4 molecole di acido nucleico che codificano per catene polipeptidiche comprendenti un dominio di CH3 possono ad esempio comprendere mutazioni di carica come mezzi per un accoppiamento preferenziale. In aggiunta, in alcuni casi può essere usato anche CH3 di tipo selvatico non ingegnerizzato per un accoppiamento preferenziale di due catene polipeptidiche comprendenti un dominio di CH3 di tipo selvatico. In un aspetto particolarmente preferito, detti mezzi per un accoppiamento preferenziale comprendono almeno una mutazione di CH3 selezionata da Tabella B, come spiegato altrove in questa domanda. Una forma di realizzazione preferita fornisce pertanto un metodo secondo le rivendicazioni, in cui tutte e 4 le dette molecole di acido nucleico sono fornite di mezzi per un accoppiamento preferenziale di detti 1° e 2° polipeptide comprendente un dominio

di CH3 e detti 3° e 4° polipeptide comprendente un dominio di CH3, in cui detti mezzi per un accoppiamento preferenziale di detti 1° e 2° polipeptide comprendente un dominio di CH3 sono differenti dai mezzi per un accoppiamento preferenziale di detti 3° e 4° polipeptide comprendente un dominio di CH3.

Un aspetto della presente invenzione fornisce un metodo secondo le rivendicazioni, in cui detti mezzi per un accoppiamento preferenziale di detti 1° e 2° polipeptide comprendente un dominio di CH3 sono differenti da detti mezzi di accoppiamento preferenziale di detti 3° e 4° polipeptide comprendente un dominio di CH3. Con 'differente' viene inteso che i mezzi per un accoppiamento preferenziale di detti 1° e 2° polipeptide comprendente un dominio di CH3 sono disegnati in modo tale che un accoppiamento preferenziale della 1^a e della 2^a catena sia favorito. Il disegno è tale per cui essenzialmente non avrà luogo alcuna interazione tra la 1^a e la 3^a e/o la 4^a catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3. In altre parole, la dimerizzazione tra detto 1° polipeptide comprendente un dominio di CH3 e detto 3° o 4° polipeptide viene ridotta essenzialmente a zero e così via. Il 3° e il 4° polipeptide comprendente un dominio di CH3 possono essere o di tipo selvatico o possono comprendere mezzi per un accoppiamento preferenziale che sono differenti dai mezzi per un accoppiamento preferenziale del 1° e del 2° dominio di CH3. Studi attuali si sono concentrati sulla produzione di un singolo anticorpo bispecifico, usando ad esempio la tecnologia sporgenza-in-buco o mutazioni (inversioni) di amminoacidi di contatto carichi presenti in domini di CH3. La produzione di miscele definite di almeno due molecole simili a Ig (bispecifiche), senza co-produzione significativa di altri sottoprodotti dimerici, tuttavia, non è stata realizzata prima della presente invenzione.

La presente invenzione fornisce metodi per la produzione efficiente e controllata di una miscela ben definita di molecole simili a Ig, con una proporzione elevata di bispecifici nella miscela. Viene ottenuta persino una proporzione di (due) bispecifici di almeno il 95%, almeno il 97% o superiore in un sistema in cui sono desiderati due bispecifici. Questo significa che vengono ottenuti solamente al massimo il 5%, al massimo il 3% o meno sottoprodotti bivalenti monospecifici. Di rilievo, la quantità di sottoprodotti monomerici, vale a dire mezze molecole, è meno importante in quanto queste mezze molecole vengono facilmente separate dai dimeri usando la loro differenza in dimensione.

In un'altra forma di realizzazione preferita, le regioni variabili della 1^a e della 2^a catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3 riconoscono epitopi bersaglio differenti, mentre le regioni variabili della 3^a e della 4^a catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3 riconoscono gli stessi epitopi bersaglio. Questo darà come risultato la produzione predominante di un tipo di molecola bispecifica simile a Ig e un tipo di molecola monospecifica simile a Ig. Ad esempio, se le regioni variabili della 1^a e della 2^a catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3 riconoscono epitopi differenti bersaglio e se le regioni variabili della 3^a e della 4^a catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3 riconoscono entrambe lo stesso epitopo bersaglio che è differente dagli epitopi bersaglio riconosciuti dal 1° e dal 2° dominio di CH3, verrà formata

una miscela di molecole simili a Ig aventi specificità per AB o CC. Viene fornito inoltre di conseguenza un metodo secondo l'invenzione, in cui l'epitopo bersaglio riconosciuto dalle regioni variabili della 3^a e della 4^a catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3 è lo stesso, ma differente dall'epitopo bersaglio riconosciuto dalla regione variabile della 1^a e della 2^a catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3.

In alternativa, quando le regioni variabili della 1^a e della 2^a catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3 riconoscono epitopi bersaglio differenti e quando le regioni variabili della 3^a e della 4^a catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3 riconoscono entrambe lo stesso epitopo della 1^a e della 2^a catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3, verrà formata una miscela di molecole simili a Ig aventi specificità per AB e AA, o AB e BB. Un metodo secondo l'invenzione, in cui l'epitopo bersaglio riconosciuto dalle regioni variabili della 3^a e della 4^a catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3 è uguale all'epitopo bersaglio riconosciuto dalla regione variabile della 1^a o della 2^a catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3 viene di conseguenza anche fornito insieme.

Un altro scopo della presente invenzione è quello di fornire mezzi e metodi per produrre miscele definite di anticorpi bispecifici e anticorpi monospecifici in una singola coltura cellulare. Un esempio non limitante di tale miscela ben definita è una miscela di anticorpi bispecifici con specificità AB e anticorpi monospecifici con specificità AA. Un altro esempio è una miscela di anticorpi bispecifici con specificità AB e anticorpi monospecifici con specificità BB. Ancora un altro esempio è una miscela di anticorpi bispecifici con specificità AB e anticorpi monospecifici con specificità CC. Ancora una volta, sono preferibilmente forniti mezzi e metodi che producono miscele di anticorpi di interesse con almeno il 90%, più preferibilmente almeno il 95% e ancora più preferibilmente almeno il 97% o persino più del 99% di anticorpi desiderati.

In ancora un'altra forma di realizzazione, viene fornito un metodo secondo l'invenzione in cui le regioni variabili della 1^a e della 2^a catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3 riconoscono lo stesso epitopo bersaglio, mentre le regioni variabili della 3^a e della 4^a catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3 riconoscono un secondo epitopo bersaglio che differisce dall'epitopo bersaglio riconosciuto da dette 1^a e 2^a regione variabile. Questo darà come risultato la produzione predominante di molecole simili a Ig monospecifiche aventi specificità per AA o specificità per BB. La formazione di molecole bispecifiche simili a Ig è diminuita o addirittura evitata. In svariate forme di realizzazione viene preferito produrre miscele di anticorpi monospecifici in una singola cellula, piuttosto che miscele di anticorpi bispecifici. Ad esempio, quando viene desiderata una reticolazione di due molecole bersaglio identiche, o quando due bersagli sono localizzati troppo distanti l'uno dall'altro per cui essi non possono essere legati da un singolo anticorpo bispecifico. Può anche essere vantaggioso produrre miscele di anticorpi monospecifici in una singola cellula poiché la miscela può essere considerata come un singolo prodotto terapeutico. Nell'arte, l'efficacia terapeutica e la sicurezza di svariati anticorpi monospecifici è già stata dimostrata ed è stata ottenuta l'autorizzazione alla commercializzazione. La produzione di miscele di anticorpi

monospecifici in una singola cellula faciliterà quindi i test per efficacia e sicurezza di svariate di tali miscele e ridurrà gli sforzi e i costi per l'approvazione normativa e la fabbricazione. Tuttavia, attualmente non esistono metodi disponibili per produrre miscele specifiche di anticorpi monospecifici in una singola cellula in cui la formazione di sottoprodotti bispecifici sia ridotta al di sotto del 5%. Un altro scopo della presente invenzione è quello di fornire mezzi e metodi per produrre tali miscele di anticorpo omodimerico ben definite in singole cellule in cui la formazione di anticorpi bispecifici è ridotta al di sotto del 5%.

Quindi, un metodo secondo la presente invenzione è adeguato per la produzione di qualsiasi miscela desiderata di molecole simili a Ig bispecifiche e/o monospecifiche. Ancora una volta, è possibile usare ulteriori molecole di acido nucleico, ad esempio codificanti per un 5° e un 6° (e un 7° e un 8° e così via) polipeptide comprendente un dominio di CH3, al fine di produrre miscele definite comprendenti più di due differenti molecole simili a Ig.

In un metodo secondo la presente invenzione vengono usati almeno due domini di CH3 che comprendono almeno una combinazione di mutazioni fornite dalla presente invenzione. Attraverso queste mutazioni vengono formate nuove interazioni specifiche tra due domini di CH3. Queste mutazioni secondo la presente invenzione sono discusse di seguito in maggiore dettaglio.

Il termine "molecola simile a Ig" come usato qui significa una molecola proteica che possiede almeno un dominio di immunoglobulina (Ig). Detta molecola simile a Ig comprende una sequenza comprendente la funzione di almeno un dominio di CH3 di immunoglobulina, preferibilmente la sequenza comprende un dominio di CH3 di IgG1. Le molecole proteiche che possiedono almeno un dominio di CH3 possono essere ulteriormente dotate di specifiche porzioni funzionali di legame. I domini di CH3 della presente invenzione, contenenti mezzi per un accoppiamento preferenziale, possono pertanto essere usati per l'accoppiamento preferenziale di due molecole proteiche comprendenti un dominio di CH3 per disegnare molecole di legame eterodimeriche desiderate o miscele di molecole di legame. Frazioni funzionali di legame che possono essere ingegnerizzate nelle molecole proteiniche comprendenti un dominio di CH3 possono essere qualsiasi agente di legame, inclusi, ma non limitati a, Fv a catena singola, diabody a singola catena o in tandem (TandAb®), VHH, Anticalin®, Nanobody®, un BiTE®, un Fab, proteine di ripetizione di anchirina o DARPIN®, Avimer®, un DART, un anticorpo simile a TCR, Adnectin®, Affilin®, Trans-body®, Affibody®, un TrimerX®, MicroProteine, Fynomer®, Centyrin® o un KALBITOR®. In una forma di realizzazione preferita, le frazioni funzionali di legame sono regioni variabili di anticorpo (vale a dire combinazioni di VH/VL). Regioni variabili che sono parte delle catene polipeptidiche comprendenti un dominio di CH3 condividono preferibilmente una catena leggera comune. In questo caso, solamente le VH delle regioni variabili differiscono mentre la VL in tutte le regioni variabili è essenzialmente la stessa.

In alternativa, o in aggiunta, altre molecole possono essere ingegnerizzate ai domini di CH3 della presente invenzione, inclusi citochine, ormoni, ligandi solubili, recettori e/o peptidi.

In un metodo secondo l'invenzione, le molecole simili a Ig sono anticorpi. Le regioni variabili di questi anticorpi condividono preferibilmente una catena leggera comune, ma possono differire nelle loro regioni di VH. Il termine "anticorpo" come usato qui significa una molecola proteica appartenente alla classe di proteine delle immunoglobuline, contenente uno o più domini che legano un epitopo su un antigene, dove tali domini sono derivati da o condividono una omologia di sequenza con la regione variabile di un anticorpo. Gli anticorpi sono noti nell'arte e includono svariati isotipi, come IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgD, IgE e IgM. Un anticorpo secondo l'invenzione può essere una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Vengono prodotte molecole simili a Ig che sono anticorpi dell'isotipo di IgG dal momento che gli anticorpi di IgG ad esempio hanno un'emivita più lunga rispetto agli anticorpi di altri isotipi.

Anticorpi prodotti con metodi secondo la presente invenzione hanno sequenze umane. Anticorpi possono consistere in sequenze da una origine solamente, come anticorpi completamente umani, oppure possono avere sequenze di più di un'origine, dando come risultato ad esempio anticorpi chimerici o umanizzati. Gli anticorpi per uso terapeutico sono preferibilmente il più vicino possibile ad anticorpi naturali del soggetto che deve essere trattato (ad esempio anticorpi umani per soggetti umani). Il legame di anticorpo può essere espresso in termini di specificità e affinità. La specificità determina quale antigene o suo epitopo viene legato dal dominio di legame. L'affinità è una misura per la forza di legame a un particolare antigene o epitopo. Un legame specifico è definito come legame con affinità (K_D) di almeno 1×10^{-5} M, più preferibilmente 1×10^{-7} M, più preferibilmente più elevata di 1×10^{-9} M. Tipicamente, anticorpi monoclonali per applicazioni terapeutiche hanno affinità fino a 1×10^{-10} M o persino più elevate. Il termine "antigene" come usato qui significa una sostanza o molecola che, quando introdotta nel corpo, innesca la produzione di un anticorpo da parte del sistema immunitario. Un antigene, tra gli altri, può essere derivato da organismi patogeni, cellule tumorali o altre cellule aberranti, da apteni, o persino da strutture proprie. Al livello molecolare, un antigene è caratterizzato dalla sua capacità di essere legato dal sito di legame di antigene di un anticorpo. Inoltre miscele di antigeni possono essere considerate come "antigene", vale a dire che il tecnico competente dovrebbe apprezzare che a volte un lisato di cellule tumorali, o particelle virali può essere indicato come "antigene", anche se in tale lisato di cellule tumorali o preparazione di particelle virali esistono molti determinanti antigenici. Un antigene comprende almeno uno, ma spesso più, epitopi. Il termine "epitopo" come usato qui significa una parte di un antigene che viene riconosciuta dal sistema immunitario, in maniera specifica da anticorpi, cellule B o cellule T. Anche se gli epitopi sono solitamente ritenuti essere derivati da proteine non proprie, sequenze derivate dall'ospite che possono essere riconosciute vengono anche classificate come epitopi.

Il termine "dominio di CH3" è ben noto nell'arte. La struttura di IgG ha quattro catene, due catene leggere e due catene pesanti; ogni catena leggera ha due domini, la catena leggera variabile e quella costante (VL e CL) e ogni catena pesante ha quattro domini, la catena pesante variabile (VH) e tre domini di catena pesante costante (CH1, CH2, CH3). La regione di dominio di CH2 e CH3 della catena pesante è chiamata porzione di Fc (frammento cristallizzabile), frammento Fc, scheletro Fc o semplicemente Fc. La molecola di IgG è un eterotetramero avente due catene pesanti che sono tenute insieme da legami di disolfuro (-S-S-) nella regione di cerniera e due catene leggere. Le catene pesanti dimerizzano attraverso interazioni nell'interfaccia di dominio di CH3-CH3 e attraverso interazioni nella regione di cerniera. Il numero di legami di disolfuro di cerniera varia tra le sottoclassi di immunoglobuline (Papadea e Check 1989). Il frammento Fc di una molecola di immunoglobulina è un dimero delle due regioni costanti C-terminali, vale a dire i domini di CH2 e CH3, della catena pesante. Tra le sue funzioni fisiologiche ci sono interazioni con il sistema del complemento e con specifici recettori sulla superficie di una varietà di cellule. Interazioni tra i domini di CH3 di due singole catene pesanti sono conosciute svolgere un ruolo importante nel guidare la dimerizzazione di catena pesante. Pertanto, domini di CH3 dirigono l'associazione di catene pesanti di anticorpo, ed è noto che l'interfaccia tra domini di CH3 contiene più di 20 residui di contatto da ciascuna catena che svolgono un ruolo nell'interazione di CH3-CH3 (Deisenhofer J., Biochemistry 1981(20)2361-2370; Miller S., J. Mol. Biol. 1990(216)965-973; Padlan, Advances in Protein Chemistry 1996 (49) 57-133). Le varianti di CH3 della presente invenzione possono pertanto essere usate in associazione con altri domini di anticorpo per generare anticorpi a lunghezza intera che sono bispecifici o monospecifici. La specificità dell'anticorpo come definita da combinazioni di VH/VL non influisce tipicamente sul comportamento di dimerizzazione di catena pesante che è guidato dai domini di CH3.

I termini "residuo di contatto", "amminoacido di contatto", "residuo di interfaccia" e "amminoacido di interfaccia" come usati qui tipicamente si riferiscono a qualsiasi residuo amminoacidico presente nel dominio di CH3 che può essere coinvolto in contatti inter-dominio, come può essere calcolato mediante tecnologie note nell'arte, incluso il calcolo di area di superficie accessibile a solvente (ASA) dei residui di dominio di CH3 in presenza e in assenza della seconda catena (Lee and Richards J. Mol. Biol. 1971 (55) 379) dove i residui che mostrano differenza ($> 1\text{\AA}^2$) in ASA tra i due calcoli sono identificati come residui di contatto. Residui di contatto che sono stati identificati includono residui in posizioni 347, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 360, 364, 366, 368, 370, 390, 392, 394, 395, 397, 399, 400, 405, 407, 409, 439 secondo il sistema di numerazione EU (Tabella A).

Tabella A: Elenco di residui di interfaccia di dominio di CH3

Residuo di interfaccia in catena A	Residui di contatto in catena B
------------------------------------	---------------------------------

Q347	K360
Y349	S354, D356, E357, K360
T350	S354, R355
L351	L351, P352, P353, S354, T366
S354	Y349, T350, L351
R355	T350
D356	Y349, K439
E357	Y349, K370
K360	Q347, Y349
S364	L368, K370
T366	L351, Y407
L368	S364, K409
K370	E357, S364
N390	S400
K392	L398, D399, S400, F405
T394	T394, V397, F405, Y407
P395	V397
V397	T394, P395
D399	K392, K409
S400	N390, K392
F405	K392, T394, K409
Y407	T366, T394, Y407, K409
K409	L368, D399, F405, Y407
K439	D356

Residui di contatto all'interno dell'interfaccia di CH₃-CH₃ possono essere amminoacidi che sono carichi, o residui amminoacidici che sono neutri. Il termine "residuo amminoacidico carico" o "residuo carico" come usato qui significa residui amminoacidici con catene laterali cariche elettricamente. Queste possono essere catene laterali cariche positivamente, come quelle presenti in arginina (Arg, R), istidina (His, H) e lisina (Lys, K) o possono essere catene laterali cariche negativamente, come quelle presenti in acido aspartico (Asp, D) e acido glutammico (Glu, E). Il termine "residuo amminoacidico neutro" o residuo neutro come usato qui si riferisce a tutti gli altri amminoacidi che non portano catene laterali cariche elettricamente. Questi residui neutri includono serina (Ser, S), treonina (Thr, T), asparagina (Asn, N), glutammina (Glu, Q), cisteina (Cys, C), glicina (Gly, G), prolina (Pro, P), alanina (Ala, A), valina (Val, V), isoleucina (Ile, I), leucina (Leu, L), metionina (Met, M), fenilalanina (Phe, F), tirosina (Tyr, Y) e triptofano (Trp, T).

Il termine "interfaccia di dominio di CH₃-CH₃" o "interfaccia di CH₃", "accoppiamento di CH₃-CH₃", "interfaccia di dominio" o semplicemente "interfaccia", come usato qui, si riferisce all'associazione tra due domini di CH₃ di polipeptidi comprendenti dominio di CH₃ separati che è un risultato di interazione di residui di amminoacidi, vale a dire almeno un'interazione tra un amminoacido di un primo dominio di CH₃ e un amminoacido di un secondo dominio di CH₃. Tale interazione è ad esempio tramite forze di Van der Waals, legami a idrogeno, legami a idrogeno mediati da acqua, ponti salini o altre forze elettrostatiche, interazioni attrattive tra catene laterali aromatiche, formazione di legami di disolfuro o altre forze note nell'arte.

Come usato qui, detti mezzi per un accoppiamento preferenziale del primo e del secondo polipeptide comprendente un dominio di CH₃ e detti terzo e quarto polipeptide comprendente un dominio di CH₃ possono essere qualsiasi mezzo noto nell'arte. In una forma di realizzazione, almeno una molecola di acido nucleico codifica per un dominio di CH₃ che contiene in una posizione di residuo di contatto un residuo amminoacidico grande (vale a dire una "sporgenza" o "protuberanza") come ad esempio R, F, Y, W, I o L, mentre almeno un'altra molecola di acido nucleico codifica per un dominio di CH₃ che contiene in una posizione di residuo di contatto complementare un residuo amminoacidico piccolo (vale a dire un "buco" o "cavità") come ad esempio G, A, S, T oppure V. I domini di CH₃ risultanti si accoppieranno preferenzialmente tra loro a causa della conformazione sterica di detti amminoacidi di contatto. La tecnologia sporgenza-in-buco è descritta qui sopra più in maggior dettaglio. In una ulteriore forma di realizzazione della presente invenzione, almeno una molecola di acido nucleico codifica per un dominio di CH₃ che contiene in una posizione di residuo di contatto che è carico naturalmente, vale a dire un K, H, R, D o E presente in natura, un amminoacido che ora porta la carica opposta rispetto al tipo selvatico, mentre almeno un'altra molecola di acido nucleico codifica per un dominio di CH₃ che contiene in una posizione di residuo di contatto complementare che è carico naturalmente, un amminoacido che ora porta la carica opposta rispetto al tipo selvatico. I domini di CH₃

ingegnerizzati risultanti si accoppieranno preferenzialmente tra loro a causa delle cariche opposte di detti amminoacidi di contatto, mentre l'accoppiamento di domini di CH3 identici sarà diminuito a causa della repulsione elettrostatica. In una forma di realizzazione, vengono usate mutazioni di CH3 come descritto in EP01870459, WO 2009/089004, Gunasekaran et al (2010). Preferibilmente, entrambi detti mezzi per un accoppiamento preferenziale di detti 1° e 2° polipeptide comprendente un dominio di CH3 e detti 3° e 4° polipeptide comprendente un dominio di CH3 sono amminoacidi ingegnerizzati nella carica. In una forma di realizzazione, differenti residui amminoacidici sono ingegnerizzati per un accoppiamento preferenziale di detti 1° e 2° polipeptide comprendente un dominio di CH3 rispetto ai residui amminoacidici che sono disegnati per un accoppiamento preferenziale di detti 3° e 4° polipeptide comprendente un dominio di CH3. In un metodo secondo l'invenzione almeno una prima e una seconda molecola di acido nucleico codificano per domini di CH3 con nuove mutazioni come fornite dalla presente invenzione. Come descritto qui di seguito in maggior dettaglio, la presente invenzione fornisce nuove mutazioni di CH3 che consentono la produzione di determinate molecole simili a Ig bispecifiche di interesse senza una quantità significativa di sottoprodotti (dimerici) indesiderati. La presente invenzione fornisce anche nuove mutazioni di CH3 che consentono la produzione di alcune molecole simili a Ig monospecifiche di interesse senza una quantità significativa di sottoprodotti (dimerici) indesiderati. L'uso di almeno una di queste mutazioni di CH3 secondo la presente invenzione è, di conseguenza, preferito.

Il termine "polipeptide", "molecola polipeptidica" o "catena polipeptidica" come usato qui si riferisce a una catena di amminoacidi che sono uniti covalentemente attraverso legami peptidici. Le proteine sono tipicamente costituite da una o più molecole polipeptidiche. Un'estremità di ogni polipeptide, chiamato l'ammino terminale o N-terminale, ha un gruppo ammino libero. L'altra estremità, con il suo gruppo carbossile libero, è chiamata il carbossi terminale o C-terminale. I polipeptidi secondo la presente invenzione possono essere passati attraverso processi di modificazione post-traduzionale e possono ad esempio essere glicosilati. Le catene polipeptidiche comprendenti un dominio di CH3 della presente invenzione pertanto si riferiscono a catene polipeptidiche che comprendono almeno un dominio di CH3 di Ig e che possono essere passate attraverso processi di modificazione post-traduzionale.

Il termine "molecola di acido nucleico" come usato qui è definito come una molecola comprendente una catena di nucleotidi, più preferibilmente DNA e/o RNA. In una forma di realizzazione, viene usato un RNA a doppio filamento. In altre forme di realizzazione una molecola di acido nucleico dell'invenzione comprende altri generi di strutture di acido nucleico come ad esempio un'elica di DNA/RNA, acido nucleico peptidico (PNA), acido nucleico bloccato (LNA) e/o un ribozima. Perciò, il termine "molecola di acido nucleico" comprende anche una catena comprendente nucleotidi non naturali, nucleotidi modificati e/o blocchi di costruzione non nucleotidici che mostrano la stessa funzione di nucleotidi naturali.

La presente invenzione fornisce inoltre un metodo secondo le rivendicazioni per fabbricare una cellula ospite per la produzione di almeno due anticorpi differenti. Detti metodi per fabbricare dette cellule ospiti preferibilmente comprendono inoltre il passaggio di introdurre in detta cellula ospite una sequenza di acido nucleico codificante per una catena leggera comune.

Qui viene anche fornita una cellula ospite ricombinante secondo le rivendicazioni comprendente sequenze di acido nucleico che codificano per almeno una prima, una seconda, una terza e una quarta catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3.

Una cellula ospite ricombinante secondo l'invenzione preferibilmente comprende inoltre una sequenza di acido nucleico che codifica per una catena leggera comune.

Una "cellula ospite" secondo l'invenzione può essere qualsiasi cellula ospite in grado di esprimere molecole di DNA ricombinanti, inclusi batteri come ad esempio *Escherichia* (ad esempio *E. coli*), *Enterobacter*, *Salmonella*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, lieviti come *S. cerevisiae*, *K. lactis*, *P. pastoris*, *Candida*, o *Yarrowia*, funghi filamentosi come *Neurospora*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus nidulans* e *Aspergillus niger*, cellule di insetto come cellule SF-9 o SF-21 di *Spodoptera frugiperda*, e preferibilmente cellule di mammifero come cellule di ovaio di criceto cinese (CHO), cellule di BHK, cellule di topo incluse cellule SP2/0 e cellule di mieloma NS-0, cellule di primate come cellule COS e Vero, cellule MDCK, cellule BRL 3A, ibridomi, cellule tumorali, cellule primarie immortalizzate, cellule umane come W138, HepG2, HeLa, HEK293, HT1080 o cellule di retina embrionale come PER. C6 e simili. Spesso, il sistema di espressione di scelta coinvolgerà un vettore di espressione in cellula di mammifero e un ospite in modo tale che gli anticorpi possano essere glicosilati in maniera appropriata. Una linea cellulare umana, preferibilmente PER.C6, può essere vantaggiosamente usata per ottenere anticorpi con uno schema di glicosilazione completamente umano. Le condizioni per la crescita o la moltiplicazione di cellule (vedere per esempio Tissue Culture, Academic Press, Kruse and Paterson, editors (1973)) e le condizioni per espressione del prodotto ricombinante possono differire in qualche modo, e una ottimizzazione del processo viene solitamente effettuata per incrementare le proporzioni di prodotto e/o la crescita delle cellule l'una rispetto all'altra, secondo metodi generalmente noti al tecnico competente nel ramo. In generale, principi, protocolli e tecniche pratiche per massimizzare la produttività di colture cellulari di mammifero possono essere trovati in Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach (M. Butler, ed., IRL Press, 1991). Espressione di anticorpi in cellule ospiti ricombinanti è stata ampiamente descritta nell'arte (vedere ad esempio EP0120694; EP0314161; EP0481790; EP0523949; brevetto statunitense 4,816,567; WO 00/63403). Le molecole di acido nucleico che codificano per le catene leggere e pesanti possono essere presenti come copie extracromosomiche e/o stabilmente integrate nel cromosoma della cellula ospite, quest'ultima è preferita.

Un ulteriore aspetto della presente invenzione è quello di fornire una coltura di cellule ospiti ricombinanti secondo l'invenzione, o una coltura

di cellule ospiti ricombinanti ottenibili od ottenute mediante un metodo secondo l'invenzione, detta coltura producendo almeno due anticorpi differenti.

Per ottenere l'espressione di sequenze di acido nucleico che codificano per i polipeptidi comprendenti un dominio di CH3, è ben noto ai tecnici del ramo che sequenze capaci di guidare tale espressione possono essere funzionalmente collegate alle sequenze di acido nucleico che codificano per i polipeptidi comprendenti un dominio di CH3. Funzionalmente collegato viene inteso descrivere che le sequenze di acido nucleico che codificano per i polipeptidi comprendenti un dominio di CH3 o loro precursori sono collegate alle sequenze in grado di guidare l'espressione in modo tale che queste sequenze possano guidare l'espressione dei polipeptidi comprendenti un dominio di CH3 o loro precursori. Nell'arte sono disponibili vettori di espressioni utili, ad esempio la serie di vettore di pcDNA di Invitrogen. Quando la sequenza che codifica per il polipeptide di interesse è correttamente inserita con riferimento a sequenze che governano la trascrizione e la traduzione del polipeptide codificato, la cassetta di espressione risultante è utile per produrre il polipeptide di interesse, riferito come espressione. Sequenze che guidano l'espressione possono includere promotori, intensificatori, e loro combinazioni. Queste dovrebbero essere in grado di funzionare nella cellula ospite, guidando in tal modo l'espressione delle sequenze di acido nucleico che sono funzionalmente collegate ad esse. Promotori possono essere costitutivi o regolati e possono essere ottenuti da svariate fonti, inclusi virus, fonti procariotiche, o eucariotiche o disegnati in maniera artificiale. L'espressione di acidi nucleici di interesse può essere dal promotore naturale o suo derivato o da un promotore interamente eterologo. Alcuni promotori ben conosciuti e molto usati per espressione in cellule eucariotiche comprendono promotori derivati da virus, come adenovirus, ad esempio il promotore di E1A, promotori derivati da citomegalovirus (CMV), come il promotore immediato precoce (IE) di CMV e promotori derivati da virus di scimmia 40 (SV40). Promotori adeguati possono anche essere derivati da cellule eucariotiche, come promotori di methallotioneina (MT), promotore di fattore di allungamento 1 α (EF-1 α), promotore di actina, un promotore di immunoglobulina e promotori di shock termico. Qualsiasi promotore o intensificatore/promotore capace di guidare l'espressione della sequenza di interesse nella cellula ospite è adeguato nell'invenzione. In una forma di realizzazione la sequenza capace di guidare l'espressione comprende una regione da un promotore di CMV, preferibilmente la regione comprendendo nucleotidi da -735 a +95 dell'intensificatore/promotore genico precoce immediato di CMV. Il tecnico competente sarà consapevole che le sequenze di espressione usate nell'invenzione possono essere combinate in maniera adeguata con elementi che possono stabilizzare o intensificare l'espressione, come isolanti, regioni di attacco a matrice, ed elementi STAR (WO 03/004704). Questo può intensificare la stabilità e/o i livelli di espressione. La produzione di proteine in cellule ospiti ricombinanti è stata ampiamente descritta, ad esempio in Current Protocols in Protein Science, 1995, Coligan JE, Dunn BM, Ploegh HL, Speicher DW, Wingfield PT, ISBN 0-471-11184-8; Bendig, 1988. La coltura di una cellula viene compiuta per consentirle di

metabolizzare, e/o crescere e/o dividersi e/o produrre proteine di interesse ricombinanti. Questo può essere compiuto mediante metodi ben noti a tecnici competenti nell'arte, e include ma non è limitato a fornire sostanze nutritive alla cellula. I metodi comprendono crescita aderente a superfici, crescita in sospensione, o loro combinazioni. Svariate condizioni di coltura possono essere ottimizzate mediante metodi ben noti nell'arte per ottimizzare rese di produzione di proteina. La coltura può essere compiuta ad esempio in piatti, bottiglie da agitazione o in bioreattori, usando sistemi in batch, fed-batch, continuo, a fibra cava e simili. Al fine di realizzare una produzione (continua) su larga scala di proteine ricombinanti attraverso la coltura cellulare, nell'arte viene preferito avere cellule capaci di crescere in sospensione, e viene preferito avere cellule capaci di essere coltivate in assenza di siero derivato da animale o uomo o componenti di siero derivato da animale o uomo. Pertanto, la purificazione è più semplice e la sicurezza è intensificata per l'assenza di proteine animali o umane derivate dal terreno di coltura addizionali, mentre il sistema è anche molto affidabile siccome terreni sintetici sono i migliori in termini di riproducibilità.

Molecole simili a Ig sono espresse in cellule ospiti e sono raccolte dalle cellule o, preferibilmente, dal terreno di coltura cellulare mediante metodi che sono generalmente noti al tecnico competente nell'arte. Dopo la raccolta, queste molecole simili a Ig possono essere purificate usando metodi noti nell'arte. Tali metodi possono includere precipitazione, centrifugazione, filtrazione, cromatografia a esclusione dimensionale, cromatografia di affinità, cromatografia a scambio cationico e/o anionico e cromatografia a interazione idrofobica. Per una miscela di anticorpi che comprendono molecole di IgG, può essere usata in maniera adeguata la cromatografia di affinità di proteina A o proteina G (vedere ad esempio brevetti statunitensi 4,801,687 e 5,151,504).

Molecole simili a Ig, e/o loro miscele, prodotte con metodi secondo la presente invenzione preferibilmente hanno una catena leggera comune. Inoltre viene, di conseguenza, fornito un metodo secondo l'invenzione, comprendente inoltre fornire a detta cellula ospite una molecola di acido nucleico che codifica per una catena leggera comune. Questa è una catena leggera che è in grado di accoppiarsi con almeno due differenti catene pesanti, formando in tal modo domini di legame di antigeni funzionali. Un dominio di legame di antigeni funzionale è capace di legarsi in maniera specifica a un antigene. Preferibilmente, viene usata una catena leggera comune che è capace di accoppiarsi con tutte le catene pesanti prodotte con un metodo secondo l'invenzione, formando in tal modo domini di legame di antigeni funzionali, in modo tale che venga evitato un accoppiamento errato di catene pesanti e leggere non abbinate. In un aspetto, vengono usate solamente catene leggere comuni con una sequenza amminoacidica identica. In alternativa, i tecnici competenti nell'arte riconosceranno che "comune" si riferisce anche a equivalenti funzionali della catena leggera la cui sequenza amminoacidica non è identica. Esistono molte varianti di detta catena leggera in cui sono presenti mutazioni (delezioni, sostituzioni, aggiunte) che non influenzano materialmente la formazione di regioni di legame funzionali. Tali varianti sono quindi anche capaci di legare differenti

catene pesanti e formare domini di legame di antigene funzionali. Il termine "catena leggera comune" come usato qui pertanto si riferisce a catene leggere che possono essere identiche o avere alcune differenze di sequenza amminoacidica, pur mantenendo la specificità di legame dell'anticorpo risultante dopo accoppiamento con una catena pesante. È per esempio possibile preparare o trovare catene leggere che sono non identiche ma ancora funzionalmente equivalenti, ad esempio introducendo e testando cambiamenti amminoacidici conservativi e/o cambiamenti di amminoacidi in regioni che non contribuiscono o contribuiscono solo parzialmente alla specificità di legame quando accoppiate con la catena pesante. Una combinazione di una certa catena leggera comune e di tali varianti funzionalmente equivalenti è racchiusa all'interno del termine "catena leggera comune". Viene fatto riferimento a WO 2004/009618 per una descrizione dettagliata dell'uso di catene leggere comuni. Preferibilmente, nella presente invenzione viene usata una catena leggera comune che è una catena leggera simile a linea germinale, più preferibilmente una catena leggera di linea germinale, preferibilmente una catena leggera kappa umana di linea germinale riarrangiata, più preferibilmente la catena leggera kappa umana di linea germinale riarrangiata IgV κ 1-39/J κ o IGV κ 3-20/J κ .

In alternativa, il tecnico competente nel ramo può selezionare, come una alternativa all'uso di una catena leggera comune ed evitare un accoppiamento errato di catene pesanti e leggere non abbinate, mezzi per accoppiamento forzato della catena pesante e leggera, come per esempio descritto in WO2009/080251, WO2009/080252 e/o WO2009/080253.

La presente invenzione fornisce nuovi domini di CH3 ingegnerizzati così come nuove combinazioni di mutazioni di CH3. Prima della presente invenzione, amminoacidi di contatto carichi di domini di CH3 che sono stati conosciuti per essere coinvolti in accoppiamento di CH3-CH3 sono stati sostituiti da amminoacidi di carica opposta (inversione di carica), influenzando in tal modo l'accoppiamento di CH3-CH3. Le mutazioni secondo la presente invenzione sono un'alternativa inventiva a questo approccio, dal momento che ora amminoacidi di CH3 che sono non carichi o neutri in CH3 di tipo selvatico sono sostituiti con residui carichi. La presente invenzione in questa forma di realizzazione non cambia amminoacidi di contatto carichi mediante amminoacidi di carica opposta ma sostituisce amminoacidi di CH3 non carichi per quelli carichi. L'approccio della presente invenzione fornisce non solo un metodo per dirigere in modo efficiente la dimerizzazione di domini di CH3, ma ha anche il vantaggio che viene creata almeno un'interazione di carica-carica addizionale nell'interfaccia di CH3. Alla luce di questa interazione di carica-carica addizionale sulle coppie di carica esistenti nell'interfaccia di CH3-CH3, i dimeri secondo l'invenzione sono generalmente più stabili rispetto ai dimeri di tipo selvatico (il dimero di tipo selvatico è definito come una IgG bispecifica (AB) senza ingegnerizzazione di CH3 in contrasto con i suoi omodimeri parentali (AA o BB)). Inoltre, è sorprendentemente diventato possibile aumentare la proporzione di una o più molecole simili a Ig di interesse in una miscela anche ulteriormente. Come descritto qui sopra, metodi noti nell'arte per produzione preferenziale di un anticorpo bispecifico tipicamente coinvolgono

la produzione di alcuni prodotti collaterali dimerici indesiderati. Ad esempio, la proporzione di un anticorpo bispecifico di interesse usando la tecnologia di sporgenza-in-buco è al massimo dell'87%, mentre l'approccio di ingegnerizzazione elettrostatica in cui amminoacidi di contatto carichi sono sostituiti da amminoacidi di carica opposta, dà come risultato anche proporzioni fino al 96% (vedere ad esempio, Esempio 11). Abbastanza sorprendentemente, i presenti inventori sono riusciti a introdurre mutazioni che intensificano ulteriormente la proporzione di una molecola simile a Ig di interesse in una miscela. Per esempio, Esempio 17 divulga un metodo che usa mutazioni secondo la presente invenzione, in cui la proporzione di un anticorpo bispecifico di interesse è stata sollevata in una misura tale che nessun sottoprodotto dimerico è stato rilevabile del tutto nella miscela risultante. Mezze molecole non accoppiate costituite da solamente una singola catena pesante accoppiata con una catena leggera comune sono state presenti in una certa misura nelle miscele, ma queste sono il risultato di un'espressione non bilanciata delle catene pesanti e possono essere facilmente separate dalla miscela mediante cromatografia a esclusione dimensionale. Perciò, con tali mutazioni secondo la presente invenzione, una molecola simile a Ig bispecifica può essere prodotta in una singola cellula con una proporzione elevata con essenzialmente nessun sottoprodotto dimerico contaminante essendo presente, cosa che è particolarmente adeguata per la produzione di una composizione farmaceutica.

Gli amminoacidi in posizione 366 di un dominio di CH3 e in posizione 351 di un secondo dominio di CH3 sono stati riportati essere una coppia di residui di contatto nell'interfaccia di CH3-CH3, il che significa che vengono trovati sufficientemente vicini l'uno all'altro nella conformazione tridimensionale della molecola simile a Ig risultante al fine di essere in grado di interagire tra loro. Perciò, il primo dominio di CH3 si accoppierà preferibilmente con il secondo dominio di CH3.

In un metodo secondo l'invenzione, treonina (T) in posizione 366 di un primo dominio di CH3 è sostituita da lisina (K) e leucina (L) in posizione 351 di un secondo dominio di CH3 è sostituita da acido aspartico (D). Se il primo polipeptide comprendente un dominio di CH3, che porta una lisina (K) in posizione 366, comprende inoltre un dominio variabile che ha specificità per antigene A, e se il secondo polipeptide comprendente un dominio di CH3, che porta un acido aspartico (D) in posizione 351, comprende inoltre un dominio variabile che ha specificità per l'antigene B, saranno formate prevalentemente molecole simili a Ig bispecifiche con una specificità AB. Di conseguenza viene fornito un metodo secondo la presente invenzione, in cui detti mezzi per un accoppiamento preferenziale di detti 1° e 2° polipeptide comprendente un dominio di CH3 o detti mezzi per un accoppiamento preferenziale di detti 3° e 4° polipeptide comprendente un dominio di CH3 sono una sostituzione di treonina in posizione 366 di detto 1° o 3° dominio di CH3 con lisina (K) e una sostituzione di leucina in posizione 351 di detti 2° e 4° dominio di CH3 con acido aspartico (D).

Una combinazione preferita di mutazioni secondo la presente invenzione è la sostituzione di treonina (T) con lisina (K) in posizione 366 di un primo polipeptide comprendente un dominio di CH3 che comprende inoltre un dominio variabile (per esempio con specificità A) e la sostituzione

di leucina (L) con acido aspartico (D) in posizione 351 di un secondo polipeptide comprendente un dominio di CH3 che comprende inoltre un dominio variabile (ad esempio con specificità B). Questo è denotato come una mutazione di coppia di T366K/L351'D. Come spiegato in precedenza, gli amminoacidi in posizione 366 di un dominio di CH3 e in posizione 351 di un secondo dominio di CH3 sono stati riportati essere una coppia di residui di contatto nell'interfaccia di CH3-CH3. La lisina che viene introdotta in posizione 366 e l'acido aspartico introdotto in posizione 351 hanno cariche opposte, in modo tale che questi amminoacidi si attrarranno elettrostaticamente a vicenda. Perciò, il primo dominio di CH3 attrarrà preferenzialmente il secondo dominio di CH3 e saranno prevalentemente formate molecole simili a Ig comprendenti un primo dominio di CH3 contenente lisina in posizione 366 accoppiato con un secondo dominio di CH3 contenente acido aspartico in posizione 351. Se il primo polipeptide comprendente un dominio di CH3 ha specificità per un antigene A, e se il secondo polipeptide comprendente un dominio di CH3 ha specificità per un antigene B, saranno formate prevalentemente molecole simili a Ig bispecifiche con specificità 'AB'. Nota bene, in alcune forme di realizzazione la specificità dei domini variabili di dette prima e seconda catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3 può essere la stessa, cosa che darà come risultato la formazione di molecole simili a Ig monospecifiche (ad esempio con specificità 'AA'). Come menzionato sopra, uno dei vantaggi delle mutazioni secondo la presente invenzione è il fatto che viene creata una nuova interazione tra una coppia di amminoacidi carichi appena introdotti, invece di sostituire interazioni di amminoacidi carichi esistenti. Questo non è stato precedentemente divulgato o suggerito. Un aspetto dell'invenzione fornisce di conseguenza un metodo secondo la presente invenzione per produrre almeno due anticorpi differenti da una singola cellula ospite, in cui detta 1^a catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3 comprende un residuo di lisina (K) in posizione amminoacidica 366 secondo il sistema di numerazione EU, e detta 2^a catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3 comprende un residuo di acido aspartico (D) in posizione amminoacidica 351 secondo il sistema di numerazione EU.

Usando le sostituzioni amminoacidiche menzionate sopra secondo la presente invenzione, è diventato possibile produrre una molecola simile a Ig eterodimerica da una singola cellula, per cui la presenza di omodimeri contaminanti è inferiore al 5%, preferibilmente inferiore al 2%, più preferibilmente inferiore all'1%, o, in maniera più preferibile, per cui omodimeri contaminanti sono essenzialmente assenti.

Preferibilmente, viene fornito un metodo secondo la presente invenzione per produrre almeno due anticorpi differenti in cui detta prima catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3 comprende inoltre un residuo di lisina (K) in posizione amminoacidica 351 secondo il sistema di numerazione EU. Viene inoltre preferito che detta seconda catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3 comprenda inoltre un residuo di acido glutammico (E) o un residuo di acido aspartico (D) in posizione amminoacidica 349 secondo il sistema di numerazione EU e/o un residuo di acido glutammico (E) in posizione amminoacidica 368 secondo il sistema di numerazione EU. Più preferibilmente, detta seconda catena polipeptidica

comprendente un dominio di CH3 comprende inoltre un residuo di acido glutammico (E) in posizione amminoacidica 368 secondo il sistema di numerazione EU.

Pertanto, in una forma di realizzazione preferita le mutazioni di T366K/L351'D menzionate sopra secondo la presente invenzione sono inoltre combinate con la sostituzione di leucina (L) con acido glutammico (E) in posizione 368 del secondo dominio di CH3. Questo è, ad esempio, indicato come una mutazione di T366K/L351'D,L368'E (ma sono anche possibili modi alternativi per indicare, come T336K/L351D-L368E o T366K/L351D,L368E o T366K - L351D,L368E). Come mostrato in Esempio 17, una introduzione di questa mutazione secondo l'invenzione in un primo polipeptide comprendente un dominio di CH3 con specificità per un antigene A e un secondo polipeptide comprendente un dominio di CH3 con specificità per un antigene B dà come risultato una buona proporzione particolare di molecole simili a Ig bispecifiche con doppia specificità AB. Con questa coppia mutazionale è persino diventato possibile ottenere un anticorpo bispecifico senza qualsiasi quantità rilevabile di omodimeri formati.

In ancora un'altra forma di realizzazione preferita, treonina (T) è sostituita da lisina (K) in posizione 366 di un primo dominio di CH3 e leucina (L) è sostituita da acido aspartico (D) in posizione 351 di un secondo dominio di CH3 e tirosina (Y) è sostituita da acido glutammico (E) in posizione 349 di detto secondo dominio di CH3. Questo è ad esempio indicato come una mutazione di T366K/L351'D,Y349'E ma altri modi per indicare queste mutazioni possono includere per esempio T366K - L351D:Y349E o T366K/L351D,Y349E o semplicemente T366K/L351DY349E. Residuo Y349 è un residuo vicino del residuo in posizione 351 che può contribuire a interazioni di dimero. Secondo i dati in silico, Y349E si aggiunge alla stabilità dell'eterodimero (punteggi in silico più bassi), così come alla destabilizzazione del monodimero (punteggi più elevati in silico) e acido glutammico (E) in posizione 349 è più favorevole rispetto ad acido aspartico (D). Pertanto, introduzione di una seconda sostituzione amminoacidica nel secondo polipeptide comprendente un dominio di CH3, comprendente già la sostituzione amminoacidica in posizione 351, favorisce ulteriormente una eterodimerizzazione.

In ancora un'altra forma di realizzazione preferita, treonina (T) è sostituita da lisina (K) in posizione 366 di un primo dominio di CH3 e leucina (L) è sostituita da acido aspartico (D) in posizione 351 di un secondo dominio di CH3 e tirosina (Y) è sostituita da acido glutammico (E) in posizione 349 di detto secondo dominio di CH3 e leucina (L) è sostituita da acido glutammico (E) in posizione 368 di detto secondo dominio di CH3. Questo è indicato come una mutazione di T366K/L351'D,Y349'E,L368'E. I due residui Y349 e L368 sono residui che possono contribuire a interazioni di dimero. Secondo i dati in silico, Y349E e L368E si aggiungono alla stabilità dell'eterodimero (punteggi più bassi in silico) così come alla destabilizzazione del dimero di BB (punteggi più elevati in silico) e acidi glutammici (E) in posizioni 349 e 368 sono più favorevoli rispetto ad acidi aspartici (D). Pertanto, una introduzione di una seconda e una terza sostituzione amminoacidica nella catena B, che comprende già la sostituzione

amminoacidica in posizione 351, favorisce ulteriormente una eterodimerizzazione.

In ancora un'altra forma di realizzazione preferita, treonina (T) è sostituita da lisina (K) in posizione 366 di un primo dominio di CH3 e leucina (L) è sostituita da lisina (K) in posizione 351 di detto primo dominio di CH3 e leucina (L) è sostituita da acido aspartico (D) in posizione 351 di un secondo dominio di CH3 e leucina (L) è sostituita da acido glutammico (E) in posizione 368 di detto secondo dominio di CH3. Questo è indicato come una mutazione di T366K,L351K/L351'D,L368'E. Questa mutazione intensifica anche la proporzione dell'anticorpo (bispecifico) di interesse, come mostrato negli Esempi. Anche con questa mutazione è diventato possibile ottenere un anticorpo bispecifico senza qualsiasi quantità rilevabile di omodimeri formati.

In ancora un'altra forma di realizzazione preferita, treonina (T) è sostituita da lisina (K) in posizione 366 di un primo dominio di CH3 e leucina (L) è sostituita da lisina (K) in posizione 351 di detto primo dominio di CH3 e leucina (L) è sostituita da acido aspartico (D) in posizione 351 di un secondo dominio di CH3 e tirosina (Y) è sostituita da acido aspartico (D) in posizione 349 di detto secondo dominio di CH3 e arginina (R) è sostituita da acido aspartico (D) in posizione 355 di detto secondo dominio di CH3. Questo è indicato come mutazione T366K,L351K/L351'D,Y349'D,R355'D. La coppia di T366K-L351K/L351'D-Y349'D può essere ulteriormente migliorata mediante la mutazione R355'D nella catena B, cosa che dà come risultato un punteggio di BB in silico più alto, ma anche il punteggio di AB in silico è leggermente più alto.

Tabella B fornisce una panoramica di mutazioni che possono essere introdotte in domini di CH3 come mezzi preferiti per un accoppiamento preferenziale per creare eterodimeri od omodimeri.

Tabella B:

Sostituzioni di AA in CH3	Costrutto #	Si accoppia preferenzialmente con
- (tipo selvatico)	-	Tipo selvatico
E356K, D399K	1	Costrutto 2 o 3
K392D, K409D	2	Costrutto 1
K392D, K409D, K439D	3	Costrutto 1
K392D, D399K, K409D	4	Costrutto 4
E356K, E357K, K439D, K370D	5	Costrutto 5
T366W	6	Costrutto 7

T366S, L368A, Y407V	7	Costrutto 6
T366K	43	Costrutto 63, 69, 70, 71, 73
L351D	63	Costrutto 43, 68
T366K, L351K	68	Costrutto 63, 69, 70, 71, 72, 75
L351D, L368E	69	Costrutto 43, 68
L351E, Y349E	70	Costrutto 43, 68
L351D, Y349E	71	Costrutto 43, 68
L351D, R355D	72	Costrutto 43, 68
L351D, Y349E, L368E	73	Costrutto 43
L351D, Y349D, R355D	75	Costrutto 68

Un metodo secondo la presente invenzione per produrre almeno due anticorpi differenti, in cui detti mezzi per un accoppiamento preferenziale di detti 1° e 2° polipeptide comprendente un dominio di CH3 e/o detti mezzi per un accoppiamento preferenziale di detti 3° e 4° polipeptide comprendente un dominio di CH3 comprendono almeno una combinazione di mutazioni, come raffigurato in Tabella B viene di conseguenza anche divulgato qui. Preferibilmente, detti mezzi per un accoppiamento preferenziale di detti 1° e 2° polipeptide comprendente un dominio di CH3 e detti mezzi per un accoppiamento preferenziale di detti 3° e 4° polipeptide comprendente un dominio di CH3 comprendono almeno due combinazioni di mutazioni come raffigurato in Tabella B.

La presente invenzione divulga anche nuove combinazioni di mutazioni di CH3 con le quali è diventato possibile produrre una miscela di almeno due molecole simili a Ig monospecifiche in una singola cellula, in cui le molecole simili a Ig bispecifiche contaminanti sono inferiori al 5%, preferibilmente superiori al 2%, ancor più preferibilmente inferiori all'1%, e più preferibilmente persino essenzialmente assenti. Queste mutazioni secondo l'invenzione sono, di conseguenza, particolarmente adeguate per la produzione di una miscela di anticorpi monospecifici, cosa che è per esempio vantaggiosa quando viene desiderato un livello elevato di reticolazione di due molecole bersaglio identiche, quando la densità di anticorpi su una cellula bersaglio deve essere abbastanza elevata per reclutare determinate funzioni effettrici come lisi mediata da complemento di una cellula tumorale, o quando due bersagli sono situati troppo lontani l'uno dall'altro per cui essi non possono essere legati da un singolo anticorpo bispecifico, o al fine di semplificare procedure di approvazione normativa. In tali casi, spesso viene desiderato di ottimizzare la piattaforma di produzione per tali anticorpi monospecifici. Come mostrato in Esempio 10, la presente invenzione fornisce l'idea che quando lisina (K) in posizione 392 di un primo

polipeptide comprendente un dominio di CH3 (ad esempio avente specificità A) viene sostituita da acido aspartico (D) e quando acido aspartico (D) in posizione 399 di detto primo polipeptide comprendente un dominio di CH3 è sostituito da lisina (K) e quando lisina (K) in posizione 409 di detto primo polipeptide comprendente un dominio di CH3 è sostituita da acido aspartico (D), è diventato possibile produrre una miscela di almeno due molecole simili a Ig monospecifiche differenti in una singola cellula, incluse molecole simili a Ig monospecifiche con specificità AA, in cui la formazione di sottoprodotti bispecifici (molecole simili a Ig bispecifiche) è ridotta al di sotto del 5%, o anche al di sotto del 3%, o persino essenzialmente non rilevabile affatto. Perciò, la combinazione menzionata sopra di mutazioni (qui indicate come K392D, D399K, K409D) è particolarmente preferita per la produzione di una miscela di molecole simili a Ig monospecifiche. Il tecnico competente nel ramo si renderà conto che sue varianti funzionali, vale a dire, K392E, D399R, K409E, possono dare come risultato effetti simili. In aggiunta, doppi mutanti comprendenti sostituzioni di D399K e K409D, o altre varianti funzionali come ad esempio K392D e K409D, D399R e K409E e così via, possono anche dare come risultato effetti simili.

Lo stesso vale per una combinazione di mutazioni in cui acido glutammico (E) in posizione 356 di un primo polipeptide comprendente un dominio di CH3 è sostituito da lisina (K) e in cui acido glutammico (E) in posizione 357 di detto primo polipeptide comprendente un dominio di CH3 è sostituito da lisina (K) e in cui lisina (K) in posizione 439 di detto primo polipeptide comprendente un dominio di CH3 è sostituita da acido aspartico (D) e in cui lisina (K) in posizione 370 di detto primo polipeptide comprendente un dominio di CH3 è sostituita da acido aspartico (D). Questa combinazione di mutazioni (qui indicata come E356K, E357K, K439D, K370D) è anche particolarmente preferita per la produzione di una miscela di molecole simili a Ig monospecifiche. Il tecnico competente nel ramo si renderà conto che le sue varianti funzionali, vale a dire E356R, E357R, K439E, K370E, possono dare come risultato effetti simili. In aggiunta, mutanti tripli o doppi comprendenti sostituzioni di E356K e K439D e E357K e K370D, o altre varianti funzionali, possono anche dare come risultato effetti simili. Viene inoltre divulgato di conseguenza un metodo per produrre almeno due differenti molecole simili a Ig monospecifiche da una singola cellula ospite, in cui ciascuna di dette due molecole simili a Ig comprende due domini di CH3 che sono capaci di formare un'interfaccia, detto metodo comprendendo fornire in detta cellula

a) una prima molecola di acido nucleico codificante per una 1^a catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3 avente una specificità

A,

b) una seconda molecola di acido nucleico codificante per una 2^a catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3 avente una specificità

B,

in cui detta prima catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3 comprende una mutazione di K392D, D399K, K409D e detta

seconda catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3 comprende un dominio di CH3 di tipo selvatico o comprende una mutazione di E356K, E357K, K439D, K370D, detto metodo comprendendo inoltre il passaggio di coltivare detta cellula ospite e consentire l'espressione di dette molecole di acido nucleico e raccogliere dette almeno due differenti molecole simili a Ig dalla coltura.

Un aspetto alternativo divulga un metodo per produrre almeno due differenti molecole simili a Ig monospecifiche da una singola cellula ospite, in cui ciascuna di dette due molecole simili a Ig comprende due domini di CH3 che sono capaci di formare un'interfaccia, detto metodo comprendendo fornire in detta cellula

a) una prima molecola di acido nucleico codificante per una 1^a catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3 avente una specificità A,

b) una seconda molecola di acido nucleico codificante per una 2^a catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3 avente una specificità B,

in cui detta prima catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3 comprende un dominio di CH3 di tipo selvatico o comprende una mutazione di K392D, D399K, K409D e detta seconda catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3 comprende una mutazione di E356K, E357K, K439D, K370D, detto metodo comprendendo inoltre il passaggio di coltivare detta cellula ospite e consentire l'espressione di dette molecole di acido nucleico e raccogliere dette almeno due differenti molecole simili a Ig dalla coltura.

Come mostrato in Esempio 10, due molecole simili a Ig monospecifiche possono essere prodotte in una singola cellula, in cui la formazione di molecole simili a Ig bispecifiche è essenzialmente non rilevabile. Il tecnico competente nel ramo può selezionare una 3^a molecola di acido nucleico che codifica per una catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3 di tipo selvatico o ingegnerizzato da fornire a detta cellula ospite in modo tale che venga prodotta una miscela di 3 anticorpi monospecifici, e così via.

In un aspetto dell'invenzione, viene fornito un metodo secondo l'invenzione per produrre almeno due differenti anticorpi in cui ciascuna delle catene polipeptidiche comprendenti un dominio di CH3 comprende inoltre una regione variabile che riconosce un epitopo bersaglio differente, in cui gli epitopi bersaglio sono situati sulla stessa molecola. Questo spesso consente una controazione più efficiente della funzione (biologica) di detta molecola bersaglio rispetto a una situazione in cui solamente un epitopo è soggetto a targeting. Ad esempio, una molecola simile a Ig eterodimerica può simultaneamente legarsi a 2 epitopi presenti su, ad esempio, recettori di fattore di crescita o molecole solubili critiche per cellule tumorali per proliferare, bloccando in tal modo efficacemente svariati percorsi di trasmissione del segnale indipendenti che portano a una proliferazione incontrollata, e qualsiasi combinazione di almeno due molecole simili a Ig possono legarsi simultaneamente a 2, o anche a 3 o 4 epitopi presenti su

tali recettori di fattore di crescita o molecole solubili.

In una forma di realizzazione preferita, la molecola bersaglio è una molecola solubile. In un'altra forma di realizzazione preferita, la molecola bersaglio è una molecola legata a membrana.

In un altro aspetto dell'invenzione, viene fornito un metodo secondo l'invenzione per produrre almeno due differenti anticorpi in cui ciascuna delle catene polipeptidiche comprendenti un dominio di CH3 comprende inoltre una regione variabile che riconosce un epitopo bersaglio, in cui gli epitopi bersaglio sono posizionati su molecole differenti. In questo caso, ciascuna delle differenti molecole bersaglio può essere una molecola solubile o una molecola legata a membrana. In una forma di realizzazione, le differenti molecole bersaglio sono molecole solubili. In alternativa, una molecola bersaglio è una molecola solubile mentre la seconda molecola bersaglio è una molecola legata a membrana. In ancora un'altra alternativa, entrambe le molecole bersaglio sono molecole legate a membrana. In una forma di realizzazione le molecole bersaglio differenti sono espresse sulle stesse cellule, mentre in altre forme di realizzazione le differenti molecole bersaglio sono espresse su cellule differenti. A titolo di esempio non limitante, qualsiasi molecola eterodimerica simile a Ig o qualsiasi combinazione di almeno due molecole simili a Ig può essere adeguata per bloccare simultaneamente più recettori legati a membrana, neutralizzare più molecole solubili come citochine o fattori di crescita per cellule tumorali o per neutralizzare differenti sierotipi virali o ceppi virali.

Una forma di realizzazione preferita fornisce un metodo secondo l'invenzione per produrre almeno due differenti anticorpi, in cui almeno uno di detti epitopi bersaglio è situato su una cellula tumorale. In alternativa, o in aggiunta, almeno uno di detti epitopi bersaglio è situato sulla superficie di una cellula effettrice. Questo è ad esempio adeguato per il reclutamento di cellule T o cellule NK per l'uccisione di cellule tumorali. Ad esempio, almeno una molecola simile a Ig viene prodotta con un metodo secondo l'invenzione che è capace di reclutare cellule effettrici immunitarie, preferibilmente cellule effettrici immunitarie umane, legandosi in modo specifico a una molecola bersaglio situata su cellule effettrici immunitarie. In una ulteriore forma di realizzazione, detta cellula effettrice immunitaria viene attivata in seguito al legame della molecola simile a Ig alla molecola bersaglio. Il reclutamento di meccanismi effettori può ad esempio comprendere il reindirizzamento di citotossicità immuno-modulata mediante la somministrazione di una molecola simile a Ig prodotta mediante un metodo secondo l'invenzione che è capace di legarsi a una molecola di innesco citotossica come il recettore di cellule T o un recettore di Fc gamma, attivando in tal modo i percorsi effettrici immunitari a valle. Il termine "cellula effettrice immunitaria" o "cellula effettrice" come usato qui si riferisce a una cellula all'interno del repertorio naturale di cellule nel sistema immunitario di mammifero che può essere attivata per influenzare la vitalità di una cellula bersaglio. Le cellule effettrici immunitarie includono cellule del lignaggio linfoide come cellule assassine naturali (NK), cellule T incluse cellule T citotossiche, o cellule B, ma anche cellule del lignaggio

mieloide possono essere considerate come cellule effettrici immunitarie, come monociti o macrofagi, cellule dendritiche e granulociti neutrofili. Perciò, detta cellula effettrice è preferibilmente una cellula NK, una cellula T, una cellula B, un monocita, un macrofago, una cellula dendritica o un granulocita neutrofilo.

Antigeni bersaglio presenti su cellule effettrici immunitarie possono includere CD3, CD16, CD25, CD28, CD64, CD89, NKG2D e NKp46. Di conseguenza viene fornito inoltre un metodo secondo l'invenzione per produrre almeno due anticorpi differenti, in cui detto epitopo bersaglio è situato su una molecola di CD3, CD16, CD25, CD28, CD64, CD89, NKG2D o NKp46.

La vitalità di una cellula bersaglio può includere sopravvivenza cellulare, proliferazione e/o capacità di interagire con altre cellule.

In una forma di realizzazione preferita, viene fornito un metodo secondo l'invenzione per produrre almeno due anticorpi differenti, in cui detti almeno due anticorpi differenti sono anticorpi dell'isotipo di IgG1, come descritto qui sopra.

Inoltre viene fornita una miscela di almeno due anticorpi, ottenibile mediante un metodo secondo la presente invenzione. Detta miscela di anticorpi comprende preferibilmente almeno una mutazione di CH3 come raffigurato in Tabella B. Viene inoltre fornita una composizione farmaceutica comprendente una miscela di almeno due anticorpi secondo la presente invenzione. In una forma di realizzazione detto anticorpo è un anticorpo bispecifico. In un'altra forma di realizzazione detto anticorpo è un anticorpo monospecifico. Una forma di realizzazione preferita fornisce una miscela di almeno due differenti anticorpi ottenibile mediante un metodo secondo l'invenzione, in cui detti almeno due anticorpi differenti si legano a epitopi differenti sullo stesso antigene e/o a epitopi differenti su antigeni differenti. Vantaggi e usi preferiti di tali miscele e anticorpi sono descritti qui sopra. L'invenzione fornisce anche una miscela di almeno due anticorpi differenti ottenibili mediante un metodo secondo l'invenzione, in cui detti almeno due anticorpi differenti comprendono almeno un anticorpo eterodimerico. In una forma di realizzazione, due di detti almeno due anticorpi differenti sono anticorpi eterodimerici. Ancora un'altra forma di realizzazione preferita fornisce miscele comprendenti un anticorpo eterodimerico comprendente due domini di CH3, in cui uno di detti due domini di CH3 comprende le sostituzioni amminoacidiche L351D e L368E e in cui l'altro di detti due domini di CH3 comprende le sostituzioni amminoacidiche T366K e L351K. Queste sostituzioni amminoacidiche sono mezzi preferiti per un accoppiamento preferenziale di detti due domini di CH3, come spiegato sopra. Le sostituzioni amminoacidiche L351D e L368E in uno di detti due domini di CH3 e le sostituzioni amminoacidiche T366K e L351K nell'altro di detti due domini di CH3 sono insieme soprannominate "la combinazione di mutazioni di DEKK", "variante di DEKK", "coppia di DEKK", "domini di CH3 ingegnerizzati con DEKK", "DEKK" o vengono usati nomi alternativi che fanno riferimento a DEKK. Il dominio di CH3 che porta le sostituzioni amminoacidiche L351D e L368E è anche soprannominato "il lato di DE" e il dominio di CH3 che porta le sostituzioni amminoacidiche T366K e L351K è anche soprannominato "il lato di

KK".

Viene anche fornita una composizione farmaceutica comprendente una miscela di almeno due anticorpi ottenibili mediante qualsiasi metodo secondo l'invenzione. Detta composizione farmaceutica può comprendere una miscela comprendente anticorpi monospecifici o bispecifici, o una combinazione di anticorpi monospecifici e bispecifici. In aggiunta, una composizione farmaceutica secondo l'invenzione comprende un trasportatore farmaceuticamente accettabile. Come usato qui, tale "trasportatore farmaceuticamente accettabile" include qualsiasi e tutti i solventi, sali, mezzi di dispersione, rivestimenti, agenti antibatterici e antifungini, agenti isotonici e ritardanti l'assorbimento, e simili che sono fisiologicamente compatibili. A seconda del percorso di somministrazione (per esempio per via endovenosa, per via sottocutanea o per via intra-articolare) gli anticorpi possono essere rivestiti in un materiale per proteggere gli anticorpi dall'azione di acidi e altre condizioni naturali che possono inattivare gli anticorpi. In un aspetto, viene fornita una composizione farmaceutica comprendente una miscela di almeno due anticorpi ottenibili mediante qualsiasi metodo secondo l'invenzione, in cui detti almeno due anticorpi differenti sono stati prodotti da cellule ospiti ricombinanti secondo la presente invenzione.

Una molecola di acido nucleico codificante per una catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3 che comprende almeno una mutazione come raffigurata in Tabella B è anche divulgata con la presente, così come una cellula ospite ricombinante comprendente almeno una molecola di acido nucleico codificante per una catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3 che comprende almeno una mutazione come raffigurato in Tabella B.

L'invenzione viene ulteriormente illustrata dai seguenti esempi. Questi esempi sono non limitanti l'invenzione in alcun modo, ma servono semplicemente a chiarire l'invenzione.

Breve descrizione dei disegni

Figura 1: A) rappresentazione schematica di vettore di costruito MV1057. La regione di riempimento è la regione in cui viene clonata una regione di VH di anticorpo. B) rappresentazione schematica di vettore di visualizzazione su fago MV1043.

Figura 2: sequenza amminoacidica di Fc di IgG1 di tipo selvatico, come presente in vettore di costruito MV1057 (schema di numerazione EU applicato).

Figura 3: sequenze di nucleotidi e amminoacidi delle regioni di VH usate per clonaggio negli svariati costrutti.

Figura 4: dati di spettrometria di massa di trasfezioni A, G e H.

Figura 5: dati di spettrometria di massa di trasfezioni M e U.

Figura 6: dati di spettrometria di massa di trasfezione O.

Figura 7: prevenzione di omodimerizzazione mediante sostituzione amminoacidica neutri per amminoacidi carichi.

Figura 8: spettro di MS nativa di campione di trasfezione ZO (T366K/L351'D) (A) e spettro di MS convoluta di campione di trasfezione ZO (T366K/L351'D). Il secondo/principale picco rappresenta la molecola bispecifica (B).

Figura 9: punteggi di HADDOCK su coppie di mutazione verificate sperimentalmente.

Figura 10: Disegni di interazioni nell'interfaccia di CH3-CH3; A) K409D:K392D/D399'K:E356'K, B) D399K:E356K/D399'K:E356'K, C) K409D:K392D/K409'D:K392'D.

Figura 11: punteggi di HADDOCK per svariati mutanti di carica 366/351'.

Figura 12: Disegni di interazioni nell'interfaccia di CH3-CH3; A) L351D/L351'D, B) L351D:S354A:R355D/L351'D:S354'A:R355'D.

Figura 13: punteggi di HADDOCK per mutazioni di carica aggiuntive intorno alla posizione L351.

Figura 14: punteggi di HADDOCK per mutazioni di carica aggiuntive intorno a posizione T366 in catena A e posizione L351 in catena B.

Figura 15: Disegni di interazioni nell'interfaccia di CH3-CH3

Figura 16: punteggi di HADDOCK per varianti intorno a T366/L351

Figura 17: punteggi di HADDOCK per varianti aggiuntive intorno a T366/L351

Figura 18: Esempi di spettri di nMS per IgG bispecifica ottenuta dopo la co-espressione di costrutto T366K,L351K con il costrutto L351D (pannello di sinistra) o L351D,Y349E (pannello di destra), ingranditi su un singolo stato di carica della IgG intera (mezzi corpi non mostrati)

Figura 19: A) Risultati di MS nativa che mostrano abbondanze relative di AA, AB, BB, A e B (il totale di tutte le specie è il 100%); B) idem ma ora senza AB per avere una migliore visione d'insieme delle specie indesiderate AA, BB, A e B

Figura 20: Risultati di saggio di termostabilità. Quadrati: tipo selvatico; triangoli: coppia di inversione di carica E356K:D399K/K392D:K409D; cerchi: combinazioni di CH3 mutanti come indicato sopra ogni grafico.

Figura 21: Risultati di esperimenti di congelamento-scongelo 10x. 1122 = 1° anticorpo parentale BB; 1337 = 2° anticorpo parentale AA; tipo selvatico = AA, AB, BB; CR = bispecifico di coppia di inversione di carica E356K:D399K/K392D:K409D; 3-6 e 9-12 = molecole bispecifiche da combinazioni 3-6 e 9-12 da Tabella 15.

Figura 22: Risultati in stabilità in siero, misurata mediante ELISA usando fibrinogeno come antigene rivestito. A) Dati di ELISA con campioni di IgG diluiti a 0,5 µg/ml; B) dati di ELISA con campioni di IgG diluiti a 0,05 µg/ml; I risultati sono normalizzati al punto temporale di T = 0 giorni (100%). 1337 = 2° anticorpo parentale AA; tipo selvatico = AA, AB, BB; CR = bispecifico di coppia di inversione di carica

E356K:D399K/K392D:K409D; 3-6 e 9-12 = molecole bispecifiche da combinazioni 3-6 e 9-12 da Tabella 15.

Figura 23: risultati di nMS di esperimenti di rapporto con rapporti di trasfezione da 1:5 a 5:1. A) Combinazione di mutazioni di DEKK, con specificità 'A' sul lato di DE e 'B' sul lato di KK; B) combinazione di mutazioni di DEKK, con specificità 'C' sul lato di DE e 'B' sul lato di KK; C) combinazione di mutazioni di inversione di carica, con specificità 'A' sul lato di E356K:D399K e 'B' sul lato di K392D:K409D.

Figura 24: risultati di nMS di trasfezioni # 1-11 da Tabella 20.

Figura 25: punteggi di HADDOCK per dimeri con differenti vettori ingegnerizzati in CH3. Barre grigie: specie desiderate AB e CD; barre nere: specie indesiderate AA, BB, CC, DD, AC, BC, AD, BD.

Figura 26: SDS-PAGE di trasfezioni # 1-11 da Tabella 20. Sono inclusi anche campioni di controllo DE/KK, DE/DE e KK/KK.

Figura 27: nMS di trasfezioni # 9 (A) e # 11 (B).

Figura 28: nMS di campioni filtrati su gel 1516:1516 (A), 1337:1337 (B) e 1516:1337 (C).

Figura 29: livelli di siero di campioni di anticorpo ingegnerizzato con DEKK e suoi due anticorpi parentali (studio di pK).

Esempi

Esempio 1: sostituzioni amminoacidiche per creare svariati domini di CH3 differenti

Al fine di avere un'ampia varietà di molecole simili a Ig che differiscono in loro domini di CH3 in modo tale che sia favorito o inibito preferenzialmente un accoppiamento di molecole simili a Ig comprendenti un dominio di CH3, un numero di sostituzioni amminoacidiche che sono state note per promuovere una formazione di eterodimero, così come un numero di sostituzioni amminoacidiche alternative che non sono state precedentemente riportate né testate ma che sono state scelte per promuovere la formazione di omodimero, sono state introdotte in un vettore di costruito (vettore di costruito MV1057; Figura 1A). Il vettore di costruito MV1057 comprende sequenze di acido nucleico che codificano per la parte di Fc di IgG1 di tipo selvatico normale, come raffigurato in figura 2. Tabella 1 elenca le sostituzioni amminoacidiche che sono state introdotte in questo Fc di tipo selvatico, dando come risultato una serie di sette costrutti. Tutti i costrutti sono stati realizzati a Geneart. Costrutti 1, 2 e 3, o loro alternative, sono stati precedentemente descritti guidare l'eterodimerizzazione (EP01870459, WO2009/089004) così come i costrutti 6 e 7 (WO98/50431). I costrutti 4 e 5 sono nuovi e sono disegnati per promuovere l'omodimerizzazione.

Tabella 1

Sostituzioni di AA in CH3	Costrutto #	Si accoppierà con	% di prodotto bispecifico riportato
---------------------------	-------------	-------------------	-------------------------------------

- (tipo selvatico)	-	- (tipo selvatico)	~ 50%
E356K, D399K	1	Costrutto 2 o 3	~ 100%
K392D, K409D	2	Costrutto 1	~ 100%
K392D, K409D, K439D	3	Costrutto 1	~ 100%
K392D, D399K, K409D	4	Costrutto 4	
E356K, E357K, K439D, K370D	5	Costrutto 5	
T366W	6	Costrutto 7	~ 86,7%
T366S, L368A, Y407V	7	Costrutto 6	~ 86,7%

Esempio 2: clonaggio di VH in costrutti con mutazioni di CH3

Svariate regioni di VH di anticorpo con specificità note e capacità nota di accoppiarsi con la catena leggera umana IGKV1-39 sono state usate per clonaggio in questi costrutti. Come indicato in precedenza, tutte le varianti di CH3 possono essere usate in associazione con altri domini di anticorpo per generare anticorpi di lunghezza intera che sono bispecifici o monospecifici. La specificità dell'anticorpo come definita dalle combinazioni di VH/VL non influirà sul comportamento di dimerizzazione della catena pesante che è guidato dai domini di CH3. Le combinazioni di VH/VL di modello sono state usate in tutti gli studi, in cui tutte le VL sono basate sulla IGKV1-39 umana di linea germinale e le VH variano. Figura 3 fornisce sequenze complete e specificità delle regioni di VH di anticorpo usate in tutti gli studi. La codifica di MF si riferisce a designazione di Merus interna per svariate VH, per esempio VH MF1337 ha specificità per il tossoide tetanico, MF1025 per tireoglobulina suina, MF1122 per fibrinogeno bovino. Regioni di VH presenti in vettore di visualizzazione su fago MV1043 (Figura 1B) vengono digerite con enzimi di restrizione SfiI e BstEII (New England Biolabs/cat # R0123L e R0162L/secondo le istruzioni del produttore) che rilasciano il frammento di VH da questo vettore. Vettore MV1057 viene digerito con SfiI e BstEII secondo le procedure standard (secondo le istruzioni del produttore). Frammenti e vettore vengono purificati su gel (Promega/cat # V3125/secondo le istruzioni del produttore) per isolare il vettore tagliato e gli inserti di gene di VH. Entrambi sono combinati mediante ligazione, dopodiché la ligazione viene trasformata in E. coli DH5α (Invitrogen/cat # 12297-016/secondo le istruzioni del produttore). Dopo la selezione per una notte vengono raccolte singole colonie e vettori con un inserto corretto sono identificati mediante sequenziamento.

Esempio 3: trasfezione ed espressione di IgG completa in cellule HEK293T

Trasfezione degli svariati plasmidi che codificano per le varianti di VH riclonate, e che codificano inoltre per la catena leggera comune

hulGKV1-39, in cellule HEK293T è stata effettuata secondo procedure standard in modo tale che IgG possano essere espresse (de Kruif et al Biotech Bioeng. 2010). Dopo la trasfezione, livelli di espressione di IgG in supernatanti sono stati misurati usando il sistema ForteBIO Octet-QK, che è basato su interferometria a bio-strato (BLI) e che consente una quantificazione in tempo reale e una caratterizzazione cinetica di interazioni biomolecolari; per dettagli vedere www.fortebio.com. Quando sono stati misurati livelli di espressione che superano 5 µg/ml, le IgG sono state purificate usando purificazione di affinità con proteina A.

Esempio 4: purificazione di IgG

Supernatanti di coltura sono stati purificati usando colonne di proteina A (GE Healthcare/cat # 11-0034-95/secondo le istruzioni del produttore) ed eluiti in tampone citrato 0,1 M pH 3,0 e immediatamente neutralizzati in un volume uguale di Tris-HCL 1,0 M pH 8,0 o direttamente ri-tamponati in PBS usando una colonna dissalante. In alternativa, si potrebbero purificare le IgG usando microsfere di proteina A (sfere di sefarosio CL-4B, GE healthcare cat # 170780-01).

Esempio 5: ELISA specifici per Ag

Sono stati effettuati ELISA specifici per antigene per stabilire un'attività di legame contro gli antigeni e sono stati effettuati ELISA di cattura per dimostrare attività di legame degli anticorpi bispecifici. Secondo antigene biotilato è stato usato per rilevamento del complesso. (De Kruif et al Biotech Bioeng. 2010)

Esempio 6: SDS-PAGE

Le miscele di IgG purificate sono state analizzate mediante SDS-PAGE (gel bis-tris al 4-12% NuPAGE®/Invitrogen/cat # NP0323BOX) in condizioni ridotte e non riducenti secondo procedure standard, e colorazione di proteine in gel è stata effettuata con blu colloidale (soluzione di colorazione di proteina PageBlue™/Fermentas/cat # RO571).

Esempio 7: Deglicosilazione enzimatica di IgG1

Siccome esiste un'eterogeneità nella glicosilazione delle IgG, le proteine sono state deglicosilate al fine di creare un singolo prodotto con una massa distinta, adeguato per una analisi spettrometrica di massa. Un'unità di N-glicosidasi F (PNGasi F; Roche Diagnostics, Mannheim, Germania) è stata incubata per 10 µg di IgG1, per una notte a 37°C. Lo scambio di tampone usando colonne a filtro centrifughe di 10 kDa di MWCO (Millipore) è stato effettuato per rimuovere il tampone di purificazione originale (tampone citrato 0,1 M pH 3,0/Tris-HCL 1,0 M pH 8,0) e ri-tamponare in PBS. Procedure di scambio di tampone simili sono state effettuate per rimuovere le catene di glicano staccate, e cambiare il tampone in acetato di ammonio 150 mM pH 7,5. Filtri sono stati lavati con 200 µl di acetato di ammonio 150 mM pH 7,5, per 12 minuti 11000 rpm e 4° C. Dopo il lavaggio 50 µl di

IgG deglicosilata sono stati caricati sul filtro e sono stati aggiunti 450 μ l di acetato di ammonio 150 mM pH 7,5, seguiti successivamente da un altro ciclo di centrifugazione di 12 minuti a 11000 rpm a 4°C. In totale la centrifugazione è stata ripetuta 5 volte, ogni volta è stato aggiunto un tampone fresco di acetato di ammonio 150 mM pH 7,5 a un volume totale di 500 μ l. Dopo l'ultimo passaggio di centrifugazione, la IgG1 deglicosilata scambiata in tampone rimanente, approssimativamente 25 μ l, è stata raccolta e trasferita in una provetta eppendorf, pronta per l'analisi spettrometrica di massa.

Esempio 8: analisi spettrometrica di massa nativa

Spettrometria di massa è stata usata per identificare le differenti specie di IgG nelle miscele di IgG purificate e per stabilire in quali rapporti sono presenti queste specie di IgG. In breve, 2-3 μ l a una concentrazione di 1 μ M in acetato di ammonio 150 mM pH 7,5 delle IgG sono stati caricati in capillari di borosilicato placcati in oro realizzati in casa (usando un estrattore Sutter P-97 [Sutter Instruments Co., Novato, CA, USA] e un sputter-coater six Edwards Scancoat [Edwards Laboratories, Milpitas, CA, USA]) per analisi su uno spettrometro di massa LCT 1 (Waters Corp., Milford, MA, USA), regolato per prestazioni ottimali in rilevamento di massa elevata (Tahallah et al., RCM 2001). È stata usata una tensione di capillare di 1300 V e una tensione di cono di campionamento di 200 V; tuttavia, queste impostazioni sono state regolate quando è stata richiesta una risoluzione più elevata del rapporto "segnale-su-rumore". La contropressione di sorgente è stata elevata al fine di promuovere il raffreddamento collisionale ad approssimativamente 7,5 mbar. Per misurare le IgG1 in condizioni denaturanti, le proteine sono state spruzzate a una concentrazione di 1 μ M in acido formico al 5%.

Esempio 9: elaborazione dei dati e quantificazione

L'elaborazione degli spettri acquisiti è stata effettuata usando il software MassLynx 4.1 (Waters Corp., Milford, MA, USA). È stato usato il livellamento minimo, dopodiché gli spettri sono stati centrati. La massa delle specie è stata calcolata usando ciascuno stato di carica in una serie. Le intensità corrispondenti di ciascuno stato di carica sono state assegnate mediante MassLynx e sommate. Questo approccio ha consentito la quantificazione relativa di tutte le specie in un campione. In alternativa, la quantificazione dei picchi può essere effettuata usando metodi di area-sotto-la-curva (AUC), noti nell'arte. Tutte le analisi sono state ripetute tre volte per calcolare le deviazioni standard di sia le masse delle IgG sia la loro abbondanza relativa.

Esempio 10: miscele di 2 o 3 anticorpi monospecifici da una singola cellula

Svariate regioni di VH di anticorpo con specificità note e capacità nota di accoppiarsi con la catena leggera IGKV1-39 umana (Figura 3) sono state usate per riclonaggio nel vettore di costruito di tipo selvatico MV1057, o nel costruito 4 o nel costruito 5 di Tabella 1, dando come risultato vettori I-III (Tabella 2). I vettori I, II e III, risultanti, ciascuno contenente sequenze di acido nucleico codificanti per la catena leggera umana comune

così come una catena pesante di Ig con regione di CH3 differente e specificità di VH differente, sono stati successivamente trasfettati in cellule, da soli per dimostrare la formazione di anticorpi monospecifici intatti solamente, o in combinazione con uno o due altri vettori di costruito per ottenere miscele di due anticorpi monospecifici o tre anticorpi monospecifici. Tabella 3 raffigura il programma di trasfezione e i risultati.

Tabella 2: specificità di VH inserita in differenti costrutti

Vettore	Gene di VH	Specificità di antigene	Massa di VH (Da)	Designazione di Merus	Clonato in costrutto #
	IGHV 1.08	Tetano (A)	13703	MF1337	tipo selvatico
	IGHV 3.23	Tireoglobulina (B)	12472	MF1025	4
	IGHV 3.30	Fibrinogeno (C)	12794	MF1122	5

Tabella 3: programma di trasfezione e risultati

# differenti monospecifici prodotti	Trasfezione di	Codice di trasfezione di e rapporto	Specie attese	Massa calcolata 2LYS	Massa sperimentale	AA Trovato (%)	BB Trovato (%)	CC Trovato (%)	Altre molecole (%)
1	Solamente vettore I	A	AA	146521	146503	100			
1	Solamente vettore II	G	BB	144032	144087		100		
1	Solamente vettore III	H	CC	144647	144688			100	
2	Vettore I e II	M (I:II=1:1)	AA BB	146521 144032	146518 144030	51	45		4
2	Vettore I e III	N (I:III=1:1)	AA CC	146521 144647	146509 144633	88		9	3
		U (I:III= 1:5)	AA CC	146521 144647	146522 144643	47		48	5
2	Vettore II e III	nd	BB CC						
3	Vettore I, II e III	O (I:II:III=1:1:1)	AA BB CC	146521 144032 144647	146525 144032 144680	66	4	30	
		V (I:II:III=1:1:10)	AA BB CC	146521 144032 144647	146531 144043 144684	8	81	9	2

nd= non compiuto.

È stato osservato che le trasfezioni A, G e H hanno dato come risultato una formazione di omodimeri solamente, e il 100% di monospecifici bivalenti AA, BB o CC è stato recuperato da cellule trasfettate con uno qualsiasi dei vettori I, II o III (Fig. 4). Sebbene questo dovesse essere atteso

ed è stato precedentemente dimostrato per la trasfezione A, viene effettivamente mostrato ora per la prima volta che l'omodimerizzazione di catene pesanti di Ig ingegnerizzate in CH3 contenenti la tripla sostituzione amminoacidica del costrutto 4 (ovvero, K392D, D399K, K409D) oppure la quadrupla sostituzione amminoacidica del costrutto 5 (ovvero, E356K, E357K, K439D, K370D) è riportata (trasfezioni G e H).

Successivamente, sono stati effettuati esperimenti di co-espressione di due vettori in una singola cellula. È interessante notare che trasfezioni M e N mostrano che catene pesanti di Ig di tipo selvatico e ingegnerizzate in CH3 possono essere co-espresse in una singola cellula insieme a una catena leggera comune dando come risultato miscele di due specie di anticorpi monospecifici senza la presenza di anticorpi bispecifici indesiderati e con appena il 4-5% di "altre molecole" contaminanti presenti nella miscela. "Altre molecole" è definito come tutte le molecole che non hanno la massa di una IgG intatta, e include mezze molecole costituite da una singola coppia di catena pesante e leggera. È importante sottolineare che la frazione "altre" non include un prodotto bispecifico. In trasfezione M, il rapporto di AA:BB è stato vicino a 1:1 dopo una trasfezione di rapporti uguali di DNA di vettore. Tuttavia, trasfezione N ha dato come risultato un rapporto quasi di 10:1 di AA:CC. Di conseguenza, questa trasfezione è stata ripetuta con rapporti di DNA aggiustati (trasfezione U). In effetti, un rapporto 1:5 di DNA di vettore I:III ha equiparato il rapporto tra il prodotto di anticorpo AA:CC nella miscela verso un rapporto quasi di 1:1. Pertanto, trasfezioni M e U mostrano che è possibile esprimere due anticorpi monospecifici differenti, essenzialmente puri, in una singola cellula, senza sottoprodotti indesiderati (vale a dire, nessuna presenza abbondante di AC o mezze molecole A o C) (fig. 5). Le nuove modifiche di CH3 di costrutti 4 e 5 differiscono sostanzialmente da CH3 di tipo selvatico per cui non si verifica una eterodimerizzazione tra tipo selvatico e 4, o tipo selvatico e 5, il che è vantaggioso per una applicazione in produzione su larga scala di miscele di anticorpi monospecifici da singole cellule.

Analogamente a questi risultati, anche la trasfezione di due differenti catene pesanti di Ig ingegnerizzate in CH3 (costrutti 4 e 5) è attesa dare come risultato miscele di due differenti anticorpi monospecifici solamente, senza altre specie indesiderate presenti. Viene ritenuto che le modifiche di CH3 del costrutto 4 differiscano sostanzialmente dalle modifiche di CH3 di costrutti 5 per cui non si verifica una eterodimerizzazione. In questo caso, la co-espressione di catene pesanti ingegnerizzate in CH3 di costrutti 4 e 5, insieme a catene pesanti di CH3 di tipo selvatico in una singola cellula, darebbe come risultati solamente 3 anticorpi monospecifici.

In effetti, questo è stato osservato essere il caso in quanto è stato riscontrato che anche una miscela di tre anticorpi monospecifici puri ha potuto essere ottenuta mediante l'espressione di tre differenti catene pesanti di Ig, disegnate per formare omodimeri rispetto a eterodimeri, insieme a una catena leggera comune in una singola cellula, senza contaminazioni presenti nella miscela (trasfezione O) (Fig. 6). Come si evince da Tabella 3, con rapporti uguali di DNA di vettore usato durante la trasfezione O, non è stato ottenuto un rapporto 1:1:1 di anticorpi AA:BB:CC. Trasfezioni con

rapporti di DNA di vettore alterati (1:1:10, trasfezione V) hanno dimostrato che rapporti di AA:BB:CC nelle miscele possono essere orientati verso rapporti desiderati. Nel loro insieme, questi esperimenti mostrano che due o tre anticorpi monospecifici essenzialmente puri possono essere espressi in una singola cellula senza sottoprodotti indesiderati, offrendo vantaggi per la produzione su larga scala di miscele di anticorpi monospecifici terapeutici.

Esempio 11: miscele di 2 anticorpi bispecifici da una singola cellula

Anche se l'uso di catene pesanti ingegnerizzate in CH3 per la produzione di singoli anticorpi bispecifici è stato riportato altrove, questo esperimento è stato disegnato per studiare se sia fattibile produrre miscele di 2 anticorpi bispecifici differenti da una singola cellula.

Regioni di VH di anticorpo con specificità note e capacità nota di accoppiarsi con la catena leggera umana IGKV1-39 (fig. 3) sono state usate per riclonaggio in vettori contenenti costrutti 1-3 o 6-7 di Tabella 1 dando come risultato vettori IV-X (Tabella 4). Vettori IV-X, ciascuno contenente sequenze di acido nucleico codificanti per la catena leggera umana comune così come una catena pesante di Ig con regione di CH3 differente e specificità di VH differente, sono stati successivamente trasfettati in cellule, da soli per dimostrare che la formazione di anticorpi monospecifici intatti è stata ostacolata, o in combinazione con un altro vettore di costruito per ottenere anticorpi bispecifici o miscele di due anticorpi bispecifici. Tabella 5 raffigura il programma di trasfezione e i risultati.

Tabella 4: specificità di VH inserita in differenti costrutti

Vettore	Gene di VH	Specificità di antigene	Massa di VH (Da)	Clonato nel costrutto #
IV	IGHV 3.23	Tireoglobulina (B)	12472	1
V	IGHV 3.30	Fibrinogeno (C)	12794	2
VI	IGHV 1.08	Tetano (A)	13703	2
VII	IGHV 3.30	Fibrinogeno (C)	12794	3
VIII	IGHV 1.08	Tetano (A)	13703	3
IX	IGHV 1.08	Tetano (A)	13703	6
X	IGHV 3.23	Tireoglobulina (B)	12472	7

Tabella 5:

# differenti bispecifici prodotti	Trasfezione di	Codice e rapporto di trasfezione	Specie attesa	Massa calcolata- 2LYS	Massa sperimentale	Mezza- molecole trovate (%)	IgG intera trovate (%)	Bispecifici trovati (%)	Altre molecole (%)
0	vettore IV	B	Mezza B	144082	144066	40	60		
0	vettore V	C	Mezza C	144651	144622	77	23		
0	vettore VI	D	Mezza A	144469	144458	23	77		
0	vettore VII	E	Mezza C	144625	144643	76	24		
0	vettore VIII	F	Mezza A	144443	144458	64	36		
0	vettore IX	P	Mezza A	144691	144677	83	19		
0	vettore X	Q	Mezza E	143818	143844	56	42		
1	Vettore IV e V	I (1:1)	BC	144367	144352			36	4
1	Vettore IV e VII	J (1:1)	BC	144354	144362			36	4
2	Vettore IV, V e VI	K (1:1:1)	BC + AB	144367 + 145276	144351 + 145260			58 + 47	15 (A + C)
		S (2:1:1)	BC + AB	144367 + 145276	144371 + 145277			42 + 55	3 (EB)
2	Vettore IV, VII e VIII	L (1:1:1)	BC + AB	144354 + 145263	144346 + 145255			16 + 60	24 (A + C)
		T (2:1:1)	BC + AB	144354 + 145263	144365 + 145290			58 + 39	3 (PB)

È stato precedentemente dimostrato che le catene pesanti di Ig ingegnerizzate in CH3 codificate dai costrutti 1 e 2 sono ancora in grado di formare omodimeri quando espresse da sole in singole cellule (WO2009/089004). Tuttavia, WO2009/089004 riporta inoltre che domini di CH3 che sono ingegnerizzati per comprendere triple mutazioni di coppia di carica, come quelle presenti in costrutto 3, non sono più in grado di formare omodimeri quando espresse da sole.

Nel presente studio, questi risultati sono stati confermati solamente in parte. Infatti, i risultati di trasfezioni B, C e D hanno dimostrato la presenza di IgG complete, oltre a un'alta proporzione di mezza molecole non accoppiate, dimostrando una certa omodimerizzazione di domini di CH3 codificati dai costrutti 1 e 2. Anche trasfezioni E e F hanno dato come risultato una produzione di IgG complete oltre a mezza molecole non accoppiate, dimostrando che le triple mutazioni di carica di costrutto 3 non compromettono completamente l'omodimerizzazione.

È stato inoltre dimostrato che anche le varianti di CH3 "sporgenza" e "cavità" di costrutti 6 e 7 formano omodimeri (18% di omodimeri per "sporgenza-sporgenza" e 42% di omodimeri per "cavità-cavità").

Sono preferite varianti di CH3 che impediscono completamente l'omodimerizzazione quando espresse da sole, per prevenire o minimizzare sottoprodotti indesiderati (omodimeri) in caso di co-espressione con una seconda variante di CH3 per eterodimerizzazione.

È interessante notare che i presenti esperimenti dimostrano per la prima volta che anche miscele di anticorpi bispecifici possono essere espresse in singole cellule praticamente senza omodimeri nella miscela. Trasfezioni K e L mostrano chiaramente che le specie bispecifiche attese BC

+ AB sono effettivamente ottenute (38% + 47% in trasfezione K e 16% + 60% in trasfezione L). In entrambe le trasfezioni è stata osservata una percentuale relativamente elevata di mezze molecole indesiderate (15% di mezza molecola A + mezza molecola C in trasfezione K e 24% di mezza molecola A + mezza molecola C in trasfezione L). La percentuale relativamente alta di mezze molecole ancora presenti è stata attribuita a basse quantità di catene pesanti corrispondenti di vettore IV a causa di una espressione sbilanciata di catene pesanti in una coppia abbinata. Di conseguenza, le trasfezioni sono state ripetute con un rapporto aggiustato di DNA di vettore, 2:1:1, in trasfezioni S e T. Questo ha dato come risultato quantità uguali di catene pesanti di IgG che costituiscono una coppia abbinata e miscele pure di IgG bispecifiche senza la presenza di mezze molecole di IgG e con appena il 3% di BB omodimerico presente. Idealmente, questa bassa proporzione di prodotto monospecifico contaminante dovrebbe essere ridotta essenzialmente a zero. Di conseguenza viene desiderato trovare mutanti di CH3 addizionali che diano come risultato miscele di anticorpi bispecifici con anticorpi monospecifici contaminanti minimi presenti.

Il presente studio dimostra per la prima volta che miscele essenzialmente pure di due anticorpi bispecifici che riconoscono 3 epitopi bersaglio differenti possono essere prodotte in una singola cellula, con una presenza minima di anticorpi monospecifici nella miscela.

Esempio 12: varietà di miscela

Siccome è stato dimostrato che la produzione di miscele di 2 anticorpi bispecifici che riconoscono 3 epitopi da una singola cellula, o la produzione di miscele di 2 o 3 anticorpi monospecifici da una singola cellula è tecnicamente fattibile, abbiamo quindi esplorato la fattibilità di una produzione controllata di una varietà di altre miscele. Una quarta regione di VH di anticorpo con specificità nota e capacità nota di accoppiarsi con la catena leggera umana IGKV1-39 sarà usata per riclonaggio in vettori contenenti costrutti 1-3 o 7 di Tabella 1, dando come risultato vettori I', II', III' o X' (il ' ' indicando una specificità differente rispetto ai numeri di vettore corrispondenti). I vettori risultanti I'-III', X' e IV-IX, ciascuno contenente sequenze di acido nucleico codificanti per la catena leggera umana comune così come una catena pesante di Ig con regione di CH3 differente e specificità di VH differente, saranno successivamente trasfettati in cellule, in combinazione con altri vettori di costrutto per ottenere una varietà di miscele di anticorpi bispecifici e/o monospecifici. La varietà di miscele che saranno ottenute includono miscele di 2 anticorpi bispecifici che riconoscono 4 epitopi, 2 anticorpi bispecifici e un anticorpo monospecifico, o miscele di 1 anticorpo bispecifico e un anticorpo monospecifico da una singola cellula. Tabella 6 raffigura il programma di trasfezione e i risultati attesi.

Tabella 6

Varietà di miscela	Trasfezione di	Codice e rapporto di trasfezione	Specie attese	% di IgG monospecifica attesa	% di bispecifico attesa
--------------------	----------------	-------------------------------------	---------------	----------------------------------	----------------------------

2 BsAb, 4 epitopi	IV+V+IX+ X'	ZA (1:1:1:1)	BC + AD	0	50 + 50
2 BsAb, 4 epitopi	IV+VII+IX +X'	ZB (1:1:1:1)	BC + AD	0	50 + 50
2 bsAb + 1 mAb	IV+V+VI+ wt'	ZC (2:1:1:2)	BC + AB + DD	33	33 + 33
2 bsAb + 1 mAb	IV+V+VI+ II'	ZD (2:1:1:2)	BC + AB + DD	33	33 + 33
2 bsAb + 1 mAb	IV+V+VI+ III'	ZE (2:1:1:2)	BC + AB + DD	33	33 + 33
1 bsAb + 1 mAb	IV+V+wt'	ZF (1:1:2)	BC + DD	50	50
1 bsAb + 1 mAb	IV+V+II'	ZG (1:1:2)	BC + DD	50	50
1 bsAb + 1 mAb	IV+V+III'	ZH (1:1:2)	BC + DD	50	50
1 bsAb + 1 mAb	IV+VII+wt'	ZI (1:1:2)	BC + DD	50	50
1 bsAb + 1 mAb	IV+VII+II'	ZJ (1:1:2)	BC + DD	50	50
1 bsAb + 1 mAb	IV+VII+III'	ZK (1:1:2)	BC + DD	50	50
1 bsAb + 1 mAb	IX+X+wt'	ZL (1:1:2)	AB + DD	50	50
1 bsAb + 1 mAb	IX+X+II'	ZM (1:1:2)	AB + DD	50	50
1 bsAb + 1 mAb	IX+X+III'	ZN (1:1:2)	AB + DD	50	50

Anche se, in teoria, la produzione di tutte le miscele dovrebbe essere fattibile, è noto da precedenti lavori di altri che una produzione su larga scala di varianti classiche di sporgenza-in-buco è ostacolata da problemi di instabilità. Miscele risultanti da trasfezioni ZA, ZB, ZL, ZM e ZN sono pertanto attese diventare problematiche quando trasferite a una produzione su larga scala.

Pertanto, l'attuale insieme di costrutti presenti in Tabella 1 non consentirebbe la produzione di tutte le miscele teoriche da singole cellule su una scala più grande, poiché le varianti di sporgenza-in-buco sono riportate essere instabili e non può essere escluso che domini di CH3 comprendenti una 'sporgenza' o un 'buco' dimerizzeranno con varianti di carica o domini di CH3 di tipo selvatico. Viene desiderato pertanto disegnare nuove varianti

di CH3 che sono ingegnerizzate per formare preferenzialmente solo omodimeri o eterodimeri solamente e che non omo- o eterodimerizzeranno con costrutti 1-5 di Tabella 1 in modo tale da consentire la co-espressione in singole cellule.

Esempio 13: identificazione di nuovi mutanti di coppia di carica

Lo scopo di questo studio è stato quello di ingegnerizzare la regione di CH3 di IgG per dare come risultato la produzione di solamente eterodimeri o solamente omodimeri su espressione mista di differenti catene pesanti di IgG in una singola cellula, in cui i nuovi domini di CH3 ingegnerizzati non omo- o eterodimerizzeranno con domini di CH3 ingegnerizzati noti, o con domini di CH3 di tipo selvatico. Di conseguenza, come un primo passaggio nell'identificazione di nuovi domini di CH3 ingegnerizzati che soddisfino i criteri, molti residui di contatto di interfaccia nel dominio di CH3 di IgG sono stati scansionati uno per uno o in gruppi per sostituzioni che dovrebbero dare come risultato una repulsione di catene pesanti identiche - vale a dire, formazione ridotta di omodimeri - tramite interazioni elettrostatiche. Lo scopo è stato quello di ottenere un elenco di residui che, quando sostituiti con un residuo carico, dovrebbero dare come risultato una repulsione di catene identiche in modo tale che queste mutazioni possano essere usate per guidare la formazione di omo- e/o eterodimero dopo espressione mista di differenti catene pesanti di IgG, per cui le IgG a lunghezza intera ottenute sono stabili e sono prodotte con proporzioni elevate. In un seguito, le sostituzioni identificate verranno usate per generare anticorpi bispecifici o miscele di anticorpi bispecifici o monospecifici mediante ingegnerizzazione di coppie abbinata di residui di CH3 in una o più catene pesanti di IgG - regioni di CH3. In aggiunta, le coppie di mutante di carica appena identificate possono essere combinate con coppie esistenti, in modo tale che più molecole di acido nucleico che codificano per catene pesanti differenti, tutte recanti mutazioni di CH3 differenti e complementanti, possano essere usate per l'espressione in cellule in modo tale che miscele di anticorpi monospecifici solamente, o anticorpi bispecifici solamente, o miscele di anticorpi monospecifici e bispecifici definiti possano essere ottenute preferenzialmente. I residui che devono essere testati nel presente studio sono residui di contatto come identificati precedentemente (Deisenhofer J., 1981; Miller S., 1990; Padlan, 1996, Gunasekaran, 2010). La logica di questo approccio è che le cariche repulsive sono ingegnerizzate in ciascuna coppia di residui di contatto disponibile. I campioni vengono successivamente analizzati su SDS-PAGE non riducente per identificare coppie in cui la formazione di dimero è ridotta, come visualizzato dalla presenza di bande di approssimativamente 72 kD. Tutte le coppie disponibili saranno vagliate come singole mutazioni o in combinazione con un'altra singola mutazione poiché l'interazione elettrostatica repulsiva tra una coppia non abbinata può essere o può non essere sufficiente per dare come risultato quantità sufficienti di mezze molecole per il rilevamento mediante questo metodo, le mutazioni sono anche combinate.

Le sostituzioni amminoacidiche sono state introdotte in vettore di costruito MV1057 da Geneart secondo la tabella 7 e l'espressione di costrutti è stata effettuata mediante trasfezione in cellule HEK293T, secondo procedure standard. I livelli di espressione di IgG sono stati misurati in Octet.

Quando la produzione è fallita due volte, la mutazione è stata considerata essere dannosa per l'espressione e la mutazione non è stata perseguita ulteriormente.

Tabella 7: elenco di sostituzioni amminoacidiche nei vari costrutti che sono stati realizzati (numerazione EU)

Sostituzioni di AA in CH3	costrutto #	Effetto sulla formazione di omodimero (- = nessun effetto; +++ = inibizione massima; NT = non testato su gel)
Q347K	8	-
Y349D	9	+-
Y349K	10	+-
T350K	11	-
T350K, S354K	12	+-
L351K, S354K	13	+-
L351K, T366K	14	++
L351K, P352K	15	+-
L351K, P353K	16	++
S354K, Y349K	17	++
D356K	18	-
E357K	19	-
S364K	20	++
T366K, L351K	21	++
T366K, Y407K	22	+++
L368K	23	NT
L368K, S364K	24	++
N390K, S400K	25	+-

T394K, V397K	26	+
T394K, F405K	27	+++
T394K, Y407K	28	+++
P395K, V397K	29	+/-
S400K	30	-
F405K	31	+++
Y407K	32	++
Q347K, V397K, T394K	33	+
Y349D, P395K, V397K	34	+
T350K, T394K, V397K	35	NT
L351K, S354K, S400K	36	+
S354K, Y349K, Y407K	37	+/-
T350K, N390K, S400K	38	+/-
L368K, F405K	39	++
D356K, T366K, L351K	40	+++
Q347K, S364K	41	+++
L368D, Y407F	42	+
T366K	43	+
L351K, S354K, T366K	44	+
Y349D, Y407D	45	+
Y349D, S364K, Y407D	46	+
Y349D, S364K, S400K, T407D	47	+
D399K	48	+/-
D399R	49	+/-

D399H	50	+-
K392D	51	+-
K392E	52	+-
K409D	53	+

Supernatanti contenenti ≥ 5 $\mu\text{g/ml}$ di IgG sono stati analizzati in SDS-PAGE e le IgG sono state purificate usando la proteina A. Le proteine sono state colorate usando blu colloidale. Gli omodimeri sono stati visibili come una banda di approssimativamente 150 kD. Bande più piccole di approssimativamente 75 kD hanno rappresentato la presenza di mezze molecole (vedere controllo negativo: K392D, K409D). I blot sono mostrati in Figura 7.

I risultati di gel SDS-PAGE sono stati analizzati e valutati come presentato in tabella 7, colonna di destra. Un certo numero di residui sono stati considerati promettenti per ulteriori test in combinazione, inclusi i residui Q347, S354, Y349, L351, K360, T366, T394 e V397. La scelta è stata basata su punteggi elevati nell'inibizione di formazione di omodimeri combinati con la disponibilità di residui di contatto che possono essere modificati senza incorrere in problemi come altre cariche non complementari. Ad esempio, è noto che i residui F405 e Y407 hanno interazioni multiple all'interfaccia di CH3-CH3, incluse interazioni con residui che sono già carichi, cosa che può essere problematica dopo l'introduzione di più mutazioni di carica tra questi residui interagenti (vedere Tabella A). Sono stati realizzati nuovi costrutti in vettore MV1057 (Tabella 8) e sono state usate regioni di VH di anticorpo con specificità note e capacità nota di accoppiarsi con la catena leggera umana IGKV1-39 per riclonaggio in vettori contenenti questi nuovi costrutti (vedere Tabella 9) in modo tale che le combinazioni potessero essere ulteriormente testate. Tabella 10 raffigura i programmi di trasfezione e i risultati.

Tabella 8:

Sostituzioni di AA in CH3	costrutto #
L351K	61
T394K	62
L351D	63
T366D	64
S354D, Y349D	65

V397D	66
K360D	67

Tabella 9: specificità di VH inserita in differenti costrutti

Vettore	Gene di VH	Specificità di antigene	massa di VH (Da)	Clonato in costrutto #
XI	IGHV 1.08	Tetano (A)	13703	8
XII	IGHV 1.08	Tetano (A)	13703	17
XIII	IGHV 1.08	Tetano (A)	13703	43
XIV	IGHV 1.08	Tetano (A)	13703	61
XV	IGHV 1.08	Tetano (A)	13703	62
XVI	IGHV 3.30	Fibrinogeno (C)	12794	63
XVII	IGHV 3.30	Fibrinogeno (C)	12794	64
XVIII	IGHV 3.30	Fibrinogeno (C)	12794	65
XIX	IGHV 3.30	Fibrinogeno (C)	12794	66
XX	IGHV 3.30	Fibrinogeno (C)	12794	67

Tabella 10:

Trasfezione di	Codice di trasfezione (rapporto)	Specie attese	AA trovato (%)	AC trovato (%)	CC trovato (%)	Mezza A trovata (%)	Mezza C trovata (%)	Altro (%)
XIII + XVI	ZO (1:1)	AC	0	69	7	24	0	0
	ZT (3:1)	AC	10	45	16	27	0	0
	ZU (1:1)	AC	5	61	10	13	0	0
	ZV (1:3)	AC	3	61	23	13	0	0
	ZW (1:1)	AC	0	88,3	2,4	7	0	2,3
XIV + XVII	ZP	AC	30	52	13	0	0	5
XII + XVIII	ZQ	AC	4	51	33	2	1	8
XV + XIX	ZR	AC	20	42	11	0	1	26
XI+XX	ZS	AC	34	41	15	0	0	10

Combinazioni di varianti di CH3 sono state espresse e analizzate in SDS-PAGE (dati non mostrati) e in spettrometria di massa nativa (MS).

I risultati sono riassunti in Tabella 10. La trasfezione di ZO ha dato come risultato la più alta proporzione di eterodimeri nelle miscele (69% di AC). È interessante notare che nella trasfezione di ZO, l'omodimero di AA non è stato presente mentre l'omodimero di CC ha costituito una piccola proporzione (7%). L'analisi spettrometrica di massa ha rivelato che la proteina rimanente nella miscela è stata costituita da molecole di mezza A, probabilmente derivanti da un'espressione disuguale delle catene pesanti di A e C. I dati MS grezzi dal campione di trasfezione ZO sono mostrati in Figura 8.

Sorprendentemente, mentre la trasfezione di ZO ha dato come risultato discrete quantità di prodotto bispecifico, la trasfezione di coppia di carica inversa ZP (L351K/T366'D contro T366K/L351'D di ZO) non ha dato come risultato risultati simili, e solamente il 52% di prodotto bispecifico è stato osservato, con quantità considerevoli dei due omodimeri essendo presenti (30% di AA e 13% di CC). Una spiegazione per questo può essere che D caricata negativamente assomiglia strutturalmente strettamente a T, perciò la T366D può non essere abbastanza potente da respingere essa stessa e T366D formerà quindi ancora omodimeri, come è stato effettivamente osservato.

Può essere previsto che sottili varianti della coppia di T366K/L351'D appena trovata (ad esempio testando tutte le permutazioni che includono i nuovi costrutti T366R e L351E), possono dare come risultato percentuali simili di BsAb.

Esempio 14: HADDOCK per disegno di nuovi mutanti di CH3 per guidare un'eterodimerizzazione efficiente.

Come descritto in Esempio 13, la coppia di carica T366K/L351'D appena trovata aumenta la proporzione di eterodimeri nella miscela (69%) con una piccola frazione di omodimeri di CC indesiderati (7%) (L351D/L351'D) e una sostanziale frazione di molecole di mezza A (24%) "contaminando" la miscela. In questo esempio, è stato usato un approccio in silico per generare ulteriori approfondimenti sui residui di amminoacidi coinvolti in interazioni di interfaccia di CH3, per testare sostituzioni complementari in regioni di CH3 opposte e per trovare nuove coppie di CH3 contenenti sostituzioni complementari che aumentano ulteriormente una eterodimerizzazione efficiente, prevenendo al contempo una formazione efficiente di omodimeri delle due catene pesanti.

HADDOCK (Aggancio di proteina-proteina guidato ad ambiguità elevata) è un approccio di aggancio flessibile guidato da informazioni per creare modelli di complessi biomolecolari. HADDOCK si distingue dai metodi di aggancio ab-initio nel fatto che codifica le informazioni da interfacce di proteina identificate o previste in restrizioni di interazione ambigue (AIR) per guidare il processo di aggancio. (de Vries et al., 2010).

L'immissione per il server web di HADDOCK consiste in un file di struttura di proteina, che può essere una struttura cristallina, un cluster di struttura di NMR o una struttura modellata. Dopo l'aggancio o il perfezionamento, HADDOCK restituisce un cosiddetto punteggio di HADDOCK, che è una media ponderata di energia di VanderWaals, energia elettrostatica, area di superficie sepolta ed energia di desolvatazione. Il punteggio di

HADDOCK può essere interpretato come un'indicazione di energia o affinità di legame, anche se una traslazione diretta in dati sperimentali è spesso difficile da ottenere. In aggiunta a questo, HADDOCK fornisce file di struttura per le "prime quattro" strutture risultanti dalla esecuzione di aggancio. Questi file di struttura possono essere scaricati e visualizzati, consentendo l'analisi dettagliata delle interazioni dei singoli residui.

In questo esempio, sono state studiate le interazioni tra i domini di CH3 delle catene pesanti di IgG1. Una struttura cristallina a risoluzione elevata della parte di Fc delle IgG (struttura 1L6X) è stata usata come struttura di partenza

(<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1l6x>; Idusogie, E.E. et al., J.I. 2000(164)4178-4184).

In esempio 13, è stato riscontrato che co-trasfezione di vettori XIII e XVI ha dato come risultato la formazione del contaminante omodimerico di CC (Tabella 10). HADDOCK è stato usato per cercare mutazioni addizionali nella coppia di T366K/L351'D che impediscono una omodimerizzazione.

L'uscita di HADDOCK consiste in un insieme di energie calcolate, un punteggio di HADDOCK (che è una media ponderata delle energie) e quattro file di struttura corrispondenti alle quattro strutture a energia più bassa rilevate dal programma. I punteggi di HADDOCK vengono usati per confrontare strutture differenti; le altre energie vengono semplicemente usate per ottenere un'indicazione riguardo a ciò che sta accadendo nelle strutture (per esempio interazioni elettrostatiche buone, superficie sepolta più piccola, energia di Van der Waals elevata). Più è basso il punteggio di HADDOCK, meglio è. Per ciascuna coppia di mutazione, i punteggi sono stati calcolati per i dimeri di AA, AB e BB.

Insieme di coppie di mutazione da esempio 12 sono stati corsi in HADDOCK per vedere se le energie calcolate fossero correlate con i dati sperimentali. Tabella 11 presenta tutte le energie teoriche, che sono visualizzate in Figura 9.

Tabella 11:

Combinazioni di costruito	Punteggio di HADDOCK	Energia di vdW	Energia elettrostatica	Energia di desolvatazione	Area di superficie sepolta
Tipo selvatico-tipo selvatico	-208,2	-62,8	-773	9,2	2505,8
1-2 (E356KD399K - K392DK409D)	-225,8	-56,4	-862	3	2458,3
2-2 (K392DK409D - K392DK409D)	-180,3	-67,9	-562,1	0,1	2312,5
1-1 (E356KD399K-E356KD399K)	-176,7	-75,5	-469,3	-7,3	2349,6
1-3 (E356KD399K-K392DK409DK439D)	-220,6	-67,9	-793,8	6,1	2499,8
3-3 (K392DK409DK439D - K392DK409DK439D)	-150,1	-76,6	-387,6	4,1	2261,2
6-7 (T366W - T366SL368AY407V)	-221,3	-65,8	-735,5	-8,3	2509,0
6-6 (T366W - T366W)	1916,9*	2072,3	-681,3	-19,2	2499,9
7-7 (T366SL368AY407V - T366SL368AY407V)	-191,9	-55,0	-685,2	-0,2	2427,2
43-63 (T366K - L351D)	-210,6	-64	-758,4	5,1	2456,5
43-43 (T366K - T366K)	-191,7	-71,2	-634,1	6,3	2533,5
63-63 (L351D - L351D)	-212,5	-60,4	-774	2,6	2445,6

Questo valore è insolitamente elevato a causa di un punteggio di energia di VanderWaals elevato, probabilmente dovuto a ingombro sterico di T366W/T366'W

Con 2 domini di CH3 di tipo selvatico, i punteggi di HADDOCK sono gli stessi per AA, AB e BB dal momento che le regioni di CH3 di A e B sono identiche. Nella maggior parte degli altri casi, la coppia di AB ha il punteggio più basso, che è come atteso. Per la coppia di T366K/L351D il punteggio di BB è leggermente migliore del punteggio di AB (-210,6 contro -212,5), ma questa differenza è all'interno dell'errore dei calcoli. Usando HADDOCK, sono state visualizzate le strutture degli eterodimeri di queste coppie. Ad esempio, le combinazioni di costruito 1-2, 1-1 e 2-2 sono presentate in Figura 10. Da queste visualizzazioni è evidente che ponti salini vengono formati nell'eterodimero (Figura 10A *pannello di sinistra*) mentre repulsione elettrostatica si verifica tra i residui di catene identiche (Figura 10B e C, *pannello centrale e di destra*). I punteggi di HADDOCK più alti per gli omodimeri possono pertanto essere spiegati dalla repulsione elettrostatica dei residui di interfaccia mutati. Questi residui devono piegarsi lontano l'uno dall'altro e non avere interazione con residui sull'altra catena, causando un calo nell'affinità.

Tabella 11 e Figura 9 confermano quanto è stato osservato in Esempio 13. L'eterodimero di AC T366K/L351'D e l'omodimero di CC L351D/L351'D si formano con un'energia simile, spiegando la presenza sia dell'eterodimero che dell'omodimero nella miscela. L'omodimero di AA T366K/T366'K, d'altra parte, è appena rilevabile nella miscela anche se sono presenti molecole di mezza A T366K. Tabella 11 e Figura 9 mostrano invece che il punteggio di HADDOCK per l'omodimero di AA T366K/T366'K è più elevato del punteggio per l'eterodimero di AC; perciò una formazione di questo omodimero è energeticamente meno favorevole.

Esempio 15: variazioni di 366/351

In esempio 13, viene ipotizzato che possono essere disegnate alternative per la coppia di carica mutante T366K/L351'D, che possono avere risultati simili in termini di percentuale di anticorpi bispecifici nella miscela. Alternative possono includere sostituzioni T366R, T366D, T366E, L351E, L351K e L351R. La proporzione di omodimeri di CC di L351D/L351'D può essere diminuita creando varianti della coppia di 366/351. Tutte le possibili coppie di mutazione sono state corse in HADDOCK e i punteggi risultanti sono presentati in Tabella 12 e visualizzati in Figura 11.

Tabella 12

Combinazioni di costruito	Punteggio di HADDOCK	Energia di VdW	Energia elettrostatica	Energia di desolvatazione	Area di superficie sepolta
T366K - L351D	-210,6	-64	-758,4	5,1	2456,5
T366K - T366K	-191,7	-71,2	-634,1	6,3	2533,5
L351D - L351D	-212,5	-60,4	-774	2,6	2445,6
T366K - L351E	-216,9	-55,7	-854,7	9,8	2532,7
L351E - L351E	-217,9	-65,5	-802,2	8	2532
T366R - L351D	-210,5	-68,8	-760,8	10,4	2514,5
T366R - T366R	-201,8	-77,4	-626,4	0,9	2608
T366R - L351E	-225,8	-56,2	-874,8	5,4	2579,2
T366D - L351R	-211,2	-71,3	-723,6	4,8	2455,6
T366D - T366D	-198,1	-58,1	-713,4	0,1	2477
L351R - L351R	-220,7	-75,5	-806,5	16,1	2552,2
T366D - L351K	-223,9	-62,1	-810,1	0,3	2487,8
L351K - L351K	-224,4	-75,6	-812,1	13,6	204,5
T366E - L351R	-222,3	-69	-783	3,4	2557,2
T366E - T366E	-201,9	-57,6	-741	4	2487,5
T366E - L351K	-215,9	-58,4	-808,9	4,3	2486

Guardando i punteggi di HADDOCK, è stato osservato che alcune delle mutazioni hanno uno "schema" simile quando paragonate a T366K/L351'D. Per la maggior parte delle permutazioni l'omodimero di AA è stato riscontrato avere un punteggio di HADDOCK più elevato rispetto all'eterodimero di AB, ma l'omodimero di BB è apparso tanto favorevole quanto l'eterodimero di AB. Anche se il residuo 351 è noto essere un 'vicino' a se stesso sull'altra catena, vale a dire residuo 351 di catena A si accoppia con residuo 351 di catena B all'interfaccia di CH3-CH3, c'è a malapena un'influenza negativa delle cariche identiche quando il dimero di BB viene formato. Guardando la struttura di L351D/L351'D questo viene spiegato dagli acidi aspartici che si piegano l'uno lontano dall'altro e l'influenza stabilizzante di almeno l'arginina presente in natura in posizione 355 e anche una certa stabilizzazione di carica negativa da parte della Serina presente in natura in posizione 354 (vedere Figura 12A). Mutazione di questi residui

(S354A e R355D) fornisce solamente un piccolo miglioramento. Da figura 12B è chiaro che lo scheletro-idrogeno di A354 causa una stabilizzazione dell'omodimero. Da questo insieme, la coppia di T366R/L351'E sembra essere la più favorevole, con il punteggio di HADDOCK più basso per la molecola bispecifica.

Esempio 16: mutazioni intorno a T366K/L351'D

Nell'insieme di analisi di HADDOCK in questo esempio, la coppia di T366K/L351'D o T366K/L351'E è stata presa come una struttura di partenza. Al fine di identificare mutazioni addizionali che aumenterebbero ulteriormente la percentuale predetta di bispecifici di queste catene A e B, mutazioni addizionali sulla catena B sono state usate per calcolare i punteggi di HADDOCK e le energie. Quando la struttura del dominio di CH3 viene studiata usando un visualizzatore per la visualizzazione di strutture di proteina a un livello molecolare (YASARA, www.yasara.org), si possono calcolare le distanze tra i singoli residui. Facendo questo, è stato osservato che i due residui Y349 e L368 sono residui vicini che possono contribuire positivamente o negativamente a interazioni di dimero e questi sono stati mutati in questo esempio - in aggiunta alla mutazione di L351D - per studiare il risultato sulla formazione di dimero degli omo- ed eterodimeri (vedere figura 13). Entrambi i residui sembrano aggiungersi alla stabilità dell'eterodimero (punteggi di HADDOCK più bassi) così come alla destabilizzazione del dimero di BB (punteggi di HADDOCK più elevati). Acidi glutammici (E) in posizioni 349 e 368 sembrano essere più favorevoli rispetto ad acidi aspartici (D). Pertanto, l'introduzione di una seconda sostituzione amminoacidica nella catena B, comprendente già la sostituzione amminoacidica in posizione 351, sembra favorire ulteriormente una eterodimerizzazione.

In un insieme successivo di analisi di HADDOCK, la coppia di T366K/L351'D è stata nuovamente presa come struttura di partenza. In aggiunta alle sostituzioni nella catena B che hanno ulteriormente aumentato l'eterodimerizzazione (vale a dire Y349D/E e L368E), sono state aggiunte mutazioni addizionali alla catena A che già comprende la sostituzione di T366K. Come mostrato in Figura 14, ci sono svariate coppie di mutazione che sembrano favorevoli alla formazione di eterodimeri bispecifici. Nella coppia di T366K-L351K/L351'D-Y349'D, tutti e quattro i residui mutati sono coinvolti nell'accoppiamento eterodimerico, cosa che non è vera per T366K-L351K/L351'E-L368'E in cui K351 non è direttamente coinvolto nel legame. Tuttavia, il punteggio di HADDOCK per quest'ultimo eterodimero è -228,9; significativamente più basso del -214,2 per T366K/L351'E-L368'E, cosa che può essere spiegata dalle interazioni di legame a idrogeno di K in posizione 351 (vedere la Figura 15).

La coppia di T366K-L351K/L351'D-Y349'D può essere ulteriormente migliorata mediante la mutazione di R355'D nella catena B, che dà come risultato un punteggio di HADDOCK di BB più alto, ma anche il punteggio di HADDOCK di AB è leggermente più alto. Nel complesso, L351K addizionale dà come risultato punteggi di AB più bassi e punteggi di AA e BB simili rispetto alla mutazione di T366K da sola nella catena A.

Teoricamente questo darebbe come risultato quantità più elevate di eterodimeri bispecifici nei campioni.

Come è evidente da figura 11, avere un R piuttosto che un K in posizione 366 può essere più potente nel guidare una eterodimerizzazione. Di conseguenza, alcune delle analisi di HADDOCK mostrate in figura 13 sono state ripetute ma ora con T366R anziché T366K nella catena A. È stato dimostrato che non è favorevole combinare un R366 in catena A con doppie mutazioni in catena B (figura 16). Questo può essere dovuto alle grandi dimensioni di questo residuo, che interferiscono con altre interazioni di interfaccia, anche se tutti i ponti salini attesi con R366 sono presenti nelle strutture. Inoltre, il punteggio di HADDOCK per l'omodimero di AA è più basso per R366 rispetto a K366, cosa che inoltre non contribuisce favorevolmente a formazione di eterodimero. Di conseguenza, non sono state effettuate ulteriori analisi di HADDOCK usando R366 nell'interfaccia.

Sono state selezionate un totale di 14 coppie con le migliori prestazioni, secondo le predizioni di HADDOCK (vedere Tabella 13 e Figura 17). In alcune coppie, è inclusa una sostituzione di R355D per rimuovere l'influenza stabilizzante di R355 presente in natura sull'interazione di L351/L351'D.

Tabella 13:

Combinazioni di costruito	Punteggio di HADDOCK di AB	Punteggio di HADDOCK di AA	Punteggio di HADDOCK di BB
Tipo selvatico-tipo selvatico	-208,2	-208,2	-208,2
T366K - L351D	-210,6	-191,7	-212,5
T366K - L351E	-216,9	-191,7	-217,9
T366R - L351E	-225,8	-201,8	-217,9
T366E - L351R	-222,3	-201,9	-220,3
T366K - L351DY349E	-215,9	-191,7	-190
T366K - L351DL368E	-223,3	-191,7	-198,9
T366K - L351EY349E	-214,5	-191,7	-187,5
T366KL351K - L351D	-233,2	-205	-212,5
T366K - L351DY349EL368E	-207,5	-191,7	-179,5
T366KL351K - L351DY349D	-255,2	-205	-204,3
T366KL351K-L351DY349E	-227,2	-205	-190

T366KL351K - L351DL368E	-243,9	-205	-198,9
T366KL351K-L351DR355D	-233,6	-205	-211,9
T366KL351K - L351DY349DR355D	-242,8	-205	-183,5
T366D - L351KY349K	-237,9	-198,1	-228,4

Esempio 17: espressione in vitro di bispecifici usando mutanti di CH3 basati su predizioni di HADDOCK

L'analisi in Esempio 16 ha suggerito che alcune varianti di CH3 con mutazioni addizionali attorno alla coppia di T366K/L351D darebbero miscele con proporzioni più elevate del componente bispecifico e proporzioni potenzialmente più basse del componente omodimerico. Queste coppie con le migliori prestazioni sono state selezionate per produzione e ulteriore analisi. In aggiunta, sono stati generati anche i costrutti T366R e L351E. Tabella 14 elenca i costrutti che sono stati realizzati e che sono stati usati per riclonare regioni di VH di anticorpo con specificità note e capacità nota di accoppiarsi con la catena leggera di IGKV1-39 umana. Espressione delle IgG che contengono i singoli costrutti è stata precedentemente riportata in Esempio 13, ed è stata ripetuta per i costrutti come elencato in Tabella 14. Scopo è stato quello di valutare quali dei costrutti omodimerizzano in assenza di un partner di eterodimerizzazione corrispondente. Idealmente, verrebbero formate percentuali elevate di mezzi corpi e basse percentuali di omodimeri. Come controllo, costrutti contenenti mutazioni di carica precedentemente riportate e costrutti contenenti le mutazioni di sporgenza-inbuc precedentemente riportate sono stati usati anche per l'espressione di IgG complete da parte delle cellule ricombinanti. I supernatanti purificati con proteina A sono stati analizzati in SDS-PAGE; i risultati sono stati analizzati e classificati come indicato in Tabella 14

Tabella 14:

Sostituzioni di AA in CH3	Costrutto #	% di IgG	% di mezza molecola
E356K, D399K	1	64,2	35,8
K392D, K409D	2	30,9	69,1
K392D, K409D, K439D	3	24,5	75,5
T366W	6	27,6	72,4
T366S, L368A, Y407V	7	58,6	41,4
T366K	43	32,9	67,1
L351D	63	89,8	10,2

T366D	64	89,6	10,4
T366K, L351K	68	34,7	65,3
L351D, L368E	69	83,7	16,3
L351E, Y349E	70	67,8	32,2
L351D, Y349E	71	79,7	20,3
L351D, R355D	72	100	-
L351D, Y349E, L368E	73	79,3	20,7
L351D, Y349D	74	88,6	11,4
L351D, Y349D, R355D	75	89,9	10,1
L351K, L368K	76	56,6	43,4
L351R	77	100	-
T366E	78	44,4	55,6
T366R	79	29,6	70,4
L351E	80	100	-

I risultati di una co-espressione di una catena leggera comune e due differenti catene pesanti che portano le sostituzioni amminoacidiche di costrutti mostrati in Tabella 14 o catene pesanti che portano le sostituzioni amminoacidiche di precedenti costrutti sono presentati in Tabella 15. Espressione di due differenti catene pesanti comprendenti le sostituzioni amminoacidiche T366K e L351'D:L368'E ha dato come risultato rispettivamente approssimativamente l'87% dell'eterodimero di AB bispecifico nella miscela senza omodimeri di AA o BB presenti (combinazione n. 3 di Tabella 15). Circa il 12% di mezze molecole (mezza A) comprendenti la sostituzione di T366K è stato osservato. Inoltre, è stato riscontrato che la percentuale di eterodimero di AB bispecifico è aumentata quando la sostituzione amminoacidica addizionale L351K è stata introdotta nella prima catena pesante. Ad esempio, co-espressione di due differenti catene pesanti che comprendono le sostituzioni amminoacidiche T366K:L351K e L351'D:L368'E hanno dato come risultato rispettivamente approssimativamente il 92% di eterodimero di AB bispecifico mentre gli omodimeri di AA e BB sono essenzialmente assenti nella miscela (combinazione no. 12 di Tabella 15). Combinazioni 10 e 11 hanno anche dato come risultato distribuzioni favorevoli di eterodimeri a percentuale elevata e praticamente assenza di omodimeri. L'assenza di omodimeri è vantaggiosa, dal

momento che la frazione contenente le molecole di IgG intatte è composta solamente da un eterodimero di AB. Per la purificazione e la successiva applicazione terapeutica, le mezze molecole possono essere rimosse mediante approcci standard come cromatografia a esclusione dimensionale. Perciò, l'applicazione di questi mutanti di carica appena identificati nel processo di produzione per la generazione di anticorpi bispecifici fornisce vantaggi rispetto a mutanti di carica noti e mutanti di sporgenza-in-buco in cui non è esclusa la presenza di anticorpi omodimerici "contaminanti". In aggiunta, le coppie di carica di T366K/L351'D:L368'E e T366K:L351K/L351'D:L368'E hanno un vantaggio addizionale rispetto alle coppie di inversione di carica precedentemente descritte E356K:D399K/K392'D:K409'D e E356K:D399K/K392'D:K409'D:K439'D, in quanto le varianti di carica precedentemente descritte sono basate sull'inversione di cariche esistenti all'interno dell'interfaccia di CH3-CH3 mentre le varianti di carica appena identificate stanno aggiungendo coppie di carica addizionali (interazioni di carica-carica) all'interfaccia di CH3-CH3. L'introduzione di coppie di carica addizionali nell'interfaccia di CH3-CH3 può aumentare ulteriormente la stabilità dell'interfaccia e quindi dell'anticorpo intatto. Lo stesso vale per le mutazioni usate nelle combinazioni no. 4, 5, 6, 9, 10 e 11, che hanno anche dato come risultato proporzioni favorevoli di eterodimero bispecifico con proporzioni estremamente basse di omodimeri di AA e BB presenti nelle miscele.

Tabella 15:

Combinazione di 2 differenti catene pesanti	catena A */ mutazioni (costrutto #)	catena B **/ mutazioni (costrutto #)	% di AA trovata	% di AB trovata	% di BB trovata	% di mezza A trovata	% di mezza B trovata
1	T366E (76)	L351R (77)	3	81	2	13	0
2	T366K (43)	L351D (63)	0	88	3	9	0
3	T366K (43)	L351D, L368E (69)	0	87	0	12	0
4	T366K (43)	L351E, Y349E (70)	2	85	0	11	0
5	T366K (43)	L351D, Y349E (71)	2	92	1	5	0
6	T366K (43)	L351D, Y349E, L368E (73)	0	96	1	4	0
7	T366K, L351K (68)	L351D (63)	0	77	12	10	1
8	T366K, L351K (68)	L351D, R355D (72)	0	79	6	10	1
9	T366K, L351K (68)	L351D, Y349D, R355D (75)	1	93	2	4	1
10	T366K, L351K (68)	L351D, Y349D (74)	1	95	1	3	0
11	T366K, L351K (68)	L351D, Y349E (71)	1	95	0	3	1
12	T366K, L351K (68)	L351D, L368E (69)	0	92	0	6	0
13	T366K (43)	L351E (80)	0	70	10	18	2
14	T366R (79)	L351E (80)	4	38	36	21	1
15	T366D (64)	L351K, L368K (76)	3	92	2,5	2,5	0
16	T366D (64)	L351R (77)	30	63	1	0	0

* catena A porta specificità di MF1337 (= tossoide tetanico); catena B porta specificità di MF1122 (= fibrinogeno);

MS nativa

MS nativa è stata effettuata su tutti i campioni bispecifici. I grafici ottenuti sono stati analizzati per determinare il rapporto relativo delle

presenti specie in due modi: per altezza di picco e per area di picco. L'area di picco è il modo di analisi più scientificamente corretto, ma dal momento che tutte le analisi precedenti per altri studi sono state compiute sulla base di altezza di picco, entrambi i metodi sono stati inclusi nell'analisi, a fini di confronto. Le differenze tra i metodi sono state all'interno dell'errore di misurazione, e di conseguenza solamente i valori di area di picco sono stati usati per misurazioni future. In Figura 18 sono mostrati due spettri tipici. Una panoramica dei risultati viene mostrata graficamente in Figura 19, i valori numerici possono essere trovati in Tabella 15. In circa la metà dei campioni la contaminazione totale di IgG monospecifica è inferiore al 5%, e solamente in tre casi è $> 10\%$ mentre per IgG di tipo selvatico è atteso trovare circa il 50% di IgG monospecifica nella miscela.

Un pannello di dieci combinazioni di 2 differenti catene pesanti è stato selezionato da Tabella 15 per ulteriori analisi. Queste dieci combinazioni hanno incluso combinazioni 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11 e 12 (Tabella 15). Selezione di queste dieci è stata basata su basse percentuali di omodimeri presenti nelle miscele come determinato mediante nMS, ma anche basata sulle loro proprietà fisico-chimiche complessive, incluse rese di produzione, SDS-PAGE, così come il numero di mutazioni presenti nel dominio di CH3.

Esempio 18: analisi di stabilità di IgG

In questo studio, un insieme di coppie di mutazione di CH3 che hanno dato come risultato proporzioni elevate di eterodimeri bispecifici nella frazione di IgG intatta e quantità molto basse ($<5\%$) di IgG parentali saranno ulteriormente analizzate per stabilità della parte di Fc della molecola di IgG. I domini di CH3 mutanti che vengono usati per promuovere l'eterodimerizzazione delle catene pesanti possono avere effetti destabilizzanti inattesi sulla regione di Fc delle IgG, questo può dare come risultato proprietà indesiderabili come una riduzione di emivita *in vivo*, riduzione in funzione effettrice e/o un aumento in immunogenicità. Le coppie di carica appena identificate verranno confrontate con bispecifici di tipo selvatico e un bispecifico contenente mutazioni di carica precedentemente identificate (catena A che comprende costruito 1 e catena B che comprende costruito 2). Tutti i bispecifici in questo studio conterranno le stesse regioni variabili di catena pesante e leggera, assicurando che gli effetti osservati siano causati da mutazioni nella parte di Fc della molecola e non da variazione nelle regioni variabili.

Un insieme di studi di stabilità saranno effettuati su questi bispecifici. Questi studi includono analisi spettroscopiche (assorbanza UV-Vis, fluorescenza e dispersione della luce) e microscopiche (microscopia ottica e a fluorescenza con colorazione del Nilo Rosso) che forniscono informazioni sullo stato di aggregazione delle varianti di CH3.

Gli spettri di assorbanza in UV-Vis verranno registrati con un Bio spettrofotometro a doppio fascio, a due monocromatori Cary 300 a 25°C. Gli spettri saranno monitorati tra 250 e 400 nm usando una lunghezza di percorso di 1 cm. L'assorbanza a lunghezze d'onda di 320 nm e oltre fornisce informazioni sullo stato di aggregazione delle IgG.

Spettri di fluorescenza intrinseca saranno monitorati a 25°C usando uno spettrofluorimetro FluoroMax. Il metodo di fluorescenza sarà ottimizzato. L'emissione di fluorescenza fornirà informazioni su conformazione e proprietà di aggregazione.

Gli spettri di dispersione della luce a 90° saranno monitorati a 25°C usando uno spettrofluorimetro FluoroMax eseguendo una scansione sincrona ($\lambda_{em} = \lambda_{ex}$) tra 400 nm e 750 nm con un tempo di integrazione di 0,01 s. Fenditure di eccitazione ed emissione saranno ottimizzate. Ad esempio, la dispersione della luce ad angolo retto può distinguere tra campioni di IgG che hanno nessuno o il 5% di dimeri.

Per la microscopia a fluorescenza con colorazione del Nilo rosso, appena prima delle misurazioni, Nilo rosso in etanolo verrà aggiunto al campione. I campioni saranno riempiti in un vetrino da microscopia e analizzati mediante microscopia a fluorescenza. Le particelle verranno contate. Il limite di dimensione più basso delle particelle che può essere osservato mediante microscopia a fluorescenza è approssimativamente 0,5 μ m.

Applicazione di stress come temperatura, pH, stress meccanico o denaturanti su proteine potrebbe dare come risultato un cambiamento di conformazione (per esempio spiegamento) e/o aggregazione. Siccome è stato precedentemente riportato che gli anticorpi bispecifici ingegnerizzati per carica hanno una temperatura di fusione ridotta del CH3 modificato (Gunasekaran 2010), questi studi mirano a discriminare tra i nuovi mutanti di carica della presente invenzione e mutanti di carica noti esistenti.

Vengono esplorati studi di termostabilità usando Octet, sia con biosensori di proteina A che usando legame di FcRn a IgG. Per esaminare la stabilità termica di IgG ingegnerizzate in CH3, i campioni saranno incubati a una concentrazione di 100 μ g/ml (in PBS) a 4, 50, 55, 60, 65, 70 e 75°C per 1 ora usando una macchina per PCR. Dopo questo i campioni verranno raffreddati lentamente durante un periodo di 15 minuti a 25°C e mantenuti a questa temperatura per 2 ore, dopodiché essi verranno conservati per una notte a 4°C.

Anticorpi precipitati saranno rimossi mediante centrifugazione, dopodiché la concentrazione di IgG totale di anticorpi solubili sarà determinata mediante Octet usando il biosensore di proteina A (diluizione 1/10 in PBS). Saggi che misurano il legame delle IgG ingegnerizzate in CH3 a FcRn usando l'Octet sono in fase di studio. Biosensori di proteina L vengono usati per legare la catena leggera di IgG al sensore, seguito da incubazione con FcRn in soluzione, oppure biosensori anti-penta-HIS vengono usati per legare proteina di FcRn con tag His, seguito da incubazione con l'IgG di interesse. Questi metodi possono essere più sensibili rispetto all'uso del biosensore di proteina A e possono anche essere usati per studi di stabilità termica.

Tutti i campioni saranno anche analizzati per la stabilità in siero. In breve, campioni di IgG (ingegnerizzate) saranno incubati a 37°C in siero umano, campioni di controllo saranno mantenuti a 4° C. Dopo 1, 2, 3 e 4 settimane, campioni vengono centrifugati per rimuovere IgG precipitate. Successivamente il campione viene titolato in ELISA specifico per antigene per determinare le quantità relative di IgG funzionali. Anticorpo di

controllo purificato appena aggiunto in siero umano verrà usato come un riferimento.

Esempio 19: analisi di stabilità

In esperimenti precedenti, sono state ottenute percentuali elevate di anticorpi bispecifici mediante co-espressione di due catene pesanti differenti comprendenti mutazioni di CH3, e una catena leggera comune (esempio 17).

Un pannello di otto combinazioni di 2 differenti catene pesanti è stato selezionato da Tabella 15 per ulteriori analisi. Queste otto combinazioni hanno incluso combinazioni 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11 e 12 (Tabella 15). In questo studio, sono state analizzate queste otto combinazioni, con una focalizzazione forte su stabilità della parte di Fc delle IgG. Come controlli, sono stati inclusi bispecifici di tipo selvatico (vale a dire senza mutazioni di CH3) e/o bispecifici basati su mutazioni di carica di CH3 precedentemente riportate. Si noti che per i bispecifici di tipo selvatico, 2 catene pesanti e la catena leggera comune sono co-esprese senza mezzi per orientare preferenzialmente verso eterodimeri. Questi "bispecifici di tipo selvatico" rappresentano pertanto una miscela di AA, AB e BB. Tutti i bispecifici in questo studio sono stati disegnati per portare le stesse combinazioni di VH/VL, assicurando che gli effetti osservati sono causati da mutazioni nella parte di Fc della molecola e non da variazione(i) nelle parti di Fab.

È stato ipotizzato che le coppie mutazionali che sono state usate per promuovere l'accoppiamento eterodimerico delle due catene pesanti differenti potrebbero essere associate a effetti strutturali o altrimenti destabilizzanti non attesi sulla regione di Fc delle IgG. Questo potrebbe successivamente dare come risultato problemi indesiderati che ostacolerebbero un ulteriore sviluppo clinico, come una riduzione di emivita *in vivo*, una funzione effettrice ridotta e/o immunogenicità aumentata per la presenza di queste mutazioni.

Termostabilità

Applicazione di stress come aumenti o diminuzioni in temperatura potrebbe dare come risultato un cambiamento di conformazione (per esempio spiegamento) e/o aggregazione di proteine. Per esaminare la stabilità termica di IgG ingegnerizzate in CH3, le molecole bispecifiche da combinazioni 3-6 e 9-12 (Tabella 15), così come molecole bispecifiche di tipo selvatico e bispecifiche ottenute con l'uso di costrutti 1 e 2 (combinazione di E356K:D399K/K392D':K409D', anche soprannominata coppia di "inversione di carica") sono state incubate a una concentrazione di 100 µg/ml (in PBS) a 4, 60, 62,5, 65, 67,5, 70 e 72,5°C per 1 ora usando una macchina per PCR. Dopo questo i campioni sono stati raffreddati lentamente per un periodo da 15 minuti a 25°C e mantenuti a questa temperatura per 2 ore, dopodiché sono stati conservati per una notte a 4°C. Il giorno successivo, anticorpi precipitati sono stati rimossi mediante centrifugazione (18000 rpm; 4°C, 20 min), dopodiché la concentrazione totale di IgG di anticorpi solubili è stata determinata mediante Octet usando il biosensore di proteina A (diluizione 1/10 in PBS). I risultati sono mostrati in figura 20. È stato osservato che l'anticorpo bispecifico di controllo ingegnerizzato in CH3 (la combinazione E356K:D399K/ K392D':K409D' di

inversione di carica (triangoli)) ha una stabilità termica ridotta rispetto al bispecifico di tipo selvatico (quadrati). Anche le molecole bispecifiche da combinazioni 3-6 e 9-12 (rombi) hanno dimostrato una stabilità termica ridotta rispetto al tipo selvatico. In maniera rimarchevole, tre combinazioni, tuttavia, hanno dimostrato una stabilità migliorata rispetto all'anticorpo bispecifico ingegnerizzato in CH3 di controllo. Bispecifici di combinazioni 9, 10 e 11 sono significativamente più stabili degli altri bispecifici ingegnerizzati in CH3 (inversione di carica) e sono stabili quanto i bispecifici di tipo selvatico alla più elevata temperatura misurata.

Stabilità a congelamento-scongelo

Per esaminare la stabilità di IgG ingegnerizzate in CH3 dopo congelamento e scongelamento ripetitivi, le molecole bispecifiche da combinazioni 3-6 e 9-12 (Tabella 15), così come bispecifici di tipo selvatico e molecole bispecifiche ottenute quando vengono usati costrutti 1 e 2 (combinazione E356K:D399K/ K392D':K409D' (coppia di inversione di carica)) sono stati esposti a dieci cicli successivi di congelamento/scongelo ponendo i campioni a -80°C per almeno 15 minuti fino a quando non sono stati completamente congelati. Successivamente, i campioni sono stati scongelati a temperatura ambiente. Quando sono stati completamente scongelati, il ciclo di congelamento-scongelo è stato ripetuto. Dopo 10 cicli di congelamento-scongelo, gli anticorpi precipitati sono stati rimossi mediante centrifugazione (18000 rpm; 4° C, 20 min), dopodiché la concentrazione totale di IgG di anticorpi solubili è stata determinata mediante Octet usando il biosensore di proteina A (diluizione 1/10 in PBS). Il test di stabilità a congelamento-scongelo è stato ripetuto tre volte. I risultati sono mostrati in figura 21. È stato osservato che l'anticorpo bispecifico ingegnerizzato in CH3 di inversione di carica di controllo sembra avere una stabilità leggermente ridotta rispetto al bispecifico di tipo selvatico. Al contrario, le molecole bispecifiche da combinazioni 3, 4 e 9 sono apparse avere una stabilità leggermente migliorata rispetto al bispecifico di tipo selvatico. Nel complesso, può essere concluso che le condizioni stringenti di cicli di congelamento/scongelo non causano problemi di stabilità importanti per le varianti ingegnerizzate in CH3.

Stabilità in siero in vitro

Per esaminare la stabilità di IgG ingegnerizzate in CH3 in siero mantenuto a 37°C, le molecole bispecifiche da combinazioni 3-6 e 9-12 (Tabella 15), così come bispecifici di tipo selvatico e le molecole bispecifiche di inversione di carica sono stati incubati a 37°C in siero umano al 10%. I campioni di controllo sono stati conservati in siero umano a 4°C. Dopo 1, 2 o 5 giorni, anticorpi precipitati sono stati rimossi mediante centrifugazione. Successivamente, i campioni sono stati titolati in un ELISA specifico per fibrinogeno, per determinare le quantità relative di IgG funzionale. Come riferimento è stato usato un anticorpo di controllo purificato appena addizionato in siero umano.

Dati dell'ELISA di fibrinogeno mostrano che tutti i campioni sono stati abbastanza stabili in siero umano al 10% a 37°C per 5 giorni. Alla

concentrazione di IgG più bassa molecole bispecifiche da combinazioni 4 e 5 sembrano essere leggermente meno stabili, specialmente a $T = 1$ e $T = 2$, ma la differenza è solamente minima al punto finale di questo esperimento (vedere Figura 22).

Esempio 20: ulteriori test di stabilità

Un ulteriore insieme di metodi analitici è stato usato per valutare la stabilità delle IgG varianti. Molecole bispecifiche da combinazioni 3-6 e 9-12 (Tabella 15), così come bispecifici di tipo selvatico (AA, AB, BB), i singoli anticorpi parentali (AA e BB) e molecole bispecifiche ottenute usando i costrutti 1 e 2 (combinazione E356K:D399K/K392D':K409D' (coppia di inversione di carica)) sono stati usati come campioni in questi saggi di stabilità. Tutte le IgG sono state diluite a 0,2 mg/ml e sono state applicate svariate condizioni di stress (2 giorni a 50°C, 2 settimane a 40°C, congelamento-scongelo 5x), con l'obiettivo di essere in grado di discriminare tra i differenti campioni. Di rilievo, questi alti livelli di stress hanno dato come risultato condizioni in cui uno degli anticorpi parentali (il BB parentale, con due Fab 1122) come usato in tutti i bispecifici è diventato instabile. A 2 giorni a 50°C, l'aggregazione di questa proteina è stata rilevata mediante assorbanza UV. Questo ha suggerito che questa condizione di stress può non differenziare tra instabilità del Fab e il CH3 nel bispecifico e dati risultanti dall'incubazione a 50°C dovrebbero essere usati con cautela.

I risultati sono riassunti in Tabella 16. Metodi analitici che sono stati usati hanno incluso:

- Microscopia a fluorescenza con Nilo rosso ("particelle di Nilo rosso" in Tabella 16); per osservare la quantità di particelle $> 0,5 \mu\text{m}$ dopo l'aggiunta di colorante Nilo rosso.
- Spettrometria UV a 350 nm ("UV 350 nm"); un cambiamento in assorbimento a lunghezze d'onda $> 320 \text{ nm}$ dà informazioni sullo stato di aggregazione della proteina.
- Dispersione della luce a 90° a 400 nm ("LS 400 nm"); una tecnica sensibile per osservare cambiamenti in aggregazione di proteina, ad esempio la differenza tra monomeri e dimeri di IgG.
- Fluorescenza intrinseca; la lunghezza d'onda di fluorescenza massima e l'intensità dei residui aromatici in una proteina cambiano a seguito di cambiamenti nell'ambiente (per esempio spiegamento)
- Spettroscopia di fluorescenza di 1,8-ANS; 1,8-ANS si lega attraverso interazioni elettrostatiche a gruppi cationici attraverso la formazione di coppia di ioni e possono essere rilevati cambiamenti in struttura e/o conformazione di proteina

Spettroscopia UV-VIS

Spettri di assorbanza in UV-Vis sono stati misurati a 25°C con un Bio spettrofotometro Cary 300 a doppio fascio, a due monocromatori da

Varian in differenti cuvette di quarzo (come cuvette Hellma a basso volume nere con una lunghezza di percorso di 1,0 cm e cuvette Hellma chiare di 0,2 cm x 1,0 cm). Gli spettri sono stati monitorati tra 220 e 450 nm usando una lunghezza di percorso di 1,0 cm. L'assorbanza intorno a 280 nm fornisce informazioni sulla concentrazione di proteina. La regione tra 320 nm e 450 nm può fornire informazioni sullo stato di aggregazione dei campioni.

Dispersione della luce a 90°

Il metodo spettrale di dispersione della luce a 90° è stato sviluppato per studiare aggregazione di proteina ed è stato effettuato come descritto in Capelle, 2005; Demeule, 2007a. Spettri di dispersione della luce a 90° sono stati monitorati a 25°C usando uno spettrofluorimetro FluoroMax (Spex, Instruments SA, Inc. UK) eseguendo una scansione sincrona ($\lambda_{em} = \lambda_{ex}$) tra 400 nm e 750 nm con un tempo di integrazione di 0,01 s. Sono state testate differenti impostazioni di fenditure al fine di trovare le condizioni ottimali. Dopo una ottimizzazione, sono state usate le stesse impostazioni di fenditura per tutte le misurazioni.

Emissione di fluorescenza allo stato stazionario

L'emissione di fluorescenza di residui di triptofano, tirosina e fenilalanina dà informazioni sull'ambiente locale di questi fluorofori. Vengono misurati cambiamenti o differenze in idrofobicità e/o rigidità. Tipicamente, un ambiente più idrofobico e rigido porta ad un aumento nell'intensità di fluorescenza e a uno spostamento nel blu del massimo di emissione. La spettroscopia a fluorescenza intrinseca può fornire informazioni sullo stato attuale della proteina e monitorare cambiamenti nelle proprietà fisiche e chimiche. Più informazioni sulla fluorescenza di tirosina e triptofano sono disponibili nel libro di Lakowicz [Lakowicz, 2006].

Gli spettri di emissione ed eccitazione di fluorescenza sono stati registrati a 25°C in differenti cuvette di quarzo. I campioni sono stati eccitati a differenti lunghezze d'onda. I tempi di integrazione e le impostazioni di fenditura sono stati ottimizzati. Dopo l'ottimizzazione, sono stati applicati gli stessi tempi di integrazione e le stesse impostazioni di fenditura per tutti i campioni.

Microscopia a fluorescenza con colorazione di Nilo Rosso

Il metodo di colorazione del Nilo rosso è stato sviluppato per visualizzare aggregati proteici ed è stato effettuato come descritto in Demeule et al., 2007b.

Le osservazioni al microscopio sono state effettuate su un microscopio Leica DM RXE (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germania) dotato di una lampada al mercurio. Le immagini sono state acquisite con una fotocamera Sony NEX-5 e il suo firmware. Gli obiettivi sono stati 10x, 20x e 40x. Per le indagini al microscopio sono stati usati vetrini con una distanza fissa di 0,1 mm tra il vetrino e il coprivetrino. La dimensione delle

griglie 4x4 è di 1 mm x 1 mm e corrisponde a 0,1 μ l.

Spettroscopia di fluorescenza di 1,8-ANS

L'acido 1-anilinoftalene-8-solfonico (1,8-ANS) è una piccola sonda fluorescente idrofobica non carica (Mw 299,34 Da) usata per studiare sia le superfici di membrana che le proteine.

1,8-ANS è essenzialmente non fluorescente in acqua e diventa sensibilmente fluorescente quando legato a membrane (rese quantiche $\sim 0,25$) o proteine (rese quantiche $\sim 0,7$). Questa proprietà di 1,8-ANS lo rende un indicatore sensibile di ripiegamento di proteine, cambiamenti conformazionali e altri processi che modificano l'esposizione della sonda ad acqua. Riferimenti su 1,8-ANS possono essere trovati sulla pagina Internet iniziale di Molecular Probes, www.probes.com.

Gli spettri di emissione di fluorescenza di 1,8-ANS sono stati registrati usando uno spettrometro FluoroMax. Un confronto diretto della fluorescenza di 1,8-ANS tra IgG non sarà effettuato. Ogni IgG può avere un numero differente di siti di legame di 1,8-ANS e di conseguenza non può essere confrontata. In linea di principio, più bassa è la fluorescenza di 1,8-ANS, meno molecole di 1,8-ANS sono legate all'anticorpo. Saranno valutati i cambiamenti di intensità di fluorescenza e lunghezza d'onda di emissione di 1,8-ANS dovuti a stress.

Tabella 16: panoramica dei differenti risultati di degradazione forzata su svariati campioni di IgG dopo diluizione a 0,2 mg/ml. Il colore delle cellule indica la variazione tra T = 0 e dopo lo stress: grigio scuro = grande cambiamento, grigio chiaro = piccolo cambiamento e nessun colore = nessun cambiamento (= stabile).

*Combi. # 'si riferisce alla combinazione di mutazioni come elencato in Tabella 15; ** particelle molto piccole mediante microscopia a fluorescenza, rilevanza di queste particelle sconosciuta; 2d4°C= 2 giorni a 4°C; 2d50°C= 2 giorni a 50°C; 2w4°C= 2 settimane a 4°C; 2w40°C= 2 settimane a 40°C; T0 = inizio di esperimento; 5FT = 5 cicli di congelamento scongelamento

Campione di proteina	Stress	Particelle di Nilo rosso	UV 350 nm	LS 400 nm (10 ⁷ cps)	Fluorescenza intrinseca		1,8-Fluorescenza di ANS		
					fluo. int. (10 ⁶ cps)	Max. λ (nm)	1,8-ANS int. (10 ⁶ cps)	Max. λ (nm)	Spostamento (nm)
BB	2d4°C	0-10	0.001	0.7	4.2	335			
	2d50°C	0-10	0.013	0.8	4.2	335			
AA	2d4°C	10-20	0	1.2	5.7	338			
	2d50°C	10-20	0.002	1.0	5.5	338			
Bispecifico di tipo selvatico (AA AB BB)	2d4°C	30-50	0.003	0.9	5.1	336	7.1	507	
	2d50°C	>10000**	0.007	0.9	5.0	336	7.1	507	
	2w4°C		0	0.9	5.0	336			
	2w40°C	>2000**	0	0.8	5.0	336			
	T0		0.001	0.8	5.0	336			
	5FT	>2000**	0.009	1.2	4.8	336			
Bispecifico di inversione di carica (E356K,D399K/K392D,K409I)	2d4°C	10-20	0.001	1.3	5.9	336	7.0	507	
	2d50°C	10-20	0.002	1.2	5.7	336	7.0	507	
	2w4°C	>2000**	0	1.1	5.5	336			
	2w40°C	>2000**	0.002	1.1	5.5	336			
	T0		0.001	1.3	5.7	336			
	5FT	30-50	0.007	1.8	5.5	336			
Combi. # 3*	2d4°C	30-50	0	0.9	5.0	337			
	2d50°C	30-50	0.001	0.8	4.9	337			
Combi. # 4	2d4°C	20-30	0	1.0	6.2	337	7.5	505	
	2d50°C	>3000**	0.001	1.0	6.2	337	7.5	505	
	2w4°C		0.001	1.0	6.3	337			
	2w40°C	>2000**	0.003	0.9	6.3	337			
	T0		0.002	1.1	6.3	337			
	5FT	>2000**	0.003	1.2	6.0	337			
Combi. # 5	2d4°C	>2000**	0.001	1.1	4.9	337			
	2d50°C	>10000**	0.001	0.9	5.0	337			
Combi. # 6	2d4°C	10-20	0	0.7	4.3	337			
	2d50°C	20-30	0.001	0.7	4.3	337			
Combi. # 9	2d4°C	30-50	0	1.0	5.5	337	7.5	507	

	2d50°C	50-100	0	1.0	5.5	337	8.1	500	-7
	2w4°C	>2000**	0	0.9	5.1	337			
	2w40°C	>2000**	0	0.9	5.2	337			
	T0		0.002	0.8	5.1	337			
	5FT	>2000**	0.007	1.4	4.9	337			
Combi. # 10	2d4°C	30-50	0.002	1.0	5.6	337	7.0	505	
	2d50°C	150-200	0.001	1.1	5.9	337	8.7	499	-8
	2w4°C	>2000**	0	0.9	5.2	337			
	2w40°C	>2000**	0	0.9	5.4	337			
	T0		0.005	1.0	5.3	337			
	5FT	20-30	0.004	1.1	5.4	337			
Combi. # 11	2d4°C	20-30	0	0.9	4.9	337			
	2d50°C	30-50	0.002	0.9	5.1	337			
	2w4°C	>2000**	0	0.8	5.0	337			
	2w40°C	>2000**	0	0.8	5.1	337			
	T0		0.004	1.1	5.0	337			
	5FT	>2000**	0.002	1.2	5.0	337			
Combi. # 12	2d4°C	10-20	0.001	0.8	3.8	337	6.2	511	
	2d50°C	10-20	0.002	0.7	3.3	337	6.5	608	-3
	2w4°C	>2000**	0.003	0.6	3.6	337			
	2w40°C	>2000**	0.001	0.5	3.5	337			
	T0		0.005	0.6	3.7	337			
	5FT		0.004	0.7	3.6	337			

Nel loro insieme, questi dati indicano che i vari campioni di IgG sono notevolmente stabili. Sono state necessarie condizioni di stress severe (per esempio 2 giorni a 50°C) per generare differenze misurabili tra i campioni testati. In queste condizioni, i campioni di combinazioni # 9 e # 10 sembrano aggregarsi più di altri campioni.

I fattori più discriminanti per la stabilità tra le proteine sono i cicli di congelamento-scongelo e la temperatura aumentata. Tenendo in considerazione il fattore di stress molto stringente di incubazione a 50°C, le varianti T366K/L351E,Y349E (combi.#4) e T366K,L351K/L351D,Y349E (combi.#11) sono le due proteine più stabili all'interno del pannello, seguite da vicino da T366K,L351K/L351D,Y349D (combi.#10) e T366K,L351K/L351D,L368E (combi.#12).

Esempio 21: MS nativa su esperimenti di rapporto; rapporto di trasfezione da 1:5 a 5:1

Per diventare più informati sul comportamento delle IgG mutate in CH3 in miscele a trasfezione obliqua, in particolare sulla combinazione

T366K:L351K/L351D':L368E' (da ora in poi soprannominata KK/DE o DEKK), è stato condotto un esperimento di rapporto più elaborato.

Regioni di VH di anticorpo usate in precedenza con capacità nota di accoppiarsi con la catena leggera comune IGKV1-39 sono state usate per riclonaggio in costrutti 1, 2, 68 e 69, dando come risultato vettori I-V di Tabella 17. Vettori I-V, ciascuno contenente sequenze di acido nucleico che codificano per la catena leggera umana comune così come una catena pesante di Ig con regione di CH3 differente e specificità di antigene differente, sono stati successivamente trasfettati in cellule con rapporti di trasfezione differenti come indicato in Tabella 18. I risultati sono mostrati in Figura 23.

Tabella 17:

Vettore	Gene di VH	Specificità di antigene	Massa di VH (Da)	Designazione di Merus	Clonato in costrutto #
I	IGHV 3.30	Fibrinogeno (A)	12794	MF1122	69 (L351D, L368E)
II	IGHV 3.23	RSV (C)	13941	MF2729	69 (L351D, L368E)
III	IGHV 1.08	Tetano (E)	13703	MF1337	68 (T366K, L351K)
IV	IGHV 3.30	Fibrinogeno (A)	12794	MF1122	1 (E356K, D399K)
V	IGHV 1.08	Tetano (E)	13703	MF1337	2 (K392D, K409D)

Tabella 18:

Trasfezione no.	vettori	rapporto
1	I e III	5:1
2	I e III	3:1
3	I e III	1:1
4	I e III	1:3
5	I e III	1:5
6	II e III	5:1

7	II e III	3:1*
8	II e III	1:1
9	II e III	1:3
10	II e III	1:5
11	IV e V	5:1
12	IV e V	3:1
13	IV e V	1:1
14	IV e V	1:3
15	IV e V	1:5

* a causa di un tecnico errore, questo campione non è stato misurato.

Figure 23A e B mostrano che per la combinazione di mutazioni di DEKK, quando è presente un eccesso di A o C (A o C sono sul "lato di DE" e B è sul "lato di KK"), viene formato AB o BC ma l'eccedenza di A o C è presente come una miscela di sia omodimeri che mezzi corpi in tutti i casi. Tuttavia, quando è presente un eccesso di B (B è sul "lato di KK" e A o C sul "lato di DE"), c'è una chiara differenza. AB o BC è ancora formato ma l'eccedenza di B è essenzialmente assente come omodimero e sono formati solamente mezzi corpi. Percentuali sono state nuovamente misurate per altezza di picco. Nota bene: picchi rilevati nell'intervallo di 2% o più basso sono al di sotto della soglia di ciò che la tecnologia di nMS come applicata può misurare in maniera accurata. Le misurazioni di <2% sono di conseguenza considerate essere all'interno del livello di rumore di analisi e di conseguenza ignorate. È sorprendente che l'eccesso di B dia come risultato percentuali elevate di mezzo corpo B solamente. Specialmente ai rapporti di 1:3 e 1:5 di A:B, sono state osservate percentuali elevate di mezzo corpo B (Fig 23A e 23B.) in assenza di omodimero BB, indicando che le mutazioni di CH3 del lato di KK sfavoriscono una omodimerizzazione. L'assenza di omodimeri offre un vantaggio cruciale, poiché questo "lato di KK" della combinazione di DEKK può essere scelto per incorporare una specificità che può avere effetti avversi noti quando presente come un omodimero (ad esempio, anticorpi cMET o CD3 sono conosciuti avere effetti collaterali avversi indesiderati quando presenti come omodimeri bivalenti in composizioni terapeutiche).

I risultati osservati per i differenti rapporti di DE:KK sono in contrasto con le mutazioni di CH3 di inversione di carica di controllo in vettori IV e V. Figura 23C mostra che per la combinazione di mutazioni di E356K:D399K/K392D':K409D' quando è presente un eccesso di A (A è sul 'lato di K392D':K409D'), l'eccedenza di A è presente come una miscela di sia gli omodimeri che mezzi corpi in tutti i casi, ma anche quando è presente un

eccesso di B (B è sul 'lato di E356K:D399K'), l'eccedenza di B è presente come una miscela di sia omodimeri che mezzi corpi in tutti i casi. Persino ai rapporti più elevati 1:3 e 1:5 nessun mezzo corpo B viene osservato anche se sono presenti omodimeri, indicando che il lato di E356K:D399K non sfavorisce omodimerizzazione tanto quanto il lato di KK della combinazione di DEKK.

Nel loro insieme, la combinazione di mutazioni di DEKK offre un chiaro vantaggio rispetto alle mutazioni di CH3 di inversione di carica, in quanto una delle catene dell'eterodimero non forma omodimeri.

Esempio 22: varietà di miscele usando la combinazione di DEKK

Siccome è stato dimostrato che la combinazione di mutazioni di DEKK guida la formazione di molecole di IgG bispecifiche ('AB') con elevata purezza, abbiamo successivamente esplorato la fattibilità di una produzione controllata di miscele di anticorpo più complesse da una cellula, come miscele di 'AB e AA' o 'AB e AC'. I Fab di modello precedentemente usati sono stati incorporati in vettori che contengono il "costrutto di DE" o il "costrutto di KK" e svariate combinazioni di questi vettori sono state co-espresse per creare miscele, per dimostrare la versatilità della tecnologia. I Fab di modello MF1337 (tossoido tetanico), MF1122 (fibrinogeno) e MF1025 (tireoglobulina) sono stati scelti sulla base di loro comportamento stabile complessivo, buoni livelli di espressione e differenze di massa tra le IgG contenenti questi Fab (vedere Tabella 19)

Tabella 19:

Specificità	Nome di Fab	massa di IgG	Δ -massa MF1122
Tetano (A)	(MF)*1337	146747,03	+1842,05
Fibrinogeno (B)	(MF)1122	144904,98	0
Tireoglobulina (C)	(MF)1025	144259,87	-645,11

* MF= Fab Merus, designazioni come MF1337 e 1337 sono entrambe usate in modo intercambiabile.

Tabella 20: Programma di trasfezione:

Tr #	Catena pesante 1	Catena pesante 2	Catena pesante 3	Rapporto di Tr.	Specie attese (%)	Specie osservate (%)
1	1337-KK	1122-DE	1025-DE	2:1:1	AB (50%) AC (50%)	AB (43%) AC (57%)
2	1337-DE	1122-KK	1025-KK	2:1:1	AB (50%) AC (50%)	AB (40%) AC (54%) AA (6%)
3	1337-KK	1122-DE	1025-KK	1:2:1	AB (50%) BC (50%)	AB (54%) BC (46%)
4	1337-KK	1122-KK	1025-DE	1:1:2	AC (50%) BC (50%)	AC (66%) BC (33%) CC (1%)
5	1337-KK	1337-DE	1122-DE	2:1:1	AA (50%) AB (50%)	AA (57%) AB (43%)
6	1337-KK	1122-KK	1122-DE	1:1:2	AB (50%) BB (50%)	AB (75%) BB (25%)
7	1337-KK	1337-DE	1025-DE	2:1:1	AA (50%) AC (50%)	AA (46%) AC (54%)
8	1337-KK	1025-KK	1025-DE	1:1:2	AC (50%) CC (50%)	AC (60%) CC (40%)
9	1337-KK	1122-DE		1:1	AB (100%)	AB (>98%)
10	1337-KK	1025-DE		1:1	AC (100%)	AC (>98%)
11	1122-KK	1025-DE		1:1	BC (100%)	AC (>98%)

Analisi di SDS-PAGE ha dimostrato che la maggior parte dei campioni sono costituiti in IgG intere prevalentemente e in alcuni casi mezzi corpi sono stati presenti in piccole percentuali. Inoltre, molti dei campioni hanno mostrato due bande a circa 150 kDa su gel non ridotti, riflettendo la presenza di due specie di IgG distinte nel campione. Anche sui gel ridotti, in alcuni campioni sono state visibili due bande di catena pesante (dati non mostrati).

MS nativa è stata effettuata su tutti i campioni e le percentuali di specie osservate sono state calcolate in base all'altezza di picco (% di specie osservate in Tabella 20). I risultati sono presentati in Figura 24. In tutti e otto i campioni in cui sono state espresse tre catene pesanti, sono stati

osservati due picchi principali corrispondenti alle specie attese. In due di questi campioni (trasfezioni 2 e 4) e in trasfezione 11, è stata osservata una piccola quantità di omodimero di DE-DE contaminante. Mezzi corpi sono stati rilevati in quantità molto piccole nella maggior parte dei campioni (meno del 2%), i quali non sono problematici in quanto essi possono essere facilmente separati dalla frazione di IgG a lunghezza intera come discusso in precedenza. Dopo nMS è stato scoperto che la massa osservata dell'IgG in campione 11 è corrisposta a una specie differente da quella attesa, ed è stato concluso che questo è stato dovuto a un errore di trasfezione, vale a dire in campione 11 apparentemente 1025-DE è stato co-trasfettato con 1337-KK invece di 1122-KK.

I campioni di IgG sono stati ulteriormente testati in un ELISA a sandwich per confermare la presenza funzionale delle specificità desiderate. Il rivestimento di piastre ELISA è stato compiuto con fibrinogeno o tireoglobulina e il rilevamento è stato effettuato con tireoglobulina etichettata con fluoresceina o tossoide tetanico. Gli antigeni di rilevamento sono stati etichettati con fluoresceina (kit di etichettatura di anticorpo di NHS-fluorescenza Pierce, cat. # 53029) secondo le istruzioni del produttore. Gli antigeni etichettati con fluoresceina hanno potuto essere successivamente rilevati mediante un anticorpo anti-fluoresceina coniugato con FITC (Roche diagnostics, cat. 11426346910). I risultati dell'ELISA bispecifico (valori di OD450) sono riassunti in Tabella 21. Le cellule in grigio indicano le specie attese per ciascuna trasfezione. Generalmente, i risultati soddisfanno l'esito atteso con le eccezioni di vista come indicato in corsivo o in grassetto. In trasfezioni 1-3, il presunto pozzetto 'negativo' per le specie BC (tr. # 1 e 2) o AC (tr. # 3) ha dimostrato un segnale di rumore di fondo significativo. Da studi precedenti è noto che ELISA bispecifici possono soffrire di livelli di rumore di fondo elevati. Questi livelli di rumore di fondo possono anche essere causati dalla potenziale presenza di mezzi-corpi nel campione. Di rilievo è che i risultati di un ELISA bispecifico hanno effettivamente confermato che si era verificato un errore in trasfezione # 11, poiché la specie AC (valore in grassetto) è stata rilevata anziché BC.

Tabella 21: valori di OD450 da ELISA bispecifico

Tr. #	Specie di IgG rilevate		
	AB (Tet-Fib)	AC (Tet-Tir)	BC (Fib-tir)
1	0,989	1,792	0,438
2	1,085	1,852	0,418
3	1,419	0,775	1,547
4	0,205	1,795	1,22

5	1,367	0,047	0,057
6	1,359	0,043	0,06
7	0,054	1,779	0,054
8	0,04	1,338	0,052
9	1,588	0,048	0,051
10	0,044	1,805	0,055
11	0,043	1,821	0,056

Esempio 23: miscele migliorate di due anticorpi bispecifici che riconoscono 4 epitopi differenti (AB e CD) da una singola cellula

In esempio 12 è stato ipotizzato che miscele risultanti da trasfezioni ZA o ZB sono attese diventare problematiche quando trasferite a produzione su scala più larga, poiché le varianti di sporgenza-in-buco sono riportate essere instabili e non può essere escluso che domini di CH3 comprendenti una 'sporgenza' o un 'buco' dimerizzeranno con domini di CH3 ingegnerizzati in carica. Siccome è stato dimostrato negli esempi precedenti che sono stati trovati nuovi mutanti di coppia di carica che guidano preferenzialmente una eterodimerizzazione praticamente senza formazione di omodimeri, catene polipeptidiche comprendenti un dominio di CH3 che comprendono questi nuovi mutanti di coppia di carica possono essere espresse in cellule insieme a catene polipeptidiche comprendenti un dominio di CH3 ingegnerizzato in carica precedentemente note o potenzialmente con corpi SEED, e sono probabili dare come risultato la formazione preferenziale di due molecole bispecifiche solamente.

Dagli esempi precedenti è stato chiaro che la combinazione di mutazioni di DEKK è eccellente per la produzione di un bispecifico (AB) o due bispecifici (AB più AC) da parte di cellule clonali in cui una dimerizzazione delle catene pesanti è guidata dai domini di CH3. Tuttavia, usare solamente un insieme di vettori di mutazioni di CH3 complementari limita il numero di possibilità di varietà di miscele che possono essere prodotte. Sarebbe possibile produrre miscele più complesse di IgG e/o bispecifici, come miscele di 'AB e CD' o 'AB e CC' se un secondo insieme di vettori 'ortogonale' potesse essere usato in combinazione con DEKK. Quando si combinano due insiemi di vettori, un requisito importante è che le catene pesanti espresse dai due insiemi di vettori ingegnerizzati in CH3 non possano creare dimeri "incrociati", vale a dire che le catene pesanti prodotte da uno degli insiemi di vettori dimerizzino in IgG complete con catene espresse dall'altro insieme di vettori.

Per testare una tale potenziale formazione di dimeri "incrociati", è stata effettuata un'analisi *in silico* usando HADDOCK per ottenere ulteriori approfondimenti sul possibile accoppiamento tra domini di CH3 di tipo selvatico e domini di CH3 contenenti mutazioni di DE o KK. Allo stesso modo, sono stati analizzati potenziali accoppiamenti tra domini di CH3 di tipo selvatico e domini di CH3 contenenti mutazioni di E356K, D399K o

K392D, K409D, così come potenziali accoppiamenti tra domini di CH3 di tipo selvatico e domini di CH3 contenenti mutazioni di sporgenza-in-buco e qualsiasi combinazione di quanto sopra. Le combinazioni di mutanti di CH3 che sono state analizzate in HADDOCK sono elencate in Tabella 22 e i punteggi di HADDOCK risultanti sono riassunti in Figura 25.

Tabella 22: varianti di CH3 analizzate in HADDOCK, con codici ad una lettera assegnati per ciascuna variante di CH3 che porta una catena pesante. *catene di tipo selvatico sono designate 'C' e 'D' per questioni di coerenza; **Le varianti di inversione di carica sono designate 'A' e 'B' quando combinate con varianti di sporgenza-in-buco e sono designate 'C' e 'D' quando combinate con varianti di DE/KK.

Combinazione di CH3	Mutazioni	Codice a una lettera in HADDOCK
DEKK	Catena 1: T366K,L351K	A
	Catena 2: L351D,L368E	B
Tipo selvatico (WT)	Catena 1: nessuna	C*
	Catena 2: nessuna	D*
Inversione di carica (CR)	Catena 1: K392D,K409D	A/C**
	Catena 2: E356K,D399K	B/D**
Sporgenza-in-buco (KIH)	Catena 1: T366W	C
	Catena 2: T366S,L368A,Y407V	D

Figura 25 mostra che, sulla base di queste predizioni di HADDOCK, combinare le combinazioni di CH3 di DEKK con combinazioni di CH3 di inversione di carica è molto probabile abbia successo nel formare la combinazione desiderata di due bispecifici (AB e CD) senza sottoprodotti contaminanti (specialmente AC, AD, BC, BD) quando co-trasfettate in una singola cellula. Come può essere visto da figura 25, queste specie bispecifiche indesiderate AC, AD, BC e BD hanno punteggi di HADDOCK relativamente elevati, mentre le specie di AB e CD desiderate hanno i punteggi di HADDOCK più bassi. Naturalmente, quando le combinazioni di CH3 di DEKK o inversione di carica verranno poste in un costrutto che

porta la stessa specificità (per esempio "C" sul lato di DE, "C" sul lato di KK, "A" sul lato di E356K,D399K e "B" sul lato di E356K,D399K o "A" sul lato di DE, "B" sul lato di KK, "C" sul lato di E356K,D399K e "C" sul lato di E356K,D399K) questo darà come risultato la produzione prevalentemente di CC e AB su co-espressione in una cellula.

Al contrario, guardando alle predizioni per la co-espressione di DEKK con tipo selvatico, può essere visto che i punteggi di HADDOCK per AC e AD sono più bassi del punteggio di HADDOCK per CD, cosa che indica che AC e AD sono molto probabilmente contaminanti quando si tenta di produrre una miscela di AB e CD mediante co-espressione di vettori che codificano per le combinazioni di CH3 di DEKK insieme a vettori che codificano per CH3 di tipo selvatico. Infine, le predizioni per la co-espressione di DEKK o varianti di inversione di carica insieme con le varianti di sporgenza-in-buco danno luogo a varianti bispecifiche indesiderate con punteggi di HADDOCK relativamente bassi, vale a dire una probabilità elevata che queste specie indesiderate saranno prodotte alla co-espressione.

Pertanto viene concluso che combinare le combinazioni di CH3 di DEKK con combinazioni di CH3 di inversione di carica (E356K,D399K/K392'D,K409D') è idealmente idoneo per ottenere miscele di anticorpi di "AB e CD" c/o "AB e CC" essenzialmente pure.

Successivamente, sono state create miscele di 2 bispecifici che riconoscono 4 bersagli/epitopi (AB e CD) e miscele di un bispecifico e 1 anticorpo monospecifico che riconoscono 3 bersagli/epitopi (AB e CC) mettendo in pratica quanto sopra. Queste miscele sono state create usando 4 differenti VH che sono tutte in grado di accoppiarsi con la catena leggera comune IGVK1-39, ma le singole combinazioni di VH/VL hanno tutte specificità differenti. Per consentire l'analisi di MS nativa, la differenza di massa tra le specie (attese) deve essere sufficiente, ovvero > 190 Da. Sono state selezionate quattro singole VH e le masse di queste sono state tali per cui le specie attese dopo co-trasfezione hanno potuto essere identificate e separate mediante nMS. Inoltre, le differenze di massa tra le 4 VH selezionate sono anche abbastanza grandi da identificare la maggior parte dei possibili contaminanti nelle miscele, in aggiunta alle due specie desiderate. Le VH selezionate sono elencate in Tabella 23.

Tabella 23:

VH (bersaglio)	Massa come IgG di tipo selvatico
A (RTK1)	146736,78
B (tossoidi del tetano)	146106,20
C (fibrinogeno)	144904,98
D (RTK2)	145421,37

Le 4 differenti VH sono state clonate in vettori contenenti i costrutti di 'DE' o 'KK' o i costrutti di inversione di carica, e sono state effettuate svariate co-trasfezioni come indicato in Tabella 24. NB: come sempre, tutti i vettori hanno contenuto anche l'acido nucleico codificante per la catena leggera comune IGKV1-39. Come precedentemente indicato, quando si combinano due insiemi di vettori, un requisito importante è che le catene pesanti espresse dai due insiemi differenti di vettori ingegnerizzati in CH3 non possano creare dimeri "incrociati", vale a dire che le catene pesanti prodotte da uno degli insiemi di vettori dimmerizzano in IgG completa con catene pesanti espresse dall'altro insieme di vettori. Per testare tale potenziale formazione di dimeri "incrociati" tra catene pesanti contenenti mutazioni di inversione di carica e catene pesanti contenenti mutazioni di DE o KK, sono state effettuate trasfezioni di controllo.

Tabella 24:

Tr. #	1° VH/ costrutto #	2° VH/ costrutto #	Specie attese
1	D/68	A/68	abbinamento errato 'KK' con 'KK'; Per lo più mezzi corpi attesi
2	D/68	A/69	abbinamento 'KK' con 'DE'; prodotto di AD atteso
3	D/68	A/1	Abbinamento errato atteso 'KK' con 'E356K:D399K'
4	D/68	A/2	Abbinamento errato atteso 'KK' con 'K392D:K409D'
5	D/69	A/68	abbinamento 'DE' con 'KK'; prodotto di AD atteso
6	D/69	A/69	Abbinamento errato 'DE' con 'DE'; miscela di mezzi-corpi, AA, AD e DD attesi
7	D/69	A/1	Abbinamento errato atteso 'DE' con 'E356K:D399K'

8	D/69	A/2	Abbinamento errato atteso 'DE' con 'K392D:K409D'		
Tr.#	1ª VH/ costrutto #	2ª VH/ costrutto #	3ª VH/ costrutto #	4ª VH/ costrutto #	Specie attese
9	A/68	B/69	C/1	D/2	AB e CD
10	A/68	A/69	C/1	D/2	AA e CD
11	A/68	B/69	C/1	C/2	AB e CC

Tabella 25 fornisce un'ulteriore panoramica di masse delle specie attese, e i possibili contaminanti di trasfezioni # 9-11 di Tabella 24.

Tabella 25: per ciascuna di trasfezioni: 3 9-11, le specie sono ordinate per massa, la differenza di massa viene calcolata con la massa sopra.

Cellule grigie: specie attese (e desiderate); corsivo: differenza di massa troppo piccola da separare in analisi di nMS. *Specie: lettere singole rappresentano mezzi-corpi; codice a due lettere IgG intatta.

Trasfezione # 9		
Specie *	Massa	Differenza di massa
C	72464,62	
D	72684,53	219,90
B	73070,99	386,47
A	73410,46	339,47
CC	144929,2	71518,78
CD	145149,2	219,90
DD	145369,1	219,90
BC	145535,6	166,56
BD	145755,5	219,90
AC	145875,1	119,57
AD	146095	219,90
BB	146142	47,00
AB	146481,5	339,47
AA	146820,9	339,47
Trasfezione # 10		
Specie *	Massa	Differenza di massa
C	72464,62	
D	72684,53	219,90
A	73410,46	725,94
CC	144929,2	71518,78
CD	145149,2	219,90
DD	145369,1	219,90
AC	145875,1	506,03
AD	146095	219,90
AA	146820,9	725,94
Trasfezione # 11		
Specie *	Massa	Differenza di massa
C	72464,62	
B	73070,99	606,37
A	73410,46	339,47
CC	144890,95	71480,49
BC	145535,61	644,66
AC	145875,08	339,47
BB	146141,98	266,90
AB	146481,45	339,47
AA	146820,92	339,47

Tutti i campioni di proteina purificati ottenuti da trasfezioni # 1-11 sono stati analizzati su SDS-PAGE, e sono stati inclusi tre campioni di controllo (Figura 26). In aggiunta, analisi di nMS è stata effettuata su campioni di proteina da trasfezioni # 9-11 per identificare tutte le specie nei campioni. Come può essere visto da Figura 26, trasfezioni # 3 e # 4 hanno dato come risultato un abbinamento errato atteso tra i costrutti di "KK" e "E356K:D399K" o "K392D:K409D" e la quantità di mezzi corpi in campioni di proteina da queste trasfezioni ha superato la quantità di molecole di IgG intere. Le trasfezioni # 7 e # 8 hanno dato come risultato campioni di proteina in cui sia mezzi corpi che IgG complete sono presenti in quantità uguali. Tuttavia, da SDS-PAGE non può essere dedotto se l'IgG intera rappresenta un dimero di DE/DE, un dimero di DE/E356K:D399K o un dimero

di DE/K392D:K409D. In maniera rimarchevole, praticamente nessun mezzo corpo è stato osservato in campioni da trasfezioni # 9-11.

In Figura 27, sono presentate l'analisi di nMS di trasfezioni # 9 e # 11. Percentuali di specie attese e specie contaminanti sono state calcolate per altezza di picco. È stato dimostrato che, per trasfezione # 9, le specie attese "AB e CD" sono rappresentate per il 97% nella miscela (30% di AB e 67% di CD) mentre è presente solamente appena circa il 3% di BD contaminante (Figura 27A). Per trasfezione # 11, le specie attese "AB e CC" sono rappresentate per il 94% nella miscela (33% di AB e 61% di CC) mentre è presente solamente appena il 6% di BC (4,1%) e AC (1,8%) contaminanti (Figura 27B). Questi dati mostrano che è effettivamente possibile produrre miscele più complesse di IgG e/o bispecifici, come miscele di 'AB e CD' o 'AB e CC' quando un secondo insieme di vettori 'ortogonale' viene usato in combinazione con DEKK. Combinazione dei costrutti di inversione di carica con i costrutti di DEKK dà come risultato solamente una formazione molto limitata di dimeri "incrociati". Aggiustando il rapporto di trasfezione è atteso che le basse percentuali di questi sottoprodotti contaminanti possano essere ulteriormente ridotte.

Esempio 24: studio di farmacocinetica di singola dose in topi

Per studiare il comportamento farmacocinetico (pK) di anticorpi bispecifici che portano la combinazione di DEKK di mutazioni nelle loro regioni di CH3, in questo studio sono stati determinati e confrontati i parametri di pK per tre differenti lotti di IgG.

I tre lotti di IgG hanno incluso 1) anticorpo parentale anti-tossoide tetanico di tipo selvatico 1337:1337 (due Fab MF1337 su uno scheletro di Fc di tipo selvatico); 2) anticorpo parentale anti-tossoide tetanico di tipo selvatico 1516:1516 (due Fab MF1516 su uno scheletro di Fc di tipo selvatico); 3) anticorpo parentale anti-tossoide tetanico bispecifico ingegnerizzato in CH3 1516: 1337 che porta la combinazione di mutazioni di DEKK nella sua regione di Fc (Fab MF1516 sul lato di DE, Fab MF1337 sul lato di KK).

Gli anticorpi parentali 1337:1337 e 1516:1516 sono stati scelti come specificità che devono essere incluse nel prodotto DEKK-bispecifico, siccome è stato noto sulla base di studi precedenti che in svariati ceppi di topi non è stata presente alcuna risposta di siero pre-dose contro questi anticorpi. NB: la presenza di una risposta di siero pre-dose invaliderebbe ovviamente lo studio. In aggiunta, c'è una differenza di massa sufficiente tra gli anticorpi parentali per consentire l'identificazione di specie di 1337:1337 (Fc wt), 1516:1337 (Fc di DEKK) e 1516:1516 (Fc wt) mediante nMS. I tre lotti di IgG sono stati preparati come precedentemente descritto, ma il DNA usato per la trasfezione è stato prodotto usando un kit maxiprep endo-free per garantire che la quantità di endotossine sia la più bassa possibile. I lotti sono stati successivamente testati per concentrazione di proteina, livelli di aggregato, livelli di endotossina e percentuale di prodotto bispecifico. È stato dimostrato che sono stati soddisfatti i criteri di accettazione per l'uso successivo dei lotti di IgG in uno studio di pK, vale a dire la concentrazione di IgG dopo filtrazione su gel è stata > 0,3 mg/ml, i livelli di aggregato sono stati < 5%, i livelli di endotossina sono stati < 3 EU/mg di proteina e il lotto di DEKK ha contenuto > 90% di IgG bispecifica.

Spettrometria di massa nativa dei campioni filtrati su gel ha mostrato che le specie attese sono state presenti in percentuali elevate. Nel campione 1516:1337 viene rilevata una piccola quantità dell'omodimero di DE:DE, che è stimata essere circa il 2% (Figura 28). È stato concluso che i 3 lotti di IgG sono qualificati per essere usati nello studio di pK.

Per il confronto dei parametri di pK tra i tre lotti, 3 gruppi di topi C57BL/6J femmine (Harlan, Paesi Bassi) sono stati dosati a 1 mg/kg di IgG umana (5 ml/kg di soluzione di immunoglobulina/kg di peso corporeo). Al momento della somministrazione, gli animali avevano un'età compresa tra 7-8 settimane e un peso corporeo di circa 18-20 grammi. I campioni di sangue sono stati raccolti pre-dose e a 15, 60 minuti e 2, 4, 8, 24, 48, 96, 168, 268 e 336 ore dopo la somministrazione. I campioni di siero sono stati preparati e conservati a -20°C fino all'analisi. Ciascun gruppo è stato costituito da 3 sottogruppi di 4 topi, ovvero 12 topi/gruppo. Da ciascun topo, 6 punti temporali sono stati campionati. Il benessere degli animali è stato mantenuto in conformità con i principi generali che governano l'uso di animali in esperimenti delle Comunità europee (Direttiva 86/609/CEE) e la legislazione olandese (The Experiments on Animals Act, 1997). Questo studio è stato inoltre effettuato in conformità con gli standard per la cura umana e l'uso di animali da laboratorio, come pubblicato dall'Ufficio di Benessere di Animali da Laboratorio dell'Istituto Nazionale di salute Statunitense con il numero di identificazione 45859-01 (data di scadenza: 30 aprile 2015).

Topi di Gruppo 1 hanno ricevuto l'anticorpo 1516:1516 di IgG monospecifica di lunghezza intera (triangoli); Topi di Gruppo 2 hanno ricevuto l'anticorpo 1337:1337 di IgG monospecifica di lunghezza intera (quadrati); Topi di Gruppo 3 hanno ricevuto l'anticorpo 1516:1337 di IgG bispecifica di lunghezza intera (rombi), con regioni di CH3 ingegnerizzate da DEKK (1516 sul lato di DE e 1337 sul lato di KK).

È stato applicato un saggio di ELISA per l'analisi quantitativa di anticorpi umani monoclonali in siero di topo usando un ELISA di IgG umana quantitativo (ZeptoMetrix, NY USA; kit ELISA n. 0801182). In breve, il saggio di ELISA è basato sul principio secondo cui l'anticorpo monoclonale umano si lega a anti-IgG umana rivestita in una piastra ELISA a 96 pozzetti. L'anticorpo legato è stato successivamente visualizzato usando un anticorpo policlonale anti-IgG umana coniugato con perossidasi di rafano (HRP). La densità ottica (OD) di ciascun pozzetto è direttamente proporzionale alla quantità di anticorpo nel campione di siero. I risultati sono mostrati in Figura 29, ed è stato osservato che i livelli di siero di sia l'anticorpo di IgG bispecifica a lunghezza intera che porta la combinazione di mutazioni DEKK sia suoi anticorpi monospecifici parentali sono sorprendentemente simili. Viene concluso che le mutazioni di CH3 come presenti nell'anticorpo DEKK-bispecifico non alterano stabilità né emivita, e la variante di DEKK si sta comportando come IgG di tipo selvatico.

Riferimenti

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

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

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

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

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

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

De Vries Nature Protocols 2010(5)883

Kabat et al, (1991)

Mammalian Cell Biotechnology : a Practical Approach (M. Butler, ed., IRL Press, 1991

Merchant Nature biotechnology 1998(16)677

Ridgeway Protein Engineering 1996(9)617-621.

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

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

Tissue Culture, Academic Press, Kruse and Paterson, editors (1973)

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

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

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

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

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

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

RIVENDICAZIONI

1. Metodo per produrre almeno due anticorpi differenti da una singola cellula ospite, in cui ciascuno di detti due anticorpi comprende due domini di CH3 che sono in grado di formare un'interfaccia, detto metodo comprendendo fornire in detta cellula
 - a. una prima molecola di acido nucleico che codifica per una 1^a catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3 di IgG umana comprendente un residuo di lisina (K) in posizione amminoacidica 366 secondo il sistema di numerazione EU,
 - b. una seconda molecola di acido nucleico che codifica per una 2^a catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3 di IgG umana comprendente un residuo di acido aspartico (D) in posizione amminoacidica 351 secondo il sistema di numerazione di EU,
 - c. una terza molecola di acido nucleico che codifica per una 3^a catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3, e
 - d. una quarta molecola di acido nucleico che codifica per una 4^a catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3,detto metodo comprendendo inoltre il passaggio di coltivare detta cellula ospite e consentire l'espressione di dette almeno quattro molecole di acido nucleico e raccogliere almeno due differenti anticorpi dalla coltura.
2. Metodo della rivendicazione 1, comprendente inoltre fornire a detta cellula ospite una molecola di acido nucleico che codifica per una catena leggera comune.
3. Metodo della rivendicazione 1 o 2, in cui detta prima catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3 comprende inoltre un residuo di lisina (K) in posizione amminoacidica 351 secondo il sistema di numerazione EU.
4. Metodo della rivendicazione 1 o 2 o 3, in cui detta seconda catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3 comprende inoltre un residuo di acido glutammico (E) o un residuo di acido aspartico (D) in posizione amminoacidica 349 secondo il sistema di numerazione EU, e/o un residuo di acido glutammico (E) in posizione amminoacidica 368 secondo il sistema di numerazione EU.
5. Metodo della rivendicazione 4, in cui detta seconda catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3 comprende inoltre un residuo di acido glutammico (E) in posizione amminoacidica 368 secondo il sistema di numerazione EU.
6. Metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-5, in cui detta terza catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3 comprende un residuo di lisina (K) in posizione amminoacidica 356 secondo il sistema di numerazione EU e un residuo di lisina (K) in posizione amminoacidica 399 secondo il sistema di numerazione EU, e detta quarta catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3 comprende un residuo di acido aspartico (D) in posizione amminoacidica 392 secondo il sistema di numerazione EU e un residuo di acido aspartico (D) in posizione amminoacidica 409 secondo il sistema di numerazione EU.

7. Metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-6, in cui ciascuna delle catene polipeptidiche comprendenti un dominio di CH3 comprende inoltre una regione variabile che riconosce un epitopo bersaglio.

8. Metodo della rivendicazione 7, in cui ciascuna delle 4 regioni variabili delle 4 catene polipeptidiche comprendenti un dominio di CH3 riconosce epitopi bersaglio differenti.

9. Metodo della rivendicazione 7, in cui le regioni variabili della 1^a e della 2^a catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3 riconoscono epitopi bersaglio differenti, mentre le regioni variabili della 3^a e della 4^a catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3 riconoscono gli stessi epitopi bersaglio.

10. Metodo della rivendicazione 9 in cui l'epitopo bersaglio riconosciuto dalle regioni variabili della 3^a e della 4^a catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3 è uguale all'epitopo bersaglio riconosciuto dalla regione variabile della 1^a e della 2^a catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3.

11. Metodo della rivendicazione 9 in cui l'epitopo bersaglio riconosciuto dalle regioni variabili della 3^a e della 4^a catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3 è differente dall'epitopo bersaglio riconosciuto dalla regione variabile della 1^a e della 2^a catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3.

12. Metodo della rivendicazione 7, in cui le regioni variabili della 1^a e della 2^a catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3 riconoscono lo stesso epitopo bersaglio, mentre le regioni variabili della 3^a e della 4^a catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3 riconoscono un secondo epitopo bersaglio che differisce dall'epitopo bersaglio riconosciuto da dette 1^a e 2^a regione variabile.

13. Miscela di almeno due differenti anticorpi ottenibile mediante i metodi secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-12.

14. Cellula ospite ricombinante comprendente sequenze di acido nucleico che codificano per almeno due anticorpi differenti, in cui ciascuno di detti due anticorpi comprende due domini di CH3 che sono capaci di formare un'interfaccia, dette sequenze di acido nucleico codificando per almeno una prima, una seconda, una terza e una quarta catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3, in cui detta prima catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3 comprende un dominio di CH3 di IgG umana che comprende un residuo di lisina (K) in posizione amminoacidica 366 secondo il sistema di numerazione EU e in cui detta seconda catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3 comprende un dominio di CH3 di IgG umana che comprende un residuo di acido aspartico (D) in posizione amminoacidica 351 secondo il sistema di numerazione EU.

15. Composizione farmaceutica comprendente almeno due anticorpi differenti della rivendicazione 13 e un trasportatore

farmaceuticamente accettabile.

16. Metodo per produrre una cellula ospite per la produzione di almeno due anticorpi differenti, il metodo comprendendo il passaggio di introdurre in detta cellula ospite sequenze di acido nucleico codificanti per almeno una prima, una seconda, una terza e una quarta catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3, in cui detta prima catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3 comprende un dominio di CH3 di IgG umana che comprende un residuo di lisina (K) in posizione amminoacidica 366 secondo il sistema di numerazione EU e in cui detta seconda catena polipeptidica comprendente un dominio di CH3 comprende un dominio di CH3 di IgG umana che comprende un residuo di acido aspartico (D) in posizione amminoacidica 351 secondo il sistema di numerazione EU, in cui dette sequenze di acido nucleico vengono introdotte consecutivamente o in maniera concomitante.

17. Cellule ospiti ricombinanti della rivendicazione 14, o le cellule ospiti ricombinanti ottenute mediante il metodo della rivendicazione 16, che producono almeno due anticorpi differenti.

* * * * *

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede.


Marco Giovanni Mari
USBM - CPI-090

LEGENDA DELLE TAVOLE DI DISEGNO

TAVOLA 1-33/33

FIGURA 1-29

"Figure" = Figura

TAVOLA 1/33

FIGURA 1

"schematic representation of construct vector MV1057" = rappresentazione schematica di vettore di costruito MV1057

"CMV-long" = CMV lungo

"HC signal peptide" = Peptide di segnale di HC

"stuffer *kb" = riempitivo *kb

"intron" = introne

"Hinge" = Cerniera

"Stop" = Stop

"LC signal peptide" = Peptide di segnale di LC

"schematic representation of phage display vector MV1043" = Rappresentazione schematica di vettore di visualizzazione su fago MV1043

"F1 origin" = Origine di F1

"Bla promoter" = Promotore di Bla

"LacZ promoter" = Promotore di LacZ

"g3 leader" = Leader di g3

"Pelb leader" = Leader di Pelb

"His tag" = Tag His

"Myc tag" = Tag Myc

"Amber stop" = Stop ambra

"Gene III protein" = Proteina di gene III

TAVOLA 2/33

FIGURA 2

"amino acid sequence of wildtype IgG1 PC, as present in construct vector MV1057 (EU numbering scheme applied)" = sequenza amminoacidica di Fc di IgG1 di tipo selvatico, come presente in vettore di costruito MV1057 (schema di numerazione di EU applicato)

TAVOLA 3/33

FIGURA 3

"nucleotide and amino acid sequences of VH regions use" = sequenze nucleotidiche e amminoacidiche di regioni di VH usate

TAVOLA 4-5/33

FIGURA 4

"mass spec data of transfections A, G and H" = dati di spettrometria di massa di trasfezioni A, G e H

"construct" = costruito

"exch" = esone

"pgnase" = pgnasi

TAVOLA 6/33

FIGURA 5

"construct" = costruito

"pgnase" = pgnasi

TAVOLA 7/33

FIGURA 6

"construct" = costruito

"pgnase" = pgnasi

TAVOLA 10/33

FIGURA 8

"Native MS spectrum of transfection sample 20 (T366K/L351'D)" = Spettro di MS nativa di campione di trasfezione ZO (T366K/L351'D)

"Convolut MS spectrum of transfection sample 20 (T366K/L351'D). The second/main peak represents the bispecific molecule." = Spettro di MS convoluta di campione di trasfezione ZO (T366K/L351'D). Il picco secondo/principale rappresenta la molecola bispecifica

TAVOLA 11, 13, 15, 16, 18, 19/33

FIGURA 9, 11, 13, 14, 16, 17

"Haddock score" = punteggio di Haddock

TAVOLA 20/33

FIGURA 18

"non-deglycosylated" = non deglicosilato

TAVOLA 24/33

FIGURA 21

" Average 10x FT n=3" = 10X FT media n = 3

"% igG left adter 10XFT" = % di IgG rimaste dopo 10XFT

TAVOLA 25/33

FIGURA 22

"Fib coat, * ug/ml IgG" = Rivestimento di fibrinogeno * ug/ml IgG

"1 day" = 1 giorno

"* days" = giorni

TAVOLA 27/33

FIGURA 24

"*Lys" = Lisina

TAVOLA 30, 31/33

FIGURA 27A-B

"Enzym" = Enzima

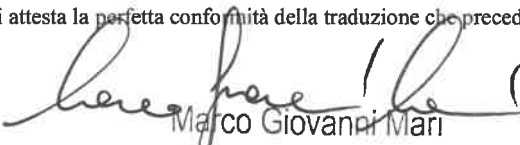
TAVOLA 33/33

FIGURA 29

"Hours after dosing" = Ore dopo la somministrazione

* * * * *

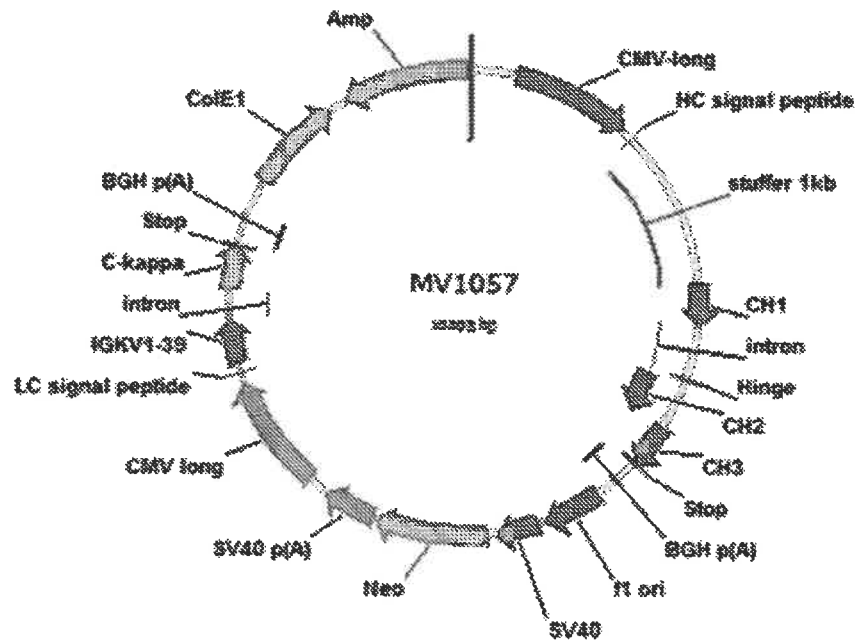
Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede.



Marco Giovanni Mari
USBM - CPI-090

Figure 1:

A) schematic representation of construct vector MV1057



B) schematic representation of phage display vector MV1043

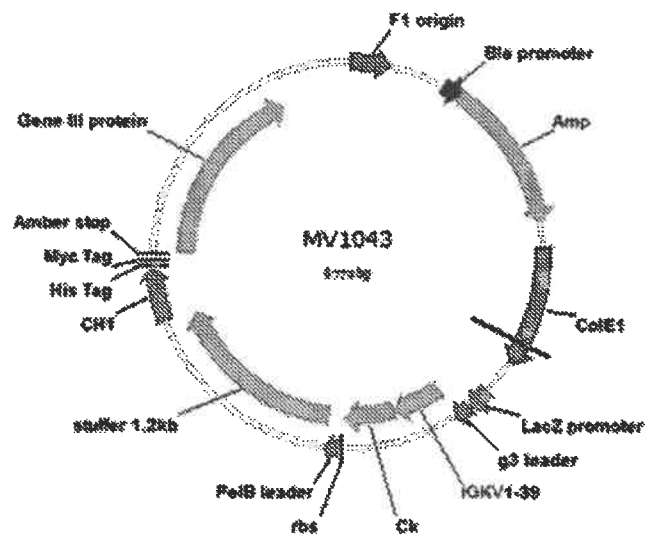


Figure 2: amino acid sequence of wildtype IgG1 Fc, as present in construct vector MV1057 (EU numbering scheme applied)

131	141	151	161	171	181
SSKSTSGCTA	ALCCLVKDYF	PEPVTVSWNS	CALTSCVHTF	PAVLQSSCLY	SLSSVTVPS
191	201	211	221	231	241
SSLGQTQYIC	NVNHKPSNFK	VDKRVEPKSC	DKLHTCPPCP	APPELLGGQPSV	FLEPPPKKDT
251	261	271	281	291	301
LMISRTPEVT	CVVVDVSHED	PEVKFNWYVD	GVEVHNAKTK	PREEQYNSTY	RVVSVLTVLT
311	321	331	341	351	361
QDWLNGKEYK	CKVSNKALPA	PIEKTLISKAK	GQPREPQVYI	LPFSREEMTK	NQVSLTCLVK
371	381	391	401	411	421
CFYPSDIAVE	WESNQQPENN	YKTTTPVLDS	DGSFFLYSKL	TVDKSRWQQG	NVFSCSVME
431	441				
ALHNHYTQKS	LSLSPCK				

Figure 3: nucleotide and amino acid sequences of VH regions used

MF1025_VH

gaggtgcagctggtggagtctgggggaggttggtacagcctggggggtccctgagactctcctgtgcag
 cclclggallcaccclllagcagclalgccal.gagclggglccgccaggclccagggaaggggclggaglg
 ggtctcagctattagtggttagtggtggttagcacatactacgcagactccgtgaagggccggttcaccatc
 tccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgt
 attactgtgcaagggccgattggtgggcgacttttgactactggggccaaggtaccctggtcacc

MF1025_VH

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTI
 SRDNSKNLYLQMNSLRAEDTAVYYCARADWWATFDYWCQGTTLV

MF1122_VH

gaggtgcagctggtggagtctgggggaggttggtccagcctgggaggtccctgagactctcctgtgcag
 cctctggattcaccctcagtagctatggcatgcactgggtccgccaggctccaggcaaggggctggagtg
 gglggcagllalalcalalgalggaaglaalaaalacalalgcagacclccglgaagggccgallcaccalc
 tccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagctgaggacacggccgtgt
 allacclglgcaagagccccllclacgaccalcgccalggacalallggggccaagglaccclgglcacc

MF1122_VH

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKLEWVAVISYDCSNKYYADSVKGRFTI
 SRDNSKNLYLQMNSLRAEDTAVYYCARALFTTIAMDYWCQGTTLV

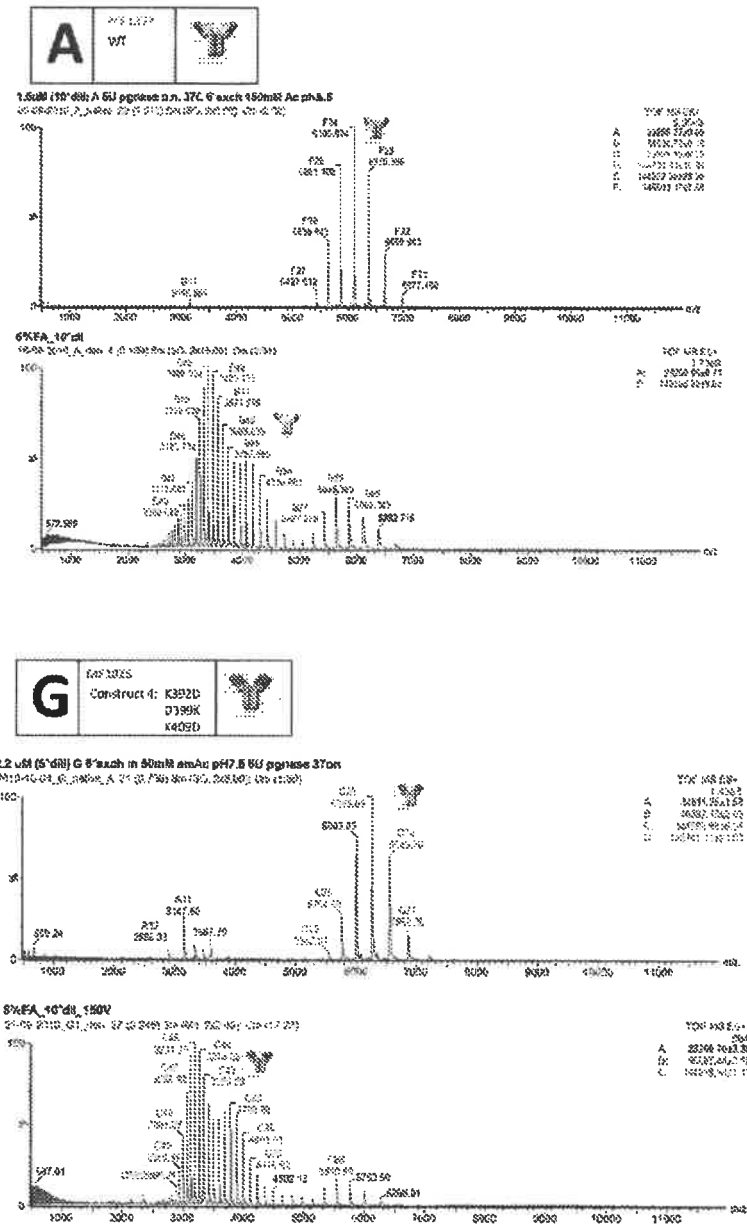
MF1337_VH

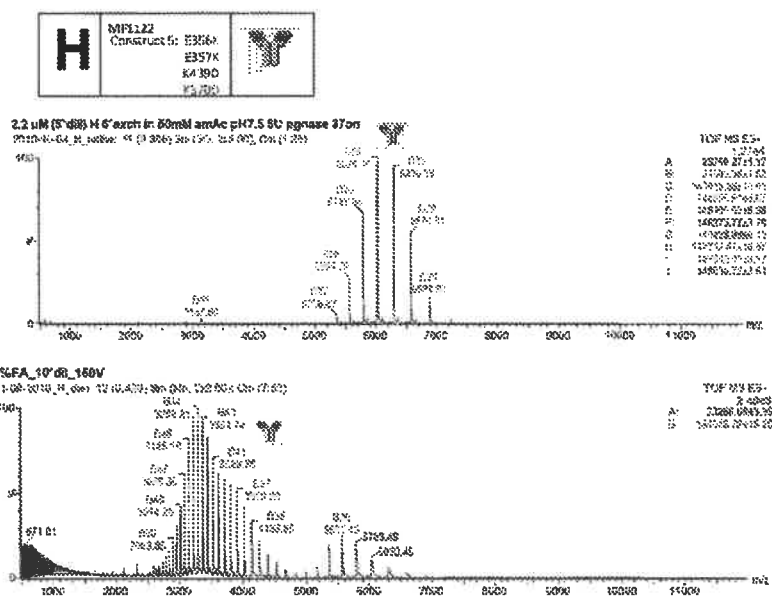
gagglgcagclggclggagacggggclgagglgaagaagccgggggcccacaglgaaagglclccclgcaaggcllcl
 gactacatcttcaccaaataatgacatcaactgggtgcgccaggccctggacaagggcttgaatggatgggatgg
 atgagcgctaacttgaaacacgggctatgcacagaagttccagggcagagtcaccatgaccagggacacgtcc
 ataaacacagcctacatggagctgagcagcctgacatctgggtgacacggccgtttatttctgtgagaggagtagt
 cttttcaagacagagacggcgccctactatcacttcgctctggacgtctggggccaagggaaccaggtcacc

MF1337

VHEVQLVETGAEVKKPCASVKVSKASDYIFTKYDINWVRQAPQCLEWMCWMSANTGNTGYAQKFQGRVTMTRD
 TSINLAYMELSSLTSCDTAVYFCARSSLEKTEETAPYYHFLDVMWCQGTTLV

Figure 4: mass spec data of transfections A, G and H





Marco Giovanni Mari
USBM-CPI-090

Figure 5

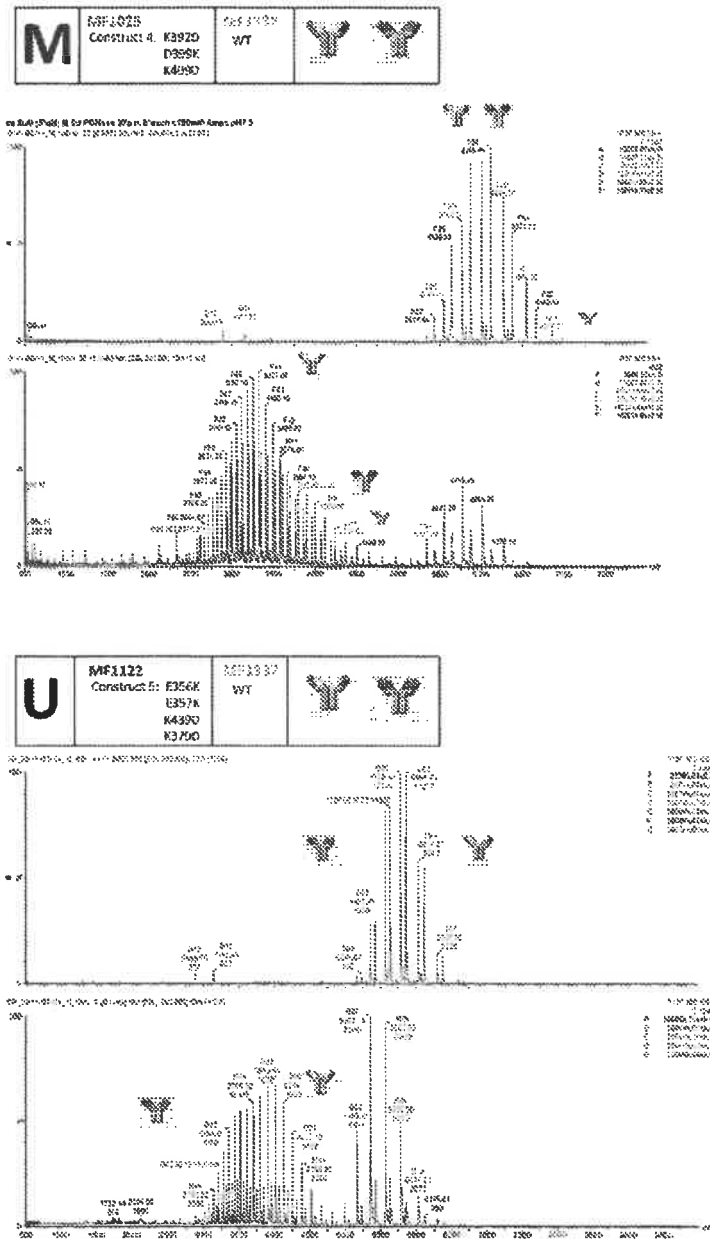


Figure 6:

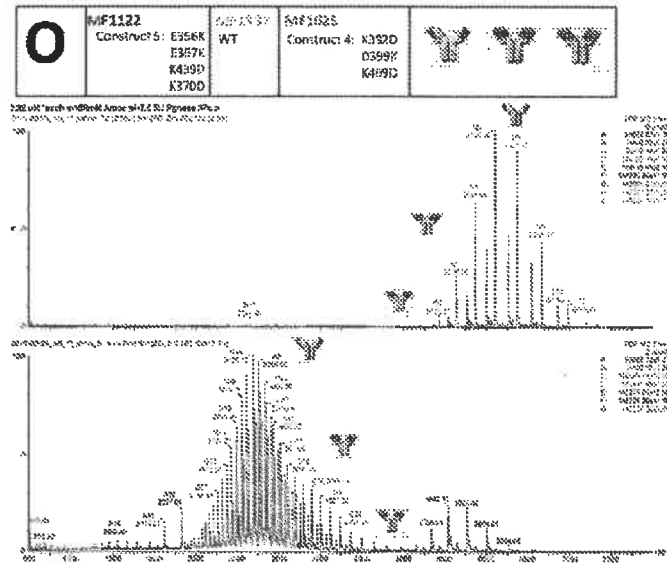
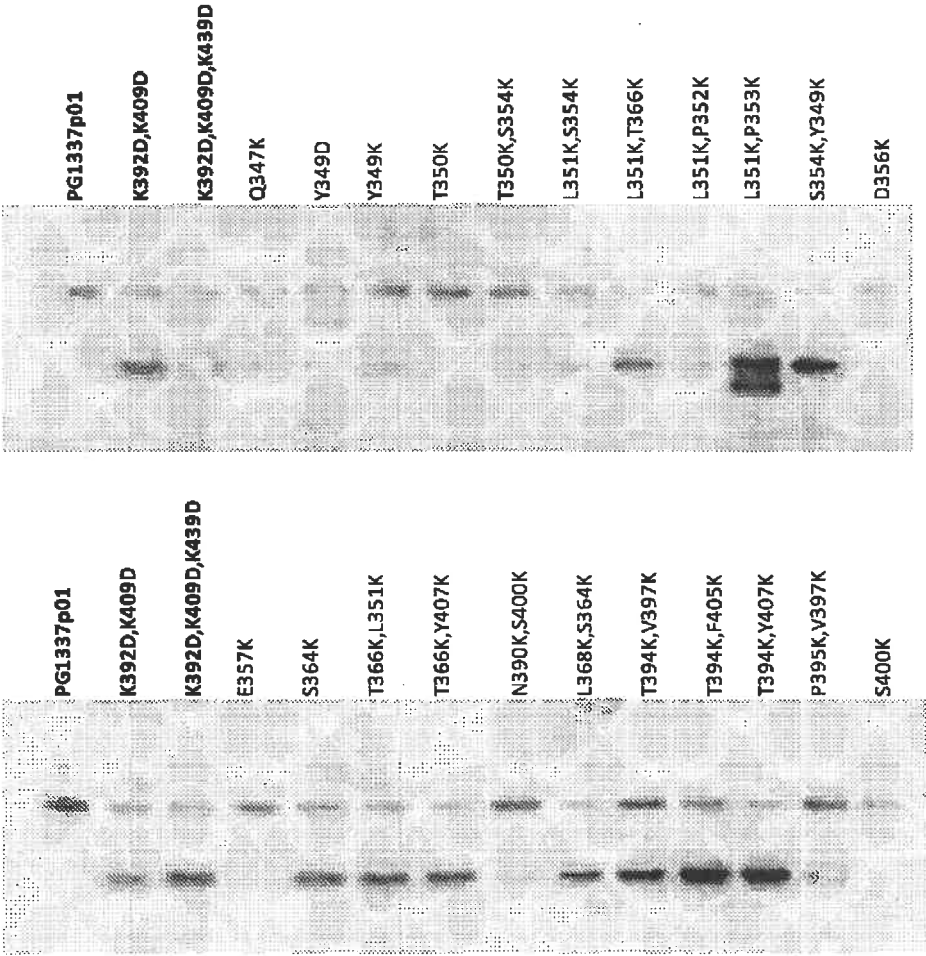
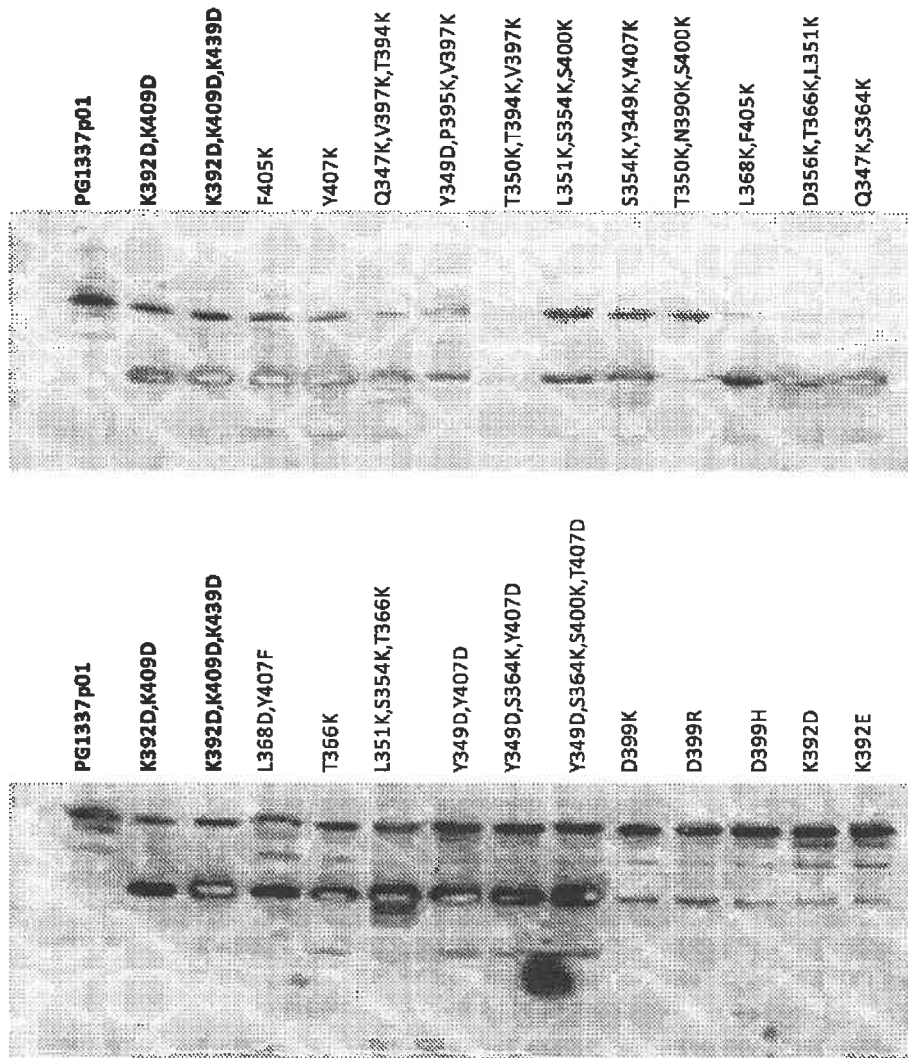


Figure 7:

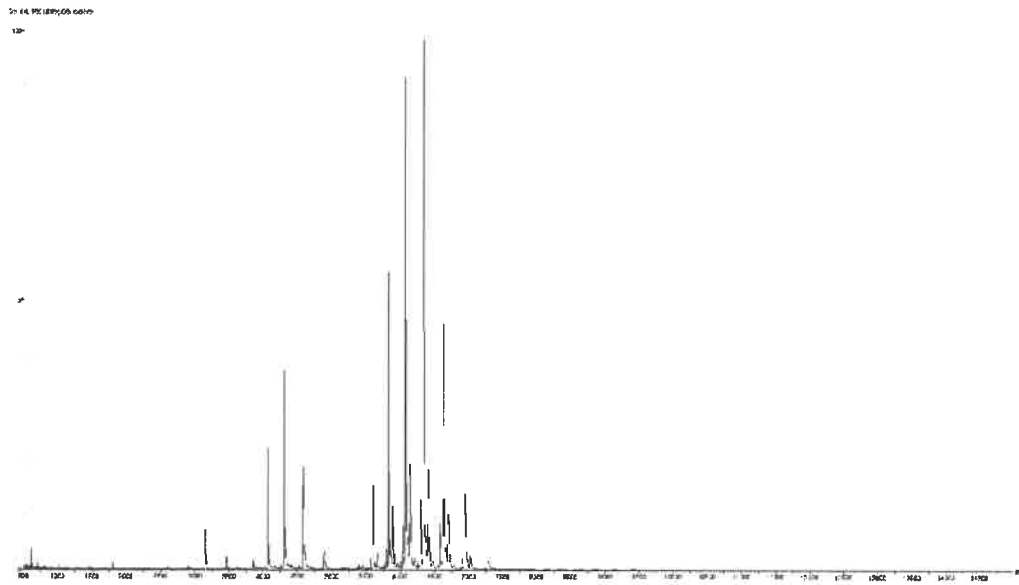


Marco Giovanni Mari
USBR-CPI-090

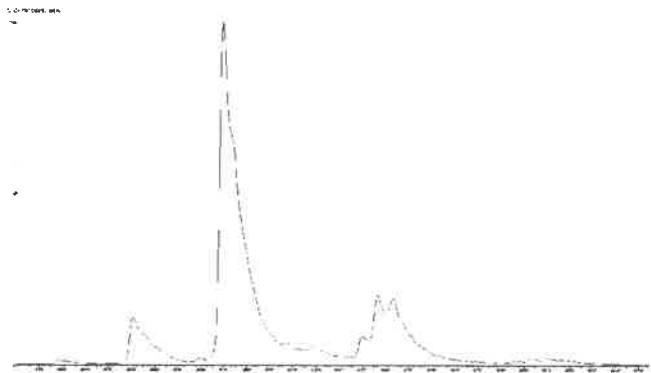


Marco Giovanni Mari
USBM-CPI-090

Figure 8:



A) Native MS spectrum of transfection sample ZO (T366K/L351'D)



B) Convolved MS spectrum of transfection sample ZO (T366K/L351'D). The second/main peak represents the bispecific molecule.

Marco Giovanni Mari
USBM - CPI-090

Figure 9:

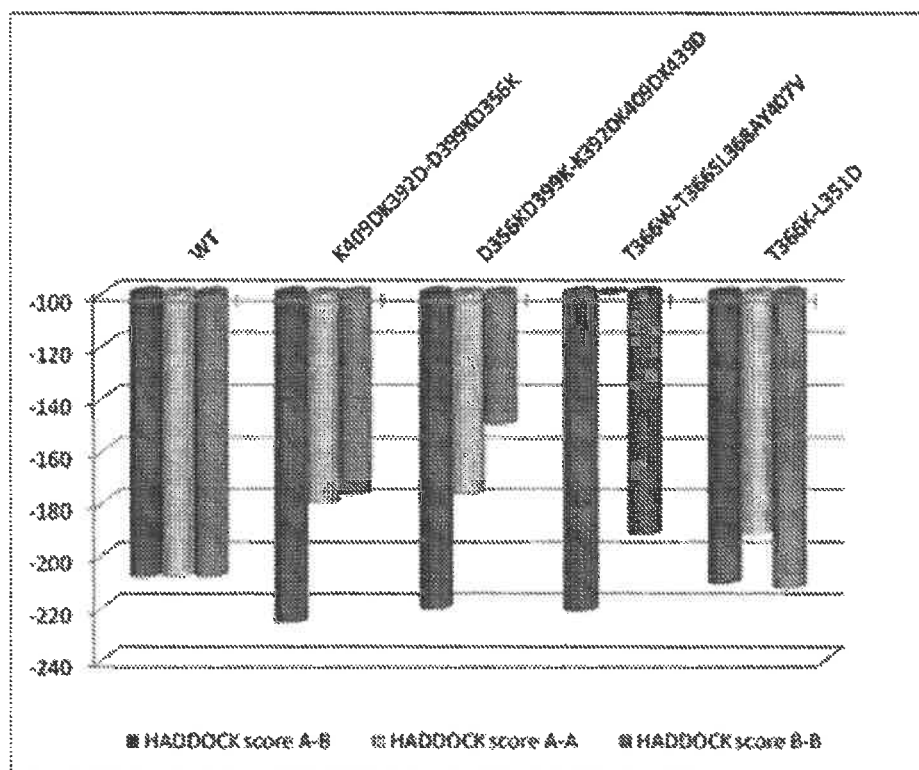
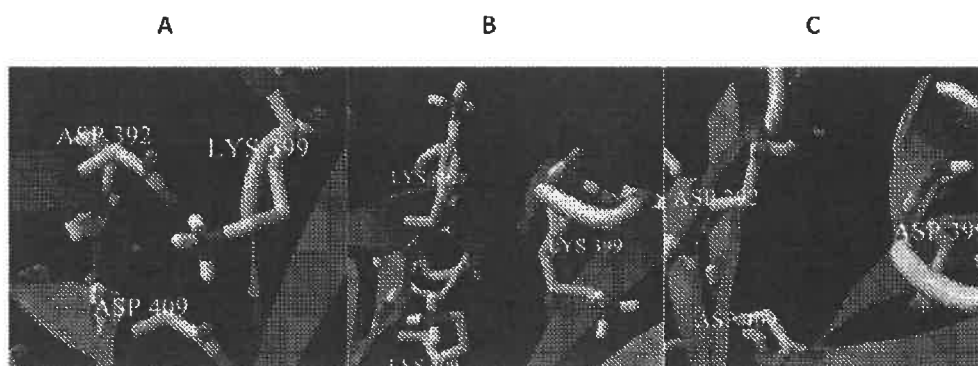


Figure 10

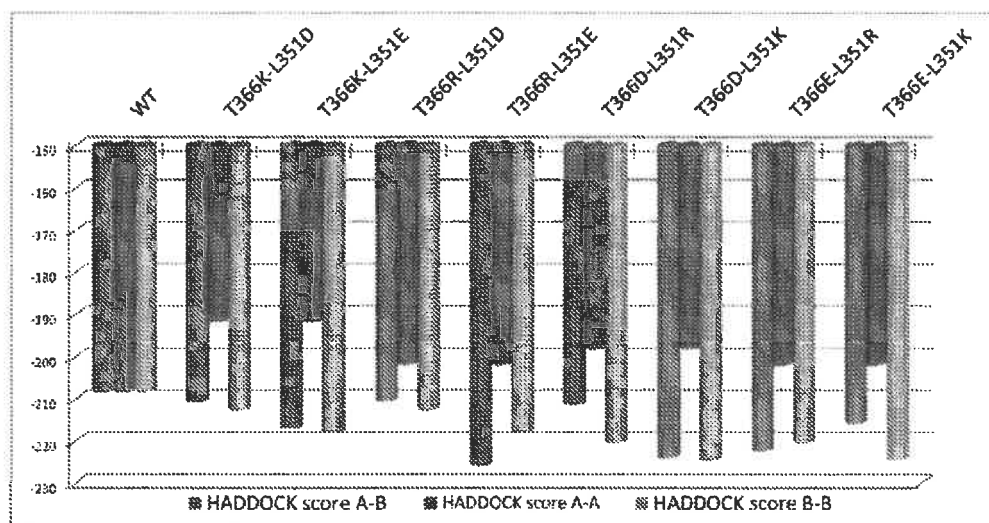


A K409D:K392D/D399'K:E356'K

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

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

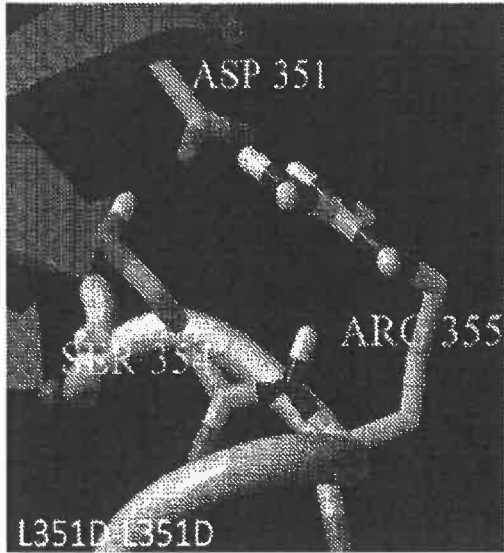
Figure 11:



Marco Giovanni Mari
USBM - CPI-090

Fig 12:

A



B

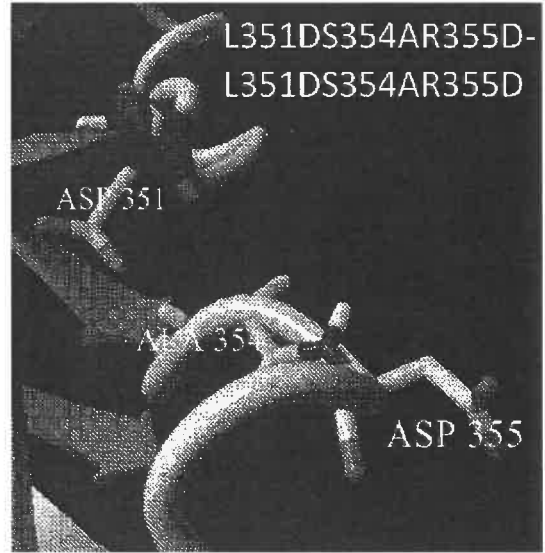


Figure 13:

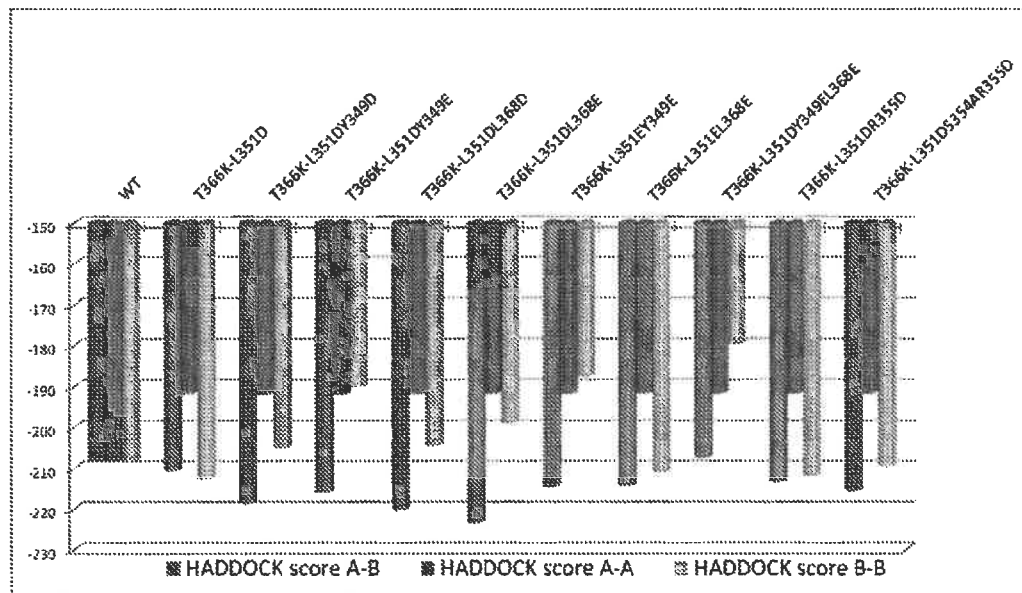


Figure 14:

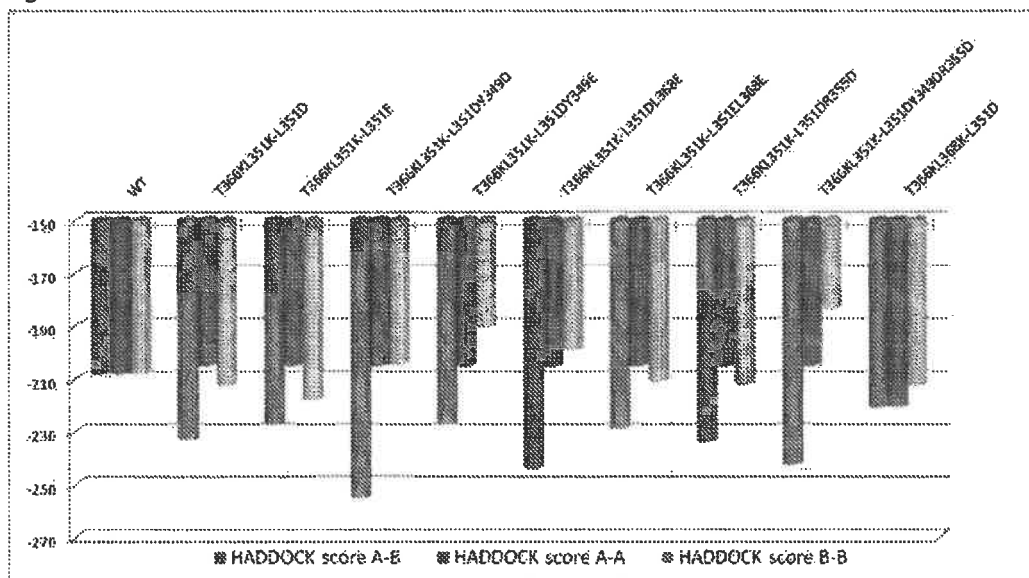


Figure 15:

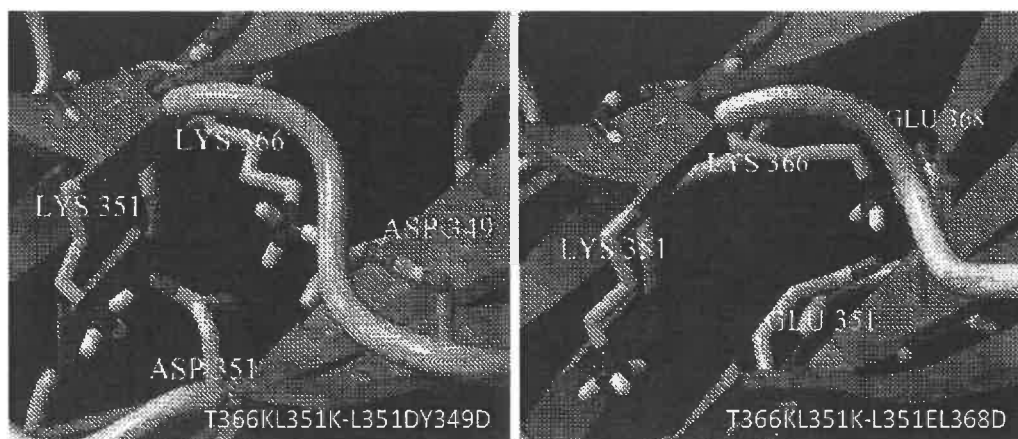


Figure 16:

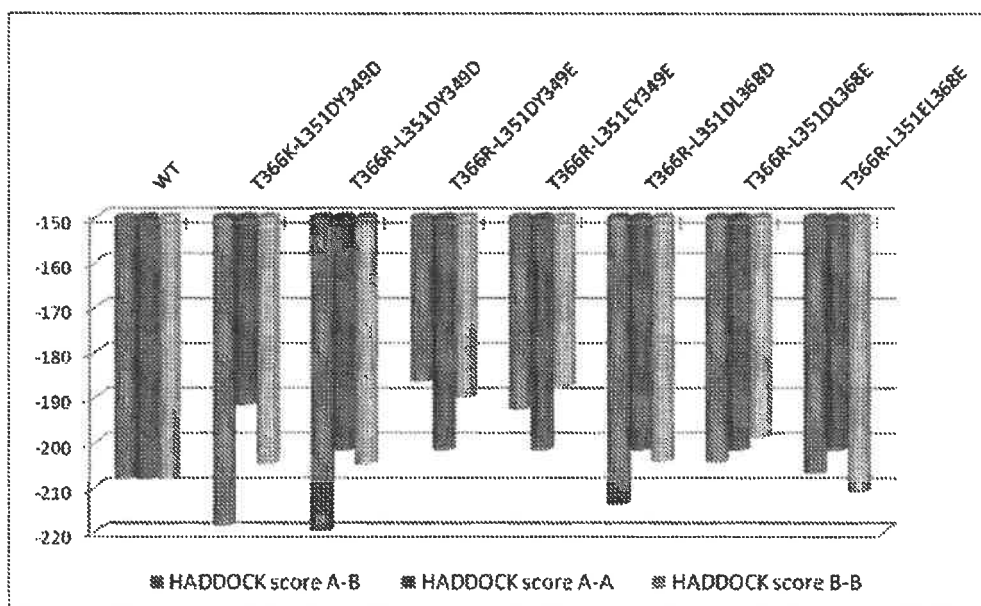
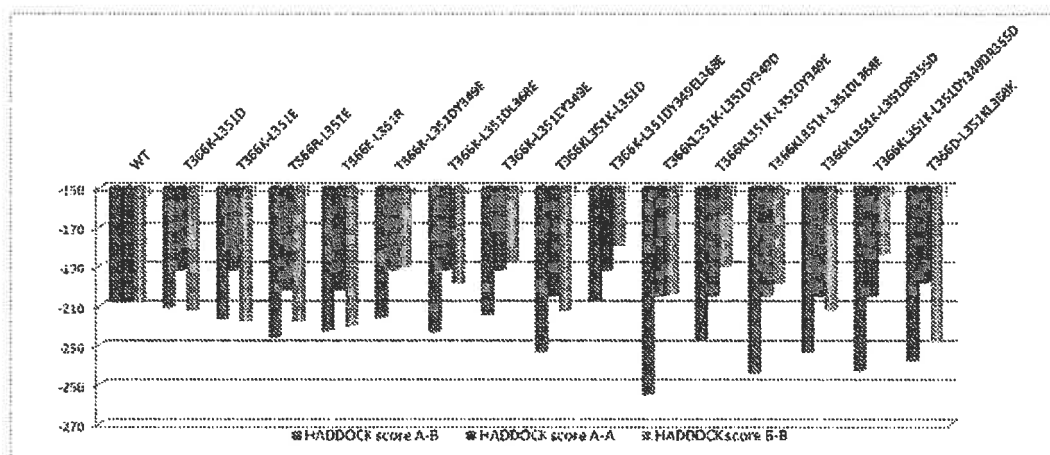
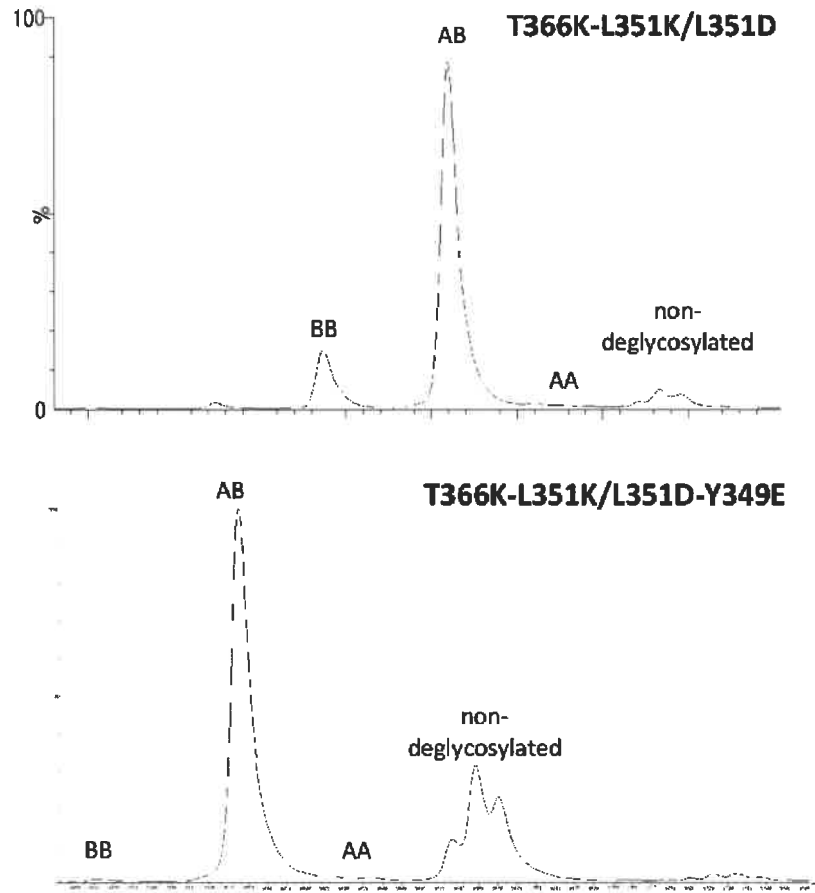


Figure 17:



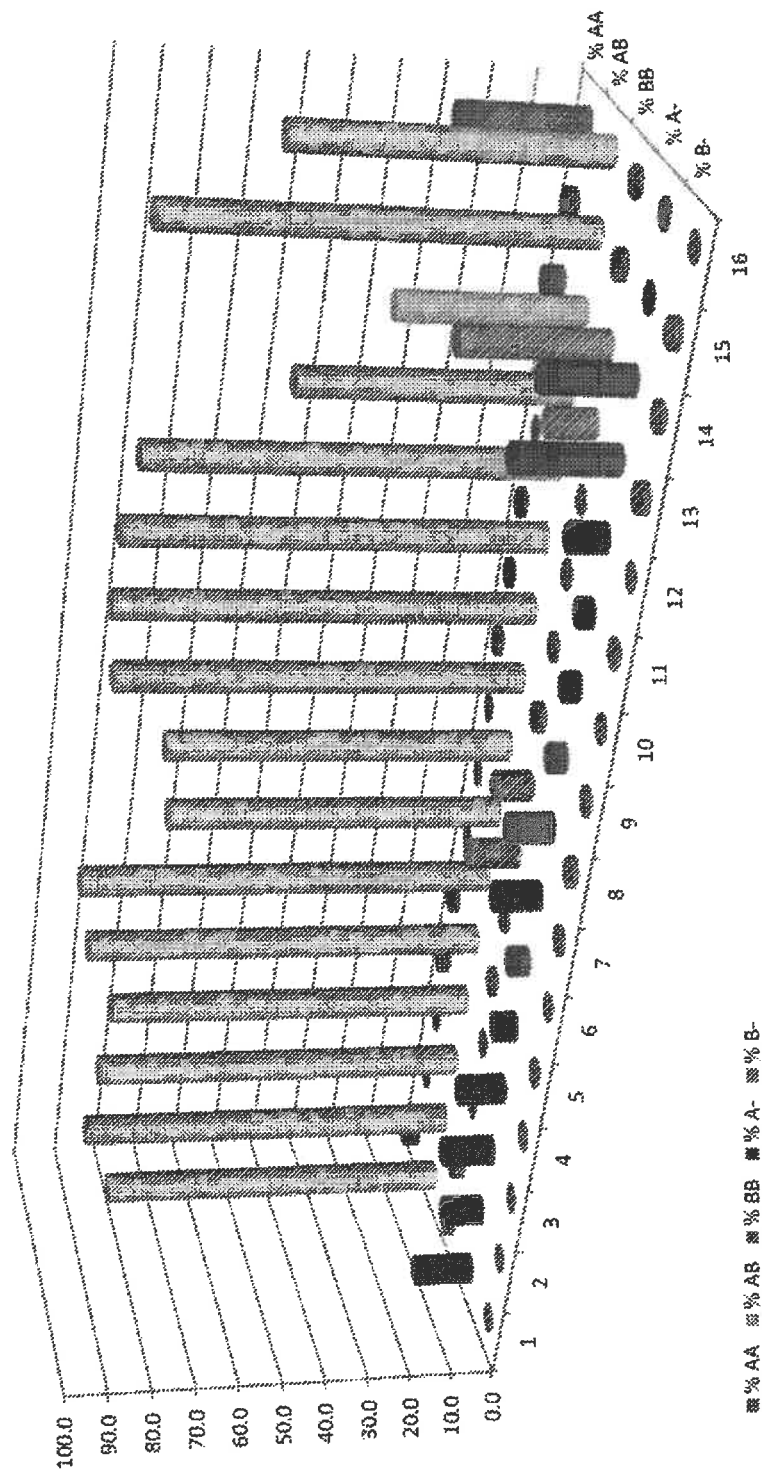
Marco Giovanni Mari
USBM - CPI-090

Figure 18:



Marco Giovanni Mari
USBM - CPI-090

Figure 19A:



Marco Giovanni Mari
USBM - CPI 090

Figure 19B:

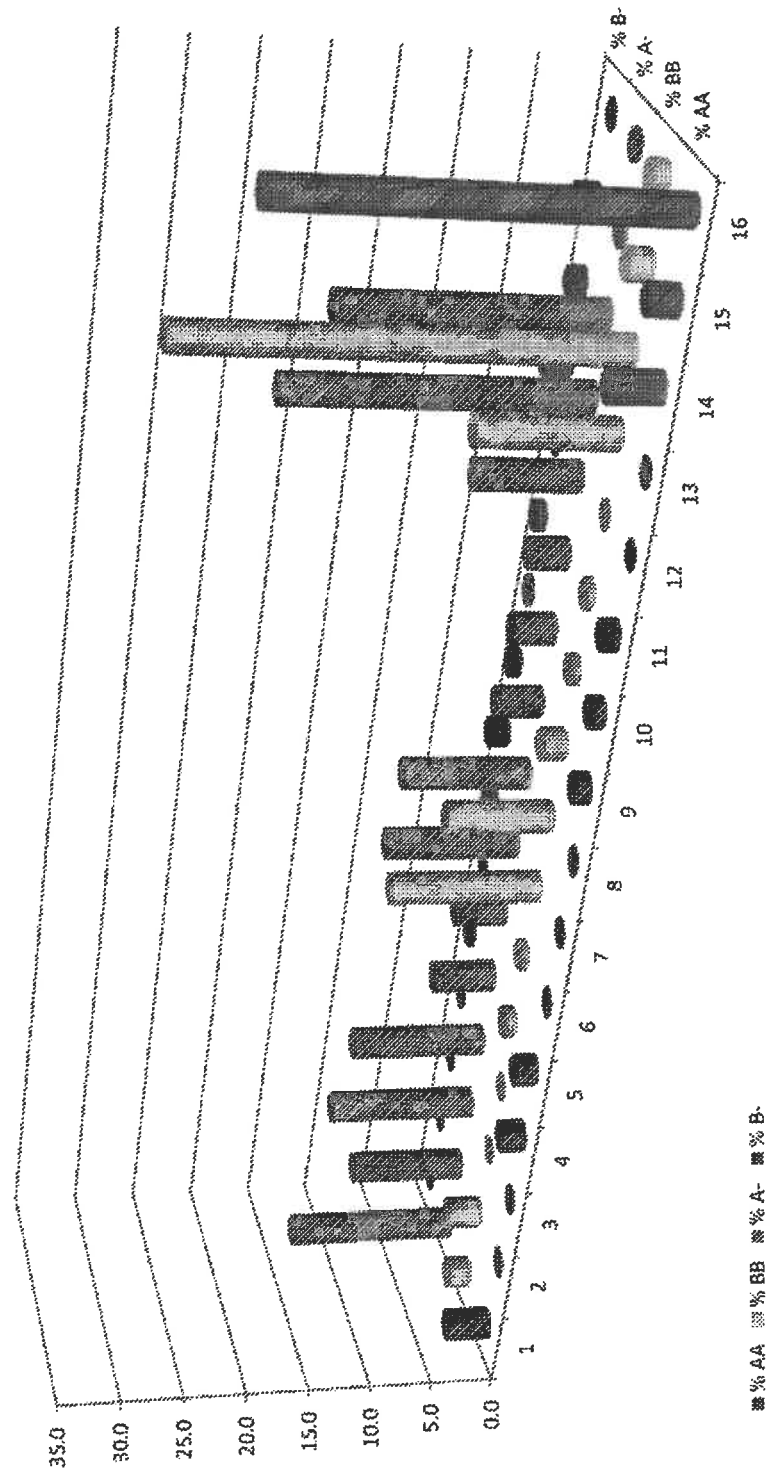


Figure 20:

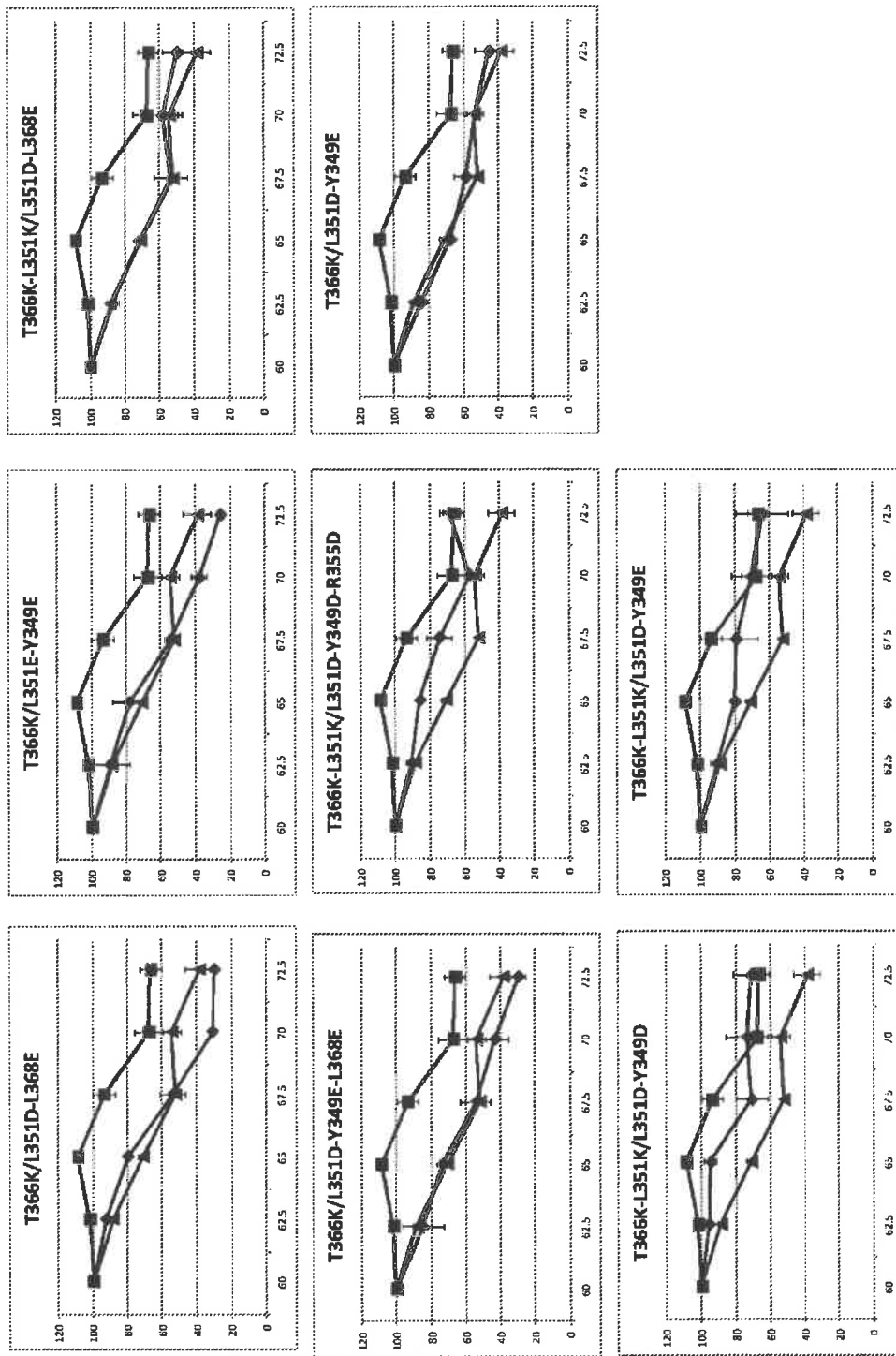
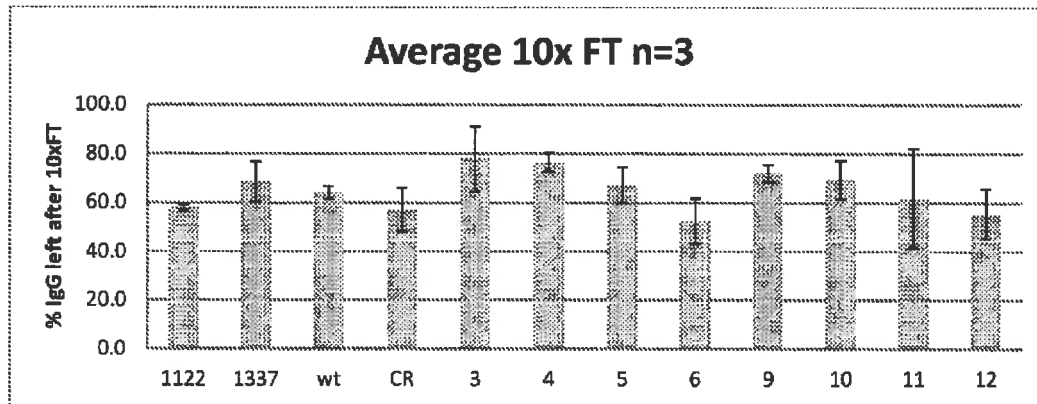


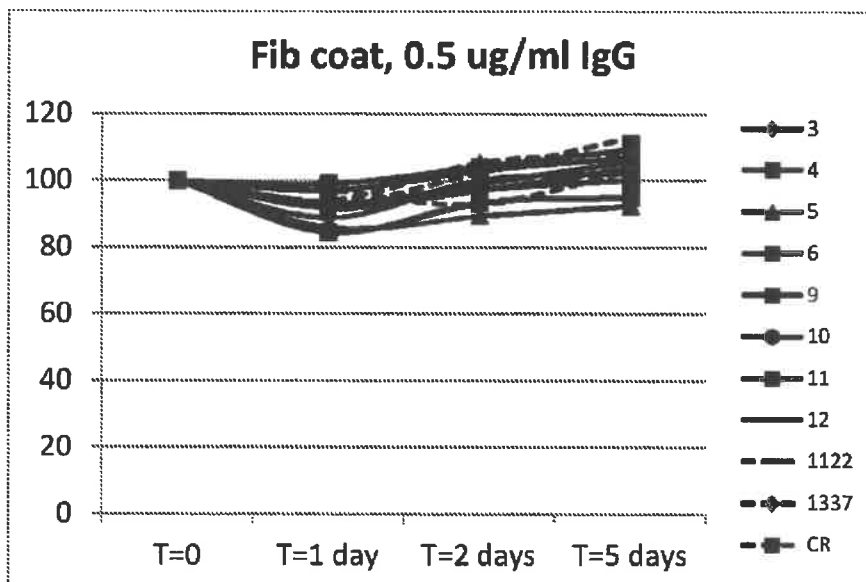
Figure 21:



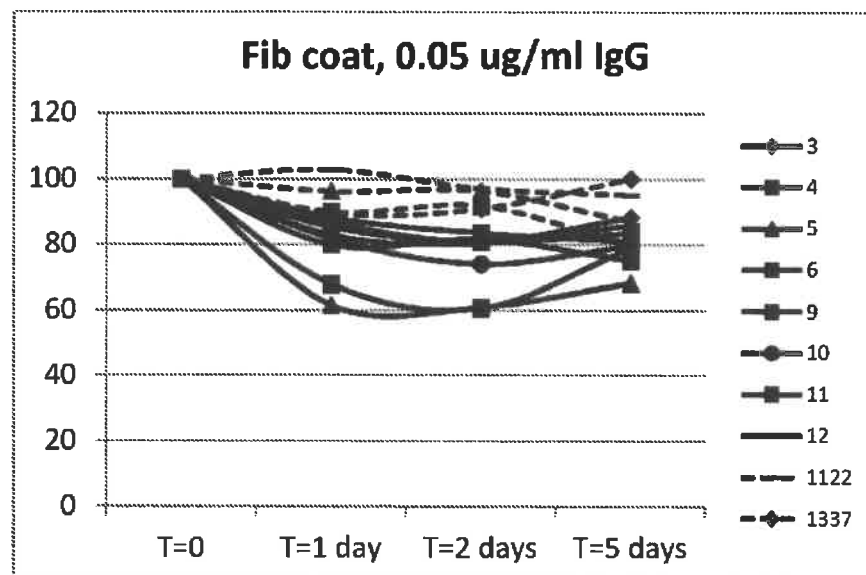
Marco Giovanni Mari
USBM - CPL 090

Figure 22:

A

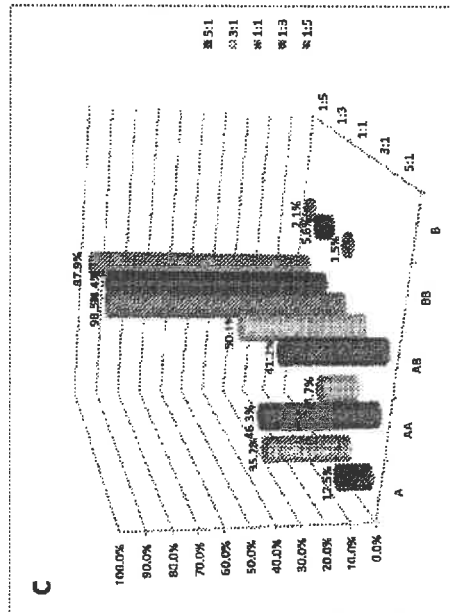
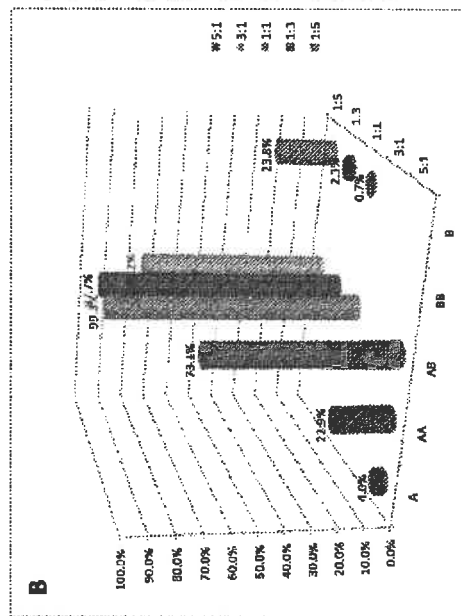
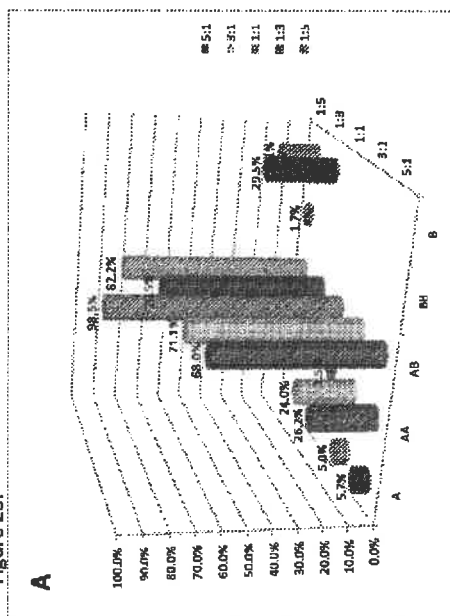


B



Marco Giovanni Mari
USBM - CPL090

Figure 23:



A

	S1	S11	S13	S15
A	5.7%	5.0%	1.5%	1.5%
AA	26.2%	24.0%	1.5%	1.5%
AB	68.0%	71.1%	98.5%	82.2%
BB	12.5%	14.7%	1.5%	1.5%
B	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%

B

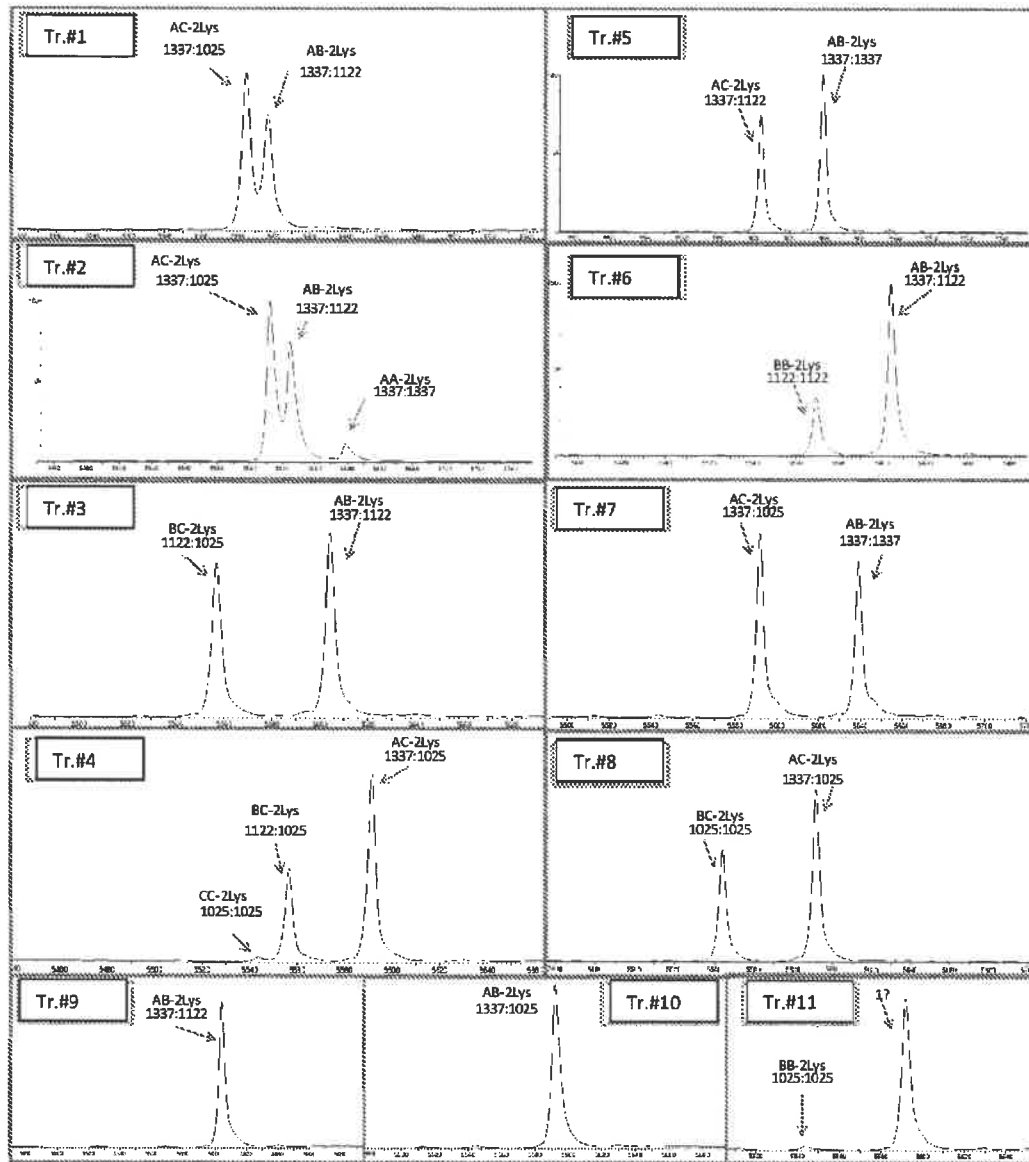
	S1	S11	S13	S15
A	4.0%	0.7%	2.3%	23.8%
AA	73.1%	99.3%	97.7%	76.2%
AB	22.0%	2.3%	1.5%	1.5%
BB	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
B	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%

C

	S1	S11	S13	S15
A	12.5%	35.2%	1.5%	1.5%
AA	46.3%	14.7%	1.5%	1.5%
AB	41.2%	50.1%	98.5%	94.4%
BB	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
B	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%

Marco Giovanni Mari
USBM - CPI-090

Figure 24:



Marco Giovanni Mari
USEM-CPI-090

Figure 25:

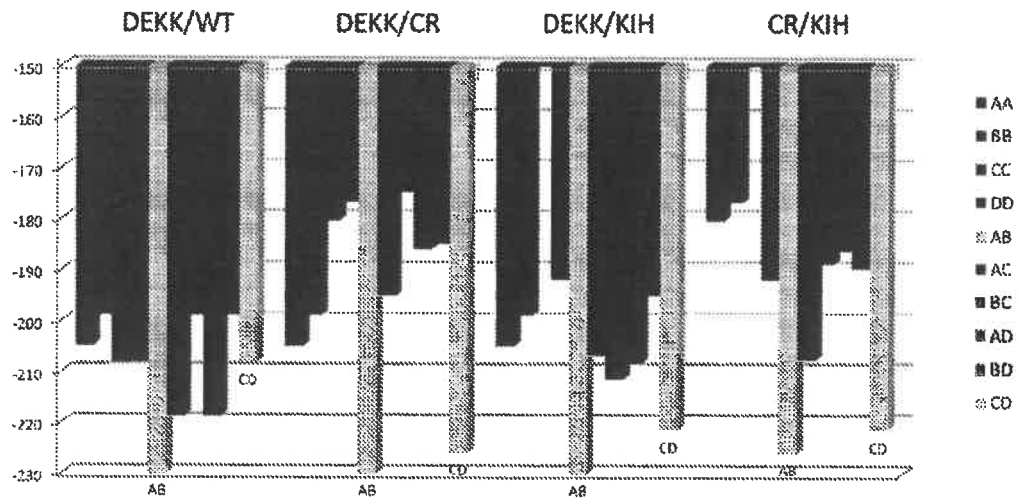
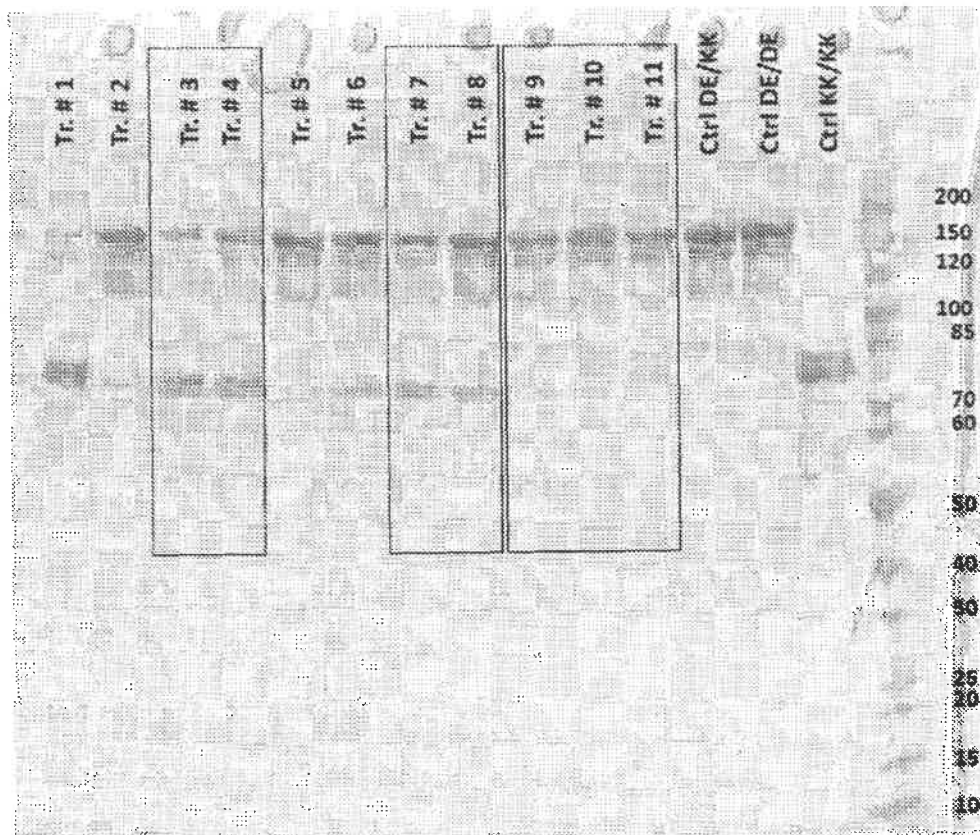
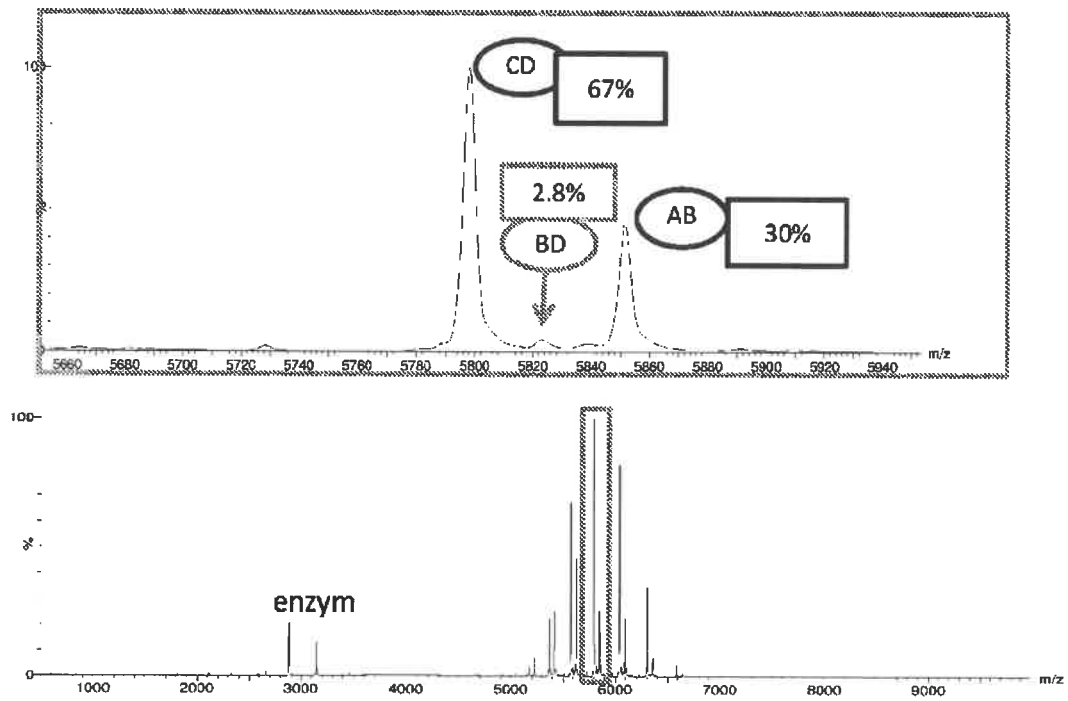


Figure 26:



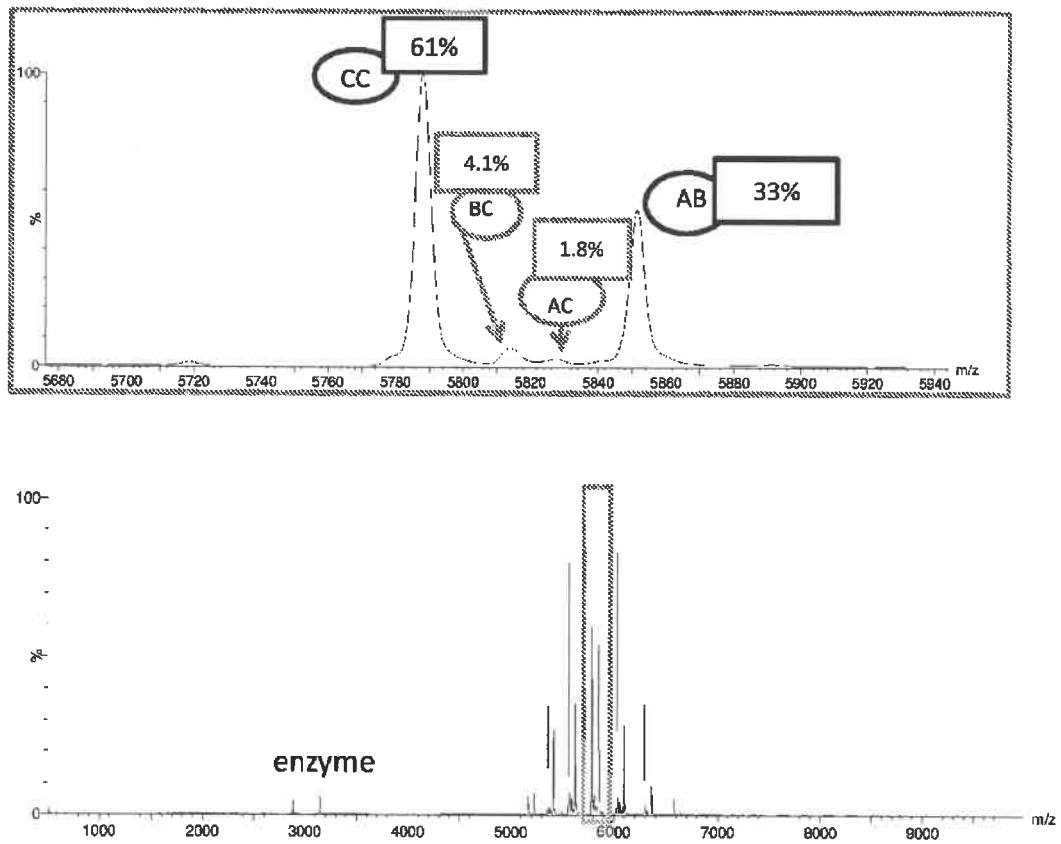
Marco Giovanni Mari
 USBM - CPI-090

Figure 27A:



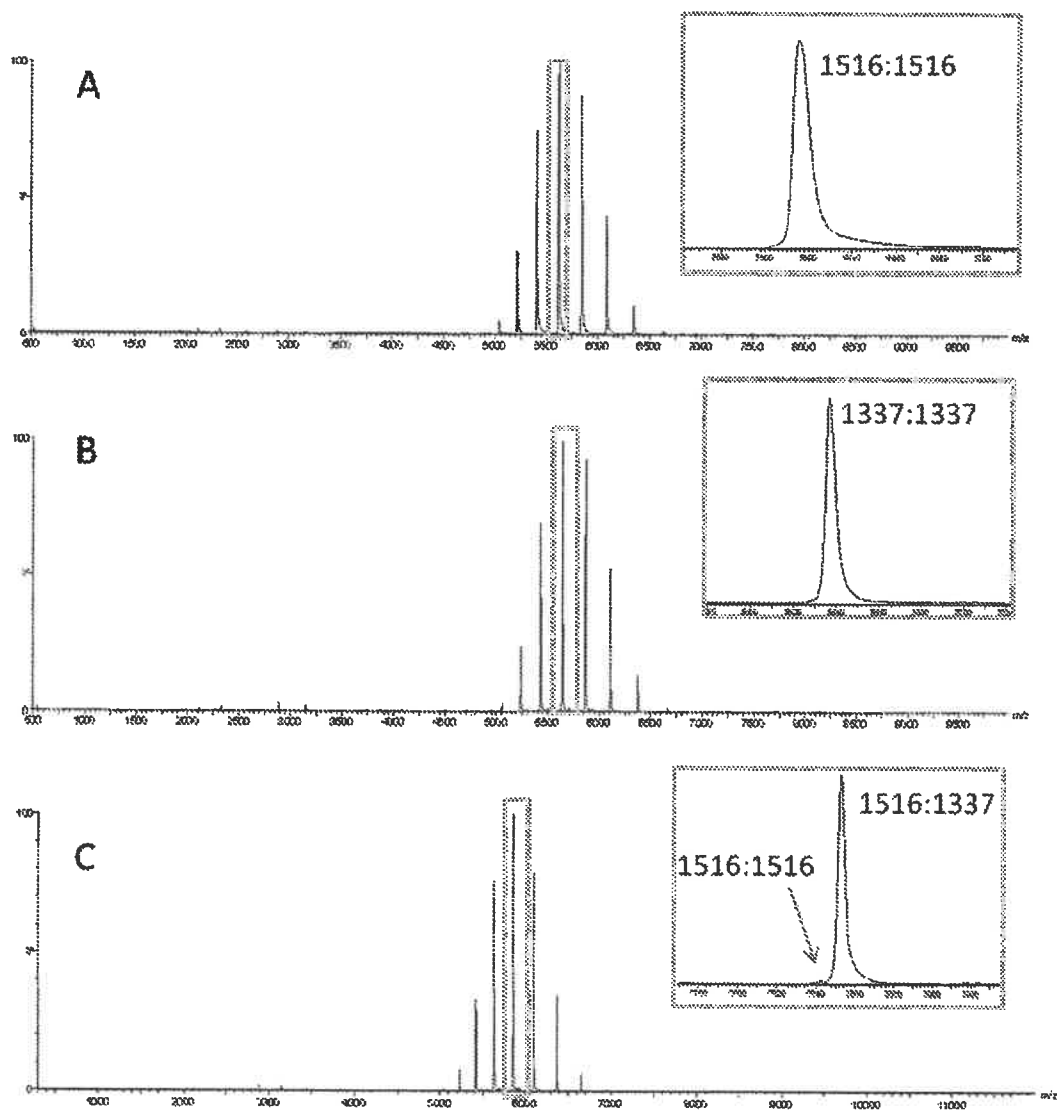
Marco Giovanni Mari
USBM - CPI 090

Figure 27B:



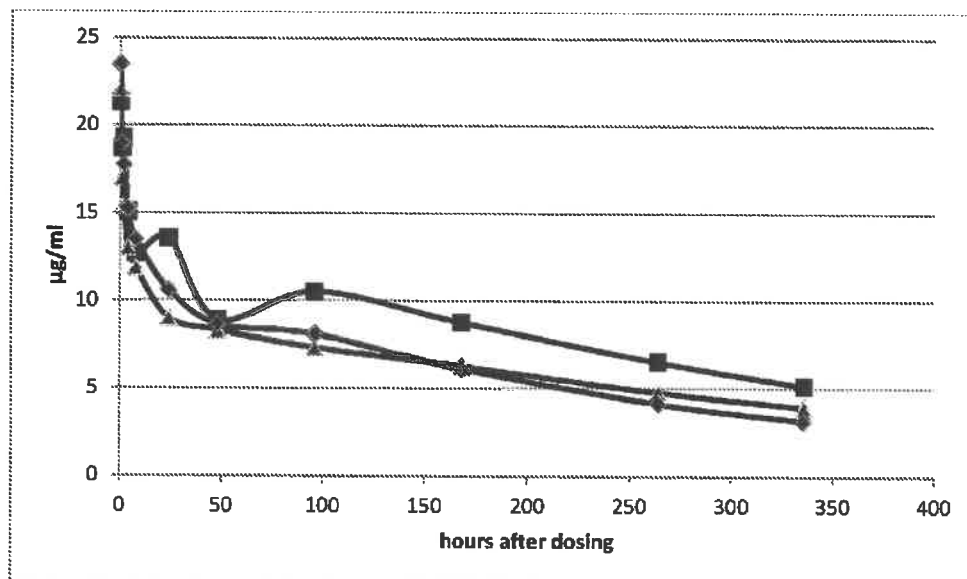
Marco Giovanni Mari
USBM - CPI-090

Figure 28:



Marco Giovanni Mari
USBM - CPI-090

Figure 29:



Marco Giovanni Mari
USBM - CPI-090