Anticuerpo quimérico, biespecífico, bivalente que comprende un heterodímero basado en CMH o proteínas similares a CMH

Campo de la invención

La presente invención se relaciona con el campo de la biotecnología, específicamente con anticuerpos quiméricos biespecíficos bivalentes que incluyen un heterodímero basado en los dominios proximales a la membrana de CMH (complejo mayor de histocompatibilidad) o proteínas similares a CMH (CD1 (grupo de diferenciación 1) o HFE (proteína de hemocromatosis), así como a una técnica para producir dichos anticuerpos biespecíficos. La invención se refiere además a un ácido nucleico que codifica dicho anticuerpo biespecífico, un vector de expresión, una célula huésped para producir dicho anticuerpo biespecífico quimérico bivalente y un método para producir dicha célula.

Antecedentes de la invención

Los anticuerpos monoclonales en forma de moléculas quiméricas, humanizadas o totalmente humanas han demostrado ser útiles como medicina eficaz para tratar una serie de trastornos y enfermedades.

Las moléculas de anticuerpos humanos que se producen de forma natural constan de dos homodímeros de cadena pesada, cada uno de los cuales forma un heterodímero en asociación con dos moléculas de cadena ligera idénticas. Los anticuerpos monoclonales convencionales en forma de moléculas enteras consisten en heterodímeros bivalentes ("de dos brazos") de cadenas pesadas y ligeras.

Las enfermedades son a menudo el resultado de varias patologías y se acompañan de muchas enfermedades concomitantes. Los anticuerpos biespecíficos son capaces de unirse y, por tanto, neutralizar dos o más antígenos diferentes por cada molécula de anticuerpo. El potencial de mejora significativa de las propiedades terapéuticas (y del valor) de los medicamentos en comparación con los anticuerpos monoclonales ha convertido a los anticuerpos biespecíficos en un área activa de investigación. En los

últimos veinte años, la literatura ha descrito muchas soluciones relativas a las versiones de ingeniería de los anticuerpos biespecíficos, como se describe en Brinkmann, U and RE Kontermann, 2017, The Making of Bispecific Antibodies, MAbs; 209 Feb/Mar; 9(2):182–212, doi: 10.1080/19420862.2016.1268307.

Como se mencionó anteriormente, existen muchos enfoques para crear moléculas con dominios de unión a antígeno combinados, es decir, con dominios de unión a antígeno que difieren entre sí. Sin embargo, cada uno de estos métodos tiene sus desventajas.

La reticulación por métodos químicos es un proceso que requiere mucho tiempo, ya que los homodímeros y otros subproductos indeseables deben eliminarse de las porciones correspondientes. Además, los pasos de modificación química pueden alterar la integridad de las proteínas, perjudicando así la estabilidad de las mismas. Por tanto, el método anterior suele ser ineficaz y puede conducir a la pérdida de la actividad del anticuerpo.

Un método basado en la fusión celular (por ejemplo, la producción de hibridomas) es un ensamblaje arbitrario de dos cadenas pesadas y dos ligeras, lo que da como resultado 10 combinaciones de anticuerpos. Los anticuerpos heteromultiméricos diana son solo una pequeña parte de los anticuerpos producidos de esta manera. El aislamiento de proteínas heteromultiméricas diana reduce significativamente el rendimiento del producto y aumenta los costes de producción.

Las técnicas de ADN recombinante se emplean para crear varios anticuerpos heteromultiméricos, por ejemplo, fragmentos de Fv de cadena única, diacuerpos, etc. que no tienen un fragmento Fc. La principal desventaja de este tipo de molécula de anticuerpo es la ausencia de un dominio Fc, lo que hace que el anticuerpo no desencadene una función efectora (como, por ejemplo, la activación del complemento, la unión a un receptor Fc, etc.). Por lo tanto, existe la necesidad de un anticuerpo biespecífico que comprenda un dominio Fc funcional.

Las técnicas de ADN recombinante se emplean además para diseñar anticuerpos biespecíficos utilizando la tecnología Botón en Ojal (del inglés Knob-into-Holes.) Véanse las solicitudes internacionales WO9627011 y WO9850431, así como Merchant AM ET ALL., An efficient route to human bispecific IgG, Nat Biotechnol. 1998 Jul;16(7):677-

81. Un factor que limita el uso del método anterior es el hecho de que las cadenas ligeras de los dos anticuerpos iniciales deben ser idénticas para evitar el emparejamiento erróneo y la formación de moléculas indeseables y/o inactivas cuando se expresan en una sola célula.

La pureza del producto de anticuerpo biespecífico depende de dos factores, como se indica a continuación:

a) ensamblaje heterodimérico de dos cadenas pesadas distintas coexpresadas en la célula, y

b) emparejamiento correcto de dos cadenas ligeras distintas con las correspondientes cadenas pesadas.

La tecnología "Botón en Ojales" (del inglés Knob-into-Holes) para diseñar anticuerpos biespecíficos resuelve el problema del ensamblaje heterodimérico correcto de dos cadenas pesadas distintas coexpresadas en la célula. Sin embargo, el uso de la tecnología"Botón en Ojal" para diseñar anticuerpos biespecíficos hace posible alcanzar solo un 25% de rendimiento de un producto biespecífico correctamente ensamblado, ya que el problema del emparejamiento correcto de dos cadenas ligeras distintas con las cadenas pesadas correspondientes todavía está sin resolver.

El problema del emparejamiento correcto de dos cadenas ligeras distintas con las correspondientes cadenas pesadas se resuelve de varias maneras:

1. Uso de una cadena ligera (idéntica) en la primera y la segunda parte del anticuerpo que se une al antígeno (Van Blarcom T ET AL., Productive common light chain libraries yield diverse panels of high affinity bispecific antibodies, MAbs. 2018 Feb/Mar;10(2):256-268. doi: 10.1080/19420862.2017.1406570).

La desventaja de la solución anterior es la no universalidad de la misma, ya que puede ser problemático seleccionar una cadena ligera adecuada para ambas valencias. Además, las sustituciones de aminoácidos en la cadena ligera para optimizar las propiedades del fragmento de unión al antígeno pueden afectar a ambas valencias. Además, la unión del anticuerpo al segundo antígeno puede verse alterada.

2. Uso de formatos de cadena única, es decir, los formatos en los que las cadenas ligeras y pesadas del fragmento de unión al antígeno específico para el primer antígeno están interconectadas mediante un conector de varios aminoácidos.

Este formato tiene desventajas tecnológicas, ya que utiliza conectores para fusionar el núcleo del anticuerpo (IgA, IgD, IgE, IgG o IgM) con otra proteína de unión (por ejemplo, scFv o scFab), o para fusionar, por ejemplo, dominios variables ligeros y pesados (VH y VL) dentro de scFv o una cadena ligera (VL-CK (o CL)) con VH-CH1 dentro de scFab. Los conectores pueden causar problemas en entornos terapéuticos. De hecho, estos péptidos extraños pueden provocar una respuesta inmunitaria contra el propio conector o la región de unión entre la proteína y el conector. Además, la naturaleza flexible de estos péptidos y su movilidad los hacen más propensos a la escisión proteolítica, lo que puede dar lugar a una mala estabilidad del anticuerpo, a su agregación y a una mayor inmunogenicidad.

3. Modificación de los dominios CH1-CK en un anticuerpo biespecífico para permitir la alteración de la interfaz de interacción en las técnicas de expresión de anticuerpos biespecíficos a fin de excluir la asociación incorrecta de las cadenas ligeras. Por ejemplo, la solicitud internacional WO2017059551 proporciona varias sustituciones de aminoácidos en CH1 y/o CK que facilitan el emparejamiento preferido entre la cadena pesada deseada y la cadena ligera deseada.

A pesar de las diversas tecnologías de expresión de anticuerpos biespecíficos mencionadas anteriormente, sigue existiendo la necesidad en la técnica de mejorar la pureza del producto de anticuerpos biespecíficos, así como de una solución de producción escalable para producir anticuerpos biespecíficos correctamente ensamblados.

Breve descripción de la invención

El formato desarrollado, por los autores de la presente invención, de anticuerpos quiméricos biespecíficos que incluyen un heterodímero basado en los dominios proximales de membrana del CMH o proteínas similares al CMH, por ejemplo, CD1 (grupo de diferenciación 1) o HFE (Proteína humana reguladora del hierro homeostático), así como la tecnología de producción de dichos anticuerpos quiméricos biespecíficos,

permiten obtener un alto rendimiento del producto con el correcto ensamblaje heterodimérico de dos cadenas pesadas distintas coexpresadas en la célula y el correcto emparejamiento entre dos cadenas ligeras distintas y las correspondientes cadenas pesadas.

El formato novedoso desarrollado por los autores de la presente invención de anticuerpos quiméricos biespecíficos que incluyen un heterodímero basado en dominios proximales de membrana del CMH o proteínas similares al CMH, así como la tecnología para producir dichos anticuerpos biespecíficos, permiten de manera sorprendente producir un producto de anticuerpos quiméricos biespecíficos correctamente ensamblados con alta pureza.

En consecuencia, los resultados anteriores reducen los costes de producción y conducen a una solución de producción escalable para producir anticuerpos biespecíficos correctamente ensamblados.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo quimérico biespecífico bivalente, en el que dicho anticuerpo comprende:

a) una primera cadena ligera y una primera cadena pesada de anticuerpo que se unen específicamente a un primer antígeno;

en el que la primera cadena ligera comprende un dominio variable de cadena ligera y un dominio constante de cadena ligera;

donde la primera cadena pesada comprende un dominio variable de cadena pesada y dominios constantes de cadena pesada del anticuerpo que incluyen un primer dominio constante de cadena pesada (CH1) y un monómero de fragmento Fc que comprende un segundo (CH2) y un tercer dominio constante de cadena pesada (CH3);

b) una segunda cadena ligera y una segunda cadena pesada de anticuerpo que se unen específicamente a un segundo antígeno,

en el que la segunda cadena ligera comprende un dominio variable de cadena ligera y un dominio constante que se selecciona del grupo:

un primer dominio proximal de la membrana del CMH (complejo mayor de histocompatibilidad) o

un primer dominio próximo a la membrana de la proteína similar a CMH;

donde la segunda cadena pesada comprende un dominio variable de cadena pesada, un dominio constante que se selecciona del grupo:

un segundo dominio proximal de la membrana del CMH (complejo mayor de histocompatibilidad) o

un segundo dominio proximal a la membrana de proteína similar a CMH;

y un monómero de fragmento Fc que comprende dominios constantes de cadena pesada segundo (CH2) y tercero (CH3);

en el que el primer dominio próximo a la membrana del CMH o la proteína similar al CMH y el segundo dominio próximo a la membrana del CMH o la proteína similar al CMH forman un heterodímero entre ellos, que se estabiliza mediante un enlace disulfuro;

en el que el dominio CH3 de una cadena pesada y el dominio CH3 de otra cadena pesada entran en contacto entre sí con las superficies de los mismos, que se modifican para formar un anticuerpo quimérico biespecífico, bivalente, siendo dichas modificaciones en los dominios CH3 de la cadena pesada sustituciones para facilitar la heterodimerización.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico biespecífico bivalente incluye un primer dominio próximo a la membrana de CMH o proteína similar a CMH y un segundo dominio próximo a la membrana de CMH o proteína similar a CMH que forman un heterodímero entre ellos, que se estabiliza mediante un enlace disulfuro por medio de una mutación o mutaciones en el primer y/o segundo dominio constante para formar un enlace SS (puente disulfuro de cisteína) entre el primer y segundo dominio proximal a la membrana de CMH o proteína similar a CMH.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico biespecífico bivalente incluye un primer dominio próximo a la membrana de CMH o proteína similar a CMH y un segundo dominio próximo a la membrana de CMH o proteína similar a CMH que forman un heterodímero entre ellos, que se estabiliza mediante un enlace disulfuro por medio de la elongación del primer dominio proximal a la membrana de CMH o proteína similar a CMH por uno o más (1 a 10) aminoácidos en el extremo C-terminal y con Cys terminal en el extremo C-terminal para formar un enlace S-S (enlace disulfuro,

puente de cisteína) entre el primer dominio proximal a la membrana de CMH o proteína similar a CMH y la bisagra.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico incluye un alargamiento del primer dominio próximo a la membrana del CMH o de la proteína similar al CMH, siendo el alargamiento una secuencia de tres aminoácidos GSC.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico biespecífico bivalente comprende:

una primera cadena ligera que comprende un dominio variable de cadena ligera (VL1) y un dominio constante de cadena ligera;

una primera cadena pesada que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH1) y dominios constantes de cadena pesada de anticuerpo que incluyen un primer (CH1) dominio constante de cadena pesada y un monómero de fragmento Fc que comprende un segundo (CH2) y un tercer (CH3) dominio constante de cadena pesada;

una segunda cadena ligera que comprende un dominio variable de cadena ligera (VL2) y un primer dominio próximo a la membrana de CMH o un primer dominio próximo a la membrana de proteína similar a CMH;

una segunda cadena pesada que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH2), un segundo dominio próximo a la membrana de CMH o un segundo dominio próximo a la membrana de la proteína similar a CMH y un monómero de fragmento Fc que comprende los dominios constantes de cadena pesada segundo (CH2) y tercero (CH3);

en el que el primer dominio proximal de membrana del CMH o de la proteína similar al CMH y el segundo dominio proximal de membrana del CMH o de la proteína similar al CMH forman un heterodímero entre ellos, que se estabiliza mediante un enlace disulfuro por medio de una mutación o mutaciones en el primer y/o segundo dominio constante para formar un enlace S-S (puente disulfuro de cisteína) entre el primer y el segundo dominio proximal de membrana del CMH o de la proteína similar al CMH;

en la que entre la primera variante Fc y la segunda variante Fc en el dominio CH3 se forma una estructura de botón en ojal.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico biespecífico bivalente comprende:

una primera cadena ligera que comprende un dominio variable de cadena ligera (VL1) y un dominio constante de cadena ligera;

una primera cadena pesada que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH1) y dominios constantes de cadena pesada de anticuerpo que incluyen un primer (CH1) dominio constante de cadena pesada y un monómero de fragmento Fc que comprende un segundo (CH2) y un tercer (CH3) dominio constante de cadena pesada;

una segunda cadena ligera que comprende un dominio variable de cadena ligera (VL2) y un primer dominio próximo a la membrana de CMH o un primer dominio próximo a la membrana de proteína similar a CMH;

una segunda cadena pesada que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH2), un segundo dominio próximo a la membrana de CMH o un segundo dominio próximo a la membrana de la proteína similar a CMH y un monómero de fragmento Fc que comprende los dominios constantes de cadena pesada segundo (CH2) y tercero (CH3);

en la que entre la primera variante Fc y la segunda variante Fc en el dominio CH3 se forma una estructura de botón en ojal.

en el que el primer dominio proximal a la membrana del CMH o el primer dominio proximal a la membrana de la proteína similar al CMH comprende además un alargamiento del primer dominio proximal a la membrana del CMH o de la proteína similar al CMH en uno o más (de 1 a 10) aminoácidos en el extremo C con terminal Cys en el extremo C para formar un enlace S-S (enlace disulfuro, puente de cisteína) entre el primer dominio proximal a la membrana del CMH o de la proteína similar al CMH y la bisagra.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico biespecífico bivalente comprende:

una primera cadena ligera que comprende un dominio variable de cadena ligera (VL1) y un dominio constante de cadena ligera;

una primera cadena pesada que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH1) y dominios constantes de cadena pesada de anticuerpo que incluyen un primer (CH1) dominio constante de cadena pesada y un monómero de fragmento Fc que comprende un segundo (CH2) y un tercer (CH3) dominio constante de cadena pesada;

una segunda cadena ligera que comprende un dominio variable de cadena ligera (VL2) y un primer dominio próximo a la membrana de CMH o un primer dominio próximo a la membrana de proteína similar a CMH;

una segunda cadena pesada que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH2), un segundo dominio próximo a la membrana de CMH o un segundo dominio próximo a la membrana de la proteína similar a CMH y un monómero de fragmento Fc que comprende los dominios constantes de cadena pesada segundo (CH2) y tercero (CH3);

en la que entre la primera variante Fc y la segunda variante Fc en el dominio CH3 se forma una estructura de botón en ojal.

en el que el primer dominio proximal a la membrana del CMH o el primer dominio proximal a la membrana de la proteína similar al CMH comprende además un alargamiento del primer dominio proximal de membrana del CMH o de la proteína similar al CMH mediante la secuencia de aminoácidos GSC para formar un enlace S-S (enlace disulfuro, puente de cisteína) entre el primer dominio proximal a la membrana del CMH o de la proteína similar al CMH y la bisagra.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico comprende un primer dominio proximal a la membrana del CMH, que puede seleccionarse de un grupo que comprende:

un primer dominio próximo a la membrana CMH clase I (complejo mayor de histocompatibilidad clase I),

un primer dominio próximo a la membrana CMH clase II (complejo mayor de histocompatibilidad clase II),

una variante modificada de un primer dominio próximo a la membrana CMH clase I o

una variante modificada de un primer dominio próximo a la membrana CMH de clase II.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico comprende un segundo dominio proximal a la membrana del CMH, que puede seleccionarse de un grupo que comprende:

un segundo dominio próximo a la membrana CMH clase I (complejo mayor de histocompatibilidad clase I),

un segundo dominio próximo a la membrana CMH clase II (complejo mayor de histocompatibilidad clase II),

una variante modificada de un segundo dominio próximo a la membrana CMH clase I o

una variante modificada de un segundo dominio próximo a la membrana CMH de clase II.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico comprende un dominio próximo a la membrana del CMH humano de clase I.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico comprende un dominio próximo a la membrana del CMH humano de clase II.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico comprende un dominio próximo a la membrana del CMH de clase II, que se selecciona del grupo: HLA-DM, HLA-DO, HLA-DP, HLA-DQ o HLA-DR.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico comprende un dominio próximo a la membrana del CMH de clase I, que se selecciona del grupo: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F or HLA-G.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico comprende un dominio próximo a la membrana de una proteína humana similar al CMH.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico comprende un primer dominio proximal a la membrana de una proteína similar al CMH, que puede seleccionarse de un grupo que comprende:

un primer dominio proximal a la membrana de CD1 (grupo de diferenciación 1),

un primer dominio proximal a la membrana de HFE (proteína de hemocromatosis),

una variante modificada de un primer dominio proximal a la membrana de CD1 o

una variante modificada de un primer dominio proximal a la membrana de HFE.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico comprende un segundo dominio proximal a la membrana de una proteína similar al CMH, que puede seleccionarse de un grupo que comprende:

un segundo dominio proximal a la membrana de CD1 (grupo de diferenciación 1),

un segundo dominio proximal a la membrana de HFE (proteína de hemocromatosis),

una variante modificada de un segundo dominio proximal a la membrana de CD1 o

una variante modificada de un segundo dominio proximal a la membrana de HFE.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico comprende un dominio proximal a la membrana de CD1, que se selecciona del grupo: CD1a, CD1b, CD1c, CD1d o CD1e.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico incluye un fragmento variable de la segunda cadena ligera (VL), que está separado de un primer dominio proximal de membrana del CMH o de la proteína similar al CMH por un conector de 1 a 25 aminoácidos de longitud, y/o un fragmento variable de la segunda cadena pesada (VH), que está separado de un segundo dominio proximal de membrana del CMH o de la proteína similar al CMH por un conector de 1 a 25 aminoácidos de longitud.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico biespecífico bivalente comprende:

a) el dominio CH3 de una cadena pesada se modifica de modo que en la superficie del dominio CH3 de una cadena pesada en contacto con la superficie del dominio CH3

de otra cadena pesada en el anticuerpo biespecífico bivalente, el residuo de aminoácido se sustituye por un residuo de aminoácido que tiene un mayor volumen de cadena lateral, lo que conduce a la formación de un botón (knob) en la superficie del dominio CH3 de una cadena pesada que puede encajar en un orificio en la superficie del dominio CH3 de otra cadena pesada,

y

b) el dominio CH3 de otra cadena pesada se modifica de modo que en la superficie del dominio CH3 de la segunda cadena pesada en contacto con la superficie del dominio CH3 de la primera cadena pesada en el anticuerpo biespecífico bivalente, el residuo de aminoácido se sustituye por un residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral menor, lo que da lugar a la formación de un orificio en la superficie del dominio CH3 de la segunda cadena pesada que puede aceptar un botón (knob) en la interfaz del dominio CH3 de la primera cadena pesada;

en el que dicho residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más grande se selecciona de un grupo que incluye arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W),

y en el que dicho residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño se selecciona de un grupo que incluye alanina (A), serina (S), treonina (T), valina (V).

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico comprende un dominio constante de la primera cadena ligera del anticuerpo, que se selecciona de CK o CL.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico comprende dominios CH3 del anticuerpo que se modifican además mediante la introducción de cisteína (C) como aminoácido en las posiciones correspondientes de cada dominio CH3 de manera que se pueda formar un puente disulfuro entre los dominios CH3.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo bivalente biespecífico comprende un dominio CH3 de una cadena pesada, que se modifica para formar un botón

(kKnob), y un dominio CH3 de otra cadena pesada, que se modifica para formar un orificio (Hole), o viceversa.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico comprende un dominio CH3 de una cadena pesada, que tiene sustituciones de aminoácidos S354C/T366W, y un dominio CH3 de otra cadena pesada, que tiene sustituciones de aminoácidos Y349C/T366S/L368A/Y407V.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico incluye un dominio CH3 de una cadena pesada, que tiene sustituciones de aminoácidos Y349C/T366S/L368A/Y407, y un dominio CH3 de otra cadena pesada, que tiene sustituciones de aminoácidos S354C/T366W.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico incluye un primer dominio proximal a la membrana del CMH y un segundo dominio proximal a la membrana del CMH que son el dominio α2 del CMH I y el dominio β2 del CMH II, respectivamente, y forman un heterodímero entre ellos.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico incluye un primer dominio proximal a la membrana del CMH y un segundo dominio proximal a la membrana del CMH que son el dominio β2 del CMH II y el dominio α2 del CMH II, respectivamente, y forman un heterodímero entre ellos.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico comprende el dominio α2 del CMH II que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo: SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36 o SEQ ID NO: 38, y el dominio β2 del CMH II que tiene la secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo: SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37 o SEQ ID NO: 39.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico incluye un primer dominio proximal a la membrana del CMH y un segundo dominio proximal a la membrana del CMH que son una variante modificada del dominio α2 del CMH II y una variante modificada del dominio β2 del CMH II, respectivamente, y forman un heterodímero entre ellos.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico incluye un primer dominio proximal a la membrana del CMH y un segundo dominio proximal a la membrana del CMH que son una variante modificada del dominio β2 del CMH II y que son una variante modificada del dominio α2 del CMH II, respectivamente, y forman un heterodímero entre ellos.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico incluye un primer dominio proximal a la membrana del CMH y un segundo dominio proximal a la membrana del CMH que son el dominio α3 del CMH I y la microglobulina β2 (β2M), respectivamente, y forman un heterodímero entre ellos.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico incluye un primer dominio proximal a la membrana del CMH y un segundo dominio proximal a la membrana del CMH que son la microglobulina β2 (β2M) y el dominio α3 del CMH I, respectivamente, y forman un heterodímero entre ellos.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico comprende el dominio α3 del CMH I que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NO: 1 a 29, y la microglobulina β2 (β2M) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico incluye un primer dominio proximal a la membrana del CMH y un segundo dominio proximal a la membrana del CMH que son una variante modificada del dominio α3 del CMH I y una variante modificada de la microglobulina β2 (β2M), respectivamente, y forman un heterodímero entre ellos.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico incluye un primer dominio proximal de membrana del CMH y un segundo dominio proximal de membrana del CMH que son una variante modificada de la microglobulina β2 (β2M) y una variante modificada del dominio α3 del CMH I, respectivamente, y forman un heterodímero entre ellos.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico comprende una variante modificada de la microglobulina β2 (β2M) que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona de SEQ ID NO: 47 o SEQ ID NO: 48.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico incluye un primer dominio proximal a la membrana de la proteína similar a CMH y un segundo dominio proximal a la membrana de la proteína similar a CMH que son el dominio α3 del CMH I y la microglobulina β2 (β2M), respectivamente, y forman un heterodímero entre ellos.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico incluye un primer dominio proximal a la membrana de la proteína similar a CMH y un segundo dominio proximal de membrana de la proteína similar a CMH que son la microglobulina β2 (β2M) y el dominio α3 de CD1, respectivamente, y forman un heterodímero entre ellos.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico comprende el dominio α3 del CD1 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NO: 40 a 44, y la microglobulina β2 (β2M) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico incluye un primer dominio proximal a la membrana de la proteína similar a CMH y un segundo dominio proximal a la membrana de la proteína similar a CMH que son una variante modificada del dominio α3 del CD1 y una variante modificada de la microglobulina β2 (β2M), respectivamente, y forman un heterodímero entre ellos.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico incluye un primer dominio proximal a la membrana de la proteína similar a CMH y un segundo dominio proximal a la membrana de la proteína similar a CMH que son una variante modificada de la microglobulina β2 (β2M) y una variante modificada del dominio α3 del CD1, respectivamente, y forman un heterodímero entre ellos.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico comprende una variante modificada del dominio α3 de CD1 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NO: 49 a 56 y/o SEQ ID NO: 109, y una variante modificada de la microglobulina β2 (β2M) que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 47 o SEQ ID NO: 48.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico incluye un primer dominio proximal a la membrana de la proteína similar a CMH y un segundo dominio proximal a la membrana de la proteína similar a CMH que son el dominio α3 de HFE y la microglobulina β2 (β2M), respectivamente, y forman un heterodímero entre ellos.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico incluye un primer dominio proximal a la membrana de la proteína similar a CMH y un segundo dominio proximal de membrana de la proteína similar a CMH que son la microglobulina β2 (β2M) y el dominio α3 de HFE, respectivamente, y forman un heterodímero entre ellos.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico comprende el dominio α3 de HFE que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45, y la microglobulina β2 (β2M) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico incluye un primer dominio proximal a la membrana de la proteína similar a CMH y un segundo dominio proximal a la membrana de la proteína similar a CMH que son una variante modificada del dominio α3 de HFE y una variante modificada de la microglobulina β2 (β2M), respectivamente, y forman un heterodímero entre ellos.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico incluye un primer dominio proximal a la membrana de la proteína similar a CMH y un segundo dominio proximal a la membrana de la proteína similar a CMH que son una variante modificada de la microglobulina β2 (β2M) y una variante modificada del dominio α3 de HFE, respectivamente, y forman un heterodímero entre ellos.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico comprende una variante modificada de la microglobulina β2 (β2M) que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona de SEQ ID NO: 47 o SEQ ID NO: 48.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico comprende una variante modificada del CMH o de la proteína similar al CMH, en la que la variante modificada se refiere a una variante que comprende

sustituciones de cisteína (C) para formar un puente disulfuro entre las cadenas del heterodímero producido a partir del primer y segundo dominios proximales de membrana del CMH o de la proteína similar al CMH.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico comprende una variante modificada del CMH o de la proteína similar al CMH, en la que la variante modificada se refiere a una variante que incluye una o más sustituciones en varias posiciones de los dominios proximales de la membrana del CMH o de la proteína similar al CMH, que conducen a un aumento de la estabilidad termodinámica Tm en más de 1 grado Celsius en comparación con los dominios proximales de la membrana de tipo salvaje del CMH o de la proteína similar al CMH, respectivamente.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico comprende una variante modificada del CMH o de la proteína similar al CMH, en la que la variante modificada se refiere a una variante que incluye una o más sustituciones en varias posiciones de los dominios proximales de membrana del CMH o de la proteína similar al CMH, que conducen a una disminución de la cantidad de agregados en más del 5% a una concentración superior a 10 mg/ml en comparación con los dominios proximales de membrana de tipo salvaje del CMH o de la proteína similar al CMH, respectivamente.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico comprende una variante modificada del CMH o de la proteína similar al CMH, donde la variante modificada se refiere a una variante que incluye una o más sustituciones en varias posiciones de los dominios proximales de membrana del CMH o de la proteína similar al CMH, que conducen a la eliminación de los sitios de glicosilación en comparación con los dominios proximales de membrana del CMH o de la proteína similar al CMH de tipo salvaje, respectivamente.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico comprende el dominio variable de una primera cadena ligera y el dominio variable de una segunda cadena ligera, que son idénticos.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico comprende un fragmento Fc que pertenece a la IgG.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico comprende un fragmento Fc seleccionado del grupo que comprende: IgG1, IgG2 o IgG4 humanas.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico incluye un monómero del fragmento Fc, en el que se introducen además sustituciones que conducen a la ausencia de propiedades ADCC, CDC y/o ADCP en el anticuerpo bivalente biespecífico.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico incluye un monómero de fragmento Fc, en el que se introducen además sustituciones LALA (L234A y L235A).

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico incluye un monómero del fragmento Fc, en el que se introducen además sustituciones que conducen a una acción prolongada del anticuerpo.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico incluye un monómero de fragmento Fc, en el que se introducen además sustituciones YTE (M252Y, S254T y T256E).

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico incluye un monómero del fragmento Fc, en el que se introducen además sustituciones que conducen a mejorar las propiedades ADCC, CDC y/o ADCP en el anticuerpo bivalente biespecífico.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico incluye un monómero de fragmento Fc, en el que se introduce además la sustitución E345R.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico se une específicamente a CD20 y CD3.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico se une específicamente a BCMA y CD3.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico se une específicamente a PD-L1 y CD47.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico se une específicamente al factor de coagulación 9 (FIX) y al factor de coagulación 10 (FX).

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico se une específicamente a GD2 y CD3.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico se une específicamente a AXL y CD3.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico se une específicamente a PD-L1 y TGF beta.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un ácido nucleico aislado que codifica cualquiera de los anticuerpos quiméricos bivalentes biespecíficos anteriores.

En algunas realizaciones de la invención, el ácido nucleico es ADN.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un vector de expresión que comprende cualquiera de los ácidos nucleicos anteriores.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para producir una célula huésped para producir cualquiera de los anticuerpos quiméricos bivalentes biespecíficos anteriores e incluye la transformación de una célula con el vector de expresión anterior.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una célula huésped para producir cualquiera de los anticuerpos quiméricos bivalentes biespecíficos anteriores que comprende cualquiera de los ácidos nucleicos anteriores.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para producir cualquiera de los anticuerpos quiméricos bivalentes biespecíficos anteriores que incluye los pasos de:

a) transformar una célula huésped

- con vectores de expresión que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican la primera cadena ligera y la primera cadena pesada del anticuerpo quimérico biespecífico,

- con vectores de expresión que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican la segunda cadena ligera y la segunda cadena pesada del anticuerpo quimérico biespecífico,

b) cultivar la célula huésped en condiciones adecuadas para la síntesis de dicho anticuerpo quimérico biespecífico, bivalente; y

c) aislar dicho anticuerpo biespecífico bivalente del cultivo celular.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una representación esquemática del formato del anticuerpo quimérico biespecífico bivalente.

A es la orientación "hacia delante" de la unidad de dimerización, B es la orientación "hacia atrás" de la unidad de dimerización

VH1, VL1 son dominios variables de la cadena pesada y ligera, respectivamente, responsables de la unión al antígeno 1;

VH2, VL2 son dominios variables responsables de la unión al antígeno 2.

CH1, CK son dominios constantes de la cadena pesada y ligera, respectivamente;

b2M es la microglobulina β2,

CD1b es el dominio α3 de la proteína CD1b.

Botón, orificio son mutaciones en el dominio CH3 del anticuerpo, que permiten la heterodimerización de las cadenas pesadas.

La figura 2 es una representación esquemática del complejo de cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo quimérico en el que se sustituyeron los dominios CH1 y CK por la microglobulina β2 y el dominio proximal de membrana α3 de la proteína CD1b.

A es la orientación "directa" de los dominios de la unidad de dimerización;

B es la orientación "inversa" de las unidades de dimerización.

VH, VL son dominios variables del anticuerpo,

b2M es la microglobulina β2,

CD1b es el dominio α3 de la membrana de la proteína CD1b,

bisagra es la región bisagra del anticuerpo, los primeros 5 aminoácidos se muestran explícitamente,

Fc es el fragmento Fc del anticuerpo;

Los aminoácidos del extremo C de los dominios b2M, α3 de CD1b y del extremo N de la región bisagra se muestran explícitamente;

El enlace SS se muestra como una línea de puntos.

La figura 3 es un electroforegrama de anticuerpos quiméricos que comprenden y están libres de enlaces disulfuro adicionales entre las cadenas pesadas y ligeras, gel de poliacrilamida al 7,5%, condiciones no reductoras.

Carriles:

M es un marcador estándar de Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (BIO-RAD), los pesos moleculares de los carriles correspondientes se indican como kDa en la columna de la izquierda del gel;

1- Control Prolgolimab - IgG1;

2 - Anticuerpo quimérico monoespecífico basado en los dominios variables de Prolgolimab y en los dominios de las proteínas tipo CMH sustituyendo a CH1-CK, con un puente disulfuro adicional;

3 - Anticuerpo quimérico monoespecífico basado en los dominios variables de Prolgolimab y los dominios de las proteínas similares al CMH sustituyendo a CH1-CK, sin un puente disulfuro adicional;

4 - Anticuerpo quimérico monoespecífico basado en los dominios variables de Prolgolimab y los dominios de las proteínas similares al CMH sustituyendo a CH1-CK, en la orientación "inversa" con un puente disulfuro adicional.

La figura 4 es un diagrama de un experimento para probar el efecto de la unidad de dimerización del CMH en el emparejamiento incorrecto entre las cadenas pesadas y ligeras. Los óvalos indican los dominios que sustituyen a CH1 y CK de las proteínas similares a CMH.

Grupo 1: las muestras 01-001 - 01-003 son anticuerpos con una combinación "correcta" de VH y VL y un par "incorrecto" de dominios constantes.

Grupo 2: las muestras 01-004 - 01-007 son anticuerpos con una combinación "incorrecta" de VH y VL y un par "correcto" de dominios constantes.

Grupo 3: las muestras 01-008 - 01-010 son anticuerpos con una combinación "incorrecta" de VH y VL y un par "incorrecto" de dominios constantes.

Grupo 4: las muestras 01-011 y 01-012 son anticuerpos de control que son un anticuerpo quimérico en el que los dominios constantes se sustituyen por unidades de dimerización del CMH y un anticuerpo clásico del formato IgG1, respectivamente.

La combinación "correcta" de VH y VL significa un par de VH y VL de un solo anticuerpo. Una combinación "incorrecta" de VH y VL significa VH y VL de anticuerpos distintos.

El par "correcto" de dominios constantes significa un par de CH1-CK o un par de dominios de proteínas similares al CMH (en este caso, la microglobulina β2 y el dominio α3 de la proteína CD1b). El par "incorrecto" de dominios constantes significa los pares CH1-CD1b o β2 microglobulina-CK.

La figura 5 es un electroforegrama de las muestras producidas en un experimento de emparejamiento incorrecto de cadenas. Gel de poliacrilamida al 7,5%, condiciones no reductoras.

A - Carriles:

M es un marcador estándar de Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (BIO-RAD), los pesos moleculares de los carriles correspondientes se indican como kDa en la columna de la izquierda del gel;

1 – 01-001;

2 – 01-002;

3 – 01-007;

4 – 01-008;

5 – 01-009;

6 – 01-012;

B - Carriles:

M - Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (BIO-RAD) marcador estándar;

1 – 01-003;

2 – 01-004;

3 – 01-005;

4 – 01-006;

5 – 01-007,

6 – 01-012;

C - Carriles:

M - Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (BIO-RAD) marcador estándar;

1 – 01-010;

2 – 01-011.

La figura 6 es un electroforegrama de anticuerpos quiméricos biespecíficos.

A - Gel de poliacrilamida al 7,5%, condiciones no reductoras,

B - Gel de poliacrilamida al 12,5%, condiciones reductoras.

Carriles:

M es un marcador estándar de Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (BIO-RAD), los pesos moleculares de los carriles correspondientes se indican como kDa en la columna de la izquierda del gel;

1 – 02-004,

2 – 02-005,

3 – 02-006,

4 – 02-007,

5 – 02-008,

6 – 02-009.

La figura 7 es un sensograma de un experimento que implica la interacción simultánea de los anticuerpos 02-006 y 02-007 con dos antígenos distintos (hPD1ex-H6F y hCSF1R_His). Las etapas (pasos del experimento) están numeradas en la parte superior de la imagen y separadas por líneas verticales. Se dan 2 sensogramas para cada anticuerpo que muestran la interacción con hCSF1R_His en el paso 8 (se observa un aumento del nivel de señal) y una señal de referencia en un tampón 1xKB libre de hCSF1R_His en el paso 8 (sin aumento del nivel de señal).

La figura 8 es el espectro de masas descontorneado del cromatograma de corriente iónica total para la muestra 02-004.

A - pico 4,

B - pico 5,

C - pico 6.

La figura 9 es un electroforegrama de electroforesis en gel SDS de anticuerpos quiméricos biespecíficos tras la proteólisis por la proteasa GingisKHAN. Gel de poliacrilamida al 7,5%, condiciones no reductoras.

A - carriles:

M es un marcador estándar de Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (BIO-RAD), los pesos moleculares de los carriles correspondientes se indican como kDa en la columna de la izquierda del gel;

1 - 02-004 no procesado por GingisKHAN,

2 - 02-009 no procesado por GingisKHAN,

3 - Ocrelizumab no procesado por GingisKHAN,

4 - 01-011 no procesado por GingisKHAN,

5 - Prolgolimab no procesado por GingisKHAN,

6 - 02-004 no procesado por GingisKHAN en tampón de bicarbonato de amonio 100 mM pH 7,2;

B - carriles:

M - Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (BIO-RAD) marcador estándar;

1 - 02-004 tras la proteólisis de GingisKHAN,

2 - 02-009 tras la proteólisis de GingisKHAN,

3 - Ocrelizumab tras la proteólisis por GingisKHAN,

4 - 01-011 tras la proteólisis de GingisKHAN,

5 - Prolgolimab tras la proteólisis por GingisKHAN,

6 - 02-004 después de la proteólisis por GingisKHAN en tampón de bicarbonato de amonio 100 mM pH 7,2,

C - carriles:

M - Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (BIO-RAD) marcador estándar;

1 - 02-005 no procesado por GingisKHAN,

2 - 02-005 tras la proteólisis de GingisKHAN,

3 - 02-006 no procesado por GingisKHAN,

4 - 02-006 tras la proteólisis por GingisKHAN,

5 - 02-007 no procesado por GingisKHAN,

6 - 02-007 tras la proteólisis de GingisKHAN,

D - carriles:

M - Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (BIO-RAD) marcador estándar,

1 - 02-008 no procesado por GingisKHAN,

2 - 02-008 tras la proteólisis de GingisKHAN,

3 - 02-004 no procesado por GingisKHAN,

4 - 02-004 tras la proteólisis por GingisKHAN.

La figura 10 es un electroforegrama de muestras con modificaciones introducidas en la unidad de dimerización basada en los dominios proximales de la membrana de la proteína similar a CMH. Gel de poliacrilamida al 7,5%, condiciones no reductoras.

A - Carriles:

M es un marcador estándar de Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (BIO-RAD), los pesos moleculares de los carriles correspondientes se indican como kDa en la columna de la izquierda del gel;

1 - Prolgolimab;

2 – 01-011;

3 – 03-003;

4 – 03-004;

5 – 03-005;

6 – 03-006;

7 – 03-007;

8 – 03-008.

B - Carriles:

M - Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (BIO-RAD) marcador estándar;

1 - Prolgolimab;

2 – 01-011;

3 – 03-001;

4 – 03-002.

Descripción de la invención

Definiciones y métodos generales

A menos que se definan de otro modo en el presente documento, todos los términos técnicos y científicos utilizados en relación con la presente invención tendrán el mismo significado que suelen entender los expertos en la técnica.

Además, salvo que el contexto exija lo contrario, los términos en singular incluirán los términos en plural, y los términos en plural incluirán los términos en singular. Normalmente, la presente clasificación y los métodos de cultivo celular, biología molecular, inmunología, microbiología, genética, química analítica, química de síntesis orgánica, química médica y farmacéutica, así como la hibridación y la química de las proteínas y los ácidos nucleicos descritos en el presente documento son bien conocidos por los expertos y ampliamente utilizados en la técnica. Las reacciones enzimáticas y los métodos de purificación se llevan a cabo según las directrices del fabricante, como es habitual en la técnica, o como se describe en el presente documento.

El término "KD" en esta descripción se refiere a la constante de afinidad (o constante de equilibrio), que se calcula a partir de la relación entre Kd y Ka (es decir, Kd/Ka), y se expresa como una concentración molar (M).

La "afinidad de unión" se refiere generalmente a la fuerza de la suma total de las interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, la "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca (característica, verdadera) que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su pareja de unión Y puede representarse generalmente por la constante de afinidad (KD). El valor Kd preferido es de aproximadamente 200 nM, 150 nM, 100 nM, 60 nM, 50 nM, 40 nM, 30 nM, 20 nM, 10 nM, 8 nM, 6 nM, 4 nM, 2 nM, 1 nM, o menos. La afinidad puede medirse por métodos comunes conocidos en la técnica, incluidos los descritos en la presente descripción. Los anticuerpos de baja afinidad se unen generalmente a un antígeno de forma lenta y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos

de alta afinidad se unen generalmente a un antígeno de forma más rápida y tienden a permanecer unidos durante más tiempo. En la técnica se conocen diversos métodos para medir la afinidad de unión, cualquiera de los cuales puede utilizarse para los fines de la presente invención.

El término "Kd", "koff" o "kdis" se refiere a la constante de velocidad de disociación de una determinada interacción entre una molécula de unión y un antígeno. La constante de velocidad de disociación koff puede medirse mediante interferometría de biocapa, por ejemplo, utilizando el sistema Octet™.

El término "Ka", "kon" o "on-rate" se refiere a la constante de velocidad de asociación.

El término "R^2" se refiere al coeficiente de determinación.

El término "Respuesta" se refiere a la señal de unión del anticuerpo al antígeno.

Tal como se utiliza en la presente descripción y en las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto dicte lo contrario, se entenderá que las palabras "incluye" y "comprende", o variaciones de las mismas como "incluye", "incluyendo", "comprende" o "comprendiendo", implican la inclusión de un número entero o grupo de números enteros indicado, pero no la exclusión de ningún otro número entero o grupo de números enteros.

Descripción detallada de la invención

Anticuerpo quimérico, biespecífico, bivalente

La presente invención se refiere a un anticuerpo quimérico, biespecífico, bivalente .

El anticuerpo según la invención es un anticuerpo monoclonal.

El término "anticuerpo monoclonal" o "mAb" se refiere a un anticuerpo que es sintetizado y aislado por una población clonal separada de células.

El anticuerpo de la invención es un anticuerpo recombinante.

El término "anticuerpo recombinante" se refiere a un anticuerpo que se expresa en una célula o línea celular que comprende secuencia(s) de nucleótidos que codifican anticuerpos, en la que dicha(s) secuencia(s) de nucleótidos no está(n) asociada(s) a la célula en la naturaleza.

El anticuerpo quimérico, biespecífico, bivalente según la invención es un anticuerpo aislado.

El término "aislado" utilizado para describir varios anticuerpos según esta descripción se refiere a un anticuerpo que ha sido identificado y separado y/o regenerado a partir de una célula o cultivo celular, en el que se expresa el anticuerpo. Las impurezas (componentes contaminantes) del entorno natural son materiales que suelen interferir con los usos diagnósticos o terapéuticos del polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. El polipéptido aislado suele prepararse mediante al menos una etapa de purificación.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo quimérico biespecífico bivalente, en el que dicho anticuerpo comprende:

a) una primera cadena ligera y una primera cadena pesada de anticuerpo que se unen específicamente a un primer antígeno;

en el que la primera cadena ligera comprende un dominio variable de cadena ligera y un dominio constante de cadena ligera;

donde la primera cadena pesada comprende un dominio variable de cadena pesada y dominios constantes de cadena pesada del anticuerpo que incluyen un primer dominio constante de cadena pesada (CH1) y un monómero de fragmento Fc que comprende un segundo (CH2) y un tercer dominio constante de cadena pesada (CH3);

b) una segunda cadena ligera y una segunda cadena pesada de anticuerpo que se unen específicamente a un segundo antígeno,

en el que la segunda cadena ligera comprende un dominio variable de cadena ligera y un dominio constante que se selecciona del grupo:

un primer dominio proximal de la membrana del CMH (complejo mayor de histocompatibilidad) o

un primer dominio próximo a la membrana de la proteína similar a CMH;

donde la segunda cadena pesada comprende un dominio variable de cadena pesada, un dominio constante que se selecciona del grupo:

un segundo dominio proximal de la membrana del CMH (complejo mayor de histocompatibilidad) o

un segundo dominio proximal a la membrana de proteína similar a CMH;

y un monómero de fragmento Fc que comprende dominios constantes de cadena pesada segundo (CH2) y tercero (CH3);

en el que el primer dominio próximo a la membrana del CMH o la proteína similar al CMH y el segundo dominio próximo a la membrana del CMH o la proteína similar al CMH forman un heterodímero entre ellos, que se estabiliza mediante un enlace disulfuro;

en el que el dominio CH3 de una cadena pesada y el dominio CH3 de otra cadena pesada entran en contacto entre sí con las superficies de los mismos, que se modifican para formar un anticuerpo quimérico biespecífico, bivalente, siendo dichas modificaciones en los dominios CH3 de la cadena pesada sustituciones para facilitar la heterodimerización.

El heterodímero que está formado por el primer dominio proximal a la membrana de la proteína CMH o similar al CMH y el segundo dominio proximal a la membrana de la proteína CMH o similar al CMH y estabilizado por un medio de enlace disulfuro:

1) un heterodímero que incluye una mutación o mutaciones en el primer y/o segundo dominio proximal de membrana del CMH o de la proteína similar al CMH para formar un enlace S-S (enlace disulfuro, puente de cisteína) entre el primer y el segundo dominio proximal de membrana del CMH o de la proteína similar al CMH;

o

2) un alargamiento del primer dominio proximal de membrana del CMH o de la proteína similar al CMH en uno o más (de 1 a 10) aminoácidos en el extremo C y con Cys terminal en el extremo C para formar un enlace S-S (enlace disulfuro, puente de cisteína) entre el primer dominio proximal de membrana del CMH o de la proteína similar al CMH y la bisagra.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico, biespecífico, bivalente incluye un primer dominio próximo a la membrana de CMH o proteína similar a CMH y un segundo dominio próximo a la membrana de CMH o proteína similar a CMH que forman un heterodímero entre ellos, que se estabiliza mediante un enlace disulfuro por medio de una mutación o mutaciones en el primer y/o segundo dominio próximo a la membrana de CMH o proteína similar a CMH para formar un enlace SS (puente disulfuro

de cisteína) entre el primer y segundo dominio proximal a la membrana de CMH o proteína similar a CMH.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico biespecífico bivalente incluye un primer dominio próximo a la membrana de CMH o proteína similar a CMH y un segundo dominio próximo a la membrana de CMH o proteína similar a CMH que forman un heterodímero entre ellos, que se estabiliza mediante un enlace disulfuro por medio de la elongación del primer dominio proximal a la membrana de CMH o proteína similar a CMH por uno o más (1 a 10) aminoácidos en el extremo C-terminal y con Cys terminal en el extremo C-terminal para formar un enlace S-S (enlace disulfuro, puente de cisteína) entre el primer dominio proximal a la membrana de CMH o proteína similar a CMH y la bisagra.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico incluye un alargamiento del primer dominio próximo a la membrana del CMH o de la proteína similar al CMH, siendo el alargamiento una secuencia de tres aminoácidos GSC.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico biespecífico bivalente comprende:

una primera cadena ligera que comprende un dominio variable de cadena ligera (VL1) y un dominio constante de cadena ligera;

una primera cadena pesada que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH1) y dominios constantes de cadena pesada de anticuerpo que incluyen un primer (CH1) dominio constante de cadena pesada y un monómero de fragmento Fc que comprende un segundo (CH2) y un tercer (CH3) dominio constante de cadena pesada;

una segunda cadena ligera que comprende un dominio variable de cadena ligera (VL2) y un primer dominio próximo a la membrana de CMH o un primer dominio próximo a la membrana de proteína similar a CMH;

una segunda cadena pesada que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH2), un segundo dominio próximo a la membrana de CMH o un segundo dominio próximo a la membrana de la proteína similar a CMH y un monómero de fragmento Fc

que comprende los dominios constantes de cadena pesada segundo (CH2) y tercero (CH3);

en el que el primer dominio proximal de membrana del CMH o de la proteína similar al CMH y el segundo dominio proximal de membrana del CMH o de la proteína similar al CMH forman un heterodímero entre ellos, que se estabiliza mediante un enlace disulfuro por medio de una mutación o mutaciones en el primer y/o segundo dominio de la membrana proximal a CMH o proteína similar a CMH para formar un enlace S-S (puente disulfuro de cisteína) entre el primer y el segundo dominio proximal de membrana del CMH o de la proteína similar al CMH;

en la que entre la primera variante Fc y la segunda variante Fc en el dominio CH3 se forma una estructura de botón en ojal.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico biespecífico bivalente comprende:

una primera cadena ligera que comprende un dominio variable de cadena ligera (VL1) y un dominio constante de cadena ligera;

una primera cadena pesada que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH1) y dominios constantes de cadena pesada de anticuerpo que incluyen un primer (CH1) dominio constante de cadena pesada y un monómero de fragmento Fc que comprende un segundo (CH2) y un tercer (CH3) dominio constante de cadena pesada;

una segunda cadena ligera que comprende un dominio variable de cadena ligera (VL2) y un primer dominio próximo a la membrana de CMH o un primer dominio próximo a la membrana de proteína similar a CMH;

una segunda cadena pesada que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH2), un segundo dominio próximo a la membrana de CMH o un segundo dominio próximo a la membrana de la proteína similar a CMH y un monómero de fragmento Fc que comprende los dominios constantes de cadena pesada segundo (CH2) y tercero (CH3);

en la que entre la primera variante Fc y la segunda variante Fc en el dominio CH3 se forma una estructura de botón en ojal,

en el que el primer dominio proximal a la membrana del CMH o el primer dominio proximal a la membrana de la proteína similar al CMH comprende además un alargamiento del primer dominio proximal a la membrana del CMH o de la proteína similar al CMH en uno o más (de 1 a 10) aminoácidos y en el extremo C con terminal Cys en el extremo C para formar un enlace S-S (enlace disulfuro, puente de cisteína) entre el primer dominio proximal a la membrana del CMH o de la proteína similar al CMH y la bisagra.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico biespecífico bivalente comprende:

una primera cadena ligera que comprende un dominio variable de cadena ligera (VL1) y un dominio constante de cadena ligera;

una primera cadena pesada que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH1) y dominios constantes de cadena pesada de anticuerpo que incluyen un primer (CH1) dominio constante de cadena pesada y un monómero de fragmento Fc que comprende un segundo (CH2) y un tercer (CH3) dominio constante de cadena pesada;

una segunda cadena ligera que comprende un dominio variable de cadena ligera (VL2) y un primer dominio próximo a la membrana de CMH o un primer dominio próximo a la membrana de proteína similar a CMH;

una segunda cadena pesada que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH2), un segundo dominio próximo a la membrana de CMH o un segundo dominio próximo a la membrana de la proteína similar a CMH y un monómero de fragmento Fc que comprende los dominios constantes de cadena pesada segundo (CH2) y tercero (CH3);

en la que entre la primera variante Fc y la segunda variante Fc en el dominio CH3 se forma una estructura de botón en ojal.

en el que el primer dominio proximal a la membrana del CMH o el primer dominio proximal a la membrana de la proteína similar al CMH comprende además un alargamiento del primer dominio proximal de membrana del CMH o de la proteína similar al CMH mediante GSC para formar un enlace S-S (enlace disulfuro, puente de cisteína)

entre el primer dominio proximal a la membrana del CMH o de la proteína similar al CMH y la bisagra.

En el anticuerpo quimérico, bivalente anterior, los dominios variable y constante están dispuestos en las cadenas pesada y ligera en el siguiente orden:

la primera cadena ligera:

1) un dominio variable de la cadena ligera,

2) un dominio constante de la cadena ligera;

la primera cadena pesada del anticuerpo:

1) un dominio variable de cadena pesada,

2) un primer dominio constante de la cadena pesada (CH1),

3) un segundo dominio constante de cadena pesada (CH2) y

4) un tercer dominio constante de la cadena pesada (CH3);

la segunda cadena ligera:

1) un dominio variable de la cadena ligera,

2) un primer dominio proximal de membrana del CMH o un primer dominio proximal de membrana de la proteína similar al CMH;

la segunda cadena pesada del anticuerpo:

1) un dominio variable de cadena pesada,

2) un segundo dominio proximal de membrana del CMH o un segundo dominio proximal de membrana de la proteína similar al CMH,

3) un segundo dominio constante de cadena pesada (CH2) y

4) un tercer dominio constante de la cadena pesada (CH3).

La figura 1 muestra algunas variantes del formato del anticuerpo quimérico, biespecífico, bivalente anterior.

El término "anticuerpo" o "inmunoglobulina" (Ig), tal como se utiliza en la presente descripción, incluye los anticuerpos enteros. El término "anticuerpo" se refiere a una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o una porción de unión al antígeno. Cada cadena pesada comprende una región variable de la cadena pesada (abreviada como VH en la presente descripción) y una región constante de la cadena pesada. Se conocen cinco tipos

de cadenas pesadas de anticuerpos de mamíferos denotados por letras griegas: α, δ, ε, γ y μ. (Janeway C.A., Jr. et al, Immunobiology, 5ª ed., publ. por Garland Publishing, 2001). El tipo de cadena pesada presente define la clase de un anticuerpo; estas cadenas se encuentran en los anticuerpos IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente. (Rhoades R.A., Pflanzer R.G., Human Physiology, 4th ed., publ. by Thomson Learning, 2002). Las distintas cadenas pesadas difieren en tamaño y composición; α y γ contienen aproximadamente 450 aminoácidos, mientras que μ y ε tienen aproximadamente 550 aminoácidos. La región constante es idéntica en todos los anticuerpos del mismo isotipo, pero difiere en los anticuerpos de diferentes isotipos. Las cadenas pesadas γ, α y δ tienen una región constante compuesta por tres dominios constantes CH1, CH2 y CH3 (en línea), y una región bisagra para añadir flexibilidad (Woof J., Burton D., Nat Rev Immunol 4, 2004, cc.89-99); las cadenas pesadas μ y ε tienen una región constante compuesta por cuatro dominios constantes CH1, CH2, CH3 y CH4 (Janeway C.A., Jr. et al, Immunobiology, 5th ed., publ. by Garland Publishing, 2001). En los mamíferos, se conocen sólo dos tipos de cadenas ligeras denotadas por lambda (λ) y kappa (κ). Cada cadena ligera está formada por una región variable de la cadena ligera (abreviada en la presente descripción como VL) y una región constante de la cadena ligera. La longitud aproximada de una cadena ligera es de 211 a 217 aminoácidos. Preferentemente la cadena ligera es una cadena ligera kappa (κ), y el dominio constante CL es preferentemente C kappa (κ).

Los "anticuerpos" según la invención pueden ser de cualquier clase (por ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, preferentemente IgG), o subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2, preferentemente IgG1).

Las regiones VL y VH pueden subdividirse a su vez en regiones de hipervariabilidad denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), situadas entre regiones más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL se compone de tres CDRs y cuatro FRs, dispuestos desde el amino terminal al carboxilo terminal en el siguiente orden FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la

unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del huésped, incluyendo varias células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema clásico del complemento.

El término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo o "fragmento de unión al antígeno" (o simplemente "porción de anticuerpo" o "fragmento de anticuerpo"), tal como se utiliza en esta descripción, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unión específica a un antígeno. Un ejemplo de un fragmento de unión incorporado en el término "porción de unión a antígeno" del anticuerpo incluye un fragmento Fab, es decir, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1 o un fragmento similar a Fab, es decir, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, un primer dominio proximal de membrana de CMH o proteína similar a CMH y un segundo dominio proximal de membrana de CMH o proteína similar a CMH.

Preferiblemente, la CDR de una porción de unión a antígeno, o toda la porción de unión a antígeno de los anticuerpos de la invención se deriva de una biblioteca de donantes de ratón, lama o humanos o sustancialmente de origen humano con ciertos residuos de aminoácidos alterados, por ejemplo, sustituidos con diferentes residuos de aminoácidos para optimizar las propiedades específicas del anticuerpo, por ejemplo, KD, koff, IC50, EC50, ED50. Preferiblemente, las regiones marco del anticuerpo de la invención son de origen humano o sustancialmente de origen humano (al menos 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99% de origen humano).

En otras realizaciones, la porción de unión al antígeno de la invención puede derivarse de otras especies no humanas, incluyendo el ratón, lama, conejo, rata o hámster, entre otros. Alternativamente, la región de unión al antígeno puede derivarse de la especie humana.

El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren mucho en la secuencia entre los anticuerpos. El dominio V funciona de mediador en la unión al antígeno y determina la especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno concreto. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente a lo largo de los 110 aminoácidos de los dominios variables. En cambio,

las regiones V consisten en fragmentos invariables denominados regiones marco (FR) de 15-30 aminoácidos, separados por regiones más cortas de extrema variabilidad denominadas "regiones hipervariables" o CDR. Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina beta, conectadas por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte, de la estructura de lámina beta. Las regiones hipervariables de cada cadena se mantienen unidas en estrecha proximidad por los FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (véase Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest. 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Los dominios constantes no intervienen directamente en la unión del anticuerpo al antígeno, sino que presentan diversas funciones efectoras, como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

El término "región hipervariable" según la presente descripción se refiere a los residuos de aminoácidos del anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende típicamente residuos de aminoácidos de una "región determinante de la complementariedad" o "CDR" y/o aquellos residuos de un "bucle hipervariable".

"Esquema de numeración de Kabat" o "numeración según Kabat", tal como se utiliza en esta solicitud, se refiere al sistema de numeración de los residuos de aminoácidos que son más variables (es decir, hipervariables) que otros residuos de aminoácidos en las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo (Kabat et al. Ann. N.Y. Acad. Sci., 190:382-93 (1971); Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991)).

El anticuerpo de la presente invención "que se une" a un antígeno diana se refiere a un anticuerpo que se une al antígeno con suficiente afinidad como para que el anticuerpo pueda utilizarse como agente diagnóstico y/o terapéutico dirigido a una proteína o célula o tejido que exprese el antígeno, y que reaccione ligeramente de forma cruzada con otras

proteínas. Según los métodos analíticos: clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), radioinmunoanálisis (RIA) o ELISA, en tales realizaciones, el grado de unión del anticuerpo a una proteína no diana es inferior al 10% de la unión del anticuerpo a una proteína diana específica. Con respecto a la unión del anticuerpo a una molécula diana, el término "unión específica" o "se une específicamente a" o "es específico para" un polipéptido particular o un epítopo en un polipéptido diana particular significa una unión que es significativamente (medible) diferente de una interacción no específica.

La unión específica puede medirse, por ejemplo, determinando la unión de una molécula en comparación con la unión de una molécula de control. Por ejemplo, la unión específica puede determinarse por competencia con otra molécula similar a la diana, por ejemplo, un exceso de diana no marcada. En este caso, la unión específica se indica si la unión de la diana marcada a una sonda es inhibida competitivamente por el exceso de diana no marcada. Como se utiliza en la presente descripción, el término "unión específica" o las frases "se une específicamente a" o "es específico para" un polipéptido particular o un epítopo en un polipéptido diana particular puede describirse mediante el ejemplo de una molécula que tiene una Kd para la diana de al menos unos 200 nM, o al menos unos 150 nM, o al menos unos 100 nM, o al menos unos 60 nM o al menos unos 50 nM, o al menos unos 40 nM, o al menos unos 30 nM, o al menos unos 20 nM, o al menos unos 10 nM, o al menos unos 8 nM, o al menos unos 6 nM, o al menos unos 4 nM, o al menos unos 2 nM, o al menos unos 1 nM, o mayor. En una realización, el término "unión específica" se refiere a la unión en la que una molécula se une a un polipéptido o epítopo particular en un polipéptido particular sin unirse sustancialmente a cualquier otro polipéptido o epítopo en un polipéptido.

El término "anticuerpo biespecífico" se refiere a un anticuerpo que tiene dominios de unión a antígenos que son capaces de unirse específicamente a dos epítopos distintos en una sola molécula biológica o capaces de unirse específicamente a epítopos en dos moléculas biológicas distintas. El anticuerpo biespecífico también se denomina aquí como de "doble especificidad" o como anticuerpo de "doble especificidad".

La región cristalizable ("región Fc, Fc") de una inmunoglobulina es la región "cola" de una molécula de inmunoglobulina que interactúa con el receptor Fc de la superficie

celular, así como con algunas proteínas del sistema del complemento. Esta propiedad permite a los anticuerpos activar el sistema inmunitario. En los isotipos IgG, IgA e IgD, la región Fc está compuesta por dos fragmentos proteicos idénticos, respectivamente, del segundo y tercer dominio constante de las dos cadenas pesadas; en los isotipos IgM e IgE, el Fc contiene tres dominios constantes de cadena pesada (dominios CH2, CH3 y CH4) en cada cadena polipeptídica.

Por "monómero de fragmentos Fc" se entiende una región Fc de los dominios constantes segundo y tercero de una de las dos cadenas pesadas (para los isotipos IgG, IgA e IgD); para los isotipos IgM e IgE, el monómero Fc comprende tres dominios constantes de una de las dos cadenas pesadas (dominios CH2, CH3 y CH4).

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico biespecífico bivalente comprende:

una primera cadena ligera que comprende un dominio variable de cadena ligera (VL1) y un dominio constante de cadena ligera;

una primera cadena pesada que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH1) y dominios constantes de cadena pesada de anticuerpo que incluyen un primer (CH1) dominio constante de cadena pesada y un monómero de fragmento Fc que comprende un segundo (CH2) y un tercer (CH3) dominio constante de cadena pesada;

una segunda cadena ligera que comprende un dominio variable de cadena ligera (VL2) y un primer dominio próximo a la membrana de CMH o un primer dominio próximo a la membrana de proteína similar a CMH;

una segunda cadena pesada que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH2), un segundo dominio próximo a la membrana de CMH o un segundo dominio próximo a la membrana de la proteína similar a CMH y un monómero de fragmento Fc que comprende los dominios constantes de cadena pesada segundo (CH2) y tercero (CH3);

y en la que entre la primera variante Fc y la segunda variante Fc en el dominio CH3 se forma una estructura de botón en ojal,

y entre el segundo dominio proximal de membrana del CMH y/o el segundo dominio proximal de membrana de la proteína similar al CMH y la bisagra se inserta otro conector peptídico.

El término "conector peptídico", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier péptido que tenga la capacidad de combinar dominios, con una longitud que depende de los dominios a los que se une, y que comprende cualquier secuencia de aminoácidos. Preferentemente, el conector peptídico tiene una longitud de 4 aminoácidos o más y consiste en cualquier conjunto de aminoácidos seleccionados entre G, A, S, P, E, T, D, K.

El CMH (complejo mayor de histocompatibilidad) se refiere a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad que es el componente central del sistema inmunitario de los vertebrados, presente en la superficie de todas las células nucleares. Existen dos formas principales de CMH, en particular las CMH de clase I y II.

Las proteínas similares a CMH se refieren a las proteínas que tienen una similitud estructural con la parte extracelular de las moléculas CMH de clase I o CMH de clase II. En particular, las proteínas similares a CMH son, por ejemplo, la proteína CD1 (grupo de diferenciación 1) o la proteína HFE (proteína de la hemocromatosis hereditaria).

La similitud estructural general entre las moléculas CMH I, II, CD1 y HFE es evidente. Esto incluye la uniformidad de la organización espacial de toda la molécula, el número de dominios (cuatro), la similitud estructural de los dominios proximales a la membrana del CMH y de las proteínas similares al CMH, así como el sitio de unión al antígeno, pesos moleculares similares.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico comprende un primer dominio proximal a la membrana del CMH, que puede seleccionarse de un grupo que comprende:

un primer dominio próximo a la membrana CMH clase I (complejo mayor de histocompatibilidad clase I),

un primer dominio próximo a la membrana CMH clase II (complejo mayor de histocompatibilidad clase II),

una variante modificada de un primer dominio próximo a la membrana CMH clase I o

una variante modificada de un primer dominio próximo a la membrana CMH de clase II.

En los seres humanos, los genes clásicos del CMH I se denominan HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F o HLA-G. Las moléculas de clase I están formadas por dos cadenas polipeptídicas: una cadena α polimórfica (a veces denominada cadena pesada) y una cadena más pequeña denominada microglobulina β2 (también conocida como cadena ligera), que generalmente no es polimórfica. Estas dos cadenas forman un heterodímero no covalente en la superficie celular. La cadena α contiene tres dominios (α1, α2 y α3). El exón 1 del gen de la cadena α codifica la secuencia líder, los exones 2 y 3 codifican los dominios α1 y α2, el exón 4 codifica el dominio α3, el exón 5 codifica el dominio transmembrana y los exones 6 y 7 codifican la cola citoplasmática. La cadena α forma una región de unión a péptidos que incluye los dominios α1 y α2.

Al dominio α2 le sigue el dominio α3 situado en el extremo C de la porción extracelular de la cadena α del CMH I y forma junto con la microglobulina β2 un complejo heterodimérico no covalente. Dicho complejo heterodimérico no covalente compuesto por el dominio α3 del CMH I y la microglobulina β2 se denomina en la descripción de la presente invención heterodímero basado en los dominios proximales de membrana del CMH I.

Las moléculas CMH de clase I se expresan en todas las células nucleadas, incluidas las tumorales. Se expresan específicamente, entre otros, en los linfocitos T y B, los macrófagos, las células dendríticas y los neutrófilos, y su función es presentar fragmentos de péptidos (normalmente de 8 a 10 aminoácidos de longitud) en la superficie de los CD8+ a los linfocitos T citotóxicos (CTL).

En los seres humanos, los genes CMH II clásicos se denominan HLA-DM, HLA-DO, HLA-DP, HLA-DQ o HLA-DR. Las moléculas CMH de clase II son heterodímeros compuestos por cadenas alfa y beta unidas de forma no covalente. La porción extracelular de cada una de las cadenas consta de dos dominios (α1 (alfa1), α2 (alfa2) y β1 (beta1), β2 (beta2), respectivamente) y está conectada por un péptido corto con un segmento

transmembrana (de aproximadamente 30 residuos de aminoácidos). Al segmento transmembrana le sigue el dominio citoplasmático que contiene aproximadamente 10-15 residuos.

La región de unión al antígeno de las moléculas del CMH de clase II está formada por secciones alfa-helicoidales de cadenas que interactúan de forma similar a las moléculas de clase I, salvo por lo siguiente: el surco de unión al antígeno de las moléculas del CMH de clase II no está formado por dos dominios de una sola cadena alfa, sino por dos dominios de cadenas distintas, los dominios α1 y β1.

Al dominio α1 le sigue el dominio α2, que forma un complejo heterodimérico no covalente con el dominio β2. Dicho complejo heterodimérico no covalente compuesto por el dominio α2 del CMH II y el dominio β2 del CMH II se denomina en la descripción de la presente invención heterodímero basado en los dominios proximales de membrana del CMH II.

En la estructura de las moléculas del CMH de clase II, el surco de unión al antígeno es más abierto que el de las moléculas del CMH de clase I y, por tanto, receptivo a péptidos más largos.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico comprende un segundo dominio proximal a la membrana del CMH, que puede seleccionarse de un grupo que comprende:

un segundo dominio próximo a la membrana CMH clase I (complejo mayor de histocompatibilidad clase I),

un segundo dominio próximo a la membrana CMH clase II (complejo mayor de histocompatibilidad clase II),

una variante modificada de un segundo dominio próximo a la membrana CMH clase I o

una variante modificada de un segundo dominio próximo a la membrana CMH de clase II.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico comprende un dominio próximo a la membrana del CMH humano de clase I.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico comprende un dominio próximo a la membrana del CMH humano de clase II.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico comprende un primer dominio proximal a la membrana del CMH, que puede seleccionarse de un grupo que comprende:

un primer dominio próximo a la membrana CMH clase I (complejo mayor de histocompatibilidad clase I),

un primer dominio próximo a la membrana CMH clase II (complejo mayor de histocompatibilidad clase II),

una variante modificada de un primer dominio próximo a la membrana CMH clase I o

una variante modificada de un primer dominio próximo a la membrana CMH de clase II,

y

un segundo dominio proximal de membrana del CMH que puede seleccionarse de entre un grupo que incluye:

un segundo dominio próximo a la membrana CMH clase I (complejo mayor de histocompatibilidad clase I),

un segundo dominio próximo a la membrana CMH clase II (complejo mayor de histocompatibilidad clase II),

una variante modificada de un segundo dominio próximo a la membrana CMH clase I o

una variante modificada de un segundo dominio próximo a la membrana CMH de clase II.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico biespecífico bivalente comprende:

un primer dominio proximal de membrana del CMH que es un primer dominio proximal de membrana del CMH clase I (complejo mayor de histocompatibilidad clase I),

y

un segundo dominio proximal de membrana del CMH que es un segundo dominio proximal de membrana del CMH clase I (complejo mayor de histocompatibilidad clase I).

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico biespecífico bivalente comprende:

un primer dominio proximal de membrana del CMH que es un primer dominio proximal de membrana del CMH clase II (complejo mayor de histocompatibilidad clase II),

y

un segundo dominio proximal de membrana del CMH que es un segundo dominio proximal de membrana del CMH clase II (complejo mayor de histocompatibilidad clase II).

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico biespecífico bivalente comprende:

un primer dominio proximal de membrana del CMH que es una variante modificada de un primer dominio proximal de membrana del CMH de clase I,

y

un segundo dominio proximal de membrana del CMH que es una variante modificada de un segundo dominio proximal de membrana del CMH de clase I.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico biespecífico bivalente comprende:

un primer dominio proximal de membrana del CMH que es una variante modificada de un primer dominio proximal de membrana del CMH de clase II,

y

un segundo dominio proximal de membrana del CMH que es una variante modificada de un segundo dominio proximal de membrana del CMH de clase II.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico biespecífico bivalente comprende:

un primer dominio proximal de membrana del CMH que es un primer dominio proximal de membrana del CMH clase I (complejo mayor de histocompatibilidad clase I),

y

un segundo dominio proximal de membrana del CMH que es una variante modificada de un segundo dominio proximal de membrana del CMH de clase I.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico biespecífico bivalente comprende:

un primer dominio proximal de membrana del CMH que es una variante modificada de un primer dominio proximal de membrana del CMH de clase I,

y

un segundo dominio proximal de membrana del CMH que es un segundo dominio proximal de membrana del CMH clase I (complejo mayor de histocompatibilidad clase I).

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico biespecífico bivalente comprende:

un primer dominio proximal de membrana del CMH que es un primer dominio proximal de membrana del CMH clase II (complejo mayor de histocompatibilidad clase II),

y

un segundo dominio proximal de membrana del CMH que es una variante modificada de un segundo dominio proximal de membrana del CMH de clase II.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico biespecífico bivalente comprende:

un primer dominio proximal de membrana del CMH que es una variante modificada de un primer dominio proximal de membrana del CMH de clase II,

y

un segundo dominio proximal de membrana del CMH que es un segundo dominio proximal de membrana del CMH clase II (complejo mayor de histocompatibilidad clase II).

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico comprende un dominio próximo a la membrana del CMH de clase II, que se selecciona del grupo: HLA-DM, HLA-DO, HLA-DP, HLA-DQ o HLA-DR.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico comprende un dominio próximo a la membrana del CMH de clase I, que se selecciona del grupo: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F or HLA-G.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico comprende un dominio próximo a la membrana de una proteína humana similar al CMH.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico comprende un primer dominio proximal a la membrana de una proteína similar al CMH, que puede seleccionarse de un grupo que comprende:

un primer dominio proximal a la membrana de CD1 (grupo de diferenciación 1),

un primer dominio proximal a la membrana de HFE (proteína de hemocromatosis),

una variante modificada de un primer dominio proximal a la membrana de CD1 o

una variante modificada de un primer dominio proximal a la membrana de HFE.

CD1 (grupo de diferenciación 1) se refiere a una molécula del grupo de diferenciación 1 que es un componente del sistema inmunitario localizado en la superficie de varias células presentadoras de antígenos, como las células dendríticas, los macrófagos y otras células. Al igual que las clases I y II del CMH, la CD1 presenta antígenos para su reconocimiento por parte de las células T mediante la interacción con el receptor de células T. A diferencia de las clases I y II del CMH, las proteínas CD1 presentan lípidos y sus derivados en lugar de péptidos.

La pluralidad de variantes de CD1 encontradas en los humanos se divide en 5 grupos: CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CD1e, que difieren en la estructura del fragmento de unión al antígeno y, en consecuencia, en la especificidad por lípidos de diferentes estructuras. Las proteínas del grupo CD1e, a diferencia de las proteínas de otros grupos, no se expresan en la superficie celular, sino que son solubles y son responsables del transporte de lípidos (Kaczmarek, R., Pasciak, M., Szymczak-Kulus, K., & Czerwinski,

M. (2017). CD1: A Singed Cat of the Three Antigen Presentation Systems. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, *65*(3), 201–214).

Las moléculas CD1 tienen una estructura similar a la del CMH de clase I. De forma parecida, una molécula CD1 es un complejo no covalente formado por dos cadenas polipeptídicas: una cadena α polimórfica (a veces denominada cadena pesada) y una cadena más pequeña denominada microglobulina β2 (también conocida como cadena ligera), que generalmente no es polimórfica.

La cadena α forma una región de unión al antígeno que comprende los dominios α1 y α2. Al dominio α2 le sigue el dominio α3 situado en el extremo C de la porción extracelular de la cadena α de la CD1 y forma junto con la microglobulina β2 un complejo heterodimérico no covalente. Dicho complejo heterodimérico no covalente compuesto por el dominio α3 del CD1 y la microglobulina β2 se denomina en la descripción de la presente invención heterodímero basado en los dominios proximales de membrana de proteínas similares al CMH.

HFE (proteína de la hemocromatosis hereditaria) se refiere a una molécula de proteína de la hemocromatosis. El locus del gen HFE humano está situado en el cromosoma 6 y consta de 5 exones y 4 intrones. La proteína de la hemocromatosis es una proteína de membrana asociada a la microglobulina β2, es responsable de la regulación de la absorción de hierro a través de la regulación de la interacción del receptor transferrina-transferrina. Las mutaciones en el gen HFE dan lugar a la hemocromatosis, una patología recesiva relacionada con el metabolismo del hierro y asociada a la acumulación de hierro en varios órganos. La molécula HFE tiene una estructura idéntica a la del CMH de clase I. Una molécula HFE es un complejo no covalente formado por dos cadenas polipeptídicas: una cadena α polimórfica (a veces denominada cadena pesada) y una cadena más pequeña denominada microglobulina β2 (también conocida como cadena ligera), que generalmente no es polimórfica.

La cadena α incluye los dominios α1, α2 y α3. El dominio α3 sigue al dominio α2 y está situado en el extremo C de la porción extracelular de la cadena α del HFE y forma con la microglobulina β2 un complejo heterodimérico no covalente. Dicho complejo heterodimérico no covalente compuesto por el dominio α3 del HFE y la microglobulina

β2 se denomina en la descripción de la presente invención heterodímero basado en los dominios proximales de membrana de proteínas similares al CMH.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico comprende un segundo dominio proximal a la membrana de una proteína similar al CMH, que puede seleccionarse de un grupo que comprende:

un segundo dominio proximal a la membrana de CD1 (grupo de diferenciación 1),

un segundo dominio proximal a la membrana de HFE (proteína de hemocromatosis),

una variante modificada de un segundo dominio proximal a la membrana de CD1 o

una variante modificada de un segundo dominio proximal a la membrana de HFE.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico biespecífico bivalente comprende:

un primer dominio proximal a la membrana de la proteína similar al CMH que puede seleccionarse de un grupo que comprende:

un primer dominio proximal a la membrana de CD1 (grupo de diferenciación 1),

un primer dominio proximal a la membrana de HFE (proteína de hemocromatosis),

una variante modificada de un primer dominio proximal a la membrana de CD1 o

una variante modificada de un primer dominio proximal a la membrana de HFE,

y

un segundo dominio proximal a la membrana de la proteína similar al CMH que puede seleccionarse del grupo que comprende:

un segundo dominio proximal a la membrana de CD1 (grupo de diferenciación 1),

un segundo dominio proximal a la membrana de HFE (proteína de hemocromatosis),

una variante modificada de un segundo dominio proximal a la membrana de CD1 o

una variante modificada de un segundo dominio proximal a la membrana de HFE.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico biespecífico bivalente comprende:

un primer dominio proximal de membrana de la proteína similar al CMH, que es un primer dominio proximal de membrana de la CD1,

y

un segundo dominio proximal de membrana de la proteína similar al CMH, que es un segundo dominio proximal de membrana de la CD1.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico biespecífico bivalente comprende:

un primer dominio proximal de membrana de la proteína similar al CMH, que es un primer dominio proximal de membrana de HFE,

y

un segundo dominio proximal de membrana de la proteína similar al CMH, que es un segundo dominio proximal de membrana de HFE.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico biespecífico bivalente comprende:

un primer dominio proximal de membrana de la proteína similar al CMH, que es una variante modificada del primer dominio proximal de membrana de la CD1,

y

un segundo dominio proximal de membrana de la proteína similar al CMH, que es una variante modificada del segundo dominio proximal de membrana de la CD1.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico biespecífico bivalente comprende:

un primer dominio proximal de membrana de la proteína similar al CMH, que es una variante modificada del primer dominio proximal de membrana de HFE,

y

un segundo dominio proximal de membrana de la proteína similar al CMH, que es una variante modificada del segundo dominio proximal de membrana de HFE.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico biespecífico bivalente comprende:

un primer dominio proximal de membrana de la proteína similar al CMH, que es un primer dominio proximal de membrana de la CD1,

y

un segundo dominio proximal de membrana de la proteína similar al CMH, que es una variante modificada del segundo dominio proximal de membrana de la CD1.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico biespecífico bivalente comprende:

un primer dominio proximal de membrana de la proteína similar al CMH, que es una variante modificada del primer dominio proximal de membrana de la CD1,

y

un segundo dominio proximal de membrana de la proteína similar al CMH, que es un segundo dominio proximal de membrana de la CD1.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico biespecífico bivalente comprende:

un primer dominio proximal de membrana de la proteína similar al CMH, que es un primer dominio proximal de membrana de HFE,

y

un segundo dominio proximal de membrana de la proteína similar al CMH, que es una variante modificada del segundo dominio proximal de membrana de HFE.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico biespecífico bivalente comprende:

un primer dominio proximal de membrana de la proteína similar al CMH, que es una variante modificada del primer dominio proximal de membrana de HFE,

y

un segundo dominio proximal de membrana de la proteína similar al CMH, que es un segundo dominio proximal de membrana de HFE.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico comprende un dominio proximal a la membrana de CD1, que se selecciona del grupo: CD1a, CD1b, CD1c, CD1d o CD1e.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico incluye un fragmento variable de la segunda cadena ligera (VL), que está separado de un primer dominio proximal de membrana del CMH o de la proteína similar

al CMH por un conector de 1 a 25 aminoácidos de longitud, y/o un fragmento variable de la segunda cadena pesada (VH), que está separado de un segundo dominio proximal de membrana del CMH o de la proteína similar al CMH por un conector de 1 a 25 aminoácidos de longitud.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico biespecífico bivalente comprende:

a) el dominio CH3 de una cadena pesada se modifica de modo que en la superficie del dominio CH3 de una cadena pesada en contacto con la superficie del dominio CH3 de otra cadena pesada en el anticuerpo biespecífico bivalente, el residuo de aminoácido se sustituye por un residuo de aminoácido que tiene un mayor volumen de cadena lateral, lo que conduce a la formación de un botón (knob) en la superficie del dominio CH3 de una cadena pesada que puede encajar en un orificio en la superficie del dominio CH3 de otra cadena pesada,

y

b) el dominio CH3 de otra cadena pesada se modifica de modo que en la superficie del dominio CH3 de la segunda cadena pesada en contacto con la superficie del dominio CH3 de la primera cadena pesada en el anticuerpo biespecífico bivalente, el residuo de aminoácido se sustituye por un residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral menor, lo que da lugar a la formación de un orificio en la superficie del dominio CH3 de la segunda cadena pesada que puede aceptar un botón (knob) en la interfaz del dominio CH3 de la primera cadena pesada;

en el que dicho residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más grande se selecciona de un grupo que incluye arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W),

y en el que dicho residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño se selecciona de un grupo que incluye alanina (A), serina (S), treonina (T), valina (V).

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico comprende un dominio constante de la primera cadena ligera del anticuerpo, que se selecciona de CK o CL.

En los mamíferos, se conocen sólo dos tipos de cadenas ligeras denotadas por lambda (λ) y kappa (κ). El dominio constante de la cadena ligera lambda se denomina CL, y el de la cadena ligera kappa, CK.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico comprende dominios CH3 del anticuerpo que se modifican además mediante la introducción de cisteína (C) como aminoácido en las posiciones correspondientes de cada dominio CH3 de manera que se pueda formar un puente disulfuro entre ambos dominios CH3.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo bivalente biespecífico comprende un dominio CH3 de una cadena pesada, que se modifica para formar un botón (kKnob), y un dominio CH3 de otra cadena pesada, que se modifica para formar un orificio (Hole), o viceversa.

"Botones en ojales" (interacciones del tipo "botones en ojales") es un enfoque que permite sortear el problema asociado a los subproductos mal reparados. Este enfoque pretende forzar el emparejamiento de dos cadenas pesadas de anticuerpos diferentes introduciendo mutaciones en los dominios CH3 para modificar las interfaces de contacto. En una cadena, los aminoácidos voluminosos fueron sustituidos por aminoácidos con cadenas laterales cortas para crear un "hole". A la inversa, se introdujeron aminoácidos con grandes cadenas laterales en el otro dominio CH3 para crear un "knob". La coexpresión de estas dos cadenas pesadas produjo un alto rendimiento de la formación del heterodímero ("knob-hole") en relación con la formación del homodímero ("hole-hole" o "knob-knob") (WO9627011 y WO9850431, así como Merchant AM ET ALL., An efficient route to human bispecific IgG, Nat Biotechnol. 1998 Jul;16(7):677-81).

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico comprende un dominio CH3 de una cadena pesada, que tiene sustituciones de aminoácidos S354C/T366W, y un dominio CH3 de otra cadena pesada, que tiene sustituciones de aminoácidos Y349C/T366S/L368A/Y407V.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico incluye un dominio CH3 de una cadena pesada, que tiene sustituciones de

aminoácidos Y349C/T366S/L368A/Y407, y un dominio CH3 de otra cadena pesada, que tiene sustituciones de aminoácidos S354C/T366W.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico incluye un primer dominio proximal a la membrana del CMH y un segundo dominio proximal a la membrana del CMH que son el dominio α2 del CMH I y el dominio β2 del CMH II, respectivamente, y forman un heterodímero entre ellos.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico incluye un primer dominio proximal a la membrana del CMH y un segundo dominio proximal a la membrana del CMH que son el dominio β2 del CMH II y el dominio α2 del CMH II, respectivamente, y forman un heterodímero entre ellos.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico comprende el dominio α2 del CMH II que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo: SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36 o SEQ ID NO: 38, y el dominio β2 del CMH II que tiene la secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo: SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37 o SEQ ID NO: 39.

SEQ ID NO: 30 es una secuencia de aminoácidos del dominio α2 proximal a la membrana del CMH clase II HLA-DM (HLA-DMA*01:01:01:01).

La SEQ ID NO: 31 es una secuencia de aminoácidos del dominio β2 membrana-proximal del CMH clase II HLA-DM (HLA-DMB*01:01:01:01).

SEQ ID NO: 32 es una secuencia de aminoácidos del dominio α2 proximal a la membrana del CMH clase II HLA-DO (HLA-DOA*01:01:01).

SEQ ID NO: 33 es una secuencia de aminoácidos del dominio β2 proximal a la membrana del CMH clase II HLA-DO (HLA-DOB*01:01:01:01).

SEQ ID NO: 34 es una secuencia de aminoácidos del dominio α2 proximal a la membrana del CMH clase II HLA-DP (HLA-DPA1*01:03:01:01).

La SEQ ID NO: 35 es una secuencia de aminoácidos del dominio β2 proximal a la membrana del CMH clase II HLA-DP (HLA-DPB1*01:01:01:01).

La SEQ ID NO: 36 es una secuencia de aminoácidos del dominio α2 proximal a la membrana del CMH clase II HLA-DQ (HLA-DQA1*01:01:01:01).

La SEQ ID NO: 37 es una secuencia de aminoácidos del dominio β2 proximal de membrana del CMH clase II HLA-DQ (HLA-DQB1*05:01:01:01).

SEQ ID NO: 38 es una secuencia de aminoácidos del dominio α2 proximal a la membrana del CMH 2 clase II HLA-DR (HLA-DRA*01:01:01:01).

La SEQ ID NO: 39 es una secuencia de aminoácidos del dominio β2 membrana-proximal del CMH clase HLA-DR (HLA-DRB1*01:01:01:01).

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico incluye un primer dominio proximal a la membrana del CMH y un segundo dominio proximal a la membrana del CMH que son una variante modificada del dominio α2 del CMH II y una variante modificada del dominio β2 del CMH II, respectivamente, y forman un heterodímero entre ellos.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico incluye un primer dominio proximal a la membrana del CMH y un segundo dominio proximal a la membrana del CMH que son una variante modificada del dominio β2 del CMH II y que son una variante modificada del dominio α2 del CMH II, respectivamente, y forman un heterodímero entre ellos.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico incluye un primer dominio proximal a la membrana del CMH y un segundo dominio proximal a la membrana del CMH que son el dominio α3 del CMH I y la microglobulina β2 (β2M), respectivamente, y forman un heterodímero entre ellos.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico incluye un primer dominio proximal a la membrana del CMH y un segundo dominio proximal a la membrana del CMH que son la microglobulina β2 (β2M) y el dominio α3 del CMH I, respectivamente, y forman un heterodímero entre ellos.

La β2 microglobulina es una proteína no glicosilada de 12 kDa; una de sus funciones es estabilizar la cadena α del CMH clase I, así como las proteínas CD1 y HFE. La β2 microglobulina humana dentro de las proteínas anteriores tiene una estructura prácticamente idéntica y, por lo tanto, en la descripción de la presente invención, se menciona la microglobulina β2 humana sin indicar la proteína de la que forma parte.

A diferencia de la cadena α, la microglobulina β2 no atraviesa la membrana. El locus de la microglobulina β2 humana está situado en el cromosoma 15. El gen de la microglobulina β2 consta de 4 exones y 3 intrones.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico comprende el dominio α3 del CMH I que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NO: 1 a 29, y microglobulina β2 (β2M) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46.

SEQ ID NO: 1 es una secuencia de aminoácidos del dominio α3 proximal a la membrana del CMH clase I HLA-A (alelo A*01:01:01:01).

SEQ ID NO: 2 es una secuencia de aminoácidos del dominio α3 proximal a la membrana del CMH clase I HLA-A (A*02:01:01:01).

SEQ ID NO: 3 es una secuencia de aminoácidos del dominio α3 proximal a la membrana del CMH clase I HLA-A (A*03:01:01:01).

SEQ ID NO: 4 es una secuencia de aminoácidos del dominio α3 proximal a la membrana del CMH clase I HLA-A (A*11:01:01:01).

SEQ ID NO: 5 es una secuencia de aminoácidos del dominio α3 proximal a la membrana del CMH clase I HLA-A (A*23:01:01:01).

SEQ ID NO: 6 es una secuencia de aminoácidos del dominio α3 proximal a la membrana del CMH clase I HLA-B (B*07:02:01:01).

SEQ ID NO: 7 es una secuencia de aminoácidos del dominio α3 proximal a la membrana del CMH clase I HLA-B (B*08:01:01:01).

SEQ ID NO: 8 es una secuencia de aminoácidos del dominio α3 proximal a la membrana del CMH clase I HLA-B (B*13:01:01:01).

SEQ ID NO: 9 es una secuencia de aminoácidos del dominio α3 proximal a la membrana del CMH clase I HLA-B (B*14:01:01:01).

SEQ ID NO: 10 es una secuencia de aminoácidos del dominio α3 proximal a la membrana del CMH clase I HLA-B (B*15:01:01:01).

SEQ ID NO: 11 es una secuencia de aminoácidos del dominio α3 proximal a la membrana del CMH clase I HLA-C (C*01:02:01:01).

La SEQ ID NO: 12 es una secuencia de aminoácidos del dominio α3 proximal a la membrana del CMH clase I HLA-C (C*03:02:01).

SEQ ID NO: 13 es una secuencia de aminoácidos del dominio α3 proximal a la membrana del CMH clase I HLA-C (C*04:01:01:01).

SEQ ID NO: 14 es una secuencia de aminoácidos del dominio α3 proximal a la membrana del CMH clase I HLA-C (C*05:01:01:01).

SEQ ID NO: 15 es una secuencia de aminoácidos del dominio α3 proximal a la membrana del CMH clase I HLA-C (C*06:02:01:01).

SEQ ID NO: 16 es una secuencia de aminoácidos del dominio α3 proximal a la membrana del CMH clase I HLA-E (E*01:01:01:01).

SEQ ID NO: 17 es una secuencia de aminoácidos del dominio α3 proximal a la membrana del CMH clase I HLA-E (E*01:03:01:01).

SEQ ID NO: 18 es una secuencia de aminoácidos del dominio α3 proximal a la membrana del CMH clase I HLA-E (E*01:05).

La SEQ ID NO: 19 es una secuencia de aminoácidos del dominio α3 proximal a la membrana del CMH clase I HLA-E (E*01:06).

La SEQ ID NO: 20 es una secuencia de aminoácidos del dominio α3 proximal a la membrana del CMH clase I HLA-E (E*01:09).

SEQ ID NO: 21 es una secuencia de aminoácidos del dominio α3 proximal a la membrana del CMH clase I HLA-F (F*01:01:01:01).

SEQ ID NO: 22 es una secuencia de aminoácidos del dominio α3 proximal a la membrana del CMH clase I HLA-F (F*01:02).

SEQ ID NO: 23 es una secuencia de aminoácidos del dominio α3 proximal a la membrana del CMH clase I HLA-F (F*01:03:01:01).

SEQ ID NO: 24 es una secuencia de aminoácidos del dominio α3 proximal a la membrana del CMH clase I HLA-F (F*01:04:01:01).

SEQ ID NO: 25 es una secuencia de aminoácidos del dominio α3 proximal a la membrana del CMH clase I HLA-F (F*01:05).

SEQ ID NO: 26 es una secuencia de aminoácidos del dominio α3 proximal a la membrana del CMH clase I HLA-G (G*01:01:01:01).

SEQ ID NO: 27 es una secuencia de aminoácidos del dominio α3 proximal a la membrana del CMH clase I HLA-G (G*01:03:01:01).

SEQ ID NO: 28 es una secuencia de aminoácidos del dominio α3 proximal a la membrana del CMH clase I HLA-G (G*01:04:01:01).

SEQ ID NO: 29 es una secuencia de aminoácidos del dominio α3 proximal a la membrana del CMH clase I HLA-G (G*01:06).

SEQ ID NO: 46 es una secuencia de aminoácidos de la microglobulina universal β2 (β2M) del CMH clase I o de las proteínas similares al CMH (CD1, HFE).

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico incluye un primer dominio proximal a la membrana del CMH y un segundo dominio proximal a la membrana del CMH que son una variante modificada del dominio α3 del CMH I y una variante modificada de la microglobulina β2 (β2M), respectivamente, y forman un heterodímero entre ellos.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico incluye un primer dominio proximal de membrana del CMH y un segundo dominio proximal de membrana del CMH que son una variante modificada de la microglobulina β2 (β2M) y una variante modificada del dominio α3 del CMH I, respectivamente, y forman un heterodímero entre ellos.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico comprende una variante modificada de la microglobulina β2 (β2M) que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona de SEQ ID NO: 47 o SEQ ID NO: 48.

La SEQ ID NO:47 es una secuencia de aminoácidos de la microglobulina universal β2 (β2M) del CMH clase I o de las proteínas similares al CMH (CD1, HFE) con la mutación R12C (el puente SS está dentro de la unidad).

SEQ ID NO: 48 es una secuencia de aminoácidos de la microglobulina universal β2 (β2M) del CMH clase I o de proteínas similares al CMH (CD1, HFE) con la mutación R12C (el puente SS está dentro de la unidad) + bisagra con la mutación C220A (el puente SS se ha eliminado del extremo C de la unidad y se ha trasladado al interior de la misma).

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico incluye un primer dominio proximal a la membrana de la proteína similar a

CMH y un segundo dominio proximal a la membrana de la proteína similar a CMH que son el dominio α3 del CMH I y la microglobulina β2 (β2M), respectivamente, y forman un heterodímero entre ellos.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico incluye un primer dominio proximal a la membrana de la proteína similar a CMH y un segundo dominio proximal de membrana de la proteína similar a CMH que son la microglobulina β2 (β2M) y el dominio α3 de CD1, respectivamente, y forman un heterodímero entre ellos.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico comprende el dominio α3 del CD1 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NO: 40 a 44, y la microglobulina β2 (β2M) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46.

SEQ ID NO: 40 es una secuencia de aminoácidos del dominio α3 proximal a la membrana de CD1a.

SEQ ID NO: 41 es una secuencia de aminoácidos del dominio α3 proximal a la membrana de CD1b.

SEQ ID NO: 42 es una secuencia de aminoácidos del dominio α3 proximal a la membrana de CD1c.

SEQ ID NO: 43 es una secuencia de aminoácidos del dominio α3 proximal a la membrana de CD1d.

SEQ ID NO: 44 es una secuencia de aminoácidos del dominio α3 proximal a la membrana de CD1e.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico incluye un primer dominio proximal a la membrana de la proteína similar a CMH y un segundo dominio proximal a la membrana de la proteína similar a CMH que son una variante modificada del dominio α3 del CD1 y una variante modificada de la microglobulina β2 (β2M), respectivamente, y forman un heterodímero entre ellos.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico incluye un primer dominio proximal a la membrana de la proteína similar a CMH y un segundo dominio proximal a la membrana de la proteína similar a CMH que

son una variante modificada de la microglobulina β2 (β2M) y una variante modificada del dominio α3 del CD1, respectivamente, y forman un heterodímero entre ellos.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico comprende una variante modificada del dominio α3 de CD1 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NO: 49 a 56 o SEQ ID NO: 109, y una variante modificada de la microglobulina β2 (β2M) que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 47 o SEQ ID NO: 48.

SEQ ID NO: 49 es una secuencia de aminoácidos del dominio α3 proximal a la membrana de CD1b con la mutación N57C (un puente SS adicional dentro de la unidad) y un alargamiento de 3 aminoácidos GSC en el extremo C.

SEQ ID NO: 50 es una secuencia de aminoácidos del dominio α3 proximal a la membrana de CD1b con la mutación N57C (el puente SS está dentro de la unidad) y un alargamiento de 2 aminoácidos GS en el extremo C (el puente SS se ha eliminado del extremo C de la unidad y se ha transferido al interior de la misma).

SEQ ID NO: 51 es una secuencia de aminoácidos del dominio α3 proximal a la membrana de CD1b con la mutación N59A (sustitución en el sitio de N-glicosilación previsto) y un alargamiento de 3 aminoácidos GSC en el extremo C.

SEQ ID NO: 52 es una secuencia de aminoácidos del dominio α3 proximal a la membrana de CD1b con la mutación N59D (sustitución en el sitio de N-glicosilación previsto) y un alargamiento de 3 aminoácidos GSC en el extremo C.

SEQ ID NO: 53 es una secuencia de aminoácidos del dominio α3 proximal a la membrana de CD1b con las mutaciones N57C, N59A y un alargamiento de 3 aminoácidos GSC en el extremo C (el puente SS adicional está dentro de la unidad + se ha eliminado el sitio de N-glicosilación previsto).

SEQ ID NO: 54 es una secuencia de aminoácidos del dominio α3 proximal a la membrana de CD1b con las mutaciones N57C, N59D y un alargamiento de 3 aminoácidos GSC en extremo C (el puente SS adicional está dentro de la unidad + se ha eliminado el sitio de N-glicosilación previsto).

SEQ ID NO: 55 es una secuencia de aminoácidos del dominio α3 proximal a la membrana de CD1b con las mutaciones N57C, N59A y un alargamiento de 2 aminoácidos

GS en extremo C (el puente SS se ha trasladado al interior de la unidad + se ha eliminado el sitio de N-glicosilación previsto).

SEQ ID NO: 56 es una secuencia de aminoácidos del dominio α3 proximal a la membrana de CD1b con las mutaciones N57C, N59D y un alargamiento de 2 aminoácidos GS en el extremo C (el puente SS se ha trasladado al interior de la unidad + se ha eliminado el sitio de N-glicosilación previsto).

SEQ ID NO: 109 es una secuencia de aminoácidos del dominio α3 proximal a la membrana de CD1b con un alargamiento de 3 aminoácidos GSC en el extremo C.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico incluye un primer dominio proximal a la membrana de la proteína similar a CMH y un segundo dominio proximal a la membrana de la proteína similar a CMH que son el dominio α3 de HFE y la microglobulina β2 (β2M), respectivamente, y forman un heterodímero entre ellos.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico incluye un primer dominio proximal a la membrana de la proteína similar a CMH y un segundo dominio proximal de membrana de la proteína similar a CMH que son la microglobulina β2 (β2M) y el dominio α3 de HFE, respectivamente, y forman un heterodímero entre ellos.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico comprende el dominio α3 de HFE que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45, y la microglobulina β2 (β2M) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46.

SEQ ID NO: 45 es una secuencia de aminoácidos del dominio α3 proximal a la membrana de HFE.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico incluye un primer dominio proximal a la membrana de la proteína similar a CMH y un segundo dominio proximal a la membrana de la proteína similar a CMH que son una variante modificada del dominio α3 de HFE y una variante modificada de la microglobulina β2 (β2M), respectivamente, y forman un heterodímero entre ellos.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico incluye un primer dominio proximal a la membrana de la proteína similar a CMH y un segundo dominio proximal a la membrana de la proteína similar a CMH que son una variante modificada de la microglobulina β2 (β2M) y una variante modificada del dominio α3 de HFE, respectivamente, y forman un heterodímero entre ellos.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico comprende una variante modificada de la microglobulina β2 (β2M) que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona de SEQ ID NO: 47 o SEQ ID NO: 48.

Se conocen más de 1.000 estructuras caracterizadas de CMH, CD1 y HFE. Cualquiera de las estructuras anteriores puede utilizarse en el anticuerpo biespecífico según la invención.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico comprende una variante modificada del CMH o de la proteína similar al CMH, en la que la variante modificada se refiere a una variante que comprende sustituciones de cisteína (C) para formar un puente disulfuro entre las cadenas del heterodímero producido a partir del primer y segundo dominios proximales de membrana del CMH o de la proteína similar al CMH.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico comprende una variante modificada del CMH o de la proteína similar al CMH, en la que la variante modificada se refiere a una variante que incluye una o más sustituciones en varias posiciones de los dominios proximales de la membrana del CMH o de la proteína similar al CMH, que conducen a un aumento de la estabilidad termodinámica Tm en más de 1 grado Celsius en comparación con los dominios proximales de la membrana de tipo salvaje del CMH o de la proteína similar al CMH, respectivamente.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico comprende una variante modificada del CMH o de la proteína similar al CMH, en la que la variante modificada se refiere a una variante que incluye una o más sustituciones en varias posiciones de los dominios proximales de membrana del CMH o de la proteína similar al CMH, que conducen a una disminución de la cantidad de

agregados en más del 5% a una concentración superior a 10 mg/ml en comparación con los dominios proximales de membrana de tipo salvaje del CMH o de la proteína similar al CMH, respectivamente.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico comprende una variante modificada del CMH o de la proteína similar al CMH, donde la variante modificada se refiere a una variante que incluye una o más sustituciones en varias posiciones de los dominios proximales de membrana del CMH o de la proteína similar al CMH, que conducen a la eliminación de los sitios de glicosilación en comparación con los dominios proximales de membrana del CMH o de la proteína similar al CMH de tipo salvaje, respectivamente.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico comprende el dominio variable de una primera cadena ligera y el dominio variable de una segunda cadena ligera, que son idénticos.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico comprende un fragmento Fc que pertenece a la IgG.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico comprende un fragmento Fc seleccionado del grupo que comprende: IgG1, IgG2 o IgG4 humanas.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico incluye un monómero del fragmento Fc, en el que se introducen además sustituciones que conducen a la ausencia de propiedades ADCC, CDC y/o ADCP en el anticuerpo bivalente biespecífico.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico incluye un monómero de fragmento Fc, en el que se introducen además sustituciones LALA (L234A y L235A).

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico incluye un monómero del fragmento Fc, en el que se introducen además sustituciones que conducen a una acción prolongada del anticuerpo.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico incluye un monómero de fragmento Fc, en el que se introducen además sustituciones YTE (M252Y, S254T y T256E).

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico incluye un monómero del fragmento Fc, en el que se introducen además sustituciones que conducen a mejorar las propiedades ADCC, CDC y/o ADCP en el anticuerpo bivalente biespecífico.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico incluye un monómero de fragmento Fc, en el que se introduce además la sustitución E345R.

Las mutaciones anteriores en el fragmento Fc están numeradas según la numeración de la UE para las cadenas de aminoácidos de los anticuerpos (Edelman, G.M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63 (1969), pp. 78-85; Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, (1991).

Por mutaciones en el fragmento Fc se entiende la(s) modificación(es) de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos descritos en la presente solicitud. Las variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo se preparan introduciendo los cambios de nucleótidos apropiados en el ácido nucleico del anticuerpo, o mediante la síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones, y/o inserciones y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se realiza cualquier combinación de supresión, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que ésta posea las características deseadas.

Una variante de la modificación de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos mediante sustituciones de aminoácidos es la sustitución de al menos un residuo de aminoácido en la molécula del anticuerpo por otro residuo.

Las sustituciones conservadoras figuran en el cuadro A en el apartado "sustituciones preferidas".

Tabla A		
Residuo inicial	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg(R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn(N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln(Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly(G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe(F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser(s)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp(W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr(Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

El término "función efectora" de los anticuerpos se refiere a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc (secuencia nativa de la región Fc o variantes de aminoácidos de la región Fc) de un anticuerpo, que varían con el isotipo del anticuerpo. Algunos ejemplos de funciones efectoras de los anticuerpos son: La unión de Clq y la citotoxicidad dependiente del complemento; la unión del receptor Fc; la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC); la fagocitosis; la regulación a la baja de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, el receptor de células B, BCR), y la activación de las células B.

La "citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos" o "ADCC" se refiere a una respuesta mediada por células, en la que las células citotóxicas no específicas que expresan receptores Fc (FcR) (por ejemplo, las células asesinas naturales (NK), los neutrófilos y los macrófagos) reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y, posteriormente, provocan la lisis o la fagocitosis de la célula diana. Las células primarias para mediar en la ADCC, las células NK, expresan sólo FcγRJII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión del FcR en las células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9: 457-92 (1991). Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés, puede realizarse un ensayo ADCC *in vitro*, como el descrito en las patentes estadounidenses nº 5.500.362 o 5.821.337. Entre las células efectoras útiles para estos ensayos se encuentran las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y las células Natural Killer (NK). Alternativa o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal como el divulgado en Clynes et al. PNAS (USA) 95: 652-656 (1998).

Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o varios FcR y realizan funciones efectoras. Preferiblemente, las células expresan al menos FcγRIII y realizan la función de efector de ADCC. Entre los ejemplos de leucocitos humanos que median la ADCC se encuentran las células mononucleares de sangre periférica (PBMC), las células asesinas naturales (NK), los monocitos, las células T citotóxicas y los neutrófilos; siendo preferibles las PBMC y las células NK. Las células efectoras pueden aislarse de una fuente nativa de las mismas, por ejemplo, de sangre o PBMCs como se describe en el presente documento.

"Citotoxicidad dependiente del complemento" y "CDC" se refieren a la capacidad de una molécula para lisar una diana en presencia del complemento. La vía de activación del complemento se inicia con la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a una molécula {por ejemplo, un anticuerpo) complejada con un antígeno afín. Para evaluar la activación del complemento, un ensayo CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202: 163 (1996).

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico se une específicamente a CD20 y CD3.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico se une específicamente a BCMA y CD3.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico se une específicamente a PD-L1 y CD47.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico se une específicamente al factor de coagulación 9 (FIX) y al factor de coagulación 10 (FX).

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico se une específicamente a GD2 y CD3.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico se une específicamente a AXL y CD3.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico se une específicamente a PD-L1 y TGF beta.

Los materiales de la solicitud proporcionan los siguientes anticuerpos y moléculas similares a anticuerpos: 01-001, 01-002, 01-003, 01-004, 01-005, 01-006, 01-007, 01-008, 01-009, 01-010, 01-011, 01-012, 02-004, 02-005, 02-006, 02-007, 02-008, 02-009, 03-001, 03-002, 03-003, 03-004, 03-005, 03-006, 03-007, 03-008.

01-001 es una molécula modelo monoespecífica similar a un anticuerpo que incluye una cadena pesada basada en VH y CH1, así como una cadena ligera basada en VL y CD1b, en la que VH es la secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo Prolgolimab (Prolgolimab_VH) con SEQ ID NO: 103, VL es la secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo Prolgolimab (Prolgolimab_VL) con SEQ ID NO: 104, y CD1b es el dominio α3 de CD1b que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 109.

01-002 es una molécula modelo monoespecífica similar a un anticuerpo que incluye una cadena pesada basada en VH y b2M y una cadena ligera basada en VL y CK, en la que VH es la secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo Prolgolimab (Prolgolimab_VH) con SEQ ID NO: 103, b2M es la

microglobulina β2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46, y VL es la secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo Prolgolimab (Prolgolimab_VL) con SEQ ID NO: 104.

01-003 es una molécula modelo monoespecífica similar a un anticuerpo que incluye una cadena pesada basada en VH y CH1, así como una cadena ligera basada en VL y CD1b, en la que VH es la secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo Ocrelizumab (Ocrelizumab_VH) con SEQ ID NO: 105, VL es la secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo Ocrelizumab (Ocrelizumab_VH) con SEQ ID NO: 106, y CD1b es el dominio α3 de CD1b que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 109.

01-004 es una molécula modelo monoespecífica similar a un anticuerpo que incluye una cadena pesada basada en VH y CH1 y una cadena ligera basada en VL y CK, en la que VH es la secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo Prolgolimab (Prolgolimab_VH) con SEQ ID NO: 103, y VL es la secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo Ocrelizumab (Ocrelizumab_VL) con SEQ ID NO: 106.

01-005 es una molécula modelo monoespecífica similar a un anticuerpo que incluye una cadena pesada basada en VH y CH1, así como una cadena ligera basada en VL y b2M, en la que VH es la secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo Prolgolimab (Prolgolimab_VH) con SEQ ID NO: 103, b2M es la microglobulina β2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46, VL es la secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo Ocrelizumab (Ocrelizumab_VL) con SEQ ID NO: 106, y CD1b es el dominio α3 de CD1b que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 109.

01-006 es una molécula modelo monoespecífica similar a un anticuerpo que incluye una cadena pesada basada en VH y CH1 y una cadena ligera basada en VL y CK, en la que VH es la secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo Ocrelizumab (Ocrelizumab_VH) con SEQ ID NO: 105, y VL es la secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo Prolgolimab (Prolgolimab_VL) con SEQ ID NO: 104.

01-007 es una molécula modelo monoespecífica similar a un anticuerpo que incluye una cadena pesada basada en VH y CH1, así como una cadena ligera basada en VL y b2M, en la que VH es la secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo Ocrelizumab (Ocrelizumab_VH) con SEQ ID NO: 105, b2M es la microglobulina β2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46, VL es la secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo Prolgolimab (Prolgolimab_VL) con SEQ ID NO: 104, y CD1b es el dominio α3 de CD1b que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 109.

01-008 es una molécula modelo monoespecífica similar a un anticuerpo que incluye una cadena pesada basada en VH y CH1, así como una cadena ligera basada en VL y CD1b, donde VH es la secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo Prolgolimab (Prolgolimab_VH) con SEQ ID NO: 103, VL es la secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo Ocrelizumab (Ocrelizumab_VH) con SEQ ID NO: 106, y CD1b es el dominio α3 de CD1b que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 109.

01-009 es una molécula modelo monoespecífica similar a un anticuerpo que incluye una cadena pesada basada en VH y b2M y una cadena ligera basada en VL y CK, en la que VH es la secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo Prolgolimab (Prolgolimab_VH) con SEQ ID NO: 103, b2M es la microglobulina β2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46, y VL es la secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo Ocrelizumab (Ocrelizumab_VL) con SEQ ID NO: 106.

01-010 es una molécula modelo monoespecífica similar a un anticuerpo que incluye una cadena pesada basada en VH y CH1, así como una cadena ligera basada en VL y CD1b, en la que VH es la secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo Ocrelizumab (Ocrelizumab_VH) con SEQ ID NO: 105, VL es la secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo Prolgolimab (Prolgolimab_VL) con SEQ ID NO: 104, y CD1b es el dominio α3 de CD1b que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 109.

01-011 es una molécula modelo monoespecífica similar a un anticuerpo que incluye una cadena pesada basada en VH y CH1, así como una cadena ligera basada en VL y b2M, en la que VH es la secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo Prolgolimab (Prolgolimab_VH) con SEQ ID NO: 103, b2M es la microglobulina β2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46, VL es la secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo Prolgolimab (Prolgolimab_VL) con SEQ ID NO: 104, y CD1b es el dominio α3 de CD1b que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 109.

01-012 es una molécula modelo monoespecífica similar a un anticuerpo que incluye una cadena pesada basada en VH y CH1 y una cadena ligera basada en VL y CK, donde VH es la secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo Prolgolimab (Prolgolimab_VH) con SEQ ID NO: 103, y VL es la secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo Prolgolimab (Prolgolimab_VL) con SEQ ID NO: 104.

02-004 es un anticuerpo quimérico bivalente y biespecífico que se une específicamente a PD1 y CD20 y comprende:

a) una primera cadena ligera y una primera cadena pesada de anticuerpo que se unen específicamente a PD1;

donde la primera cadena ligera comprende el dominio variable de cadena ligera del anticuerpo Prolgolimab (Prolgolimab_VL) con SEQ ID NO: 104 y un dominio constante de cadena ligera;

donde la primera cadena pesada comprende el dominio variable de cadena pesada del anticuerpo Prolgolimab (Prolgolimab_VH) con SEQ ID NO: 103 y los dominios constantes de cadena pesada del anticuerpo que incluyen un primer dominio constante de cadena pesada (CH1) y un monómero de fragmento Fc que comprende los dominios constantes de cadena pesada segundo (CH2) y tercero (CH3), donde CH3 incluye sustituciones de aminoácidos para formar ojales (hole);

b) la segunda cadena ligera y la segunda cadena pesada del anticuerpo se unen específicamente a CD20,

en el que la segunda cadena ligera comprende el dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo Ocrelizumab (Ocrelizumab_VL) con SEQ ID NO: 106 y el dominio proximal de membrana α3 de CD1b que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 109;

en el que la segunda cadena pesada comprende el dominio variable de cadena pesada del anticuerpo Ocrelizumab (Ocrelizumab_VH) con SEQ ID NO: 105, un dominio proximal de membrana de microglobulina β2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46, y un monómero de fragmento Fc que comprende los dominios constantes de cadena pesada segundo (CH2) y tercero (CH3), en el que CH3 incluye sustituciones de aminoácidos para formar botón (knob).

02-004 es un anticuerpo quimérico bivalente y biespecífico que se une específicamente a PD1 y CD20 y comprende:

a) una primera cadena ligera y una primera cadena pesada de anticuerpo que se unen específicamente a PD1;

donde la primera cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58 (Prolgolimab_VL_CK);

donde la primera cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57 (Prolgolimab_VH_HC_hole);

b) la segunda cadena ligera y la segunda cadena pesada del anticuerpo se unen específicamente a CD20,

donde la segunda cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60 (Ocrelizumab_VL_CD1b);

donde la segunda cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59 (Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_knob).

02-005 es un anticuerpo quimérico bivalente y biespecífico que se une específicamente a PD1 y CD20 y comprende:

a) una primera cadena ligera y una primera cadena pesada de anticuerpos que se unen específicamente a CD20;

donde la primera cadena ligera comprende el dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo Ocrelizumab (Ocrelizumab_VL) con SEQ ID NO: 106 y un dominio constante de la cadena ligera;

donde la primera cadena pesada comprende el dominio variable de cadena pesada del anticuerpo Ocrelizumab (Ocrelizumab_VH) con SEQ ID NO: 105 y los dominios constantes de cadena pesada del anticuerpo que incluyen un primer dominio constante de cadena pesada (CH1) y un monómero de fragmento Fc que comprende los dominios constantes de cadena pesada segundo (CH2) y tercero (CH3), donde CH3 incluye sustituciones de aminoácidos para formar ojales (hole);

b) una segunda cadena ligera y una segunda cadena pesada de anticuerpos que se unen específicamente a la PD1,

en el que la segunda cadena ligera comprende el dominio variable de cadena ligera del anticuerpo Prolgolimab (Prolgolimab_VL) con SEQ ID NO: 104 y el dominio proximal de membrana α3 de CD1b que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 109;

en el que la segunda cadena pesada comprende el dominio variable de cadena pesada del anticuerpo Prolgolimab (Prolgolimab_VH) con SEQ ID NO: 103, un dominio proximal de membrana de la microglobulina β2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46, y un monómero de fragmento Fc que comprende los dominios constantes de cadena pesada segundo (CH2) y tercero (CH3), en el que CH3 incluye sustituciones de aminoácidos para formar botones (Knob).

02-005 es un anticuerpo quimérico bivalente y biespecífico que se une específicamente a PD1 y CD20 y comprende:

a) una primera cadena ligera y una primera cadena pesada de anticuerpos que se unen específicamente a CD20;

donde la primera cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62 (Ocrelizumab_VL_CK);

donde la primera cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61 (Ocrelizumab_VH_ HC_hole);

b) una segunda cadena ligera y una segunda cadena pesada de anticuerpos que se unen específicamente a la PD1,

donde la segunda cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64 (Prolgolimab_VL_CD1b);

donde la segunda cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63 (Prolgolimab_VH_b2m_Fc_knob).

02-006 es un anticuerpo quimérico bivalente biespecífico que se une específicamente a PD1 y CSF1R y comprende:

a) una primera cadena ligera y una primera cadena pesada de anticuerpo que se unen específicamente a PD1;

donde la primera cadena ligera comprende el dominio variable de cadena ligera del anticuerpo Prolgolimab (Prolgolimab_VL) con SEQ ID NO: 104 y un dominio constante de cadena ligera;

donde la primera cadena pesada comprende el dominio variable de cadena pesada del anticuerpo Prolgolimab (Prolgolimab_VH) con SEQ ID NO: 103 y los dominios constantes de cadena pesada del anticuerpo que incluyen un primer dominio constante de cadena pesada (CH1) y un monómero de fragmento Fc que comprende los dominios constantes de cadena pesada segundo (CH2) y tercero (CH3), donde CH3 incluye sustituciones de aminoácidos para formar ojales (hole);

b) una segunda cadena ligera y una segunda cadena pesada de anticuerpos que se unen específicamente al CSF1R,

en el que la segunda cadena ligera comprende el dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo contra CSF1R con SEQ ID NO: 108 y el dominio proximal de membrana α3 de CD1b que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 109;

en el que la segunda cadena pesada comprende el dominio variable de cadena pesada del anticuerpo contra CSF1R con SEQ ID NO: 107, un dominio proximal de membrana de la microglobulina β2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46, y un monómero de fragmento Fc que comprende los dominios constantes de cadena pesada segundo (CH2) y tercero (CH3), en el que CH3 incluye sustituciones de aminoácidos para formar botones (Knob).

02-006 es un anticuerpo quimérico bivalente biespecífico que se une específicamente a PD1 y CSF1R y comprende:

a) una primera cadena ligera y una primera cadena pesada de anticuerpo que se unen específicamente a PD1;

donde la primera cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58 (Prolgolimab_VL_CK);

donde la primera cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57 (Prolgolimab_VH_HC_hole);

b) una segunda cadena ligera y una segunda cadena pesada de anticuerpos que se unen específicamente al CSF1R,

donde la segunda cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 66 (Anti-CSF1R_VL_CD1b);

donde la segunda cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 65 (Anti-CSF1R_VH_b2m_Fc_knob).

02-007 es un anticuerpo quimérico bivalente biespecífico que se une específicamente a PD1 y CSF1R y comprende:

a) una primera cadena ligera y una primera cadena pesada de anticuerpos que se unen específicamente al CSF1R;

en el que la primera cadena ligera comprende el dominio variable de cadena ligera del anticuerpo contra CSF1R con SEQ ID NO: 108 y un dominio constante de cadena ligera;

donde la primera cadena pesada comprende el dominio variable de cadena pesada del anticuerpo contra el CSF1R con SEQ ID NO: 107 y los dominios constantes de cadena pesada del anticuerpo que incluyen un primer dominio constante de cadena pesada (CH1) y un monómero de fragmento Fc que comprende los dominios constantes de cadena pesada segundo (CH2) y tercero (CH3), donde CH3 incluye sustituciones de aminoácidos para formar ojales (hole);

b) una segunda cadena ligera y una segunda cadena pesada de anticuerpos que se unen específicamente a la PD1,

en el que la segunda cadena ligera comprende el dominio variable de cadena ligera del anticuerpo Prolgolimab (Prolgolimab_VL) con SEQ ID NO: 104 y el dominio proximal de membrana α3 de CD1b que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 109;

en el que la segunda cadena pesada comprende el dominio variable de cadena pesada del anticuerpo Prolgolimab (Prolgolimab_VH) con SEQ ID NO: 103, un dominio proximal de membrana de la microglobulina β2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46, y un monómero de fragmento Fc que comprende los dominios constantes de cadena pesada segundo (CH2) y tercero (CH3), en el que CH3 incluye sustituciones de aminoácidos para formar botones (Knob).

02-007 es un anticuerpo quimérico bivalente biespecífico que se une específicamente a PD1 y CSF1R y comprende:

a) una primera cadena ligera y una primera cadena pesada de anticuerpos que se unen específicamente al CSF1R;

donde la primera cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 68 (Anti-CSF1R_VL_CK);

donde la primera cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67 (Anti-CSF1R_VH_HC_hole);

b) una segunda cadena ligera y una segunda cadena pesada de anticuerpos que se unen específicamente a la PD1,

donde la segunda cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64 (Prolgolimab_VL_CD1b);

donde la segunda cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63 (Prolgolimab_VH_b2m_Fc_knob).

02-008 es un anticuerpo quimérico bivalente biespecífico que se une específicamente a CD20 y CSF1R y comprende:

a) una primera cadena ligera y una primera cadena pesada de anticuerpos que se unen específicamente a CD20;

donde la primera cadena ligera comprende el dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo Ocrelizumab (Ocrelizumab_VL) con SEQ ID NO: 106 y un dominio constante de la cadena ligera;

donde la primera cadena pesada comprende el dominio variable de cadena pesada del anticuerpo Ocrelizumab (Ocrelizumab_VH) con SEQ ID NO: 105 y los dominios constantes de cadena pesada del anticuerpo que incluyen un primer dominio constante de cadena pesada (CH1) y un monómero de fragmento Fc que comprende los dominios constantes de cadena pesada segundo (CH2) y tercero (CH3), donde CH3 incluye sustituciones de aminoácidos para formar ojales (hole);

b) una segunda cadena ligera y una segunda cadena pesada de anticuerpos que se unen específicamente al CSF1R,

en el que la segunda cadena ligera comprende el dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo contra CSF1R con SEQ ID NO: 108 y el dominio proximal de membrana α3 de CD1b que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 109;

en el que la segunda cadena pesada comprende el dominio variable de cadena pesada del anticuerpo contra CSF1R con SEQ ID NO: 107, un dominio proximal de membrana de la microglobulina β2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46, y un monómero de fragmento Fc que comprende los dominios constantes de cadena pesada segundo (CH2) y tercero (CH3), en el que CH3 incluye sustituciones de aminoácidos para formar botones (Knob).

02-008 es un anticuerpo quimérico bivalente biespecífico que se une específicamente a CD20 y CSF1R y comprende:

a) una primera cadena ligera y una primera cadena pesada de anticuerpos que se unen específicamente a CD20;

donde la primera cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62 (Ocrelizumab_VL_CK);

donde la primera cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61 (Ocrelizumab_VH_ HC_hole);

b) una segunda cadena ligera y una segunda cadena pesada de anticuerpos que se unen específicamente al CSF1R,

donde la segunda cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 66 (Anti-CSF1R_VL_CD1b);

donde la segunda cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 65 (Anti-CSF1R_VH_b2m_Fc_knob).

02-009 es un anticuerpo quimérico bivalente biespecífico que se une específicamente a CD20 y CSF1R y comprende:

a) una primera cadena ligera y una primera cadena pesada de anticuerpos que se unen específicamente al CSF1R;

en el que la primera cadena ligera comprende el dominio variable de cadena ligera del anticuerpo contra CSF1R con SEQ ID NO: 108 y un dominio constante de cadena ligera;

donde la primera cadena pesada comprende el dominio variable de cadena pesada del anticuerpo contra el CSF1R con SEQ ID NO: 107 y los dominios constantes de cadena pesada del anticuerpo que incluyen un primer dominio constante de cadena pesada (CH1) y un monómero de fragmento Fc que comprende los dominios constantes de cadena pesada segundo (CH2) y tercero (CH3), donde CH3 incluye sustituciones de aminoácidos para formar ojales (hole);

b) la segunda cadena ligera y la segunda cadena pesada del anticuerpo se unen específicamente a CD20,

en el que la segunda cadena ligera comprende el dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo Ocrelizumab (Ocrelizumab_VL) con SEQ ID NO: 106 y el dominio proximal de membrana α3 de CD1b que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 109;

en el que la segunda cadena pesada comprende el dominio variable de cadena pesada del anticuerpo Ocrelizumab (Ocrelizumab_VH) con SEQ ID NO: 105, un dominio proximal de membrana de microglobulina β2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46, y un monómero de fragmento Fc que comprende los dominios constantes de cadena pesada segundo (CH2) y tercero (CH3), en el que CH3 incluye sustituciones de aminoácidos para formar botón (knob).

02-009 es un anticuerpo quimérico bivalente biespecífico que se une específicamente a CD20 y CSF1R y comprende:

a) una primera cadena ligera y una primera cadena pesada de anticuerpos que se unen específicamente al CSF1R;

donde la primera cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 68 (Anti-CSF1R_VL_CK);

donde la primera cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67 (Anti-CSF1R_VH_HC_hole);

b) la segunda cadena ligera y la segunda cadena pesada del anticuerpo se unen específicamente a CD20,

donde la segunda cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60 (Ocrelizumab_VL_CD1b);

donde la segunda cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59 (Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_knob).

03-001 es un anticuerpo quimérico monoespecífico bivalente que se une específicamente a PD1 y comprende:

una cadena ligera que comprende el dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo Prolgolimab (Prolgolimab_VL) con SEQ ID NO: 104 y el dominio α3 proximal a la membrana de CD1b con la mutación N57C (puente SS adicional dentro de la unidad) y elongación por 3 aminoácidos GSC en el extremo C, que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49;

una cadena pesada que comprende el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo Prolgolimab (Prolgolimab_VH) con SEQ ID NO: 103, un dominio proximal a la membrana de la microglobulina β2 con la mutación R12C, que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47, y un monómero del fragmento Fc que comprende los dominios constantes de la segunda (CH2) y tercera (CH3) cadena pesada.

03-001 es un anticuerpo quimérico monoespecífico bivalente que se une específicamente a PD1 y comprende:

una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 72 y

una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 69.

03-002 es un anticuerpo quimérico monoespecífico bivalente que se une específicamente a PD1 y comprende:

una cadena ligera que comprende el dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo Prolgolimab (Prolgolimab_VL) con SEQ ID NO: 104 y el dominio proximal de membrana α3 de CD1b con la mutación N57C (el puente SS está dentro de la unidad) y la elongación por 2 aminoácidos GS en el extremo C (el puente SS se ha eliminado del extremo C de la unidad y se ha transferido dentro de la unidad), que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50;

una cadena pesada que comprende el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo Prolgolimab (Prolgolimab_VH) con la SEQ ID NO: 103, un dominio proximal de la membrana de la microglobulina β2 con la mutación R12C y una bisagra con la mutación C220A, que tienen la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 48 y un monómero del fragmento Fc que comprende los dominios constantes de la segunda (CH2) y tercera (CH3) cadena pesada.

03-002 es un anticuerpo quimérico monoespecífico bivalente que se une específicamente a PD1 y comprende:

una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73 y

una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71.

03-003 es un anticuerpo quimérico monoespecífico bivalente que se une específicamente a PD1 y comprende:

una cadena ligera que comprende el dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo Prolgolimab (Prolgolimab_VL) con SEQ ID NO: 104 y el dominio proximal a la membrana α3 de CD1b con la mutación N59A (sustitución en el sitio de glicosilación N previsto en la cadena ligera) y elongación por 3 aminoácidos GSC en el extremo C, que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51;

una cadena pesada que comprende el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo Prolgolimab (Prolgolimab_VH) con SEQ ID NO: 103, un dominio proximal a la membrana de la microglobulina β2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46, y un monómero de fragmento Fc que comprende los dominios constantes de la segunda (CH2) y tercera (CH3) cadena pesada.

03-003 es un anticuerpo quimérico monoespecífico bivalente que se une específicamente a PD1 y comprende:

una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 74 y

una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 70.

03-004 es un anticuerpo quimérico monoespecífico bivalente que se une específicamente a PD1 y comprende:

una cadena ligera que comprende el dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo Prolgolimab (Prolgolimab_VL) con SEQ ID NO: 104 y el dominio proximal a la membrana α3 de CD1b con la mutación N59D (sustitución en el sitio de glicosilación N previsto en la cadena ligera) y elongación por 3 aminoácidos GSC en el extremo C, que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52;

una cadena pesada que comprende el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo Prolgolimab (Prolgolimab_VH) con SEQ ID NO: 103, un dominio proximal a la membrana de la microglobulina β2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46, y un monómero de fragmento Fc que comprende los dominios constantes de la segunda (CH2) y tercera (CH3) cadena pesada.

03-004 es un anticuerpo quimérico monoespecífico bivalente que se une específicamente a PD1 y comprende:

una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 75 y

una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 70.

03-005 es un anticuerpo quimérico monoespecífico bivalente que se une específicamente a PD1 y comprende:

una cadena ligera que comprende el dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo Prolgolimab (Prolgolimab_VL) con SEQ ID NO: 104 y el dominio proximal de membrana α3 de CD1b con las mutaciones N57C, N59A y un alargamiento de 3 aminoácidos GSC en el extremo C (un puente SS adicional está dentro de la unidad + el sitio de N-glicosilación previsto se ha eliminado) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53;

una cadena pesada que comprende el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo Prolgolimab (Prolgolimab_VH) con SEQ ID NO: 103, un dominio proximal a la membrana de la microglobulina β2 con la mutación R12C, que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47, y un monómero del fragmento Fc que comprende los dominios constantes de la segunda (CH2) y tercera (CH3) cadena pesada.

03-005 es un anticuerpo quimérico monoespecífico bivalente que se une específicamente a PD1 y comprende:

una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 76 y

una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 69.

03-006 es un anticuerpo quimérico monoespecífico bivalente que se une específicamente a PD1 y comprende:

una cadena ligera que comprende el dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo Prolgolimab (Prolgolimab_VL) con SEQ ID NO: 104 y el dominio proximal de membrana α3 de CD1b con las mutaciones N57C, N59D y un alargamiento de 3 aminoácidos GSC en el extremo C (un puente SS adicional está dentro de la unidad + el sitio de N-glicosilación previsto se ha eliminado) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54;

una cadena pesada que comprende el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo Prolgolimab (Prolgolimab_VH) con SEQ ID NO: 103, un dominio proximal a la membrana de la microglobulina β2 con la mutación R12C, que tiene la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 47, y un monómero del fragmento Fc que comprende los dominios constantes de la segunda (CH2) y tercera (CH3) cadena pesada.

03-006 es un anticuerpo quimérico monoespecífico bivalente que se une específicamente a PD1 y comprende:

una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 77 y

una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 69.

03-007 es un anticuerpo quimérico monoespecífico bivalente que se une específicamente a PD1 y comprende:

una cadena ligera que comprende el dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo Prolgolimab (Prolgolimab_VL) con SEQ ID NO: 104 y el dominio proximal de membrana α3 de CD1b con las mutaciones N57C, N59A y un alargamiento de 2 aminoácidos GS en el extremo C (el puente SS se ha transferido dentro de la unidad + se ha eliminado el sitio de N-glicosilación previsto) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55;

una cadena pesada que comprende el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo Prolgolimab (Prolgolimab_VH) con la SEQ ID NO: 103, un dominio proximal de la membrana de la microglobulina β2 con la mutación R12C y una bisagra con la mutación C220A, que tienen la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 48 y un monómero del fragmento Fc que comprende los dominios constantes de la segunda (CH2) y tercera (CH3) cadena pesada.

03-007 es un anticuerpo quimérico monoespecífico bivalente que se une específicamente a PD1 y comprende:

una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78 y

una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71.

03-008 es un anticuerpo quimérico monoespecífico bivalente que se une específicamente a PD1 y comprende:

una cadena ligera que comprende el dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo Prolgolimab (Prolgolimab_VL) con SEQ ID NO: 104 y el dominio proximal de membrana α3 de CD1b con las mutaciones N57C, N59D y un alargamiento de 2 aminoácidos GS en el extremo C (el puente SS se ha transferido dentro de la unidad + se ha eliminado el sitio de N-glicosilación previsto) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56;

una cadena pesada que comprende el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo Prolgolimab (Prolgolimab_VH) con la SEQ ID NO: 103, un dominio proximal de la membrana de la microglobulina β2 con la mutación R12C y una bisagra con la mutación C220A, que tienen la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 48 y un monómero del fragmento Fc que comprende los dominios constantes de la segunda (CH2) y tercera (CH3) cadena pesada.

03-008 es un anticuerpo quimérico monoespecífico bivalente que se une específicamente a PD1 y comprende:

una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79 y

una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71.

Estos anticuerpos se dan a título ilustrativo para confirmar la operatividad del formato de anticuerpo quimérico bivalente biespecífico según la invención, así como para confirmar propiedades sorprendentes del mismo. Estos anticuerpos no deben interpretarse como una limitación del anticuerpo quimérico bivalente biespecífico según la invención.

Los parámetros de rendimiento del producto con el correcto ensamblaje heterodimérico de dos cadenas pesadas distintas y el correcto emparejamiento entre dos cadenas ligeras distintas y las correspondientes cadenas pesadas no dependen de los fragmentos variables de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo quimérico biespecífico ni de su especificidad para los antígenos.

Los anticuerpos quiméricos bivalentes biespecíficos según la invención pueden utilizarse para tratar diversas enfermedades, en particular, enfermedades oncológicas,

enfermedades autoinmunes o enfermedades que están asociadas con el trastorno de la coagulación de la sangre (coagulación).

Ácido nucleico

En un aspecto, la presente invención se refiere a un ácido nucleico aislado que codifica cualquiera de los anticuerpos quiméricos bivalentes biespecíficos anteriores o fragmentos de los mismos.

Los términos "ácido nucleico", "secuencia nucleica", "secuencia de ácido nucleico", "polinucleótido", "oligonucleótido", "secuencia de polinucleótidos" y "secuencia de nucleótidos" utilizados indistintamente en la presente descripción, significan una secuencia precisa de nucleótidos, modificada o no, que determina un fragmento o una región de un ácido nucleico, que contiene o no nucleótidos no naturales, y que es un ADN o ARN de doble cadena, un ADN o ARN de cadena simple, o productos de transcripción de dichos ADN.

También debe incluirse aquí que la presente invención no se refiere a las secuencias de nucleótidos en su entorno cromosómico natural, es decir, en estado natural. Las secuencias de la presente invención han sido aisladas y/o purificadas, es decir, han sido muestreadas directa o indirectamente, por ejemplo, mediante copia, habiendo sido modificado su entorno al menos parcialmente. Así pues, también cabe mencionar aquí los ácidos nucleicos aislados obtenidos por genética recombinante, mediante, por ejemplo, células huésped, u obtenidos por síntesis química.

Una referencia a una secuencia de nucleótidos abarca su complemento, a menos que se especifique lo contrario. Por lo tanto, una referencia a un ácido nucleico que tiene una secuencia particular debe entenderse como una que abarca la cadena complementaria del mismo con la secuencia complementaria del mismo.

En cualquiera de las realizaciones anteriores, las moléculas de ácido nucleico pueden ser aisladas.

Una molécula de ácido nucleico "aislada" es aquella que se identifica y se separa de al menos una molécula-impureza de ácido nucleico, a la que la primera está unida en la fuente natural del ácido nucleico del anticuerpo. Una molécula de ácido nucleico

aislada es diferente de la forma o conjunto en que se encuentra en condiciones naturales. Así, una molécula de ácido nucleico aislada es diferente de una molécula de ácido nucleico que existe en las células en condiciones naturales.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 1-79 o SEQ ID NO: 109. Una molécula de ácido nucleico también puede comprender cualquier combinación de dichas secuencias de nucleótidos.

En algunas realizaciones, un ácido nucleico es ADN.

En una variante, la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera o pesada del anticuerpo biespecífico anterior según la invención, seleccionada entre:

una primera secuencia de aminoácidos de cadena ligera que comprende un dominio variable de cadena ligera y un dominio constante de cadena ligera;

una primera secuencia de aminoácidos de la cadena pesada que comprende un dominio variable de cadena pesada y dominios constantes de cadena pesada de anticuerpo que incluyen un primer (CH1) dominio constante de cadena pesada y un monómero de fragmento Fc que comprende un segundo (CH2) y un tercer (CH3) dominio constante de cadena pesada;

una segunda secuencia de aminoácidos de cadena ligera que comprende un dominio variable de cadena ligera y un dominio constante que se selecciona del grupo

un primer dominio proximal de la membrana del CMH (complejo mayor de histocompatibilidad) o

un primer dominio próximo a la membrana de la proteína similar a CMH;

una segunda secuencia de aminoácidos de cadena pesada que comprende un dominio variable de cadena pesada y un dominio constante que se selecciona del grupo

un segundo dominio proximal de la membrana del CMH (complejo mayor de histocompatibilidad) o

un segundo dominio proximal a la membrana de proteína similar a CMH,

y un monómero de fragmento Fc que comprende dominios constantes de cadena pesada segundo (CH2) y tercero (CH3).

Una molécula de ácido nucleico también puede comprender cualquier combinación de las secuencias de nucleótidos anteriores.

Este experto en la materia apreciará que un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera o pesada del anticuerpo biespecífico anterior según la invención, seleccionado entre:

una primera secuencia de aminoácidos de cadena ligera que comprende un dominio variable de cadena ligera y un dominio constante de cadena ligera;

una primera secuencia de aminoácidos de la cadena pesada que comprende un dominio variable de cadena pesada y dominios constantes de cadena pesada de anticuerpo que incluyen un primer (CH1) dominio constante de cadena pesada y un monómero de fragmento Fc que comprende un segundo (CH2) y un tercer (CH3) dominio constante de cadena pesada;

una segunda secuencia de aminoácidos de cadena ligera que comprende un dominio variable de cadena ligera y un dominio constante que se selecciona del grupo

un primer dominio proximal de la membrana del CMH (complejo mayor de histocompatibilidad) o

un primer dominio próximo a la membrana de la proteína similar a CMH;

una segunda secuencia de aminoácidos de cadena pesada que comprende un dominio variable de cadena pesada y un dominio constante que se selecciona del grupo

un segundo dominio proximal de la membrana del CMH (complejo mayor de histocompatibilidad) o

un segundo dominio proximal a la membrana de proteína similar a CMH,

y un monómero de fragmento Fc que comprende dominios constantes de cadena pesada segundo (CH2) y tercero (CH3),

puede estar codificado por una amplia gama de secuencias de ADN diferentes, debido a la degeneración del código genético. Está dentro de las capacidades de una persona entrenada en la técnica crear estas secuencias de ADN alternativas que codifican

las mismas secuencias de aminoácidos. Tales secuencias de ADN variantes están dentro del alcance de la presente invención.

La molécula de ácido nucleico según la presente invención puede aislarse de cualquier fuente que produzca el anticuerpo biespecífico según la invención. En ciertas realizaciones de la invención, la molécula de ácido nucleico de la invención puede sintetizarse, en lugar de aislarse.

En algunas realizaciones de la invención, el ácido nucleico es un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la primera cadena pesada del candidato 02-004 y 02-006 (Prolgolimab_VH_HC_hole), e incluye una secuencia de nucleótidos con SEQ ID NO: 80.

En algunas realizaciones de la invención, el ácido nucleico es un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la primera cadena ligera del candidato 02-004 y 02-006 (Prolgolimab_VL_CK), e incluye una secuencia de nucleótidos con SEQ ID NO: 81.

En algunas realizaciones de la invención, el ácido nucleico es un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la segunda cadena pesada del candidato 02-004 y 02-009 (Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_knob), e incluye una secuencia de nucleótidos con SEQ ID NO: 82.

En algunas realizaciones de la invención, el ácido nucleico es un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la segunda cadena ligera del candidato 02-004 y 02-009 (Ocrelizumab_VL_CD1b), e incluye una secuencia de nucleótidos con SEQ ID NO: 83.

En algunas realizaciones de la invención, el ácido nucleico es un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la primera cadena pesada del candidato 02-005 y 02-008 (Ocrelizumab_VH_ HC_hole), e incluye una secuencia de nucleótidos con SEQ ID NO: 84.

En algunas realizaciones de la invención, el ácido nucleico es un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la primera cadena ligera de los candidatos 02-005 y 02-008 (Ocrelizumab_VL_CK), e incluye una secuencia de nucleótidos con SEQ ID NO: 85.

En algunas realizaciones de la invención, el ácido nucleico es un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la segunda cadena pesada de los candidatos 02-005 y 02-007 (Prolgolimab_VH_b2m_Fc_knob), e incluye una secuencia de nucleótidos con SEQ ID NO: 86.

En algunas realizaciones de la invención, el ácido nucleico es un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la segunda cadena ligera de los candidatos 02-005 y 02-007 (Prolgolimab_VL_CD1b), e incluye una secuencia de nucleótidos con SEQ ID NO: 87.

En algunas realizaciones de la invención, el ácido nucleico es un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la segunda cadena pesada de los candidatos 02-006 y 02-008 (Anti-CSF1R_VH_b2m_Fc_knob), e incluye una secuencia de nucleótidos con SEQ ID NO: 88.

En algunas realizaciones de la invención, el ácido nucleico es un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la segunda cadena ligera de los candidatos 02-006 y 02-008 (Anti-CSF1R_VL_CD1b), e incluye una secuencia de nucleótidos con SEQ ID NO: 89.

En algunas realizaciones de la invención, el ácido nucleico es un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la primera cadena pesada de los candidatos 02-007 y 02-009 (Anti-CSF1R_VH_HC_hole), e incluye una secuencia de nucleótidos con SEQ ID NO: 90.

En algunas realizaciones de la invención, el ácido nucleico es un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la primera cadena ligera de los candidatos 02-007 y 02-009 (Anti-CSF1R_VL_CK), e incluye una secuencia de nucleótidos con SEQ ID NO: 91.

En algunas realizaciones de la invención, el ácido nucleico es un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de los candidatos 03-001 y 03-005, que comprende una microglobulina β2 universal (β2M) con la mutación R12C e incluye una secuencia de nucleótidos con SEQ ID NO: 92.

En algunas realizaciones de la invención, el ácido nucleico es un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de los candidatos 03-003 y

03-004, que comprende una microglobulina β2 universal (β2M) e incluye una secuencia de nucleótidos con SEQ ID NO: 93.

En algunas realizaciones de la invención, el ácido nucleico es un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de los candidatos 03-002, 03-007 y 03-008, que comprende una microglobulina β2 universal (β2M) con la mutación R12C y una bisagra con la mutación C220A e incluye una secuencia de nucleótidos con SEQ ID NO: 94.

En algunas realizaciones de la invención, el ácido nucleico es un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del candidato 03-001, que comprende el dominio proximal de membrana α3 de CD1b con la mutación N57C y un alargamiento por 3 aminoácidos GSC en el extremo C, e incluye una secuencia de nucleótidos con SEQ ID NO: 95.

En algunas realizaciones de la invención, el ácido nucleico es un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del candidato 03-002, que comprende el dominio proximal de membrana α3 de CD1b con la mutación N57C y un alargamiento por 2 aminoácidos GS en el extremo C, e incluye una secuencia de nucleótidos con SEQ ID NO: 96.

En algunas realizaciones de la invención, el ácido nucleico es un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del candidato 03-003, que comprende el dominio α3 proximal a la membrana de CD1b con la mutación N59A y un alargamiento en 3 aminoácidos GSC en el extremo C, e incluye una secuencia de nucleótidos con SEQ ID NO: 97.

En algunas realizaciones de la invención, el ácido nucleico es un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del candidato 03-004, que comprende el dominio α3 proximal a la membrana de CD1b con la mutación N59D y un alargamiento en 3 aminoácidos GSC en el extremo C, e incluye una secuencia de nucleótidos con SEQ ID NO: 98.

En algunas realizaciones de la invención, el ácido nucleico es un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del candidato 03-005, que comprende el dominio proximal de membrana α3 de CD1b con las mutaciones N57C,

N59A y un alargamiento en 3 aminoácidos GSC en el extremo C, e incluye una secuencia de nucleótidos con SEQ ID NO: 99.

En algunas realizaciones de la invención, el ácido nucleico es un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del candidato 03-006, que comprende el dominio proximal de membrana α3 de CD1b con las mutaciones N57C, N59D y un alargamiento en 3 aminoácidos GSC en el extremo C, e incluye una secuencia de nucleótidos con SEQ ID NO: 100.

En algunas realizaciones de la invención, el ácido nucleico es un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del candidato 03-007, que comprende el dominio proximal de membrana α3 de CD1b con las mutaciones N57C, N59A y un alargamiento por 2 aminoácidos GS en el extremo C, e incluye una secuencia de nucleótidos con SEQ ID NO: 101.

En algunas realizaciones de la invención, el ácido nucleico es un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del candidato 03-008, que comprende el dominio proximal de membrana α3 de CD1b con las mutaciones N57C, N59D y un alargamiento en 2 aminoácidos GS en el extremo C, e incluye una secuencia de nucleótidos con SEQ ID NO: 102.

Las moléculas de ácido nucleico pueden utilizarse para expresar los anticuerpos quiméricos bivalentes biespecíficos según la invención.

Vector de expresión

En un aspecto, la presente invención se refiere a un vector de expresión que comprende el ácido nucleico aislado anterior. La presente invención se refiere a un vector adecuado para la expresión de cualquiera de las secuencias de nucleótidos descritas en el presente documento.

El término "vector", tal y como se utiliza aquí, significa una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. En algunas realizaciones de la invención, el vector es un plásmido, es decir, un trozo de ADN circular de doble cadena en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. En algunas realizaciones de la invención, el vector es un vector viral, en el que se pueden ligar

segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. En algunas realizaciones de la invención, los vectores son capaces de replicarse de forma autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un sitio de origen de replicación y vectores episomales de mamíferos). En otras realizaciones de la invención, los vectores (por ejemplo, los vectores no episomales de mamíferos) pueden integrarse en el genoma de una célula huésped tras su introducción en una célula huésped, y por tanto se replican junto con el gen huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de los genes a los que están unidos de forma operativa. Dichos vectores se denominan aquí "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores de expresión").

La presente invención se refiere a vectores que comprenden las moléculas de ácido nucleico anteriores que codifican cualquiera de los anticuerpos bivalentes biespecíficos anteriores o porciones estructurales de los mismos seleccionadas entre:

una primera secuencia de aminoácidos de cadena ligera que comprende un dominio variable de cadena ligera y un dominio constante de cadena ligera;

una primera secuencia de aminoácidos de la cadena pesada que comprende un dominio variable de cadena pesada y dominios constantes de cadena pesada de anticuerpo que incluyen un primer (CH1) dominio constante de cadena pesada y un monómero de fragmento Fc que comprende un segundo (CH2) y un tercer (CH3) dominio constante de cadena pesada;

una segunda secuencia de aminoácidos de cadena ligera que comprende un dominio variable de cadena ligera y un dominio constante que se selecciona del grupo

un primer dominio proximal de la membrana del CMH (complejo mayor de histocompatibilidad) o

un primer dominio próximo a la membrana de la proteína similar a CMH;

una segunda secuencia de aminoácidos de cadena pesada que comprende un dominio variable de cadena pesada y un dominio constante que se selecciona del grupo

un segundo dominio proximal de la membrana del CMH (complejo mayor de histocompatibilidad) o

un segundo dominio proximal a la membrana de proteína similar a CMH,

y un monómero de fragmento Fc que comprende dominios constantes de cadena pesada segundo (CH2) y tercero (CH3),

como se describe en este documento.

Los vectores de expresión incluyen plásmidos, retrovirus, adenovirus, virus adeno-asociados (AAV), virus de plantas, como el virus del mosaico de la coliflor, el virus del mosaico del tabaco, cósmidos, cromosoma artificial de levadura, episomas derivados del VEB, y similares. Las moléculas de ADN pueden ligarse a un vector de manera que las secuencias de control transcripcional y traslacional dentro del vector cumplan su función prevista de regular la transcripción y la traducción del ADN. Pueden elegirse un vector de expresión y secuencias de control de expresión que sean compatibles con la célula huésped de expresión utilizada. Las moléculas de ADN que codifican parcial o totalmente las secuencias de los dominios de unión primero y segundo (por ejemplo, las secuencias de cadena pesada y ligera cuando un dominio de unión comprende una secuencia de cadena pesada y ligera) pueden introducirse en vectores individuales. En una realización, cualquier combinación de dichas moléculas de ADN se introduce en el mismo vector de expresión. Las moléculas de ADN pueden introducirse en un vector de expresión por métodos estándar (por ejemplo, ligando sitios de restricción complementarios en un fragmento del gen del anticuerpo y en el vector, o ligando el extremo romo si no hay sitios de restricción).

En algunas realizaciones de la invención, un vector adecuado es uno que incluye sitios de restricción tales que cualquier secuencia VH o VL puede insertarse y expresarse fácilmente, como se ha descrito anteriormente. La poliadenilación y la terminación de la transcripción pueden producirse en un sitio cromosómico nativo, secuencia abajo de las regiones codificantes. Un vector de expresión recombinante también puede codificar un péptido señal que facilite la secreción de una cadena de anticuerpos a partir de una célula huésped. El gen de una cadena de anticuerpos puede clonarse en un vector de forma que el péptido señal esté unido en el marco al amino terminal de una cadena de inmunoglobulina. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína no inmunoglobulina).

En algunas realizaciones de la invención, además de los genes de la cadena de anticuerpos, el vector recombinante de expresión de la invención puede llevar secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de la cadena de anticuerpos en una célula huésped. Los expertos en la materia entenderán que el diseño de un vector de expresión, incluida la selección de las secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de una célula huésped para ser transformada, el nivel de expresión de una proteína deseada, etc. Las secuencias de control preferidas para una célula huésped de expresión en mamíferos incluyen elementos virales que aseguran altos niveles de expresión de proteínas en células de mamíferos, como promotores y/o potenciadores derivados de un LTR retroviral, citomegalovirus (CMV) (como un promotor/ potenciador de CMV), virus simiano 40 (SV40) (como un promotor/ potenciador de SV40), adenovirus, (por ejemplo, el promotor principal tardío del adenovirus (AdMLP)), poliomavirus y promotores fuertes de mamíferos como el promotor nativo de la inmunoglobulina o el promotor de la actina. Los métodos para expresar polipéptidos en células bacterianas o fúngicas, por ejemplo, células de levadura, también son bien conocidos en la técnica.

En algunas realizaciones de la invención, además de los genes de la cadena de anticuerpos y las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinante de la invención pueden llevar secuencias adicionales, como secuencias que regulan la replicación de un vector en las células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador de selección facilita la selección de las células huésped en las que se ha introducido un vector.

En algunas realizaciones de la invención, el vector puede incluir una secuencia de control de expresión. El término "secuencia de control de expresión", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a las secuencias de polinucleótidos que son necesarias para llevar a cabo la expresión y el procesamiento de las secuencias codificantes a las que se ligan. Las secuencias de control de expresión incluyen secuencias apropiadas de iniciación, terminación, promotoras y potenciadoras de la transcripción; señales eficientes de procesamiento del ARN, como señales de empalme y poliadenilación; secuencias que estabilizan el ARNm citoplasmático; secuencias que

mejoran la eficiencia de la traducción (es decir, la secuencia de consenso Kozak); secuencias que mejoran la estabilidad de la proteína; y, cuando se desea, secuencias que mejoran la secreción de la proteína. La naturaleza de dichas secuencias de control difiere según el organismo anfitrión; en procariotas, dichas secuencias de control generalmente incluyen el promotor del sitio de unión al ribosoma, y secuencias de terminación de la transcripción; en eucariotas, típicamente, dichas secuencias de control incluyen promotores y secuencias de terminación de la transcripción. El término "secuencias de control" incluye al menos todos los componentes cuya presencia es esencial para la expresión y el procesamiento, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líderes y secuencias compañeras de fusión.

Células huésped y método de producción de las mismas

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para producir una célula huésped para producir cualquiera de los anticuerpos quiméricos bivalentes biespecíficos anteriores e incluye la transformación de una célula con el vector de expresión anterior.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una célula huésped para producir cualquiera de los anticuerpos quiméricos bivalentes biespecíficos anteriores que comprende cualquiera de los ácidos nucleicos anteriores.

El término "célula huésped recombinante" (o simplemente "célula huésped"), tal y como se utiliza aquí, se refiere a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. La presente invención se refiere a células huésped, que pueden incluir, por ejemplo, un vector según la invención descrita anteriormente.

La presente invención se refiere además a células huésped que incluyen, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que codifica la primera cadena pesada del anticuerpo quimérico bivalente biespecífico según la invención, una secuencia de nucleótidos que codifica la primera cadena ligera del anticuerpo quimérico biespecífico bivalente según la invención, una secuencia de nucleótidos que codifica la segunda cadena pesada del anticuerpo quimérico bivalente biespecífico según la invención, o una secuencia de nucleótidos que codifica la segunda cadena ligera del anticuerpo quimérico

biespecífico bivalente según la invención o todas las cuatro secuencias anteriores. Debe entenderse que "célula huésped recombinante" y "célula huésped" se refieren no sólo a una célula particular, sino también a la progenie de dicha célula. Dado que pueden producirse modificaciones en las generaciones sucesivas debido a mutaciones o influencias ambientales, dicha progenie puede no ser, de hecho, idéntica a una célula parental; sin embargo, dichas células siguen estando incluidas en el alcance del término "célula huésped" tal y como se utiliza aquí.

Moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera o de la cadena pesada del anticuerpo biespecífico anterior, seleccionada entre:

una primera secuencia de aminoácidos de cadena ligera que comprende un dominio variable de cadena ligera y un dominio constante de cadena ligera;

una primera secuencia de aminoácidos de la cadena pesada que comprende un dominio variable de cadena pesada y dominios constantes de cadena pesada de anticuerpo que incluyen un primer (CH1) dominio constante de cadena pesada y un monómero de fragmento Fc que comprende un segundo (CH2) y un tercer (CH3) dominio constante de cadena pesada;

una segunda secuencia de aminoácidos de cadena ligera que comprende un dominio variable de cadena ligera y un dominio constante que se selecciona del grupo

un primer dominio proximal de la membrana del CMH (complejo mayor de histocompatibilidad) o

un primer dominio próximo a la membrana de la proteína similar a CMH;

una segunda secuencia de aminoácidos de cadena pesada que comprende un dominio variable de cadena pesada y un dominio constante que se selecciona del grupo

un segundo dominio proximal de la membrana del CMH (complejo mayor de histocompatibilidad) o

un segundo dominio proximal a la membrana de proteína similar a CMH;

y un monómero de fragmento Fc que comprende dominios constantes de cadena pesada segundo (CH2) y tercero (CH3),

y los vectores que comprenden estas moléculas de ácido nucleico pueden utilizarse para transfectar una célula de mamífero o una célula de éste, una planta o una célula de éste, una célula bacteriana o una célula de levadura adecuadas. La transformación puede llevarse a cabo mediante cualquier técnica conocida de introducción de polinucleótidos en una célula huésped. Los métodos para la introducción de polinucleótidos heterólogos en las células de mamíferos son bien conocidos en la técnica e incluyen la transfección mediada por dextrano, la transfección de complejos de polímeros catiónicos y ácidos nucleicos, la precipitación de fosfato de calcio, la transfección mediada por polbreno, la fusión de protoplastos, la encapsulación de los polinucleótidos en liposomas y la microinyección directa de ADN en los núcleos. Además, las moléculas de ácido nucleico pueden introducirse en las células de mamíferos mediante vectores virales.

Las líneas celulares de mamíferos utilizadas como huéspedes para la transformación son bien conocidas en la técnica e incluyen una pluralidad de líneas celulares inmortalizadas disponibles. Entre ellas se encuentran, por ejemplo, las células de ovario de hámster chino (CHO), las células NS0, las células SP2, las células HEK-293T, las células FreeStyle 293 (Invitrogen), las células NIH-3T3, las células HeLa, las células de riñón de hámster bebé (BHK), las células de riñón de mono verde africano (COS), las células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), las células A549 y otras líneas celulares. Las líneas celulares se seleccionan determinando qué líneas celulares tienen altos niveles de expresión y proporcionan las características necesarias de la proteína producida. Otras líneas celulares que pueden utilizarse son las de insectos, como las células Sf9 o Sf21. Cuando los vectores de expresión recombinantes que codifican el anticuerpo biespecífico anterior o una porción del mismo se introducen en células huésped de mamífero, el anticuerpo biespecífico anterior se produce cultivando las células huésped durante un periodo de tiempo suficiente para expresar el anticuerpo biespecífico anterior o una porción del mismo según la invención en las células huésped, o, más preferiblemente, secretar el anticuerpo biespecífico anterior en el medio de cultivo en el que se cultivan las células huésped. El anticuerpo biespecífico anterior puede aislarse del medio de cultivo utilizando técnicas estándar de purificación de proteínas. Las células huésped vegetales incluyen, por ejemplo, *Nicotiana,Arabidopsis*, lenteja de

agua, maíz, trigo, papa, etc. Las células huésped bacterianas incluyen las especies *Escherichia* y *Streptomyces*. Las células huésped de levadura incluyen *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* y Pichia pastoris.

Además, el nivel de producción del anticuerpo biespecífico de la invención a partir de una línea celular productora puede mejorarse utilizando una serie de técnicas conocidas. Por ejemplo, el sistema de expresión del gen de la glutamina sintetasa (el sistema GS) es un enfoque común para mejorar la expresión en ciertas condiciones. El sistema GS se discute total o parcialmente en relación con los números EP 0216846, 0256055, 0323997 y 0338841.

Es probable que el anticuerpo quimérico biespecífico de la invención en diferentes líneas celulares o células huésped tenga patrones de glicosilación diferentes entre sí. Sin embargo, el anticuerpo biespecífico aquí divulgado forma parte de esta invención, independientemente del estado de glicosilación de las moléculas de unión y, en general, de la presencia o ausencia de modificaciones postraduccionales.

La célula huésped mencionada no se refiere a una célula huésped producida con embriones humanos.

La célula huésped anterior no se refiere a una célula huésped producida mediante la modificación de la integridad genética de las células de la línea germinal humana.

Método de producción del anticuerpo

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para producir cualquiera de los anticuerpos quiméricos bivalentes biespecíficos anteriores que incluye los pasos de:

a) transformar una célula huésped

- con vectores de expresión que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican la primera cadena ligera y la primera cadena pesada del anticuerpo quimérico bivalente biespecífico según la invención,

- con vectores de expresión que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican la segunda cadena ligera y la segunda cadena pesada del anticuerpo quimérico bivalente biespecífico según la invención,

b) cultivar la célula huésped en condiciones adecuadas para la síntesis de dicho anticuerpo bivalente biespecífico; y

c) aislar dicho anticuerpo biespecífico bivalente del cultivo celular.

La presente invención se refiere a métodos para producir los anticuerpos quiméricos bivalentes biespecíficos según la presente invención. Una realización de la invención se refiere a un método para producir anticuerpos quiméricos bivalentes biespecíficos como se define en el presente documento, que comprende producir una célula huésped recombinante capaz de expresar el anticuerpo quimérico bivalente biespecífico, cultivar dichas células huésped en condiciones adecuadas para la expresión de los anticuerpos quiméricos biespecíficos bivalentes, y aislar los anticuerpos quiméricos biespecíficos resultantes. El anticuerpo quimérico bivalente biespecífico producido por dicha expresión en dichas células huésped recombinantes se denomina en el presente documento "anticuerpo quimérico bivalente biespecífico".

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para una mejor comprensión de la invención. Estos ejemplos son sólo para fines ilustrativos y no deben interpretarse de ninguna manera como una restricción del alcance de la invención.

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patentes citadas en esta especificación se incorporan aquí por remisión. Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo para fines de claridad de la comprensión, será fácilmente aparente para aquellos de habilidad ordinaria en la técnica a la luz de las enseñanzas de esta invención que se pueden hacer a la misma ciertos cambios y modificaciones sin apartarse del espíritu o del alcance de las realizaciones anexas.

Materiales y métodos generales

Técnicas de ADN recombinante

Se utilizaron métodos estándar para manipular el ADN como se describe en Sambrook, J. et al, Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor

Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Los reactivos de biología molecular se utilizaron según los protocolos del fabricante.

Síntesis genética

Los segmentos génicos deseados se prepararon a partir de oligonucleótidos fabricados por síntesis química. Los segmentos génicos de 300 a 4.000 pb de longitud, que estaban flanqueados por sitios de restricción singulares, se ensamblaron mediante el recocido y la ligación de oligonucleótidos, incluyendo la amplificación por PCR, y posteriormente se clonaron a través de los sitios de restricción especificados. Las secuencias de ADN de los fragmentos genéticos subclonados se confirmaron mediante la secuenciación del ADN.

Determinación de la secuencia de ADN

Las secuencias de ADN se determinaron mediante secuenciación de Sanger.

Análisis de secuencias de ADN y proteínas y gestión de datos de secuencias

Se utilizó el paquete de software Ylab2 (Biocad) para la creación de secuencias, mapeo, análisis, anotación e ilustración.

Vectores de expresión

Se aplicaron variantes de plásmidos de expresión para la expresión transitoria de los anticuerpos, proteínas similares a los anticuerpos y antígenos en células eucariotas (por ejemplo, células CHO). Además del casete de expresión para una proteína objetivo, los vectores (plásmidos) contenían: un origen de replicación que permite la replicación de dicho plásmido en *E. coli*, genes que confieren resistencia en *E. coli* a diversos antibióticos (por ejemplo, a la ampicilina y a la kanamicina).

Los genes de fusión que comprenden las cadenas de anticuerpos descritas anteriormente se generaron mediante PCR y/o síntesis genética y se ensamblaron con métodos y técnicas conocidos mediante la conexión de los segmentos de ácido nucleico correspondientes, por ejemplo, utilizando sitios de restricción únicos en los vectores

correspondientes. Las secuencias de ácidos nucleicos subclonados se verificaron mediante la secuenciación del ADN. Las cantidades necesarias de plásmidos para la transfección transitoria se generaron en cultivos celulares de *E. coli* y se aislaron mediante técnicas conocidas.

Generación y purificación de antígenos recombinantes en cultivo en suspensión de células de mamífero

Las proteínas recombinantes se produjeron en células de líneas celulares establecidas obtenidas de células de ovario de hámster chino (línea CHO). El cultivo en suspensión se llevó a cabo en matraces en un incubadora con agitador orbital utilizando medios libres de suero suplementados con L-glutamina 8 mM y Pluronic 68 1 g/l . Para la expresión transitoria, se transfectaron células (2-2,2×10^6 células/ml) utilizando polietilenimina lineal. 9 días después de la transfección, el líquido de cultivo se separó de las células por filtración a través de un filtro de lecho profundo de 0,5/0,22 µm.

Las proteínas marcadas con histidina se purificaron mediante cromatografía de quelatos metálicos. Las proteínas purificadas pasaron por filtros de 0,22 µm y se almacenaron a -70 °C.

La pureza de la solución proteica resultante se evaluó mediante electroforesis en gel SDS; la electroforesis se realizó en gel de poliacrilamida desnaturalizante al 12% suplementado con mercaptoetanol y en gel de poliacrilamida nativa al 8%.

Producción de anticuerpos y proteínas similares a los anticuerpos en cultivos de suspensión de células de mamíferos

Los anticuerpos de control, los anticuerpos quiméricos biespecíficos según la invención y las proteínas similares a los anticuerpos se produjeron en células de una línea celular permanente obtenida de células de ovario de hámster chino (línea CHO). El cultivo en suspensión se llevó a cabo en matraces en un incubadora con agitador orbital utilizando medios libres de suero suplementados con L-glutamina 8 mM y Pluronic 68 1 g/l . Para la expresión transitoria, se transfectaron células (2-2,2×10^6 células/ml) utilizando polietilenimina lineal. La relación ADN/PEI fue de 1:3/1:10. 9 días después de

la transfección, el líquido de cultivo se separó de las células por filtración a través de un filtro de lecho profundo de 0,5/0,22 µm, y a continuación se midió el título de proteínas en ForteBio utilizando la metodología estándar. El líquido de cultivo clarificado se hizo pasar por una columna de sorbente de afinidad a la Proteína A entre 10 y 20 mg por ml del sorbente, la columna se equilibró con tampón fosfato salino (PBS, pH 7,4). A continuación, se lavó la columna con 5 volúmenes de PBS para eliminar los componentes de unión no específica. La proteína unida se eluyó con un tampón de glicina 0,1 M (pH 3). El pico de elución de la proteína principal se recogió y se llevó a un pH de 6,8 a 7,0 utilizando un tampón Tris-HCl 1 M (pH 8). Todas las etapas se realizaron con un caudal de 110 cm/h. A continuación, la proteína se dializó en PBS (pH 7,4) mediante diálisis, se filtró (0,22 µm), se transfirió a tubos y se almacenó a -70°C.

La pureza de la solución proteica resultante se evaluó mediante electroforesis en gel SDS en condiciones reductoras y no reductoras, así como mediante cromatografía líquida de alto rendimiento con exclusión de tamaño (SE HPLC).

La HPLC SE se realizó en una columna TSK-Gel G3000SWXL, de 7,8x300 mm, tamaño de partícula: 5 µm, tamaño de poro: 250Å, y una precolumna TSK-Gel Guard SWxl.

Ejemplo 1. Selección de la sustitución del dominio CH1/CK en el anticuerpo biespecífico

Para la correcta heterodimerización de las cadenas pesadas y ligeras en el anticuerpo biespecífico, se sustituyó uno de los dos pares de dominios CH1/CK por dominios estructuralmente idénticos de otras proteínas (Fig. 1). Los dominios de sustitución adecuados se seleccionaron en tres pasos:

1) La pregeneración de un modelo tridimensional de los dominios CH1/CK;

2) alineación estructural de los modelos tridimensionales de los dominios CH1/CK con todos los objetos del Banco de Datos de Proteínas (www.rcsb.org), excepto anticuerpos y receptores de células T;

3) selección de una sustitución adecuada tras los resultados de la alineación estructural basada en la métrica RDCM y el número de aminoácidos que forman elementos de estructura secundaria idénticos

El primer paso, la pregeneración de un modelo tridimensional de los dominios CH1/CK, es la adición de los átomos que faltan en los dominios CH1/CK de la estructura PDBid 4nyl utilizando la herramienta Prepwizard de Schrodinger Suite. En el segundo paso, el modelo resultante se alineó alternativamente con todas las estructuras del Banco de Datos de Proteínas (excepto anticuerpos y receptores de células T) utilizando la herramienta Protein Structure Alignment de Schrodinger Suite. El grado de similitud entre una estructura arbitraria y el modelo de dominio CH1/CK se evaluó utilizando dos métricas 1) RDCM que refleja la raíz de la desviación cuadrática media para los átomos entre una estructura y otra estructura (para el cálculo se utilizaron los átomos de la columna vertebral de la cadena polipeptídica), 2) el número de aminoácidos que forman elementos idénticos de la estructura secundaria de la proteína siguiendo los resultados de la alineación. La Tabla 1 muestra los mejores resultados de la alineación utilizando la métrica RDCM.

Tabla 1. Estructuras PDB que demostraron la mejor calidad de alineación con los dominios CH1/CK del anticuerpo humano según la métrica RDCM. PdbID es un identificador de estructura en la base de datos PDB; RDCM es la raíz de la desviación cuadrática media de los átomos de la estructura respecto a los del modelo de dominio CH1/CK; nombre de la estructura es un encabezado de la base de datos PDB

pdbID	Aminoácidos de estructuras secundarias idénticas	RDCM, Å	Nombre de la estructura	Tipo de proteína
1ktd	101	3,253	ESTRUCTURA CRISTALINA DE LA MOLÉCULA CMH DE CLASE II IEK UNIDA AL PÉPTIDO CITOCROMO C DE LA PALOMA	CMH Clase II

4mdj	101	3,269	Receptor inmunológico	CMH Clase II
3qxd	101	3,526	F54C HLA-DR1 unida al péptido CLIP	CMH Clase II
1d5x	101	3,551	ESTRUCTURA CRISTALINA DE RAYOS X DE HLA-DR4 COMPLEJADA CON UN DIPÉPTIDO MIMÉTICO Y SEB	CMH Clase II
5wl1	103	3,585	Estructura cristalina de la CD1b humana en Complejo	Proteína CD1b similar al CMH
1gzq	102	3,594	CD1b en complejo con Fosfatidilinositol	Proteína CD1b similar al CMH
6c15	103	3,607	CD1c en complejo con fosfatidilcolina	Proteína CD1c similar al CMH
5j1a	108	3,639	Molécula de presentación de antígenos	Proteína CD1a similar al CMH
4mx7	106	3,647	Estructura de la CD1d de ratón en complejo con ácido dioleoil-fosfatídico	Proteína similar al CMH de la CD1d
4i0p	101	3,689	HLA-DO en complejo con HLA-DM	CMH Clase II
1bx2	105	3,690	ESTRUCTURA CRISTALINA DE HLA-DR2 (DRA*0101, DRB1*1501) EN COMPLEJO CON UN PÉPTIDO DE LA PROTEÍNA BÁSICA DE LA MIELINA HUMANA	CMH Clase II
4e0r	108	3,739	Estructura de la molécula del CMH de clase I de gallina BF2*0401	CMH de clase I
5tw5	101	3,794	Estructura de la CD1d de ratón con glicoesfingolípido JJ112 unido	Proteína similar al CMH de la CD1d

3gmo	102	3,814	Estructura de la CD1d de ratón en complejo con C8PhF	Proteína similar al CMH de la CD1d
4f7c	107	3,847	Estructura cristalina de la CD1d bovina con C12-di-sulfato unido	Proteína similar al CMH de la CD1d
1gzp	101	3,858	CD1b en complejo con gangliósido GM2	Proteína CD1b similar al CMH
1a6z	109	4,041	PROTEÍNA HFE DE LA HEMOCROMATOSIS (HUMANA)	Proteína similar al CMH del HFE
1s7q	112	4,069	Estructuras cristalinas del complejo mayor de histocompatibilidad H-2Kb murino de clase I en complejo con el péptido índice gp33 derivado del LCMV y tres de sus variantes de escape	CMH de clase I

Las estructuras que presentan la máxima similitud estructural con los dominios CH1/CK según la métrica RDCM pertenecen a las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad de clases I y II (CMH), así como a sus análogos estructurales, CD1 y HFE. Basándose en los valores comparables del grado de similitud estructural (RDCM y el número de aminoácidos de estructuras secundarias idénticas), se puede seleccionar cualquiera de las proteínas mencionadas para su sustitución. Para otros trabajos que impliquen sustituciones de los dominios CH1/CK y con fines ilustrativos, elegimos la CD1b, en particular los dominios proximales a la membrana de la misma.

Ejemplo 2. Selección de la ubicación del enlace disulfuro entre las cadenas pesadas y ligeras en la molécula del anticuerpo con la sustitución de CH1/CK por dominios proximales de la membrana del CMH o proteínas similares al CMH.

Una molécula de anticuerpo humano de isotipo IgG está formada por dos cadenas ligeras y dos pesadas. Cada una de las dos cadenas ligeras del anticuerpo está conectada

a la cadena pesada a través de un puente SS, un enlace covalente entre los átomos de azufre de los residuos de cisteína. Este enlace está formado (en el caso del isotipo IgG1) por el residuo de cisteína cercano al extremo C-terminal de la cadena ligera y el residuo de cisteína proximal al extremo N de la región bisagra de la cadena pesada.

Los dominios proximales a la membrana del CMH y de las proteínas similares al CMH están conectados sólo por enlaces no covalentes y no forman puentes SS entre ellos; por lo tanto, la sustitución de los dominios CH1/CK por los dominios proximales a la membrana del CMH puede reducir potencialmente la estabilidad térmica de la molécula de anticuerpo y el rendimiento del producto objetivo durante la generación. Para evitarlo, se requirió una sustitución puntual de cisteína en la cadena ligera de la molécula de anticuerpo quimérico, en una posición adecuada para la formación de un puente SS con un residuo de cisteína proximal al extremo N de la región bisagra.

La posición para la introducción de un residuo de cisteína en el dominio proximal de la membrana del CMH o de la proteína similar al CMH se seleccionó basándose en la alineación estructural del CMH o de la proteína similar al CMH con una molécula de anticuerpo de longitud completa. Como resultado de la alineación, se introdujo el residuo de cisteína en el dominio proximal a la membrana del CMH o de la proteína similar al CMH, situado en el lugar del dominio inicial CL (CK) del anticuerpo, en la posición proximal al residuo de cisteína de la región bisagra que forma un puente SS con una cadena ligera en la molécula nativa del anticuerpo isotipo IgG1. Por analogía con la cadena ligera del anticuerpo nativo, el residuo de cisteína introducido es terminal. Para que la distancia entre los residuos de cisteína sea suficiente para establecer un enlace disulfuro, la cadena ligera se amplió en dos aminoácidos GS. La Fig. 2 muestra de forma esquemática la ubicación del puente SS entre las cadenas pesadas y ligeras en el anticuerpo quimérico con dominios CH1-CK sustituidos por los dominios proximales de membrana de la proteína CD1b similar al CMH.

Ejemplo 3

Producción de construcciones genéticas para generar anticuerpos quiméricos bivalentes biespecíficos

Para producir construcciones que codifiquen secuencias de las primeras cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo que se unen específicamente al primer antígeno, se generaron productos de PCR que comprenden los genes de los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos utilizando cebadores que comprenden sitios de restricción. El dominio variable de la cadena pesada se clonó en el vector pSXn-HChole-NR_VH1 utilizando los sitios de restricción SalI/XbaI. El dominio variable de la cadena ligera se clonó en el vector pSXn-CL-BR_VL1 utilizando sitios de restricción SalI/XbaI.

Para producir construcciones que codifican las secuencias de las segundas cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo que se unen específicamente al segundo antígeno, sintetizamos construcciones que comprenden los genes de los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos y los dominios proximales a la membrana de la secuencia CD1 humana(https://www.rcsb.org/structure/5wl1), incluyendo o sin varias modificaciones.

La secuencia se sintetizó a partir de oligonucleótidos mediante PCR utilizando cebadores que comprendían sitios de restricción. El dominio variable de la cadena pesada con el primer dominio proximal a la membrana de la secuencia de la CD1 humana, con o sin modificaciones, se clonó en el vector pSX-FCknob-PR utilizando sitios de restricción SalI/XbaI. El dominio variable de la cadena ligera con el segundo dominio proximal a la membrana de la secuencia de la CD1 humana, con o sin modificaciones, se clonó en el vector pSX-HR utilizando los sitios de restricción Sal1/Xba1.

Los cuatro vectores anteriores se combinaron en la etapa de transfección para producir los anticuerpos quiméricos bivalentes biespecíficos según la invención.

Las cantidades necesarias de todos los plásmidos mencionados se generaron en células *E.Coli* y se purificaron utilizando el kit Maxiprep Qiagen.

Ejemplo 4. Efecto del enlace disulfuro introducido en el ensamblaje del anticuerpo quimérico de longitud completa.

Para comprobar la operatividad del enlace disulfuro introducido, generamos modelos de anticuerpos quiméricos monoespecíficos. Este formato es un anticuerpo

compuesto por dos cadenas pesadas y dos ligeras, en el que los dominios CH1 de la cadena pesada y CK de la cadena ligera han sido sustituidos por β2 microglobulina y el dominio α3 de la proteína CD1b, respectivamente.

Las secuencias de los dominios variables VH (SEQ ID NO: 103) y VL (SEQ ID NO: 104) se obtuvieron del anticuerpo Prolgolimab (CJSC Biocad). En la primera variante de la muestra no había ningún enlace disulfuro entre las cadenas pesadas y ligeras. En la segunda variante se añadió cisteína al extremo C de la cadena ligera (como se describe en el Ejemplo 2); se considera que la cisteína forma un enlace disulfuro con la cisteína de la región bisagra superior, estabilizando así el heterodímero de las cadenas pesada y ligera.

La Fig. 3 muestra el resultado de la electroforesis en gel SDS no reductor de las muestras generadas. La muestra de prolgolimab (IgG1 clásica) se aplicó en el carril 3 como control. Los resultados muestran que la molécula de longitud completa se ensambló sólo en presencia de un enlace disulfuro adicional (carril 2), mientras que en su ausencia sólo observamos un fragmento cuya movilidad corresponde al dímero de la cadena pesada (carril 3).

También generamos un anticuerpo quimérico con orientación inversa de las unidades de dimerización en relación con las cadenas pesadas y ligeras (el dominio CH1 de la cadena pesada y el dominio CK de la cadena ligera fueron sustituidos por el dominio α3 de la proteína CD1b y microglobulina β2, respectivamente, véase la Fig. 1B). La Fig. 3 (carril 4) muestra el resultado de la electroforesis en gel SDS para la muestra en condiciones no reductoras; los resultados confirman que esta orientación también permite ensamblar los anticuerpos quiméricos.

Ejemplo 5. Verificación del efecto de la unidad de dimerización basada en la proteína CMH o similar al CMH en el emparejamiento correcto entre las cadenas pesadas y ligeras.

Para demostrar el funcionamiento de la unidad de dimerización basada en la proteína CMH o similar al CMH, en particular para evitar el emparejamiento incorrecto entre las cadenas ligeras y las cadenas pesadas inadecuadas, realizamos el siguiente

experimento con moléculas monoespecíficas. Generamos 4 grupos de moléculas de la siguiente manera:

1. Moléculas que tienen una combinación "correcta" de VH y VL y un par "incorrecto" de dominios constantes.

2. Moléculas que tienen una combinación "incorrecta" de VH y VL y un par "correcto" de dominios constantes.

3. Moléculas que tienen una combinación "incorrecta" de VH y VL y un par "incorrecto" de dominios constantes.

4. Moléculas de control que incluyen un anticuerpo de formato IgG1 clásico y un anticuerpo quimérico en el que los dominios constantes han sido sustituidos por los dominios proximales a la membrana del CMH o proteínas similares al CMH (en este caso, microglobulina β2 y el dominio α3 de la proteína CD1b).

La combinación "correcta" de VH y VL significa un par de VH y VL obtenido de un solo anticuerpo. La combinación "incorrecta" de VH y VL significa que el VH y el VL se obtienen de anticuerpos distintos.

El par "correcto" de dominios constantes significa un par de CH1-CK o un par de dominios de interacción de proteínas similares al CMH (en este caso, microglobulina β2 y el dominio α3 de la proteína CD1b). El par "incorrecto" de dominios constantes significa los pares CH1-CD1b o β2 microglobulina-CK.

En la Fig. 4 se muestra el esquema general del experimento. Las secuencias de dominio variable del anticuerpo Prolgolimab se utilizaron como dominios variables VH1 y VL1, las correspondientes secuencias de dominio variable del anticuerpo Ocrelizumab (Genentech) se utilizaron como dominios variables VH2 y VL2.

En la Tabla 2 se muestran los datos de productividad de las proteínas. Los resultados muestran que los candidatos que tienen el dominio constante CH1 en la cadena pesada del mismo y el dominio proximal a la membrana de la proteína CD1b en la cadena ligera del mismo demostraron una baja productividad (anticuerpos 01-001, 01-003, 01-008, 01-010). Esto es coherente con el hecho conocido de que el correcto plegamiento y exportación desde el retículo endoplásmico (RE) requiere la interacción entre el dominio CH1 y el dominio CL (Feige MJ, Groscurth S, Marcinowski M, Shimizu Y, Kessler H,

Hendershot LM, Buchner J. An unfolded CH1 domain controls the assembly and secretion of IgG antibodies. Mol Cell. 2009 Jun 12;34(5):569-79. doi: 10.1016/j.molcel.2009.04.028. PMID: 19524537; PMCID: PMC2908990). Los anticuerpos 01-002 y 01-009 no pasaron dicho control de calidad en el RE y demostraron una productividad superior a 200 mg/l; sin embargo, a pesar de los altos niveles de productividad, su movilidad durante el PAGE no se correspondía con la de una molécula de longitud completa (Fig. 5A, carriles 2, 5).

Tabla 2. Productividad de los anticuerpos quiméricos monoespecíficos modelo. VH es el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo, VL es el dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo, CH1 es el primer dominio constante de la cadena pesada del anticuerpo, CK es el dominio constante de la cadena ligera del anticuerpo, b2M es β2 microglobulina, CD1b es el dominio α3 de la proteína CD1b.

Anticuerpo	Grupo experimental	Cadena pesada (VH_CH1)	Cadena ligera (VL_CK)	Productividad en el día 9, mg/l
01-001	1	Prolgolimab_CH1	Prolgolimab_CD1b	13,6
01-002	1	Prolgolimab_b2M	Prolgolimab_CK	230,83
01-003	1	Ocrelizumab_CH1	Ocrelizumab_CD1b	12,97
01-004	2	Prolgolimab_CH1	Ocrelizumab_CK	221,7
01-005	2	Prolgolimab_b2M	Ocrelizumab_CD1b	214,8
01-006	2	Ocrelizumab_CH1	Prolgolimab_CK	328,87
01-007	2	Ocrelizumab_b2M	Prolgolimab_CD1b	201,7
01-008	3	Prolgolimab_CH1	Ocrelizumab_CD1b	7,31
01-009	3	Prolgolimab_b2M	Ocrelizumab_CK	200,47
01-010	3	Ocrelizumab_CH1	Prolgolimab_CD1b	33,53
01-011	Control	Prolgolimab_b2M	Prolgolimab_CD1b	293,63
01-012	Control	Prolgolimab_CH1	Prolgolimab_CK	284,03

En la Fig. 5 se muestran los resultados de la electroforesis en gel SDS en condiciones no reductoras. Según los resultados, la movilidad electroforética de los anticuerpos del grupo 1 (Fig. 5A carriles 1, 2, Fig. 5B carril 1) y del grupo 3 (Fig. 5A carriles 4,5, Fig. 5B carril 1) era mayor que la de una molécula de longitud completa (Fig. 5B carril 2), lo que indica que las moléculas no se ensamblaron. A pesar de que las

secuencias VH y VL se obtuvieron de anticuerpos distintos, la movilidad electroforética de los anticuerpos del grupo 2 (Fig. 5B carriles 2, 3, 4, 5 (igual que la Fig. 5A carril 3)) corresponde a la movilidad de una molécula de longitud completa (Fig. 5B carril 2). Como era de esperar, se ensamblaron los anticuerpos del grupo de control (carril 2 de la Fig. 5B, carril 6 de la Fig. 5A (igual que el carril 6 de la Fig. 5B)

Los datos resultantes indican que la unidad de dimerización basada en los dominios proximales a la membrana del CMH o proteínas similares al CMH impide la formación de pares incorrectos entre las cadenas pesadas y ligeras cuando las cadenas incluyen dominios constantes de distinta naturaleza.

Ejemplo 6. Generación de anticuerpos quiméricos bivalentes biespecíficos que comprenden una unidad de dimerización similar al CMH.

Para verificar la universalidad del enfoque propuesto como solución de plataforma para ensamblar moléculas biespecíficas utilizando cualquier par de fragmentos de unión al antígeno (en adelante, fragmentos variables de cadena ligera y pesada), elegimos tres pares aleatorios de fragmentos variables de cadena ligera y pesada de anticuerpos conocidos (véase la Tabla 3) y los utilizamos para generar 6 anticuerpos quiméricos biespecíficos. En la Tabla 3 se muestran los resultados de la productividad de las proteínas producidas. En la Fig. 6 se muestran los resultados de la electroforesis en gel SDS de las muestras generadas en condiciones no reductoras y reductoras. En las seis muestras existe una banda principal de aproximadamente 150 kDa, que corresponde a una molécula de longitud completa. En la Tabla 3 también se muestran los resultados de la pureza de la muestra según HPLC SE.

Tabla 3. Productividad y pureza de anticuerpos quiméricos biespecíficos producidos mediante unidades de dimerización basadas en dominios de los dominios proximales de la membrana de proteínas similares al CMH.

Muestra	Primer par de fragmentos variables de	Segundo par de fragmentos variables de	Productividad, día 9, mg/l	Pureza por HPLC SE		
				Agregados, %	Monómeros, %	Fragmentos, %

	cadena ligera y pesada dentro de Fab	cadens ligera y pesada y unidad de dimerización similar al CMH				
02-004	Prolgolimab	Ocrelizumab	188,6	14,22	72,94	12,84
02-005	Ocrelizumab	Prolgolimab	224,3	7,1	90,4	2,6
02-006	Prolgolimab	Anti-CSF1R	83,2	14,7	78,2	7,1
02-007	Anti-CSF1R	Prolgolimab	241,9	7,0	81,7	11,4
02-008	Ocrelizumab	Anti-CSF1R	141,0	9,0	87,1	3,9
02-009	Anti-CSF1R	Ocrelizumab	205,2	5,37	85,74	8,89

Ejemplo 7 Determinación de la afinidad de anticuerpos quiméricos biespecíficos de longitud completa en Forte Bio Octert RED 384

Para verificar que los anticuerpos quiméricos biespecíficos generados no han perdido la capacidad de unión al antígeno, realizamos un análisis de afinidad en Forte Bio Octert RED 384. Para los anticuerpos 02-004 y 02-005, se midió la afinidad al dominio extracelular de la proteína PD-1 humana (hPD1ex-H6F) y al péptido biotinilado [NH2]CEPANPSEKNSPSTQYCYSIQS[CH2CH2]biotina que comprende en la secuencia de aminoácidos un fragmento de la secuencia CD20 humana (en lo sucesivo denominado péptido CD20); para los anticuerpos 02-006 y 02-007, se midió la afinidad al dominio extracelular de la proteína PD-1 humana (hPD1ex-H6F) y al dominio extracelular de la proteína CSF1R humana (hCSF1R_His); para los anticuerpos 02-008 y 02-009, se midió la afinidad al dominio extracelular de la proteína CSF1R humana (hCSF1R_His) y al péptido CD20.

La secuencia de aa 20-512 de la proteína humana CSF1R con etiquetas C-terminal His y FLAG, peso molecular 57,4 kDa, se utilizó como antígeno hCSF1R. La secuencia de aa 21-170 de la proteína humana PD-1 con etiquetas C-terminal His y FLAG, peso molecular 20,6 kDa, se utilizó como antígeno hPD-1ex-H6F (ver Tabla 6).

Las secuencias genéticas que codifican antígenos se sintetizaron *de novo,* se clonaron en un vector de expresión, se generaron en células CHO y se purificaron mediante cromatografía de afinidad, como se describe en los ejemplos generales.

Los experimentos se llevaron a cabo utilizando una solución tampón cinética (en lo sucesivo denominada 1xKB) con la siguiente formulación Na_2HPO_4 4,3 mM; NaCl 136,9 mM, KH_2PO_4 1,5 mM; KCl 2,7 mM; la fracción de volumen de Tween 20 añadido fue del 0,1%; la fracción de masa de ASB (albúmina de suero bovino) añadida fue del 0,1%; pH 7,4. Antes de la medición, los sensores ProA se regeneraron con una solución de glicina 50 mM y ácido clorhídrico, pH 1,8 (5 segundos en la solución regeneradora, 5 segundos en 1xKB, tres repeticiones).

En el caso de los antígenos hPD1ex-H6F y hCSF1R_His, los biosensores de Proteína A (ProA) (ForteBio) se sumergieron en una solución con anticuerpos a una concentración de 10 μg/ml durante 60 segundos para inmovilizarlos. El punto de referencia se registró en 1xKB durante 60 segundos. A continuación, los sensores cargados con el anticuerpo se sumergieron en pocillos que contenían una solución del antígeno objetivo (analito) en un tampón cinético durante 90 segundos. Se realizaron mediciones para soluciones con el analito hPD1ex-H6F a concentraciones de 2,50 μg/ml (121,4 nM), 1,25 μg/ml (60,7 nM), 0,625 μg/ml (30,35 nM). Se realizaron mediciones para soluciones con el analito hCSF1R_His a concentraciones de 2,50 μg/ml (43,6 nM), 1,25 μg/ml (21,8 nM), 0,625 μg/ml (10,9 nM). Luego detectamos la disociación del complejo en 1xKB durante 210 s para hPD1ex-H6F, 300 s para hCSF1R_His.

Los sensores de referencia pasaron por todos los pasos que siguieron los sensores utilizados para registrar los sensogramas del analito, con la excepción del paso de asociación - en el paso de asociación, los sensores se sumergieron en una solución de 1xKB sin analito (las señales del sensor de referencia se midieron en paralelo con el registro de los sensogramas principales). La señal de referencia se restó de la señal recibida en los sensores que interactuaron con el analito durante el procesamiento de los sensogramas.

Para comprobar la interacción inespecífica entre el analito y los sensores, utilizamos un sensor sin anticuerpos (en el paso de carga, el sensor se sumergió en una solución de 1xKB; todos los demás pasos son idénticos a los utilizados para el sensor cargado con anticuerpos).

En el caso del péptido CD20 biotinilado, el péptido a una concentración de 5 µg/ml se inmovilizó en la superficie de los sensores SAX (biosensores de estreptavidina de alta precisión (SAX), ForteBio) durante 120 segundos. El punto de referencia se registró en una solución 1xKB durante 120 segundos. Los sensores que contenían el péptido cargado se sumergieron en pocillos que contenían la solución de anticuerpos (analito) en 1xKB durante 15 segundos. Se realizaron mediciones para las soluciones con analito (anticuerpos en el caso del péptido CD20) a concentraciones de 150 µg/ml, 75 µg/ml, 37,5 µg/ml. La disociación del complejo se registró en 1xKB durante 120 segundos.

Todas las mediciones se realizaron a 30 °C y la velocidad de mezcla orbital fue de 1.000 revoluciones por minuto.

Para obtener los valores numéricos de las constantes cinéticas (k_{on} es la constante de velocidad de activación/asociación, kd_{is} es la constante de velocidad de disociación, KD es la constante de disociación de equilibrio o constante de afinidad), los sensogramas resultantes se procesaron según el modelo de interacción 1:1 utilizando Global Fit (selección de un conjunto de constantes kon, kdis, KD para analizar varios sensogramas de diferentes concentraciones) del software ForteBio Octet Data Analysis 9.0. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Constantes cinéticas k_{on}, k_{dis}, KD para las interacciones entre los anticuerpos 02-004 al 02-009 y los antígenos objetivo.

Anticuerpo	Antígeno	KD (M)	k_{on} (M-1c-1)	k_{dis} (c-1)	R^2
02-004	hPD1ex-H6F	3,49E-09	2,16E+05	7,53E-04	0,9916
	Péptido CD20	1,27E-06	1,88E+05	2,38E-01	0,9781
02-005	hPD1ex-H6F	5,69E-09	1,78E+05	1,01E-03	0,9894
	Péptido CD20	1,12E-06	3,05E+05	3,42E-01	0,9789
02-006	hPD1ex-H6F	2,51E-09	2,75E+05	6,91E-04	0,9867
	hCSF1R_His	7,97E-10	3,59E+05	2,86E-04	0,9985
02-007	hPD1ex-H6F	4,49E-09	2,42E+05	1,09E-03	0,9873
	hCSF1R_His	8,31E-10	3,78E+05	3,14E-04	0,9986
02-008	Péptido CD20	8,92E-07	3.69E+05	3,29E-01	0,9696
	hCSF1R_His	5,49E-10	4,29E+05	2,36E-04	0,9982
02-009	hCSF1R_His	4,20E-10	5,00E+05	2,10E-04	0,9984

	Péptido CD20	8,20E-07	2,16E+05	1,77E-01	0,9780

La Tabla 5 muestra los resultados de la verificación de la interacción inespecífica entre el analito y los sensores no cargados. No hubo interacción inespecífica entre el analito y los sensores no cargados.

Tabla 5. Resultados de la verificación de la interacción inespecífica entre el analito y los sensores no cargados

Tipo de sensor	Analito	Concentración, µg/ml	Señal, nm
ProA	hPD1ex-H6F	2,5	-0,023
ProA	hCSF1R_His	2,5	-0,0038
SAX	02-004	150	0,017
SAX	02-005	150	0,0048
SAX	02-008	150	0,0173
SAX	02-009	150	0,0112

Según los resultados, todos los anticuerpos quiméricos biespecíficos 02-004 al 02-009 demuestran una unión específica a los antígenos objetivo, y los valores numéricos de KD tienen el mismo orden de magnitud independientemente de la posición de los correspondientes fragmentos de unión al antígeno (ya sea dentro del fragmento Fab o dentro del fragmento tipo Fab que comprende la microglobulina β2 y el dominio α3 de la proteína CD1b, sustituyendo los dominios CK y CH1).

Ejemplo 8. Análisis de la unión inespecífica de anticuerpos quiméricos biespecíficos a antígenos no objetivo

El estudio experimental de la unión inespecífica de los anticuerpos quiméricos biespecíficos a los antígenos no objetivo se realizó en Forte Bio Octert RED 384.

Los biosensores de la Proteína A (ProA) (ForteBio) se sumergieron en una solución que contenía anticuerpos a una concentración de 10 µg/ml durante 150 segundos para inmovilizarlos. El punto de referencia se registró en una solución 1xKB durante 30 segundos. A continuación, los sensores cargados con anticuerpos se sumergieron en pocillos que contenían antígenos no objetivo a una concentración de 30 µg/ml durante

150 segundos. A continuación, se registró la disociación del complejo durante 30 segundos.

Los sensores de referencia pasaron por todos los pasos que siguieron los sensores utilizados para registrar los sensogramas del analito, con la excepción del paso de asociación - en el paso de asociación, los sensores se sumergieron en una solución tampón cinética sin analito (las señales del sensor de referencia se midieron en paralelo con el registro de los sensogramas principales). La señal de referencia se restó de la señal recibida en los sensores que interactuaron con el analito durante el procesamiento de los sensogramas.

El panel de antígenos incluía: hAng2_H6F, hPD1ex-H6F, hCSF1R_His, IL5R-His, hIL4R-His, hCD38-Avi, C-Avi-His-TEVs-HSA_hBCMA, Her3-H6F, hisOX40, Macaca CSF1R_C-His (ver Tabla 6). Cada anticuerpo estudiado en el panel de antígenos tiene un antígeno específico (objetivo), los resultados de la interacción con el antígeno objetivo se dan como control positivo.

Los sensogramas se procesaron con el software ForteBio Octet Data Analysisn 9.0. Para informar de la ausencia de interacción inespecífica, se comprobó el nivel de señal registrado al final del paso de asociación (el parámetro de respuesta). En la Tabla 7 se muestran los resultados de la verificación de la unión de los anticuerpos quiméricos biespecíficos. El experimento ha revelado que no hay interacción entre los anticuerpos 02-004 al 02-009 y los antígenos no objetivo.

Tabla 6. Composición de los antígenos

Antígeno	Nombre de la proteína	ID UNIPROT	Aminoácidos
PD1ex-H6F	Proteína de muerte celular programada 1 (Homo sapiens)	Q15116	21-170
hCD38-Avi	ADP-ribosil ciclasa/ADP-ribosa hidrolasa cíclica 1 (Homo sapiens)	P28907	43-300
Her3-H6F	Tirosina proteína quinasa receptora erbB-3 (Homo sapiens)	P21860	21-643
IL4R-His	Subunidad alfa del receptor de interleucina 4 (Homo sapiens)	P24394	27-227
hAng-H6F	Angiopoyetina-2 (Homo sapiens)	O15123	19-496
His-OX40	Miembro 4 de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (Homo sapiens)	P43489	26-210

IL5R-His	Subunidad alfa del receptor de interleucina 5 (Homo sapiens)	Q01344	22-342
hCSF1R_His	Receptor del factor 1 de estimulación de colonias de macrófagos (Homo sapiens)	P07333	20-512
Macaca CSF1R_C-His	Receptor del factor 1 de estimulación de colonias de macrófagos (Macaca mulatta)	F7BTH9	20-513
C-Avi-His-TEVs-HSA_hBCMA	Miembro 17 de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (Homo sapiens)	Q02223	1-54

Tabla 7. Resultados de la verificación de la unión inespecífica de los anticuerpos quiméricos biespecíficos según la invención. Cada muestra para análisis en este panel de antígenos tiene uno o más antígenos específicos (objetivo), los resultados de la interacción con el antígeno objetivo se dan como un control positivo.

Anticuerpo	Analito (antígeno del panel)	Concentración (nM)	Nivel de la señal (nm)	Notas
02-004	hAng_H6F	510,2	0,0212	
	hPD1ex-H6F	1456	0,3503	Antígeno específico
	hCSF1R_His	522,5	0,0103	
	IL5R-His	757,6	0,0249	
	hIL4R-His	1154	0,0102	
	hCD38-Avi	854,7	0,004	
	C-Avi-His-TEVs-HSA_hBCMA	391,2	0,0108	
	Her3-H6F	420,8	0,0217	
	hisOX40	1310	0,0103	
	Macaca CSF1R_C-His	534,8	0,0236	
02-005	hAng_H6F	510,2	-0,0194	
	hPD1ex-H6F	1456	0,1386	Antígeno específico
	hCSF1R_His	522,5	0,0034	
	IL5R-His	757,6	0,0225	
	hIL4R-His	1154	-0,0057	
	hCD38-Avi	854,7	0,0072	

	C-Avi-His-TEVs-HSA_hBCMA	391,2	0,0021	
	Her3-H6F	420,8	-0,0128	
	hisOX40	1310	-0,0169	
	Macaca CSF1R_C-His	534,8	-0,0084	
02-006	hAng_H6F	510,2	-0,0239	
	hPD1ex-H6F	1456	0,1443	Antígeno específico
	hCSF1R_His	522,5	0,573	Antígeno específico
	IL5R-His	757,6	0,0153	
	hIL4R-His	1154	-0,0075	
	hCD38-Avi	854,7	0,0158	
	C-Avi-His-TEVs-HSA_hBCMA	391,2	0,0009	
	Her3-H6F	420,8	-0,0115	
	hisOX40	1310	-0,0094	
	Macaca CSF1R_C-His	534,8	0,5868	Antígeno específico
02-007	hAng_H6F	510,2	-0,0079	
	hPD1ex-H6F	1456	0,1716	Antígeno específico
	hCSF1R_His	522,5	0,5375	Antígeno específico
	IL5R-His	757,6	0,0221	
	hIL4R-His	1154	0,0051	
	hCD38-Avi	854,7	0,0088	
	C-Avi-His-TEVs-HSA_hBCMA	391,2	0,0061	
	Her3-H6F	420,8	-0,0063	
	hisOX40	1310	-0,0056	
	Macaca CSF1R_C-His	534,8	0,5347	Antígeno específico
02-008	hAng_H6F	510,2	-0,0124	
	hPD1ex-H6F	1456	-0,0033	

	hCSF1R_His	522,5	0,5477	Antígeno específico
	IL5R-His	757,6	0,0098	
	hIL4R-His	1154	-0,002	
	hCD38-Avi	854,7	0,0028	
	C-Avi-His-TEVs-HSA_hBCMA	391,2	-0,0023	
	Her3-H6F	420,8	-0,0108	
	hisOX40	1310	-0,012	
	Macaca CSF1R_C-His	534,8	0,549	Antígeno específico
02-009	hAng_H6F	510,2	-0,0114	
	hPD1ex-H6F	1456	-0,0059	
	hCSF1R_His	522,5	0,5641	Antígeno específico
	IL5R-His	757,6	-0,0064	
	hIL4R-His	1154	-0,0036	
	hCD38-Avi	854,7	-0,0089	
	C-Avi-His-TEVs-HSA_hBCMA	391,2	-0,0154	
	Her3-H6F	420,8	-0,0161	
	hisOX40	1310	-0,0158	
	Macaca CSF1R_C-His	534,8	0,5307	Antígeno específico
Control negativo	hAng_H6F	510,2	0,0076	Verificación de la señal de interacción entre los sensores sin anticuerpos y los antígenos
	hPD1ex-H6F	1456	-0,0037	
	hCSF1R_His	522,5	0,0102	
	IL5R-His	757,6	0,0558	
	hIL4R-His	1154	0,0105	
	hCD38-Avi	854,7	0,002	
	C-Avi-His-TEVs-HSA_hBCMA	391,2	-0,008	
	Her3-H6F	420,8	-0,0146	
	hisOX40	1310	-0,0087	
	Macaca CSF1R_C-His	534,8	0,0024	

Ejemplo 9 Análisis de la unión simultánea de anticuerpos quiméricos biespecíficos según la invención a dos antígenos.

Los anticuerpos 02-006 y 02-007 fueron analizados para su unión simultánea a dos antígenos objetivo distintos (hPD1ex-H6F y hCSF1R_His) en Forte Bio Octet RED 384. El experimento se llevó a cabo en sensores AR2G (biosensores de segunda generación reactivos de aminas (AR2G), ForteBio). Los pasos del experimento se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Pasos del experimento para verificar la unión simultánea de anticuerpos quiméricos biespecíficos según la invención a dos antígenos distintos

Nro.	Paso del experimento	Duración del paso (s)	Notas
1	Punto de referencia	60	Etapa auxiliar, equilibrio en el agua, verificación de la señal registrada en los sensores
2	Activación	300	Solución acuosa de activadores EDC (clorhidrato de 1-(3-Dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida) 20 mM y sNHS (N-hidroxisulfosuccinimida) 10 mM
3	Carga	900	Carga de la proteína hPD1ex-H6F (15 µg/ml) en una solución tampón de acetato de sodio 10 mM pH 5,0
4	Desactivación	300	Etanolamina 1 M pH 8,5. Desactivación de grupos activos sin reaccionar en la superficie del sensor
5	Punto de referencia 2	300	Equilibración de los sensores en la solución tampón cinética
6	Carga 2	300	La carga del anticuerpo en los sensores se debe a la interacción con el hPD1ex-H6F inmovilizado en el sensor
7	Punto de referencia 3	15	Equilibración de los sensores en la solución tampón cinética, verificación de la velocidad de disociación del anticuerpo de los sensores
8	Asociación	60	Interacción con el hCSF1R_His
9	Disociación	30	Paso auxiliar, confirma la ausencia de disociación rápida tras la unión al hCSF1R_His

Los sensores se activaron en una solución acuosa que contenía EDC (clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida) 20 mM y sNHS(*N*-

hidroxisulfosuccinimida) 10 mM durante 300 s. El antígeno (hPD1ex-H6F) se cargó en la superficie de los biosensores en un tampón de acetato de sodio 10 mM con pH 5,0 durante 300 s. La concentración de proteína a cargar era de 15 μg/ml. Los centros activos sin reaccionar en las superficies del sensor se desactivaron en una solución acuosa de etanolamina 1M con pH 8,5 durante 300 s. El punto de referencia en el quinto paso del experimento y todos los pasos posteriores se llevaron a cabo en una solución tampón cinética (1xKB) con la siguiente formulación Na_2HPO_4 4,3 mM; NaCl 136,9 mM, KH_2PO_4 1,5 mM; KCl 2,7 mM; la fracción volumétrica de Tween 20 añadida fue del 0,1%; la fracción de masa de ASB añadida fue del 0,1%; pH 7,4. Tras registrar el punto de referencia (paso 5), se cargaron los anticuerpos en los sensores; la concentración del anticuerpo a cargar fue de 30 μg/ml (paso 6). A continuación se registró el tercer punto de referencia (paso 7). Este paso demuestra la ausencia de una desintegración rápida de la señal, lo que indica una interacción específica entre el anticuerpo cargado y el hPD1ex-H6F inmovilizado previamente en los sensores. En el siguiente paso de la asociación (paso 8), los sensores que contenían hPD1ex-H6F inmovilizado y los anticuerpos unidos se sumergieron en una solución de antígeno hCSF1R_His a una concentración de 100 μg/ml. La amplificación de la señal en este paso se debe a la presencia de anticuerpos cargados en los sensores, un fragmento FAB al antígeno hCSF1R_His.

Los sensogramas se analizaron con el software ForteBio Octet Data Analysisn 9.0. Las principales conclusiones se recogen en la Tabla 9. En la Fig. 7 se muestran los sensogramas que muestran los pasos (etapas) del experimento. Siguiendo los resultados, las muestras 02-006 y 02-007 demuestran una unión simultánea a los antígenos hPD1ex-H6F y hCSF1R_His.

Tabla 9. Resultados del experimento de interacción simultánea de los anticuerpos 02-006 y 02-007 con dos antígenos distintos (hPD1ex-H6F y hCSF1R_His).

Anticuerpo analizado	Proteínas cargadas en sensores	Asociación	Nivel de la señal (nm)	Notas

02-006	HPD1ex-H6F inmovilizado cargado con el anticuerpo 02-006	hCSF1R_His (100 µg/ml)	0,1375	Demuestra la interacción simultánea con dos antígenos distintos (hPD1ex-H6F y hCSF1R_His)
		1xKB	-0,0194	
02-007	HPD1ex-H6F inmovilizado cargado con el anticuerpo 02-007	hCSF1R_His (100 µg/ml)	0,0757	Demuestra la interacción simultánea con dos antígenos distintos (hPD1ex-H6F y hCSF1R_His)
		1xKB	-0,0125	
Verificación de la interacción no específica entre el analito (hCSF1R_His) y los sensores cargados con hPD1ex-H6F	HPD1ex-H6F inmovilizado no cargado con anticuerpos	hCSF1R_His (100 µg/ml)	-0,0023	Este control demuestra que los sensores que contienen hPD1ex-H6F inmovilizado no interactúan con hCSF1R_His cuando no están cargados con anticuerpos

Según los resultados, los anticuerpos 02-006 y 02-007 demuestran una unión simultánea a los antígenos hPD1ex-H6F y hCSF1R_His.

Ejemplo 10. Análisis de los pesos moleculares de los anticuerpos quiméricos biespecíficos según la invención mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución de fase inversa (RP UHPLC) con detección por espectrometría de masas

Para confirmar el correcto ensamblaje de las moléculas, realizamos un análisis de los pesos moleculares de los anticuerpos quiméricos biespecíficos de longitud completa según la invención. Este método permite identificar los anticuerpos quiméricos biespecíficos de longitud completa según la invención que constan de 4 cadenas distintas y distinguirlos de los subproductos formados a partir de otro conjunto de cadenas. Estos datos, combinados con los obtenidos en el Ejemplo 5, sugieren que la solución tecnológica que implica la sustitución de un par de dominios constantes CH1-CK por un par de dominios proximales de membrana del CMH o proteínas similares al CMH

proporciona el ensamblaje correcto de los anticuerpos quiméricos biespecíficos según la invención.

El análisis se llevó a cabo utilizando el complejo de cromatografía-espectrometría de masas Agilent 1290 Infinity II UPLC-Agilent 6530 Q-Tof en la columna BioResolve Polyphenyl RP (2,1 x 50 mm, diámetro de partícula 2,7 μm; también se utilizó la precolumna BioResolve Polyphenyl RP, 2,1 x 5 mm, diámetro de partícula 2,7 μm). Antes del análisis, todas las moléculas fueron tratadas con la enzima PNGasa F (Promega) para eliminar los N-glicanos. Para ello, la enzima se diluyó con agua hasta alcanzar una concentración de 1 unidad de actividad en μl. Se mezcló una muestra con un contenido proteico de 120 μg con una solución tampón (bicarbonato de amonio 100 mM, pH 7,2), se añadió una solución de PNGasa F en la proporción enzima:proteína de 1 unidad : 50 μg, y se incubó la mezcla en un termostato durante 18 horas a (37,0 ± 0,1) °C.

Para el análisis, se seleccionaron 10 μg de la solución de ensayo de acuerdo con las concentraciones de proteínas medidas y se ajustó la concentración con la fase móvil A a 0,2 mg/ml. El volumen de entrada de la muestra fue de 7 μl.

Antes del análisis, el sistema cromatográfico se equilibró con una fase móvil en la proporción inicial de fases móviles A: 95%, B: 5% (la fase A contiene una solución de ácido fórmico al 0,1%, una solución de ácido trifluoroacético en agua al 0,02%, la fase B contiene una solución de ácido fórmico al 0,1%, acetonitrilo en alcohol isopropílico al 30%) durante al menos 30 minutos hasta que se alcanzó una presión estable. El espectrómetro de masas se calibró utilizando un estándar de calibración de acuerdo con las directrices del fabricante.

La muestra se separó a un caudal de 0,5 ml/min en un gradiente de concentración de la fase móvil B (del 5% al 27% entre 5 y 6 minutos después de la introducción de la muestra, y después del 27% al 37% entre 6 y 30 minutos) a una temperatura de columna de (60 ± 1) °C, obteniéndose un cromatograma a una longitud de onda de 280 nm.

Los datos se procesaron con el software PMi Intact.

Los nombres de las cadenas incluidas en los anticuerpos quiméricos biespecíficos se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Nombres de las cadenas incluidas en los anticuerpos quiméricos biespecíficos 02-004 al 02-009

Anticuerpo	Nombre de las cadenas incluidas en la proteína tipo anticuerpo
02-004	Prolgolimab_VH_HC_hole
	Prolgolimab_VL_CK
	Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_knob
	Ocrelizumab_VL_CD1b
02-005	Ocrelizumab_VH_ HC_hole
	Ocrelizumab_VL_CK
	Prolgolimab_VH_b2m_Fc_knob
	Prolgolimab_VL_CD1b
02-006	Prolgolimab_VH_ HC_hole
	Prolgolimab_VL_CK
	Anti-CSF1R_VH_b2m_Fc_knob
	Anti-CSF1R_VL_CD1b
02-007	Anti-CSF1R_VH_HC_hole
	Anti-CSF1R_VL_CK
	Prolgolimab_VH_b2m_Fc_knob
	Prolgolimab_VL_CD1b
02-008	Ocrelizumab_VH_HC_hole
	Ocrelizumab_VL_CK
	Anti-CSF1R_VH_b2m_Fc_knob
	Anti-CSF1R_VL_CD1b
02-009	Anti-CSF1R_VH_HC_hole
	Anti-CSF1R_VL_CK
	Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_knob
	Ocrelizumab_VL_CD1b

Los resultados del análisis de masa para los anticuerpos 02-004, 02-006, 02-009 (como los más representativos) se muestran en la Tabla 11. Además, en la Fig. 8 se muestran imágenes del espectro de masas deconvolucionado de los picos 4 a 6 del cromatograma de corriente iónica total para el anticuerpo 02-004, los picos para el resto de los anticuerpos tenían un aspecto similar.

Para cada anticuerpo, en la tabla se muestran la masa de la sustancia en los picos correspondientes del cromatograma; los picos se anotaron, además, lo que permitió

identificar las cadenas incluidas en los fragmentos de una determinada masa. La distribución de masas fue similar en todas las muestras: el pico principal se situó en 146 kDa, y los picos de masa menores en unos 23 kDa (correspondientes a la masa de una sola cadena ligera) y unos 74 kDa (correspondientes al heterodímero de las cadenas pesada y ligera). Los picos principales se anotaron basándose en los valores teóricos de las masas medias.

El pico 4 del anticuerpo 02-004 no fue anotado por el software porque los ajustes incluían la suposición de que todas las glutaminas del N-terminal están en la forma piro (por consiguiente, la masa de la piroglutamina era 18 Da menos que la de la glutamina). Así, las masas obtenidas en el pico 4 corresponden a las masas de las moléculas anotadas en el pico 5, donde una de las glutaminas del N-terminal está en la forma no piro.

Los picos 5 y 6 del anticuerpo 02-004 tienen 3 masas correspondientes a una molécula de longitud completa y a dos formas sin lisina de una molécula de longitud completa (falta una cisteína en el C-terminal y dos lisinas en el C-terminal). En los anticuerpos 02-006 y 02-009, la distribución de la masa fue similar.

Tabla 11. Anotación de los picos del cromatograma de corriente iónica total. La correspondencia entre los anticuerpos y los nombres de las cadenas se muestra en la Tabla 10. "-Lys (1)" indica que falta una de las lisinas en el C-terminal de las cadenas pesadas, "-Lys(2)" indica que faltan las dos lisinas en el C-terminal de las cadenas pesadas.

Anticuerpo	Pico, №	Tiempo de rendimiento, min.	Intensidad relativa del pico de masa, %.	Anotación de picos (cadenas que forman una molécula)	Masa, Da	Área de pico relativa, %.
02-004	1	8,12793	100	23263	23262,5	0,452
	2	9,00068	34,9407	23432	23431,6	1,061
			100	23245	23245,1	
	3	14,1315	89,472	74260	74259,7	12,933
			91,3607	Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_knob, Ocrelizumab_VL_CD1b	73961,5	
			95,6128	74138	74138,2	
			100	74088	74088,5	

	4	17,711	37,5684	146957	146957	26,771
			69,086	146828	146828	
			100	146701	146701	
	5	18,0457	39,3818	Ocrelizumab_VL_CD1b, Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_knob, Prolgolimab_VH_HC_hole, Prolgolimab_VL_CK	146936	55,956
			69,116	Ocrelizumab_VL_CD1b, Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_knob, Prolgolimab_VH_HC_hole-Lys(1), Prolgolimab_VL_CK	146812	
			100	Ocrelizumab_VL_CD1b, Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_knob, Prolgolimab_VH_HC_hole-Lys(2), Prolgolimab_VL_CK	146684	
	6	19,5708	48,9742	Ocrelizumab_VL_CD1b, Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_knob, Prolgolimab_VH_HC_hole, Prolgolimab_VL_CK	146935	2,828
			78,6579	Ocrelizumab_VL_CD1b, Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_knob, Prolgolimab_VH_HC_hole-Lys(1), Prolgolimab_VL_CK	146826	
			100	Ocrelizumab_VL_CD1b, Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_knob, Prolgolimab_VH_HC_hole-Lys(2), Prolgolimab_VL_CK	146696	
02-006	1	8,9566	42,2628	23432	23431,9	0,757
			100	23245	23245,5	
	2	15,5067	76,2204	Anti-CSF1R_VL_CD1b, Anti-CSF1R_VH_b2m_Fc_knob	73805,3	9,69
			96,3739	74117	74117,2	
			98,217	73931	73931,2	
			100	73986	73985,7	
	3	18,7862	47,5686	Anti-CSF1R_VH_b2m_Fc_knob, Anti-CSF1R_VL_CD1b,	146786	89,553

				Prolgolimab_VH_HC_hole, Prolgolimab_VL_CK,		
			76,1565	Anti-CSF1R_VH_b2m_Fc_knob, Anti-CSF1R_VL_CD1b, Prolgolimab_VH_HC_hole-Lys(1), Prolgolimab_VL_CK	146661	
			100	Anti-CSF1R_VH_b2m_Fc_knob, Anti-CSF1R_VL_CD1b, Prolgolimab_VH_HC_hole-Lys(2), Prolgolimab_VL_CK	146534	
02-009	1	8,08387	45,7919	Anti-CSF1R_VL_CK, Referencia	23035,6	2,969
			78,2384	23341	23341	
			100	23155	23154,7	
	2	14,1756	60,3569	Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_knob, Ocrelizumab_VL_CD1b(1)	73962,3	14,71
			69,7348	74091	74091	
			97,9381	74134	74134,2	
			100	74259	74259,5	
	3	17,2699	32,2696	Anti-CSF1R_VH_HC_hole, Anti-CSF1R_VL_CK, Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_knob, Ocrelizumab_VL_CD1b	146524	74,95
			63,7103	Anti-CSF1R_VH_HC_hole, Anti-CSF1R_VL_CK, Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_knob-Lys(1), Ocrelizumab_VL_CD1b	146399	
			100	Anti-CSF1R_VH_HC_hole, Anti-CSF1R_VL_CK, Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_knob-Lys(2), Ocrelizumab_VL_CD1b	146271	
	4	18,892	39,1159	Anti-CSF1R_VH_HC_hole, Anti-CSF1R_VL_CK, Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_knob, Ocrelizumab_VL_CD1b	146526	7,371
			69,8928	Anti-CSF1R_VH_HC_hole, Anti-CSF1R_VL_CK,	146404	

				Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_knob-Lys(1), Ocrelizumab_VL_CD1b		
			100	Anti-CSF1R_VH_HC_hole, Anti-CSF1R_VL_CK, Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_knob-Lys(2), Ocrelizumab_VL_CD1b	146275	

En resumen, los resultados demuestran que la masa de los anticuerpos quiméricos biespecíficos de longitud completa corresponde a la de una molécula formada por cuatro cadenas distintas. Además, los preparados incluyen fragmentos de bajo peso molecular, pero son menores.

Ejemplo 11. Confirmación del ensamblaje correcto de los anticuerpos quiméricos biespecíficos según la invención mediante proteólisis y análisis de masas de los fragmentos resultantes

Para verificar directamente el correcto emparejamiento entre las cadenas ligeras y pesadas, los anticuerpos quiméricos biespecíficos según la invención fueron escindidos por la proteasa GingisKHAN (Genovis) cuyo sitio de reconocimiento se encuentra en la región bisagra del anticuerpo (...KSCDK/THTCPPCP...). Esta proteólisis da lugar a la descomposición del anticuerpo de longitud completa en un fragmento Fc, un fragmento Fab y un fragmento tipo Fab que comprende β2-microglobulina y el dominio α3 de la proteína CD1b en sustitución de los dominios CK y CH1. Los fragmentos de la molécula biespecífica se analizaron tras la proteólisis mediante electroforesis vertical en condiciones no reductoras; además, los fragmentos resultantes se sometieron a espectrometría de masas.

La mezcla de reacción de proteólisis contenía 40 µg del anticuerpo biespecífico y 40 unidades de la enzima GingisKHAN (a razón de 1 unidad de enzima: 1 µg de proteína) en un tampón compuesto por Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, cisteína 1 mM en un volumen de 60 µl. La reacción se llevó a cabo en un termostato a (37,0 ± 0,1) °C durante 1 hora y se detuvo añadiendo yodoacetamida a una concentración de 10 mM. Para la electroforesis, se añadió a las muestras resultantes un tampón que contenía SDS (hasta

una concentración del 1% de SDS) y se realizó la electroforesis en gel de SDS en condiciones no reductoras.

La Fig. 9 muestra los resultados de la electroforesis en gel SDS. Tras el tratamiento de los anticuerpos quiméricos biespecíficos (02-004 al 02-009) con la proteasa GingisKHAN, se formaron 3 fragmentos principales, que se observaron en el electroforegrama en la región de entre 40 y 50 kDa y mostraron movilidades distintas en el gel de poliacrilamida. Las moléculas monoespecíficas que contienen (01-011) y no contienen una unidad de dimerización basada en los dominios proximales a la membrana de la proteína CD1b similar al CMH (Prolgolimab, Ocrelizumab) también se trataron con la proteasa GingisKHAN (Fig. 9B, carriles 3, 4, 5). Como resultado de la comparación de las movilidades electroforéticas formadas como resultado de la proteólisis de los fragmentos, se concluyó que el fragmento que muestra el menor nivel de movilidad corresponde al fragmento Fc, con una movilidad media de un fragmento Fab, y el fragmento que muestra el mayor nivel de movilidad de un fragmento tipo Fab que comprende β2 microglobulina y el dominio α3 de la proteína CD1b sustituyendo a los dominios CK y CH1. En el caso de los anticuerpos 02-006 al 02-009, el electroforegrama mostró un fragmento adicional formado como resultado de la escisión no específica del dominio variable del fragmento anti-CSF1R. Para determinar las masas exactas de los fragmentos formados como resultado de la proteólisis, realizamos análisis de espectrometría de masas.

Antes del análisis por espectrometría de masas, las muestras, inmediatamente después de añadir yodoacetamida, se transfirieron a bicarbonato de amonio 50 mM, pH (7,6 ± 0,2), en columnas Zeba (MWCO 7 kDa), según las directrices del fabricante; a continuación, se añadió PNGasa F a razón de 1 unidad de enzima: 50 μg de proteína y las muestras se incubaron en un termostato durante 18 horas a (37,0 ± 0,1) °C.

El análisis de masa de los fragmentos resultantes se llevó a cabo según la metodología descrita en el Ejemplo 10.

Los resultados de la UHPLC RP con detección por espectrometría de masas se muestran en la Tabla 12.

Los anticuerpos 02-006 y 02-008 mostraron fragmentos de 11.424 Da y 37.035 Da, en total 48.459 Da correspondientes a la masa de un fragmento tipo Fab que comprende la β2 microglobulina y el dominio α3 de la proteína CD1b sustituyendo los dominios CK y CH1 y fragmentos variables de las cadenas ligeras y pesadas de CSF1R. Los anticuerpos 02-007 y 02-009 mostraron fragmentos de 11.424 Da y 36.062 Da, en total 47.486 Da correspondientes a la masa de un fragmento Fab con fragmentos variables de cadenas ligeras y pesadas de CSF1R, lo cual es consistente con los datos obtenidos tras la electroforesis en gel SDS de estas muestras y confirma la presencia de un putativo sitio de proteólisis adicional en el dominio variable a CSF1R (Fig. 9).

Tabla 12. Anotación de los picos del cromatograma de corriente iónica total. En la Tabla 10 se muestra la correspondencia entre las muestras y los nombres de las cadenas. Npart es la sección N-terminal de la cadena correspondiente formada tras la escisión de un anticuerpo de longitud completa por la proteasa GingisKHAN, Cpart es la sección C-terminal de la cadena correspondiente formada tras la escisión de un anticuerpo quimérico biespecífico de longitud completa por la proteasa GingisKHAN.

Anticuerpo	Pico, №	Tiempo de rendimiento, min.	Fracción de masa máxima	Anotación de picos	Masa, Da	Área de pico relativa, UV 280nm %.
02-004 GingisKHAN	1	7,72388	1,00	Prolgolimab_VH_HC_hole-Cpart, Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_knob-Cpart (fragmento Fc)	50242,5	16,48
	2	13,1124	0,04	37128	37128,3	2,47
			0,10	47583	47583,1	
			0,13	36023	36022,6	

			0,74	Ocrelizumab_VL_CD1b, Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_knob-Npart (Fragmento tipo Fab que comprende la microglobulina β2 y el dominio α3 de la proteína CD1b sustituyendo los dominios CK y CH1 (en adelante fragmento tipo Fab))	48616,5	
	3	13,3272	1,00	Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_knob-Npart, Ocrelizumab_VL_CD1b (fragmento tipo Fab)	48599,5	3,44
	4	13,5261	1,00	Ocrelizumab_VL_CD1b, Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_knob-Npart (fragmento tipo Fab)	48615	9,04
	5	13,808	1,00	Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_knob-Npart, Ocrelizumab_VL_CD1b (fragmento tipo Fab)	48598,5	36,41
	6	14,239	1,00	Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_knob-Npart, Ocrelizumab_VL_CD1b (fragmento tipo Fab)	48470,4	7,95
	7	16,2781	0,22	47918,1 (forma no piro del fragmento Fab)	47918,1	1,71
			0,78	Ocrelizumab_VL_CD1b, Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_knob-Npart (fragmento tipo Fab)	48600,4	
	8	17,2727	1,00	Prolgolimab_VH_HC_hole-Npart, Prolgolimab_VL_CK (fragmento Fab)	47900,5	8,55
	9	17,5877	1,00	Prolgolimab_VH_HC_hole-Npart, Prolgolimab_VL_CK (fragmento Fab)	47883,1	12,6
	10	18,4497	1,00	47865	47865,5	1,36
02-005 GingisKHAN	1	7,72805	1,00	Ocrelizumab_VH_HC_hole_C-part, Prolgolimab_VH_b2m_Fc_knob_C-part (fragmento Fc)	50242,5	15,24
	2	13,0666	1,00	Ocrelizumab_VH_HC_hole_N-part, Ocrelizumab_VL_CK (fragmento Fab)	47625,9	4,52
	3	13,6131	1,00	Ocrelizumab_VH_HC_hole_N-part, Ocrelizumab_VL_CK (fragmento Fab)	47625	32,12
	4	14,6078	0,46	Ocrelizumab_VH_HC_hole_N-part, Ocrelizumab_VL_CK (fragmento Fab)	47625,4	5,98
			0,54	47607	47606,8	

	5	16,017	0,12	Ocrelizumab_VH_HC_hole_N-part, Ocrelizumab_VL_CK (fragmento Fab)	47625,5	9,65
			0,88	48874	48874,2	
	6	16,4977	0,10	Ocrelizumab_VH_HC_hole_N-part, Ocrelizumab_VL_CK (fragmento Fab)	48746,5	27,74
			0,90	Prolgolimab_VL_CD1b, Prolgolimab_VH_b2m_Fc_knob_N-part (fragmento tipo Fab)	48856,7	
	7	16,9122	0,46	Prolgolimab_VL_CD1b, Prolgolimab_VH_b2m_Fc_knob_N-part (fragmento tipo Fab)	48728,5	4,75
			0,54	Ocrelizumab_VH_HC_hole_N-part, Ocrelizumab_VL_CK (fragmento Fab)	47626,4	
02-006 GingisKHAN	1	7,67755	1,00	Prolgolimab_VH_HC_hole_C-part, Anti-CSF1R_VH_b2m_Fc_knob_C-part (fragmento Fc)	50242,5	15,11
	2	7,92622	0,13	Prolgolimab_VH_HC_hole_C-part, Anti-CSF1R_VH_b2m_Fc_knob_C-part (fragmento Fc)	50242,5	7,1
			0,87	11424	11424,5	
	3	11,5402	1,00	37035	37035	4,02
	4	15,2867	1,00	48459	48458,9	5,16
	5	15,4857	1,00	Anti-CSF1R_VH_b2m_Fc_knob_N-part, Anti-CSF1R_VL_CD1b (fragmento tipo Fab)	48442,1	24,04
	6	17,0937	1,00	Prolgolimab_VH_HC_hole_N-part, Prolgolimab_VL_CK (fragmento Fab)	47900,5	10,97
	7	17,5579	1,00	Prolgolimab_VH_HC_hole_N-part, Prolgolimab_VL_CK (fragmento Fab)	47883	27,76
	8	18,4697	1,00	47865,2	47865,2	5,84
02-007 GingisKHAN	1	7,70328	1,00	Anti-CSF1R_VH_HC_hole_C-part, Prolgolimab_VH_b2m_Fc_knob_C-part (fragmento Fc)	50242	9,48
	2	7,93537	1,00	11425	11424,5	6,03

	3	11,0188	1,00	36062	36061,5	3,63
	4	15,6825	0,38	47486	47485,9	6,14
			0,62	48891	48890,5	
	5	16,1911	0,27	48873,9	48873,9	33,27
			0,73	Anti-CSF1R_VH_HC_hole_N-part, Anti-CSF1R_VL_CK (fragmento Fab)	47468,6	
	6	16,506	0,10	Anti-CSF1R_VH_HC_hole_N-part, Anti-CSF1R_VL_CK (fragmento Fab)	47469,1	27,71
			0,90	Prolgolimab_VL_CD1b, Prolgolimab_VH_b2m_Fc_knob_N-part (fragmento tipo Fab)	48856,5	
	7	16,9205	0,12	47595,5	47595,5	13,74
			0,38	Prolgolimab_VL_CD1b, Prolgolimab_VH_b2m_Fc_knob_N-par (fragmento tipo Fab)	48857,2	
			0,50	47451	47450,7	
02-008 GingisKHAN	1	7,66267	1,00	Ocrelizumab_VH_HC_hole_C-part, Anti-CSF1R_VH_b2m_Fc_knob_C-part (fragmento tipo Fab)	50242,1	20,18
	2	7,92792	0,32	Ocrelizumab_VH_HC_hole_C-part, Anti-CSF1R_VH_b2m_Fc_knob_C-part (fragmento tipo Fab)	50242,6	4,85
			0,68	11425	11424,5	
	3	11,6082	1,00	37035	37035	1,25
	4	13,1002	1,00	Ocrelizumab_VH_HC_hole_N-part, Ocrelizumab_VL_CK (fragmento Fab)	47626	5,25
	5	13,6472	1,00	Ocrelizumab_VH_HC_hole_N-part, Ocrelizumab_VL_CK (fragmento Fab)	47625	35,7
	6	14,5756	1,00	47607	47607	4,54

	7	15,2719	0,13	Ocrelizumab_VH_HC_hole_N-part, Ocrelizumab_VL_CK (fragmento Fab)	47625,6	4,6
			0,87	48458,9 (forma no piro de la masa 48442)	48458,9	
	8	15,4873	1,00	Anti-CSF1R_VH_b2m_Fc_knob_N-part, Anti-CSF1R_VL_CD1b (fragmento tipo Fab)	48442,1	22,27
	9	16,9462	0,09	Anti-CSF1R_VH_b2m_Fc_knob_N-part, Anti-CSF1R_VL_CD1b (fragmento tipo Fab)	48443	1,37
			0,91	Ocrelizumab_VH_HC_hole_N-part, Ocrelizumab_VL_CK (fragmento Fab)	47626,6	
02-009 GingisKhan	1	7,90917		Anti-CSF1R_VH_HC_hole-Cpart, Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_knob-Cpart (fragmento Fc)	50242	16,75
	2	8,37167		11425	11424,6	10,79
	3	11,52		36079	36078,6	1,12
	4	11.9383		36062	36061,6	7,69
	5	13,2667		36043	36043,5	0,9
	6	14,23		forma no piro de la masa 48600	48616,1	1,52
				48655	48655,1	
	7	14,5133		Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_knob-Npart, Ocrelizumab_VL_CD1b (fragmento tipo Fab)	48600	3,73
	8	14,8117		forma no piro de la masa 48600	48615,9	4,26
	9	15,045		Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_knob-Npart, Ocrelizumab_VL_CD1b (fragmento tipo Fab)	48598,4	31,1
	10	15,535		Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_knob-Npart, Ocrelizumab_VL_CD1b (fragmento tipo Fab)	48599,1	5,94
				48470	48470	
	11	16,295		Anti-CSF1R_VL_CK, Anti-CSF1R_VH_HC_hole-Npart, Anti-CSF1R_VH_HC_hole-Cpart,	97811,8	4,23

				Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_knob-Cpart (anticuerpo con un solo fragmento Fab, proteólisis ineficaz)		
				36062	36062	
				97693	97692,9	
				Ocrelizumab_VH_b2m_Fc_knob-Npart, Ocrelizumab_VL_CD1b (fragmento tipo Fab)	48598,9	
	12	17,56		Anti-CSF1R_VH_HC_hole-Npart, Anti-CSF1R_VL_CK (fragmento Fab)	47468,9	9,99
	13	18,5283		47451	47451	1,96

Las masas 97811,8 Da y 97693 Da en el caso de la muestra 02-009 corresponden a una molécula con un fragmento truncado tipo Fab.

Los resultados muestran que todos los anticuerpos quiméricos biespecíficos según la invención se descomponen tras la proteólisis en fragmentos correspondientes en masa de un fragmento Fc, un fragmento Fab y un fragmento tipo Fab que comprende β2 microglobulina y el dominio α3 de la proteína CD1b sustituyendo los dominios CK y CH1, indicando que la solución tecnológica basada en la sustitución del par de dominios constantes de CH1-CK por el par de dominios proximales a la membrana del CMH o proteínas similares al CMH proporciona el correcto ensamblaje de los anticuerpos quiméricos biespecíficos según la invención.

Ejemplo 12. Verificación del efecto de las sustituciones de aminoácidos en la unidad de dimerización basada en los dominios proximales a la membrana de la proteína similar al CMH sobre la estabilidad térmica de los anticuerpos quiméricos.

Además, ensayamos varias sustituciones en la unidad de dimerización y su efecto en la pureza y estabilidad de los anticuerpos quiméricos resultantes. Se realizó el ensayo para el formato monoespecífico es un anticuerpo compuesto por dos cadenas pesadas y dos ligeras, en el que los dominios CH1 de la cadena pesada y CK de la cadena ligera han sido sustituidos por β2 microglobulina y el dominio α3 de la proteína CD1b,

respectivamente (orientación hacia delante de la unidad de dimerización). Las secuencias de los dominios variables VH y VL se obtuvieron del anticuerpo Prolgolimab (CJSC Biocad). Las mutaciones indicadas en la Tabla 13 se introdujeron en las secuencias de microglobulina β2 y el dominio α3 de la proteína CD1b. Las secuencias del dominio α3 de la proteína CD1b comprenden además las elongaciones del extremo C-terminal indicados en la Tabla 13. En la Tabla 13 se muestran la numeración de las posiciones en las que se introdujeron las mutaciones desde el principio de la unidad de dimerización, y se muestra además la correspondencia de las posiciones numeradas según la numeración de aminoácidos de cadenas de anticuerpos de la UE (Edelman G.M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63 (1969), pp. 78-85; Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, (1991). A continuación, se muestra la numeración de las posiciones en las que se introdujeron las sustituciones, desde el principio de la unidad de dimerización; la posición de las sustituciones en la región bisagra es conforme a la numeración de la UE.

Tabla 13. Descripción de variantes mutantes de la unidad de dimerización basada en microglobulina β2 y el dominio α3 de la proteína CD1b.

Anticuerpo	Mutaciones de la cadena pesada (β2 microglobulina). Numeración desde el principio de la unidad	Mutaciones de la cadena pesada. Numeración de la UE	Mutaciones y elongación del extremo C-terminal en la cadena ligera (CD1b)	Mutaciones de la cadena ligera Numeración de la UE	Notas
03-001	R12C	R129C	N57C y elongación del GSC en el extremo C	N164C y elongación del GSC en el extremo C	molécula con 2 puentes S-S en la unidad de dimerización
03-002	R12C	R129C, C220A	N57C y GS de elongación en el extremo C	N164C y GS de elongación en el extremo C	molécula con 1 puente S-S dentro de la unidad de dimerización
03-003			N59A y GSC de elongación en el extremo C	N166A y GSC de elongación en el extremo C	Molécula con sitio de glicosilación potencial

					eliminado en la cadena ligera
03-004			N59D y GSC de elongación en el extremo C	N166D y GSC de elongación en el extremo C	Molécula con sitio de glicosilación potencial eliminado en la cadena ligera
03-005	R12C	R129C	N57C, N59A y GSC de elongación en el extremo C	N164C, N166A y GSC de elongación en el extremo C	una molécula con 2 puentes S-S en la unidad de dimerización y un sitio de glicosilación potencial eliminado en la cadena ligera
03-006	R12C	R129C	N57C, N59D y GSC de elongación en el extremo C	N164C, N166D y GSC de elongación en el extremo C	una molécula con 2 puentes S-S en la unidad de dimerización y un sitio de glicosilación potencial eliminado en la cadena ligera
03-007	R12C	R129C, C220A	N57C, N59A y GS de elongación en el extremo C	N164C, N166A y GS de elongación en el extremo C	una molécula con 1 puente S-S dentro de la unidad de dimerización y un sitio de glicosilación potencial eliminado en la cadena ligera
03-008	R12C	R129C, C220A	N57C, N59D y GS de elongación en el extremo C	N164C, N166D y GS de elongación en el extremo C	una molécula con 1 puente S-S dentro de la unidad de dimerización y un

					sitio de glicosilación potencial eliminado en la cadena ligera

En la Fig. 10 se muestra el resultado de la electroforesis en gel SDS no reductor de los anticuerpos generados. Las muestras de Prolgolimab (IgG1 clásico) y 01-011 (muestra con una unidad de dimerización inicial basada en los dominios proximales a la membrana de proteínas similares al CMH, véase el Ejemplo 5) se aplicaron como controles en los carriles 1 y 2 (Fig. 10A y 10B), respectivamente. Los resultados muestran que la movilidad del fragmento principal de todas las muestras modificadas corresponde a una molécula de longitud completa (ver Fig. 10 A carriles 3 - 8, Fig. 10 B carriles 3 - 4), indicando así que las modificaciones introducidas no afectan al ensamblaje de una molécula de longitud completa. La SE HPLC (Tabla 14) muestra que algunas modificaciones conducen a la disminución del contenido de monómeros y al aumento del número de fragmentos de bajo peso molecular (anticuerpos 03-001, 03-003, 03-005, 03-006, 03-007); algunos de ellos, sin embargo, demostraron un aumento del porcentaje de monómeros (03-002, 03-004, 03-008). Además, analizamos la temperatura de agregación mediante dispersión de luz dinámica de los anticuerpos resultantes; los resultados también se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Productividad, pureza y temperatura de agregación de anticuerpos quiméricos monoespecíficos que comprenden unidades de dimerización modificadas basadas en dominios proximales a la membrana de proteínas similares al CMH.

Anticuerpo	Productividad, día 9, mg/l	Pureza por HPLC SE			Temperatura de agregación, °C
		Agregados, %	Monómeros, %	Fragmentos, %	
Prolgolimab	252,4	3,5	94,7	1,8	66,34
01-011	302,6	1,7	80,6	17,7	55,23
03-001	192,7	4,2	61,5	34,3	59,09
03-002	310,8	3,9	82,9	13,1	58,16
03-003	229,6	3,3	62,2	34,4	42,14

03-004	189,9	5,0	84,3	10,8	61,13
03-005	175,0	2,7	69,7	27,6	58,66
03-006	182,2	2,0	71,7	26,3	58,91
03-007	297,5	5,8	78,4	15,9	52,07
03-008	199,8	3,4	88,6	8,0	58,07

Los resultados muestran que las variantes de anticuerpos que demostraron un mayor contenido relativo de monómeros según la SE HPLC, demostraron además una mayor temperatura de agregación en comparación con una variante no modificada de la unidad de dimerización basada en proteínas similares al CMH.

Reivindicaciones

1. Un anticuerpo quimérico, biespecífico, bivalente, en el que dicho anticuerpo comprende:

a) una primera cadena ligera y una primera cadena pesada de anticuerpo que se unen específicamente a un primer antígeno;

en el que la primera cadena ligera comprende un dominio variable de cadena ligera y un dominio constante de cadena ligera;

donde la primera cadena pesada comprende un dominio variable de cadena pesada y dominios constantes de cadena pesada del anticuerpo que incluyen un primer dominio constante de cadena pesada (CH1) y un monómero de fragmento Fc que comprende un segundo (CH2) y un tercer dominio constante de cadena pesada (CH3);

b) una segunda cadena ligera y una segunda cadena pesada de anticuerpo que se unen específicamente a un segundo antígeno,

en el que la segunda cadena ligera comprende un dominio variable de cadena ligera y un dominio constante que se selecciona del grupo:

un primer dominio próximo a la membrana de CMH (complejo principal de histocompatibilidad) o

un primer dominio próximo a la membrana de la proteína similar a CMH;

donde la segunda cadena pesada comprende un dominio variable de cadena pesada, un dominio constante que se selecciona del grupo:

un segundo dominio próximo a la membrana de CMH (complejo principal de histocompatibilidad) o

un segundo dominio proximal a la membrana de proteína similar a CMH;

y un monómero de fragmento Fc que comprende dominios constantes de cadena pesada segundo (CH2) y tercero (CH3);

en el que el primer dominio próximo a la membrana del CMH o la proteína similar al CMH y el segundo dominio próximo a la membrana del CMH o la proteína similar al CMH forman un heterodímero entre ellos, que se estabiliza mediante un enlace disulfuro;

en el que el dominio CH3 de una cadena pesada y el dominio CH3 de otra cadena pesada entran en contacto entre sí con las superficies de los mismos, que se modifican

para formar un anticuerpo quimérico biespecífico, bivalente, siendo dichas modificaciones en los dominios CH3 de la cadena pesada sustituciones para facilitar la heterodimerización.

2. El anticuerpo quimérico, biespecífico, bivalente según la reivindicación 1, en el que el primer dominio próximo a la membrana del CMH se puede seleccionar de un grupo que incluye:

un primer dominio próximo a la membrana CMH clase I (complejo mayor de histocompatibilidad clase I),

un primer dominio próximo a la membrana CMH clase II (complejo principal de histocompatibilidad clase II),

una variante modificada de un primer dominio próximo a la membrana CMH clase I o

una variante modificada de un primer dominio próximo a la membrana CMH de clase II.

3. El anticuerpo quimérico, biespecífico, bivalente según la reivindicación 1, en el que el segundo dominio próximo a la membrana del CMH se puede seleccionar de un grupo que incluye:

un segundo dominio próximo a la membrana CMH clase I (complejo principal de histocompatibilidad clase I),

un segundo dominio próximo a la membrana CMH clase II (complejo principal de histocompatibilidad clase II),

una variante modificada de un segundo dominio próximo a la membrana CMH clase I o

una variante modificada de un segundo dominio próximo a la membrana CMH de clase II.

4. El anticuerpo quimérico, biespecífico, bivalente según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3, donde el CMH clase II se selecciona del grupo: HLA-DM, HLA-DO, HLA-DP, HLA-DQ o HLA-DR.

5. El anticuerpo bivalente, biespecífico, quimérico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3, donde el CMH clase I se selecciona del grupo: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F o HLA-G.

6. El anticuerpo quimérico biespecífico, bivalente según la reivindicación 1, en el que el primer dominio próximo a la membrana de la proteína similar al CMH se puede seleccionar de un grupo que incluye:

un primer dominio proximal a la membrana de CD1 (grupo de diferenciación 1),

un primer dominio proximal a la membrana de HFE (proteína de hemocromatosis),

una variante modificada de un primer dominio proximal a la membrana de CD1 o

una variante modificada de un primer dominio proximal a la membrana de HFE.

7. El anticuerpo quimérico biespecífico, bivalente según la reivindicación 1, en el que el segundo dominio próximo a la membrana de la proteína similar al CMH se puede seleccionar de un grupo que incluye:

un segundo dominio proximal a la membrana de CD1 (grupo de diferenciación 1),

un segundo dominio proximal a la membrana de HFE (proteína de hemocromatosis),

una variante modificada de un segundo dominio proximal a la membrana de CD1 o

una variante modificada de un segundo dominio proximal a la membrana de HFE.

8. El anticuerpo quimérico, biespecífico, bivalente según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, en el que el CD1 se selecciona del grupo: CD1a, CD1b, CD1c, CD1d o CD1e.

9. El anticuerpo quimérico, biespecífico, bivalente según la reivindicación 1, en el que el fragmento variable de la segunda cadena ligera (VL) está separado del primer dominio proximal a la membrana de CMH o proteína similar a CMH mediante un conector de 1 a 25 aminoácidos. ácidos de longitud y/o el fragmento variable de la segunda cadena pesada (VH) se separa del segundo dominio próximo a la membrana del CMH o proteína similar a CMH mediante un enlazador de 1 a 25 aminoácidos de longitud.

10. El anticuerpo quimérico biespecífico bivalente según la reivindicación 1, en el que

a) el dominio CH3 de una cadena pesada se modifica de modo que en la superficie del dominio CH3 de una cadena pesada en contacto con la superficie del dominio CH3 de otra cadena pesada en el anticuerpo biespecífico bivalente, el residuo de aminoácido se sustituye por un residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más grande, lo que lleva a la formación de un botón (knob) en la superficie del dominio CH3 de una cadena pesada que puede encajar en un orificio en la superficie del dominio CH3 de otra cadena pesada,

y

b) el dominio CH3 de otra cadena pesada se modifica de modo que en la superficie del dominio CH3 de la segunda cadena pesada en contacto con la superficie del dominio CH3 de la primera cadena pesada en el anticuerpo biespecífico bivalente, se sustituye el residuo de aminoácido para un residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño, lo que da lugar a la formación de un orificio en la superficie del dominio CH3 de la segunda cadena pesada que puede aceptar un botón (knob) en la interfaz del dominio CH3 de la primera cadena pesada;

en el que dicho residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más grande se selecciona de un grupo que incluye arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W),

y en el que dicho residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño se selecciona de un grupo que incluye alanina (A), serina (S), treonina (T), valina (V).

11. El anticuerpo quimérico biespecífico bivalente según la reivindicación 1, en el que el dominio constante de la primera cadena ligera del anticuerpo se selecciona de CK o CL.

12. El anticuerpo quimérico biespecífico bivalente según la reivindicación 1, en el que los dominios CH3 del anticuerpo se modifican adicionalmente mediante la introducción de cisteína (C) como un aminoácido en las posiciones correspondientes de cada dominio CH3 para que se pueda formar un puente disulfuro entre ambos dominios CH3.

13. El anticuerpo quimérico, biespecífico, bivalente según la reivindicación 10, en el que el dominio CH3 de una cadena pesada se modifica para formar el botón (Knob), y el dominio CH3 de otra cadena pesada se modifica para formar el ojal (Hole), o viceversa.

14. El anticuerpo quimérico biespecífico bivalente según la reivindicación 13, en el que el dominio CH3 de una cadena pesada tiene sustituciones de aminoácidos S354C/T366W, y el dominio CH3 de otra cadena pesada tiene sustituciones de aminoácidos Y349C/T366S/L368A/Y407V; o

el dominio CH3 de una cadena pesada tiene sustituciones de aminoácidos Y349C/T366S/L368A/Y407, y el dominio CH3 de otra cadena pesada tiene sustituciones de aminoácidos S354C/T366W.

15. El anticuerpo quimérico, biespecífico, bivalente según la reivindicación 1, en el que el primer dominio próximo a la membrana del CMH y el segundo dominio próximo a la membrana del CMH son el dominio α2 del CMH II y el dominio β2 del CMH II, respectivamente, que forman un heterodímero entre ellos.

16. El anticuerpo quimérico biespecífico bivalente según la reivindicación 15, en el que el dominio α2 del CMH II tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo: SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36 o SEQ ID NO: 38, y el dominio β2 de CMH II tiene la secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo: SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37 o SEQ ID NO: 39.

17. El anticuerpo quimérico biespecífico bivalente según la reivindicación 1, en el que el primer dominio próximo a la membrana de CMH y el segundo dominio próximo a la membrana de CMH son el dominio β2 del CMH II y el dominio α2 del CMH II, respectivamente, que forman un heterodímero entre ellos.

18. El anticuerpo quimérico biespecífico bivalente según la reivindicación 17, en el que el dominio β2 del CMH II tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo: SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37 o SEQ ID NO: 39, y el dominio α2 de CMH II tiene la secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo: SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36 o SEQ ID NO: 38.

19. El anticuerpo quimérico, biespecífico, bivalente según la reivindicación 1, en el que el primer dominio próximo a la membrana de CMH y el segundo dominio próximo a la membrana de CMH son una variante modificada del dominio α2 de CMH II y una variante modificada del dominio β2 de CMH II, respectivamente, que forman un heterodímero entre ellos.; o

en el que el primer dominio próximo a la membrana del CMH y el segundo dominio próximo a la membrana del CMH son una variante modificada del dominio β2 del CMH II y una variante modificada del dominio α2 del CMH. CMH II, respectivamente, que forman un heterodímero entre ellos; o

en el que el primer dominio próximo a la membrana del CMH y el segundo dominio próximo a la membrana del CMH son el dominio α3 del CMH I y la microglobulina β2 (β2M), respectivamente, que forman un heterodímero entre ellos.

20. El anticuerpo bivalente, biespecífico, quimérico de acuerdo con la reivindicación 19, donde el dominio α3 del CMHI tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo: SEQ ID NO: 1-29, y la microglobulina β2 (β2M) tiene el aminoácido secuencia de SEQ ID NO: 46.

21. El anticuerpo quimérico biespecífico bivalente según la reivindicación 1, en el que el primer dominio próximo a la membrana del CMH y el segundo dominio próximo a la membrana del CMH son β2 microglobulina (β2M) y el dominio α3 del CMH I, respectivamente, que forman un heterodímero entre ellos.

22. El anticuerpo quimérico, biespecífico, bivalente según la reivindicación 21, en el que la microglobulina β2 (β2M) tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46, y el dominio α3 de CMH I tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo: SEC ID NO: 1-29.

23. El anticuerpo quimérico biespecífico bivalente según la reivindicación 1, en el que el primer dominio próximo a la membrana del CMH y el segundo dominio próximo a la membrana del CMH son una variante modificada del dominio α3 del CMH I y una variante modificada de la microglobulina β2 (β2M), respectivamente, que forman un heterodímero entre ellos; o

en el que el primer dominio próximo a la membrana de CMH y el segundo dominio próximo a la membrana de CMH son una variante modificada de microglobulina β2 (β2M) y una variante modificada del dominio α3 de CMH I, respectivamente, que forman un heterodímero entre ellos.

24. El anticuerpo quimérico, biespecífico, bivalente según la reivindicación 23, en el que la variante modificada de microglobulina β2 (β2M) tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 47 o SEQ ID NO: 48.

25. El anticuerpo quimérico bivalente, biespecífico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el primer dominio próximo a la membrana de la proteína similar al CMH y el segundo dominio próximo a la membrana de la proteína similar al CMH son el dominio α3 de CD1 y la microglobulina β2 (β2M), respectivamente, que forman un heterodímero entre ellos.

26. El anticuerpo bivalente, biespecífico, quimérico de acuerdo con la reivindicación 25, donde el dominio α3 de CD1 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo: SEQ ID NO: 40-44, y la microglobulina β2 (β2M) tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46.

27. El anticuerpo quimérico bivalente, biespecífico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el primer dominio proximal a la membrana de la proteína similar al CMH y el segundo dominio proximal a la membrana de la proteína similar al CMH son β2 microglobulina (β2M) y el dominio α3 de CD1, respectivamente, que forman un heterodímero entre ellos.

28. El anticuerpo bivalente, biespecífico, quimérico de acuerdo con la reivindicación 27, donde la microglobulina β2 (β2M) tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46, y el dominio α3 de CD1 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo: SEQ NÚMERO DE IDENTIFICACIÓN: 40-44.

29. El anticuerpo quimérico biespecífico bivalente según la reivindicación 1, en el que el primer dominio próximo a la membrana de la proteína similar al CMH y el segundo dominio próximo a la membrana de la proteína similar al CMH son una variante modificada del dominio α3 de CD1 y un dominio modificado variante de microglobulina β2 (β2M), respectivamente, que forman un heterodímero entre ellos.

30. El anticuerpo bivalente, biespecífico, quimérico de acuerdo con la reivindicación 29, donde la variante modificada del dominio α3 de CD1 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo: SEQ ID NO: 49-56, y la variante modificada de β2 microglobulina (β2M) tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 47 o SEQ ID NO: 48.

31. El anticuerpo quimérico bivalente, biespecífico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el primer dominio proximal a la membrana de la proteína similar al CMH y el segundo dominio proximal a la membrana de la proteína similar al CMH son una variante modificada de β2 microglobulina (β2M) y una variante modificada del dominio α3 de CD1, respectivamente, que forman un heterodímero entre ellos.

32. El anticuerpo quimérico, biespecífico, bivalente de acuerdo con la reivindicación 31, donde la variante modificada de microglobulina β2 (β2M) tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 47 o SEQ ID NO: 48, y la variante modificada de dominio α3 de CD1 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo: SEQ ID NO: 49-56 o SEQ ID NO: 109.

33. El anticuerpo quimérico, biespecífico, bivalente según la reivindicación 1, en el que el primer dominio próximo a la membrana de la proteína similar al CMH y el segundo dominio próximo a la membrana de la proteína similar al CMH son el dominio α3 de HFE y la microglobulina β2 (β2M), respectivamente, que forman un heterodímero entre ellos.

34. El anticuerpo quimérico, biespecífico, bivalente según la reivindicación 33, en el que el dominio α3 de HFE tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45, y la microglobulina β2 (β2M) tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46.

35. El anticuerpo quimérico bivalente, biespecífico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el primer dominio próximo a la membrana de la proteína similar al CMH y el segundo dominio próximo a la membrana de la proteína similar al CMH son β2 microglobulina (β2M) y el dominio α3 de HFE, respectivamente, que forman un heterodímero entre ellos.

36. El anticuerpo quimérico, biespecífico, bivalente según la reivindicación 35, en el que la microglobulina β2 (β2M) tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46, y el dominio α3 de HFE tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45.

37. El anticuerpo quimérico, biespecífico, bivalente según la reivindicación 1, en el que el primer dominio próximo a la membrana de la proteína similar al CMH y el segundo dominio próximo a la membrana de la proteína similar al CMH son una variante modificada del dominio α3 de HFE y un dominio modificado variante de microglobulina β2 (β2M), respectivamente, que forman un heterodímero entre ellos; o

en el que el primer dominio próximo a la membrana de la proteína similar al CMH y el segundo dominio próximo a la membrana de la proteína similar al CMH son una variante modificada de β2 microglobulina (β2M) y una variante modificada del dominio α3 de HFE, respectivamente, que forman un heterodímero entre ellos.

38. El anticuerpo quimérico, biespecífico, bivalente según la reivindicación 37, donde la variante modificada de microglobulina β2 (β2M) tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 47 o SEQ ID NO: 48.

39. El anticuerpo bivalente, biespecífico, quimérico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3, 6 a 7, 19, 23, 29, 31 y37, donde la variante modificada se refiere a una variante que incluye sustituciones para que la cisteína (C) forme un puente disulfuro entre las cadenas de heterodímero producido a partir del primer y segundo dominio próximo a la membrana del CMH o proteína similar al CMH; o

en donde la variante modificada se refiere a una variante que incluye uno o más sustituciones en varias posiciones de los dominios próximos a la membrana de CMH o de la proteína similar a CMH, lo que da como resultado una mayor estabilidad termodinámica Tm en más de 1 grado Celsius en comparación con los dominios próximos a la membrana de tipo salvaje de CMH o proteína similar a CMH, respectivamente; o

donde la variante modificada se refiere a una variante que incluye uno o más sustituciones en varias posiciones de los dominios próximos a la membrana de CMH o proteína similar a CMH, lo que conduce a una disminución de la cantidad de agregados en más del 5% a una concentración superior a 10 mg/ml en comparación con los dominios

próximos a la membrana de tipo salvaje de CMH o proteína similar a CMH, respectivamente; o

donde la variante modificada se refiere a una variante que incluye uno o más sustituciones en varias posiciones de los dominios próximos a la membrana de CMH o proteína similar a CMH, lo que conduce a sitios de glicosilación eliminados en comparación con los dominios próximos a la membrana de tipo salvaje de CMH o proteína similar a CMH, respectivamente.

40. El anticuerpo quimérico biespecífico bivalente según la reivindicación 1, en el que el dominio variable de la primera cadena ligera y el dominio variable de la segunda cadena ligera son idénticos.

41. El anticuerpo bivalente, biespecífico, quimérico de acuerdo con la reivindicación 1, donde el fragmento Fc pertenece a IgG.

42. El anticuerpo quimérico biespecífico bivalente según la reivindicación 41, en el que el isotipo del fragmento Fc se selecciona del grupo: IgG1, IgG2 o IgG4 humanos.

43. El anticuerpo quimérico biespecífico bivalente según la reivindicación 1, en el que se introducen además sustituciones en el monómero del fragmento Fc, lo que conduce a la ausencia de propiedades ADCC, CDC y/o ADCP en el anticuerpo biespecífico bivalente.

44. El anticuerpo quimérico, biespecífico, bivalente según la reivindicación 43, en el que las sustituciones LALA (L234A y L235A) se introducen además en el monómero del fragmento Fc.

45. El anticuerpo quimérico, biespecífico, bivalente según la reivindicación 1, en el que las sustituciones que conducen a una actividad prolongada del anticuerpo se introducen además en el monómero del fragmento Fc.

46. El anticuerpo quimérico biespecífico, bivalente según la reivindicación 45, en el que las sustituciones YTE (M252Y, S254T y T256E) se introducen además en el monómero del fragmento Fc.

47. El anticuerpo quimérico biespecífico bivalente según la reivindicación 43, en el que la sustitución E345R se introduce además en el monómero del fragmento Fc.

48. El anticuerpo quimérico, biespecífico, bivalente según la reivindicación 1, que se une específicamente a CD20 y CD3; o

que se une específicamente a BCMA y CD3; o

que se une específicamente a PD-L1 y CD47; o

que se une específicamente al factor de coagulación 9 (FIX) y al factor de coagulación 10 (FX); o

que se une específicamente a GD2 y CD3 o

que se une específicamente a AXL y CD3; o

que se une específicamente a PD-L1 y TGF beta.

49. El anticuerpo quimérico biespecífico, bivalente según la reivindicación 1, en el que el primer dominio próximo a la membrana de CMH o proteína similar al CMH y el segundo dominio próximo a la membran de CMH o proteína similar a CMH forman un heterodímero entre ellos, que está estabilizado por un enlace disulfuro por medio de una mutación o mutaciones en el primer y/o segundo dominio próximo a la membrana para formar un enlace SS (puente disulfuro de cisteína) entre el primer y segundo dominio próximo a la membrana de CMH o proteína similar al CMH.

50. El anticuerpo quimérico biespecífico bivalente según la reivindicación 1, en el que el primer dominio próximo a la membrana de CMH o proteína similar al CMH y el segundo dominio próximo a la membrana de CMH o proteína similar al CMH forman un heterodímero entre ellos, que se estabiliza por un enlace disulfuro por medio de la elongación del primer dominio proximal a la membrana de CMH o proteína similar a CMH por uno o más (1 a 10) aminoácidos en el extremo C-terminal y con Cys terminal en el extremo C-terminal para formar un Enlace S-S (enlace disulfuro, puente de cisteína) entre el primer dominio próximo a la membrana de CMH o proteína similar al CMH y la bisagra.

51. El anticuerpo quimérico, biespecífico, bivalente según la reivindicación 50, en el que el alargamiento del primer dominio próximo a la membrana de CMH o proteína similar al CMH es GSC.

52. Un ácido nucleico aislado, que codifica el anticuerpo quimérico biespecífico bivalente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 51.

53. El ácido nucleico aislado según la reivindicación 52, en el que el ácido nucleico es ADN.

54. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 52 a 53.

55. Un método para producir una célula huésped para producir un anticuerpo quimérico biespecífico bivalente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 51, que comprende transformar la célula con el vector según la reivindicación 54.

56. Una célula huésped para producir el anticuerpo quimérico biespecífico bivalente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 51, que comprende el ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 52 a 653

57. Un método para producir el anticuerpo quimérico biespecífico bivalente según las reivindicaciones 1 a 51, en el que el método comprende los pasos de:

a) transformar la célula huésped

- con vectores de expresión que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican la primera cadena ligera y la primera cadena pesada del anticuerpo quimérico biespecífico,

- con vectores de expresión que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican la segunda cadena ligera y la segunda cadena pesada del anticuerpo quimérico biespecífico,

b) cultivar la célula huésped en condiciones adecuadas para la síntesis de dicho anticuerpo quimérico biespecífico, bivalente; y

c) aislar dicho anticuerpo biespecífico bivalente del cultivo celular.

Resumen

La presente invención se relaciona con el campo de la biotecnología, específicamente con anticuerpos quiméricos biespecíficos bivalentes que incluyen un heterodímero basado en los dominios proximales a la membrana de CMH (complejo mayor de histocompatibilidad) o proteínas similares a CMH (CD1 (grupo de diferenciación 1) o HFE (proteína de hemocromatosis), así como a una técnica para producir dichos anticuerpos biespecíficos. La invención se refiere además a un ácido nucleico que codifica dicho anticuerpo biespecífico, un vector de expresión, una célula huésped para producir dicho anticuerpo biespecífico quimérico bivalente y un método para producir dicha célula.