

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2009.01.06	(73) Titular(es): AMGEN INC.	
(30) Prioridade(s): 2008.01.07 US 19569 P 2008.12.05 US 120305 P	ONE AMGEN CENTER DRIVE THOUSAND	
(43) Data de publicação do pedido: 2010.10.06	OAKS, CA 91320	US
(45) Data e BPI da concessão: 2015.11.25 042/2016	(72) Inventor(es): GUNASEKARAN KANNAN	US
	MICHAEL WITTEKIND	US
	WEI YAN	US
	MARTIN PENTONY	US
	(74) Mandatário: MARIA TERESA DELGADO	
	AVENIDA DA LIBERDADE, Nº 69, 3º D 1250-140 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **MÉTODO DE PREPARAÇÃO DE MOLÉCULAS HETERODIMÉRICAS DE FC DE ANTICORPOS UTILIZANDO EFEITOS DE INDUÇÃO ELETROSTÁTICA**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO REFERE-SE A MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DE PROTEÍNAS OU POLIPÉPTIDOS HETERODIMÉRICOS DE FC. A INVENÇÃO REFERE-SE TAMBÉM ÀS PRÓPRIAS PROTEÍNAS OU POLIPÉPTIDOS HETERODIMÉRICOS DE FC, INCLUINDO AS COMPONENTES POLIPEPTÍDICAS INDIVIDUAIS QUE COMPREENDEM O HETERODÍMERO. ÁCIDOS NUCLEICOS QUE CODIFICAM TAIS POLIPÉPTIDOS, VETORES DE EXPRESSÃO, E CÉLULAS HOSPEDEIRAS. ALÉM DO MAIS, A INVENÇÃO REFERE-SE A COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS QUE COMPREENDEM UMA OU MAIS PROTEÍNAS OU POLIPÉPTIDOS HETERODIMÉRICOS DE FC.

RESUMO**"MÉTODO DE PREPARAÇÃO DE MOLÉCULAS HETERODIMÉRICAS DE FC DE ANTICORPOS UTILIZANDO EFEITOS DE INDUÇÃO ELETROSTÁTICA"**

A invenção refere-se a métodos de preparação de proteínas ou polipéptidos heterodiméricos de Fc. A invenção refere-se também às próprias proteínas ou polipéptidos heterodiméricos de Fc, incluindo as componentes polipeptídicas individuais que compreendem o heterodímero. Ácidos nucleicos que codificam tais polipéptidos, vetores de expressão, e células hospedeiras. Além do mais, a invenção refere-se a composições farmacêuticas que compreendem uma ou mais proteínas ou polipéptidos heterodiméricos de Fc.

DESCRIÇÃO

"MÉTODO DE PREPARAÇÃO DE MOLÉCULAS HETERODIMÉRICAS DE FC DE ANTICORPOS UTILIZANDO EFEITOS DE INDUÇÃO ELETROSTÁTICA"

ANTECEDENTES

Os anticorpos tornaram-se a modalidade de eleição dentro da indústria biofarmacêutica porque possuem várias características que são atrativas para aqueles que desenvolvem moléculas terapêuticas. Juntamente com a capacidade para visar estruturas ou células específicas, os anticorpos tornam o seu alvo suscetível à fagocitose e morte mediada por células com recetores Fc (Raghavan e Bjorkman 1996). Além disso, a capacidade do anticorpo para interagir com o recetor Fc neonatal (FcRn) de uma maneira dependente do pH confere-lhe semivida no soro prolongada (Ghetie e Ward 2000). Esta característica única dos anticorpos permite prolongar a semivida de uma proteína ou péptido terapêutico no soro pela manipulação de moléculas de fusão de Fc.

Os anticorpos pertencem à classe de imunoglobulinas de proteínas, a qual inclui IgG, IgA, IgE, IgM, e IgD. A classe mais abundante de imunoglobulina no soro humano é a IgG cuja estrutura esquemática é mostrada na Figura 1 (Deisenhofer 1981; Huber 1984; Roux 1999). A estrutura de IgG tem quatro cadeias, duas cadeias leves e duas pesadas; cada cadeia leve tem dois domínios e cada cadeia pesada tem quatro domínios. O sítio de ligação de antigénio está localizado na região Fab (Fragmento de ligação ao antigénio), a qual contém um domínio da cadeia leve variável (VL) e um da cadeia pesada variável (VH) bem como domínios constantes da cadeia leve (LC) e constantes da

cadeia pesada (CHI). O região dos domínios CH2 e CH3 da cadeia pesada é chamado Fc (Fragmento cristalizável). A molécula de IgG pode ser considerada como um heterotetrâmero possuindo duas cadeias pesadas que são mantidas juntas por ligações dissulfureto (-S-S-) na região charneira e duas cadeias leves. O número de ligações dissulfureto na charneira varia entre as subclasses de imunoglobulina (Papadea e Check 1989). O sítio de ligação FcRn está localizado na região Fc do anticorpo (Martin, West *et al.* 2001), e assim a propriedade de semivida no soro prolongada do anticorpo é retida no fragmento Fc. A região Fc sozinha pode ser pensada como um homodímero de cadeias pesadas que compreendem os domínios CH2 e CH3.

Em certos casos, é desejável gerar uma molécula que contém a porção Fc de um anticorpo mas compreende um heterodímero. Uma aplicação importante das moléculas heterodiméricas de Fc é a geração de anticorpos biespecíficos (BsAbs). Os anticorpos biespecíficos referem-se a anticorpos que têm especificidades para pelo menos dois antigénios diferentes (Nolan e O'Kennedy 1990; de Leij, Molema *et al.* 1998; Carter 2001). Em vez de ter uma sequência idêntica em ambos os Fabs, os anticorpos biespecíficos têm sequências diferentes nos dois Fabs pelo que cada braço da molécula em forma de Y pode ligar-se a antigénios diferentes.

A utilização de anticorpos biespecíficos para imunoterapia de cancro foi exaustivamente revista na literatura (por exemplo, ver (Nolan e O'Kennedy 1990; de Leij, Molema *et al.* 1998; Carter 2001)). Ao ter a capacidade para ligar-se a dois epítomos ou moléculas diferentes, os BsAbs proporcionam meios para desencadear um célula efetora imune e ligar um antigénio de superfície numa célula alvo tumoral. Isto ajuda a utilizar o sistema imunitário para destruir células cancerosas. Outras aplicações de

anticorpos biespecíficos são exaustivamente cobertas nas Pat. N.º 5,731,168 e 7,183,076.

O método clássico de produção de BsAbs por coexpressão de duas IgGs diferentes em hibridomas híbridos leva até 10 combinações possíveis de cadeias pesada e leve. Isto compromete o rendimento e impõe um desafio para a purificação. Carter e colaboradores produziram por engenharia genética cadeias pesadas para heterodimerização utilizando uma estratégia de "botões-em-orifícios" (Ridgway, Presta *et al.* 1996; Atwell, Ridgway *et al.* 1997; Merchant, Zhu *et al.* 1998; Carter 2001). O conceito de botões-em-orifícios foi originalmente proposto por Crick como um modelo para empacotar as cadeias laterais de aminoácido entre hélices α adjacentes (Crick 1952). Carter e colaboradores criaram um botão na interface do domínio CH3 da primeira cadeia substituindo uma cadeia lateral de aminoácidos mais pequena por uma maior (por exemplo, T366Y); e foi criado um orifício na posição justaposta na interface CH3 da segunda cadeia substituindo uma cadeia lateral de aminoácidos maior por uma mais pequena (por exemplo, Y407T). A base para criar um botão e orifício em posições justapostas é que a interação entre botão e orifício favorecerá a formação de heterodímeros, enquanto a interação botão-botão e orifício-orifício impedirá a formação de homodímeros devido ao conflito estérico e supressão de interações favoráveis, respetivamente. As mutações botões-em-orifícios foram também combinadas com manipulação de ligações dissulfureto inter-domínio CH3 para aumentar a formação de heterodímeros (Sowdhamini, Srinivasan *et al.* 1989; Atwell, Ridgway *et al.* 1997). Além destas mutações, a proporção de ADN de entrada foi também modificada para maximizar o rendimento (Merchant, Zhu *et al.* 1998). A técnica de "botões-em-orifícios" é divulgada nas Pat. U.S. N.º 5,731,168 e 7,183,076.

SUMÁRIO

Este pedido descreve uma estratégia para alterar a interação de domínios de anticorpos, por exemplo, alterando um domínio CH3 para reduzir a capacidade do domínio para interagir com ele mesmo, isto é, formar homodímeros. Em particular, um ou mais resíduos que constituem a interface CH3-CH3 está substituída por um aminoácido carregado de tal forma que a interação torna-se eletrostaticamente desfavorável. Em formas de realização preferidas, um aminoácido carregado positivamente na interface, tal como uma lisina, arginina, ou histidina, é substituído por um aminoácido carregado negativamente, tal como ácido aspártico ou ácido glutâmico. Noutras formas de realização, um aminoácido carregado negativamente na interface está substituído por um aminoácido carregado positivamente. Em certas formas de realização, o aminoácido está substituído por um aminoácido não natural possuindo a característica de carga desejada.

Aqui é ainda descrita uma estratégia para alterar um par de domínios CH3 para reduzir a capacidade de cada domínio para interagir com ele mesmo e aumentar a capacidade dos domínios para interagirem uns com os outros, isto é, formar heterodímeros. Isto pode ser conseguido substituindo um ou mais resíduos que constituem a interface CH3-CH3 em ambos os domínios CH3 com um aminoácido carregado de tal forma que a formação de homodímero é eletrostaticamente desfavorável mas a heterodimerização é eletrostaticamente favorável. Em certas formas de realização, um aminoácido carregado em cada domínio CH3 está substituído com um aminoácido com uma carga oposta. Por exemplo, um aminoácido carregado positivamente pode estar substituído por um aminoácido carregado negativamente no primeiro domínio CH3

e um aminoácido carregado negativamente pode estar substituído por um aminoácido carregado positivamente no segundo domínio CH3. Ao inverter a carga do aminoácido, a formação de homodímero é reduzida. Quando as substituições são coordenadas adequadamente, as cargas invertidas são eletrostaticamente favoráveis, isto é, cargas opostas na interface, para formação de heterodimerização.

Em certos aspetos, a invenção proporciona um método de preparação de uma proteína heterodimérica. O heterodímero pode compreender um primeiro polipéptido que contém CH3 e um segundo polipéptido que contém CH3 que se reúnem para formar uma interface manipulada por engenharia genética para promover a formação de heterodímeros. O primeiro polipéptido que contém CH3 e o segundo polipéptido que contém CH3 são manipulados por engenharia genética para compreender um ou mais aminoácidos carregados dentro da interface que são eletrostaticamente desfavoráveis para a formação de homodímeros mas eletrostaticamente favoráveis para a formação de heterodímeros.

Tais métodos podem incluir a cultura de uma célula hospedeira compreendendo ácidos nucleicos que codificam o primeiro e segundo polipéptidos que contêm CH3 de tal forma que os polipéptidos são coexpressos pela célula. Em certas formas de realização, os ácidos nucleicos que codificam o primeiro e o segundo polipéptidos que contêm CH3 são proporcionados à célula hospedeira numa proporção, por exemplo de 1:1, 1:2, 2:1, 1:3, 3:1, 1:4, 4:1, 1:5, 5:1, 1:6, 6:1, 1:7, 7:1, 1:8, 8:1, 1:9, 9:1, 1:10, 10:1. É considerada que a alteração da proporção de ácidos nucleicos pode aumentar a produção de moléculas heterodiméricas versus moléculas homodiméricas.

As moléculas heterodiméricas podem ser purificadas a partir da cultura de células hospedeiras utilizando técnicas

convencionais. Por exemplo, quando a proteína heterodimérica compreende um Fc, a proteína pode ser purificada utilizando uma coluna de proteína A. As técnicas de purificação incluem mas não estão limitadas a métodos cromatográficos tais como exclusão molecular, troca iônica e cromatografia baseada em afinidade e ultracentrifugação.

Em certas formas de realização, o polipéptido que contém CH3 compreende uma região Fc de IgG, preferencialmente derivada de uma região Fc de IgG humana de tipo selvagem. Por Fc de IgG humana de "tipo selvagem" entende-se uma sequência de aminoácidos que ocorre naturalmente na população humana. Evidentemente, tal como a sequência de Fc pode variar ligeiramente entre indivíduos, podem ser feitas uma ou mais alterações a uma sequência de tipo selvagem e mesmo assim permanecer no âmbito da invenção. Por exemplo, a região Fc pode conter alterações adicionais que não estão relacionadas com a presente invenção, tal como uma mutação num sítio de glicosilação, inclusão de um aminoácido não natural, ou uma mutação de "botões-em-orifícios".

Em certas formas de realização, o polipéptido que contém a região CH3 é uma molécula de IgG e contém ainda um domínio CH1 e CH2. As sequências de IgG humana ilustrativas compreendem as regiões constantes de IgG1 (por exemplo, SEQ ID NO:3; CH1 = aminoácidos 1-98, CH2 = aminoácidos 111-223, CH3 = 224-330), IgG2 (por exemplo, SEQ ID NO:4; CH1 = aminoácidos 1-94, CH2 = aminoácidos 111-219, CH3 = 220-326), IgG3 (por exemplo, SEQ ID NO:5; CH1 = aminoácidos 1-98, CH2 = aminoácidos 161-270, CH3 = 271-377) e IgG4 (por exemplo, SEQ ID NO:6; CH1 = aminoácidos 1-98, CH2 = aminoácidos 111-220, CH3 = 221-327). Os especialistas na técnica podem diferir na sua compreensão sobre os aminoácidos exatos que correspondem aos vários domínios da molécula de IgG. Assim, a extremidade N-terminal ou

extremidade C-terminal dos domínios delineados acima pode ser prolongada ou encurtada em 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou até mesmo 10 aminoácidos. Refira-se também que o esquema de numeração aqui utilizado para designar os domínios diferem do esquema de numeração da EU de Kabat que é utilizado no resto deste pedido de patente. Por exemplo, IgG1 "CH3=224-330" corresponde a "CH3=341-447" no esquema de numeração da EU.

A região Fc pode ser também constituída dentro da região constante de uma cadeia pesada de IgA (por exemplo, SEQ ID NO:7), IgD (por exemplo, SEQ ID NO:8), IgE (por exemplo, SEQ ID NO:9), e IgM (por exemplo, SEQ ID NO: 10).

O polipéptido que contém a região CH3 pode ser uma cadeia pesada de anticorpo e a célula hospedeira pode expressar ainda uma ou mais cadeias leves de anticorpo. Nas formas de realização em que são coexpressas mais do que uma cadeia pesada e cadeias leves (por exemplo, anticorpo bivalente), cada cadeia pesada pode compreender uma mutação na região CH1 e cada cadeia leve pode compreender uma mutação na região constante para se ligar preferencialmente entre si mas não para se ligar a outra cadeia leve ou pesada, respetivamente. Em formas de realização preferidas, tais mutações envolvem a alteração da carga de um ou mais aminoácidos na interface entre a região CH1 e a região constante de uma cadeia leve.

As formas de realização preferidas da invenção incluem mas não se limitam a um anticorpo, um anticorpo biespecífico, um anticorpo monovalente monoespecífico, um biespecífica maxicorpo (maxicorpo refere-se a scFv-Fc), um monocorpo, um pepticorpo, um pepticorpo biespecífico, um pepticorpo monovalente (um péptido fundido com um braço de uma

molécula de Fc heterodimérico), e uma proteína de fusão recetor-Fc. Ver FIG. 2.

Os exemplos de células hospedeiras de mamífero que podem ser utilizados incluem mas não se limitam a linhas de células CHO, 293 e mieloma. A célula hospedeira pode ser também levedura ou um procaríota, tal como E. coli.

As proteínas heterodiméricas podem ser particularmente úteis em composições terapêuticas. Em certas formas de realização, uma proteína heterodimérica pode ser formulada numa composição que inclui um ou mais tampões ou excipientes farmacologicamente aceitáveis. Essa composição terapêutica pode ser administrada a um indivíduo para tratar uma doença ou pode ser dada para prevenir uma doença ou impedir a progressão dos sintomas de uma doença.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Figura 1. Diagrama esquemático do anticorpo de IgG 1 com os domínios indicados. O anticorpo de IgG1 é um tetrâmero em forma de Y com duas cadeias pesadas (comprimento mais comprido) e duas cadeias leves (comprimento mais curto). As duas cadeias pesadas são ligadas em conjunto por ligações dissulfureto (-S-S-) na região charneira. Fab - fragmento de ligação a antigénio, Fc - fragmento cristalizável, VL - domínio variável da cadeia leve, VH - domínio variável da cadeia pesada, CL - domínio constante (sem variação de sequência) da cadeia leve, CH1 - domínio constante da cadeia pesada 1, CH2 - domínio constante da cadeia pesada 2, CH3 - domínio constante da cadeia pesada 3.

Figura 2. Figura representa algumas das formas de realização que incluem moléculas heterodiméricas de Fc. Estas incluem anticorpos biespecíficos (têm especificidade

para dois ou mais antigénios) para moléculas de fusão recetor-Fc. Preferencialmente, o Fc retém a sua capacidade para interagir com o recetor FcRn, mesmo sem os domínios Fab, conduzindo a uma semivida mais longa no soro para proteínas/domínios que se encontram fundidos com as cadeias pesadas de Fc. scFv - fragmento variável de cadeia simples, Pep. - pepticorpo, A e B significam proteínas ou recetores ou domínios.

Figura 3. Estrutura da interface do domínio CH3 mostrando-se os resíduos envolvidos na interação domínio-domínio. Os resíduos da interface foram identificados utilizando um método de corte de distância. Os resíduos estruturalmente conservados e ocultos (área superficial acessível ao solvente < 10%) são mostrados no modelo de bolas e varetas. Os resíduos expostos a solvente ou estruturalmente não conservados são mostrados na representação de varetas. A análise baseia-se na estrutura cristalina de IgG1 (código PDB: 1L6X) que é determinada em alta resolução (1,65Å) (Idusogie, Presta *et al.* 2000).

Figura 4. Comparação das sequências da subclasse de IgG de (a) humanos e (b) rato. É mostrada apenas a sequência da cadeia pesada correspondente ao domínio CH3. O asterisco (*) indica posições de resíduos envolvidas na interação dos domínios CH3-CH3 identificadas com base na estrutura cristalina do Fc humano de IgG1 (1L6X). As posições marcadas com retângulos são resíduos preferidos para mutação para melhorar a formação de heterodímeros. Pode aqui notar-se que os resíduos carregados são altamente conservados entre as IgGs. (c) comparação de sequências do domínio CH3 de outra classe de anticorpos (IgA, IgE, IgD, e IgM). As posições dos resíduos da interface (indicadas por "**") em (b) e (c) foram identificadas com base na comparação das sequências com a sequência da IgG1 Hu que é

também mostrada. Em (a), as sequências derivadas das IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas correspondem às SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13 e SEQ ID NO: 14, respectivamente. Em (b), as sequências derivadas das IgG1 humana, IgG1 de rato, IgG2a de rato, IgG2b de rato e IgG3 de rato correspondem às SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO:18, e SEQ ID NO: 19, respectivamente. Em (c), as sequências derivadas da IgG1 humana, IgA humana, IgE humana, IgD humana e IgM humana correspondem às SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, e SEQ ID NO:24, respectivamente.

Figura 5. Estrutura cristalina do homodímero de domínio CH3 com um domínio mostrado em representação em fita e o outro domínio mostrado no modelo de fio metálico. Os resíduos de Lys409 (Lys409' no segundo domínio) e Asp399 (Asp399' no segundo) são mostrados no modelo de bolas e varetas a fim de ilustrar cada interação emparelhada é representada duas vezes na estrutura. Isto é devido à simetria dupla presente na interação do domínio CH3-CH3. A figura foi gerada utilizando as coordenadas de 1L6X depositadas no PDB.

Figura 6. Esquemas que mostram as interações eletrostáticas no tipo selvagem e nos mutantes concebidos como um exemplo para melhorar a formação de heterodímeros e impedir a formação de homodímeros. (a) No caso do WT, as interações eletrostáticas favorecem a formação de heterodímeros e homodímeros dando-lhes igual probabilidade. (b) No caso do mutante único (K409E), um dos homodímeros é desencorajado por ambas as interações e ao mesmo tempo o heterodímero é também desencorajado por uma das interações. (c) No caso do mutante duplo, ambas as interações eletrostáticas favorecem a formação de heterodímeros e desfavorecem homodímeros. (d) Mutações adicionais que envolvem alteração da carga (por exemplo, K360E) poderiam ser também utilizados para

melhorar os efeitos de indução eletrostática na formação do heterodímero e homodímero.

Figura 7. Esta figura mostra que as interações eletrostáticas poderiam ser também utilizadas para favorecer a formação de homodímeros e desfavorecer heterodímeros, quando são coexpressas duas cadeias diferentes.

Figura 8. Figura (a) mostra o desenho esquemático das construções utilizadas no Exemplo. A primeira cadeia do Fc tem um maxicorpo (fragmento variável de cadeia simples, scFv) ligado covalentemente, e a segunda cadeia chamada Fc falso não tem qualquer domínio ou funcionalidade ligado à mesma. (b) Ilustração da mobilidade relativa esperada na SDS-PAGE. Uma vez que a cadeia Fc ligada ao maxicorpo tem um peso molecular mais alto do que o Fc falso, os homodímeros e heterodímero têm diferentes mobilidades na SDS-PAGE. A espessura da banda na SDS-PAGE pode ser utilizada como uma medição da fração do rendimento de heterodímero e homodímero. O tipo selvagem é incluído como um controle e para monitorizar a melhoria relativa no rendimento de heterodímero devido a várias mutações.

Figura 9. Análise por SDS-PAGE que mostra os efeitos de mutações sobre o par de interação D399'---K409.

Figura 10. Análise por SDS-PAGE das mutações de resíduos com carga (listados na Tabela 6) além das mutações do par D399'K --- K409D. O tipo selvagem (primeira faixa) e as mutações de botões-em-orifícios (última faixa) são também mostradas para comparação. Foi aqui utilizada uma proporção de ADN de entrada de 1:2 de Fc falso e maxicorpo M315.

Figura 11. Transferência de Western que mostra que certas combinações de mutantes conseguem alta seletividade para formação de heterodímeros. As moléculas Fc foram detetadas utilizando anti-Fc humano de cabra HRP conjugado a 1:10 000.

DESCRIÇÃO DETALHADA DE FORMAS DE REALIZAÇÃO PREFERIDAS

Um total de 48 estruturas cristalinas de anticorpos que tinham coordenadas que correspondiam à região Fc foram identificados a partir do Banco de Dados de proteínas (PDB) (Bernstein, Koetzle *et al.* 1977) utilizando um algoritmo de pesquisa com base na estrutura (Ye e Godzik 2004). O exame das estruturas cristalinas de Fc identificadas revelou que a estrutura determinada à resolução mais alta corresponde ao fragmento Fc de RITUXIMAB ligado a uma versão minimizada do domínio B da proteína A designado Z34C (código PDB: 1L6X). A estrutura do homodímero de Fc biológico para o 1L6X foi gerado utilizando as coordenadas do monómero de Fc depositadas e simetria cristalina. Foram utilizados dois métodos para identificar os resíduos envolvidos na interação do domínio CH3-CH3: (i) contacto como determinado pelo critério de limite de distância e (ii) análise da área superficial acessível ao solvente.

De acordo com o método baseado no contacto, os resíduos da interface são definidos como resíduos cujos átomos pesados da cadeia lateral estão posicionados mais próximos do que um limite especificado dos átomos pesados de quaisquer resíduos na segunda cadeia. Embora o limite de distância de 4,5Å seja preferido, poderia também utilizar-se um limite de distância mais longo (por exemplo, 5,5Å) para identificar os resíduos da interface (Bahar e Jernigan 1997).

O segundo método envolve o cálculo da área superficial acessível ao solvente (ASA) dos resíduos do domínio CH3 na presença e ausência da segunda cadeia (Lee e Richards 1971). Os resíduos que apresenta uma diferença ($>1\text{\AA}^2$) em ASA entre os dois cálculos são identificados como resíduos da interface. Ambos os métodos identificaram um conjunto semelhante de resíduos da interface. Além disso, estes foram coerentes com o trabalho publicado (Miller 1990).

A Tabela 1 lista os vinte e quatro resíduos da interface identificados com base no método do critério de contacto, utilizando o limite de distância de $4,5\text{\AA}$. Estes resíduos foram ainda examinados quanto à conservação estrutural. Para este efeito, 48 estruturas cristalinas de Fc identificadas a partir do PDB foram sobrepostas e analisadas calculando o desvio quadrático médio para os átomos pesados da cadeia lateral. As designações de resíduos baseiam-se no esquema de numeração da EU de Kabat, a qual corresponde também à numeração no Banco de Dados de proteínas (PDB).

A Figura 3 mostra a interface do domínio CH3 juntamente com as posições estruturalmente conservadas, ocultas ($\% \text{ASA} \leq 10$) e expostas ($\% \text{ASA} > 10$) ($\% \text{ASA}$ refere-se à proporção de ASA observada relativamente à ASA padrão de aminoácidos; (Lee e Richards 1971)). A conservação de resíduos da interface entre as subclasses de IgG Humana e de Rato bem como entre outras classes de Ig foi também examinada através de comparações de sequências (Figura 4).

Tabela 1: Lista de resíduos da interface do domínio CH3 na primeira cadeia (A) e os seus resíduos de contacto na segunda cadeia (B)^a

<i>Res. da Interface na Cadeia A</i>	<i>Resíduos de Contacto na Cadeia B</i>
GLN A 347	LYS B 360'
TYR A 349	SER B 354' ASP B 356' GLU B 357' LYS B 360'
THR A 350	SER B 354' ARG B 355'
LEU A 351	LEU B 351' PRO B 352' PRO B 353' SER B 354' THR B 366'
SER A 354	TYR B 349' THR B 350' LEU B 351'
ARG A 355 ^b	THR B 350'
ASP A 356	TYR B 349' LYS B 439'
GLU A 357	TYR B 349' LYS B 370'
LYSA 360 ^b	GLN B 347' TYR B 349'
SER A 364	LEU B 368' LYS B 370'
THR A 366	LEU B 351' TYR B 407'
LEU A 368	SER B 364' LYS B 409'
LYS A 370	GLU B 357' SER B 364'
ASN A 390	SER B 400'
LYS A 392	LEU B 398' ASP B 399' SER B 400' PHE B 405'
THR A 394	THR B 394' VAL B 397' PHE B 405' TYR B 407'
PRO A 395	VAL B 397'
VAL A 397	THR B 393' THR B 394' PRO B 395'
ASP A 399	LYS B 392' LYS B 409'
SER A 400	ASN B 390' LYS B 392'
PHE A 405	LYS B 392' THR B 394' LYS B 409'
TYR A 407	THR B 366' THR B 394' TYR B 407' SER B 408' LYS B 409'
LYS A 409	LEU B 368' ASP B 399' PHE B 405' TYR B 407'

<i>Res. da Interface na Cadeia A</i>	<i>Resíduos de Contacto na Cadeia B</i>
LYS A 439	ASP B 356'

^aPosições que envolvem a interação entre resíduos carregados opostamente são indicados a negrito. Devido à simetria dupla presente na interação do domínio CH3-CH3, cada interação emparelhada é representada duas vezes na estrutura (por exemplo, Asp A 356 --- Lys B 439' & Lys A 439 --- Asp B 356'; Figura 5)

^bAs posições Arg355 e Lys360 (mostradas em itálico) poderiam ser também utilizadas para melhorar os efeitos de indução eletrostática embora não estejam envolvidas na interação com resíduos carregados opostamente.

A pH neutro (=7,0), os resíduos de Asp e Glu estão carregados negativamente e os de Lys, Arg e His estão carregados positivamente. Estes resíduos carregados podem ser utilizados para promover a formação de heterodímeros e ao mesmo tempo impedir homodímeros. Há interação de atração entre cargas opostas e interação repulsiva entre cargas semelhantes. O método aqui apresentado utiliza as interações atrativas e repulsivas para promover heterodímeros e impedir homodímeros, respetivamente, através da realização de mutagénese específica de um locus de resíduos da interface carregados.

O exame dos resíduos da interface do domínio CH3 identificados (Tabela 1) revela quatro pares de resíduos de carga única envolvidos na interação domínio-domínio (Asp356---Lys439', Glu357-Lys370', Lys392---Asp399', Asp399---Lys409'); a numeração dos resíduos na segunda cadeia é indicada pela plica '). Estes pares de carga não estão necessariamente envolvidos na interação carga-carga na estrutura cristalina aqui utilizada (1L6X), uma vez que a estrutura cristalina é um produto final na via de reação de

dobragem da proteína e representa a estrutura no estado cristalino. Assume-se aqui que para haver efeitos de indução eletrostática é suficiente que os resíduos se encontrem próximos no espaço como definido pelo critério de limite de distância (4,5Å). Deve também assinalar-se aqui que devido à simetria dupla presente na interação do domínio CH3-CH3, cada interação única será representada duas vezes na estrutura (por exemplo, Asp399---Lys409' & Lys409---Asp399'; Figura 5).

Os quatro pares foram ordenados de acordo com a extensão de acessibilidade ao solvente (análise ASA) (Lee e Richards 1971). No caso de Lys409---Asp399', ambos os resíduos estavam estruturalmente conservados bem como ocultos. Noutros três casos de pares, pelo menos um dos parceiros está exposto ao solvente (%ASA > 10). Por conseguinte, para o Exemplo aqui, o par Lys409---Asp399' foi escolhido para mutagenese específica de um locus. A estratégia é esquematicamente mostrada na Figura 6.

No tipo selvagem, a interação K409---D399' favorece a formação de ambos, heterodímeros e homodímeros. Uma única mutação que troca a polaridade da carga (K409E; carga positiva para negativa) na primeira cadeia conduz a interações desfavoráveis para a formação do homodímero da primeira cadeia. As interações desfavoráveis surgem devido às interações repulsivas que ocorrem entre as mesmas cargas (negativa---negativa; D399---K409E & K409E---D399). Uma mutação semelhante que troca a polaridade da carga (D399'K; carga negativa para positiva) na segunda cadeia conduz a interações desfavoráveis (K409'---D399'K & D399'K---K409') para a formação de homodímeros da segunda cadeia. Mas, ao mesmo tempo, estas duas mutações (K409E & D399'K) conduzem a interações favoráveis (K409E---D399'K & D399---K409') para a formação de heterodímeros.

Os efeitos de indução eletrostática na formação de heterodímeros e desencorajamento de homodímeros podem ser melhorados ainda mais pela mutação de resíduos com carga adicionais, os quais podem, ou não, ser emparelhados com um resíduo carregado opostamente na segunda cadeia, tal como Arg355 e Lys360, como se mostra na Figura 6d. As mutações que se mostram na Figura 6 são apenas para efeitos de ilustração. A Tabela 2 lista muitas mutações possíveis que envolvem a alteração de carga, e as mutações podem ser combinadas para melhorar os efeitos eletrostáticas.

Tabela 2a: Lista de algumas mutações possíveis de resíduos com carga emparelhados para melhorar a formação de heterodímeros^a

Posição na Primeira Cadeia	Mutação na Primeira Cadeia	Posição de Interação na Segunda Cadeia	Mutação Correspondente na Segunda Cadeia
Lys409	Asp ou Glu	Asp399'	Lys ou Arg ^b
Lys392	Asp ou Glu	Asp399'	Lys ou Arg ^b
Lys439	Asp ou Glu	Asp356'	Lys ou Arg ^b
Lys370	Asp ou Glu	Glu357'	Lys ou Arg ^b
Asp399	Lys ou Arg ^b	Lys409'	Asp ou Glu
Asp399	Lys ou Arg ^b	Lys392'	Asp ou Glu
Asp356	Lys ou Arg ^b	Lys439'	Asp ou Glu
Glu357	Lys ou Arg ^b	Lys370'	Asp ou Glu

^aPoderiam ser também utilizadas combinações das mutações de resíduos com carga emparelhados anteriores. Por exemplo, mutações do par de interação Lys409 --- Asp399' poderiam ser combinadas com mutações do par Lys439 --- Asp356'.

^bA histidina (His) poderia ser também adicionada a esta lista de resíduos carregados positivamente, contudo, o aumento no volume da cadeia lateral e a dependência do pH devem ser tidos em consideração na concepção.

Tabela 2b: Mutações de resíduos com carga única adicionais para melhorar os efeitos de indução eletrostática³

Posição na Cadeia 1	Mutação	Posição na Cadeia 2	Mutação
Arg355	Asp ou Glu	Arg355'	Asp ou Glu
Lys360	Asp ou Glu	Lys360'	Asp ou Glu

³Estas mutações de resíduo único poderiam ser combinadas com as mutações emparelhadas da Tabela 2a para melhorar a formação de heterodímeros (Figura 6d).

Cada resíduo carregado positivamente (Lys e Arg) pode ser mutado em dois resíduos carregados negativamente (Asp ou Glu) e *vice versa*, e como consequência o método aqui descrito proporciona numerosas combinações. Deve ser aqui especificado que diferentes combinações terão efeitos diferentes na formação da estrutura quaternária (homodímero/heterodímero) dependendo dos resíduos circundantes ao sítio de mutação e ao papel das moléculas de água. O aminoácido Histidina (His) está carregado positivamente a pH neutro e, por conseguinte, é também considerada a mutação em His. No entanto, a mutação de resíduos carregados negativamente (Asp ou Glu) em His levará a um aumento no volume da cadeia lateral que pode originar questões estéricas. Além disso, a forma doadora ou aceitadora de prótons da Histidina depende do ambiente de localização. Estas questões devem ser tidas em consideração durante a estratégia de concepção.

Uma vez que os resíduos da interface são altamente conservados em subclasses de IgG Humana e de Rato, os efeitos de indução eletrostática podem ser aplicados à IgG1, IgG2, IgG3, ou IgG4 Humana ou de Rato. Esta estratégia pode ser também alargada à modificação de resíduos não carregados em resíduos carregados na interface do domínio CH3. Uma estratégia semelhante que envolve

mutações de resíduos com carga pode ser também utilizada para melhorar a formação de homodímeros e impedir heterodímeros quando são coexpressas duas cadeias pesadas diferentes (Figura 7).

A fim de avaliar a estabilidade dos mutantes de resíduos com carga, utilizou-se o software EGAD para estimar a energia livre de ligação do domínio CH3-CH3. Através da otimização dos parâmetros utilizados no cálculo, Pokala e Handel puderam prever os efeitos de quase 400 mutações na formação de complexos proteína-proteína com 1,0kcal/mol de erro (Pokala e Handel 2005). O EGAD foi utilizado para comparar grosseiramente a energia livre de ligação de várias mutações feitas na interface do domínio CH3.

A Tabela 3 lista a energia livre de ligação calculada ($\Delta\Delta G$) para os mutantes de resíduos com carga da interface. A energia livre de ligação de um mutante é definida como $\Delta\Delta G_{mut} = \mu (\Delta G_{mut} - \Delta G_{wt})$. Onde, μ ($=0,1$, em geral) é o fator de escala utilizado para normalizar as alterações previstas na afinidade de ligação para ter um declive de 1 quando se compara com as energias experimentais (Pokala e Handel 2005). A energia livre de dissociação (ΔG) é definida como a diferença de energia entre o complexo (ΔG_{ligado}) e os estados livres (ΔG_{livre}). A comparação mostra que as mutações de resíduos carregados afetam a estabilidade numa extensão muito menor em comparação com as mutações de botões-em-orifícios. Para comparação, são indicadas as temperaturas de fusão descritas para o selvagem tipo e os mutantes de botões-em-orifícios. As temperaturas de fusão foram medidas por Carter e colaboradores utilizando apenas a construção do domínio CH3 (Atwell, Ridgway et al. 1997). Para os mutantes de botões-em-orifícios, foi também observada uma diminuição na entalpia nas experiências de calorimetria diferencial de varrimento.

Tabela 3: Energia livre de ligação do domínio CH3-CH3 para vários mutantes concebidos para melhorar a formação de heterodímeros, calculada utilizando o programa EGAD (Pokala e Handel 2005)^a

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

^aNão foram considerados todos os pares de carga-carga possíveis para o cálculo da energia livre de ligação. O tipo selvagem é listado para comparação. ΔG é definido como a diferença de energia entre os estados de complexo e livre. A energia livre de ligação de um mutante ($\Delta\Delta G_{mut}$) é definida como a diferença entre as energias livres do mutante (ΔG_{mut}) e de tipo selvagem (ΔG_{WT}).

A Figura 2 representa várias formas de realização que compreendem moléculas heterodiméricas de Fc, desde anticorpos biespecíficos até complexos de recetor heterodiméricos. As duas cadeias pesadas das moléculas de Fc heterodimérico podem ser fundidas com proteínas e/ou domínios que têm funcionalidades diferentes. Por exemplo, a

fusão com Fabs que se ligam a antigénios diferentes levará a anticorpos biespecíficos (BsAbs). A fusão de dois domínios de Fv de cadeia simples diferentes (scFv; cadeias variáveis leve e pesada ligadas por uma unidade de ligação peptídica flexível) levará a maxicorpos biespecíficos. Além disso, domínios ou proteínas que interagem por razões funcionais podem ser também fundidos com Fc heterodimérico para desenvolver ensaios funcionais ou para utilizações terapêuticas. Por exemplo, na família de recetores hematopoiéticos, o gp130 é conhecido por interagir com outros recetores tais como o Recetor do Fator Inibidor de Leucemia (LIFR). O domínio extracelular (ECD) de gp130 pode ser fundido com a primeira cadeia pesada de Fc e o ECD de LIFR pode ser fundido com a segunda cadeia pesada de Fc, o que levará à formação do complexo gp130-LIFR que provavelmente imitará o estado biológico. Uma vez que o sítio de ligação de FcRn está localizado na região Fc, é provável que as moléculas de fusão de Fc possuam semivida no soro prolongada - uma característica que distingue moléculas heterodiméricas de Fc de outras moléculas heterodiméricas tais como as proteínas de fusão de fecho de leucina (Liu, Caderas *et al.* 2001). Não é essencial que existam funcionalidades diferentes ligadas às duas cadeias pesadas do heterodímero de Fc. Pode também ser gerado um monocorpo (Figura 2).

Em certas formas de realização, por exemplo, quando se produzem anticorpos biespecíficos, podem ser coexpressas múltiplas cadeias leves diferentes com as múltiplas cadeias pesadas diferentes. A fim de aumentar a fidelidade de ligação de cada cadeia leve à cadeia pesada apropriada mantendo, desse modo, a especificidade do "braço" do anticorpo, os domínios CH1 de uma ou mais das cadeias pesadas e a região constante de uma ou mais das cadeias leves podem ser manipulados por engenharia genética para

favorecer a dimerização. Preferencialmente, isto é realizado utilizando uma técnica de indução eletrostática semelhante à descrita acima para os domínios CH3.

Foi analisada a interação da sequência da cadeia leve kappa correspondente ao depósito no Banco de Dados de proteínas (PDB) com o código 1N0X (SEQ ID NO:25) e a cadeia leve lambda correspondente ao depósito (PDB) com o código 7FAB (SEQ ID NO:26) com sequência da cadeia pesada correspondente ao domínio CH1 de IgG1 (SEQ ID NO:27). Os contactos cadeia leve lambda-Cadeia pesada na interface são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4: Lista de resíduos da interface da cadeia leve lambda e seus resíduos de contacto na cadeia pesada^a

<i>Res. da Interface na Cadeia Leve Lambda</i>	<i>Resíduos de Contacto na Cadeia Pesada</i>
THR L 112	ALA H 141
PHE L 114	LEU H 128 ALA H 129 ALA H 141 LEU H 142 GLY H 143 VAL H 185
SER L 117	PHE H 126 PRO H 127
GLU L 119	VAL H 125 PHE H 126 PRO H 127 LYS H 213
GLU L 120	PHE H 126
LYS L 125	LYS H 147 ASP H 148
THR L 127	LEU H 145 LYS H 147
VAL L 129	LEU H 128 LEU H 145 SER H 183
LEU L 131	PHE H 170 SER H 183 VAL H 185
SER L 133	HIS H 168 PHE H 170

<i>Res. da Interface na Cadeia Leve Lambda</i>	<i>Resíduos de Contacto na Cadeia Pesada</i>
GLU L 156	VAL H 173 LEU H 174 GLN H 175 SER H 176
THR L 158	PRO H 171 ALA H 172 VAL H 173
SER L 161	PRO H 171
GLN L 163	HIS H 168
ALA L 169	HIS H 168 PHE H 170
SER L 171	PHE H 170 PRO H 171
TYR L 173	LEU H 145 VAL H 173 SER H 181 LEU H 182 SER H 183

^aOs resíduos de contacto foram identificados utilizando o critério de limite de distância de 4,5Å. O esquema de numeração da cadeia leve e pesada corresponde àquele no ficheiro de coordenadas depositado (código PDB:7FAB).

Os contactos da cadeia leve kappa-cadeia pesada dentro da interface são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5: Lista de resíduos da interface da cadeia leve kappa e seus resíduos de contacto na cadeia pesada^a

<i>Res. da Interface na Cadeia Leve kappa</i>	<i>Resíduos de Contacto na Cadeia Pesada</i>
PHE 116	THR H 139 ALA H 140 ALA H 141
PHE 118	LEU H 128 ALA H 129 PRO H 130 ALA H 141 LEU H 142
SER 121	PHE H 126 PRO H 127
ASP 122	LYS H 218
GLU 123	VAL H 125 PHE H 126 LYS H 213
GLN 124	PHE H 126 LEU H 145 LYS H 147
SER 131	LEU H 145 LYS H 147
VAL 133	LEU H 128
LEU 135	ALA H 141 PHE H 170 VAL H 185
ASN 137	HIS H 168 THR H 187

<i>Res. da Interface na Cadeia Leve kappa</i>	<i>Resíduos de Contacto na Cadeia Pesada</i>
ASN 138	HIS H 168
GLN 160	VAL H 173 LEU H 174 GLN H 175
SER 162	PHE H 170 PRO H 171 VAL H 173
THR 164	THR H 169 PHE H 170 PRO H 171
SER 174	HIS H 168 PHE H 170
SER 176	PHE H 170 SER H 183

^aOs resíduos de contacto foram identificados utilizando o critério de limite de distância de 4,5Å. O esquema de numeração da cadeia leve corresponde àquele no ficheiro de coordenadas depositado (código PDB:1N0X). O esquema de numeração da cadeia pesada corresponde àquele na tabela 4.

Em certas formas de realização, a Lys125 da cadeia lambda é mutada num aminoácido carregado negativamente e é feita uma mutação correspondente numa cadeia pesada na Asp148, mudando o resíduo para um aminoácido carregado positivamente. Alternativamente, ou além disso, o Glu119 da cadeia lambda é mutado num aminoácido carregado positivamente e é feita uma mutação correspondente numa cadeia pesada na Lys213, mudando o resíduo para um aminoácido carregado negativamente.

A análise da interação cadeia leve-cadeia pesada revelou posições nas quais poderiam ser introduzidos pares de carga na sequência para melhorar a ligação de um par específico de cadeias leve e pesada. Estas posições incluem a Thr112 da lambda e Ala141 da cadeia pesada, Glu156 da lambda e Ser176 da cadeia pesada, e Ser171 da lambda e Ser183 da cadeia pesada e outras posições mostradas na Tabela 4 e 5 a negrito.

EXEMPLOS

Exemplo 1

Este exemplo demonstra que os domínios CH3 podem ser manipulados por engenharia genética para favorecer a heterodimerização enquanto desfavorece a homodimerização utilizando efeitos de indução eletrostática. Foi feita uma construção maxicorpo - Fc falso como se mostra na Figura 8(a) possuindo mutações de resíduos com carga na interface do domínio CH3. O rendimento de formação de homodímero e heterodímero foi avaliado através de eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS. Uma vez que o maxicorpo tem um peso molecular mais alto em comparação com o Fc falso, o heterodímero (maxicorpo-Fc falso) e homodímeros (maxicorpo-maxicorpo e Fc falso-Fc falso) têm mobilidades diferentes na SDS-PAGE facilitando a identificação dos vários emparelhamentos (FIG. 8(b)).

Um anticorpo de ratazana anti-NKG2D de rato, designado M315, foi gerado através de fusões de hibridoma convencionais e as sequências de ADN que codificam a cadeia pesada variável (VH) e cadeia leve variável (VL) foram utilizadas para construir M315scFv-Fc utilizando um método anteriormente descrito (Gilliland, Norris, *et al.* 1996).

A sequência de M315 scFv-Fc (SEQ ID NO:1) e huIgG1Fc (SEQ ID NO:2) foram clonados no vetor de expressão de mamífero pTT5 e as duas construções foram utilizadas para co-transfetar células 293-6E para avaliar a formação de heterodímero Fc/scFv-Fc relativamente ao homodímero de Fc e homodímero de scFv-Fc.

SEQ ID NO: 1

M315scFv-huFc

HMAEVQLQQSGAELVKPGSSVKISCKASGYTFANNFMHWIKQQPGNGLEW
 IGWIYPGDGDEYNQKFSGKATLTADKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYFCI
 RLTEGTTYWGQGMVTVSSGGGGSGGGSSGGGSQFVLTQPNVSTNLGS
 TVKLSCKRSTGNIGSNYVNWYQQHEGRSPTTMIYRDDKRPDGVDPDRFSGS
 IDGSSNSALLTINNVQTEDEADYFCQSYSRGVSPVFGGGTKLTVLAAAEF
 KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
 EYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
 LVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
 QOQNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 2

huIgG1-Fc

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
 EYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
 LVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
 QOQNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(O sombreado corresponde à região Fc)

Os pares de resíduos com carga na região CH3 identificados através de análise computacional foram mudados para aminoácido de polaridade de carga oposta nas construções IgG1Fc humano (falso) ou M315 scFv-Fc (mxb). As mutações, as quais estão listadas na Tabela 6, foram geradas utilizando o kit de mutagênese QuikChange® da Stratagene e verificadas por sequenciação de ADN. As mutações são indicadas pelo resíduo de tipo selvagem seguido da posição utilizando o sistema de numeração de Kabat (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, Md., ed, 5, [1991]), o qual é coerente com o esquema de numeração da estrutura

cristalina (código PDB:1L6X), e em seguida o resíduo de substituição no código de letra única. A sequência Fc utilizada nestas duas construções foi derivada do alótipo não-(a) de IgG1 humana, o qual tem uma Glu na posição 356 e uma Met na posição 358. As sequências de CH3 da estrutura cristalina são de um alótipo de IgG1 diferente, o qual tem uma Asp na posição 356 e uma Leu na posição 368.

TABELA 6: Lista de mutações de resíduos com carga

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

O ADN foi transfetado na linha de células de rim embrionário humano 293-6E utilizando o reagente Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen). O sobrenadante da cultura de células foi colhido 3-4 dias após transfeção e analisado sobre Geles de SDS-PAGE em condições não redutoras. O gel foi em seguida transferido para membrana de nitrocelulose e submetido a análise de western utilizando anticorpo IgG de cabra anti-humana conjugado com peroxidase (Jackson ImmunoResearch Laboratories) e os resultados são mostrados na Fig 10.

A cotransfeção do vetor de expressão para M315 scFv-Fc (mxb) em conjunto com o Fc falso resultou na formação do heterodímero scFv-Fc/Fc bem como do homodímero de scFv-Fc e homodímero de Fc. A proporção de heterodímero scFv-Fc/Fc relativamente ao homodímero de scfv-Fc e homodímero de Fc é

próxima de 1:1:1 quando é utilizada a sequência de CH3 de selvagem tipo.

A introdução de uma mutação de par com carga K409D no Fc falso e D399'K no maxicorpo M315 aumentou significativamente a proporção de heterodímero scFv-Fc/Fc relativamente ao homodímero de scFv-Fc, bem como homodímero de Fc. Foi também observada uma melhoria semelhante na formação de heterodímeros para outras variantes mutantes tais como K409D/D399'R, K409E/D399'K e K409E/D399'R (Fig,9), realçando ainda mais a importância da complementação da polaridade de carga para a formação de heterodímeros de Fc. (A construção de M315 scFv-Fc de tipo selvagem utilizada neste estudo tem um marcador extra no carboxilo terminal do Fc, pelo que migra mais lentamente no gel de SDS-PAGE.)

Quando foram introduzidas mutações adicionais nos resíduos com carga que estão localizados próximos de K409 tais como K360 e K392, foi observado um aumento adicional na formação de heterodímeros (Fig. 10). Por exemplo, a combinação K409D;K392D no Fc falso com D399'K no maxicorpo M315 mostrou uma maior proporção de heterodímero para homodímeros, provavelmente devido à rutura do homodímero de Fc. Foi detetada uma banda de 25KD que corresponde ao tamanho do monómero Fc em todas as transfeções utilizando Fc falso com K409D;K392D (dados não apresentados). A adição de outra mutação tal como D356'K ou D357'K sobre a variante D399'K do maxicorpo M315 mostrou uma melhoria adicional. A combinação de K409D;K392D no Fc falso com D399'K;D356'K no maxicorpo M315 resultou na formação quase exclusiva de heterodímero. Outras combinações tais como K409D;K392D/D399'K;D357'K e K409D;K370D/D399'K;D357'K também ofereceram melhoria significativa em relação à variante K409D/D399'K.

Tabela 7: Quantificação da percentagem de rendimentos de homodímero e heterodímero para a SDS-PAGE mostrada na Figura 10.^a

Homodímero de Fc Falso	Heterodímero M315 scFv-Fc-Fc Falso	Homodímero de M315 scFv-Fc	M315 scFv-Fc	Fc Falso
42,1	32,4	25,5	WT	WT
28,1	55,1	16,8	D399* K	K409D;K360D
ND	76,9	23,1	D399* K	K409D;K392D
ND	100	ND	D399* K;E356* K	K409D;K392D
20,9	79,1	ND	D399* K;E357* K	K409D;K392D
7,7	92,3	ND	D399* K;E356* K	K409D;K439D
14,8	85,2	ND	D399* K;E357* K	K409D;K370D
ND	86,7	13,3	D366* W (Orifício)	D366S;L368A;Y407V (Boltão)

^a ND significa Não Detetado na análise baseada em densidade.

Exemplo 2

Este exemplo demonstra que os domínios CH3 que contêm certas mutações triplas de pares de carga foram incapazes de formar homodímeros quando expressos sozinhos mas foram capazes de formar heterodímeros quando coexpressos. Os mutantes foram preparados e as células transfetadas como se descreveu no Exemplo 1. Quando as construções foram cotransfetadas, foi utilizada uma proporção 1:1 de plasmídeos. Os resultados são mostrados na Figura 11. O heterodímero e os homodímeros foram detetados por transferência de Western utilizando anticorpo de cabra anti-Fc humano conjugado com HRP. Curiosamente, as moléculas que contêm Fc possuindo mutações triplas em que resíduos carregados positivamente foram mudados por resíduos carregados negativamente (K409D,K392D,K370D ou K409D,K392D,K439D) foram incapazes de serem detetadas quando expressas sozinhas. De forma semelhante, as moléculas que contêm Fc possuindo mutações triplas em que resíduos carregados negativamente foram mudados por resíduos carregados positivamente (D399K,E356K,E357K) foram incapazes de serem detetadas quando expressas sozinhas. No entanto, quando coexpressas com uma molécula que contém Fc possuindo mutações de polaridade de carga oposta, foram apenas detetados heterodímeros.

Ao longo de todo este pedido de invenção, é para ser entendido que a utilização de um termo no singular pode implicar, quando apropriado, a utilização de respectivo termo no plural, e vice versa.

Atwell, S., J. B. Ridgway, et al. (1997). "Stable heterodimers from remodeling the domain interface of a homodimer using a phage display library." *J Mol Biol* 270(1): 26-35.

Bahar, I. e R. L. Jernigan (1997). "Inter-residue potentials in globular proteins and the dominance of highly specific hydrophilic interactions at close separation." *J Mol Biol* 266(1): 195-214.

Bernstein, F. C., T. F. Koetzle, et al. (1977). "The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures." *J Mol Biol* 112(3): 535-42.

Bogan, A. A. e K. S. Thorn (1998). "Anatomy of hot spots in protein interfaces." *J Mol Biol* 280(1): 1-9.

Carter, P. (2001). "Bispecific human IgG by design." *J Immunol Methods* 248(1-2): 7-15.

Crick, F. H. (1952). "Is alpha-keratin a coiled coil?" *Nature* 170(4334): 882-3.

de Leij, L., G. Molema, et al. (1998). "Bispecific antibodies for treatment of cancer in experimental animal models and man." *Adv Drug Deliv Rev* 31(1-2): 105-129.

Deisenhofer, J. (1981). "Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9- and 2.8-Å resolution." *Biochemistry* 20(9): 2361-70.

Gabdoulline, R. R. e R. C. Wade (2002). "Biomolecular diffusional association." *Curr Opin Struct Biol* 12(2): 204-13.

Ghetie, V. e E. S. Ward (2000). "Multiple roles for the major histocompatibility complex class I-related receptor FcRn." *Annu Rev Immunol* 18: 739-66.

Gilliland, L. K., N. A. Norris, et al. (1996). "Rapid and reliable cloning of antibody variable regions and generation of recombinant single chain antibody fragments." *Tissue Antigens* 47(1): 1-20

Halperin, I., H. Wolfson, et al. (2004). "Protein-protein interactions; coupling of structurally conserved residues and of hot spots across interfaces. Implications for docking." *Structure* 12(6): 1027-38.

Huber, R. (1984). "Three-dimensional structure of antibodies." *Behring Inst Mitt*(76): 1-14.

Idusogie, E. E., L. G. Presta, et al. (2000). "Mapping of the Clq binding site on rituxan, a chimeric antibody with a human IgG1 Fc." *J Immunol* 164(8): 4178-84.

Joachimiak, L. A., T. Kortemme, et al. (2006). "Computational design of a new hydrogen bond network and at least a 300-fold specificity switch at a protein-protein interface." *J Mol Biol* 361(1): 195-208.

King, D. J., J. R. Adair, et al. (1992). "Expression, purification and characterization of a mouse-human chimeric antibody and chimeric Fab' fragment." *Biochem J* 281 (Pt 2): 317-23.

Kortemme, T. e D. Baker (2004). "Computational design of protein-protein interactions." *Curr Opin Chem Biol* 8(1): 91-7.

Kortemme, T., L. A. Joachimiak, et al. (2004). "Computational redesign of protein-protein interaction specificity." *Nat Struct Mol Biol* 11(4): 371-9.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-5.

Lee, B. e F. M. Richards (1971). "The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility." *J Mol Biol* 55(3): 379-400.

Liu, N., G. Caderas, et al. (2001). "Fusion proteins from artificial and natural structural modules." *Curr Protein Pept Sci* 2(2): 107-21.

Maizel, J. V., Jr., D. F. Summers, et al. (1970). "SDS-acrylamide gel electrophoresis and its application to the proteins of poliovirus- and adenovirus-infected human cells." *J Cell Physiol* 76(3): 273-87.

Martin, W. L., A. P. West, Jr., et al. (2001). "Crystal structure at 2.8 Å of an FcRn/heterodimeric Fc complex: mechanism of pH-dependent binding." *Mol Cell* 7(4): 867-77.

Marvin, J. S. e H. B. Lowman (2003). "Redesigning an antibody fragment for faster association with its antigen." *Biochemistry* 42(23): 7077-83.

Matthews, B. W. (1995). "Studies on protein stability with T4 lysozyme." *Adv Protein Chem* 46: 249-78.

Merchant, A. M., Z. Zhu, et al. (1998). "An efficient route to human bispecific IgG." *Nat Biotechnol* 16(7): 677-81.

Miller, S. (1990). "Protein-protein recognition and the association of immunoglobulin constant domains." *J Mol Biol* 216(4): 965-73.

Nolan, O. e R. O'Kennedy (1990). "Bifunctional antibodies: concept, production and applications." *Biochim Biophys Acta* 1040(1): 1-11.

Papadea, C. e I. J. Check (1989). "Human immunoglobulin G and immunoglobulin G subclasses: biochemical, genetic, and clinical aspects." *Crit Rev Clin Lab Sci* 27(1): 27-58.

Pokala, N. e T. M. Handel (2005). "Energy functions for protein design: adjustment with protein-protein complex affinities, models for the unfolded state, and negative design of solubility and specificity." *J Mol Biol* 347(1): 203-27.

Raghavan, M. e P. J. Bjorkman (1996). "Fc receptors and their interactions with immunoglobulins." *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 181-220.

Ridgway, J. B., L. G. Presta, et al. (1996). "'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization." *Protein Eng* 9(7): 617-21.

Roux, K. H. (1999). "Immunoglobulin structure and function as revealed by electron microscopy." *Int Arch Allergy Immunol* 120(2): 85-99.

Schreiber, G., Y. Shaul, et al. (2006). "Electrostatic design of protein-protein association rates." *Methods Mol Biol* 340: 235-49.

Selzer, T., S. Albeck, et al. (2000). "Rational design of faster associating and tighter binding protein complexes." *Nat Struct Biol* 7(7): 537-41.

Sheinerman, F. B., R. Norel, et al. (2000). "Electrostatic aspects of protein-protein interactions." *Curr Opin Struct Biol* 10(2): 153-9.

Sondermann, P., R. Huber, et al. (2000). "The 3.2-Å crystal structure of the human IgG1 Fc fragment-Fc gammaRIII complex." *Nature* 406(6793): 267-73.

Sowdhamini, R., N. Srinivasan, et al. (1989). "Stereochemical modeling of disulfide bridges. Criteria for introduction into proteins by site-directed mutagenesis." *Protein Eng* 3(2): 95-103.

Szczepek, M., V. Brondani, et al. (2007). "Structure-based redesign of the dimerization interface reduces the toxicity of zinc-finger nucleases." *Nat Biotechnol* 25(7): 786-93.

Ye, Y. e A. Godzik (2004). "FATCAT: a web server for flexible structure comparison and structure similarity searching." *Nucleic Acids Res* 32(Web Server issue): W582-5.

LISTA DE SEQUÊNCIAS

<110> AMGEN INC.

KANNAN, Gunasekaran

WITTEKIND, Michael

YAN, Wei

PENTONY, Martin

<120> MÉTODO DE PREPARAÇÃO DE MOLÉCULAS HETERODIMÉRICAS DE Fc DE ANTICORPOS UTILIZANDO EFEITOS DE INDUÇÃO ELETROSTÁTICA

<130> A-1392-WO-PCT

<140> --a ser concedida-- <141> 2009-01-06

<150> 61/019,569 <151> 2008-01-07

<150> 61/120,305 <151> 2008-12-05

<160> 27

<170> PatentIn versão 3.4

<210> 1

<211> 480

<212> PRT

<213> M315scFv-huFc

<400> 1

His Met Ala Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys
1 5 10 15

Pro Gly Ser Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
20 25 30

Ala Asn Asn Phe Met His Trp Ile Lys Gln Gln Pro Gly Asn Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Ile Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Glu Tyr Asn
50 55 60

Gln Lys Phe Ser Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
65 70 75 80

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
85 90 95

Tyr Phe Cys Ile Arg Leu Thr Glu Gly Thr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 3

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

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

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

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

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

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

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

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

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

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 4

<211> 326

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

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

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

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

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

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

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

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 115 120 125

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

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

<210> 5

<211> 377

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 370 375

<210> 6

<211> 327

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 7

<211> 353

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

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

Gln Pro Asp Gly Asn Val Val Ile Ala Cys Leu Val Gln Gly Phe Phe
 20 25 30

Pro Gln Glu Pro Leu Ser Val Thr Trp Ser Glu Ser Gly Gln Gly Val
 35 40 45

Thr Ala Arg Asn Phe Pro Pro Ser Gln Asp Ala Ser Gly Asp Leu Tyr
 50 55 60

Thr Thr Ser Ser Gln Leu Thr Leu Pro Ala Thr Gln Cys Leu Ala Gly
 65 70 75 80

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

Val Thr Val Pro Cys Pro Val Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro
 100 105 110

Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Cys Cys His Pro Arg Leu Ser
 115 120 125

Leu His Arg Pro Ala Leu Glu Asp Leu Leu Leu Gly Ser Glu Ala Asn
 130 135 140

Leu Thr Cys Thr Leu Thr Gly Leu Arg Asp Ala Ser Gly Val Thr Phe
 145 150 155 160

Thr Trp Thr Pro Ser Ser Gly Lys Ser Ala Val Gln Gly Pro Pro Glu
 165 170 175

Arg Asp Leu Cys Gly Cys Tyr Ser Val Ser Ser Val Leu Pro Gly Cys
 180 185 190

Ala Glu Pro Trp Asn His Gly Lys Thr Phe Thr Cys Thr Ala Ala Tyr
 195 200 205

Pro Glu Ser Lys Thr Pro Leu Thr Ala Thr Leu Ser Lys Ser Gly Asn
 210 215 220

Thr Phe Arg Pro Glu Val His Leu Leu Pro Pro Pro Ser Glu Glu Leu
 225 230 235 240

Ala Leu Asn Glu Leu Val Thr Leu Thr Cys Leu Ala Arg Gly Phe Ser
 245 250 255

Pro Lys Asp Val Leu Val Arg Trp Leu Gln Gly Ser Gln Glu Leu Pro
 260 265 270

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

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

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

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

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

Tyr

<210> 8

<211> 384

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ala Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys
 130 135 140

Glu Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu
 145 150 155 160

Cys Pro Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val Tyr Leu Leu Thr Pro Ala
 165 170 175

Val Gln Asp Leu Trp Leu Arg Asp Lys Ala Thr Phe Thr Cys Phe Val
 180 185 190

Val Gly Ser Asp Leu Lys Asp Ala His Leu Thr Trp Glu Val Ala Gly
 195 200 205

Lys Val Pro Thr Gly Gly Val Glu Glu Gly Leu Leu Glu Arg His Ser
 210 215 220

Asn Gly Ser Gln Ser Gln His Ser Arg Leu Thr Leu Pro Arg Ser Leu
 225 230 235 240

Trp Asn Ala Gly Thr Ser Val Thr Cys Thr Leu Asn His Pro Ser Leu
 245 250 255

Pro Pro Gln Arg Leu Met Ala Leu Arg Glu Pro Ala Ala Gln Ala Pro
 260 265 270

Val Lys Leu Ser Leu Asn Leu Leu Ala Ser Ser Asp Pro Pro Glu Ala
 275 280 285

Ala Ser Trp Leu Leu Cys Glu Val Ser Gly Phe Ser Pro Pro Asn Ile
 290 295 300

Leu Leu Met Trp Leu Glu Asp Gln Arg Glu Val Asn Thr Ser Gly Phe
 305 310 315 320

Ala Pro Ala Arg Pro Pro Pro Gln Pro Gly Ser Thr Thr Phe Trp Ala
 325 330 335

Trp Ser Val Leu Arg Val Pro Ala Pro Pro Ser Pro Gln Pro Ala Thr
 340 345 350

Tyr Thr Cys Val Val Ser His Glu Asp Ser Arg Thr Leu Leu Asn Ala
 355 360 365

Ser Arg Ser Leu Glu Val Ser Tyr Val Thr Asp His Gly Pro Met Lys
 370 375 380

<210> 9

<211> 428

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

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

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

Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Met Val Thr Trp Asp Thr Gly Ser Leu
 35 40 45

Asn Gly Thr Thr Met Thr Leu Pro Ala Thr Thr Leu Thr Leu Ser Gly
 50 55 60

His Tyr Ala Thr Ile Ser Leu Leu Thr Val Ser Gly Ala Trp Ala Lys
 65 70 75 80

Gln Met Phe Thr Cys Arg Val Ala His Thr Pro Ser Ser Thr Asp Trp
 85 90 95

Val Asp Asn Lys Thr Phe Ser Val Cys Ser Arg Asp Phe Thr Pro Pro
 100 105 110

Thr Val Lys Ile Leu Gln Ser Ser Cys Asp Gly Gly Gly His Phe Pro
 115 120 125

Pro Thr Ile Gln Leu Leu Cys Leu Val Ser Gly Tyr Thr Pro Gly Thr
 130 135 140

Ile Asn Ile Thr Trp Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Leu
 145 150 155 160

Ser Thr Ala Ser Thr Thr Gln Glu Gly Glu Leu Ala Ser Thr Gln Ser
 165 170 175

Glu Leu Thr Leu Ser Gln Lys His Trp Leu Ser Asp Arg Thr Tyr Thr
 180 185 190

Cys Gln Val Thr Tyr Gln Gly His Thr Phe Glu Asp Ser Thr Lys Lys
 195 200 205

Cys Ala Asp Ser Asn Pro Arg Gly Val Ser Ala Tyr Leu Ser Arg Pro
 210 215 220

Ser Pro Phe Asp Leu Phe Ile Arg Lys Ser Pro Thr Ile Thr Cys Leu
 225 230 235 240

Val Val Asp Leu Ala Pro Ser Lys Gly Thr Val Asn Leu Thr Trp Ser
 245 250 255

Arg Ala Ser Gly Lys Pro Val Asn His Ser Thr Arg Lys Glu Glu Lys
 260 265 270

Gln Arg Asn Gly Thr Leu Thr Val Thr Ser Thr Leu Pro Val Gly Thr
 275 280 285

Arg Asp Trp Ile Glu Gly Glu Thr Tyr Gln Cys Arg Val Thr His Pro
 290 295 300

His Leu Pro Arg Ala Leu Met Arg Ser Thr Thr Lys Thr Ser Gly Pro
 305 310 315 320

Arg Ala Ala Pro Glu Val Tyr Ala Phe Ala Thr Pro Glu Trp Pro Gly
 325 330 335

Ser Arg Asp Lys Arg Thr Leu Ala Cys Leu Ile Gln Asn Phe Met Pro
 340 345 350

Glu Asp Ile Ser Val Gln Trp Leu His Asn Glu Val Gln Leu Pro Asp
 355 360 365

Ala Arg His Ser Thr Thr Gln Pro Arg Lys Thr Lys Gly Ser Gly Phe
 370 375 380

Phe Val Phe Ser Arg Leu Glu Val Thr Arg Ala Glu Trp Glu Gln Lys
 385 390 395 400

Asp Glu Phe Ile Cys Arg Ala Val His Glu Ala Ala Ser Pro Ser Gln
 405 410 415

Thr Val Gln Arg Ala Val Ser Val Asn Pro Gly Lys
 420 425

<210> 10

<211> 452

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn
 1 5 10 15

Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp
 20 25 30

Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Leu Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser
 35 40 45

Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys
 50 55 60

Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln
 65 70 75 80

Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn
 85 90 95

Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro Val Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys
 100 105 110

Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg
 115 120 125

Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile
 130 135 140

Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly Lys Gln Val Gly Ser Gly Val Thr
 145 150 155 160

Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr Tyr
 165 170 175

Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile Lys Glu Ser Asp Trp Leu Gly Gln
 180 185 190

Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp His Arg Gly Leu Thr Phe Gln Gln
 195 200 205

Asn Ala Ser Ser Met Cys Val Pro Asp Gln Asp Thr Ala Ile Arg Val
 210 215 220

Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr
 225 230 235 240

Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu Thr Thr Tyr Asp Ser Val Thr
 245 250 255

Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu Ala Val Lys Thr His Thr Asn
 260 265 270

Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala
 275 280 285

Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr
 290 295 300

Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg
 305 310 315 320

Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro
 325 330 335

Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu
 340 345 350

Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg
 355 360 365

Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro
 370 375 380

Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val
 385 390 395 400

Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Ala His
 405 410 415

Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser Thr
 420 425 430

Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala
 435 440 445

Gly Thr Cys Tyr
 450

<210> 11

<211> 109

<212> PRT

<213> IgG1 Humana

<400> 11

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

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

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

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

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

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

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

<210> 12

<211> 109

<212> PRT

<213> IgG2 Humana

<400> 12

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

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

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

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

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

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

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

<210> 13

<211> 109

<212> PRT

<213> IgG3 Humana

<400> 13

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

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

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

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

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

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

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

<210> 14

<211> 109

<212> PRT

<213> IgG4 Humana

<400> 14

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

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

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

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

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

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

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

<210> 15

<211> 106

<212> PRT

<213> IgG1 Humana

<400> 15

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

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

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

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

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

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

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

<210> 16

<211> 106

<212> PRT

<213> IgG1 de Rato

<400> 16

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

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

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

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

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

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

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

<210> 17

<211> 106

<212> PRT

<213> IgG2a de Rato

<400> 17

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

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

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

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

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

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

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

<210> 18

<211> 106

<212> PRT

<213> IgG2b de Rato

<400> 18

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

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

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

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

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

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

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

<210> 19

<211> 106

<212> PRT

<213> IgG3 de Rato

<400> 19

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

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

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

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

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

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

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

<210> 20

<211> 105

<212> PRT

<213> IgG1 Humana

<400> 20

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

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

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

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

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

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

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 100 105

<210> 21

<211> 114

<212> PRT

<213> IgA Humana

<400> 21

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys

<210> 22

<211> 112

<212> PRT

<213> IgE Humana

<400> 22

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

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

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

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

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

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

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

<210> 23

<211> 114

<212> PRT

<213> IgD Humana

<400> 23

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

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

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

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

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

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

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

Val Thr

<210> 24

<211> 115

<212> PRT

<213> IgM Humana

<400> 24

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

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

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

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

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

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

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

Thr Gly Lys
115

<210> 25

<211> 107

<212> PRT

<213> Cadeia leve kappa humana

<400> 25

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

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

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

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

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

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

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

<210> 26

<211> 105

<212> PRT

<213> Cadeia leve lambda humana

<400> 26

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

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

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

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

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

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

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 100 105

<210> 27

<211> 100

<212> PRT

<213> CH1 de IgG1 Humana

<400> 27

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

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

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

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

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

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

Lys Val Glu Pro
100

REIVINDICAÇÕES

1. Proteína heterodimérica que compreende um primeiro polipéptido que contém CH3 de IgG e um segundo polipéptido que contém CH3 de IgG que se reúnem para formar uma interface manipulada por engenharia genética para promover a formação de heterodímeros, em que o referido primeiro polipéptido que contém CH3 de IgG compreende uma substituição do aminoácido na posição 392 por um aminoácido carregado negativamente e o referido segundo polipéptido que contém CH3 de IgG compreende uma substituição de Asp399, Glu356, Asp356, ou Glu357 por um aminoácido carregado positivamente.
2. Proteína heterodimérica da reivindicação 1, em que a proteína heterodimérica compreende uma região Fc.
3. Proteína heterodimérica da reivindicação 2, em que a região Fc compreende uma região Fc de IgG.
4. Proteína heterodimérica da reivindicação 3, em que a região Fc de IgG compreende uma região Fc de IgG humana.
5. Proteína heterodimérica da reivindicação 4, em que a região de IgG humana compreende uma região Fc de IgG1, uma região Fc de IgG2, uma região Fc de IgG3 ou uma região Fc de IgG4.
6. Proteína heterodimérica da reivindicação 1, em que o primeiro polipéptido que contém CH3 de IgG compreende ainda uma substituição de Lys409, Arg409, Lys439, ou Lys370 por um aminoácido carregado negativamente.

7. Proteína heterodimérica da reivindicação 6, em que o aminoácido carregado negativamente é ácido aspártico.
8. Proteína heterodimérica da reivindicação 1, em que o aminoácido carregado positivamente é lisina.
9. Proteína heterodimérica da reivindicação 1, em que o referido segundo polipéptido que contém CH3 de IgG humana compreende uma substituição de Asp399 e Glu356 por lisina.
10. Proteína heterodimérica da reivindicação 1, em que o primeiro polipéptido que contém CH3 de IgG compreende ainda uma substituição de Asp399, Asp356, ou Glu357 por um aminoácido carregado positivamente e o segundo polipéptido que contém CH3 de IgG compreende ainda uma substituição de Lys409, Lys439, Lys370, ou Lys392 por um aminoácido carregado negativamente.
11. Proteína heterodimérica da reivindicação 1, em que o primeiro polipéptido que contém CH3 de IgG, ou o segundo polipéptido que contém CH3 de IgG é uma cadeia pesada de anticorpo.
12. Proteína heterodimérica da reivindicação 1, em que a proteína heterodimérica compreende ainda uma ou mais cadeias leves de anticorpo.
13. Proteína heterodimérica da reivindicação 1, em que a proteína heterodimérica é selecionada do grupo que consiste em um anticorpo, um anticorpo biespecífico, um anticorpo monovalente monoespecífico, um maxicorpo biespecífico, um monocorpo, um pepticorpo, um pepticorpo biespecífico, um pepticorpo monovalente, e uma proteína de fusão de recetor.

14. Célula hospedeira que compreende um ácido nucleico que codifica um primeiro polipéptido que contém CH3 de IgG e um ácido nucleico que compreende um segundo polipéptido que contém CH3 de IgG, em que o referido primeiro polipéptido que contém CH3 de IgG compreende uma substituição do aminoácido na posição 392 por um aminoácido carregado negativamente e o referido segundo polipéptido que contém CH3 de IgG compreende uma substituição de Asp399, Glu356, Asp356, ou Glu357 por um aminoácido carregado positivamente.

15. Composição que compreende um ácido nucleico que codifica um primeiro polipéptido que contém CH3 de IgG e um ácido nucleico que compreende um segundo polipéptido que contém CH3 de IgG, em que o referido primeiro polipéptido que contém CH3 de IgG compreende uma substituição do aminoácido na posição 392 por um aminoácido carregado negativamente e o referido segundo polipéptido que contém CH3 de IgG compreende uma substituição de Asp399, Glu356, Asp356, ou Glu357 por um aminoácido carregado positivamente.

16. Método de preparação de uma proteína heterodimérica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, compreendendo o método os passos de:

(a) cultivar uma célula hospedeira compreendendo um ácido nucleico que codifica o primeiro polipéptido que contém CH3 de IgG e um ácido nucleico que compreende o segundo polipéptido que contém CH3 de IgG, em que a célula hospedeira cultivada expressa o primeiro e segundo polipéptidos que contém CH3 de IgG; e

(b) recuperar a proteína heterodimérica a partir da cultura de células hospedeiras.

17. Proteína heterodimérica da reivindicação 1, em que o referido primeiro polipéptido que contém CH3 de IgG compreende a substituição dos aminoácidos nas posições 392 e 409 por um aminoácido carregado negativamente e o referido segundo polipéptido que contém CH3 de IgG compreende a substituição dos aminoácidos nas posições 356 e 399 por um aminoácido carregado positivamente.
18. Proteína heterodimérica da reivindicação 17, em que o primeiro polipéptido que contém CH3 de IgG compreende a substituição dos aminoácidos nas posições 370, 392 e 409 por um aminoácido carregado negativamente e o referido segundo polipéptido que contém CH3 de IgG compreende a substituição dos aminoácidos nas posições 356, 357 e 399 por um aminoácido carregado positivamente.
19. Proteína heterodimérica da reivindicação 17 ou 18, em que o aminoácido carregado negativamente é ácido aspártico.
20. Proteína heterodimérica da reivindicação 17, 18 ou 19, em que o aminoácido carregado positivamente é lisina.

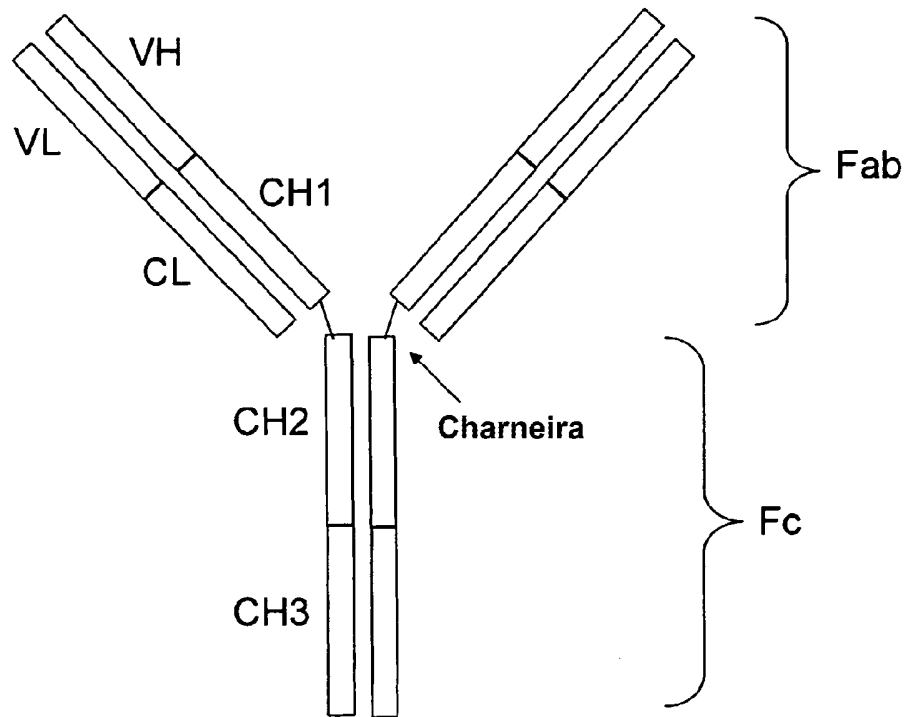


Figura 1

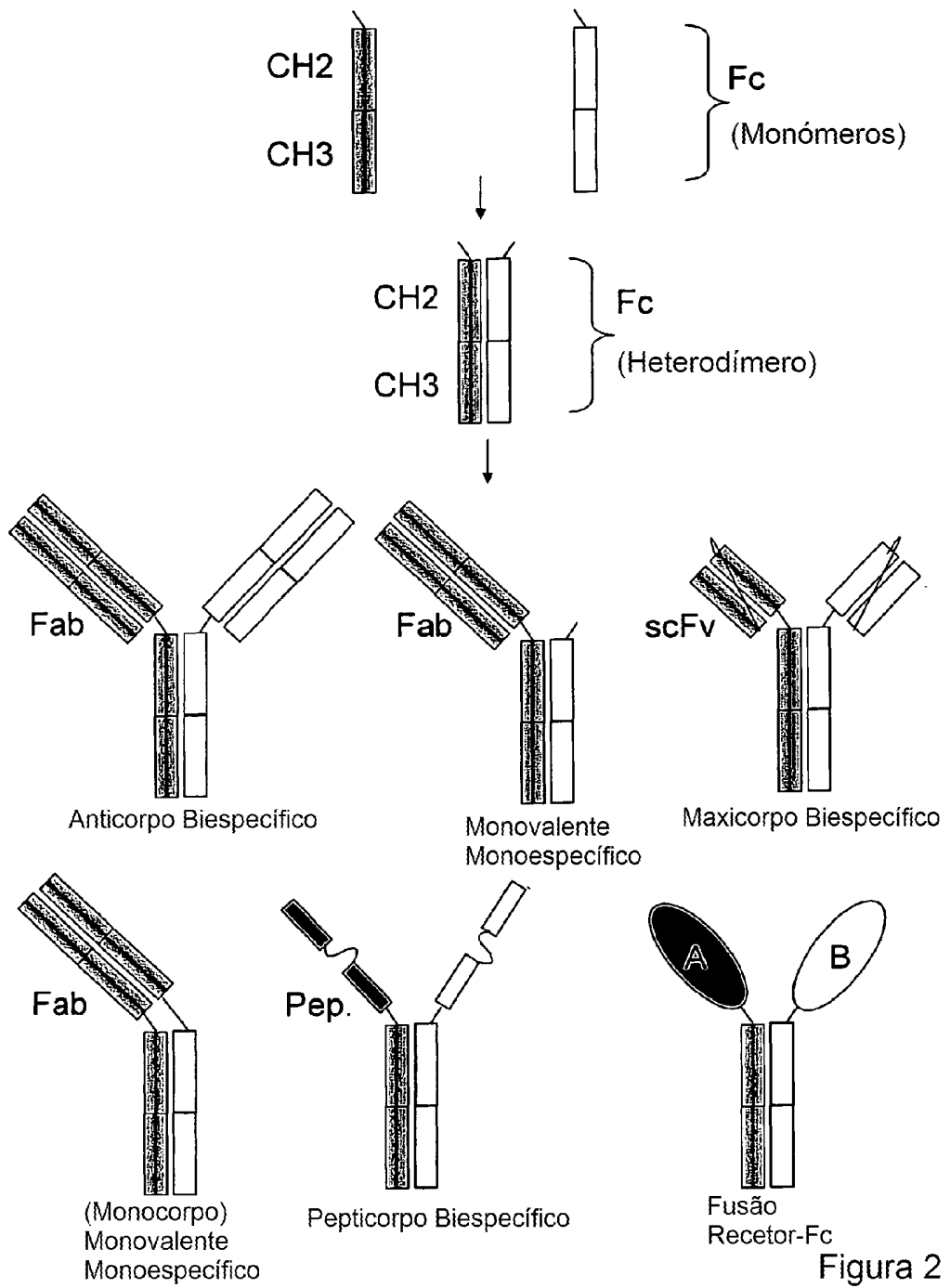


Figura 2

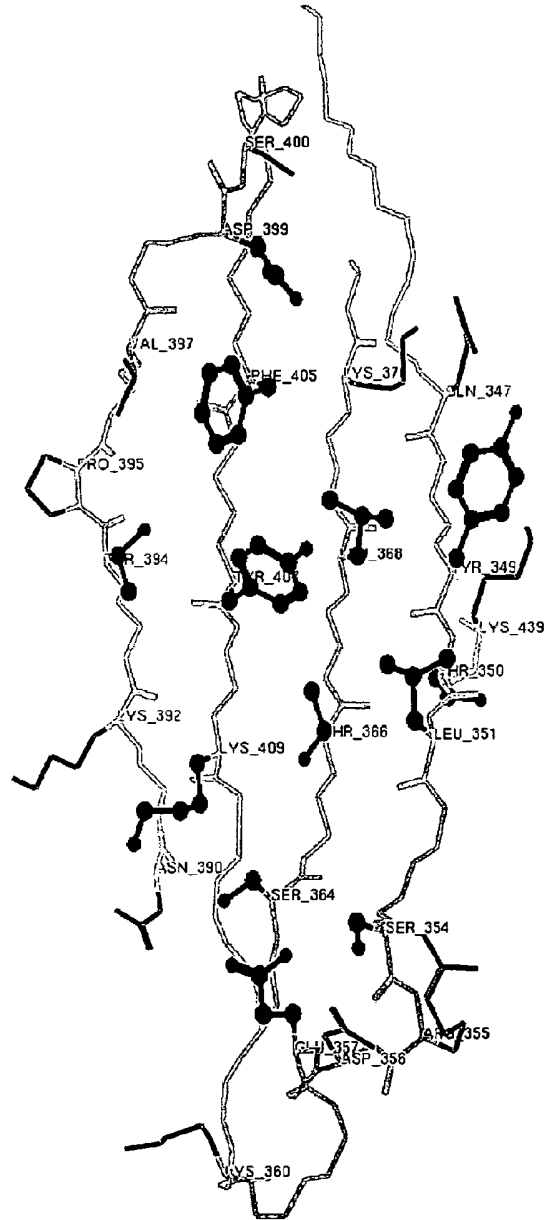


Figura 3

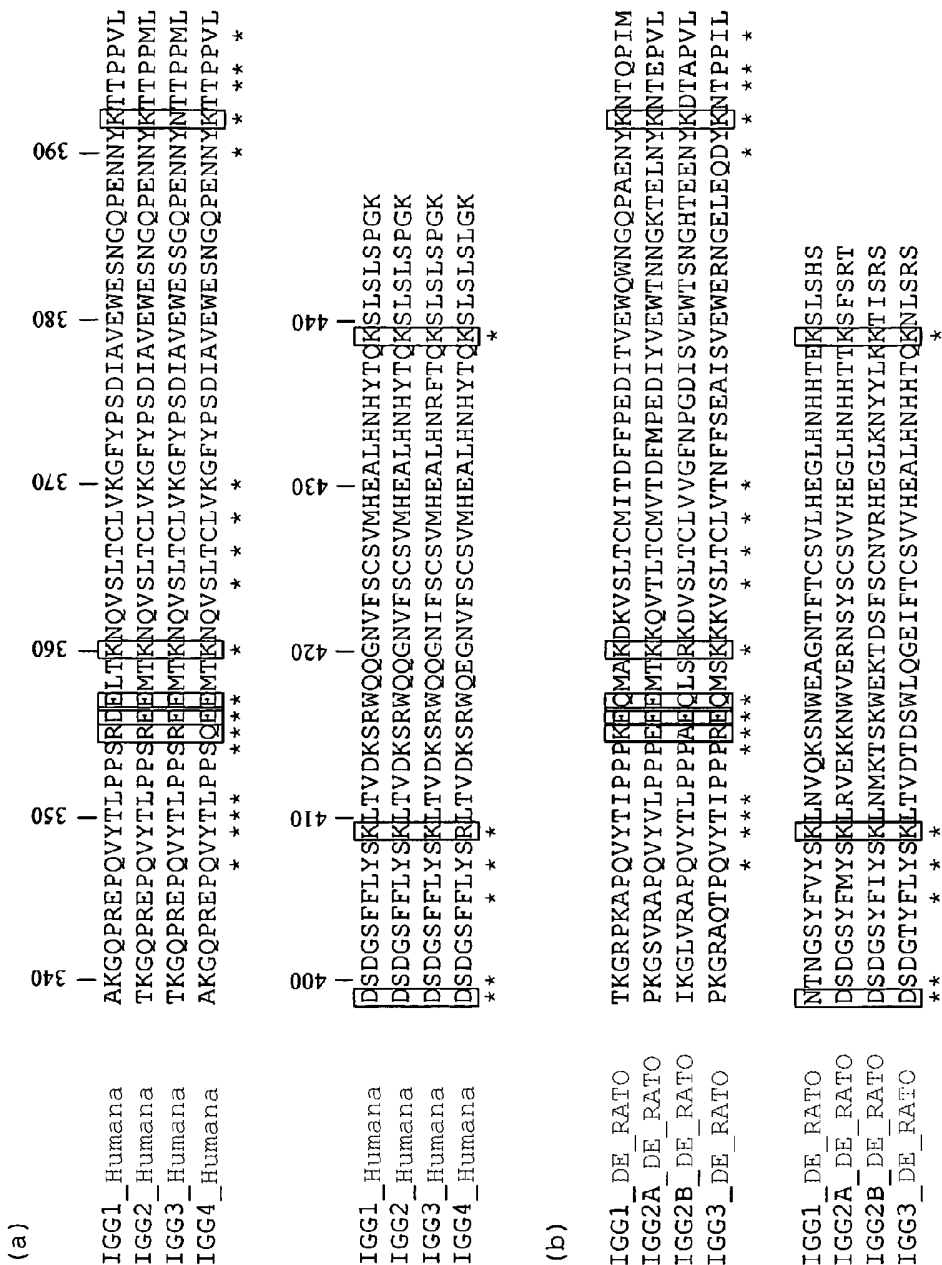


Figura 4

```

(c)
IGA_HUMANA      -SGNT-FRPEVHLLPPSEELALNELVTLTCLARGFSPKDVLRWVLCQSQELPREKYLITW
IGE_HUMANA      TSGPR-AAPEVYAFATPEWPGSRDK-RTLACLIONFMPEDISVQWLLHNEVQLPDPARHSTT
IGD_HUMANA      REPAA-QAPVKLSLNLLASSDPPPEAASWLLCEVSGFSPNILLMWLEDDQREVNTSGFAPA
IGM_HUMANA      PKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRRESATITCLVTGFSPADVFVQMMQRGQPLSPEKYVTS
                *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
IGA_HUMANA      ASRQEPSQGTTFAVTSLRVAEDWKKGDTFSCMVGHEAL-PLAFTQKTIIDRLAGK
IGE_HUMANA      QPRKT---KSGFFVFSRLEVTTRAWEQKDEFICRAVHEAASPQTVQRAVSVPNGK
IGD_HUMANA      RPPQP--GSTTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRILLNASRSLEVSIVT
IGM_HUMANA      APMPEP-QAPGRYFAHSILTVSEEWNTGETYTCVVAHEAL-PNRVTERTIVDKSTGK
                *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

```

Figura 4

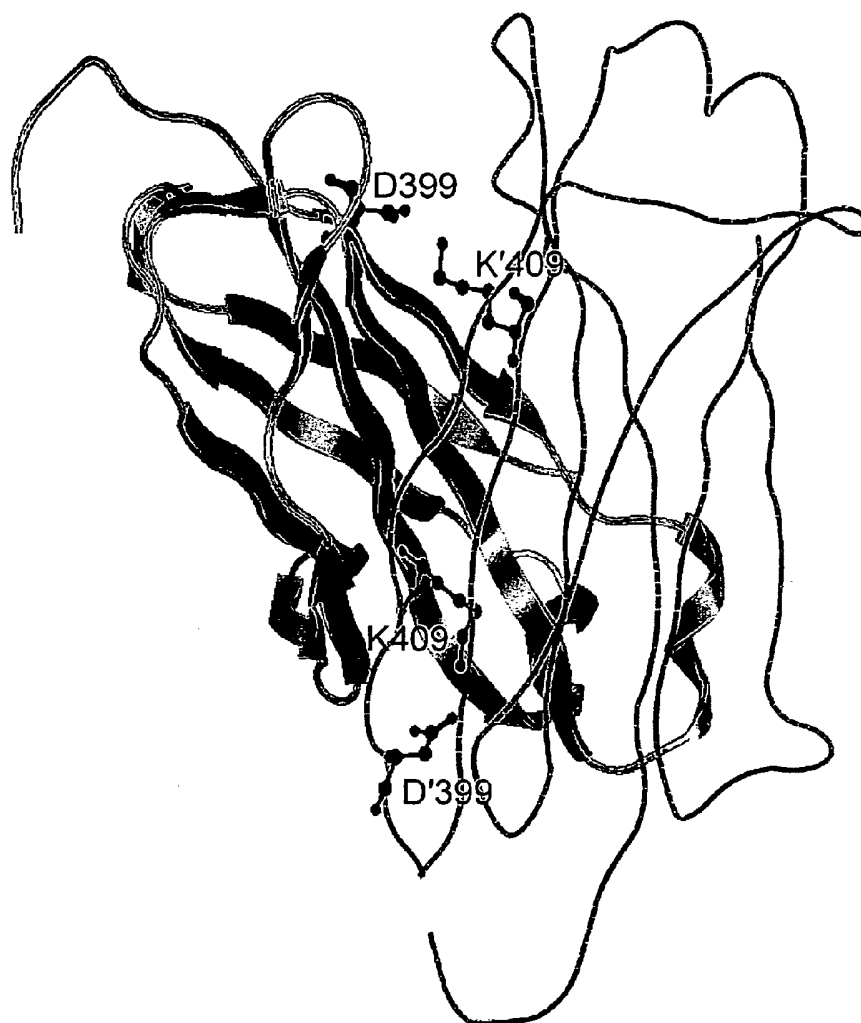


Figura 5

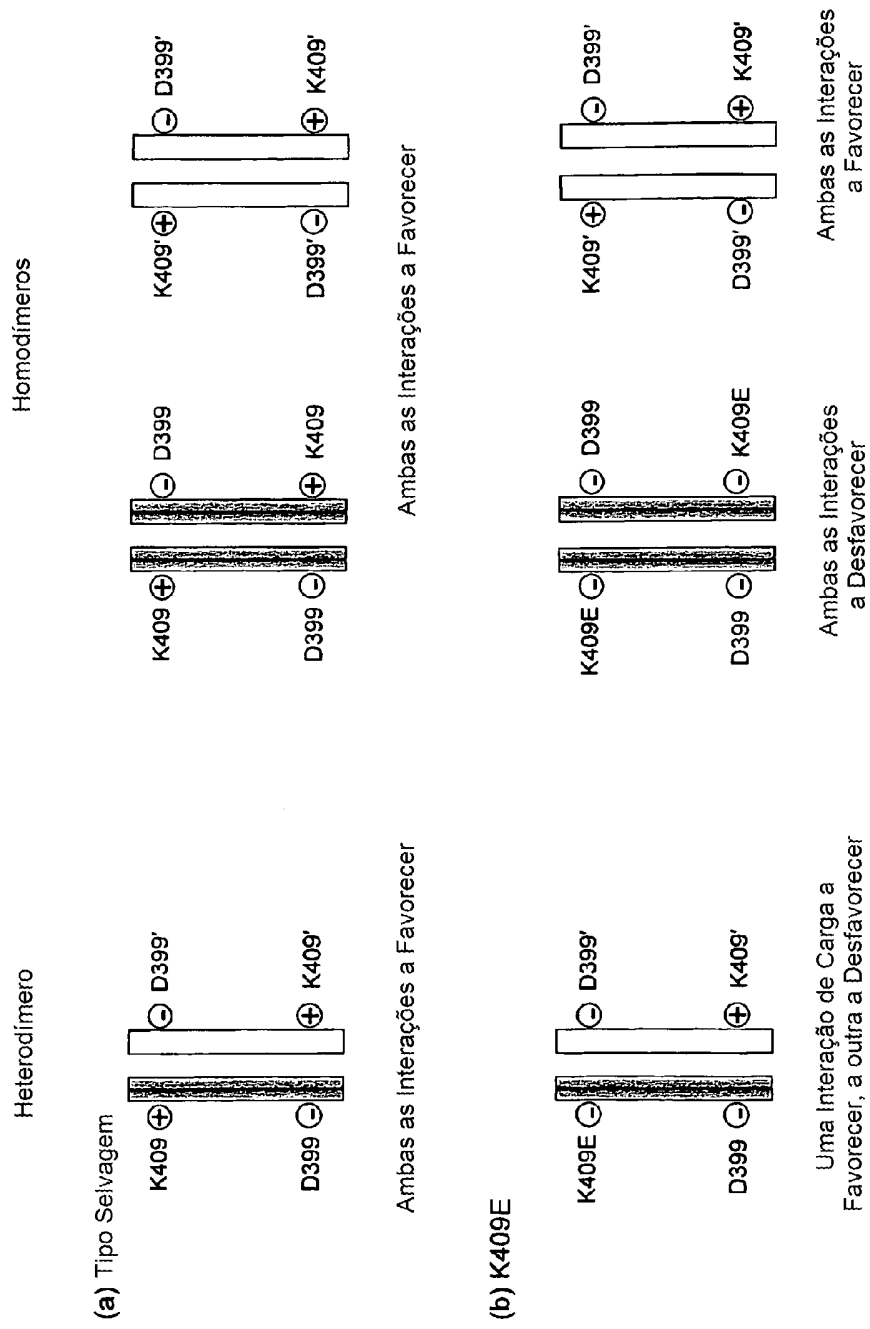
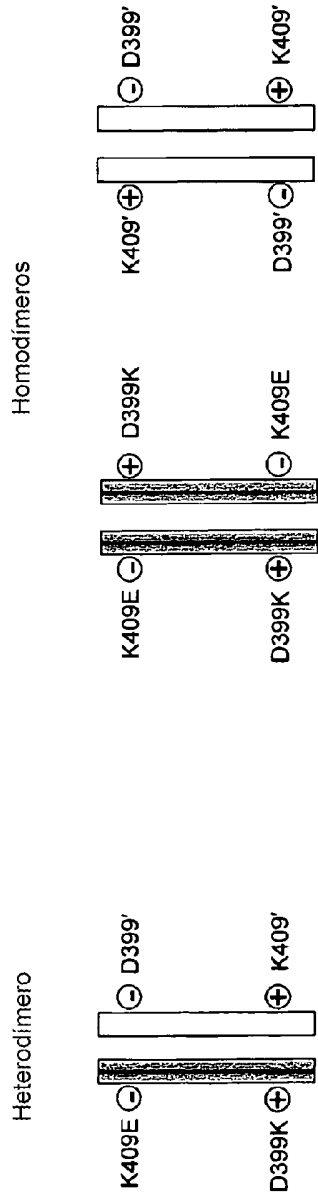


Figura 6



Ambas as interações a Desfavorecer

Ambas as Interações a Favorecer

Mutações K409E e D399K como Um Exemplo para Promover Homodímeros

Figura 7

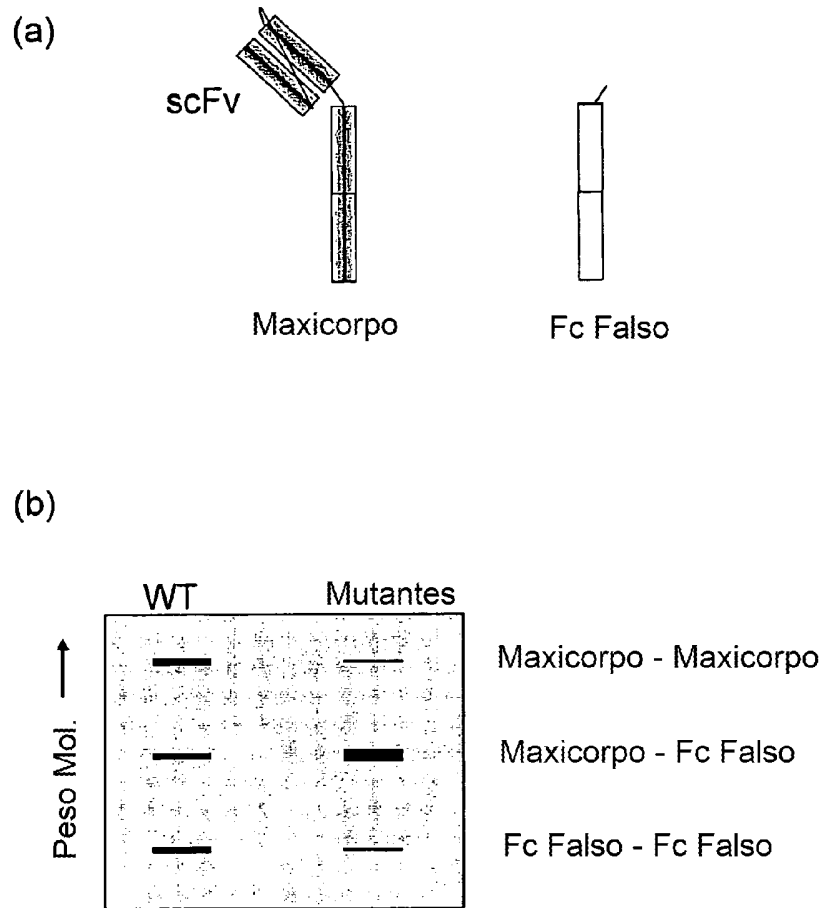


Figura 8

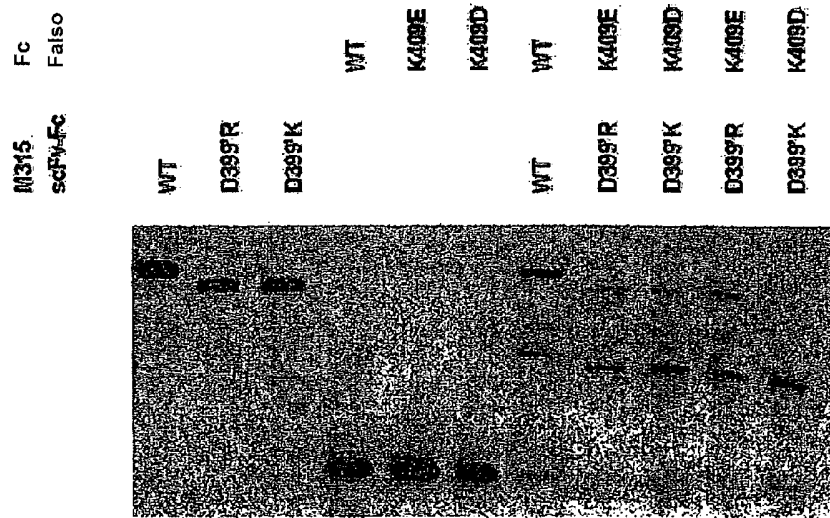


Figura 9

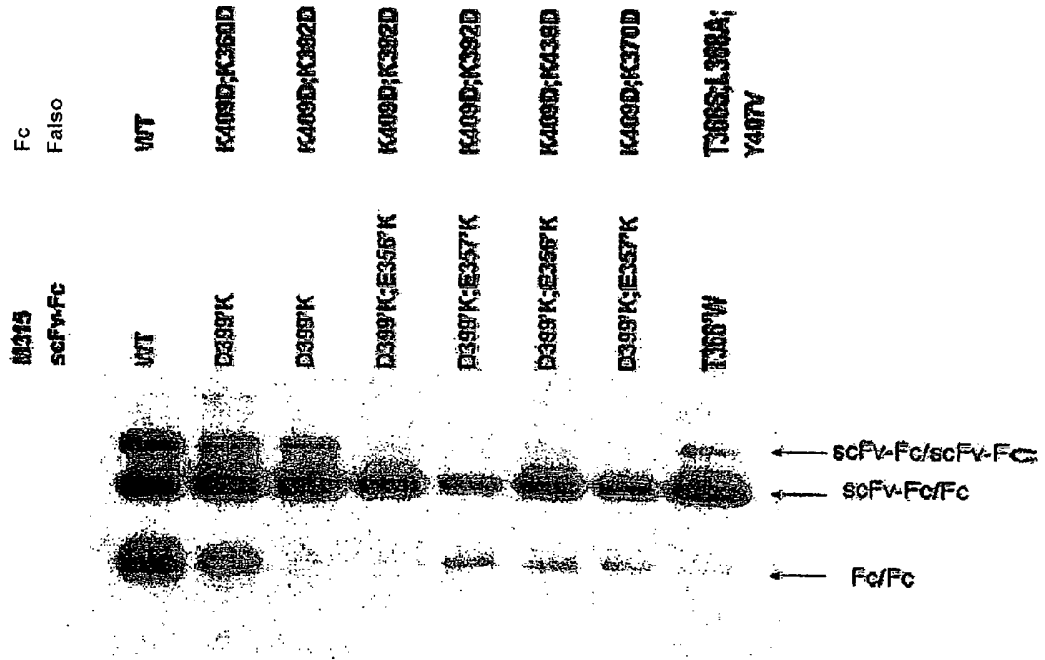


Figura 10

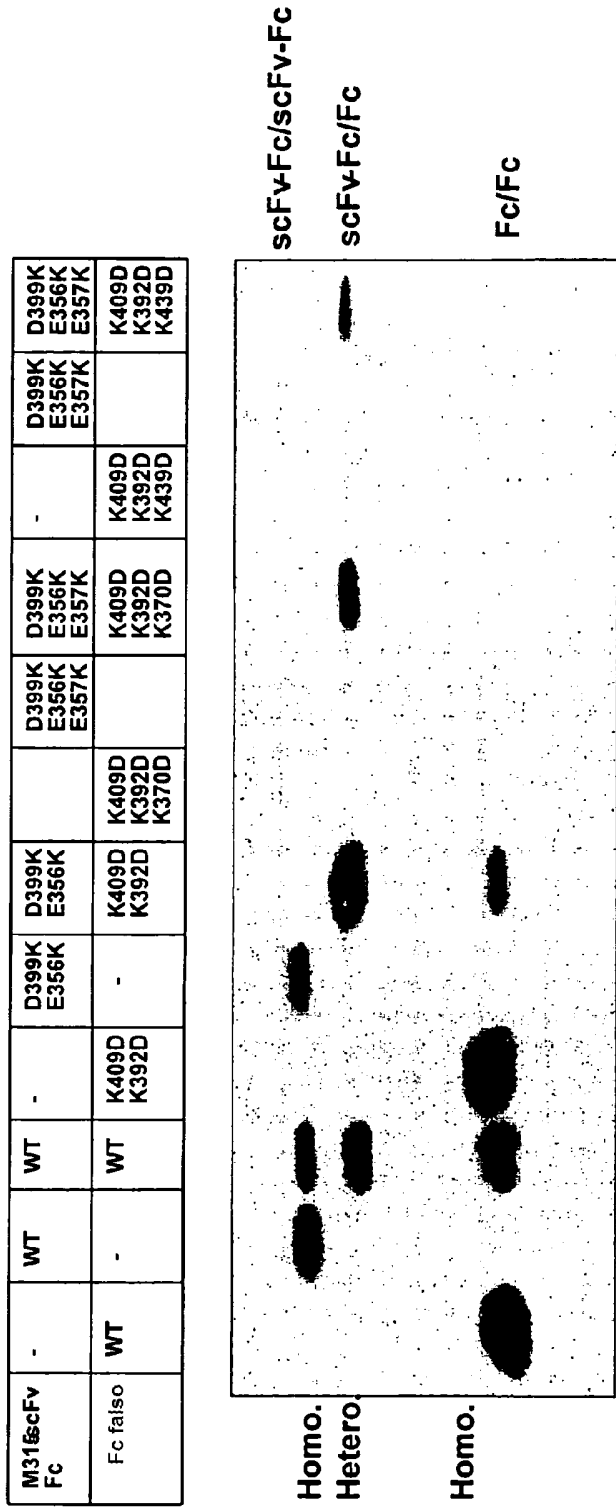


Figura 11