



INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) Número de Publicação: **PT 812357 E**

(51) Classificação Internacional:

C12N 15/13 (2006.01) **C07K 16/46** (2006.01)

C07K 17/00 (2006.01) **A61K 39/395** (2006.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **1996.02.05**

(30) Prioridade(s): **1995.03.01 US 0399106**

(43) Data de publicação do pedido: **1997.12.17**

(45) Data e BPI da concessão: **2007.01.10**
004/2007

(73) Titular(es):

GENENTECH, INC.

1 DNA WAY SOUTH SAN FRANCISCO, CA
94080-4990

US

(72) Inventor(es):

PAUL J. CARTER

JOHN B. RIDGWAY

LEONARD G. PRESTA

US

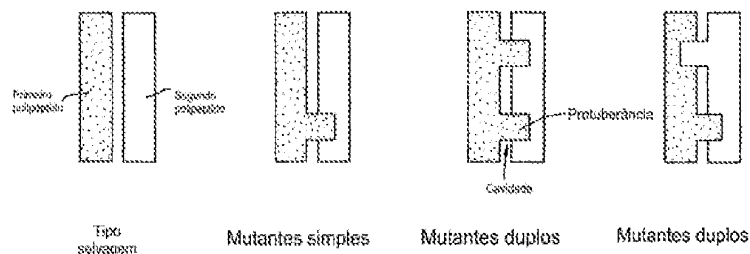
US

US

(74) Mandatário:

(54) Epígrafe: **MÉTODO DE PREPARAÇÃO DE POLIPÉPTIDOS HETEROMULTIMÉRICOS**

(57) Resumo:

RESUMO**"Método de preparação de polipéptidos heteromultiméricos"**

O invento refere-se a um método de preparar polipéptidos heteromultiméricos tais como anticorpos biespecíficos, imunoadesinas biespecíficas e quimeras anticorpo-imunoadesina. O invento também se refere aos heteromultímeros preparados utilizando o método. Geralmente, o método envolve a introdução de uma protuberância na interface de um primeiro polipéptido e uma cavidade correspondente na interface de um segundo polipéptido, de modo que a protuberância possa ser posicionada na cavidade de forma a promover a formação de heteromultímeros e evitar a formação de homomultímeros. Constroem-se "protuberâncias" por substituição de cadeias laterais de aminoácidos pequenas da interface do primeiro polipéptido por cadeias laterais maiores (por exemplo tirosina ou triptofano). Criam-se "cavidades" de compensação de tamanho idêntico ou similar às protuberâncias na interface do segundo polipéptido por substituição de cadeias laterais de aminoácidos grandes por mais pequenas (por exemplo alanina ou treonina). A protuberância e cavidade podem ser feitas por meios sintéticos, tal como por alteração do ácido nucleico que codifica os polipéptidos ou por síntese de péptidos.

DESCRIÇÃO

"Método de preparação de polipéptidos heteromultiméricos"

ANTECEDENTES DO INVENTO

Campo do invento

O presente invento refere-se a um método para preparar polipéptidos heteromultiméricos tais como anticorpos multiespecíficos (por exemplo anticorpos biespecíficos), imunoadesinas multiespecíficas (por exemplo imunoadesinas biespecíficas), bem como quimeras anticorpo-imunoadesina e os polipéptidos heteromultiméricos preparados utilizando o método.

Descrição da arte relacionada

Anticorpos biespecíficos

Os anticorpos biespecíficos (BsAb) que apresentam especificidades de ligação para pelo menos dois antigénios diferentes têm um potencial significativo numa vasta gama de aplicações clínicas como agentes de direcção ao alvo para imunodiagnóstico e terapia *in vitro* e *in vivo* e para imunoensaios de diagnóstico.

Nas áreas de diagnóstico, os anticorpos biespecíficos têm sido muito úteis para sondar as propriedades funcionais de moléculas de superfície celular e para definir a capacidade de diferentes receptores Fc mediarem citotoxicidade (Fanger et al., Crit. Rev. Immunol. **12**:101-124 [1992]). Nolan et al., Biochem. Biophys. Acta. **1040**:1-11 (1990) descrevem outras aplicações em diagnóstico para BsAb. Nomeadamente, podem construir-se BsAb para imobilizar enzimas para utilização em imunoensaios enzimáticos. Para conseguir tal, pode conceber-se um dos braços do BsAb para ligar um epítopo específico na enzima de modo que a ligação não cause inibição da enzima, o outro braço do BsAb liga-se à matriz imobilizadora assegurando uma elevada densidade de enzima no estado pretendido. Constitui um exemplo de tal BsAb de diagnóstico um BsAB anti-IgG de coelho/anti-ferritina descrito por Hammerling et al.,

J. Exp. Med. **128**:1461-1473 (1968) que foi utilizado para localizar antígenos de superfície. Foram também desenvolvidos BsAb com especificidades de ligação para peroxidase de rábano (HRP), bem como para uma hormona. Outra aplicação imunoquímica potencial para BsAb envolve a sua utilização em imunoensaios de dois locais. Por exemplo, produzem-se dois BsAb que se ligam a dois epítomos independentes na proteína analito - um BsAb liga o complexo a uma matriz insolúvel, o outro liga uma enzima indicadora (consultar Nolan et al., supra).

Os anticorpos biespecíficos podem também ser utilizados para imunodiagnóstico *in vitro* ou *in vivo* de várias doenças tal como cancro (Songsivilai et al., Clin. Exp. Immunol. **79**:315 [1990]). Para facilitar esta utilização do BsAb em diagnóstico, um braço do BsAb pode ligar um antígeno associado a tumor e o outro braço pode ligar um marcador detectável, tal como um quelante que se liga fortemente a um radionuclídeo. Utilizando esta abordagem, Le Doussal et al. prepararam um BsAb útil para radioimunodeteção de carcinomas colorrectal e da tiróide, que apresentava um braço que se ligava a um antígeno carcinoembrionário (CEA) e outro braço que se ligava a ácido dietilenotriaminopenta-acético (DPTA). Consultar Le Doussal et al., Int. J. Cancer **Supl. 7**:58-62 (1992) e Le Doussal et al., J. Nucl. Med. **34**:1662-1671 (1993). Stickney et al. descrevem de igual modo uma estratégia para detectar cancros colorrectais que expressam CEA utilizando radioimunodeteção. Estes investigadores descrevem um BsAb que liga CEA, bem como hidroxietiltiourea-benzil-EDTA (EOTUBE). Consultar Stickney et al., Cancer Res. **51**:6650-6655 (1991).

Os anticorpos biespecíficos podem também ser utilizados para terapia humana em citotoxicidade redireccionada, proporcionando um braço que liga um alvo (por exemplo, patógeno ou célula de tumor) e outro braço que liga uma molécula que desencadeia citotoxicidade, tal como o receptor de células T ou o receptor Fc γ . Assim, os anticorpos biespecíficos podem ser utilizados para dirigir os mecanismos de defesa imunitária celular de um doente especificamente para a célula de tumor ou agente infeccioso. Utilizando esta estratégia, foi demonstrado que os anticorpos biespecíficos que se ligam a Fc γ RIII (ou seja CD16) podem mediar morte de célula de tumor por células assassinas naturais (NK)/células

de linfócitos granulares grandes (LGL) *in vitro* e são eficazes na prevenção de crescimento de tumor *in vivo*. Segal et al., Chem. Immunol. **47**:179 (1989) e Segal et al., Biologic Therapy of Cancer 2(4) DeVita et al. ed. J.B. Lippincott, Filadélfia (1992) p. 1. De igual modo, foi desenvolvido um anticorpo biespecífico com um braço que se liga a Fc γ RIII e outro que se liga ao receptor HER2 para terapia de tumores de ovário e da mama que sobre-expressam o antígeno HER2. (Hsieh-Ma et al. Cancer Research **52**:6832-6839 [1992] e Weiner et al. Cancer Research **53**:94-100 [1993]). Os anticorpos biespecíficos podem também mediar a morte por células T. Normalmente, os anticorpos biespecíficos ligam o complexo CD3 em células T a um antígeno associado a tumor. Foi utilizado um BsAb F(ab')₂ completamente humanizado que consiste em anti-CD3 ligado a anti-p185^{HER2} para dirigir células T ao alvo para matar células de tumor que sobre-expressam o receptor HER2. Shalaby et al., J. Exp. Med. **175**(1):217 (1992). Os anticorpos biespecíficos foram ensaiados em vários ensaios clínicos de fase inicial com resultados encorajadores. Num ensaio, trataram-se 12 doentes com cancro de pulmão, ovários ou mama com infusões de linfócitos T activados que se direccionaram ao alvo com anticorpo biespecífico anti-CD3/anti-tumor (MOC31). deLeij et al. Bispecific Antibodies and Targeted Cellular Cytotoxicity, Romet-Lemonne, Fanger e Segal Ed., Lienhart (1991) p. 249. As células dirigidas ao alvo induziram lise local considerável de células de tumor, uma reacção inflamatória moderada, mas nenhuns efeitos secundários tóxicos ou respostas de anticorpo anti-ratinho. Num ensaio muito preliminar de um anticorpo biespecífico anti-CD3/anti-CD19 num doente com malignidade de células B, conseguiu-se também redução significativa das contagens de células de tumor periféricas. Clark et al. Bispecific Antibodies and Targeted Cellular Cytotoxicity, Romet-Lemonne, Fanger e Segal Ed., Lienhart (1991) p. 243. Consultar também Kroesen et al., Cancer Immunol. Immunother. **37**:400-407 (1993), Kroesen et al., Br. J. Cancer **70**:652-661 (1994) e Weiner et al., J. Immunol. **152**:2385 (1994) respeitantes a aplicações terapêuticas de BsAb.

Os anticorpos biespecíficos podem ser também utilizados como agentes fibrinolíticos ou adjuvantes de vacinas. Além disso, estes anticorpos podem ser utilizados no tratamento de doenças infecciosas (por exemplo para dirigir ao alvo células

efectoras para células infectadas por vírus, tais como VIH ou vírus de influenza ou protozoários tais como *Toxoplasma gondii*), utilizados para entregar imunotoxinas a células de tumor ou direccionar ao alvo complexos imunitários para receptores de superfície celular (consultar Fanger et al., supra).

A utilização de BsAb tem sido muito dificultada pela dificuldade de obter BsAb em quantidade e pureza suficientes. Tradicionalmente, os anticorpos biespecíficos eram preparados utilizando tecnologia de híbrido-hibridoma (Millstein e Cuello, Nature **305**:537-539 [1983]). Devido à distribuição aleatória de cadeias pesadas e leves de imunoglobulina, estes hibridomas (quadromas) produzem uma mistura potencial de 10 moléculas de anticorpo diferentes, das quais apenas uma tem a estrutura biespecífica correcta (consultar figura 1 aqui incluída). A purificação da molécula correcta, que é feita habitualmente por etapas de cromatografia de afinidade, é bastante trabalhosa e os rendimentos de produto são baixos. Assim, desenvolveram-se técnicas para a produção de rendimentos mais elevados de BsAb. Estes apresentam-se nas figuras 2A-2E aqui incluídas. Tal como apresentado na figura 2A, podem preparar-se anticorpos biespecíficos utilizando ligação química. Para obter acoplamento químico dos fragmentos de anticorpo, Brennan et al., Science **229**:81 (1985) descrevem um procedimento em que se clivam proteoliticamente anticorpos intactos para gerar fragmentos $F(ab')_2$. Estes fragmentos são reduzidos na presença do agente complexante de ditiol, arsenieto de sódio, para estabilizar ditióis vizinhos e evitar formação de dissulfuretos intermoleculares. Os fragmentos Fab' gerados são então convertidos a derivados tionitrobenzoato (TNB). Um destes derivados Fab' -TNB é então reconvertido no Fab' -tiol por redução com mercaptoetilamina e é misturado com uma quantidade equimolar do outro derivado Fab' -TNB para formar o BsAb. Os BsAb produzidos podem ser utilizados como agentes para imobilização selectiva de enzimas.

Progressos recentes facilitaram a recuperação directa de fragmentos Fab' -SH de *E. coli*. que podem ser acoplados quimicamente para formar anticorpos biespecíficos (consultar figura 2B). Shalaby et al., J. Exp. Med. **175**:217-225 (1992)

descrevem a produção de uma molécula de BsAb F(ab')₂ completamente humanizada apresentando um braço que liga p185^{HER2} e outro braço que liga CD3. Cada fragmento Fab' foi excretado separadamente de *E. coli*. e sujeito a acoplamento químico dirigido *in vitro* para formar o BsAb. O BsAb assim formado foi capaz de ligar células que sobre-expressam o receptor HER2 e células T humanas normais, bem como desencadear a actividade lítica de linfócitos citotóxicos humanos contra alvos de tumor de mama humano. Consultar também Rodrigues et al., Int. J. Cancers (Supl.) **7**:45-50 (1992).

Foram também descritas várias técnicas para preparar e isolar fragmentos BsAb directamente de culturas de células recombinantes. Por exemplo, produziram-se heterodímeros F(ab')₂ biespecíficos utilizando cremalheiras de leucina (consultar figura 2C). Kostelny et al., J. Immunol. **148**(5):1547-1553 (1992). Os péptidos de cremalheira de leucina de proteínas Fos e Jun foram ligados às partes Fab' de anticorpos anti-CD3 e anti-receptor de interleucina-2 (IL-2R) por fusão génica. Os homodímeros de anticorpo foram reduzidos na região de dobra para formar monómeros e seguidamente reoxidados para formar os heterodímeros de anticorpo. Verificou-se que os BsAb eram altamente eficazes no recrutamento de células T citotóxicas para lisar células HuT-102 *in vitro*. O advento da tecnologia dos "diacorpos" descrita por Hollinger et al., PNAS (USA) **90**:6444-6448 (1993) proporcionou um mecanismo alternativo para preparar fragmentos de BsAb. Os fragmentos incluem um domínio variável de cadeia pesada (V_H) ligado a um domínio variável de cadeia leve (V_L) por um ligante que é demasiado curto para permitir emparelhamento entre os dois domínios na mesma cadeia. Assim, os domínios V_H e V_L de um fragmento são forçados a emparelhar com os domínios V_L e V_H complementares de outro fragmento, formando assim dois locais de ligação de antigénio (consultar figura 2D aqui incluída). Foi também relatada outra estratégia para preparar fragmentos de BsAb por utilização de dímeros de Fv de cadeia simples (sFv). Consultar Gruber et al. J. Immunol. **152**: 5368 (1994). Estes investigadores conceberam um anticorpo que inclui os domínios V_H e V_L de um anticorpo dirigido contra o receptor de células T ligado a um ligante de 25 resíduos de aminoácido para os domínios V_H e V_L de um anticorpo anti-fluoresceína. A molécula reenrolada (consultar

figura 2E aqui incluída) ligava a fluoresceína e a receptor de células T e redireccionou a lise de células de tumor humanas que tinham fluoresceína ligada covalentemente à sua superfície.

É aparente que foram relatadas várias técnicas para preparar fragmentos de anticorpo biespecífico que podem ser recuperados directamente de cultura de células recombinantes. No entanto, podem ser preferíveis BsAb completos a fragmentos BsAb para muitas aplicações clínicas, devido à sua provável semivida sérica mais longa e às possíveis funções efectoras.

Imunoadesinas

As imunoadesinas (Ia) são moléculas do tipo anticorpo que combinam o domínio de ligação de uma proteína tal como um receptor de superfície celular ou um ligando (uma "adesina") com as funções de efector de um domínio constante de imunoglobulina. As imunoadesinas podem apresentar muitas das propriedades químicas e biológicas valiosas de anticorpos humanos. Dado que as imunoadesinas podem ser construídas a partir de uma sequência de proteína humana com uma especificidade desejada ligada a uma sequência adequada de dobra e domínio constante (Fc) de imunoglobulina humana, pode obter-se a especificidade de ligação de interesse utilizando apenas componentes humanas. Tais imunoadesinas são minimamente imunogénicas para o doente e são seguras para utilização crónica ou repetida.

As imunoadesinas relatadas na literatura incluem fusões do receptor de células T (Gascoigne *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**:2936-2940 [1987]); CD4 (Capon *et al.*, Nature **337**:525-531 [1989]; Traunecker *et al.*, Nature **339**:68-70 [1989]; Zettmeissl *et al.*, DNA Cell Biol. USA **9**:347-353 [1990]; e Byrn *et al.*, Nature **344**:667-670 [1990]); L-selectina ou receptor de residência (Watson *et al.*, J. Cell. Biol. **110**:2221-2229 [1990]; e Watson *et al.*, Nature **349**:164-167 [1991]); CD44 (Aruffo *et al.*, Cell **61**:1303-1313 [1990]); CD28 e B7 (Linsley *et al.*, J. Exp. Med. **173**:721-730 [1991]); CTLA-4 (Lisley *et al.*, J. Exp. Med. **174**:561-569 [1991]); CD22 (Stamenkovic *et al.*, Cell **66**:1133-1144 [1991]); receptor TNF (Ashkenazi *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**:10535-10539

[1991]; Lesslauer et al., Eur. J. Immunol. **27**:2883-2886 [1991]; e Peppel et al., J. Exp. Med. **174**:1483-1489 [1991]); receptores NP (Bennett et al., J. Biol. Chem. **266**:23060-23067 [1991]); receptor de interferão γ (Kurschner et al., J. Biol. Chem. **267**:9354-9360 [1992]); 4-1BB (Chalupny et al., PNAS [USA] **89**:10360-10364 [1992]) e receptor α de IgE (Ridgway e Gorman, J. Cell. Biol. **Vol. 115**, Resumo N.º 1448 [1991]).

Constituem exemplos de imunoadesinas que foram descritas para utilização terapêutica, entre outros, imunoadesina CD4-IgG para bloquear a ligação de VIH a CD4 de superfície celular. Os dados obtidos de ensaios clínicos de fase I nos quais de administrou CD4-IgG a mulheres grávidas imediatamente antes do parto sugere que esta imunoadesina pode ser útil na prevenção de transferência materno-fetal de VIH. Ashkenazi et al., Intern. Rev. Immunol. **10**:219-227 (1993). Foi também desenvolvida uma imunoadesina que liga o factor de necrose tumoral (TNF). O TNF é uma citocina pró-inflamatória que se demonstrou ser um mediador principal de choque séptico. Com base num modelo de ratinho de choque séptico, uma imunoadesina de receptor TNF mostrou ser promissora como candidata para utilização clínica no tratamento de choque séptico (Ashkenazi et al., supra). As imunoadesinas também têm utilizações não terapêuticas. Por exemplo, a imunoadesina de receptor de L-selectina foi utilizada como um reagente para coloração histoquímica de vénulas endoteliais altas (HEV) de nódulos linfáticos periféricos. Este reagente também foi utilizado para isolar e caracterizar o ligando L-selectina (Ashkenazi et al., supra).

Se os dois braços da estrutura da imunoadesina têm diferentes especificidades, a imunoadesina é denominada uma "imunoadesina biespecífica" por analogia com anticorpos biespecíficos. Dietsch et al., J. Immunol. Methods **162**:123 (1993) descrevem uma tal imunoadesina biespecífica combinando os domínios extracelulares das moléculas de adesão, E-selectina e P-selectina. Os estudos de ligação indicam que a proteína de fusão de imunoglobulina biespecífica assim formada tem uma capacidade aumentada para se ligar a uma linha celular mielóide comparativamente às imunoadesinas monoespecíficas das quais foi derivada.

Quimeras anticorpo-imunoadesina

Foram também descritas na literatura quimeras anticorpo-imunoadesina (Ab/Ia). Estas moléculas combinam a região de ligação de uma imunoadesina com o domínio de ligação de um anticorpo.

Berg et al., PNAS (USA) **88**:4723-4727 (1991) prepararam uma quimera anticorpo-imunoadesina biespecífica que foi derivada de CD4-IgG murino. Estes trabalhadores construíram uma molécula tetramérica com dois braços. Um dos braços era composto de CD4 fundido a um domínio constante de cadeia pesada de anticorpo, juntamente com uma fusão CD₄ com um domínio constante de cadeia leve de anticorpo. O outro braço era composto de uma cadeia pesada completa de um anticorpo anti-CD3, juntamente com uma cadeia leve completa do mesmo anticorpo. Devido ao braço CD4-IgG, esta molécula biespecífica liga-se a CD3 na superfície de células T citotóxicas. A justaposição das células citotóxicas e células infectadas por VIH resulta na morte específica destas últimas células.

Enquanto que Berg et al. descrevem uma molécula biespecífica que tinha estrutura tetramérica, é possível produzir uma molécula híbrida trimérica que contém apenas uma fusão CD4-IgG. Consultar Chamow et al., J. Immunol. **153**:4268 (1994). O primeiro braço desta construção é formado por uma cadeia leve κ de anti-CD3 humanizada e uma cadeia pesada γ de anti-CD3 humanizada. O segundo braço é uma imunoadesina CD4-IgG que combina parte do domínio extracelular de CD4 responsável por ligação de gp120 com o domínio Fc de IgG. A quimera Ab/Ia resultante mediou a morte de células infectadas por VIH, utilizando quer preparações de células T citotóxicas puras, quer fracções de linfócitos de sangue periférico (PBL) completos que incluíam adicionalmente células efectoras de linfócitos granulares grandes apresentando receptor Fc.

No fabrico dos heteromultímeros supramencionados, é desejável aumentar os rendimentos do heteromultímero pretendido relativamente ao(s) homomultímero(s). O invento aqui descrito proporciona um modo para conseguir tal.

SUMÁRIO DO INVENTO

Este pedido descreve uma estratégia de "protuberância-em-cavidade" que serve para modificar racionalmente uma interface entre um primeiro e segundo polipéptido para hetero-oligomerização. Consultar a figura 4 para uma ilustração esquemática da estratégia utilizada. A interface preferida inclui pelo menos uma parte do domínio C_H3 de um domínio constante de anticorpo. As "protuberâncias" são construídas por substituição de cadeias laterais de aminoácidos pequenas da interface do primeiro polipéptido com cadeias laterais maiores (por exemplo tirosina ou triptofano). Opcionalmente criam-se "cavidades" de compensação de tamanho idêntico ou similar às protuberâncias na interface do segundo polipéptido por substituição de cadeias laterais de aminoácidos grandes por outras mais pequenas (por exemplo alanina ou treonina). Quando existe uma protuberância ou cavidade adequadamente posicionada e dimensionada na interface do primeiro ou do segundo polipéptido, só é necessário conceber racionalmente uma cavidade ou protuberância correspondente, respectivamente, na interface adjacente.

Assim, pode dizer-se que o invento se refere a um método de acordo com a reivindicação 1.

Normalmente, os ácidos nucleicos que codificam tanto o primeiro polipéptido como o segundo polipéptido são alterados para codificar a protuberância e cavidade, respectivamente. De preferência cada um dos primeiros e segundo polipéptidos inclui um domínio constante de anticorpo, tal como o domínio C_H3 de uma IgG₁ humana.

O invento também proporciona um heteromultímero (tal como um anticorpo biespecífico, imunoadesina biespecífica ou quimera anticorpo/imunoadesina) obténível pelo método da reivindicação 1. O heteromultímero pode ser proporcionado sob a forma de uma composição incluindo adicionalmente um transportador farmacêuticamente aceitável.

O invento também se refere a uma célula hospedeira incluindo ácido nucleico que codifica o heteromultímero do parágrafo anterior, em que o ácido nucleico que codifica o

primeiro polipéptido e segundo polipéptido está presente num único vector ou em vectores independentes. A célula hospedeira pode ser utilizada num método de preparar um heteromultímero que envolve cultura da célula hospedeira de modo que o ácido nucleico seja expresso e recuperação do heteromultímero da cultura celular.

O invento proporciona um mecanismo para aumentar os rendimentos do heteromultímero relativamente a outros produtos finais indesejados, tais como homomultímeros. De preferência, os rendimentos do heteromultímero recuperado de cultura celular recombinante são pelo menos superiores a 80% e de preferência superiores a 90% comparativamente com o(s) produto(s) secundário(s) homomultímero(s).

Descrição sucinta dos desenhos

A figura 1 representa as várias moléculas de anticorpo que podem ser geradas quando a técnica tradicional de híbrido-hibridoma de Millstein e Cuello, supra, é utilizada para preparar BsAb completos.

As figuras 2A-2E ilustram as várias técnicas da arte prévia para fabrico de fragmentos BsAb, revistas na secção de antecedentes supra.

As figuras 3A-3C representam um exemplo de estratégia para preparar um dímero de imunoadesina (figura 3C) incluindo o domínio de ligação de um receptor (figura 3A) e o domínio constante de uma imunoglobulina IgG₁ (figura 3B).

A figura 4 ilustra esquematicamente a estratégia de protuberância-em-cavidade do presente pedido para gerar heteromultímeros.

A figura 5 apresenta os resíduos de interface do domínio C_H3 das imunoglobulinas IgG (SEQ ID NO:1-3), IgA (SEQ ID NO:4), IgD (SEQ ID NO:5), IgE (SEQ ID NO:6) e IgM (SEQ ID NO:7). O domínio C_H3 de cada uma destas imunoglobulinas é constituído por uma "sanduíche β ", que é constituída por duas "folhas β " independentes e paralelas. Uma das folhas β proporciona os resíduos da interface, a outra é a "folha β

exterior". A folha β que forma a interface é formada por quatro "cadeias β ". Os resíduos de cada uma das sete folhas β do domínio C_H3 de várias imunoglobulinas são identificados com linha no topo a tracejado. Os resíduos nas cadeias β do meio e do limiar da interface estão identificados, bem como os da folha β exterior. A numeração de resíduos está de acordo com a estrutura cristalina de Fc (Deisenhofer, Biochem. **20**:2361 [1981]). Os resíduos enterrados no interior do domínio C_H3 são identificados com um "B", os que estão parcialmente enterrados no interior do domínio C_H3 são identificados com um "b", os resíduos de "contacto" que se encontram parcialmente enterrados na interface (ou seja expostos a 26%-10%) são identificados com um "i" e os que estão enterrados na interface (ou seja <6% expostos) são identificados com um "I". Os resíduos a negrito são resíduos originais candidatos óptimos para substituição com resíduos importados.

A figura 6 identifica os resíduos da interface de subtipos de IgG humana (h) (SEQ ID NO:8-11 e 16) ou murina (m) (SEQ ID NO:12-15) (B=ASX e Z=GLX). Os resíduos em cadeias β no limiar e no meio da interface estão entre parêntesis e os resíduos de "contacto" são indicados com setas. As sequências foram obtidas de Miller et al., J. Mol. Biol. **216**:965 (1990) e Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, ed. 5, (1991). É óbvio que os resíduos de contacto são altamente conservados.

A figura 7 apresenta os resíduos da interface do domínio C_H3 de IgG₁ humana. Os dados foram derivados de Miller et al., J. Mol. Biol. **216**:965 (1990). Apresentam-se os resíduos de "contacto" e os resíduos mutados nos exemplos aqui descritos estão em caixas.

A figura 8 apresenta esquematicamente o ensaio de co-transfecção para análise da heterodimerização de Fc descrito nos exemplos.

A figura 9 representa um dímero C_H3 com base numa estrutura de 2,9 Å de Fc de IgG₁ humana (Deisenhofer, Biochem. **20**:2361 [1981]) salientando as mutações T366Y e Y407T em lados opostos da interface conjuntamente com os resíduos Phe⁴⁰⁵ e

Thr³⁹⁴ ("numeração de Kabat"-Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, ed. 5, [1991]).

As figuras 10A-10E representam uma análise de varrimento densitométrico dos produtos de SDS-PAGE de co-transfecção de cadeias pesada (H) e leve (L) de anticorpo (Ab) com imunoadesina (Ia). A figura 10A apresenta tipo selvagem; a figura 10B apresenta o mutante Ab Y407T, Ia T366Y; a figura 10C apresenta o mutante Ab T366Y, Ia Y407T; a figura 10D apresenta o mutante Ab F405A, Ia T394W; e a figura 10E apresenta o mutante Ab T366Y:F405A, Ia T394W:Y407T. Os dados apresentados são a média de pelo menos 2 experiências independentes. Verificou-se que a resposta de sinal densitométrico é linear ($R=0,9993$) ao longo da gama experimental utilizada (0,02-10 µg), tal como avaliado pela experiência de controlo utilizando um anticorpo humanizado altamente relacionado, huMAb4D5-8 (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**:4285 [1992]).

I. Definições

Em geral, as seguintes palavras ou frases têm as definições indicadas quando utilizadas na descrição, exemplos e reivindicações:

Um "heteromultímero" ou "polipéptido heteromultimérico" é uma molécula incluindo pelo menos um primeiro polipéptido e um segundo polipéptido, em que o segundo polipéptido difere na sequência de aminoácidos do primeiro polipéptido pelo menos num resíduo de aminoácido. De preferência, o heteromultímero tem especificidade de ligação para pelo menos dois ligandos ou locais de ligação diferentes. O heteromultímero pode incluir um "heterodímero" formado pelo primeiro e segundo polipéptidos ou podem formar estruturas terciárias de ordem superior em que estão presentes polipéptidos além do primeiro e segundo polipéptidos. Constituem exemplos de estruturas para o heteromultímero, entre outras, heterodímeros, por exemplo a imunoadesina biespecífica descrita por Dietsch et al., supra), heterotrímeros (por exemplo a quimera Ab/Ia descrita por Chamow et al., supra), heterotetrâmeros (por exemplo um anticorpo biespecífico) e estruturas oligoméricas adicionais.

Tal como aqui utilizado, "polipéptido" refere-se geralmente a péptidos e proteínas com mais de cerca de dez aminoácidos. De preferência, utilizam-se polipéptidos de mamífero (polipéptidos que foram originalmente derivados de um organismo mamífero), com maior preferência os que são directamente excretados para o meio. Constituem exemplos de polipéptidos bacterianos, entre outros, por exemplo, fosfatase alcalina e β -lactamase. Constituem exemplos de polipéptidos de mamífero, entre outros, moléculas tais como renina, uma hormona de crescimento, incluindo hormona de crescimento humana; hormona de crescimento bovina; factor de libertação de hormona de crescimento; hormona paratiróide; hormona estimuladora da tiróide; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadeia A de insulina; cadeia B de insulina; pró-insulina; hormona folículo estimulante; calcitonina; hormona luteinizante; glucagon; factores de coagulação tais como factor VIIIC, factor IX, factor de tecido e factor de von Willebrands; factores de anti-coagulação tais como proteína C; factor natriurético atrial; surfactante pulmonar; um activador de plasminogénio, tal como uroquinase ou activador de plasminogénio de urina humana ou de tipo de tecido (t-PA); bombesina; trombina; factor de crescimento hemopoiético; factor alfa e factor beta de necrose tumoral; encefalinase; RANTES (regulado por activação normalmente expresso e excretado por células T); proteína inflamatória de macrófago humano (MIP-1-alfa); uma albumina de soro, tal como albumina de soro humana; substância de inibição mulleriana; cadeia A de relaxina; cadeia B de relaxina; pró-relaxina; péptido associado a gonadotropina de ratinho; uma proteína microbiana, tal como beta-lactamase; ADNase; inibina; activina; factor de crescimento endotelial vascular (VEGF); receptores para hormonas ou factores de crescimento; integrina; proteína A ou D; factores reumatóides; um factor neurotrófico tal como factor neurotrófico derivado de osso (BDNF), neurotrofina-3, neurotrofina-4, neurotrofina-5 ou neurotrofina-6 (NT-3, NT-4, NT-5 ou NT-6), ou um factor de crescimento de nervos tal como NGF- β ; factor de crescimento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crescimento de fibroblasto tal como aFGF e bFGF; factor de crescimento epidérmico (EGF); factor de crescimento de transformação (TGF) tal como TGF-alfa e TGF-beta, incluindo TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 ou TGF- β 5; factor I e factor II de crescimento do tipo insulina (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-

IGF-I (IGF-I cerebral), proteínas de ligação de factor de crescimento do tipo insulina; proteínas CD tais como CD-3, CD-4, CD-8 e CD-19; eritropoietina; factores osteoindutores; imunotoxinas; uma proteína morfogenética óssea (BMP); um interferão tal como interferão-alfa, interferão-beta e interferão-gama; factores de estimulação de colónias (CSF), por exemplo, M-CSF, GM-CSF e G-CSF; interleucinas (IL), por exemplo, IL-1 a IL-10; superóxido-dismutase; receptores de células T; proteínas de superfície membranar; factor de aceleração de decaimento; antigénio vírico tal como, por exemplo, uma parte do invólucro de SIDA; proteínas de transporte; receptores de residência; adressinas; proteínas de regulação; anticorpos; e fragmentos de qualquer um dos polipéptidos apresentados supra.

O "primeiro polipéptido" é qualquer polipéptido que está associado com um segundo polipéptido. O primeiro e segundo polipéptidos encontram-se numa "interface" (definida infra). Além da interface, o primeiro polipéptido pode incluir um ou mais domínios adicionais, tal como "domínios de ligação" (por exemplo um domínio variável de anticorpo, domínio de ligação de receptor, domínio de ligação de ligando ou domínio enzimático) ou domínios constantes de anticorpo (ou suas partes) incluindo domínios C_{H2} , C_{H1} e C_L . Normalmente, o primeiro polipéptido incluirá pelo menos um domínio que é derivado de um anticorpo. Este domínio é convenientemente um domínio constante, tal como o domínio C_{H3} de um anticorpo e pode formar a interface do primeiro polipéptido. Constituem exemplos de primeiros polipéptidos, entre outros, polipéptidos de cadeia pesada de anticorpo, quimeras que combinam um domínio constante de anticorpo com um domínio de ligação de um polipéptido heterólogo (ou seja uma imunoadesina, consultar definição infra), polipéptidos receptores (especialmente os que formam dímeros com outro polipéptido receptor, por exemplo, receptor de interleucina-8 [IL-8R] e heterodímeros de integrina [por exemplo LFA-1 ou GPIIIb/IIIa]), polipéptidos ligandos (por exemplo factor de crescimento de nervos [NGF], neurotrofina-3 [NT-3] e factor neurotrófico derivado de cérebro [BDNF] - consultar Arakawa *et al.* J. Biol. Chem. **269**(45): 27833-27839 [1994] e Radziejewski *et al.* Biochem. **32**(48): 1350 [1993]) e polipéptidos de domínio variável de anticorpo (por exemplo diacorpos). O primeiro polipéptido

preferido é seleccionado de uma cadeia pesada de anticorpo e uma imunoadesina.

O "segundo polipéptido" é qualquer polipéptido que está associado como o primeiro polipéptido através de uma "interface". Além da interface, o segundo polipéptido pode incluir domínios adicionais tal como um "domínio de ligação" (por exemplo um domínio variável de anticorpo, domínio de ligação de receptor, domínio de ligação de ligando ou domínio enzimático), ou domínios constantes de anticorpo (ou suas partes) incluindo domínios C_{H2} , C_{H1} e C_L . Normalmente, o segundo polipéptido incluirá pelo menos um domínio que é derivado de um anticorpo. Este domínio é convenientemente uma região constante, tal como o domínio C_{H3} de um anticorpo e pode formar a interface do segundo polipéptido. Constituem exemplos de segundos polipéptidos, entre outros, polipéptidos de cadeia pesada de anticorpo, quimeras que combinam um domínio constante de anticorpo com um domínio de ligação de um polipéptido heterólogo (ou seja uma imunoadesina, consultar a definição infra), polipéptidos receptores (especialmente os que formam dímeros com outro polipéptido receptor, por exemplo, receptor de interleucina-8 [IL-8R] e heterodímeros de integrina [por exemplo LFA-1 ou GPIIb/IIIa]), polipéptidos ligandos (por exemplo factor de crescimento de nervos [NGF], neurotrofina-3 [NT-3] e factor neurotrófico derivado de cérebro [BDNF]-consultar Arakawa et al. J. Biol. Chem. **269(45)**: 27833-27839 [1994] e Radziejewski et al. Biochem. **32(48)**: 1350 [1993]) e polipéptidos de domínio variável de anticorpo (por exemplo diacorpos). O segundo polipéptido preferido é seleccionado de uma cadeia pesada de anticorpo e uma imunoadesina.

Um "domínio de ligação" inclui qualquer região de um polipéptido que é responsável por ligação selectiva a uma molécula de interesse (por exemplo um antigénio, ligando, receptor, substrato ou inibidor). Constituem exemplos de domínios de ligação, entre outros, um domínio variável de anticorpo, domínio de ligação de receptor, domínio de ligação de ligando e um domínio enzimático.

A expressão "anticorpo" significará um polipéptido contendo um ou mais domínios capazes de ligar um epítopo de um

antigénio de interesse, em que tal(is) domínio(s) é(são) derivado(s) de ou são homólogos à região variável de um anticorpo. Constituem exemplos de anticorpos, entre outros, anticorpos completos, fragmentos de anticorpo, moléculas de cadeia simples, moléculas biespecíficas ou bifuncionais, diacorpos e anticorpos quiméricos (por exemplo anticorpos humanizados e Primatized™). Os "fragmentos de anticorpo" incluem fragmentos Fv, Fv', Fab, Fab' e F(ab')₂.

As formas "humanizadas" de anticorpos não humanos (por exemplo de roedor ou de primata) são imunoglobulinas quiméricas específicas, cadeias de imunoglobulina ou seus fragmentos que contêm uma sequência mínima derivada de uma imunoglobulina não humana. Na sua maioria, os anticorpos humanizados são imunoglobulinas humanas (anticorpo receptor) nos quais se substituíram resíduos de uma região determinante de complementaridade (CDR) do receptor por resíduos de uma CDR de uma espécie não humana (anticorpo dador), tal como ratinho, rato, coelho ou primata, com a especificidade, afinidade e capacidade pretendidas. Em alguns casos, substituem-se resíduos da região de esqueleto (FR) Fv da imunoglobulina humana pelos resíduos não humanos correspondentes. Além disso, o anticorpo humanizado pode incluir resíduos que não se encontram nem no anticorpo receptor, nem nas sequências de CDR ou de esqueleto importadas. Estas modificações são feitas para refinar e otimizar adicionalmente o desempenho do anticorpo. Em geral, o anticorpo humanizado incluirá substancialmente a totalidade de pelo menos um e tipicamente dois domínios variáveis, nos quais todas ou substancialmente todas as regiões CDR correspondem às de uma imunoglobulina não humana e todas ou substancialmente todas as regiões FR são as de uma sequência de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado incluirá também optimamente pelo menos uma parte de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente a de uma imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado inclui um anticorpo Primatized™ em que a região de ligação de antigénio do anticorpo é derivada de um anticorpo produzido por imunização de macacos *Macaque* com o antigénio de interesse.

Um "anticorpo multiespecífico" é uma molécula com especificidades de ligação para pelo menos dois antigénios

diferentes. Embora tais moléculas normalmente só se liguem a dois antígenos (ou seja anticorpos biespecíficos, BsAb), abrangem-se nesta expressão, quando aqui utilizada, anticorpos com especificidades adicionais, tais como anticorpos triespecíficos. Constituem exemplos de BsAb, entre outros, os que têm um braço dirigido contra um antígeno de célula de tumor e o outro braço dirigido contra uma molécula que desencadeia citotoxicidade, tal como anti-Fc γ RI/anti-CD15, anti-p185^{HER2}/Fc γ RIII (CD16), anti-CD3/anti-células B malignas (1D10), anti-CD3/anti-p185^{HER2}, anti-CD3/anti-p97, anti-CD3/anti-carcinoma de células renais, anti-CD3/anti-OVCAR-3, anti-CD3/L-D1 (anti-carcinoma de cólon), anti-CD3/anti-análogo de hormona de estimulação de melanócitos, anti-receptor EGF/anti-CD3, anti-CD3/anti-CAMA1, anti-CD3/anti-CD19, anti-CD3/MoV18, anti-molécula de adesão celular neuronal (NCAM)/anti-CD3, anti-proteína de ligação de folato (FBP)/anti-CD3, antígeno anti-pan associado a carcinoma (AMOC-31)/anti-CD3; BsAb com um braço que se liga especificamente a um antígeno de tumor e um braço que se liga a uma toxina, tal como anti-saporina/anti-Id-1, anti-CD22/anti-saporina, anti-CD7/anti-saporina, anti-CD38/anti-saporina, anti-CEA/anti-cadeia A de ricina, anti-interferão α (IFN- α)/anti-idiotipo de hibridoma, anti-CEA/anti-alcalóide de vinca; BsAb para converter profármacos activados por enzima tal como anti-CD30/anti-fosfatase alcalina (que catalisa a conversão de profármaco fosfato de mitomicina a mitomicina álcool); BsAb que podem ser utilizados como agentes fibrinolíticos tais como anti-fibrina/anti-activador de plasminogénio tecidual (tPA), anti-fibrina/anti-activador de plasminogénio de tipo uroquinase (uPA); BsAb para dirigirem complexos imunitários a alvos de receptores de superfície celular tais como anti-lipoproteína de baixa densidade (LDL)/anti-receptor Fc (por exemplo Fc γ RI, Fc γ RII ou Fc γ RIII); BsAb para utilização em terapia de doenças infecciosas tais como anti-CD3/anti-vírus de herpes *simplex* (HSV), anti-complexo receptor de células T:CD3/anti-influenza, anti-Fc γ R/anti-VIH; BsAb para detecção de tumores *in vitro* ou *in vivo* tais como anti-CEA/anti-EOTUBE, anti-CEA/anti-DPTA, anti-p185^{HER2}/anti-hapteno; BsAb como adjuvantes de vacinas (consultar Fanger et al., supra); e BsAb como ferramentas de diagnóstico tal como anti-IgG de coelho/anti-ferritina, anti-peroxidase de rábano (HRP)/anti-hormona, anti-

somatostatina/anti-substância P, anti-HRP/anti-FITC, anti-CEA/anti- β -galactosidase (consultar Nolan et al., supra). Constituem exemplos de anticorpos triespecíficos, entre outros, anti-CD3/anti-CD4/anti-CD37, anti-CD3/anti-CD5/anti-CD37 e anti-CD3/anti-CD8/anti-CD37.

Tal como aqui utilizada, a expressão "imunoadesina" designa moléculas do tipo anticorpo que combinam o "domínio de ligação" de uma proteína heteróloga (uma "adesina", por exemplo um receptor, ligando ou enzima) com as funções de efector de domínios constantes de imunoglobulinas. Estruturalmente, as imunoadesinas incluem uma fusão da sequência de aminoácidos de adesina com a especificidade de ligação pretendida que é diferente do local de reconhecimento e ligação de antigénio (local de combinação de antigénio) de um anticorpo (ou seja é "heteróloga") e uma sequência de domínio constante de imunoglobulina. A sequência de domínio constante de imunoglobulina na imunoadesina pode ser obtida de qualquer imunoglobulina, tal como subtipos IgG₁, IgG₂, IgG₃ ou IgG₄, IgA, IgE, IgD ou IgM.

A expressão "domínio de ligação de ligando" tal como aqui utilizada refere-se a qualquer receptor de superfície celular nativo ou qualquer sua região ou derivado que mantenha pelo menos qualitativamente uma capacidade de ligação de ligando e de preferência a actividade biológica de um receptor nativo correspondente. Numa concretização específica, o receptor é de um polipéptido de superfície celular com um domínio extracelular que é homólogo a um membro da superfamília génica da imunoglobulina. Outros receptores típicos não são membros da superfamília génica da imunoglobulina, mas são mesmo assim abrangidos por esta definição, são receptores para citoquinas, e em particular receptores com actividade de tirosina quinase (tirosina quinases receptoras), membros das superfamílias de hematopoietinas e receptores de factor de crescimento de nervos e moléculas de adesão celular, por exemplo selectinas E, L e P.

A expressão "domínio de ligação de receptor" é utilizada para denominar qualquer ligando nativo para um receptor, incluindo moléculas de adesão celular ou qualquer região ou derivado de tal ligando nativo que mantenha pelo menos

qualitativamente uma capacidade de ligação de receptor e de preferência a actividade biológica de um ligando nativo correspondente. Esta definição, entre outras, inclui especificamente sequências de ligação de ligandos para os receptores supramencionados.

Tal como aqui utilizada a frase "imunoadesina multiespecífica" denomina imunoadesinas (tal como aqui definido supra) com pelo menos duas especificidades de ligação (ou seja combinação de dois ou mais domínios de ligação de adesina). As imunoadesinas multiespecíficas podem ser montadas como heterodímeros, heterotrímeros ou heterotetrâmeros, essencialmente como revelado em WO 89/02922 (publicada a 6 de Abril de 1989), em EP 314 317 (publicada a 3 de Maio de 1989), e na Patente U.S. N.º 5 116 964 concedida a 2 de Maio de 1992. As imunoadesinas multiespecíficas preferidas são biespecíficas. Constituem exemplos de imunoadesinas biespecíficas, entre outras, CD4-IgG/receptor TNF-IgG e CD4-IgG/L-selectina-IgG. A última molécula mencionada combina a função de ligação de nódulos linfáticos do receptor de residência de linfócito (LHR, L-selectina) e a função de ligação de VIH de CD4 e tem potencial aplicação na prevenção ou tratamento de infecção por VIH, doenças relacionadas ou como um diagnóstico.

Uma "quimera anticorpo-imunoadesina (quimera Ab/Ia)" inclui uma molécula que combina pelo menos um domínio de ligação de um anticorpo (tal como aqui definido) com pelo menos uma imunoadesina (tal como definida neste pedido). Constituem exemplos de quimeras Ab/Ia, as quimeras CD4-IgG biespecíficas descritas por Berg et al., supra e Chamow et al., supra.

A "interface" inclui os resíduos de aminoácidos de "contacto" (ou outros grupos não aminoácido tais como grupos de hidratos de carbono, NADH, biotina, FAD ou grupo hemo) no primeiro polipéptido que interactivam com um ou mais resíduos de aminoácidos de "contacto" (ou outros grupos não aminoácido) na interface do segundo polipéptido. A interface é um domínio constante de um anticorpo. A interface preferida inclui o domínio C_H3 de uma imunoglobulina que é de preferência

derivada de um anticorpo IgG e com maior preferência de um anticorpo IgG₁ humano.

Uma "protuberância" refere-se a pelo menos uma cadeia lateral de aminoácido que se projecta da interface do primeiro polipéptido e é portanto posicionável numa cavidade de compensação na interface adjacente (ou seja a interface do segundo polipéptido) de modo a estabilizar o heteromultímero e assim favorecer a formação de heteromultímero relativamente à formação de homomultímero, por exemplo. A protuberância pode existir na interface original ou pode ser introduzida sinteticamente (por exemplo por alteração do ácido nucleico que codifica a interface). Normalmente, o ácido nucleico que codifica a interface do primeiro polipéptido é alterado para codificar a protuberância. Para conseguir tal, o ácido nucleico que codifica pelo menos um resíduo de aminoácido "original" na interface do primeiro polipéptido é substituído por ácido nucleico que codifica pelo menos um resíduo de aminoácido "importado" que tem um volume de cadeia lateral maior do que o resíduo de aminoácido original. Considerar-se-á que podem existir mais do que um resíduo original e importado correspondente. O limite superior para o número de resíduos originais que é substituído é o número total de resíduos na interface do primeiro polipéptido. Os volumes das cadeias laterais dos diferentes resíduos amino apresentam-se na seguinte tabela.

TABELA 1

Propriedades dos resíduos de aminoácido				
Aminoácido	Abr. de uma letra	MASSA ^a (daltons)	VOLUME ^b (Å ³)	Área superficial Acessível ^c (Å ²)
Alanina (Ala)	A	71,08	88,6	115
Arginina (Arg)	R	156,20	173,4	225
Asparagina (Asn)	N	114,11	117,7	160
Ácido Aspártico (Asp)	D	115,09	111,1	150
Cisteína (Cys)	C	103,14	108,5	135
Glutamina (Gln)	Q	128,14	143,9	180
Ácido Glutâmico (Glu)	E	129,12	138,4	190
Glicina (Gly)	G	57,06	60,1	75
Histidina (His)	H	137,15	153,2	195
Isoleucina (Ile)	I	113,17	166,7	175
Leucina (Leu)	L	113,17	166,7	170
Lisina (Lys)	K	128,18	168,6	200
Metionina (Met)	M	131,21	162,9	185
Fenilalanina (Phe)	F	147,18	189,9	210
Prolina (Pro)	P	97,12	122,7	145
Serina (Ser)	S	87,08	89,0	115
Treonina (Thr)	T	101,11	116,1	140
Triptofano (Trp)	W	186,21	227,8	255
Tirosina (Tyr)	Y	163,18	193,6	230
Valina (Val)	V	99,14	140,0	155
^a Peso molecular do aminoácido menos o da água. Valores de <u>Handbook of Chemistry and Physics</u> , 43rd ed. Cleveland, Chemical Rubber Publishing Co., 1961. ^b Valores de A.A. Zamyatnin, <u>Prog. Biophys. Mol. Biol.</u> 24 :107-123, 1972. ^c Valores de C. Chothia, <u>J. Mol. Biol.</u> 105 :1-14, 1975. A área superficial acessível é definida nas Figuras 6-20 desta referência.				

Os resíduos importados preferidos para a formação de uma protuberância são geralmente resíduos de aminoácidos de ocorrência natural e são seleccionados de preferência de arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y) e triptofano (W). Com maior preferência são triptofano e tirosina. Na concretização preferida, o resíduo original para a formação da protuberância tem um volume de cadeia lateral pequeno, tal

como alanina, asparagina, ácido aspártico, glicina, serina, treonina ou valina.

Uma "cavidade" refere-se a pelo menos uma cadeia lateral de aminoácido que se encontra retraída na interface do segundo polipéptido e assim acomoda uma protuberância correspondente na interface adjacente do primeiro polipéptido. A cavidade pode existir na interface original ou pode ser introduzida sinteticamente (por exemplo por alteração do ácido nucleico que codifica a interface). Normalmente, o ácido nucleico que codifica a interface do segundo polipéptido é alterado para codificar a cavidade. Para conseguir tal, o ácido nucleico que codifica pelo menos um resíduo de aminoácido "original" na interface do segundo polipéptido é substituído por ADN que codifica pelo menos um resíduo de aminoácido "importado" que tem um volume de cadeia lateral menor do que o resíduo de aminoácido original. Considerar-se-á que podem existir mais do que um resíduo original e importado correspondente. O limite superior para o número de resíduos originais que são substituídos é o número total de resíduos na interface do segundo polipéptido. Os volumes das cadeias laterais dos diferentes resíduos amino apresentam-se na tabela 1 supra. Os resíduos importados preferidos para a formação de uma cavidade são usualmente resíduos de aminoácidos de ocorrência natural e são seleccionados de preferência de alanina (A), serina (S), treonina (T) e valina (V). Com maior preferência são serina, alanina ou treonina. Na concretização preferida, o resíduo original para a formação da protuberância tem um volume de cadeia lateral grande, tal como tirosina, arginina, fenilalanina ou triptofano.

Um resíduo de aminoácido "original" é aquele que é substituído por um resíduo "importado" que pode ter um volume de cadeia lateral menor ou maior do que o resíduo original. O resíduo de aminoácido importado pode ser um resíduo de aminoácido de ocorrência natural ou não natural mas, de preferência é o primeiro. Os resíduos de aminoácidos de "ocorrência natural" são os resíduos codificados pelo código genético e apresentam-se na tabela 1 supra. Resíduo de aminoácido de "ocorrência não natural" significa um resíduo que não é codificado pelo código genético, mas que é capaz de ligar covalentemente resíduo(s) de aminoácido(s) adjacente(s)

na cadeia de polipéptido. Constituem exemplos de resíduos de aminoácidos de ocorrência não natural norleucina, ornitina, norvalina, homo-serina e outros resíduos de aminoácidos análogos, tais como os descritos em Ellman et al., Meth. Enzym. **202**:301-336 (1991), por exemplo. Para gerar tais resíduos de aminoácidos de ocorrência não natural podem ser utilizados os procedimentos de Noren et al. Science **244**: 182 (1989) e Ellman et al., supra. Sucintamente, tal envolve a activação química de um ARNt supressor com um resíduo de aminoácido de ocorrência não natural, seguido por transcrição e tradução do ARN *in vitro*. O método do presente invento envolve substituição de pelo menos um resíduo de aminoácido original, mas podem ser substituídos mais do que um resíduo original. Normalmente, não serão substituídos mais resíduos de aminoácidos originais do que os resíduos totais na interface do primeiro ou segundo polipéptido. Os resíduos originais preferidos para substituição estão "enterrados". "Enterrados" significa que o resíduo é essencialmente inacessível ao solvente. O resíduo importado preferido não é cisteína para evitar possível oxidação ou emparelhamento errado de ligações dissulfureto.

A protuberância é "posicionável" na cavidade, o que significa que a localização espacial da protuberância e cavidade na interface do primeiro polipéptido e segundo polipéptido, respectivamente, e os tamanhos da protuberância e cavidade são tais que a protuberância pode estar localizada na cavidade sem perturbar significativamente a associação normal do primeiro e segundo polipéptidos na interface. Dado que protuberâncias como Tyr, Phe e Trp não se estendem tipicamente perpendicularmente relativamente ao eixo da interface e apresentam conformações preferidas, o alinhamento de uma protuberância com uma cavidade correspondente baseia-se na modelação do par protuberância/cavidade com base numa estrutura tridimensional, tal como a obtida por cristalografia de raios X ou ressonância magnética nuclear (RMN). Tal pode ser conseguido utilizando técnicas largamente aceites na arte.

"Ácido nucleico original" significa que o ácido nucleico que codifica um polipéptido de interesse que pode ser "alterado" (ou seja modificado por engenharia genética ou mutado) para codificar uma protuberância ou cavidade. O ácido

nucleico original ou de partida pode ser um ácido nucleico de ocorrência natural ou pode incluir um ácido nucleico que foi sujeito a alteração anterior (por exemplo, um fragmento de anticorpo humanizado). "Alteração" do ácido nucleico significa que o ácido nucleico original é mutado por inserção, deleção ou substituição de pelo menos um codão que codifica um resíduo de aminoácido de interesse. Normalmente, substitui-se um codão que codifica um resíduo original por um codão que codifica um resíduo importado. As técnicas para modificar por engenharia genética um ADN desta forma foram revistas em Mutagenesis: a Practical Approach, M.J. McPherson, Ed., (IRL Press, Oxford, RU (1991) e incluem mutagénese dirigida ao local, mutagénese de cassete e mutagénese por reacção de polimerização em cadeia (PCR), por exemplo.

A protuberância ou cavidade pode ser "introduzida" na interface do primeiro ou segundo polipéptido por meios sintéticos, por exemplo por técnicas recombinantes, síntese de péptidos *in vitro*, técnicas para introduzir resíduos de aminoácidos de ocorrência não natural descritas previamente, por acoplamento de péptidos enzimática ou quimicamente ou por uma combinação destas técnicas. Assim, a protuberância ou cavidade que é "introduzida" é de "ocorrência não natural" ou "não nativa", o que significa que não existe na natureza ou no polipéptido original (por exemplo um anticorpo monoclonal humanizado).

De preferência o resíduo de aminoácido importado para a formação da protuberância tem um número relativamente pequeno de "rotâmeros" (por exemplo cerca de 3-6). Um "rotâmero" é uma conformação energeticamente favorável de uma cadeia lateral de aminoácido. O número de rotâmeros de vários resíduos de aminoácidos é revisto em Ponders e Richards, J. Mol. Biol. **193**: 775-791 (1987).

Heteromultímero "isolado" significa um heteromultímero que foi identificado e separado e/ou recuperado de uma componente do seu ambiente de cultura celular natural. As componentes contaminantes do seu ambiente natural são materiais que interfeririam com as utilizações de diagnóstico ou terapêuticas para o heteromultímero e podem incluir enzimas, hormonas e outros solutos proteínáceos ou não proteínáceos. Em

concretizações preferidas, o heteromultímero será purificado (1) a mais do que 95% em peso de proteína, tal como determinado pelo método de Lowry e com maior preferência mais de 99% em peso, (2) a um grau suficiente para obter pelo menos 15 resíduos do terminal N ou da sequência de aminoácidos interna por utilização de um sequenciador de copo rotativo ou (3) até homogeneidade por SDS-PAGE em condições redutoras ou não redutoras utilizando coloração de azul de Coomassie ou, de preferência, prata.

Os heteromultímeros do presente invento são geralmente purificados até homogeneidade substancial. As frases "substancialmente homogéneo", "forma substancialmente homogénea" e "homogeneidade substancial" são utilizadas para indicar que o produto está substancialmente isento de produtos secundários originados de combinações de polipéptido indesejadas (por exemplo homomultímeros). Expressa em termos de pureza, homogeneidade substancial significa que a quantidade de produtos secundários não excede 10% e de preferência é inferior a 5%, com maior preferência inferior a 1%, com a maior preferência inferior a 0,5%, em que as percentagens são em peso.

A expressão "sequências de controlo" refere-se a sequências de ADN necessárias para a expressão de uma sequência de codificação ligada operacionalmente num organismo hospedeiro determinado. As sequências de controlo que são adequadas para procariotas, por exemplo, incluem um promotor, opcionalmente uma sequência de operador, um local de ligação de ribossoma e, possivelmente, outras sequências ainda fracamente entendidas. Sabe-se que as células eucarióticas utilizam promotores, sinais de poliadenilação e facilitadores.

O ácido nucleico está "ligado operacionalmente" quando está colocado numa relação funcional com outra sequência de ácido nucleico. Por exemplo, ADN para uma pré-sequência ou comando de excreção que se encontra ligado operacionalmente a ADN para um polipéptido, caso seja expresso como uma pré-proteína que participa na excreção do polipéptido; um promotor ou facilitador encontra-se ligado operacionalmente a uma sequência de codificação se afecta a transcrição da sequência; ou um local de ligação de ribossoma encontra-se ligado

operacionalmente a uma sequência de codificação se está posicionado de modo a facilitar tradução. Geralmente, "ligado operacionalmente" significa que as sequências de ADN a ligar são contíguas e, no caso de um comando de excreção, contíguas e em fase de leitura. Contudo, os facilitadores não têm que ser contíguos. A ligação é efectuada por ligação a locais de restrição convenientes. Caso tais locais não existam, utilizam-se adaptadores ou ligantes oligonucleótidos sintéticos de acordo com a prática convencional.

II. Preparação do heteromultímero

1. Preparação dos materiais de partida

Como primeira etapa, seleccionam-se o primeiro e segundo polipéptidos (e quaisquer polipéptidos adicionais que formam o heteromultímero). Normalmente, o ácido nucleico que codifica estes polipéptidos deve ser isolado de modo a poder ser alterado para codificar a protuberância ou cavidade, ou ambas, tal como aqui definidas. Contudo, as mutações podem ser introduzidas utilizando meios sintéticos, por exemplo por utilização de um sintetizador de péptido. Igualmente, no caso do resíduo importado ser um resíduo de ocorrência não natural, está disponível o método de Noren *et al.*, supra para preparar polipéptidos com tais substituições. Adicionalmente, parte do heteromultímero é preparada recombinantemente de modo adequado em cultura celular e preparam-se outra(s) parte(s) da molécula por essas técnicas descritas supra.

Seguem-se técnicas para isolar anticorpos e preparar imunoadesinas. No entanto, considerar-se-á que o heteromultímero pode incorporar outros polipéptidos utilizando técnicas que são conhecidas na arte. Por exemplo, o ácido nucleico que codifica um polipéptido de interesse (por exemplo um ligando, receptor ou enzima) pode ser isolado de uma biblioteca de ADNc preparada de tecido que se pensa possuir o ARNm de polipéptido e para expressá-lo a um nível detectável. Rastreiam-se as bibliotecas com sondas (tais como anticorpos ou oligonucleótidos de cerca de 20-80 bases) concebidas para identificar o gene de interesse ou a proteína por ele codificada. O rastreio de ADNc ou biblioteca genómica com a sonda seleccionada pode ser efectuado utilizando procedimentos

padrão tal como descrito nos capítulos 10-12 de Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Nova Iorque: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).

(i) Preparação de anticorpo

Foram descritas várias técnicas para a produção de anticorpos que incluem o método de hibridoma tradicional para preparar anticorpos monoclonais, técnicas recombinantes para preparar anticorpos (incluindo anticorpos quiméricos, por exemplo anticorpos humanizados), produção de anticorpo em animais transgênicos e a tecnologia descrita recentemente de disposição de fagos para preparar anticorpos "completamente humanos". Estas técnicas serão descritas sucintamente infra.

Podem geralmente desenvolver-se anticorpos policlonais para o antigénio de interesse em animais por múltiplas injeções subcutâneas (sc) ou intraperitoneais (ip) do antigénio e um adjuvante. Pode ser útil conjugar o antigénio (ou um fragmento contendo a sequência de aminoácidos alvo) com uma proteína que é imunogénica na espécie a imunizar, por exemplo, hemocianina de lapa gigante, albumina de soro, tiroglobulina bovina ou inibidor de tripsina de soja, utilizando um agente bifuncional ou de derivatização, por exemplo éster sulfossuccinimida de maleimidobenzoílo (conjugação através de resíduos de cisteína), N-hidroxissuccinimida (através de resíduos lisina), glutaraldeído, anidrido succínico, SOCl_2 ou $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, em que R e R^1 são grupos alquilo diferentes. Os animais são imunizados contra os conjugados ou derivados imunogénicos por combinação de 1 mg de 1 μg de conjugado (para coelhos ou ratinhos, respectivamente) com 3 volumes de adjuvante completo de Freud e injectando a solução intradermicamente em múltiplos locais. Um mês mais tarde, os animais são reforçados com 1/5 a 1/10 da quantidade original do conjugado em adjuvante completo de Freud por injeção subcutânea em múltiplos locais. 7 a 14 dias mais tarde, sangram-se os animais e ensaia-se o soro para título de anticorpo. Os animais recebem reforço até que o título atinja um patamar. De preferência, o animal recebe reforço com o conjugado do mesmo antigénio, mas conjugado com uma proteína diferente e/ou através de um reagente de reticulação diferente. Podem também preparar-se conjugados em

cultura celular recombinante como fusões de proteínas. Igualmente, utilizam-se agentes de agregação, tais como alúmen, para aumentar a resposta imunitária.

Os anticorpos monoclonais são obtidos de uma população de anticorpos substancialmente homogênea utilizando o método do hibridoma primeiramente descrito por Kohler e Milstein, Nature **256**:495 (1975) ou podem ser preparados por métodos de ADN recombinante (Cabilly et al., Patente U.S. N.º 4 816 567). No método do hibridoma, imuniza-se um ratinho ou outro animal hospedeiro adequado, tal como *hamster*, como aqui descrito supra, para desenvolver linfócitos que produzem ou são capazes de produzir anticorpos que se ligarão especificamente à proteína utilizada para imunização. Alternativamente, os linfócitos podem ser imunizados *in vitro*. Os linfócitos são então fundidos com células de mieloma utilizando um agente de fusão adequado, tal como polietilenoglicol, para formar uma célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, p. 59-103 [Academic Press, 1986]). As células de hibridoma assim preparadas são cultivadas e crescidas num meio de cultura adequado que contém de preferência uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou sobrevivência de células de mieloma parentais não fundidas. Por exemplo, se as células de mieloma parentais não contiverem a enzima hipoxantina-guanina-fosforibosil-transferase (HGPRT ou HPRT), o meio de cultura para os hibridomas incluirá tipicamente hipoxantina, aminopterina e timidina (meio HAT), substâncias que evitam o crescimento de células deficientes em HGPRT. As células de mieloma preferidas são as que fundem eficazmente, mantêm expressão estável em níveis elevados de anticorpo pelas células produtoras de anticorpo seleccionadas e são sensíveis a um meio tal como meio HAT. Entre estas, as linhas de células de mieloma preferidas são linhas de mieloma murino, tais como as derivadas de tumores de ratinho MOPC-21 e MPC-11 disponíveis de Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Califórnia, EUA e células SP-2 disponíveis de American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, EUA. Foram também descritas linhas celulares de mieloma humano e heteromieloma ratinho-humano para a produção de anticorpos monoclonais humanos (Kozbor, J. Immunol., **133**:3001 [1984]; e Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, p. 51-63, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque,

1987). Consultar também, Boerner et al., J. Immunol., **147**(1):86-95 (1991) e WO 91/17769, publicada a 28 de Novembro de 1991, para técnicas para a produção de anticorpos monoclonais humanos. O meio de cultura no qual crescem as células de hibridoma é ensaiado para a produção de anticorpos monoclonais dirigidos contra o antigénio de interesse. De preferência, a especificidade de ligação de anticorpos monoclonais produzidos por células de hibridoma é determinada por imunoprecipitação ou por ensaio de ligação *in vitro*, tal como radioimunoensaio (RIA) ou ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). A afinidade de ligação do anticorpo monoclonal pode, por exemplo, ser determinada pela análise de Scatchard de Munson e Pollard, Anal. Biochem. 107:220 (1980). Após se identificarem células de hibridoma que produzem anticorpos com a especificidade, afinidade e/ou actividade pretendidas, os clones podem ser subclonados por procedimentos de diluição limitativa e cultivados por métodos padrão. Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, p. 59-104 (Academic Press, 1986). Constituem meios de cultura adequados para este objectivo, entre outros, por exemplo, meio Eagle modificado por Dulbecco ou meio RPMI-1640. Além disso, as células de hibridoma podem ser cultivadas *in vivo* como tumores de ascites num animal. Os anticorpos monoclonais excretados pelos subclones são separados adequadamente do meio de cultura, fluido de ascites ou soro por procedimentos de purificação de imunoglobulina convencionais tais como, por exemplo, proteína A-Sepharose, cromatografia em hidroxilapatite, electroforese em gel, diálise ou cromatografia de afinidade.

Alternativamente, é agora possível produzir animais transgénicos (por exemplo ratinhos) que são capazes, por imunização, de produzirem um reportório completo de anticorpos humanos na ausência de produção de imunoglobulina endógena. Por exemplo, foi descrito que a deleção homozigótica do gene de região de junção (JH) de cadeia pesada de anticorpo em ratinhos quiméricos e mutantes de linha germinal resulta em inibição completa da produção de anticorpo endógeno. A transferência de uma matriz de gene de imunoglobulina de linha germinal humana em tais ratinhos mutantes de linha germinal resultará na produção de anticorpos humanos por provocação com antigénio. Consultar, por exemplo, Jakobovits et al., Proc.

Natl. Acad. Sci. USA **90**:2551-255 (1993) e Jakobovits et al., Nature **362**:255-258 (1993).

Numa concretização adicional, podem isolar-se anticorpos ou fragmentos de anticorpo a partir de bibliotecas de fagos de anticorpo geradas utilizando as técnicas descritas em McCafferty et al., Nature, **348**:552-554 (1990), utilizando o antígeno de interesse para seleccionar um anticorpo ou fragmento de anticorpo adequado. Clackson et al., Nature, **352**:624-628 (1991) e Marks et al., J. Mol. Biol., **222**:581-597 (1991) descrevem o isolamento de anticorpos murinos e humanos, respectivamente, utilizando bibliotecas de fagos. Publicações subsequentes descrevem a produção de anticorpos humanos de elevada afinidade (gama de nM) por reorganização de cadeia (Mark et al., Bio/Technol. **10**:779-783 [1992]), bem como infecção combinatória e recombinação *in vivo* como uma estratégia para construir biblioteca de fagos muito extensas (Waterhouse et al., Nuc. Acids Res., **21**:2265-2266 [1993]). Assim, estas técnicas são alternativas viáveis às técnicas de hibridoma de anticorpo monoclonal tradicionais para isolamento de anticorpos "monoclonais" (especialmente anticorpos humanos) que são abrangidos pelo presente invento.

O ADN que codifica os anticorpos do invento é facilmente isolado e sequenciado utilizando procedimentos convencionais (por exemplo, por utilização de sondas de oligonucleótido que são capazes de ligar especificamente genes que codificam as cadeias pesada e leve de anticorpos murinos). As células de hibridoma do invento servem como fonte preferida de tal ADN. Uma vez isolado, o ADN pode ser colocado em vectores de expressão, que são então transfectados para células hospedeiras, tais como células COS de símio, células de ovário de hamster chinês (CHO) ou células de mieloma, que de outro modo não produzem proteína imunoglobulina, para obter a síntese de anticorpos monoclonais nas células hospedeiras recombinantes. O ADN pode também ser modificado, por exemplo, por substituição da sequência de codificação por domínios constantes de cadeia pesada e cadeia leve humanas em vez das sequências murinas homólogas, Morrison et al., Proc. Nat. Acad. Sci. **81**:6851 (1984). Dessa forma, preparam-se anticorpos "quiméricos" que apresentam a especificidade de ligação de um anticorpo monoclonal anti-antígeno aqui incluído.

São bem conhecidos na arte métodos para humanizar anticorpos não humanos. Geralmente, um anticorpo humanizado tem um ou mais resíduos de aminoácidos nele introduzido de uma fonte que não é humana. Estes resíduos de aminoácidos não humanos são frequentemente denominados resíduos "importado", que são tipicamente obtidos de um domínio variável "importado". A humanização pode ser essencialmente efectuada seguindo o método de Winter e colaboradores (Jones *et al.*, Nature **321**:522-525 [1986]; Riechmann *et al.*, Nature **332**:323-327 [1988]; Verhoeven *et al.*, Science **239**:1534-1536 [1988]), por substituição de CDR ou sequências de CDR humanas por sequências correspondentes de um anticorpo de roedor. Assim, tais anticorpos "humanizados" são anticorpos quiméricos (Cabilly, *supra*), em que substancialmente menos do que um domínio variável humano intacto foi substituído pela sequência correspondente de uma espécie não humana. Na prática, os anticorpos humanizados são tipicamente anticorpos humanos em que alguns resíduos de CDR e possivelmente alguns resíduos de FR são substituídos por resíduos de locais análogos em anticorpos de roedor. É importante que os anticorpos sejam humanizados com retenção de elevada afinidade para o antigénio e outras propriedades biológicas favoráveis. Para atingir tal objectivo, de acordo com um método preferido, os anticorpos humanizados são preparados por um processo de análise se sequências parentais e vários produtos humanizados conceptuais utilizando modelos tridimensionais das sequências parentais e humanizada. Os modelos tridimensionais de imunoglobulina são familiares aos peritos na arte. Encontram-se disponíveis programas de computador que ilustram e apresentam estruturas conformacionais tridimensionais prováveis de sequências de imunoglobulina candidatas seleccionadas. A inspecção destas apresentações permite a análise do papel provável dos resíduos no funcionamento da sequência de imunoglobulina candidata ou seja a análise dos resíduos que influenciam a capacidade da imunoglobulina candidata ligar o seu antigénio. Desta forma, podem seleccionar-se e combinar-se resíduos FR da sequência consensual e importada de modo a conseguir a característica de anticorpo pretendida, tal como afinidade melhorada para o(s) antigénio(s) alvo. Para mais detalhes consultar WO 92/22653, publicada a 23 de Dezembro de 1992.

(ii) Preparação de imunoadesina

São conhecidas imunoglobulinas (Ig) e determinadas suas variantes e muitas foram preparadas em cultura celular recombinante. Por exemplo, consultar patente U.S. N.º 4 745 055; EP 256 654; Faulkner et al., Nature **298**:286 (1982); EP 120 694; EP 125 023; Morrison, J. Immun. **123**:793 (1979); Kohler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**:2197 (1980); Raso et al., Cancer Res. **41**:2073 (1981); Morrison et al., Ann. Rev. Immunol. **2**:239 (1984); Morrison, Science **229**:1202 (1985); Morrison et al., Proc. Natl. Acad. sci. USA **81**:6851 (1984); EP 255 694; EP 266 663; e WO 88/03559. São também conhecidas cadeias de imunoglobulina redistribuídas. Consultar, por exemplo, patente U.S. N.º 4 444 878; WO 88/03565; e EP 68 763 e referências aí citadas.

São conhecidas na arte quimeras construídas a partir de uma sequência de domínio de ligação de adesina ligada a uma sequência de domínio constante de imunoglobulina adequada (imunoadesinas). As imunoadesinas relatadas na literatura incluem fusões do receptor de células T (Gascoigne et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**:2936-2940 [1987]); CD4 (Capon et al., Nature **337**:525-531 [1989]; Traunecker et al., Nature **339**:68-70 [1989]; Zettmeissl et al., DNA Cell Biol. USA **9**:347-353 [1990]; e Byrn et al., Nature **344**:667-670 [1990]); L-selectina (receptor de residência) (Watson et al., J. Cell. Biol. **110**:2221-2229 [1990]; e Watson et al., Nature **349**:164-167 [1991]); CD44 (Aruffo et al., Cell **61**:1303-1313 [1990]); CD28 e B7 (Linsley et al., J. Exp. Med. **173**:721-730 [1991]); CTLA-4 (Lisley et al., J. Exp. Med. **174**:561-569 [1991]); CD22 (Stamenkovic et al., Cell **66**:1133-1144 [1991]); receptor de TNF (Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**:10535-10539 [1991]; Lesslauer et al., Eur. J. Immunol. **27**:2883-2886 [1991]; e Peppel et al., J. Exp. Med. **174**:1483-1489 [1991]); e receptor α de IgE (Ridgway e Gorman, J. Cell. Biol. **Vol. 115**, Resumo N.º 1448 [1991]).

A concepção de imunoadesina mais simples e mais directa combina o(s) domínio(s) de ligação da adesina (por exemplo o domínio extracelular [ECD] de um receptor) com as regiões de dobra e Fc de uma cadeia pesada de imunoglobulina (consultar figura 3). Usualmente, quando se preparam imunoadesinas do

presente invento, fundir-se-á ácido nucleico que codifica o domínio de ligação da adesina no terminal C com ácido nucleico que codifica o terminal N de uma sequência de domínio constante de imunoglobulina, contudo são também possíveis fusões de terminal N.

Tipicamente em tais fusões, o polipéptido quimérico codificado manterá funcionalmente activos pelo menos os domínios de dobra, C_H2 e C_H3 da região constante de uma cadeia pesada de imunoglobulina. Também se fazem fusões com o terminal C da parte Fc de um domínio constante ou imediatamente terminal N da C_H1 da cadeia pesada ou da região correspondente da cadeia leve. O local exacto no qual se faz a fusão não é crítico; são bem conhecidos locais específicos e podem ser seleccionados de modo a optimizar a actividade biológica, excreção ou características de ligação da Ia.

Numa concretização preferida, a sequência de adesina é fundida ao terminal N do domínio Fc de imunoglobulina G_1 (IgG_1). É possível fundir a região constante de cadeia pesada completa à sequência de adesina. Contudo, com maior preferência, é utilizada na fusão uma sequência com início na região de dobra imediatamente a montante do local de clivagem de papaína que define quimicamente Fc de IgG (ou seja resíduo 216, considerando o primeiro resíduo da região constante de cadeia pesada como sendo 114) ou locais análogos de outras imunoglobulinas. Numa concretização particularmente preferida, funde-se a sequência de aminoácidos de adesina a (a) a região de dobra e C_H2 e C_H3 ou (b) os domínios C_H1 , de dobra, C_H2 e C_H3 , de uma cadeia pesada de IgG_1 , IgG_2 ou IgG_3 . O local exacto no qual se faz a fusão não é crítico e o local óptimo pode ser determinado por experiências de rotina.

Para imunoadesinas biespecíficas, as imunoadesinas são montadas como multímeros e nomeadamente como heterodímeros ou heterotetrâmeros. Geralmente, estas imunoglobulinas montadas terão unidades estruturais conhecidas. A unidade estrutural básica de quatro cadeias é a forma em que existem IgG, IgD e IgE. Nas imunoglobulinas de peso molecular mais elevado repete-se uma unidade de quatro cadeias; IgM geralmente existe como um pentâmero de quatro unidades básicas mantidas em conjunto por pontes dissulfureto. A globulina IgA, e

ocasionalmente a globulina IgG, pode também existir em forma multimérica no soro. No caso do multímero, cada uma das quatro unidades pode ser igual ou diferente.

Apresentam-se esquematicamente infra vários exemplos de montagens de imunoadesinas abrangidas pelo presente âmbito:

- (a) AC_L-AC_L ;
- (b) $AC_H-[AC_H, AC_L-AC_H, AC_L-V_HC_H \text{ ou } V_LC_L-AC_H]$;
- (c) $AC_L-AC_H-[AC_L-AC_H, AC_L-V_HC_H, V_LC_L-AC_H \text{ ou } V_LC_L-V_HC_H]$;
- (d) $AC_L-V_HC_H-[AC_H, \text{ ou } AC_L-V_HC_H \text{ ou } V_LC_L-AC_H]$;
- (e) $V_LC_L-AC_H-[AC_L-V_HC_H \text{ ou } V_LC_L-AC_H]$; e
- (f) $[A-Y]_n-[V_LC_L-V_HC_H]_2$,

em que A representa sequências de aminoácidos de adesina iguais ou diferentes;

V_L é um domínio variável de cadeia leve de imunoglobulina;
 V_H é um domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina;
 C_L é um domínio constante de cadeia leve de imunoglobulina;
 C_H é um domínio constante de cadeia pesada de imunoglobulina;
 n é um número inteiro superior a 1;
 Y designa o resíduo de um agente de reticulação covalente.

Por motivos de brevidade, as estruturas anteriores apenas apresentam características chave; não indicam domínios de junção (J) ou outros domínios das imunoglobulinas, nem se apresentam as ligações dissulfureto. Contudo, quando são necessários tais domínios para actividade de ligação, deve ser entendido que devem estar presentes nas localizações usuais que ocupam nas moléculas de imunoglobulina.

Alternativamente, podem inserir-se sequências de adesina entre as sequências de cadeia pesada e leve de imunoglobulina, de modo a obter-se uma imunoglobulina incluindo uma cadeia pesada quimérica. Nesta concretização, as sequências de adesina são fundidas à extremidade 3' de uma cadeia pesada de imunoglobulina em cada braço de uma imunoglobulina, quer entre os domínios de dobra e C_{H2} , quer entre os domínios C_{H2} e C_{H3} . Foram relatadas construções semelhantes por Hoogenboom, et al., Mol. Immunol. **28**:1027-1037 (1991).

Embora não seja necessária a presença de uma cadeia leve de imunoglobulina nas imunoadesinas do presente invento, pode estar presente uma cadeia leve de imunoglobulina quer associada covalentemente a um polipéptido de fusão adesina-cadeia pesada de imunoglobulina, quer directamente fundida à adesina. No primeiro caso, o ADN que codifica uma cadeia leve de imunoglobulina é tipicamente co-expresso com o ADN que codifica a proteína de fusão de adesina-cadeia pesada de imunoglobulina. Por excreção, o híbrido de cadeia pesada e cadeia leve estará associado covalentemente para proporcionar uma estrutura do tipo imunoglobulina incluindo dois pares de cadeia pesada-cadeia leve de imunoglobulina ligados por dissulfureto. Constituem métodos adequados para a preparação de tais estruturas, por exemplo, os revelados em patente U.S. N.º 4 816 567, concedida a 28 de Março de 1989.

Numa concretização preferida, as sequências de imunoglobulina utilizadas na construção das imunoadesinas do presente invento são de um domínio constante de cadeia pesada de uma imunoglobulina IgG. Para imunoadesinas humanas, é preferida a utilização de sequências de imunoglobulina IgG₁ e IgG₃ humana. Uma das vantagens principais de utilizar IgG₁ é devida ao facto das imunoadesinas IgG₁ poderem ser purificadas eficazmente em proteína A imobilizada. Contrariamente, a purificação de IgG₃ requer proteína G, um meio significativamente menos versátil. Contudo, devem considerar-se outras propriedades estruturais e funcionais de imunoglobulinas quando se selecciona o parceiro de fusão Ig para uma determinada construção de imunoadesina. Por exemplo, a dobra IgG₃ é mais longa e mais flexível, portanto pode acomodar domínios de "adesina" maiores que podem não se dobrar ou funcionar adequadamente quando fundidos a IgG₁. Outra consideração pode ser a valência; as imunoadesinas IgG são homodímeros bivalentes, enquanto que as Ig de subtipos como IgA e IgM podem dar origem a estruturas diméricas ou pentaméricas, respectivamente, da unidade de homodímero Ig básica. Para imunoadesinas concebidas para aplicação *in vivo*, as propriedades farmacocinéticas e as funções de efector especificadas pela região Fc são também importantes. Embora IgG₁, IgG₂ e IgG. apresentem todas semividas *in vivo* de 21 dias, as suas potências relativas de activar o sistema de complemento são diferentes. IgG₄ não activa o complemento e

IgG₂ é significativamente mais fraca na activação de complemento do que IgG₁. Além disso, contrariamente a IgG₁, IgG₂ não se liga a receptores Fc em células mononucleares ou neutrófilos. Enquanto que IgG₃ é óptima para activação de complemento, a sua semivida in vivo é cerca de um terço da dos outros isotipos IgG. Outra consideração importante para imunoadesinas concebidas para utilização como agentes terapêuticos para humanos é o número de variantes alotípicas do isotipo particular. Em geral, são preferidos os isotipos IgG com menos alotipos definidos serologicamente. Por exemplo, IgG₁ apresenta apenas quatro locais alotípicos definidos serologicamente, dois dos quais (G1m e 2) estão localizados na região Fc; e um destes locais, G1m1, não é imunogénico. Contrariamente, existem 12 alotipos definidos serologicamente em IgG₃, todos localizados na região Fc; somente três destes locais (G3m5, 11 e 21) apresentam um alotipo que é não imunogénico. Assim, a imunogenicidade potencial de uma imunoadesina $\gamma 3$ é superior à de uma imunoadesina $\gamma 1$.

A imunoadesinas são construídas do modo mais conveniente por fusão da sequência de ADNc que codifica a parte de adesina em quadro com uma sequência de ADNc de Ig. Contudo, também pode ser utilizada a fusão a fragmentos de Ig genómicos (consultar, por exemplo Gascoigne et al., supra; Aruffo et al., Cell **61**:1303-1313 [1990]; e Stamenkovic et al., Cell **66**:1133-1144 [1991]). Este último tipo de fusão requer para expressão a presença de sequências de regulação de Ig. Os ADNc que codificam regiões constantes de cadeia pesada de IgG podem ser isolados com base em sequências publicadas de bibliotecas de ADNc derivadas de linfócitos de baço ou de sangue periférico, por técnicas de hibridação ou reacção de polimerização em cadeia (PCR). Os ADNc que codificam a "adesina" e as partes de Ig da imunoadesina são inseridos em tandem para um vector de plasmídeo que dirige expressão eficaz nas células hospedeiras seleccionadas.

2. Geração de uma protuberância e/ou cavidade

Como primeira etapa para seleccionar resíduos originais para formar a protuberância e/ou cavidade, obtém-se a estrutura tridimensional do heteromultímero utilizando técnicas que são bem conhecidas na arte, tal como

cristalografia de raios X ou RMN. Com base na estrutura tridimensional, os peritos na arte serão capazes de identificar os resíduos de interface.

A interface preferida é o domínio C_H3 de um domínio constante de imunoglobulina. Os resíduos de interface dos domínios C_H3 de IgG, IgA, IgD, IgE e IgM são identificados na figura 5, incluindo os que são óptimos para substituição por resíduos importados. Os resíduos de interface de vários subtipos IgG apresentam-se na figura 6. Identificam-se também os resíduos "enterrados". A base para modificação por engenharia genética da interface C_H3 é a constatação por cristalografia de raios X que a associação intermolecular entre as cadeias pesadas de IgG₁ humana na região Fc inclui interação proteína/proteína extensa entre domínios C_H3 enquanto que os domínios C_H2 glicosilados interactuam através do seu hidrato de carbono (Deisenhofer, Biochem. **20**:2361 [1981]). Além disso, existem duas ligações dissulfureto intercadeia pesada que são formadas eficazmente durante expressão de anticorpo em células de mamífero, excepto se a cadeia pesada for truncada para remover os domínios C_H2 e C_H3 (King *et al.*, Biochem. J. **281**:317 [1992]). Assim, a montagem de cadeias pesadas parece promover a formação de ligação dissulfureto e não o oposto. Conjuntamente, estes dados estruturais e funcionais levaram à hipótese que a associação das cadeias pesadas de anticorpo é dirigida pelos domínios C_H3 . Especulou-se ainda que a interface entre domínios C_H3 pode ser modificada racionalmente para promover a formação de heteromultímeros de cadeias pesadas diferentes e evitar a montagem dos homomultímeros correspondentes. As experiências aqui descritas demonstraram que foi possível promover a formação de heteromultímeros relativamente a homomultímeros utilizando esta abordagem. Assim, é possível gerar uma fusão de polipéptido incluindo um polipéptido de interesse e o domínio C_H3 de um anticorpo para formar um primeiro ou segundo polipéptido. O domínio C_H3 preferido é derivado de um anticorpo IgG, tal como uma IgG₁ humana. Os resíduos de interface de IgG₁ humana apresentam-se na figura 7.

Identificam-se os resíduos de interface que podem constituir candidatos potenciais para formar a protuberância ou cavidade. É preferível seleccionar para substituição

resíduos "enterrados". Para determinar se um resíduo se encontra enterrado pode utilizar-se o programa de acessibilidade superficial de Lee et al. J. Mol. Biol. **55**: 379-400 (1971) para calcular a acessibilidade ao solvente (SA) de resíduos na interface. Seguidamente, podem calcular-se separadamente a SA para os resíduos de cada um dos primeiro e segundo polipéptidos após remoção do outro polipéptido. A diferença em SA de cada resíduo entre as formas de monómero e dímero da interface pode então ser calculada por: SA (dímero) - SA (monómero). Tal proporciona uma lista de resíduos que perdem SA na formação do dímero. Compara-se a SA de cada resíduo no dímero à SA teórica do mesmo aminoácido no tripéptido Gly-X-Gly, em que X= aminoácido de interesse (Rose et al. Science 229: 834-838 [1985]). Consideram-se como resíduos de interface os resíduos que (a) perdem SA no dímero comparativamente ao monómero e (b) apresentam uma SA inferior a 26% da obtida no tripéptido correspondente. Podem delinear-se duas categorias: os que apresentam uma SA <10% comparativamente ao seu tripéptido correspondente (ou seja "enterrado") e os que têm 25% > SA > 10% comparativamente ao seu tripéptido correspondente (ou seja "parcialmente enterrado").

TABELA 2

Resíduo N.º [†]	Perda de SA Monómero→Dímero		% de Tripéptido	
	Polipéptido A	Polipéptido B	Polipéptido A	Polipéptido B
Q347	22,1	31,0	25,0	26,5
Y349	79,8	83,9	5,2	5,7
L351	67,4	77,7	3,9	2,0
S354	53,4	52,8	11,3	11,7
E357	43,7	45,3	0,4	1,3
S364	21,5	15,1	0,5	1,4
T366	29,3	25,8	0,0	0,1
L368	25,5	29,7	1,0	1,1
K370	55,8	62,3	11,5	11,0
T394	64,0	58,5	0,6	1,4
V397	50,3	49,5	13,2	11,0
D399	39,7	33,7	5,7	5,7
F405	53,7	52,1	0,0	0,0
Y407	89,1	90,3	0,0	0,0
K409	86,8	92,3	0,7	0,6
T411	4,3	7,5	12,7	9,8

[†] numeração dos resíduos como na estrutura cristalina de IgG (Deisenhofer, Biochemistry **20**:2361-2370 [1981]).

O efeito de substituir resíduos na estrutura da cadeia de polipéptido pode ser estudado utilizando um programa de modelação de grafismo molecular tal como o programa InsightTM (Biosym Technologies). Utilizando o programa, os resíduos enterrados na interface do primeiro polipéptido que têm uma cadeia lateral com pequeno volume podem ser alterados para resíduos apresentando um maior volume de cadeia lateral (ou seja uma protuberância), por exemplo. Seguidamente, os resíduos na interface do segundo polipéptido que se encontram próximos da protuberância são analisados para revelar um resíduo adequado para formar a cavidade. Normalmente, este resíduo terá um grande volume de cadeia lateral e é substituído por um resíduo apresentando um menor volume de cadeia lateral. Em determinadas concretizações, a análise da estrutura tridimensional da interface revelará uma protuberância adequadamente posicionada e dimensionada na interface do primeiro polipéptido ou uma cavidade na interface do segundo polipéptido. Nesses casos é apenas necessário modelar um mutante único, ou seja, com uma protuberância ou cavidade introduzidas sinteticamente.

Relativamente a seleccionar resíduos originais potenciais para substituição quando o primeiro e o segundo polipéptido incluem ambos um domínio C_H3, a interface C_H3/C_H3 de IgG₁ humana envolve dezasseis resíduos em cada domínio localizados em quatro folhas β anti-paralelas que mergulha 1090 Å² de cada superfície (Deisenhofer, supra) e Miller, J. Mol. Biol. **216**:965 [1990]). Consultar figura 7 aqui incluída. As mutações têm de preferência como alvo resíduos localizados nas duas folhas β anti-paralelas centrais. O objectivo é minimizar o risco de que as protuberâncias que são criadas possam ser acomodadas por projecção no solvente circundante em vez de o serem por cavidades compensatórias no domínio C_H3 do parceiro.

Uma vez identificados os resíduos preferíveis originais ou importados por modelação molecular, introduzem-se as substituições de aminoácidos no polipéptido utilizando técnicas que são bem conhecidas na arte. Normalmente o ADN que codifica o polipéptido é concebido por engenharia genética utilizando as técnicas descritas em Mutagenesis: a Practical Approach, supra.

A mutagénese mediada por oligonucleótidos constitui um método preferido para preparar variantes de substituição do ADN que codifica o primeiro ou segundo polipéptido. Esta técnica é bem conhecida na arte tal como descrita por Adelman *et al.*, DNA, **2:183** (1983). Sucintamente, o ADN do primeiro ou segundo polipéptido é alterado por hibridação de um oligonucleótido que codifica a mutação pretendida com um molde de ADN, em que o molde é a forma em cadeia simples de um plasmídeo ou bacteriófago contendo a sequência de ADN do heteromultímero não alterada ou nativa. Após hibridação, utiliza-se uma ADN polimerase para sintetizar uma segunda cadeia complementar completa do molde que assim incorporará o iniciador de oligonucleótido e codificará para a alteração seleccionada no ADN de heteromultímero.

Pode efectuar-se mutagénese com cassete tal como descrito por Wells *et al.* Gene **34:315** (1985) por substituição de uma região do ADN de interesse por um fragmento mutante sintético gerado por hibridação de oligonucleótidos complementares. A mutagénese por PCR é também adequada para produzir variantes de ADN do primeiro ou segundo polipéptido. Apesar da discussão que se segue se referir ao ADN entende-se que a técnica também encontra aplicação com ARN. A técnica de PCR refere-se geralmente ao seguinte procedimento (consultar Erlich, Science, **252:1643-1650** [1991], o capítulo por R. Higuchi, p. 61-70).

O presente invento também abrange, além de mutações de protuberância ou cavidade, variantes de sequência de aminoácidos do heteromultímero que podem ser preparados por introdução de alterações apropriadas de nucleótidos no ADN de heteromultímero ou por síntese do polipéptido de heteromultímero pretendido. Tais variantes incluem, por exemplo, deleções de resíduos ou inserções ou substituições de resíduos no interior das sequências de aminoácidos do primeiro e segundo polipéptidos que formam o heteromultímero. Qualquer combinação de deleção, inserção e substituição é efectuada de modo a se obter a construção final desde que a construção final apresente as características de ligação de antigénio pretendidas. As alterações de aminoácidos podem também alterar processos pós-tradução do heteromultímero tal como alterar o número ou posição de locais de glicosilação.

Um método útil para identificação de determinados resíduos ou regiões do heteromultímero de polipéptidos que são localizações preferidas para mutagénese denomina-se “mutagénese por varrimento de alanina”, tal como descrito por Cunningham e Wells, *Science*, **244**:1081-1085 (1989). Aqui, identificam-se um resíduo ou grupo de resíduos alvo (por exemplo resíduos carregados tais como arg, asp, his, lys e glu) e substituem-se por um aminoácido neutro ou carregado negativamente (com a maior preferência alanina ou polialanina) para afectar a interacção dos aminoácidos com o meio aquoso circundante dentro ou fora da célula. Os domínios que demonstrarem sensibilidade funcional às substituições são então refinados por introdução de mais variantes ou de outros variantes nos locais de substituição ou em vez destes. Assim, enquanto que o local para introduzir uma variação de sequência de aminoácidos é predeterminado, a natureza da própria mutação não necessita ser predeterminada.

Normalmente as mutações envolverão substituições conservativas de aminoácidos em regiões não funcionais do heteromultímero. Apresentam-se exemplos de mutações na tabela seguinte.

TABELA 3

Resíduo Original	Substituições Exemplificativas	Substituições Preferidas
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro; 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

Resíduo Original	Substituições Exemplificativas	Substituições Preferidas
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	leu

Podem introduzir-se modificações covalentes do heteromultímero na molécula por reacção dos resíduos de aminoácido alvo dos heteromultímeros ou seus fragmentos com um agente de derivatização orgânico que é capaz de reagir com cadeias laterais seleccionadas ou resíduos de terminal N ou C seleccionados. Outro tipo de modificação covalente do polipéptido de heteromultímero inclui alteração do padrão de glicosilação nativo do polipéptido. Por alteração entenda-se eliminar uma ou mais partes de hidrato de carbono presentes no heteromultímero original e/ou adicionar um ou mais locais de glicosilação que não estão presentes no heteromultímero original. A adição de locais de glicosilação ao polipéptido de heteromultímero é convenientemente obtida por alteração da sequência de aminoácidos de modo a que esta contenha um ou mais locais de glicosilação ligados a N. A alteração pode também ser efectuada pela adição de um ou mais resíduos serina ou treonina ou por substituições por estes resíduos na sequência de heteromultímero original (para locais de glicosilação ligados a O). Para facilitar, a sequência de aminoácidos do heteromultímero é de preferência alterada através de modificações ao nível do ADN, nomeadamente por mutação do ADN que codifica o polipéptido de heteromultímero em bases pré-seleccionadas de modo a serem gerados codões que se traduzirão nos aminoácidos pretendidos. Outro meio de aumentar o número de partes de hidrato de carbono no polipéptido de heteromultímero é por acoplamento químico ou enzimático de glicósidos ao polipéptido. Estes métodos são descritos em WO 87/05330 publicada a 11 de Setembro de 1987 e em Aplin e Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., p. 259-306

(1981). A remoção de partes de hidrato de carbono presentes no heteromultímero pode ser efectuada química ou enzimaticamente.

Outro tipo de modificação covalente de heteromultímero inclui ligar o polipéptido de heteromultímero a um de entre vários polímeros não proteináceos, por exemplo, polietilenoglicol, polipropilenoglicol ou polioxialquilenos do modo estabelecido nas patentes U.S. n.º 4 640 835; 4 496 689; 4 301 144; 4 670 417; 4 791 192 ou 4 179 337.

Dado ser muitas vezes difícil prever antecipadamente as características de um heteromultímero variante, considerar-se-á que será necessário algum rastreio do variante recuperado para seleccionar o variante óptimo.

3. Expressão do heteromultímero

Após mutação do ADN tal como discutido na secção anterior, o ADN que codifica a molécula é expresso por utilização de técnicas recombinantes que se encontram largamente disponíveis na arte. Muitas vezes, o sistema de expressão de eleição envolverá um vector e hospedeiro de expressão de células de mamífero de modo a que o heteromultímero seja adequadamente glicosilado (por exemplo no caso de heteromultímeros incluindo domínios de anticorpo que estão glicosilados). Contudo, as moléculas podem também ser produzidas nos sistemas de expressão procarióticos elaborados infra. Normalmente, a célula hospedeira será transformada com ADN que codifica tanto o primeiro polipéptido como o segundo polipéptido e outro(s) polipéptido(s) necessário(s) para formar o heteromultímero num único vector ou em vectores independentes. Contudo, é possível expressar o primeiro polipéptido e o segundo polipéptido em sistemas de expressão independentes e acoplar os polipéptidos expressos *in vitro*.

O ácido nucleico (por exemplo, ADNc ou ADN genómico) que codifica o heteromultímero é inserido num vector replicável para clonagem adicional (amplificação do ADN) ou para expressão. Encontram-se disponíveis muitos vectores. As componentes do vector incluem geralmente, entre outras, uma ou mais das seguintes: uma sequência de sinalização, uma origem de replicação, um ou mais genes marcadores, um elemento

facilitador, um promotor e uma sequência de terminação de transcrição.

Os polipéptidos do heteromultímero podem ser produzidos como polipéptidos de fusão com uma sequência de sinalização ou outro polipéptido apresentando um local de clivagem específico no terminal N da proteína ou polipéptido maduros. Em geral, a sequência de sinalização pode ser uma componente do vector ou pode ser uma parte do ADN que está inserida no vector. A sequência de sinalização heteróloga preferentemente seleccionada é aquela que é reconhecida e processada (ou seja, clivada por uma peptidase de sinalização) pela célula hospedeira. Para células hospedeiras procarióticas, a sequência de sinalização pode ser substituída por uma sequência de sinalização procariótica seleccionada, por exemplo, do grupo de comandos de fosfatase alcalina, penicilinase, lpp ou enterotoxina II termoestável. Para excreção por levedura a sequência de sinalização nativa pode ser substituída por, por exemplo, o comando de invertase de levedura, o comando de factor alfa (incluindo os comandos de factor α de *Saccharomyces* e *Kluyveromyces*, sendo o último descrito na patente U.S. n.º 5 010 182 concedida a 23 de Abril de 1991) ou comando de fosfatase ácida, o comando de glucoamilase de *C. albicans* (EP 362 179 publicada a 4 de Abril de 1990), ou o sinal descrito em WO 90/13646 publicada a 15 de Novembro de 1990. Em expressão de células de mamífero a sequência de sinalização nativa (por exemplo, a pré-sequência de anticorpo ou adesina que normalmente dirige excreção destas moléculas por células humanas *in vivo*) é satisfatória, apesar de outras sequências de sinalização de mamífero poderem ser adequadas assim como comandos de excreção víricos, por exemplo, o sinal gD de herpes *simplex*. O ADN para tal região de precursor está ligado em quadro de leitura ao ADN que codifica os polipéptidos que formam o heteromultímero.

Tanto o vector de expressão como o de clonagem contém uma sequência de ácido nucleico que permite que o vector se replique em uma ou mais células hospedeiras seleccionadas. Geralmente, em vectores de clonagem esta sequência é tal que permite que o vector se replique independentemente do ADN cromossómico do hospedeiro e inclui origens de replicação ou sequências com replicação autónoma. Tais sequências são bem

conhecidas para várias bactérias, leveduras e vírus. A origem de replicação do plasmídeo pBR322 é adequada para a maioria das bactérias Gram-negativas, a origem do plasmídeo 2 μ é adequada para levedura e diferentes origens víricas (SV40, polioma, adenovírus, VSV ou BPV) são úteis para vectores de clonagem em células de mamífero. Geralmente, a componente de origem de replicação não é necessária para vectores de expressão de mamífero (a origem SV40 pode ser tipicamente utilizada apenas porque contém o promotor precoce).

Os vectores de expressão e clonagem devem conter um gene de selecção também denominado um marcador seleccionável. Genes de selecção típicos codificam proteínas que (a) conferem resistência a antibióticos ou outras toxinas, por exemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato ou tetraciclina, (b) complementam deficiências auxotróficas, ou (c) fornecem nutrientes críticos não disponíveis em meios complexos, por exemplo, o gene que codifica D-alanina racemase para bacilos. Um exemplo de um esquema de selecção utiliza um fármaco para parar crescimento de uma célula hospedeira. As células que são transformadas com sucesso com um gene heterólogo produzem uma proteína que proporciona resistência ao fármaco e assim sobrevivem ao regime de selecção. Exemplos de tal selecção dominante utiliza os fármacos neomicina (Southern et al., J. Molec. Appl. Genet. **1**:327 [1982]), ácido micofenólico (Mulligan et al., Science **209**:1422 [1980]) ou higromicina (Sugden et al., Mol. Cell. Biol. **5**:410-413 [1985]). Os três exemplos apresentados supra utilizam genes bacterianos sob controlo eucariótico para proporcionar resistência ao fármaco apropriado G418 ou neomicina (geneticina), xgpt (ácido micofenólico) ou higromicina, respectivamente.

Constituem outros exemplos de marcadores de selecção adequados para células de mamífero os que permitem a identificação de células competentes para absorver o ácido nucleico do heteromultímero, tal como DHFR ou timidina quinase. Os produtos de transformação de células de mamífero são colocados sob pressão selectiva às quais apenas os produtos de transformação estão adaptados de modo único para sobreviver em virtude de terem absorvido o marcador. A pressão selectiva é imposta por cultura dos produtos de transformação sob condições nas quais a concentração no meio do agente

seleccionado é alterada sucessivamente, levando assim a amplificação tanto do gene de selecção como do ADN que codifica o heteromultímero. Sintetizam-se quantidades aumentadas de heteromultímero a partir do ADN amplificado. Constituem outros exemplos de genes amplificáveis, entre outros, metalotioneína-I e metalotioneína-II, de preferência genes de metalotioneína de primata, adenosina-desaminase, ornitina-descarboxilase, etc.

Por exemplo, são primeiramente identificadas células transformadas com o gene de selecção DHFR por cultura de todos os produtos de transformação num meio de cultura que contém metotrexato (Mtx), um antagonista competitivo de DHFR. Constitui uma célula hospedeira apropriada quando se utiliza DHFR de tipo selvagem, a linha celular de ovário de *hamster* chinês (CHO) deficiente em actividade DHFR preparada e propagada tal como descrito por Urlaub e Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**:4216 (1980). As células transformadas são então expostas a níveis aumentados de metotrexato. Tal leva à síntese de cópias múltiplas do gene DHFR e concomitantemente, cópias múltiplas de outros ADN incluindo vectores de expressão, tal como o ADN que codifica as componentes do heteromultímero. Esta técnica de amplificação pode ser utilizada com outro hospedeiro adequado de outro modo, por exemplo, ATCC n.º CCL61 CHO-K1, apesar da presença de DHFR endógena caso, por exemplo, se utilize um gene DHFR mutante que é altamente resistente a Mtx (EP 117 060).

Alternativamente, podem seleccionar-se células hospedeiras (nomeadamente hospedeiros de tipo selvagem que contêm DHFR endógeno) transformadas ou co-transformadas com sequências de ADN que codificam heteromultímero, proteína DHFR de tipo selvagem e outro marcador seleccionável tal como aminoglicósido-3'-fosfotransferase (APH) através do crescimento de células em meio contendo um agente de selecção para o marcador seleccionável tal como um antibiótico aminoglicosídico, por exemplo, canamicina, neomicina ou G418. Consultar patente U.S. n.º 4 965 199.

Constitui um gene de selecção adequado para utilização em levedura, o gene *trpI* presente no plasmídeo de levedura YRp7 (Stinchcomb et al., Nature **282**:39 [1979]; Kingsman et al.,

Gene **7**:141 [1979]; ou Tschemper et al., Gene **10**: 157 [1980]). O gene *trpI* proporciona um marcador de selecção para uma estirpe mutante de levedura sem a capacidade de crescer em triptofano, por exemplo, ATCC n.º 44076 ou PEP4-1 (Jones, Genetics **85**:12 [1977]). A presença da lesão *trpI* no genoma da célula hospedeira de levedura proporciona então um ambiente eficaz para detectar transformação por crescimento na ausência de triptofano. De igual modo, estirpes de levedura deficientes em *Leu2* (ATCC 20 622 ou 38 626) são complementadas por plasmídeos conhecidos apresentando o gene *Leu2*.

Adicionalmente, podem utilizar-se vectores derivados do plasmídeo circular de pKD1 de 1,6 µm para transformação de leveduras *Kluyveromyces*. Bianchi et al., Curr. Genet. **12**:185 (1987). Mais recentemente, relatou-se para *K. lactis* um sistema de expressão para produção em larga escala de quimosina de vitelo recombinante. Van den Berg, Bio/Technology **8**:135 (1990). Foram também revelados vectores de expressão de cópias múltiplas para excreção de albumina de soro humano recombinante maduro por estirpes industriais de *Kluyveromyces*. Fleer et al., Bio/Technology **9**:968-975 (1991).

Os vectores de expressão e clonagem contêm habitualmente um promotor que é reconhecido pelo organismo hospedeiro e está ligado operacionalmente ao ácido nucleico de heteromultímero. São bem conhecidos um grande número de promotores reconhecidos por várias células hospedeiras potenciais. Estes promotores estão ligados operacionalmente ao ADN que codifica o heteromultímero por remoção do promotor do ADN de origem por digestão com enzimas de restrição e inserção da sequência de promotor isolada no vector.

Constituem promotores adequados para utilização com hospedeiros procarióticos, entre outros, sistemas de promotor de β-lactamase e de lactose (Chang et al., Nature **275**:615 [1978]; e Goeddel et al., Nature **281**:544 [1979]), fosfatase alcalina, um sistema de promotor de triptofano (*trp*) (Goeddel, Nucleic Acids Res., **8**:4057 [1980] e EP 36 776) e promotores híbridos tais como o promotor *tac* (deBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**:21-25 [1983]). Contudo, são adequados outros promotores bacterianos conhecidos. As suas sequências de nucleótidos foram publicadas, permitindo assim que um perito

na arte os ligues de modo operacional a ADN que codifica o heteromultímero (Siebenlist et al., Cell **20**:269 [1980]) utilizando ligantes ou adaptadores para fornecer quaisquer locais de restrição necessários. Os promotores para utilização em sistemas bacterianos conterão igualmente uma sequência de Shine-Dalgarno (S.D.) ligada operacionalmente ao ADN que codifica o heteromultímero.

Conhecem-se sequências de promotor para eucariotas. Virtualmente todos os genes eucarióticos têm uma região rica em AT localizada aproximadamente entre 25 e 30 bases a montante do local onde se inicia a transcrição. Outra região presente entre 70 e 80 bases a montante do início de transcrição de muitos genes é uma região CXCAAT em que X pode ser qualquer nucleótido. Na extremidade 3' da maioria dos genes eucarióticos ocorre uma sequência AATAAA que pode ser o sinal para adição da cauda poli A à extremidade 3' da sequência de codificação. Todas estas sequências são adequadamente inseridas em vectores de expressão eucarióticos.

Constituem exemplos de sequências de promoção adequadas para utilização com hospedeiros de levedura, entre outros, os promotores da 3-fosfoglicerato-quinase (Hitzeman et al., J. Biol. Chem. **255**:2073 [1980]) ou outras enzimas glicolíticas (Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg. **7**:149 [1968]; e Holland, Biochemistry **17**:4900 [1978]), tais como enolase, gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase, hexoquinase, piruvato-descarboxilase, fosfofrutoquinase, glucose-6-fosfato-isomerase, 3-fosfoglicerato-mutase, piruvato-quinase, triosefosfato-isomerase, fosfoglucoquinase e glucoquinase.

Outros promotores de levedura, que são promotores indutíveis apresentando a vantagem adicional de transcrição controlada pelas condições de crescimento, são as regiões de promotor para álcool desidrogenase 2, isocitocromo C, fosfatase ácida, enzimas degradativas associadas com o metabolismo do azoto, metalotioneína, gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase e enzimas responsáveis por utilização de maltose e galactose. Descrevem-se adicionalmente vectores e promotores adequados para utilização em expressão em levedura em Hitzeman

et al., EP 73 657A. Os facilitadores de levedura são também vantajosamente utilizados com promotores de levedura.

A transcrição de heteromultímeros a partir de vectores em células hospedeiras de mamífero é controlada, por exemplo, por promotores obtidos dos genomas de vírus tais como vírus do políoma, vírus da varíola aviária (UK 2 211 504 publicado a 5 de Julho de 1989), adenovírus (tal como Adenovírus 2), vírus do papiloma bovino, vírus do sarcoma aviário, citomegalovírus, um retrovírus, vírus da hepatite B e com a maior preferência vírus símio 40 (SV40), de promotores mamíferos heterólogos, por exemplo, o promotor da actina ou um promotor de imunoglobulina ou promotores de choque térmico.

Os promotores precoce e tardio do vírus SV40 são convenientemente obtidos como um fragmento de restrição SV40 que também contém a origem de replicação vírica SV40. Fiers et al., Nature **273**:113 (1978); Mulligan e Berg, Science **209**:1422-1427 (1980); Pavlakis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**:7398-7402 (1981). O promotor precoce imediato do citomegalovírus humano é convenientemente obtido como um fragmento de restrição *HindIII* E. Greenaway et al., Gene **18**:355-360 (1982). Revela-se um sistema para expressar ADN em hospedeiros de mamífero utilizando o vírus de papiloma bovino como um vector, em patente U.S. n.º 4 419 446. Descreve-se uma modificação deste sistema em patente U.S. n.º 4 601 978. Consultar igualmente Gray et al., Nature **295**:503-508 (1982) sobre expressão de ADNc que codifica interferão imunitário em células de macaco; Reyes et al., Nature **297**:598-601 (1982) sobre expressão de ADNc de interferão β humano em células de ratinho sob o controlo de um promotor de timidina quinase do vírus herpes *simplex*; Canaani e Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**:5166-5170 (1982) sobre expressão do gene de interferão β 1 humano em células de ratinho e de coelho em cultura; e Gorman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**:6777-6781 (1982) sobre expressão de sequências CAT bacterianas em células de rim de macaco CV-1, fibroblastos de embrião de galinha, células de ovário de *hamster* chinês, células HeLa e células NIH-3T3 de ratinho utilizando a sequência longa terminal repetitiva do vírus do sarcoma de Rous como um promotor.

A transcrição de ADN que codifica o heteromultímero por eucariotas superiores é muitas vezes aumentada por inserção de uma sequência de facilitador no vector. Os facilitadores são relativamente independentes da orientação e posição, tendo sido encontrados a 5' (Laimins et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**:993 [1981]) e a 3' (Lusky et al., Mol. Cell Bio. **3**:1108 [1983]) da unidade de transcrição, no interior de um intrão (Banerji et al., Cell **33**:729 [1983]), assim como no interior da própria sequência de codificação (Osborne et al., Mol. Cell Bio. **4**:1293 [1984]). São actualmente conhecidas muitas sequências de facilitador de genes mamíferos (globina, elastase, albumina, α -fetoproteína e insulina). Tipicamente, contudo utilizar-se-á um facilitador de um vírus de célula eucariótica. Constituem exemplos o facilitador SV40 do lado tardio da origem de replicação (pb 100-270), o facilitador do promotor precoce de citomegalovírus, o facilitador de polioma do lado tardio da origem de replicação e facilitadores de adenovírus. Consultar igualmente Yaniv, Nature **297**:17-18 (1982) sobre elementos facilitadores para activação de promotores eucarióticos. O facilitador pode ser sujeito a *splicing* para o vector na posição 5' ou 3' relativamente à sequência de codificação do heteromultímero, mas localiza-se de preferência no local a 5' do promotor.

Os vectores de expressão utilizados em células hospedeiras eucarióticas (células de levedura, fungo, insecto, planta, animal, humanas ou nucleadas de outros organismos multicelulares) conterão igualmente sequências necessárias para a terminação de transcrição e para estabilizar o ARNm. Tais sequências estão habitualmente disponíveis a partir das regiões não traduzidas a 5' e ocasionalmente a 3' de ADN ou ADNc eucarióticos ou víricos. Estas regiões contêm segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados na parte não traduzida do ARNm que codifica o heteromultímero.

A construção de vectores adequados contendo uma ou mais das componentes referidas supra utiliza técnicas de ligação padrão. Clivam-se plasmídeos ou fragmentos de ADN isolados, cortam-se e tornam-se a ligar na forma pretendida para gerar os plasmídeos necessários.

Para análise para confirmar sequências correctas nos plasmídeos construídos, utilizam-se as misturas de ligação para transformar *E. coli* K12 estirpe 294 (ATCC 31 446) e os produtos de transformação bem sucedida são seleccionados por resistência a ampicilina ou tetraciclina quando apropriado. Preparam-se plasmídeos a partir dos produtos de transformação, analisam-se por digestão com endonucleases de restrição e/ou sequenciam-se pelo método de Messing et al., Nucleic Acids Res. **9**:309 (1981) ou pelo método de Maxam et al., Methods in Enzymology **65**:499 (1980).

São particularmente úteis para levar à prática este invento vectores de expressão que proporcionam expressão transitória em células de mamífero de ADN que codifica heteromultímero. De um modo geral, a expressão transitória envolve a utilização de um vector de expressão que é capaz de se replicar eficazmente numa célula hospedeira, de modo que a célula hospedeira acumule muitas cópias do vector de expressão que por sua vez sintetiza níveis elevados de um polipéptido pretendido codificado pelo vector de expressão. Sambrook et al., supra, p. 16.17-16.22. Os sistemas de expressão transitória, incluindo um vector de expressão adequado e uma célula hospedeira, permitem identificação positiva conveniente de polipéptidos codificados pelos ADN clonados assim como rastreio rápido de heteromultímeros apresentado especificidades/afinidades de ligação pretendidas.

Descrevem-se outros métodos, vectores e células hospedeiras adequadas para adaptar à síntese do heteromultímero em cultura de células de vertebrado recombinantes em Gething et al., Nature **293**:620-625 (1981); Mantei et al., Nature **281**:40-46 (1979); Levinson et al.; EP 117 060; e EP 117 058. Constituem plasmídeos particularmente úteis para expressão do heteromultímero em cultura de células de mamífero pRK5 (EP 307 247) ou pSVI6B (publicação PCT n.º WO 91/08291 publicado a 13 de Junho de 1991).

A escolha da linha de células hospedeiras para expressão do heteromultímero depende principalmente do vector de expressão. Outra consideração é a quantidade de proteína que é necessária. Podem muitas vezes ser produzidas quantidades na

ordem de miligramas por transfecções transitórias. Por exemplo, a linha celular de rim embrionário humano 293 transformada com o EIA de adenovírus pode ser transfectada de modo transitório com vectores baseados em pRK5 através de uma modificação do método de fosfato de cálcio para permitir expressão eficaz de heteromultímero. Podem utilizar-se vectores baseados em CDM8 para transfectar células COS pelo método de DEAE-dextrano (Aruffo et al., Cell **61**:1303-1313 [1990]; e Zettmeissl et al., DNA Cell Biol. (US) **9**:347-353 [1990]). Caso se pretendam maiores quantidades de proteína, a imunoadesina pode ser expressa após transfecção estável numa linha celular hospedeira. Por exemplo, pode introduzir-se um vector baseado em pRK5 em células de ovário de hamster chinês (CHO) na presença de um plasmídeo adicional que codifica di-hidrofolato-redutase (DHFR) e conferindo resistência a G418. Podem seleccionar-se em cultura clones resistentes a G418. Crescem-se estes clones na presença de níveis aumentados do inibidor de DHFR, metotrexato e seleccionam-se clones nos quais se co-amplificam o número de cópias de genes que codificam o DHFR e as sequências de heteromultímero. Se a imunoadesina contiver uma sequência de comando hidrófoba no seu terminal N, é provável que seja processada e excretada pelas células transfectadas. A expressão de imunoadesinas com estruturas mais complexas pode requerer células hospedeiras especificamente adequadas. Por exemplo, determinadas células hospedeiras de mieloma ou hibridoma podem proporcionar componentes tais como cadeia leve ou cadeia J (Gascoigne et al., supra; e Martin et al., J. Virol. **67**:3561-3568 [1993]).

Constituem outras células hospedeiras adequadas para clonagem ou expressão destes vectores, células de procariotas, leveduras ou de outros eucariotas superiores descritas supra. Constituem procariotas adequados para este efeito eubactérias, tais como organismos Gram-negativos ou Gram-positivos, por exemplo, Enterobacteriaceae tais como *Escherichia*, por exemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por exemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por exemplo, *Serratia marcescans* e *Shigella*, assim como bacilos tais como *B. subtilis* e *B. licheniformis* (por exemplo, *B. licheniformis* 41P revelado em DD 266 710 publicada a 12 de Abril de 1989), *Pseudomonas* tal como *P. aeruginosa* e *Streptomyces*. Constitui um hospedeiro de clonagem de *E. coli*

preferido, *E. coli* 294 (ATCC 31 446), apesar de serem adequadas outras estirpes tais como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31 537) e *E. coli* W3110 (ATCC 27 325). Estes exemplos são ilustrativos e não limitativos. A estirpe W3110 é um hospedeiro ou hospedeiro parental particularmente preferido porque constitui uma estirpe hospedeira comum para fermentação de produtos de ADN recombinante. De preferência, a célula hospedeira deve excretar quantidades mínimas de enzimas proteolíticas. Por exemplo, a estirpe W3110 pode ser modificada para efectuar uma mutação genética nos genes que codificam proteínas, incluindo os exemplos de tais hospedeiros *E. coli* W3110 estirpe 27C7. O genótipo completo de 27C7 é *tonAΔ ptr3 phoAΔE15 Δ(argf-lac)169 ompTΔ degP4lkarf*. A estirpe 27C7 foi depositada a 30 de Outubro de 1991 em American Type Culture Collection como o n.º ATCC 55 244. Alternativamente, pode ser utilizada uma estirpe de *E. coli* apresentando a protease periplasmática mutante revelada na patente U.S. n.º 4 946 783 concedida a 7 de Agosto 1990. Alternativamente, são adequados métodos de clonagem, por exemplo, PCR ou outras reacções de polimerase de ácido nucleico.

Além de procariotas, constituem hospedeiros adequados para clonagem ou expressão de vectores que codificam heteromultímero, micróbios eucarióticos tais como fungos filamentosos ou leveduras. *Saccharomyces cerevisiae*, o vulgar fermento de padeiro, é o mais comumente utilizado dos microrganismos hospedeiros eucariotas inferiores. Contudo, encontram-se facilmente disponíveis e são aqui úteis vários outros géneros, espécies e estirpes tais como *Schizosaccharomyces pombe* (Beach e Nurse, Nature **290**:140 [1981]; EP 139 383 publicada a 2 de Maio de 1985); hospedeiros de *Kluyveromyces* (patente U.S. n.º 4 943 529; Fleer et al., supra) tal como, por exemplo, *K. lactis* [MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt et al., J. Bacteriol., **737** (1983)], *K. fragilis* (ATCC 12 424), *K. bulgaricus* (ATCC 16 045), *K. wickerhamii* (ATCC 24 178), *K. waltii* (ATCC 56 500), *K. drosophilarum* (ATCC 36 906; Van den Berg et al., supra), *K. thermotolerans* e *K. marxianus*; *Yarrowia* [EP 402 226]; *Pichia pastoris* (EP 183 070; Sreekrishna et al., J. Basic Microbiol. **28**:265-278 [1988]); *Candida*; *Trichoderma reesia* [EP **244** 234]; *Neurospora crassa* (Case et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**:5259-5263 [1979]); *Schwanniomyces* tal como

Schwanniomyces occidentalis (EP 394 538 publicada a 31 de Outubro de 1990); e fungos filamentosos tais como, por exemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (WO 91/00357 publicada a 10 de Janeiro de 1991) e hospedeiros de *Aspergillus* tais como *A. nidulans* (Ballance et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. **112**:284-289 [1983]; Tilburn et al., Gene **26**:205-221 [1983]; Yelton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**:1470-1474 [1984]) e *A. niger* (Kelly e Hynes, EMBO J. **4**:475-479 [1985]).

Derivam-se células hospedeiras adequadas para a expressão de heteromultímero glicosilado a partir de organismos multicelulares. Tais células hospedeiras são capazes de actividades complexas de processamento e glicosilação. Em princípio, pode funcionar-se com qualquer cultura celular de eucariota superior, quer seja de cultura de vertebrados quer seja de invertebrados. Constituem exemplos de células de invertebrados, entre outras, células de plantas e de insectos. Foram identificadas várias estirpes e variantes de baculovírus e as correspondentes células hospedeiras de insecto permissivas de hospedeiros tais como *Spodoptera frugiperda* (lagarta), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca do vinagre) e *Bombyx mori*. Consultar, por exemplo, Luckow et al., Bio/Technology **6**:47-55 (1988); Miller et al., em Genetic Engineering, Setlow et al., ed., Vol. 8 (Plenum Publishing, 1986), p. 277-279; e Maeda et al., Nature **315**:592-594 (1985). Encontram-se disponíveis ao público várias estirpes víricas para transfecção, por exemplo, a variante L-1 de *Autographa californica* NPV e a estirpe Bm-5 de *Bombyx mori* NPV e tais vírus podem ser utilizados como o vírus aqui de acordo com o presente invento, nomeadamente para transfecção de células de *Spodoptera frugiperda*.

Podem utilizar-se como hospedeiros culturas de células de planta de algodão, milho, batata, soja, petúnia, tomate e tabaco. Tipicamente, transfectam-se células de planta por incubação com determinadas estirpes da bactéria *Agrobacterium tumefaciens*, que foram previamente manipuladas para conter o ADN de heteromultímero. Durante a incubação da cultura de células de planta com *A. tumefaciens*, o ADN que codifica o heteromultímero é transferido para o hospedeiro de célula de

planta de modo a ser transfectado e expressará, em condições apropriadas, o ADN de heteromultímero. Adicionalmente, encontram-se disponíveis sequências de regulação e de sinalização compatíveis com células de planta, tal como o promotor de nopalina-sintase e sequências de sinalização de poliadenilação. Depicker *et al.*, J. Mol. Appl. Gen. **1**:561 (1982). Adicionalmente, segmentos de ADN isolados da região a montante do gene T-DNA 780 são capazes de activar ou aumentar os níveis de transcrição de genes expressos em plantas em tecido de planta contendo ADN recombinante. EP 321 196 publicada a 21 de Junho de 1989.

Os hospedeiros preferidos são células de vertebrado e a propagação de células de vertebrado em cultura (cultura de tecidos) tornou-se um procedimento de rotina em anos recentes (Tissue Culture, Academic Press, Kruse e Patterson, editores [1973]). Constituem exemplos de linhas de células hospedeiras de mamífero úteis, a linha CV1 de rim de macaco transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); a linha de rim embrionário humano (células 293 ou 293 subclonadas para crescimento em cultura em suspensão, Graham *et al.*, J. Gen. Virol. **36**:59 [1977]); células de rim de *hamster* bebé (BHK, ATCC CCL 10); células de ovário de *hamster* chinês/-DHFR (CHO, Urlaub e Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**:4216 [1980]); células de Sertoli de ratinho (TM4, Mather, Biol. Reprod. **23**:243-251 [1980]); células de rim de macaco (CV1 ATCC CCL 70); células de rim de macaco verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células de rim canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de fígado de rato búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmão humano (W138, ATCC CCL 75); células de fígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor de mama de ratinho (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, Annals N.Y. Acad. Sci. **383**:44-68 [1982]); células MRC 5; células FS4; e uma linha de hepatoma humano (Hep G2).

Transfectam-se células hospedeiras com os vectores de expressão ou clonagem descritos supra deste invento e cultivam-se em meio nutriente convencional modificado tal como adequado para induzir promotores, seleccionar produtos de transformação ou amplificar os genes que codificam as sequências pretendidas. Dependendo da célula hospedeira

utilizada, a transfecção é efectuada utilizando técnicas padrão adequadas para tais células. É geralmente utilizado o tratamento com cálcio utilizando cloreto de cálcio, tal como descrito na secção 1.82 de Sambrook et al., supra, ou electroporação para procariotas ou outras células que contêm barreiras de parede celular substanciais. A infecção com *Agrobacterium tumefaciens* utiliza-se para transformação de determinadas células de plantas, tal como descrito por Shaw et al., Gene **23**:315 (1983) e WO 89/05859 publicada a 29 de Junho de 1989. Adicionalmente, podem transfectar-se plantas utilizando tratamento com ultra-sons tal como descrito em WO 91/00358 publicada a 10 de Janeiro de 1991.

Para células de mamífero sem tais paredes celulares, prefere-se o método de precipitação com fosfato de cálcio de Graham e van der Eb, Virology **52**:456-457 (1978). Descreveram-se aspectos gerais de transformações de sistemas de células hospedeiras de mamífero por Axel na patente U.S. n.º 4 399 216 concedida a 16 de Agosto de 1983. As transformações para levedura são tipicamente efectuadas de acordo com o método de Van Solingen et al., J. Bact. **130**:946 (1977) e Hsiao et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) **76**:3829 (1979). Contudo, podem utilizar-se outros métodos para introduzir ADN em células, tal como micro-injecção nuclear, electroporação, fusão de protoplastos bacterianos com células intactas, ou policações, por exemplo, polibreno, poliornitina, etc.. Para diferentes técnicas para transformar células de mamífero, consultar Keown et al., Methods in Enzymology (1989), Keown et al., Methods in Enzymology **185**:527-537 (1990) e Mansour et al., Nature **336**:348-352 (1988).

As células procarióticas utilizadas para produzir o polipéptido de heteromultímero deste invento são cultivada em meio adequado tal como descrito de um modo geral em Sambrook et al., supra.

As células hospedeiras de mamífero utilizadas para produzir o heteromultímero deste invento podem ser cultivadas em vários meios. São adequados para cultivar as células hospedeiras meio disponíveis comercialmente tais como F10 de Ham (Sigma), meio mínimo essencial ([MEM], Sigma), RPMI-1640

(Sigma) e meio de Eagle modificado por Dulbecco ([DMEM], Sigma). Adicionalmente, quaisquer dos meios descritos em Ham e Wallace, Meth. Enz. **58**:44 (1979), Barnes e Sato, Anal. Biochem. **102**:255 (1980), patentes U.S. n.º 4 767 704; 4 657 866; 4 927 762; ou 4 560 655; WO 90/03430; WO 87/00195; pedido de patente U.S. n.º 30 985; ou patente U.S. n.º 5 122 469 podem ser utilizados como meio de cultura para as células hospedeiras. Quaisquer destes meios pode ser suplementado como necessário com hormonas e/ou outros factores de crescimento (tais como insulina, transferrina ou factor de crescimento epidérmico), sais (tais como cloreto de sódio, cálcio, magnésio e fosfato), tampões (tal como HEPES), nucleósidos (tais como adenosina e timidina), antibióticos (tal como o fármaco GentamycinTM), elementos vestigiários (definidos como compostos inorgânicos habitualmente presentes em concentrações finais na gama do micromolar) e glucose ou qualquer fonte de energia equivalente. Podem também incluir-se quaisquer outros suplementos necessários a concentrações apropriadas que são conhecidas dos peritos na arte. As condições de cultura, tais como temperatura, pH e semelhantes, são as previamente utilizadas com a célula hospedeira seleccionada para expressão e são evidentes para o perito na arte.

De um modo geral, podem encontrar-se princípios, protocolos e técnicas práticas para maximizar a produtividade de culturas de células de mamífero em Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler, ed., IRL Press, 1991.

As células hospedeiras referidas nesta revelação abrangem células em cultura assim como células que se encontram no interior de um animal hospedeiro.

4. Recuperação do heteromultímero

O heteromultímero de preferência é geralmente recuperado do meio de cultura como um polipéptido excretado, apesar de poder também ser recuperado de lisados de células hospedeiras quando produzido directamente sem um sinal de excreção. Se o heteromultímero for ligado à membrana, pode ser libertado da

membrana por utilização de uma solução de detergente adequada (por exemplo Triton-X 100).

Quando o heteromultímero é produzido numa célula recombinante diferente de uma célula com origem humana, está completamente isento de proteínas ou polipéptidos de origem humana. Contudo, é necessário purificar o heteromultímero de proteínas ou polipéptidos de células recombinantes para obter preparações que são substancialmente homogéneas relativamente a heteromultímero. Como uma primeira etapa, o meio de cultura ou lisado é normalmente centrifugado para remover resíduos celulares particulados.

Os heterodímeros apresentando domínios constantes de anticorpo podem ser convenientemente purificados por cromatografia em hidroxilapatite, electroforese em gel, diálise ou cromatografia de afinidade, sendo a cromatografia de afinidade a técnica preferida. Quando o heteromultímero inclui um domínio C_H3 , a resina Bakerbond ABXTM (J.T. Baker, Phillipsburg, Nova Jérсия) é útil para purificação. Outras técnicas para purificação de proteínas tais como fraccionamento numa coluna de permuta iónica, precipitação com etanol, HPLC de fase reversa, cromatografia em sílica, cromatografia em heparina Sepharose, cromatografia numa resina de permuta aniónica ou cationica (tal como uma resina de poli(ácido aspártico)), electrofocagem, SDS-PAGE e precipitação com sulfato de amónio estão também disponíveis dependendo do polipéptido a recuperar. A adequação de proteína A como um ligando de afinidade depende da espécie e isotipo do domínio Fc de imunoglobulina que é utilizado na quimera. Pode utilizar-se proteína A para purificar imunoadesinas que se baseiam em cadeias pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$ ou $\gamma 4$ humanas (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. **62**:1-13 [1983]). Recomenda-se proteína G para todos os isotipos de ratinho e para $\gamma 3$ humana (Guss et al., EMBO J. **5**:1567-1575 [1986]). A matriz à qual o ligando de afinidade está ligado é na maioria das vezes agarose, mas encontram-se disponíveis outras matrizes. Matrizes mecanicamente estáveis tais como vidro de porosidade controlada ou poli(estirenodivinil)benzeno permitem caudais mais rápidos e tempos de processamento mais curtos do que os que podem ser obtidos com agarose. As condições para ligação de uma imunoadesina a colunas de afinidade de proteína A ou G

são inteiramente ditadas pelas características do domínio Fc; ou seja, a sua espécie e isotipo. De um modo geral, quando se escolhe o ligando apropriado, ocorre ligação eficaz directamente a partir de fluido de cultura não condicionado. Consiste numa característica distintiva das imunoadesinas, para moléculas $\gamma 1$ humanas, que a capacidade de ligação a proteína A é algo diminuída relativamente a um anticorpo do mesmo tipo Fc. A imunoadesina ligada pode ser eficazmente eluída quer a pH ácido (a 3,0 ou acima desse valor), ou num tampão com pH neutro contendo um sal ligeiramente caotrópico. A etapa de cromatografia de afinidade pode resultar numa preparação de heterodímero que é >95% pura.

5. Utilizações para o heteromultímero

Consideram-se muitas aplicações terapêuticas para o heteromultímero. Por exemplo, o heteromultímero pode ser utilizado para citotoxicidade redirigida (por exemplo para matar células de tumor), como um adjuvante de vacina, para entregar agentes trombolíticos a coágulos, para entregar imunotoxinas a células de tumor, para converter profármacos activados por enzima num local alvo (por exemplo, um tumor), para tratar doenças infecciosas ou dirigir ao alvo complexos imunitários para receptores de superfície celular.

Preparam-se formulações terapêuticas do heteromultímero para armazenagem por mistura do heteromultímero apresentando o grau de pureza pretendido com transportadores, excipientes ou estabilizantes aceitáveis fisiologicamente opcionais (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16^a edição, Osol, A., Ed., [1980]), sob a forma de bolo liofilizado ou soluções aquosas. Os transportadores, excipientes ou estabilizantes aceitáveis não são tóxicos para os recebedores nas dosagens e concentrações utilizadas e incluem tampões tais como fosfato, citrato e outros ácidos orgânicos; antioxidantes incluindo ácido ascórbico; polipéptidos de baixo peso molecular (menos de cerca de 10 resíduos); proteínas, tais como albumina de soro, gelatina ou imunoglobulinas; polímeros hidrófilos tal como polivinilpirrolidona; aminoácidos tais como glicina, glutamina, asparagina, arginina ou lisina; monossacáridos, dissacáridos e outros hidratos de carbonos incluindo glucose, manose ou dextrinas; agentes quelantes tal como EDTA; álcoois

de açúcar tais como manitol ou sorbitol; contra-íões formadores de sal tal como sódio; e/ou tensioactivos não iónicos tais como Tween, Pluronic ou polietilenoglicol (PEG).

O heteromultímero pode também ser encapsulado em microcápsulas preparadas, por exemplo, por técnicas de coacervação ou por polimerização interfacial (por exemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulose ou de gelatina e microcápsulas de poli[metilmetacrilato], respectivamente), em sistemas coloidais de entrega de fármacos (por exemplo, lipossomas, microesferas de albumina, microemulsões, nanopartículas e nanocápsulas) ou em macroemulsões. Tais técnicas são reveladas em Remington's Pharmaceutical Sciences, supra.

O heteromultímero a utilizar para administração *in vivo* deve ser estéril. Tal é facilmente conseguido por filtração através de membranas de filtração estéreis, antes ou após liofilização e reconstituição. O heteromultímero será normalmente armazenado em forma liofilizada ou sem solução.

As composições terapêuticas de heteromultímero colocam-se geralmente num recipiente apresentando um ponto de acesso estéril, por exemplo, um saco ou frasco de solução intravenosa apresentando uma rolha perfurável por uma agulha de injeção hipodérmica.

A via de administração de heteromultímero está de acordo com métodos conhecidos, por exemplo, injeção ou infusão por vias intravenosa, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intra-ocular, intra-arterial ou intralesional ou por sistemas de libertação prolongada como referido infra. O heteromultímero é administrado continuamente por infusão ou por injeção de *bolus*.

Constituem exemplos adequados de preparações de libertação prolongada, entre outros, matrizes semi-permeáveis de polímeros hidrófobos sólidos contendo a proteína cujas matrizes se encontram na forma de artigos enformados, por exemplo, filmes ou microcápsulas. Constituem exemplos de matrizes de libertação prolongada, entre outros, poliésteres, hidrogéis [por exemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato) tal

como descrito por Langer et al., J. Biomed. Mater. Res. **15**:167-277 (1981) e Langer, Chem. Tech. **12**:98-105 (1982) ou poli(álcool vinílico)], polilactidos (patente U.S. n.º 3 773 919, EP 58 481), copolímeros de ácido L-glutâmico e gama etil-L-glutamato (Sidman et al., Biopolymers **22**:547-556 [1983]), etileno-acetato de vinilo não degradável (Langer et al., supra), copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico tais como o Lupron DepotTM (microesferas injectáveis compostas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico e acetato de leuprolida) e ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico (EP 133 988).

Enquanto que polímeros tais como etileno-acetato de vinilo e ácido láctico-ácido glicólico permitem libertação de moléculas durante mais de 100 dias, determinados hidrogéis libertam proteínas durante períodos de tempo mais curtos. Quando as proteínas encapsuladas permanecem no corpo durante um longo período de tempo podem desnaturar ou agregar em resultado da exposição a humidade a 37°C, resultando em perda de actividade biológica e possíveis alterações na imunogenicidade. Podem conceber-se estratégias racionais para estabilização de proteínas dependendo do mecanismo envolvido. Por exemplo, caso se revele que o mecanismo de agregação é formação de ligações S-S intermoleculares através de permuta de tiodissulfureto, pode obter-se estabilização por modificação de resíduos sulfidriilo, liofilização a partir de soluções ácidas, controlo do teor em humidade, utilização de aditivos apropriados e desenvolvimento de composições de matriz de polímero específicas.

As composições de heteromultímero de libertação prolongada também incluem heteromultímero sequestrado em lipossomas. Preparam-se lipossomas contendo heteromultímero por métodos conhecidos por si: DE 3 218 121; Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**:3688-3692 (1985), Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**:4030-4034 (1980); EP 52 322; EP 36 676; EP 88 046; EP 143 949; EP 142 641; pedido de patente japonesa 83-118008; patentes U.S. n.º 4 485 045 e 4 544 545; e EP 102 324. Habitualmente os lipossomas são do tipo unilamelar pequeno (cerca de 200-800 angstrom) nos quais o teor de lípido é superior a cerca de 30% mol de colesterol, sendo a proporção seleccionada ajustada para uma terapia óptima com o heteromultímero.

Uma quantidade eficaz de heteromultímero a utilizar terapêuticamente dependerá, por exemplo, dos objectivos terapêuticos, da via de administração e do estado do doente. Consequentemente, será necessário que o terapeuta titule a dosagem e modifique a via de administração tal como necessário para obter o efeito terapêutico óptimo. Uma dosagem diária típica pode variar entre cerca de 1 µg/kg até 10 mg/kg ou mais dependendo dos factores mencionados supra. Tipicamente, o médico administrará heteromultímero até ser atingida uma dosagem que atinja o efeito pretendido. O progresso desta terapia é facilmente monitorizado por ensaios convencionais.

Os heteromultímeros aqui descritos podem também ser utilizados em imunoensaios enzimáticos. Para atingir este objectivo, um braço do heteromultímero pode ser concebido para se ligar a um epítopo específico na enzima que modo que a ligação não provoque inibição enzimática, podendo o outro braço do heteromultímero ser concebido para se ligar à matriz de imobilização assegurando uma densidade enzimática elevada no local pretendido. Constituem exemplos de tais heteromultímeros de diagnóstico, entre outros, os que apresentam especificidade para IgG assim como ferritina e os que apresentam especificidades de ligação para peroxidase de rábano (HRP) assim como para uma hormona, por exemplo.

Os heteromultímeros podem ser concebidos para utilização em imunoensaios com dois locais. Por exemplo, produzem-se dois heteromultímeros biespecíficos que se ligam a dois epítomos separados na proteína analito - um heteromultímero liga o complexo a uma matriz insolúvel, o outro liga-se a uma enzima indicadora.

Os heteromultímeros podem também ser utilizados para imunodiagnóstico *in vitro* ou *in vivo* de diferentes doenças tal como cancro. Para facilitar esta utilização em diagnóstico, um braço do heteromultímero pode ser concebido para ligar um antigénio associado a tumor e o outro braço pode ligar um marcador detectável (por exemplo um quelante que liga um radionuclídeo). Por exemplo, pode utilizar-se um heteromultímero apresentando especificidades para o antigénio CEA associado a tumor assim como um hapteno bivalente para efectuar imagem de carcinomas colorrectais e da tiróide.

Outras utilizações não terapêuticas, diagnósticas para o heteromultímero tornar-se-ão evidentes para o perito na arte.

Para aplicações diagnósticas pelo menos um braço do heteromultímero será tipicamente marcado directa ou indirectamente com uma parte detectável. A parte detectável pode ser qualquer uma que seja capaz de produzir, directa ou indirectamente, um sinal detectável. Por exemplo, a parte detectável pode ser um radioisótopo tal como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ou ^{125}I ; um composto fluorescente ou quimioluminescente, tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina ou luciferina; ou uma enzima, tal como fosfatase alcalina, beta-galactosidase ou peroxidase de rábano (HRP).

Pode utilizar-se qualquer método conhecido na arte para conjugar o heteromultímero separadamente à parte detectável, incluindo os métodos descritos por Hunter et al., Nature **144**:945 (1962); David et al., Biochemistry **13**:1014 (1974); Pain et al., J. Immunol. Meth. **40**:219 (1981); e Nygren, J. Histochem. and Cytochem. **30**:407 (1982).

Podem utilizar-se os heteromultímeros do presente invento em qualquer método de ensaio conhecido tais como ensaios de ligação competitiva, ensaios em sanduíche directos e indirectos e ensaios de imunoprecipitação. Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, p. 147-158 (CRC Press, Inc., 1987).

Os ensaios de ligação competitiva baseiam-se na capacidade de um padrão marcado competir com o analito da amostra de ensaio para ligação a uma quantidade limitada de heteromultímero. A quantidade de analito na amostra de ensaio é inversamente proporcional à quantidade de padrão que se liga ao heteromultímero. Para facilitar a determinação da quantidade de padrão que se liga, os heteromultímeros em geral são insolubilizados antes ou após a competição, de modo a que o padrão e o analito que estão ligados aos heteromultímeros possam ser convenientemente separados do padrão e analito que permanecem não ligados.

Os heteromultímeros são particularmente úteis para ensaios em sanduíche que envolvem a utilização de duas moléculas,

sendo cada uma capaz de se ligar a uma parte imunogénica diferente ou epítopo, da amostra a detectar. Num ensaio em sanduíche, o analito de amostra de ensaio é ligado por um primeiro braço do heteromultímero que está imobilizado a um suporte sólido após o que um segundo braço do heteromultímero se liga ao analito formando assim um complexo tripartido insolúvel. Consultar, por exemplo, patente U.S. n.º 4 376 110. O segundo braço do heteromultímero pode ser ele próprio marcado com uma parte detectável (ensaio em sanduíche directos) ou pode medir-se utilizando um anticorpo anti-imunoglobulina que está marcado com uma parte detectável (ensaio em sanduíche indirecto). Por exemplo, um tipo de ensaio em sanduíche é um ensaio ELISA em que a parte detectável é uma enzima.

Apresentam-se infra exemplos de concretizações específicas para levar à prática o presente invento. Os exemplos são apresentados a título meramente ilustrativo e não se pretende que limitem de algum modo o âmbito do presente invento.

EXEMPLOS

A interface C_H3 entre a quimera anti-CD3/CD4-IgG humanizada previamente descrita por Chamow *et al.* J. Immunol. **153**:4268 (1994) foi concebida racionalmente para maximizar a percentagem de heteromultímeros que poderiam ser recuperados. Comparam-se variantes C_H3 de protuberância-em-cavidade e de tipo selvagem relativamente à sua capacidade de dirigir a formação de uma quimera anticorpo-imunoadesina (Ab/Ia) anti-CD3/CD4-IgG humanizada.

Assim, constroem-se mutações no domínio C_H3 da cadeia pesada do anticorpo anti-CD3 humanizado e em CD4-IgG por mutagénese dirigida ao local utilizando oligonucleótidos não complementares (Kunkel *et al.*, *Methods Enzymol.* 154: 367 [1987] e P. Carter, em *Mutagenesis: a Practical Approach*, M. J. McPherson, Ed., IRL Press, Oxford, R.U., p. 1-25 [1991]) e verificam-se por sequenciação de didesoxinucleótidos (Sanger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463 [1977]). Consultar a tabela 4 infra e a figura 7 aqui incluída.

TABELA 4

Mutantes Mais Preferidos	
C _H 3 de anti-CD3	C _H 3 de CD4-IgG
T366Y	Y407T
T366W	Y407A
F405A	T394W
Y407T	T366Y
T366Y:F405A	T394W:Y407T
T366W:F405W	T394S:Y407A
F405W:Y407A	T366W:T394S
Mutantes Preferidos	
F405W	T394S

O resíduo T366 encontra-se a distância de ligação de ponte de hidrogénio do resíduo Y407 no domínio C_H3 do parceiro. De facto, o principal contacto intermolecular com o resíduo T366 é com o resíduo Y407 e vice-versa. Criou-se um par protuberância-em-cavidade por inversão desses resíduos com as mutações recíprocas de T366Y num domínio C_H3 e Y407T no domínio parceiro mantendo assim o volume de cadeias laterais na interface (figura 9). As mutações denotam-se 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, Maryland, ed. 5, [1991]) e seguidamente o resíduo de substituição no código de uma letra. Denotam-se as variações múltiplas por listagem das componentes de mutações simples separadas por uma vírgula.

Co-transfectaram-se fagemídeos que codificam variantes de cadeia leve (L) e pesada (H) anti-CD3 (Shalaby et al., *J. Exp. Med.* **175**: 217 [1992] e Rodrigues et al., *Int. J. Cancer (Supl.)* **7**: 45 [1992]) para células de rim embrionário humano, 293S, conjuntamente com um fagemídeo que codifica a variante CD4-IgG (Byrn et al., *Nature* **344**: 667 [1990]) tal como previamente descrito (Chamow et al., *J. Immunol.* **153**: 4268 [1994]). O procedimento é ilustrado na figura 8 aqui incluída.

A quantidade total de ADN de fagemídeo transfectada foi fixada enquanto que a razão dos diferentes ADN foi variada para maximizar o rendimento de quimera Ab/Ia. A razão (em massa) dos ADN de entrada Ia: cadeia H: cadeia L (15 µg no total) variou do seguinte modo: 8:1:3; 7:1:3; 6:1:3; 5:1:3; 4:1:3; 3:1:3; 1:0:0; 0:1:3.

Purificaram-se os produtos por afinidade utilizando proteína A de estafilococos (ProSep A, BioProcessing Ltd, R.U.) antes de analisar por SDS-PAGE seguido de densitometria por varrimento LASER (figuras 10A-10E). Utilizou-se excesso de ADN de cadeia L relativamente a ADN de cadeia H para evitar que a cadeia L fosse limitante. A identidade de produtos foi verificada por electrotransferência para membrana PVDF (Matsudaira, *J. Biol. Chem.* **262**: 10035 [1987]) seguido de sequenciação de terminal amino.

A co-transfecção de fagemídeos para cadeia L conjuntamente com os da cadeia H e Ia incorporando C_H3 de tipo selvagem resultou numa mistura de produtos de quimera Ab/Ia, homodímeros IgG e Ia como esperado (Chamow et al., *J. Immunol.* **153**: 4268 [1994]). Consultar figura 10A. Quanto maior a fracção de ADN de entrada que codifica as cadeias H e L de anticorpo ou Ia, maior a fracção correspondente de homodímeros recuperados. Uma razão de ADN de entrada de 6:1:3 de Ia:H:L originou 54,5% de quimera Ab/Ia com fracções semelhantes de homodímero Ia (22,5%) e IgG (23,0%). Estas razões são concordantes com as esperadas de expressão equimolar de cada domínio seguido de distribuição aleatória de cadeias H sem introdução de desvios devidos ao método de análise: 50% de quimera Ab/Ia, 25% de homodímero Ia e 25% de homodímero IgG.

Contrariamente às cadeias contendo C_H3 de tipo selvagem, a quimera Ab/Ia foi recuperada com rendimentos de até 92% a partir de co-transfecções nas quais a cadeia H de anti-CD3 e CD4-IgG Ia continham as mutações Y407T de cavidade e T366Y de protuberância, respectivamente (figura 10B). Obtiveram-se rendimentos semelhantes de quimera Ab/Ia se essas mutações recíprocas fossem estabelecidas com a protuberância na cadeia H e a cavidade na Ia (figura 10C). Em ambos os casos foi observado monómero para a cadeia contendo a protuberância mas não para a cadeia contendo a cavidade. Sem quaisquer

limitações teóricas, pensa-se que a protuberância T366Y é mais prejudicial à formação de homodímero do que a cavidade Y407T. A fracção de híbrido Ab/Ia não foi significativamente alterada por aumento do tamanho tanto da protuberância como da cavidade (Ab T366W, Ia Y407A). Um segundo par protuberância e cavidade (Ab F405A, Ia T394W) produziu até 71% de quimera Ab/Ia utilizando uma pequena fracção de ADN de entrada Ia para compensar a tendência não esperada da variante de protuberância Ia T394W homodimerizar (figura 10D). A combinação dos dois pares de mutantes protuberância-em-cavidade independentes (Ab T366Y:F405A, Ia T394W:Y407T) não melhorou o rendimento de híbrido Ab/Ia relativamente ao par Ab T366Y, Ia Y407T (comparar as figuras 10C e 10E).

A fracção de quimera Ab/Ia obtida com o par mutante T366Y e Y407T foi virtualmente independente da razão de ADN de entrada ao longo da gama ensaiada. Além disso, as espécies contaminantes foram facilmente removidas da quimera Ab/Ia por cromatografia de permuta iónica (NaCl 0-300 mM em Tris-HCl 20 mM, pH 8,0) numa coluna mono S HR 5/5 (Pharmacia, Piscataway, Nova Jérсия). Tal é um bom augúrio para a preparação de maiores quantidades de quimeras Ab/Ia utilizando linhas celulares estáveis em que os níveis de expressão relativos de Ab e Ia são manipuláveis com menor facilidade do que num sistema de expressão transitória.

Espera-se que as mutações protuberância-em-cavidade identificadas aumentem as aplicações potenciais de BsAb contendo Fc por redução da complexidade da mistura de produtos obtida a partir de dez espécies maioritárias possíveis (Suresh *et al.*, *Methods Enzymol.* **121**: 210 [1990]) até quatro ou menos. Espera-se que o par de mutantes T366Y e Y407T seja útil para gerar heteromultímeros de outros isotipos IgG humanos dado que T366 e Y407 são completamente conservados e outros resíduos na interface do domínio C_H3 de IgG₁ são altamente conservados (consultar figura 6 aqui incluída).

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

(1) INFORMAÇÃO GERAL:

- (i) REQUERENTE: Genentech, Inc.
- (ii) TÍTULO DA INVENÇÃO: MÉTODO DE PREPARAÇÃO DE POLIPÉPTIDOS
HETEROMULTIMÉRICOS
- (iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 16
- (iv) ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:
 - (A) DESTINATÁRIO: Genentech, Inc.
 - (B) RUA: 460 Point San Bruno Blvd
 - (C) CIDADE: South San Francisco
 - (D) ESTADO: California
 - (E) PAÍS: EUA
 - (F) CÓDIGO POSTAL: 94080
- (v) FORMATO LEGÍVEL EM COMPUTADOR:
 - (A) TIPO DE MEIO: disquete de 3,5 polegadas, 720 Kb
 - (B) COMPUTADOR: PC compatível com IBM
 - (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) SOFTWARE: WinPatin (Genentech)
- (vi) DADOS DO PRESENTE PEDIDO:
 - (A) NÚMERO DO PEDIDO:
 - (B) DATA DE APRESENTAÇÃO: 05-Fev-1996
 - (C) CLASSIFICAÇÃO:
- (vii) DADOS DE PEDIDO ANTERIOR:
 - (A) NÚMERO DO PEDIDO: 08/399106
 - (B) DATA DE APRESENTAÇÃO: 01-Mar-1995
- (viii) INFORMAÇÃO SOBRE REPRESENTANTE/AGENTE:
 - (A) NOME: Wendy M. Lee
 - (B) NÚMERO DE REGISTRO: 00,000
 - (C) NÚMERO DE REFERÊNCIA/PROCESSO: P0927PCT
- (ix) INFORMAÇÃO PARA TELECOMUNICAÇÕES:
 - (A) TELEFONE: 415/225-1994
 - (B) TELEFAX: 415/952-9881
 - (C) TELEX: 910/371-7168

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:1:

- (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
 - (A) COMPRIMENTO: 108 aminoácidos
 - (B) TIPO: Aminoácido
 - (D) TOPOLOGIA: Linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:1:

Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	
341				345					350					355	
Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	
				360					365					370	
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Asp	
				375					380					385	
Gly	Glx	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	
				390					395					400	
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	
				405					410					415	
Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	
				420					425					430	
Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	
				435					440					445	
Pro	Gly	Lys													
				448											

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:2:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 108 aminoácidos
- (B) TIPO: Aminoácido
- (D) TOPOLOGIA: Linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:2:

Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	
341				345					350					355	
Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	
				360					365					370	
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Asp	
				375					380					385	
Gly	Glx	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	
				390					395					400	
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	
				405					410					415	
Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	
				420					425					430	
Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	
				435					440					445	
Pro	Gly	Lys													
				448											

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:3:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 108 aminoácidos
- (B) TIPO: Aminoácido
- (D) TOPOLOGIA: Linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:3:

Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	341	345	350	355
Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	360	365	370	
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Asp	375	380	385	
Gly	Glx	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	390	395	400	
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	405	410	415	
Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	420	425	430	
Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	435	440	445	
Pro	Gly	Lys	448															

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:4:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 113 aminoácidos
- (B) TIPO: Aminoácido
- (D) TOPOLOGIA: Linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:4:

Gly	Asn	Thr	Phe	Arg	Pro	Gln	Val	His	Leu	Leu	Pro	Pro	Pro	Ser	341	345	350	355
Glu	Glu	Leu	Ala	Leu	Asx	Glx	Leu	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Leu	Ala	360	365	370	
Arg	Gly	Phe	Ser	Pro	Lys	Asp	Val	Leu	Val	Arg	Trp	Leu	Gln	Gly	375	380	385	
Ser	Gln	Glu	Leu	Pro	Arg	Glu	Lys	Tyr	Leu	Thr	Trp	Ala	Ser	Arg	390	395	400	
Gln	Glx	Pro	Ser	Gln	Gly	Thr	Thr	Thr	Phe	Ala	Val	Thr	Ser	Ile	405	410	415	
Leu	Arg	Val	Ala	Ala	Glu	Asp	Trp	Lys	Lys	Gly	Asp	Thr	Phe	Ser	420	425	430	
Cys	Met	Val	Gly	His	Glu	Ala	Leu	Pro	Leu	Ala	Phe	Thr	Gln	Lys	435	440	445	
Thr	Ile	Asp	Arg	Leu	Ala	Gly	Lys	450	453									

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:5:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 107 aminoácidos
- (B) TIPO: Aminoácido
- (D) TOPOLOGIA: Linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:5:

Gln Ala Pro Val Lys Leu Ser Leu Asn Leu Leu Ala Ser Ser Asp
 341 345 350 355
 Pro Pro Glu Ala Ala Ser Trp Leu Leu Cys Glu Val Ser Gly Phe
 360 365 370
 Ser Pro Pro Asn Ile Leu Leu Met Trp Leu Glu Asp Gln Arg Glu
 375 380 385
 Val Asn Thr Ser Gly Phe Ala Pro Ala Arg Pro Pro Pro Gln Pro
 390 395 400
 Gly Ser Thr Thr Phe Trp Ala Trp Ser Val Leu Arg Val Pro Ala
 405 410 415
 Pro Pro Ser Pro Gln Pro Ala Thr Tyr Thr Cys Val Val Ser His
 420 425 430
 Glu Asp Ser Arg Thr Leu Leu Asn Ala Ser Arg Ser Leu Glu Val
 435 440 445
 Ser Tyr
 447

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:6:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 110 aminoácidos
- (B) TIPO: Aminoácido
- (D) TOPOLOGIA: Linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:6:

Gly Pro Arg Ala Ala Pro Glu Val Tyr Ala Phe Ala Thr Pro Glu
 341 345 350 355
 Trp Pro Gly Ser Arg Asp Lys Arg Thr Leu Ala Cys Leu Ile Gln
 360 365 370
 Asn Phe Met Pro Glu Asp Ile Ser Val Gln Trp Leu His Asn Glu
 375 380 385
 Val Gln Leu Pro Asp Ala Arg His Ser Thr Thr Gln Pro Arg Lys
 390 395 400
 Thr Lys Gly Ser Gly Phe Phe Val Phe Ser Arg Leu Glu Val Thr
 405 410 415
 Arg Ala Glu Trp Glu Gln Lys Asp Glu Phe Ile Cys Arg Ala Val
 420 425 430
 His Glu Ala Ala Ser Pro Ser Gln Thr Val Gln Arg Ala Val Ser
 435 440 445
 Val Asn Pro Gly Lys
 450

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:7:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 106 aminoácidos
- (B) TIPO: Aminoácido
- (D) TOPOLOGIA: Linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:7:

```

Asp Glx Asx Thr Ala Ile Arg Val Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe
342          345          350          355

Ala Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr Lys Leu Thr Cys Leu Val
          360          365          370

Thr Asp Leu Thr Thr Tyr Asx Ser Val Thr Ile Ser Trp Thr Arg
          375          380          385

Glx Asp Gly Glu Ala Val Lys Thr His Thr Asx Ile Ser Glx Ser
          390          395          400

His Pro Asx Ala Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala Ser Ile Cys
          405          410          415

Glu Asx Asx Trp Asx Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr Val Thr
          420          425          430

His Thr Asp Leu Pro Ser Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg Pro
          435          440          445

Lys
447

```

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:8:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 108 aminoácidos
- (B) TIPO: Aminoácido
- (D) TOPOLOGIA: Linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:8:

```

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
361          365          370          375

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
          380          385          390

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asx Asp
          395          400          405

Gly Glx Pro Glx Asx Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
          410          415          420

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
          425          430          435

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
          440          445          450

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
          455          460          465

Pro Gly Lys
          468

```

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:9:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 107 aminoácidos
- (B) TIPO: Aminoácido
- (D) TOPOLOGIA: Linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:9:

Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	
361				365					370					375	
Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	
				380					385					390	
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	
				395					400					405	
Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	
				410					415					420	
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	
				425					430					435	
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	
				440					445					450	
Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	
				455					460					465	
Gly	Lys														
	467														

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:10:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 107 aminoácidos
- (B) TIPO: Aminoácido
- (D) TOPOLOGIA: Linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:10:

Gly	Gln	Pro	Arg	Glx	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	
361				365					370					375	
Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	
				380					385					390	
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Ser	Gly	
				395					400					405	
Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Asn	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	
				410					415					420	
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	
				425					430					435	
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Ile	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	
				440					445					450	
Ala	Leu	His	Asn	Arg	Phe	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	
				455					460					465	
Gly	Lys														
	467														

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:11:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 107 aminoácidos
- (B) TIPO: Aminoácido
- (D) TOPOLOGIA: Linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:11:

Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln
361				365					370					375
Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys
				380					385					390
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glx	Ser	Asn	Gly
				395					400					405
Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser
				410					415					420
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser
				425					430					435
Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu
				440					445					450
Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu
				455					460					465
Gly	Lys													
	467													

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:12:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 107 aminoácidos
- (B) TIPO: Aminoácido
- (D) TOPOLOGIA: Linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:12:

Gly	Arg	Pro	Lys	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Ile	Pro	Pro	Pro	Lys
361				365					370					375
Glu	Gln	Met	Ala	Lys	Asp	Lys	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Met	Ile	Thr
				380					385					390
Asp	Phe	Phe	Pro	Glu	Asp	Ile	Thr	Val	Glu	Trp	Gln	Trp	Asx	Gly
				395					400					405
Gln	Pro	Ala	Glu	Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr	Gln	Pro	Ile	Met	Asx	Thr
				410					415					420
Asx	Gly	Ser	Tyr	Phe	Val	Tyr	Ser	Lys	Leu	Asn	Val	Gln	Lys	Ser
				425					430					435
Asn	Trp	Glu	Ala	Gly	Asn	Thr	Phe	Thr	Cys	Ser	Val	Leu	His	Glu
				440					445					450
Gly	Leu	His	Asn	His	His	Thr	Glu	Lys	Ser	Leu	Ser	His	Ser	Pro
				455					460					465
Gly	Lys													
	467													

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:13:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 107 aminoácidos
- (B) TIPO: Aminoácido
- (D) TOPOLOGIA: Linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:13:

Gly	Pro	Val	Arg	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Val	Leu	Pro	Pro	Pro	Ala	
361				365					370					375	
Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Lys	Glx	Phe	Ser	Leu	Thr	Cys	Met	Ile	Thr	
				380					385					390	
Gly	Phe	Leu	Pro	Ala	Glu	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Thr	Ser	Asn	Gly	
				395					400					405	
Arg	Thr	Glu	Gln	Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr	Ala	Thr	Val	Leu	Asp	Ser	
				410					415					420	
Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	Met	Tyr	Ser	Lys	Leu	Arg	Val	Glx	Lys	Ser	
				425					430					435	
Thr	Trp	Glu	Arg	Gly	Ser	Leu	Phe	Ala	Cys	Ser	Val	Val	His	Glu	
				440					445					450	
Gly	Leu	His	Asn	His	Leu	Thr	Thr	Lys	Thr	Phe	Ser	Arg	Ser	Leu	
				455					460					465	
Gly	Lys														
	467														

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:14:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 107 aminoácidos
- (B) TIPO: Aminoácido
- (D) TOPOLOGIA: Linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:14:

Gly	Leu	Val	Arg	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Pro	Ala	
361				365					370					375	
Glu	Gln	Leu	Ser	Arg	Lys	Asp	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Val	
				380					385					390	
Gly	Phe	Asn	Pro	Gly	Asp	Ile	Ser	Val	Glu	Trp	Thr	Ser	Asn	Gly	
				395					400					405	
His	Thr	Glu	Glu	Asn	Tyr	Lys	Asx	Thr	Ala	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	
				410					415					420	
Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	Ile	Tyr	Ser	Lys	Leu	Asn	Met	Lys	Thr	Ser	
				425					430					435	
Lys	Trp	Glu	Lys	Thr	Asp	Ser	Phe	Ser	Cys	Asn	Val	Arg	His	Glu	
				440					445					450	
Gly	Leu	Lys	Asn	Tyr	Tyr	Leu	Lys	Lys	Thr	Ile	Ser	Arg	Ser	Pro	
				455					460					465	
Gly	Lys														
	467														

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:15:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 107 aminoácidos
- (B) TIPO: Aminoácido
- (D) TOPOLOGIA: Linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:15:

Gly	Arg	Ala	Gln	Thr	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Ile	Pro	Pro	Pro	Arg	361	365	370	375
Glu	Gln	Met	Ser	Lys	Lys	Lys	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Thr	380	385	390	
Asn	Phe	Phe	Ser	Glu	Ala	Ile	Ser	Val	Glu	Trp	Glu	Arg	Asn	Gly	395	400	405	
Glu	Leu	Glu	Gln	Asp	Tyr	Lys	Asn	Thr	Pro	Pro	Ile	Leu	Asp	Ser	410	415	420	
Asp	Gly	Thr	Tyr	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Thr	Asp	425	430	435	
Ser	Trp	Leu	Gln	Gly	Glu	Ile	Phe	Thr	Cys	Ser	Val	Val	His	Glu	440	445	450	
Ala	Leu	His	Asn	His	His	Thr	Gln	Lys	Asn	Leu	Ser	Arg	Ser	Pro	455	460	465	
Gly	Lys														467			

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:16:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 29 aminoácidos
- (B) TIPO: Aminoácido
- (D) TOPOLOGIA: Linear

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:16:

Lys	Asp	Glu	Phe	Ile	Cys	Arg	Ala	Val	His	Glu	Ala	Ala	Ser	Pro	451	455	460	465
Ser	Gln	Thr	Val	Gln	Arg	Ala	Val	Ser	Val	Asn	Pro	Gly	Lys		470	475	479	

Lisboa,

REIVINDICAÇÕES

1. Método de preparação de um heteromultímero incluindo um primeiro polipéptido e um segundo polipéptido, em que o primeiro polipéptido e o segundo polipéptido incluem, cada um, um domínio constante de anticorpo, em que os domínios constantes de anticorpo se encontram numa interface que inclui uma interface original entre os domínios constantes de anticorpo que é alterada para promover a formação do heteromultímero, incluindo o método:

- (a) alterar um primeiro ácido nucleico que codifica o domínio constante de anticorpo do primeiro polipéptido de modo a que dentro da interface original do domínio constante de anticorpo do primeiro polipéptido que encontra a interface original do domínio constante de anticorpo do segundo polipéptido dentro do heteromultímero, um resíduo de aminoácido seja substituído por um resíduo de aminoácido apresentando um maior volume de cadeia lateral, gerando assim uma protuberância dentro da interface no domínio constante de anticorpo do primeiro polipéptido que é posicionável numa cavidade dentro da interface do domínio constante de anticorpo do segundo polipéptido;

e/ou

- (b) alterar um segundo ácido nucleico que codifica o domínio constante de anticorpo do segundo polipéptido de modo a que dentro da interface original do domínio constante de anticorpo do segundo polipéptido que encontra a interface original do domínio constante de anticorpo do primeiro polipéptido dentro do heteromultímero, um resíduo de aminoácido seja substituído por um resíduo de aminoácido apresentando um menor volume de cadeia lateral, gerando assim uma cavidade dentro da interface do domínio constante de anticorpo do segundo polipéptido na qual se pode posicionar uma protuberância dentro da interface do domínio constante de anticorpo do segundo polipéptido;
- (c) introduzir numa célula hospedeira o primeiro e o segundo ácidos nucleicos e cultivar a célula de modo a que ocorra expressão dos primeiro e segundo ácidos nucleicos;
- (d) recuperar o heteromultímero formado a partir da cultura de células.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, incluindo alterar como descrito o ácido nucleico que codifica o domínio constante de anticorpo do primeiro polipéptido e o ácido nucleico que codifica o domínio constante de anticorpo do segundo polipéptido.

3. Método de acordo com a reivindicação 1 em que o referido resíduo de aminoácido apresentando um maior volume de cadeia lateral é arginina (R).

4. Método de acordo com a reivindicação 1 em que o referido resíduo de aminoácido com um maior volume de cadeia lateral é fenilalanina (F).

5. Método de acordo com a reivindicação 1 em que o referido resíduo de aminoácido com um maior volume de cadeia lateral é tirosina (Y).

6. Método de acordo com a reivindicação 1 em que o referido resíduo de aminoácido com um maior volume de cadeia lateral é triptofano (W).

7. Método de acordo com a reivindicação 1 em que o referido resíduo de aminoácido apresentando um menor volume de cadeia lateral não é cisteína (C).

8. Método de acordo com a reivindicação 1 em que o referido resíduo de aminoácido com um menor volume de cadeia lateral é alanina (A).

9. Método de acordo com a reivindicação 1 em que o referido resíduo de aminoácido com um menor volume de cadeia lateral é serina (S).

10. Método de acordo com a reivindicação 1 em que o referido resíduo de aminoácido com um menor volume de cadeia lateral é treonina (T).

11. Método de acordo com a reivindicação 1 em que o referido resíduo de aminoácido com um menor volume de cadeia lateral é valina (V).

12. Método de acordo com a reivindicação 1 em que o domínio constante de anticorpo é um domínio C_H3.

13. Método de acordo com a reivindicação 12 em que o domínio constante de anticorpo é de uma IgG.

14. Método de acordo com a reivindicação 13 em que a IgG é IgG₁ humana.

15. Método de acordo com a reivindicação 1 em que o heteromultímero é um anticorpo biespecífico.

16. Método de acordo com a reivindicação 1 em que o heteromultímero é uma imunoadesina biespecífica.

17. Método de acordo com a reivindicação 1 em que o heteromultímero é uma quimera anticorpo-imunoadesina.

18. Heteromultímero obtenível pelo método de acordo com a reivindicação 1.

19. Heteromultímero de acordo com a reivindicação 18 em que a protuberância e a cavidade foram introduzidas na interface do domínio constante de anticorpo do primeiro e do segundo polipéptidos, respectivamente.

20. Heteromultímero de acordo com a reivindicação 19 em que a protuberância e a cavidade incluem ambas um resíduo de aminoácido de ocorrência natural.

21. Composição incluindo o heteromultímero de acordo com a reivindicação 18 e um transportador farmacêuticamente aceitável.

22. Célula hospedeira incluindo ácido nucleico que codifica o heteromultímero de acordo com a reivindicação 18.

23. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 22 em que o ácido nucleico que codifica o primeiro polipéptido e o ácido nucleico que codifica o segundo polipéptido estão presentes num único vector.

24. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 22 em que o ácido nucleico que codifica o primeiro polipéptido e o ácido nucleico que codifica o segundo polipéptido estão presentes em vectores separados.

25. Método de produção de um heteromultímero incluindo a cultura da célula hospedeira de acordo com a reivindicação 22 de modo que o ácido nucleico seja expresso e a recuperação do heteromultímero a partir da cultura celular.

26. Método de acordo com a reivindicação 25 em que a célula hospedeira é uma célula de mamífero.

27. Método de acordo com a reivindicação 25 em que o heteromultímero é recuperado a partir do meio de cultura celular.

Lisboa,

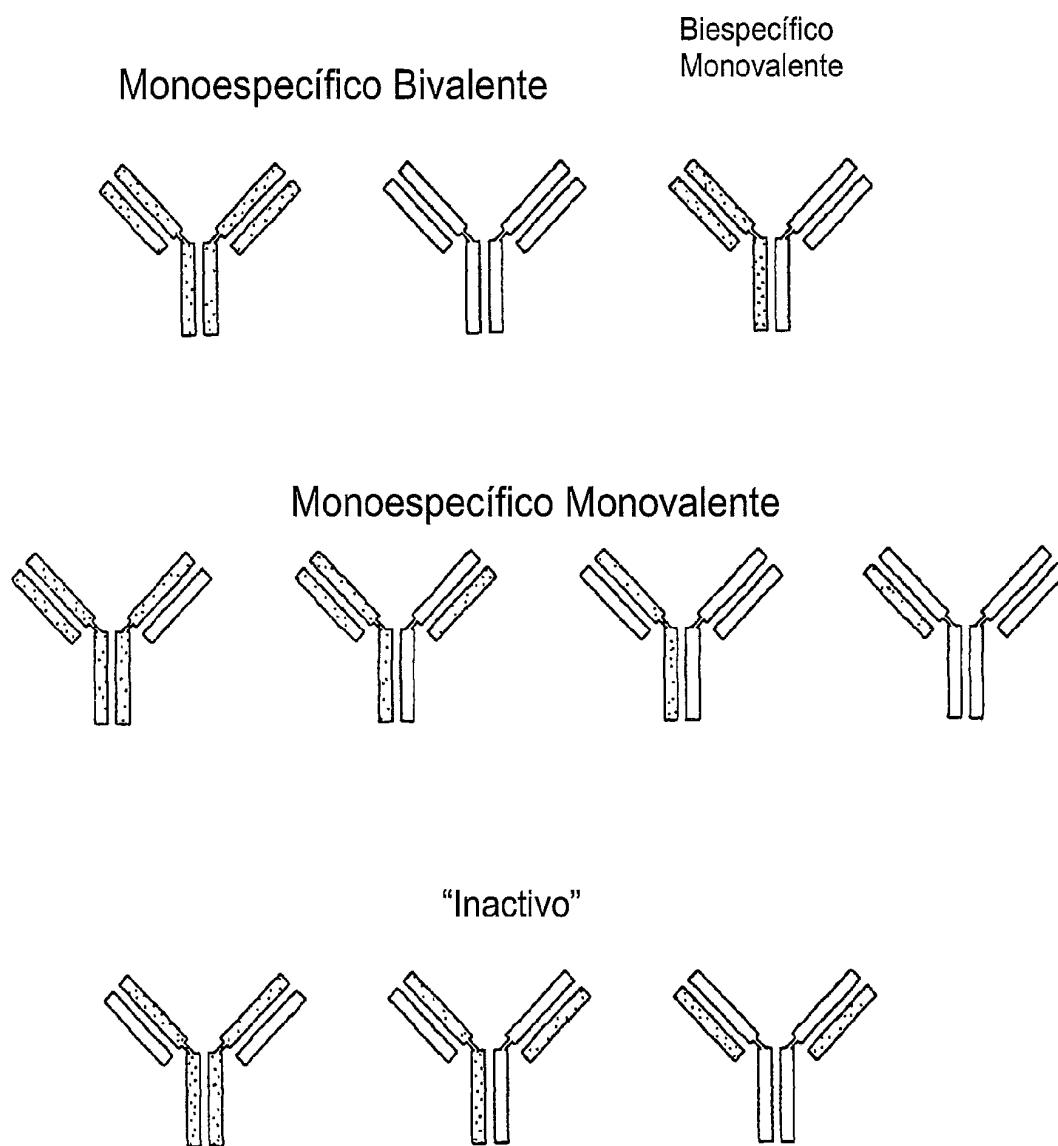
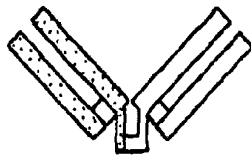
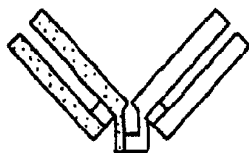
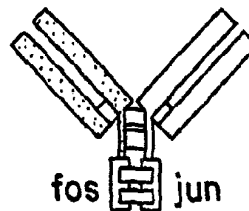
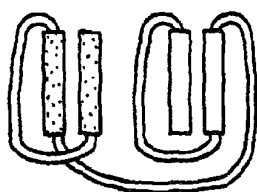
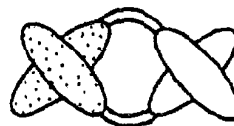


FIG. I

BsF(ab')₂Fragmentos de roedor
acoplados quimicamente**FIG. 2A****BsF(ab')₂**Fragmentos derivados de E. coli
acoplados quimicamente**FIG. 2B****BsF(ab')₂**Cremalheiras de leucina
montadas**FIG. 2C**

Dímero sFv

FIG. 2E

Diacorpo

FIG. 2D

RECEPTOR



FIG. 3A

Cadeia pesada IgG1

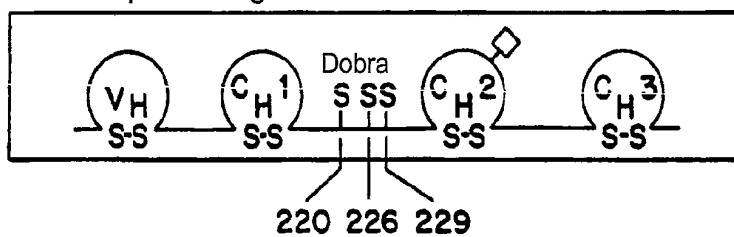


FIG. 3B

Imunoadesina

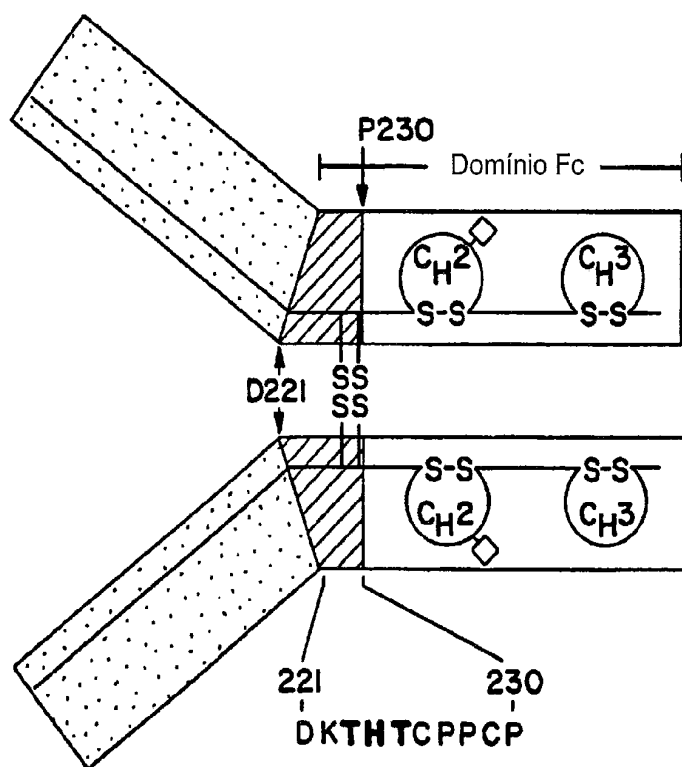
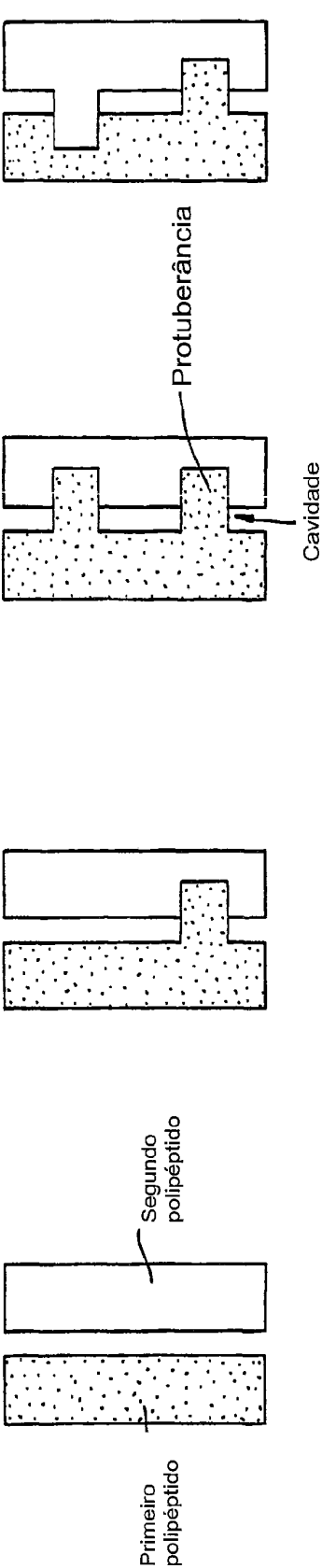


FIG. 3C



Tipo selvagem Mutantes simples Mutantes duplos Mutantes duplos

FIG.4

Limiar, interface

```

-----
      B i B I B I      B i
IgG   G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q
IgA   G N T F R P Q V H L L P P P S E E L A L B Z L
IgD   Q A P V K L S L N L L A S S D P - - P E A A
IgE   G P R A A P E V Y A F A T P E W P G S R D K
IgM   - D Z B T A I R V F A I P P S F A S I F L T K S
      350                               360

```

Meio, interface

exterior

```

-----
      B I B I B I B i      B      B      B
IgG   V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N
IgA   V T L T C L A R G F S P K D V L V R W L Q G
IgD   S W L L C E V S G F S P P N I L L M W L E D Q
IgE   R T L A C L I Q N F M P E D I S V Q W L H N
IgM   T K L T C L V T D L T T Y B S V T I S W T R Z
      370                               380

```

Limiar, interface

```

-----
              I      i      I
IgG   D - G Q P E N N Y K T T P P V/M L D S D G S
IgA   S Q E L P R E K Y L T W A S R   Q Z P S Q G T T T
IgD   R E V N T S G F A P A R P P P   Q P G S T T
IgE   E V Q L P D A R H S T T Q P R   K T K G S G
IgM   D - - G E A V K T H T B I S Z   S H P B A T
      390                               400

```

Meio, interface

exterior

```

-----
      B I B I B I      B i B      B      B      B
IgG   F F L Y S K/R L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M
IgA   F A V T S I   L R V A A E D W K K G D T F S C M V G
IgD   F W A W S V   L R V P A P P S P Q P A T Y T C V V S
IgE   F F V F S R   L E V T R A E W E Q K D E F I C R A V
IgM   F S A V G E   A S I C E B B W B S G E R F T C T V T
      410                               420

```

exterior

```

-----
      B      b      b      b
IgG   H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K
IgA   H E A L P L A F T Q K T I D R L A G K
IgD   H E D - S R T L L N A S R S L E V S Y
IgE   H E A A S P S Q T V Q R A V S V N P G K
IgM   H T D L P S P L K Q T I S R P K - - -
      430                               440

```

FIG. 5

```

hIgG1      361  LIMIAR  MEIO  390
G - Q P R E P Q V Y T L P P S R E E E - - M T K N Q V S L T C
hIgG2      G - Q P R E P Q V Y T L P P S R E E E - - M T K N Q V S L T C
hIgG3      G - Q P R E P Q V Y T L P P S R E E E - - M T K N Q V S L T C
hIgG4      G - Q P R E P Q V Y T L P P S R E E E - - M T K N Q V S L T C

mIgG1      361  LIMIAR  MEIO  390
G - R P K A P Q V Y T I P P P K E Q - - M A K D K V S L T C
mIgG2A     G - P V R A P Q V Y T L P P P - A E E - - M T K K Z F S L T C
mIgG2B     G - L V R A P Q V Y T L P P P - A E E - - M T K K Z F S L T C
mIgG3      G - R A Q T P Q V Y T I P P P - R E E - - M S K K K V S L T C
*****

hIgG1      400  LIMIAR  MEIO  410
L V K G F Y P S D - - I A V E W E S - B D - G Z P Z B N Y K
hIgG2      L V K G F Y P S D - - I A V E W E S - N G - - Q P P E N N Y K
hIgG3      L V K G F Y P S D - - I A V E W E S - S G - - Q P P E N N Y K
hIgG4      L V K G F Y P S D - - I A V E W E S - N G - - Q P P E N N Y K

mIgG1      M I T D F F F P E D I T V - - E W Q W - B G - - Q P A E N Y K
mIgG2A     M I T G F F F P A E I A V - - E W T S - N G - - R T E Q N Y K
mIgG2B     L V V G F F F P G D I S V - - E W T S - N G - - H T E E N Y K
mIgG3      L V T N F F F S E A I S V - - E W E R - N G - - E L E Q D Y K
*****

```

FIG. 6A

	LIMAR				MEIO										
hIgG1	T	T	P	P	↓	↓	↓	↓	430	↓	↓	↓	↓	450	
hIgG2	T	T	P	P	↓	↓	↓	↓	-	-	-	-	Q	Q	
hIgG3	T	T	P	P	↓	↓	↓	↓	-	-	-	-	Q	Q	
hIgG4	T	T	P	P	↓	↓	↓	↓	-	-	-	-	Q	Q	
mIgG1	N	T	Q	P	↓	↓	↓	↓	-	-	-	-	E	A	
mIgG2A	N	T	A	T	↓	↓	↓	↓	-	-	-	-	E	R	
mIgG2B	B	T	A	P	↓	↓	↓	↓	-	-	-	-	E	K	
mIgG3	N	T	P	P	↓	↓	↓	↓	-	-	-	-	L	Q	
*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
hIgG1	G	N	V	F	↓	↓	↓	↓	451	↓	↓	↓	↓	480	
hIgE	K	D	E	F	↓	↓	↓	↓	460	↓	↓	↓	↓	K	K
hIgG2	G	N	V	F	↓	↓	↓	↓	-	-	-	-	K	K	
hIgG3	G	N	I	F	↓	↓	↓	↓	-	-	-	-	K	K	
hIgG4	G	N	V	F	↓	↓	↓	↓	-	-	-	-	K	K	
mIgG1	G	N	T	F	↓	↓	↓	↓	-	-	-	-	K	K	
mIgG2A	G	S	L	F	↓	↓	↓	↓	-	-	-	-	K	K	
mIgG2B	T	D	S	F	↓	↓	↓	↓	-	-	-	-	K	K	
mIgG3	G	E	I	F	↓	↓	↓	↓	-	-	-	-	K	K	
*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	

FIG.6B

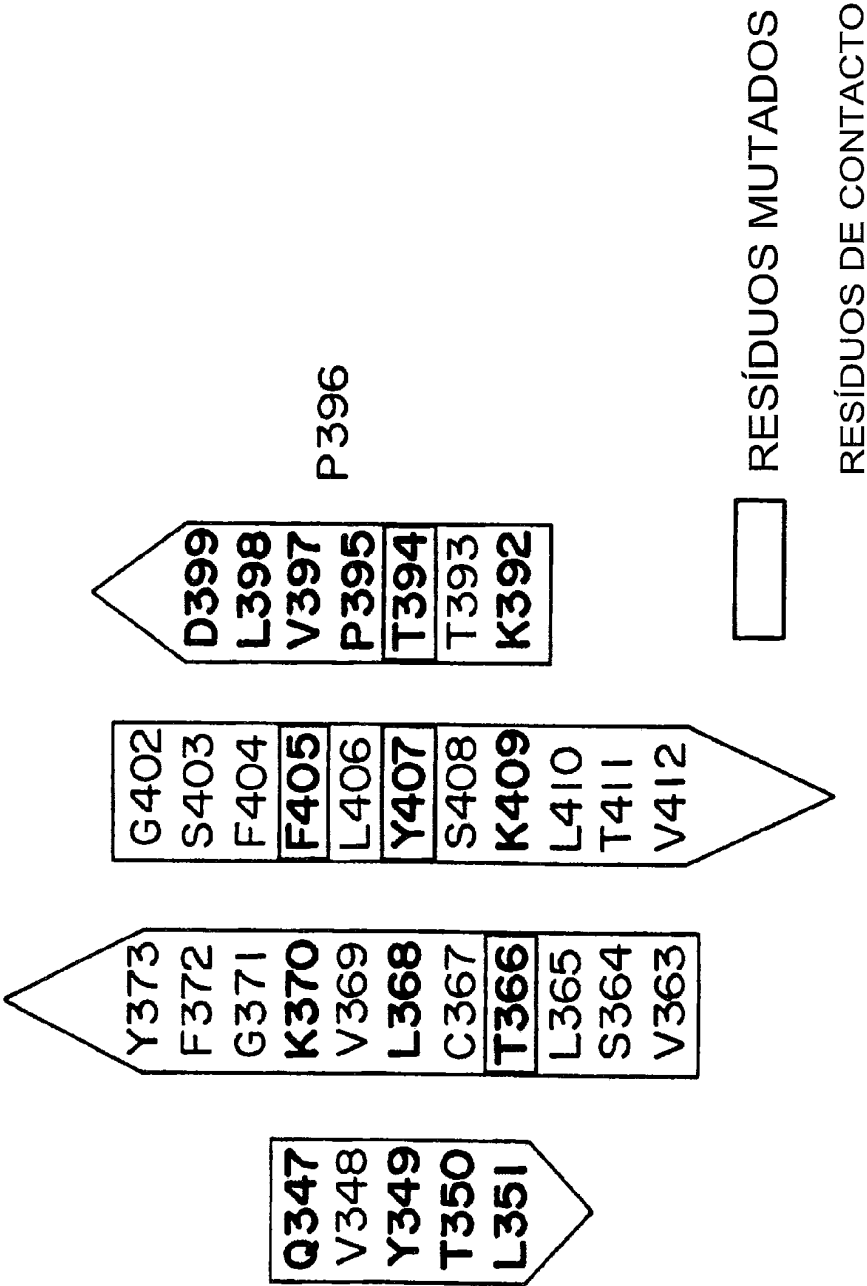


FIG. 7

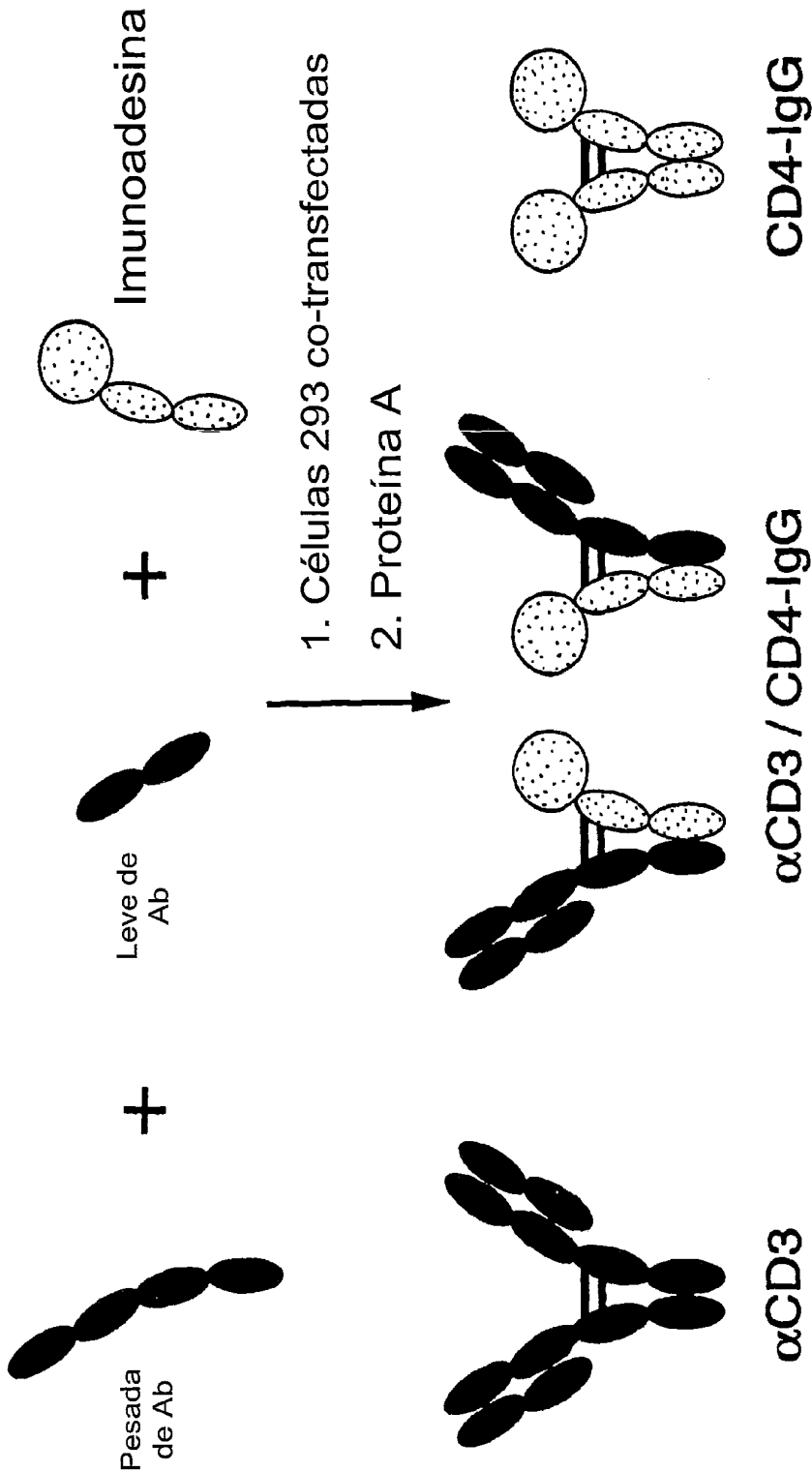


FIG.8



FIG.9

