

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 973 885**

51 Int. Cl.:

C07K 16/46 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.07.2016** **PCT/EP2016/065576**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.01.2017** **WO17005649**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.2016** **E 16733969 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.01.2024** **EP 3319996**

54 Título: **Anticuerpos biespecíficos y multiespecíficos y método para aislarlos**

30 Prioridad:

09.07.2015 DK 201500399

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

24.06.2024

73 Titular/es:

GENMAB A/S (100.0%)
Carl Jacobsens Vej 30
2500 Valby, DK

72 Inventor/es:

HIBBERT, RICHARD G.;
LABRIJN, ARAN F.;
GERRITSEN, ARNOUT F.;
SCHUURMAN, JANINE y
PARREN, PAUL

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 973 885 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos biespecíficos y multiespecíficos y método para aislarlos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a nuevos anticuerpos biespecíficos y multiespecíficos y a nuevos métodos para producirlos y aislarlos.

10 **Antecedentes de la invención**

Los anticuerpos monoclonales se han convertido en los últimos años en moléculas terapéuticas de éxito, en particular para el tratamiento del cáncer. Por desgracia, sin embargo, en ciertos casos, los anticuerpos monoclonales no pueden curar enfermedades cuando se usan como monoterapia. Los anticuerpos biespecíficos pueden potencialmente superar algunas de las limitaciones de la terapia con anticuerpos monoclonales, por ejemplo, podrían usarse como mediadores para dirigir un fármaco o un compuesto tóxico a las células, como mediadores para redirigir los mecanismos efectores a sitios asociados a enfermedades o como mediadores para aumentar la especificidad de las células tumorales, por ejemplo, uniéndose a una combinación de moléculas diana que se encuentra exclusivamente en las células tumorales.

Se han desarrollado muchos formatos y usos diferentes de anticuerpos biespecíficos y multiespecíficos. Uno de los principales obstáculos en el desarrollo de anticuerpos biespecíficos ha sido la dificultad de producir el material en calidad y cantidad suficiente mediante tecnologías tradicionales, tal como el hibridoma híbrido y los métodos de conjugación química. La coexpresión de dos anticuerpos, que consiste en diferentes cadenas pesadas y ligeras, en una célula huésped conduce a una mezcla de posibles productos de anticuerpos además del anticuerpo biespecífico deseado.

Se han descrito varias estrategias para favorecer la formación de un producto heterodimérico, es decir, biespecífico, tras la coexpresión de diferentes construcciones de anticuerpos en una célula. Lindhofer *et al.* (1995 J Immunol 155:219) han descrito que la fusión de hibridomas de rata y ratón que producen diferentes anticuerpos conduce al enriquecimiento de anticuerpos biespecíficos funcionales, debido al emparejamiento preferente de cadenas pesadas/ligeras restringidas por especies. Otra estrategia para promover la formación de heterodímeros sobre homodímeros tras la coexpresión de diferentes construcciones de anticuerpos es mediante ingeniería de la interfaz CH3-CH3. Ejemplos de tales estrategias incluyen la estrategia de "llave en cerradura" (patente de Estados Unidos 5.731.168), orientación electrostática (documentos EP1870459 y WO 2009089004) y la estrategia de "dominio de ingeniería intercambiado por hebras" (SEED) (documento WO2007110205).

Alternativa a la coexpresión de diferentes anticuerpos en una célula para producir anticuerpos biespecíficos, el solicitante ha divulgado previamente un método de posproducción para generar anticuerpos biespecíficos *in vitro* mediante el llamado intercambio de brazo Fab tras la expresión separada de los anticuerpos monoespecíficos (documentos WO 2008119353 y WO2011131746). El solicitante descubrió que introduciendo mutaciones asimétricas en las regiones CH3 de las dos proteínas de partida monoespecíficas, se puede forzar que la reacción de intercambio del brazo Fab se vuelva direccional y produzca proteínas heterodiméricas altamente estables.

Los métodos utilizados para generar un producto biespecífico heterodimérico, incluyendo los métodos descritos anteriormente, a veces puede resultar en la producción de una pequeña cantidad de homodímeros no deseados. Para algunas aplicaciones se prefiere o se requiere la monovalencia y, en estos casos, los homodímeros bivalentes residuales pueden disminuir la eficacia del tratamiento y/o generar problemas de seguridad. Esto requiere una purificación adicional del producto deseado.

Se han descrito varios métodos para la purificación de anticuerpos (biespecíficos). El anticuerpo híbrido biespecífico de rata/ratón descrito por Lindhofer *et al.* (1995 J Immunol 155:219) puede purificarse selectivamente con proteína A, haciendo uso de la diferencia intrínseca en las propiedades de unión de los anticuerpos de ratón y rata usados contra la proteína A: la IgG2b de rata no se une a la proteína A, mientras que la IgG2a de ratón sí.

En el documento US 8.586.713 se ha descrito otra estrategia para aislar anticuerpos biespecíficos basados en la unión diferencial a la proteína A. En este método, la región Fc de una de las cadenas pesadas está diseñada para tener una afinidad reducida por la proteína A, permitiendo el aislamiento del anticuerpo biespecífico mediante unión diferencial de las regiones IgG a la proteína A. Las mutaciones en las regiones Fc, sin embargo, pueden afectar a las funciones efectoras mediadas por Fc, tales como ADCC y CDC, o la semivida *in vivo* de los anticuerpos.

Adicionalmente, se han descrito varias resinas que se unen específicamente a las cadenas ligeras Kappa, tales como Proteína L HiTrap (GE Healthcare), Capto L (GE Healthcare), KappaSelect (GE Healthcare) y CaptureSelect KappaXL (ThermoFisher).

Se ha descrito un método en el que anticuerpos monoclonales biespecíficos compuestos por una única cadena pesada

y dos cadenas ligeras (LC) diferentes, una que contiene un dominio constante Kappa y la otra un dominio constante Lambda, se purificaron usando resinas específicas de cadena ligera (documento WO2013/088259 A2, Novimmune). Este método está restringido a anticuerpos biespecíficos que contienen diferentes especies de LC y pares LC-HC específicos. También se ha descrito un método para purificar anticuerpos biespecíficos basados en mutaciones del dominio CH1 (documento WO2013/136186 A2 Novimmune). Otra divulgación describe inmunoglobulinas de origen no natural en donde un anticuerpo de dominio basado en cadena ligera (dAb) tiene una mutación de S12P que elimina la unión a la proteína L y también previene la agregación de la cadena ligera (documento WO2008/052933).

Todavía existe una necesidad de métodos para purificar proteínas de unión heterodiméricas, tales como anticuerpos biespecíficos y multiespecíficos. Es un objeto de la presente invención proporcionar métodos para purificar proteínas de unión heterodiméricas tales como anticuerpos biespecíficos y multiespecíficos que contienen dos o más cadenas ligeras Kappa usando resinas que se unen a cadenas ligeras Kappa, combinados con mutaciones que previenen o reducen la unión de una o más de las cadenas ligeras kappa a las resinas. Otro objeto es proporcionar métodos para separar anticuerpos biespecíficos de los homodímeros a partir de los cuales se forman los anticuerpos biespecíficos heterodiméricos.

Sumario de la invención

La invención es como se establece en las reivindicaciones.

La información técnica que se establece a continuación puede, en algunos aspectos, ir más allá de la definición de la invención, que se define únicamente por las reivindicaciones adjuntas. La información técnica adicional se proporciona para ubicar la invención real en un contexto técnico más amplio e ilustrar posibles desarrollos técnicos relacionados. Dicha información técnica adicional que no esté dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas, que no forma parte de la invención. T

En un aspecto, la divulgación se refiere a un anticuerpo biespecífico o multiespecífico en donde dos cadenas ligeras difieren en al menos un aminoácido, diferencia que da como resultado una capacidad mejorada para aislar rápida y eficazmente la proteína heterodimérica biespecífica de los homodímeros, dado que la diferencia da como resultado una capacidad diferencial de las cadenas ligeras para unirse a un reactivo de afinidad diseñado específicamente para unirse a cadenas ligeras, tales como los reactivos de afinidad Proteína L, CaptureSelect KappaXL y KappaSelect.

Por consiguiente, en un aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo biespecífico que comprende un primer par de cadena ligera/cadena pesada que comprende una primera región VL y una primera región VH que tiene una primera especificidad de unión y que comprende una primera región constante de cadena ligera kappa y una primera región constante de cadena pesada; y un segundo par de cadena ligera/cadena pesada que comprende una segunda región VL y una segunda región VH que tiene una segunda especificidad de unión y que comprende una segunda región constante de cadena ligera kappa y una segunda región constante de cadena pesada en donde la primera y segunda cadenas ligeras son cadenas ligeras kappa humanas o humanizadas y dicha primera cadena ligera kappa comprende una sustitución de aminoácidos seleccionada entre V110D, V110R, V110E, V110H, V110K, V110N, V110P, V110Q, V110W o E143D cuando se utiliza el sistema de numeración de EU.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para producir un producto de anticuerpo biespecífico que comprende:

- a. proporcionar un primer anticuerpo que tiene una primera especificidad de unión, comprendiendo dicho primer anticuerpo dos pares de cadena ligera/cadena pesada, en donde cada cadena ligera es una cadena ligera kappa humana o humanizada que comprende una modificación en donde dicha modificación es la sustitución de aminoácidos S12P cuando se usa el sistema de numeración IMGT que reduce o elimina la unión de la cadena ligera a la Proteína L;
- b. proporcionar un segundo anticuerpo que tiene una segunda especificidad de unión, comprendiendo dicho segundo anticuerpo dos pares de cadena ligera/cadena pesada, en donde cada cadena ligera es una cadena ligera kappa humana o humanizada que no está modificada con respecto a la unión a la Proteína L;
- c. incubar dichos primer y segundo anticuerpos en condiciones que permitan la generación de un anticuerpo biespecífico, cuyo anticuerpo biespecífico comprende:
 - un primer par de cadena ligera/cadena pesada de dicho primer anticuerpo que tiene una primera especificidad de unión y que tiene dicha modificación para reducir o eliminar la unión de la cadena ligera a la Proteína L;
 - y que comprende un segundo par de cadena ligera/cadena pesada de dicho segundo anticuerpo que tiene una segunda especificidad de unión en donde la cadena ligera es una cadena ligera kappa humana o humanizada que no está modificada con respecto a la unión a la Proteína L;
- d. aislar el anticuerpo biespecífico basándose en la capacidad del anticuerpo biespecífico para unirse a la proteína L.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para aislar un anticuerpo biespecífico, que comprende aislar de una mezcla de anticuerpos un anticuerpo biespecífico que tiene cadenas ligeras kappa humanas o humanizadas modificadas diferencialmente que comprenden sustituciones de aminoácidos de S12P cuando se utiliza

el sistema de numeración IMGT, en donde la modificación da como resultado un anticuerpo biespecífico con cadenas ligeras heterodiméricas cuyos monómeros tienen una afinidad diferencial por la Proteína L y el anticuerpo biespecífico se aísla de la mezcla en función de su afinidad por la Proteína L.

5 Breve descripción de las figuras

Figura 1: Alineación de secuencia de los dominios kappa de cadena ligera CL. (alo) indica variaciones alotípicas; CONSENSO + indica restos conservados presentes en todas las especies con reactividad cruzada; CONSENSO - indica restos de "CONSENSO +" que están presentes en una de las especies que no tienen reactividad cruzada (y lambda de CL humana); PISA (INTERFAZ) indica restos (+) que se encuentran en las interfaces CL-VL y CL-CH1 con <50 % de superficie expuesta en la estructura PDB 1HZH según lo determinado por la herramienta PDBePISA (<http://pdbe.org/pisa/>) (Krissinel, E. y Henrick, K.; J Mol Biol (372):774-97, 2007); Los restos seleccionados (*) se mutaron al equivalente de ratón. La convención de numeración de EU se utiliza para anotar los restos de aminoácidos (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Doctor en medicina. (1991)).

Figura 2: Alineación de secuencia de dominios VL de cadena ligera kappa. Las estructuras de PDB 1HEZ y 1MHH se analizaron utilizando la herramienta PDBePISA (<http://pdbe.org/pisa/>) (Krissinel, E. y Henrick, K.; J Mol Biol (372):774-97, 2007). Los restos identificados como en la interfaz con la proteína L en todos los modelos están marcados (+). Los restos seleccionados (marcados *) se mutaron con respecto al resto equivalente encontrado en las secuencias del subtipo V-II kappa (P01617) o del subtipo Lambda V-1 (P01699). La numeración IMGT se utiliza para anotar restos de aminoácidos (Lefranc, M.-P. *et al.*, Dev. Comp. Immunol., 2003, 27, 55-77).

Figura 3: Purificaciones KappaSelect de ejemplo de variantes de IgG1-2F8-F405L modificadas utilizando proteína purificada (A) IgG1-2F8-F405L o sobrenadantes de cultivos celulares que contienen (B) IgG1-2F8-F405L-mmF135L, (C) IgG1-2F8-F405L-V110D, (D) IgG1-2F8-F405L-E143D y (E) IgG1-2F8-F405L-E165D. Se controlaron la absorción a 280 nm (línea continua) y el pH (línea gris discontinua). Las purificaciones del sobrenadante de cultivos celulares muestran una elevada absorción durante la carga de la columna del material no unido en el flujo. Las variantes de IgG1-2F8-F405L unidas específicamente se eluyeron a pH 3,0 y pH 2,0 y se detectaron mediante picos en la absorción a 280 nm. (F) Análisis de fracciones de flujo continuo de purificaciones KappaSelect de variantes de IgG1-2F8 modificadas mediante SDS-PAGE. Los geles SDS-PAGE no reductores muestran una banda de variantes de IgG1 intactas en el flujo de IgG1-2F8-F405L-mmF135L (carril 1) e IgG1-2F8-F405L-V110D (carril 2), pero no las otras variantes IgG1-2F8-F405L (carriles 3-10). Las otras bandas principales se asignan como fragmentos de anticuerpos.

Figura 4: Separaciones CaptureSelect KappaXL ilustrativas de variantes de IgG1-7D8-K409R modificadas de sobrenadantes de cultivos celulares que contienen (A) IgG1-7D8-K409R, (B) IgG1-7D8-K409R-V110R, (C) IgG1-7D8-K409R-V110K, (D) IgG1-7D8-K409R-V110D, (E) IgG1-7D8-K409R-V110E, (F) IgG1-7D8-K409R-V110T producidas. Se controlaron la absorción a 280 nm (línea continua) y el pH (línea gris discontinua). Todas las purificaciones muestran una absorción elevada durante la carga de la columna del material no unido de los sobrenadantes del cultivo celular en el flujo continuo. Las variantes de IgG1-7D8-K409R unidas específicamente se eluyeron a pH 3,5 y se detectaron mediante picos en la absorción a 280 nm. Los picos a 280 nm durante el lavado con pH 5,0 son indicativos de material menos unido, mientras que los picos a 280 nm durante el lavado con guanidina-HCl a aproximadamente 30 ml son causados por una elución incompleta de anticuerpos durante las fases de lavado y elución.

Figura 5: Análisis de fracciones de separaciones CaptureSelect KappaXL de variantes IgG1-7D8-K409R modificadas mediante interferometría de biocapa y CE-SDS. (A) La concentración de variantes de IgG1-7D8-K409R en muestras de carga, muestras de flujo continuo agrupadas y muestras de la fracción eluida agrupadas se infirieron a partir de mediciones de interferometría de biocapa. Los datos de las 20 variantes IgG1-7D8-K409R, con un aminoácido diferente en la posición 110 (convención de numeración de EU) de la cadena ligera kappa, se agrupan y marcan utilizando el código de aminoácido único para el aminoácido en esta posición. Las concentraciones de proteína medidas en el flujo son más bajas que en las muestras de carga para las variantes que no muestran unión detectable a la resina como resultado de la dilución de las muestras de flujo durante los experimentos de purificación. (B) Análisis de fracciones de separaciones CaptureSelect KappaXL de variantes IgG1-7D8-K409R modificadas utilizando CE-SDS. Electroferogramas CE-SDS no reductores de ejemplo que han sido calibrados de acuerdo con un patrón de peso molecular, muestran una banda de variantes de IgG1 intactas con un peso molecular de aproximadamente 150 kDa en las muestras de carga de IgG1-7D8-K409R, IgG1-7D8-K409R-V110D, IgG1-7D8-K409R-V110E, IgG1-7D8-K409R-V110K, IgG1-7D8-K409R-V110R y IgG1-7D8-K409R-V110T. Se pueden detectar variantes de IgG1 intactas en el flujo continuo y/o en la fracción eluida dependiendo de la unión relativa de las variantes de IgG1-7D8-K409R a la resina CaptureSelect KappaXL. Las otras bandas principales de pesos moleculares más bajos se asignan como fragmentos de anticuerpos, picos de calibración del sistema u otro material de los experimentos de producción transitorios.

Figura 6: Purificaciones HiTrap Proteína L de variantes IgG-2F8-F405L purificadas. Cromatogramas que muestran la absorción a 280 nm (línea continua) y el perfil de pH (línea gris discontinua) durante las separaciones de (A) IgG1-2F8-F405L, (B) IgG1-2F8-F405L-S9L y (C) IgG1-2F8-F405L-S12P.

Figura 7: (A) Separación CaptureSelect KappaXL ilustrativa del producto del intercambio de brazo fab controlado

asimétrico de IgG1-2F8-F405L-V110D × IgG1-7D8-K409R. Los cromatogramas muestran la absorción a 280 nm (línea continua) y el perfil de pH (línea gris discontinua) durante la purificación. (B) Cuantificación del contenido de anticuerpos biespecíficos mediante cromatografía analítica de interacción hidrofóbica. Superposición de perfiles HIC de anticuerpos parentales IgG1-2F8-F405L-V110D e IgG1-7D8-K409R (líneas punteadas y discontinuas grises, respectivamente) y las soluciones de cromatografía combinadas (línea continua negra) de la muestra de carga y (C) muestra eluida tras la purificación CaptureSelect KappaXL. (D) Cuantificación ilustrativa del contenido de monómero de anticuerpo utilizando HP-SEC. El cromatograma muestra la señal detectada a 280 nm. Los picos asignados están indicados con triángulos. (E) Electroferogramas CE-SDS de ejemplo de la muestra de carga y la muestra del producto final eluido (EP) después de la purificación CaptureSelect KappaXL.

Figura 8: (A) Separación ilustrativa HiTrap Proteína L del producto del intercambio de brazo Fab controlado asimétrico de IgG1-2F8-F405L-S12P × IgG1-1014-169-K409R. Los cromatogramas muestran la absorción a 280 nm (línea continua) y el perfil de pH (línea gris discontinua) durante la purificación. Caracterización ilustrativa de la cromatografía de intercambio catiónico (CIE) de muestras de carga y de producto final de purificaciones de anticuerpos biespecíficos. Superposición de perfiles CIE de anticuerpos parentales IgG1-2F8-F405L-S12P e IgG1-1014-169-K409R (líneas punteadas y discontinuas grises, respectivamente) y el material de carga o el producto final (C) (línea continua negra). (D) Cuantificación ilustrativa del contenido de monómero de anticuerpo utilizando HP-SEC. El cromatograma muestra la señal detectada a 280 nm. Los picos asignados están indicados con triángulos. (E) Electroferogramas CE-SDS de ejemplo de la muestra de carga y la muestra del producto final eluido (EP) después de la purificación de Proteína L.

Figura 9: Unión a células que expresan CD20 o EGFR recombinante mediante anticuerpos parentales y biespecíficos que contienen las mutaciones V110D o S12P. Se usaron series de concentraciones de los anticuerpos parentales monoespecíficos bivalentes (A, C) o anticuerpos biespecíficos monovalentes (B, D) indicados para probar su capacidad para unirse a CD20 expresado en células de Ramos (A, B) usando citometría de flujo o EGFR recombinante (C, D) por ELISA.

Figura 10 Muerte celular mediada por CDC y ADCC de células que expresan CD20 o EGFR mediante anticuerpos parentales y biespecíficos que contienen las mutaciones V110D o S12P. Serie de concentraciones de los anticuerpos parentales monoespecíficos bivalentes indicados (A, C, E) o anticuerpos biespecíficos monovalentes (B, D, F) se utilizaron para probar su capacidad para mediar la CDC de las células Daudi (A, B), la ADCC de las células Daudi (C, D) o la ADCC de las células A431 (E, F).

Figura 11: Concentración total de anticuerpos a lo largo del tiempo (A, B) y tasa de aclaramiento plasmático (C) de anticuerpos parentales y biespecíficos que contienen la mutación V110D (A) o S12P (B). A tres grupos de ratones (3 ratones por grupo) se les inyectaron los anticuerpos indicados (100 µg/ratones). Se muestran los valores medios de dos experimentos ELISA.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

El término "inmunoglobulina" se refiere a una clase de glicoproteínas estructuralmente relacionadas que consisten en dos pares de cadenas polipeptídicas, un par de cadenas ligeras (LC) y un par de cadenas pesadas (HC), las cuatro interconectadas por enlaces disulfuro. La estructura de las inmunoglobulinas ha sido bien caracterizada. Véase, por ejemplo, Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Brevemente, cada cadena pesada comprende de forma típica una región variable de la cadena pesada (abreviada en el presente documento como VH) y una región constante de la cadena pesada (CH). La región constante de la cadena pesada está compuesta por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Las cadenas pesadas están interconectadas mediante enlaces disulfuro en la llamada "región bisagra". Cada cadena ligera comprende de forma típica una región variable de la cadena ligera (abreviada en el presente documento como VL) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera normalmente está compuesta por un dominio, CL. La CL puede ser de isotipo κ (kappa) o λ (lambda).

A menos que se indique lo contrario, la numeración de los restos de aminoácidos en la región constante se realiza según el índice EU descrito en Kabat. *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Doctor en medicina. (1991). Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad (o regiones hipervariables, que pueden ser hipervariables en secuencia y/o en forma de bucles definidos estructuralmente), también denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones estructurales (FR). Cada VH y VL se compone de forma típica de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (véase también Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196, 901 917 (1987)).

Cuando se usa en el presente documento, la expresión "brazo Fab" se refiere a un par de cadena pesada-cadena ligera de un anticuerpo.

Cuando se usan en el presente documento, las expresiones "región Fc" y "dominio Fc" se usan indistintamente y se refieren a una región de anticuerpo que comprende al menos la región bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3 (ver, por ejemplo, Kabat EA, en el Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., n.º de publicación NIH 91-3242, Edn. 5ª edición 662, 680, 689 (1991)). La región Fc puede generarse mediante digestión de un anticuerpo con papaína, donde la región Fc es el fragmento obtenido de esta manera, que incluye las dos regiones CH2-CH3 de una inmunoglobulina y una región bisagra. El dominio constante de la cadena pesada de un anticuerpo define el isotipo de anticuerpo, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgE. El dominio Fc media las funciones efectoras de los anticuerpos con los receptores de la superficie celular denominados receptores de Fc y las proteínas del sistema del complemento.

La expresión "región CH2" o "dominio CH2" se usa indistintamente y, como se usa en el presente documento, se pretende hacer referencia a la región CH2 de una inmunoglobulina. De este modo, por ejemplo, la región CH2 de un anticuerpo de IgG1 humana corresponde a los aminoácidos 228-340 según el sistema de numeración de la UE. Sin embargo, la región CH2 también puede ser cualquiera de los otros isotipos de anticuerpos descritos en el presente documento.

La expresión "región CH3" o "dominio CH3" se usa indistintamente y, como se usa en el presente documento, se pretende hacer referencia a la región CH3 de una inmunoglobulina. De este modo, por ejemplo, la región CH3 de un anticuerpo de IgG1 humana corresponde a los aminoácidos 341-447 según el sistema de numeración de la UE. Sin embargo, la región CH3 también puede ser cualquiera de los otros isotipos de anticuerpos descritos en el presente documento.

El término "anticuerpo" (Ab, por sus siglas en inglés) en el contexto de la presente divulgación se refiere a una molécula de inmunoglobulina, un fragmento de una molécula de inmunoglobulina o un derivado de cualquiera de los mismos, que tiene la capacidad de unirse específicamente a un antígeno en condiciones fisiológicas normales con una semivida de períodos de tiempo significativos, tal como al menos aproximadamente 30 minutos, al menos aproximadamente 45 min, al menos aproximadamente una hora (h), al menos aproximadamente dos horas, al menos aproximadamente cuatro horas, al menos aproximadamente ocho horas, al menos aproximadamente 12 horas (h), aproximadamente 24 horas o más, aproximadamente 48 horas o más, aproximadamente tres, cuatro, cinco, seis, siete o más días, etc., o cualquier otro período relevante funcionalmente definido (como un tiempo suficiente para inducir, estimular, mejorar y/o modular una respuesta fisiológica asociada con la unión del anticuerpo al antígeno y/o tiempo suficiente para que el anticuerpo reclute una actividad efectora). Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de la molécula de inmunoglobulina contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos (Ab) pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del hospedador, incluyendo varias células del sistema inmunológico (tales como las células efectoras) y componentes del sistema del complemento, tal como C1q, el primer componente de la ruta clásica de activación del complemento. Un anticuerpo también puede ser un anticuerpo biespecífico, diacuerpo o molécula similar.

La expresión "anticuerpo biespecífico" se refiere a un anticuerpo que tiene especificidades por al menos dos epítopos diferentes, normalmente epítopos que no se superponen o un anticuerpo que contiene dos sitios de unión a antígeno distintos. Un anticuerpo biespecífico puede describirse como una proteína heterodimérica, mientras que un anticuerpo monoespecífico puede describirse como una proteína homodimérica. Como se ha indicado anteriormente, el término anticuerpo en el presente documento, salvo que se indique lo contrario o que el contexto lo contradiga claramente, incluye fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente al antígeno. Dichos fragmentos se pueden proporcionar por cualquier técnica conocida, tales como escisión enzimática, síntesis de péptidos y técnicas de expresión recombinante. Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo se puede realizar mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa, por ejemplo fragmentos Fab o F(ab')₂. También debe entenderse que el término anticuerpo, salvo que se especifique otra cosa, también incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (mAb), polipéptidos similares a anticuerpos, tales como anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados. Un anticuerpo generado puede poseer cualquier isotipo.

La expresión "anticuerpo multiespecífico" se refiere a un anticuerpo que tiene especificidades por más de dos epítopos diferentes, normalmente epítopos que no se superponen o un anticuerpo que contiene más de dos sitios distintos de unión a antígeno. Como se ha indicado anteriormente, el término anticuerpo en el presente documento, salvo que se indique lo contrario o que el contexto lo contradiga claramente, incluye fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente al antígeno. Dichos fragmentos se pueden proporcionar por cualquier técnica conocida, tales como escisión enzimática, síntesis de péptidos y técnicas de expresión recombinante. Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo se puede realizar mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa, por ejemplo fragmentos Fab o F(ab')₂. También debe entenderse que el término anticuerpo, salvo que se especifique otra cosa, también incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (mAb), polipéptidos similares a anticuerpos, tales como anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados. Un anticuerpo generado puede poseer cualquier isotipo.

La expresión "anticuerpo de longitud completa", cuando se utiliza en la presente memoria, se refiere a un anticuerpo que contiene todos los dominios constantes y variables de las cadenas pesada y ligera que normalmente se encuentran en un anticuerpo de ese isotipo.

Como se utiliza en el presente documento, "isotipo" se refiere a la clase de inmunoglobulina (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE o IgM) que está codificada por los genes de la región constante de la cadena pesada.

- 5 La expresión "anticuerpo humano", como se utiliza en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas mediante mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*). Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano",
10 como se utiliza en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que secuencias CDR deriven de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, han sido injertados en secuencias estructurales humanas.

- 15 El término "epítipo" significa una proteína determinante capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. Los epítipos habitualmente consisten en agrupaciones de moléculas de superficie tales como cadenas laterales de aminoácidos o de azúcares y habitualmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítipos conformacionales y no conformacionales se distinguen porque la unión al primero pero no al segundo se pierde en presencia de disolventes desnaturizantes. El epítipo puede comprender restos de aminoácidos directamente implicados en la unión y otros restos de aminoácidos, que no están
20 directamente implicados en la unión, tales como restos de aminoácidos que se bloquean eficazmente mediante el péptido de unión a antígeno (en otras palabras, el resto de aminoácido está dentro de la huella del péptido de unión a antígeno).

- 25 Como se utiliza en el presente documento, el término "unión" la expresión "se une específicamente" en el contexto de la unión de un anticuerpo a un antígeno predeterminado normalmente es una unión con una afinidad correspondiente a una K_D de aproximadamente 10^{-6} M o menos, por ejemplo 10^{-7} M o menos, tal como aproximadamente 10^{-8} M o menos, tal como aproximadamente 10^{-9} M o menos, aproximadamente 10^{-10} M o menos o aproximadamente 10^{-11} M o incluso menos cuando se determina mediante, por ejemplo, tecnología BioLayer Interferometry (BLI) en un instrumento Octet HTX que usa el anticuerpo como el ligando y el antígeno como el analito, y en donde el anticuerpo
30 se une al antígeno predeterminado con una afinidad correspondiente a una K_D que es al menos diez veces menor, tal como al menos 100 veces menor, por ejemplo al menos 1.000 veces menor, tal como al menos 10.000 veces menor, por ejemplo, al menos 100.000 veces menor que su afinidad para unirse a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) distinto del antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado. La cantidad con la que la afinidad es menor depende de la K_D del anticuerpo, de modo que cuando la K_D del anticuerpo es muy baja (es decir, el anticuerpo es muy específico), la cantidad con la que la afinidad por el antígeno es menor que la afinidad por un antígeno no específico puede ser de al menos 10.000 veces. El término " K_D " (M), como se utiliza en el presente documento, se refiere a la constante de disociación en el equilibrio de una interacción particular anticuerpo-antígeno.

- 40 Cuando se utiliza en el presente documento, la expresión "interacción heterodimérica entre la primera y segunda regiones CH3" se refiere a la interacción entre la primera región CH3 y la segunda región CH3 en una proteína heterodimérica primera-CH3/segunda-CH3.

- 45 Cuando se usa en el presente documento, la expresión "interacciones homodiméricas de la primera y segunda regiones CH3" se refiere a la interacción entre una primera región CH3 y otra primera región CH3 en una proteína homodimérica primera-CH3/primera-CH3 y la interacción entre una segunda región CH3 y otra segunda región CH3 en una proteína homodimérica segundo-CH3/segundo-CH3.

- 50 Un "anticuerpo aislado", como se utiliza en el presente documento, denota que el material ha sido eliminado de su entorno original (por ejemplo, el entorno natural si se produce de forma natural o la célula huésped si se expresa de forma recombinante). También es ventajoso que los anticuerpos estén en forma purificada. El término "purificado" no requiere pureza absoluta; más bien, se pretende como una definición relativa, indicando un aumento de la concentración de anticuerpos con respecto a la concentración de contaminantes en una composición en comparación con el material de partida.

- 55 La expresión "célula huésped", como se utiliza en el presente documento, pretende referirse a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión, por ejemplo un vector de expresión que codifica un anticuerpo de la invención. Las células huésped recombinantes incluyen, por ejemplo, transfectomas, tales como células CHO, células HEK293, células NS/O y células linfocíticas.

- 60 Cuando se usa en el presente documento, el término "coexpresión" de dos o más construcciones de ácido nucleico, se refiere a la expresión de las dos construcciones en una única célula huésped.

- 65 La expresión "proteína de células tumorales", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una proteína ubicada en la superficie celular de una célula tumoral.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "célula efectora" se refiere a una célula inmunitaria que

participa en la fase efectora de una respuesta inmunitaria, a diferencia de las fases cognitiva y de activación de una respuesta inmunitaria. Las células inmunitarias de ejemplo incluyen una célula de origen mieloide o linfoide, por ejemplo, linfocitos (tales como linfocitos B y linfocitos T, incluidos los linfocitos T citolíticos (LTC)), células asesinas, linfocitos citolíticos naturales, macrófagos, monocitos, eosinófilos, células polimorfonucleares, tales como neutrófilos, granulocitos, mastocitos y basófilos. Algunas células efectoras expresan receptores Fc específicos y llevan a cabo funciones inmunitarias específicas. En algunas realizaciones, una célula efectora es capaz de inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), tal como una célula citolítica natural. En algunas realizaciones, una célula efectora puede fagocitar un antígeno diana o una célula diana.

- 10 La expresión "condiciones reductoras" o "entorno reductor" se refiere a condiciones suficientes para permitir la reducción de los enlaces disulfuro entre cadenas en la región bisagra de un anticuerpo.

La expresión "reactivo de afinidad" cuando se usa en el presente documento se refiere a una resina que contiene un ligando que está inmovilizado en una matriz y se une específicamente a agrupaciones superficiales de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y generalmente tiene características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los reactivos de afinidad son herramientas en cromatografía de afinidad, donde la purificación es posible gracias a la interacción específica entre el ligando y el producto.

- 20 El término "Proteína L", cuando se usa en el presente documento, se refiere a la proteína L recombinante que está inmovilizada sobre una matriz para formar un ligando de afinidad que tiene afinidad por un subconjunto del dominio variable de las cadenas ligeras kappa de inmunoglobulina. Por ejemplo, los reactivos de afinidad de proteína L se pueden comercializar como HiTrap™ Proteína L y Capto™ L de GE Healthcare.

- 25 El término "KappaSelect" cuando se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo recombinante de cadena sencilla derivado de camélido de 13 kDa que se inmoviliza en una matriz para formar un ligando de afinidad que tiene afinidad por el dominio constante de las cadenas ligeras kappa de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, los reactivos de afinidad KappaSelect se pueden comercializar como KappaSelect™ por GE Healthcare.

- 30 El término "KappaXL" cuando se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo recombinante de cadena sencilla derivado de camélido de 13 kDa que se inmoviliza en una matriz para formar un ligando de afinidad que tiene afinidad por el dominio constante de las cadenas ligeras kappa de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, los reactivos de afinidad KappaXL se pueden comercializar como CaptureSelect™ KappaXL de Thermo Fisher.

- 35 La referencia a las posiciones de los aminoácidos en la presente invención es, a menos que el contexto lo contradiga, según el índice EU descrito en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Doctor en medicina. (1991).

En una realización, la divulgación se refiere a un anticuerpo biespecífico o multiespecífico que comprende un primer par de cadena ligera/cadena pesada que comprende una primera región VL y una primera región VH que tiene una primera especificidad de unión y que comprende una primera región constante de cadena ligera y una primera región constante de cadena pesada; y un segundo par de cadena ligera/cadena pesada que comprende una segunda región VL y una segunda región VH que tiene una segunda especificidad de unión y que comprende una segunda región constante de cadena ligera y una segunda región constante de cadena pesada, en donde la primera cadena ligera comprende una modificación que reduce o elimina la unión de la primera cadena ligera a un reactivo de afinidad. Por la presente, la presente divulgación permite la purificación de la especie de anticuerpo biespecífico que contiene solo una cadena ligera no modificada a partir de anticuerpos monoespecíficos. Esto se puede lograr expresando dos anticuerpos parentales diferentes en dos sistemas diferentes en donde un anticuerpo parental se modifica en las dos cadenas ligeras para reducir o eliminar la afinidad por un reactivo de afinidad y el otro anticuerpo no se modifica con respecto a la afinidad por el mismo reactivo de afinidad. Cuando se fabrica un anticuerpo biespecífico como se describe en el documento WO 11/131746, el anticuerpo biespecífico se puede purificar a partir de la mezcla de tres anticuerpos: un anticuerpo monoespecífico homodimérico que porta dos cadenas ligeras no modificadas, un anticuerpo monoespecífico homodimérico que porta dos cadenas ligeras modificadas y un anticuerpo biespecífico heterodimérico que porta una cadena ligera modificada y una cadena ligera no modificada. Las propiedades diferenciales de las tres moléculas diferentes se pueden aprovechar para purificar eficazmente el anticuerpo biespecífico de los monoespecíficos. Como alternativa, cuando se fabrica un anticuerpo biespecífico como se describe en el documento WO 11/131746, la reacción de intercambio de brazo Fab se puede realizar con un exceso molar del anticuerpo con la cadena ligera modificada para limitar los niveles del anticuerpo monoespecífico homodimérico que porta dos cadenas ligeras no modificadas. Las propiedades diferenciales del anticuerpo biespecífico con una cadena ligera modificada y el anticuerpo monoespecífico homodimérico que porta dos cadenas ligeras modificadas se pueden utilizar para purificar el anticuerpo biespecífico del anticuerpo monoespecífico.

En otra realización, los dos anticuerpos monoespecíficos parentales se modifican en las cadenas ligeras pero en diferentes posiciones para reducir o eliminar la afinidad por diferentes reactivos de afinidad.

Las modificaciones de las cadenas ligeras descritas en el presente documento se pueden combinar con otras

mutaciones o modificaciones de una porción de un anticuerpo, tal como el dominio Fc. En una realización particular, los homodímeros se mutan en la región CH3 de la cadena pesada para permitir el intercambio de brazos Fab como se describe en el documento WO 11/131746. En una realización preferida, un homodímero tiene una sustitución F405L y el otro homodímero tiene una mutación K409R en la región CH3.

5 En un aspecto principal, la invención se refiere a un anticuerpo biespecífico o multiespecífico que comprende un primer par de cadena ligera/cadena pesada que comprende una primera región VL y una primera región VH que tiene una primera especificidad de unión y que comprende una primera región constante de cadena ligera kappa y una primera región constante de cadena pesada; y un segundo par de cadena ligera/cadena pesada que comprende una segunda
10 región VL y una segunda región VH que tiene una segunda especificidad de unión y que comprende una segunda región constante de cadena ligera kappa y una segunda región constante de cadena pesada, en donde la primera y la segunda cadena ligera son cadenas ligeras kappa humanas o humanizadas y dicha primera cadena ligera kappa comprende una sustitución de aminoácidos seleccionada entre V110D, V110R, V110E, V110H, V110K, V110N, V110P, V110Q, V110W o E143D cuando se utiliza el sistema de numeración de EU. Tal mutación reduce la afinidad
15 o la unión a un reactivo de afinidad.

En una realización de la invención, el reactivo de afinidad es la proteína L que tiene afinidad por las cadenas ligeras kappa. HiTrap™ Protein L y Capto™ L se pueden obtener de GE Healthcare.

20 En otra realización, el reactivo de afinidad es CaptureSelect™ KappaXL que tiene afinidad por las cadenas ligeras kappa. CaptureSelect™ KappaXL se puede obtener de ThermoFisher.

En otra realización, el reactivo de afinidad es KappaSelect™ que tiene afinidad por las cadenas ligeras kappa. KappaSelect™ puede obtenerse de GE Healthcare.

25 El enfoque para generar anticuerpos biespecíficos descrito en el presente documento supera las desventajas de otros métodos, ya que no implica mutagénesis adicional de la región Fc, sino que se basa en modificaciones de la cadena ligera que alteran su capacidad de unión a un reactivo de afinidad específica de la cadena ligera.

30 En una realización, la primera región constante de cadena ligera comprende la sustitución de aminoácidos V110D, V110R, V110E, V110H, V110K, V110N, V110P, V110Q o V110W, preferentemente, V110D o V110R, siendo V110D el más preferido. Por la presente se proporciona una variante que ha reducido o eliminado la unión a las resinas CaptureSelect-KappaXL y/o KappaSelect.

35 En otra realización, la primera región constante de cadena ligera comprende la sustitución de aminoácido E143D. Por la presente se proporciona una variante que tiene una unión reducida a la resina KappaSelect.

En otro aspecto de la divulgación, la primera región constante de cadena ligera comprende la sustitución de aminoácidos S12P. En la presente se describe una variante que ha reducido o eliminado la unión a la resina de Proteína L.

40 En otra realización, la primera cadena ligera comprende dos o más de las sustituciones seleccionadas entre V110D, E143D y S12P. Por la presente se proporcionan variantes que han eliminado o reducido la unión a más de un tipo de resina, tal como Protein L y KappaSelect.

45 En otra realización, el segundo par de cadena ligera-cadena pesada comprende una mutación en una posición diferente a la de la primera cadena ligera, cuya mutación reduce o elimina la unión a un reactivo de afinidad diferente. Éste puede ser cualquier reactivo de afinidad. En una realización, es un reactivo de afinidad específica de cadena ligera. En otra realización, es un reactivo de afinidad específica de cadena pesada.

50 En una realización de la invención, la segunda cadena ligera del anticuerpo biespecífico o multiespecífico comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas entre V110D, E143D y S12P.

55 En otra realización de la invención, la segunda cadena ligera del anticuerpo biespecífico o multiespecífico comprende la sustitución de aminoácidos V110D, V110R, V110E, V110H, V110K, V110N, V110P, V110Q o V110W, preferentemente, V110D o V110R, siendo V110D el más preferido.

En una realización adicional, la segunda cadena ligera del anticuerpo biespecífico o multiespecífico comprende la sustitución de aminoácido E143D.

60 En una realización adicional, la segunda cadena ligera del anticuerpo biespecífico o multiespecífico de la invención comprende la sustitución de aminoácido S12P.

65 La primera y segunda cadenas ligeras del anticuerpo biespecífico o multiespecífico de la invención no están sustituidas en las mismas posiciones.

La primera y segunda cadenas ligeras de la invención son cadenas ligeras kappa.

Las cadenas ligeras kappa de la invención son cadenas ligeras kappa humanas o humanizadas. En una realización, la primera y/o segunda cadena ligera es una cadena ligera kappa humana. En otra realización, la primera y/o segunda cadena ligera kappa es una cadena ligera humanizada.

En una realización, la invención se refiere a anticuerpos biespecíficos. En otra realización, la invención se refiere a anticuerpos multiespecíficos.

En otra realización, el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo biespecífico humano y tiene afinidad por dos epítomos diferentes. Preferentemente, la afinidad por el epítopo es, independientemente, del orden micromolar, nanomolar o picomolar.

En una realización, la cadena pesada del primer anticuerpo es un isotipo IgG seleccionado entre el grupo que comprende IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4. En una realización, la cadena pesada del segundo anticuerpo es un isotipo de IgG seleccionado entre el grupo que comprende IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4. Preferentemente, el isotipo del primer y segundo anticuerpo es el mismo. En una realización, el isotipo del primer y segundo anticuerpo es IgG1. En otra realización, el isotipo del primer y segundo anticuerpo es IgG2. En otra realización, el isotipo del primer y segundo anticuerpo es IgG3. En otra realización, el isotipo del primer y segundo anticuerpo es IgG4.

En una realización, la proteína de unión a antígeno no es inmunogénica o sustancialmente no inmunogénica en un ser humano.

Además, la divulgación se refiere a un método para producir un producto de anticuerpo biespecífico que comprende

- a. proporcionar un primer anticuerpo que tiene una primera especificidad de unión, comprendiendo dicho primer anticuerpo dos pares de cadena ligera/cadena pesada, en donde cada cadena ligera comprende una modificación que reduce o elimina la unión de la cadena ligera a un reactivo de afinidad seleccionado entre el grupo que consiste en Proteína L, KappaXL y KappaSelect;
- b. proporcionar un segundo anticuerpo que tiene una segunda especificidad de unión, comprendiendo dicho segundo anticuerpo dos pares de cadena ligera/cadena pesada, en donde cada cadena ligera no está modificada con respecto a la unión al reactivo de afinidad seleccionado entre el grupo que consiste en Proteína L, KappaXL y KappaSelect;
- c. incubar dichos primer y segundo anticuerpos en condiciones que permitan la formación de un anticuerpo biespecífico, cuyo anticuerpo biespecífico comprende: un primer par de cadena ligera/cadena pesada de dicho primer anticuerpo que tiene una primera especificidad de unión y que ha reducido o eliminado la unión de la cadena ligera a un reactivo de afinidad seleccionado del grupo que consiste en Proteína L, KappaXL y KappaSelect; y que comprende un segundo par de cadena ligera/cadena pesada de dicho segundo anticuerpo que tiene una segunda especificidad de unión y no está modificado con respecto a la unión al reactivo de afinidad seleccionado entre el grupo que consiste en Proteína L, KappaXL y KappaSelect;
- d. aislar el anticuerpo biespecífico basándose en la capacidad del anticuerpo biespecífico para unirse al reactivo de afinidad seleccionado del grupo que consiste en Proteína L, KappaXL y KappaSelect.

El reactivo de afinidad por el cual el primer anticuerpo tiene afinidad reducida debe ser el mismo reactivo de afinidad utilizado en la etapa de aislamiento. El método puede usarse para moléculas biespecíficas o multiespecíficas que contienen al menos dos cadenas ligeras.

También se describe en el presente documento que el método puede implicar que el segundo anticuerpo comprenda una mutación o modificación que altere sus propiedades de unión a un reactivo de afinidad diferente del reactivo de afinidad seleccionado en a).

Además, se divulga que el método puede implicar que la primera y/o segunda cadena ligera del anticuerpo comprenda una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas entre V110R, V110D, V110E, V110H, V110K, V110N, V110P, V110Q o V110W, E143D y S12P y que la primera y segunda cadena ligera no se modifican en las mismas posiciones.

En una realización específica, la invención se refiere a un método para producir un producto de anticuerpo biespecífico que comprende

- a. proporcionar un primer anticuerpo que tiene una primera especificidad de unión, comprendiendo dicho primer anticuerpo dos pares de cadena ligera/cadena pesada, en donde cada cadena ligera es una cadena ligera kappa humana o humanizada que comprende una modificación en donde dicha modificación es la sustitución de aminoácidos S12P cuando se usa el sistema de numeración IMGT que reduce o elimina la unión de la cadena ligera a la Proteína L;
- b. proporcionar un segundo anticuerpo que tiene una segunda especificidad de unión, comprendiendo dicho segundo anticuerpo dos pares de cadena ligera/cadena pesada, en donde cada cadena ligera es una cadena

- c. ligera kappa humana o humanizada que no está modificada con respecto a la unión a la Proteína L;
incubar dichos primer y segundo anticuerpos en condiciones que permitan la formación de un anticuerpo biespecífico, cuyo anticuerpo biespecífico comprende:
un primer par de cadena ligera/cadena pesada de dicho primer anticuerpo que tiene una primera especificidad de unión y que tiene dicha modificación para reducir o eliminar la unión de la cadena ligera kappa humana o humanizada a la Proteína L;
y que comprende un segundo par de cadena ligera/cadena pesada de dicho segundo anticuerpo que tiene una segunda especificidad de unión en donde la cadena ligera es una cadena ligera kappa humana o humanizada que no está modificada con respecto a la unión a la Proteína L;
- d. aislar el anticuerpo biespecífico basándose en la capacidad del anticuerpo biespecífico para unirse a la proteína

En una realización, las condiciones que permiten la formación de un anticuerpo biespecífico se describen en el documento WO 11/131746. Preferentemente, estas condiciones son condiciones reductoras que permiten la reducción de los enlaces disulfuro entre cadenas en la región bisagra. En una realización, el primer y segundo anticuerpo comprenden una o más mutaciones en las regiones CH3, cuyas mutaciones son diferentes y son tales que la interacción heterodimérica entre dichas primera y segunda regiones CH3 es más fuerte que cada una de las interacciones homodiméricas de dichas primera y segunda regiones CH3. En una realización, el primer anticuerpo tiene una sustitución de aminoácido en una posición seleccionada entre el grupo que consiste en: 366, 368, 370, 399, 405, 407 y 409, y dicho segundo anticuerpo tiene una sustitución de aminoácido en una posición seleccionada entre el grupo que consiste en: 366, 368, 370, 399, 405, 407 y 409, y el primer y segundo anticuerpo no están sustituidos en las mismas posiciones. En una realización, el primer anticuerpo está sustituido en la posición 405 y el segundo anticuerpo está sustituido en la posición 409. En una realización particular, el primer anticuerpo tiene una sustitución F405L. En otra realización, el segundo anticuerpo tiene una sustitución K409R.

En una realización, el primer anticuerpo comprende una sustitución en la LC de V110D y una sustitución de la región CH3 de la cadena pesada. En una realización, la sustitución en la región CH3 está en una posición seleccionada entre el grupo que consiste en: 366, 368, 370, 399, 405, 407 y 409. Por consiguiente, en una realización, el primer anticuerpo tiene una sustitución V110D de la LC y una sustitución de la región CH3 en la posición 366. En otra realización, el primer anticuerpo tiene una sustitución V110D de la LC y una sustitución de la región CH3 en la posición 368. En otra realización, el primer anticuerpo tiene una sustitución V110D de la LC y una sustitución de la región CH3 en la posición 370. En otra realización, el primer anticuerpo tiene una sustitución V110D de la LC y una sustitución de la región CH3 en la posición 399. En otra realización, el primer anticuerpo tiene una sustitución V110D de la LC y una sustitución de la región CH3 en la posición 405. En otra realización, el primer anticuerpo tiene una sustitución V110D de la LC y una sustitución de la región CH3 en la posición 407. En otra realización, el primer anticuerpo tiene una sustitución V110D de la LC y una sustitución de la región CH3 en la posición 409. En otra realización, el primer anticuerpo tiene una sustitución V110D de la LC y una sustitución F405L de la región CH3. En otra realización, el primer anticuerpo tiene una sustitución V110D de la LC y una sustitución F405L de la región CH3 y el segundo anticuerpo comprende una sustitución K409R. En otra realización, el primer anticuerpo tiene una sustitución V110D de la LC y una sustitución K409R de la región CH3. En otra realización, el primer anticuerpo tiene una sustitución V110D de la LC y una sustitución K409R de la región CH3 y el segundo anticuerpo comprende una sustitución F405L.

También se describe en el presente documento que el primer anticuerpo tiene una sustitución S12P de la LC y una sustitución de la región CH3 en la posición 366. También se describe en el presente documento que el primer anticuerpo tiene una sustitución S12P de la LC y una sustitución de la región CH3 en la posición 368. También se describe en el presente documento que el primer anticuerpo tiene una sustitución S12P de la LC y una sustitución de la región CH3 en la posición 370. También se describe en el presente documento que el primer anticuerpo tiene una sustitución S12P de la LC y una sustitución de la región CH3 en la posición 399. También se describe en el presente documento que el primer anticuerpo tiene una sustitución S12P de la LC y una sustitución de la región CH3 en la posición 405. También se describe en el presente documento que el primer anticuerpo tiene una sustitución S12P de la LC y una sustitución de la región CH3 en la posición 407. También se describe en el presente documento que el primer anticuerpo tiene una sustitución S12P de la LC y una sustitución de la región CH3 en la posición 409. También se describe en el presente documento que el primer anticuerpo tiene una sustitución S12P de la LC y una sustitución F405L de la región CH3. También se describe en el presente documento que el primer anticuerpo tiene una sustitución S12P de la LC y una sustitución K409R de la región CH3. También se describe en el presente documento que el primer anticuerpo tiene una sustitución S12P de la LC y una sustitución K409R de la región CH3 y el segundo anticuerpo comprende una sustitución F405L. También se describe en el presente documento que el primer anticuerpo tiene una sustitución S12P de la LC y una sustitución F405L de la región CH3 y el segundo anticuerpo comprende una sustitución K409R.

En una realización, el primer anticuerpo tiene una sustitución E143D de la LC y una sustitución de la región CH3 en la posición 366. En otra realización, el primer anticuerpo tiene una sustitución E143D de la LC y una sustitución de la región CH3 en la posición 368. En otra realización, el primer anticuerpo tiene una sustitución E143D de la LC y una sustitución de la región CH3 en la posición 370. En otra realización, el primer anticuerpo tiene una sustitución E143D de la LC y una sustitución de la región CH3 en la posición 399. En otra realización, el primer anticuerpo tiene una sustitución E143D de la LC y una sustitución de la región CH3 en la posición 405. En otra realización, el primer

anticuerpo tiene una sustitución E143D de la LC y una sustitución de la región CH3 en la posición 407. En otra realización, el primer anticuerpo tiene una sustitución E143D de la LC y una sustitución de la región CH3 en la posición 409. En otra realización, el primer anticuerpo tiene una sustitución E143D de la LC y una sustitución F405L de la región CH3. En otra realización, el primer anticuerpo tiene una sustitución E143D de la LC y una sustitución K409R de la región CH3. En otra realización, el primer anticuerpo tiene una sustitución E143D de la LC y una sustitución F405L de la región CH3 y el segundo anticuerpo comprende una sustitución K409R. En otra realización, el primer anticuerpo tiene una sustitución E143D de la LC y una sustitución K409R de la región CH3 y el segundo anticuerpo comprende una sustitución F405L.

En una realización del método de la invención, el primer anticuerpo se proporciona en exceso de masa en comparación con el segundo anticuerpo. En una realización, el primer anticuerpo se proporciona en un exceso de masa de al menos 1,05 veces en comparación con el segundo anticuerpo, tal como un exceso de masa de 1,1 veces en comparación con el segundo anticuerpo, tal como al menos un exceso de masa de 1,2 veces, tal como al menos un exceso de masa de 1,3 veces, 1,4, 1,5, 1,6 o 1,7 veces.

En otro aspecto más, la divulgación se refiere a un método para aislar un anticuerpo biespecífico, que comprende aislar de una mezcla de anticuerpos un anticuerpo biespecífico o multiespecífico que tiene al menos una cadena ligera modificada diferencialmente, en donde la modificación da como resultado un anticuerpo biespecífico cuyo brazo Fab tiene una afinidad diferencial por un reactivo de afinidad diseñado para unirse a la cadena ligera de una inmunoglobulina y el anticuerpo biespecífico se aísla de la mezcla en función de su afinidad por el reactivo. En una realización, el reactivo de afinidad es la proteína L y el anticuerpo biespecífico se aísla de la mezcla en función de su afinidad por la proteína L. En otro ejemplo, el reactivo de afinidad es KappaXL y el anticuerpo biespecífico se aísla de la mezcla en función de su afinidad por KappaXL. En otro ejemplo, el reactivo de afinidad es KappaSelect y el anticuerpo biespecífico se aísla de la mezcla en función de su afinidad por KappaSelect. En un aspecto, el anticuerpo biespecífico tiene una modificación en una de las cadenas ligeras cuya modificación se selecciona entre V110D, E143D y S12P.

En otra realización principal, la invención se refiere a un método para aislar un anticuerpo biespecífico, que comprende aislar de una mezcla de anticuerpos un anticuerpo biespecífico o multiespecífico que tiene al menos una cadena ligera kappa humana o humanizada modificada diferencialmente que comprende una sustitución de aminoácidos de S12P cuando se utiliza el sistema de numeración IMGT, en donde la modificación da como resultado un anticuerpo biespecífico cuyo brazo Fab tiene una afinidad diferencial por la Proteína L y el anticuerpo biespecífico se aísla de la mezcla en función de su afinidad por la Proteína L.

Preferentemente, la cadena ligera modificada diferencialmente no es inmunogénica o sustancialmente no inmunogénica en un ser humano.

Ejemplos

Ejemplo 1: Vectores de expresión para la expresión de IgG1-2F8 humana, IgG1-7D8 humana o IgG1-1014-169 humana y variantes con una cadena ligera kappa modificada

Las regiones codificantes VH y VL de HuMab 2F8 (documento WO 02/100348), HuMab 7D8 (documento WO 04/035607) y HuMab 1014-169 (documento WO 12/143524) se clonaron en el vector de expresión pConG1f (que contiene la secuencia genómica de la región constante del alotipo IgG1m(f) humana (Lonza Biologics)) para la producción de la cadena pesada de IgG1 humana y pConKappa (que contiene la región constante de la cadena ligera kappa humana, Lonza Biologics) para la producción de la cadena ligera kappa. Como alternativa, en construcciones de seguimiento, se usaron vectores que contenían las regiones codificantes con codones completamente optimizados de la cadena pesada en el vector pcDNA3.3 (Invitrogen) o la cadena ligera kappa humana de HuMab 2F8 o HuMab 7D8 en el vector pcDNA3.3. Las secuencias de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada utilizadas fueron las siguientes:

Región constante de la cadena pesada de IgG1 humana (Número de acceso P01857)

```
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
EVTCTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
```

Región constante de la cadena ligera kappa humana (Número de acceso J00241)

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Para introducir mutaciones en las regiones CH3 de las cadenas pesadas del anticuerpo, es decir, F405L o K409R (se usa la convención de numeración de EU como se describe en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)) o en los dominios CL de las cadenas ligeras del anticuerpo, por ejemplo, la cadena ligera V110D, kit de mutagénesis dirigida al sitio Quickchange (Stratagene, La Jolla, CA) se utilizó según las recomendaciones del fabricante. Como alternativa, se sintetizaron las regiones codificantes de anticuerpos con codones optimizados *de novo* y se insertaron en vectores pcDNA3.3 separados (cadena pesada y cadena ligera).

Ejemplo 2: Producción de anticuerpo

Se produjeron anticuerpos, en condiciones sin suero, cotransfectando vectores de expresión de cadenas pesadas y ligeras relevantes en células Freestyle™ 293-F (LifeTechnologies), usando 293fectin™ (LifeTechnologies), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Como alternativa, se produjeron anticuerpos, en condiciones sin suero, cotransfectando vectores de expresión de cadenas pesadas y ligeras relevantes en células Expi293F™ (LifeTechnologies), usando ExpiFectamine™ 293 (LifeTechnologies), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los sobrenadantes del cultivo se filtraron sobre filtros sin salida de 0,2 µm antes del análisis y la purificación. Como alternativa, se produjo IgG1-2F8-F405L como se describe en Gramer *et al.*, MAbs 2013, 5: 962-973.

Ejemplo 3: Cuantificación de anticuerpos en muestras de cultivo celular o fracciones de cromatografía mediante interferometría de biocapa

La concentración de IgG de las muestras de cultivos celulares se cuantificó mediante interferometría de biocapa utilizando biosensores de proteína A con Octet QK (FortéBio). Las muestras se diluyeron 4 veces y 20 veces en diluyente de muestras (FortéBio). La tasa de unión inicial de cada muestra se midió usando un tiempo de lectura de 60 segundos y una velocidad de agitación de 200 rpm, y la concentración se dedujo mediante referencia a una curva patrón. Se usó glicina 10 mM a pH 1,0 como solución de regeneración.

Ejemplo 4: Purificación de anticuerpos a partir de sobrenadante de cultivo celular mediante cromatografía de proteína A

Los anticuerpos se purificaron mediante cromatografía de afinidad con proteína A. En pocas palabras, el sobrenadante del cultivo se cargó en columnas MabSelect SuRe de 5 ml (GE Healthcare), se lavó y eluyó con citrato de sodio-NaOH 0,02 M, pH 3. La fracción eluida se cargó en una columna HiPrep Desalting (GE Healthcare) inmediatamente después de la purificación y el anticuerpo se intercambió por NaH₂PO₄ 12,6 M, NaCl 140 mM, tampón de pH 7,4 (B. Braun o Thermo Fisher). Después del intercambio de tampón, las muestras se filtraron en esterilidad sobre filtros sin salida de 0,2 µm. La pureza se determinó mediante SDS-PAGE/CE-SDS y la concentración se midió mediante absorbancia a 280 nm. Los anticuerpos purificados se almacenaron a 2-8 °C. Como alternativa, se purificó IgG1-2F8-F405L como se describe en Gramer. *et al.*, MAbs 2013, 5: 962-973.

Ejemplo 5: Separaciones KappaSelect de variantes de IgG1-2F8-F405L modificadas utilizando proteínas purificadas o sobrenadante de cultivo celular

Se unieron en tándem cuatro columnas KappaSelect (GE Healthcare) de 1 ml. Las columnas se equilibraron previamente con solución salina tamponada con fosfato (PBS; fosfato de sodio 12,6 mM, cloruro de sodio 140 mM, pH 7,4, B. Braun o Thermo Fisher). Los sobrenadantes del cultivo celular de anticuerpos se filtraron sobre filtros sin salida de 0,2 µm y el nivel de expresión de IgG1 se cuantificó usando interferometría de biocapa como se describe en el **Ejemplo 3**. Se cargaron en las columnas KappaSelect entre 40 ml y 80 ml de sobrenadante de cultivo celular que contenía entre 10 mg y 30 mg de variantes de IgG1-2F8-F405L no purificadas. Como alternativa, se diluyeron 16 mg de IgG-2F8-F405L purificada hasta un volumen total de 80 ml con PBS (B. Braun) y se cargaron en las columnas. Las columnas se lavaron con PBS y eluyeron secuencialmente con glicina HCl 0,1 M, pH 3,0, y glicina HCl 0,1 M, pH 2,0. Las fracciones eluidas se neutralizaron con unas pocas gotas de Tris HCl 2 M, pH 9,0, se dializaron en PBS (B. Braun) usando caros Slide-A-Lyzer de corte de peso molecular de 10 kDa (ThermoFisher) del tamaño apropiado. La columna se limpió usando guanidina HCl 6 M. Las fracciones de flujo se combinaron con el lavado de PBS y se analizaron mediante SDS-PAGE, como se describe en el **Ejemplo 8**.

Ejemplo 6: Separaciones CaptureSelect KappaXL de variantes de IgG1-7D8-K409R modificadas a partir de sobrenadante de cultivo celular o soluciones de inmunoglobulina purificadas

Se empaquetó manualmente una columna que contenía aproximadamente 1 ml de resina empaquetada a partir de una suspensión homogénea de CaptureSelect KappaXL (ThermoFisher) en una columna HiT de 6,6 mm de diámetro (Omnifit), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La columna se preequilibró con solución salina tamponada con fosfato (PBS; fosfato de sodio 12,6 mM, cloruro de sodio 140 mM, pH 7,4, ThermoFisher). Los sobrenadantes del

cultivo celular de anticuerpos se filtraron sobre filtros sin salida de 0,2 µm y el nivel de expresión de IgG1 se cuantificó usando interferometría de biocapa como se describe en el **Ejemplo 3**. Se cargaron 10 ml del sobrenadante, que contenían 1-10 mg de variantes de IgG1-7D8-K409R no purificadas, en la columna CaptureSelect KappaXL. La columna se lavó secuencialmente con aproximadamente cinco volúmenes de columna de PBS y tres volúmenes de columna de citrato NaOH 0,1 M, pH 5,0. El material unido se eluyó con citrato NaOH 0,1 M, pH 3,5. Se neutralizaron fracciones de 1 ml con unas pocas gotas de Tris HCl 2 M, pH 9,0. La columna se lavó con guanidina HCl 6 M. El flujo continuo se combinó con el lavado de PBS. Se agruparon las fracciones que contenían una absorción significativa a un pico de 280 nm ya sea del lavado a pH 5,0 o de la elución a pH 3,5. Las fracciones de flujo continuo agrupadas y las fracciones agrupadas se analizaron mediante interferometría de biocapa y CE-SDS, tal como se describe en los **Ejemplos 3 y 9**.

Ejemplo 7: Separaciones de proteína L de variantes de IgG1-2F8-F405L modificadas con dominios variables de cadena ligera Kappa modificada

Se preequilibró una columna HiTrap Protein L de 5 ml (GE Healthcare) con solución salina tamponada con fosfato (PBS; fosfato de sodio 12,6 mM, cloruro de sodio 140 mM, pH 7,4). Los sobrenadantes de cultivos celulares de anticuerpos que contenían IgG-2F8-F405L-R18P, IgG-2F8-F405L-T20S-T22S, IgG-2F8-F405L-R24S o IgG-2F8-F405L-K107L se filtraron sobre filtros sin salida de 0,2 µm y se cuantificó el nivel de expresión de IgG1 usando interferometría de biocapa como se describe en el **Ejemplo 3**. Se cargaron 10 ml del sobrenadante en la columna HiTrap Protein L. Como alternativa, los sobrenadantes del cultivo de anticuerpos se purificaron mediante cromatografía de proteína A, como se describe en el **Ejemplo 4**. Se mezclaron entre 0,8 mg y 2,8 mg de IgG-2F8-F405L, IgG-2F8-F405L-S9L o IgG-2F8-F405L-S12P purificadas hasta un volumen total de 10 ml en PBS y se cargaron en la columna HiTrap Proteína L. La columna se lavó con PBS y el material específicamente unido se eluyó secuencialmente con glicina-HCl 0,1 M, pH 3,5, 3,0 y 2,5 y se neutralizó con unas pocas gotas de Tris 2 M, pH 9,0. La columna se lavó usando hidróxido de sodio 15 mM. El material en el flujo se analizó mediante interferometría de biocapa y CE-SDS, tal como se describe en los **Ejemplos 3 y 9**.

Ejemplo 8: Análisis de muestras de fracciones de flujo continuo de cromatografía mediante electroforesis en gel de poliácridamida y dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE)

Las muestras se mezclaron con cantidades iguales de tampón de muestra NuPAGE LDS (Invitrogen) y se calentaron a 70 °C durante 10 minutos. La SDS-PAGE se realizó en condiciones no reductoras en geles NuPAGE Bis-Tris al 4-12 % (Invitrogen) utilizando un método de Laemmli modificado (Laemmli 1970 Nature 227(5259): 680-5), con 1x de tampón de carrera NuPAGE MOPS SDS (Invitrogen). Los geles SDS-PAGE se tiñeron con Coomassie y se tomaron imágenes digitalmente utilizando un sistema de imágenes OptiGo (Isogen Life Sciences). Se utilizó el patrón preteñido SeeBlue Plus2 como patrón del peso molecular (Invitrogen).

Ejemplo 9: Análisis de muestras de fracciones cromatográficas mediante electroforesis capilar - Dodecilsulfato de sodio (CE-SDS)

Las muestras se filtraron sobre filtros sin salida de 0,2 µm antes del análisis. Las concentraciones de las muestras se ajustaron diluyendo en PBS de modo que la concentración no fuera superior a 250 µg/ml, utilizando la medición de concentración de interferometría de biocapa descrita en el **Ejemplo 3** o basado en la absorción a 280 nm. CE-SDS se realizó utilizando un LabChip GXII (Caliper Life Sciences, MA) en un HT Protein Express LabChip (Caliper Life Sciences, MA) en condiciones no reductoras de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los datos se analizaron utilizando el software LabChipGX V3.1 (Caliper Life Sciences, MA).

Ejemplo 10: Identificación de mutaciones de tipo *knock-out* para la matriz de afinidad CaptureSelect LC-kappa (Hu)

Según lo descrito por el fabricante, las matrices de afinidad CaptureSelect LC-kappa (Hu), KappaSelect y CaptureSelect KappaXL (GE-Healthcare, BAC), contienen ambas un fragmento de anticuerpo Llama de 13 kDa que reconoce un epítipo único en la parte constante de la cadena kappa L (CL) humana. Adicionalmente, según el fabricante, el fragmento tiene reacción cruzada con especies de primate no humano y no tiene reacción cruzada con cadenas L de ratón, conejo, bovina y de rata o con cadenas L lambda humanas.

La alineación de secuencia del dominio kappa CL de estas diferentes especies reveló varios restos de aminoácidos que estaban conservados en secuencias kappa de humanos y primates, pero diferentes en las otras secuencias. De estos, los restos expuestos en el complejo de cadena ligera y pesada se seleccionaron para el análisis y se diseñaron cadenas L kappa humanas que contenían el dominio CL de ratón (mm) o mutaciones puntuales únicas correspondientes a sus homólogos específicos de ratón. (**Tabla 1**). Se introdujo una mutación puntual adicional (F135L) en el dominio mmCL para facilitar el emparejamiento eficiente con cadenas H humanas.

Se expresaron nueve mutantes de cadena L kappa en combinación con las cadenas H apropiadas y se evaluó su capacidad para unirse a la resina KappaSelect (como se describe en el **Ejemplo 5**). Se utilizó IgG1-2F8-F405L purificada como control positivo para purificaciones por afinidad utilizando resina KappaSelect. (**Figura 3A**). Como se

esperaba, la IgG1-2F8-F405L que contenía la cadena L de mmCL(F135L), no pudo ser purificado por resinas KappaSelect (**Figura 3B**). Con la excepción de V110D, todos los mutantes aún podrían ser purificados, lo que sugiere que V110 en kappa LC es directa o indirectamente parte del sitio de unión de KappaSelect (**Figura 3**). IgG1-2F8-F405L-E143D eluye predominantemente a un pH más alto que los otros mutantes, lo que es indicativo de una interacción más débil con la resina de la columna (**Figuras 3D**). Los efectos de las mutaciones de un solo punto sobre la unión a la resina KappaSelect se resumen en la **Tabla 2**, donde (+++) indicó un perfil de unión similar al control positivo; (++) indica una mayor proporción de IgG1 eluyendo a un pH más alto, en comparación con el control; (+) indica proteína IgG1 significativa detectada en el flujo continuo y en el lavado con PBS y (-) indica que no se detectó unión a la resina.

La tolerabilidad de la matriz de afinidad CaptureSelect KappaXL para sustituciones en el resto V110 de la cadena L kappa se evaluó adicionalmente mediante purificación (como se describe en el **Ejemplo 6**) mutantes de cadena L kappa expresados individualmente, en combinación con la cadena H adecuada, que contenía sustituciones en la posición V110 de todos los aminoácidos naturales (excepto C). Como se esperaba, IgG1-7D8-K409R se unió a la resina ya que se detecta un pico de elución a 280 nm durante la elución a pH 3,5. La sustitución V110D anuló la unión a la resina KappaSelect y también impidió la unión a la unión CaptureSelect KappaXL, lo que sugiere que ambas matrices se unen a epítomos iguales o similares. V110R fue la única otra mutación que no mostró interacción detectable con la resina en estas condiciones. (**Figura 4 y 5**). Otras variantes de IgG1-7D8-K409R muestran una afinidad reducida por la resina. Por ejemplo, se detecta IgG1-7D8-K409R-V110E en las fracciones de eluato y flujo continuo de pH 3,5. Se detecta IgG1-7D8-K409R-V110K en las fracciones de lavado y flujo continuo con pH 5,0, y IgG1-7D8-K409R-V110T eluye durante el lavado con pH 5,0 y la elución con pH 3,5. (**Figura 4 y 5**). Los efectos de las mutaciones de un solo punto sobre la unión a la resina CaptureSelect KappaXL se resumen en la **Tabla 3**, donde (+++) indicó un perfil de unión similar al control positivo; (++) indica una mayor proporción de IgG1 eluyendo a un pH más alto, en comparación con el control; (+) indica proteína IgG1 significativa detectada en el flujo continuo y en el lavado con PBS y (-) indica que no se detectó unión a la resina.

Ejemplo 11: Identificación de mutaciones *knock-out* para la matriz de afinidad de la proteína L

También se ha descrito que la proteína L se une a la porción variable de los subtipos kappa I, III y IV, pero no al subtipo II kappa ni a la mayoría de los subtipos lambda (Nilson *et al.* J Biol Chem. 1992;267(4):2234-9). Adicionalmente, el epítipo de la proteína L en cadenas ligeras kappa humanas y murinas ha sido identificado mediante cristalografía de rayos X (Graille *et al.* Structure. 2001 9(8):679-87; Graille *et al.* Biol Chem. 2002 277(49):47500-6). El análisis de estas estructuras cristalinas identifica 17 restos como restos de contacto importantes en ambas estructuras (**Figura 2**). De estos, se seleccionaron 7 restos basándose en el análisis de las estructuras y alineamientos de secuencias y se mutaron a restos comúnmente encontrados en la posición equivalente en el subtipo II kappa o en la mayoría de las secuencias del subtipo I lambda usando mutaciones de punto único o doble. (**Figura 2, Tabla 1**).

Estos mutantes de cadena L kappa se expresaron en combinación con las cadenas H apropiadas y se evaluó su capacidad para unirse a la resina de proteína L (como se describe en el **Ejemplo 7**). El control positivo de IgG1-2F8-F405L purificado y la mayoría de las proteínas mutadas se unieron a la resina. Por el contrario, IgG1-2F8-S12P no se une a la resina en estas condiciones (**Figura 6**). Los efectos de las mutaciones puntuales sobre la unión a la columna HiTrap Proteína L se resumen en la **Tabla 4**, donde (+++) indicó un perfil de unión similar al control positivo; (++) indica una mayor proporción de IgG1 eluyendo a un pH más alto, en comparación con el control; (+) indica proteína IgG1 significativa detectada en el flujo continuo y en el lavado con PBS y (-) indica que no se detectó unión a la resina.

Ejemplo 12: Generación de anticuerpos biespecíficos que incluyen mutaciones coincidentes F405L y K409R mediante intercambio controlado del brazo Fab

Se generaron anticuerpos biespecíficos *in vitro* usando la tecnología de plataforma DuoBody®, es decir, intercambio de brazo Fab controlado (cFAE) o intercambio de brazo Fab inducido por 2-MEA como se describe en el documento WO 2011/147986; Labrijn *et al.*, PNAS 2013, 110: 5145-50; Gramer *et al.*, MAb 2013, 5: 962-973 y Labrijn *et al.*, Nat Protoc 2014, 9: 2450-63). Las condiciones de reacción utilizadas en este método se optimizaron para anticuerpos biespecíficos derivados de IgG1 humana y dependieron de determinantes en la región bisagra y la región CH3 (Labrijn *et al.*, J Immunol 2011, 187: 3238-46; Labrijn *et al.*, PNAS 2013, 110: 5145-50).

Para generar anticuerpos biespecíficos, se mezcló un exceso de masa de 1,3 veces de IgG1-2F8-F405L-V110D con IgG1-7D8-K409R o IgG1-1014-169-K409R y se incubó con una concentración final de 2-mercaptoetilamina-HCl (2-MEA) 75 mM en PBS (B.Braun o ThermoFisher) a 31 °C durante 5 horas. Las reacciones se realizaron en una escala de 4,5 mg a 50 mg y una concentración final de 2 mg/ml a 5 mg/ml de IgG total. La reacción se detuvo cuando el agente reductor 2-MEA se eliminó mediante diálisis en PBS (B.Braun o ThermoFisher) utilizando carros Slide-A-Lyzer de corte de peso molecular de 10 kDa (ThermoFisher) del tamaño apropiado. El tampón de diálisis se actualizó hasta que la concentración teórica de 2-MEA fue inferior a 50 µM. Las muestras finales de DuoBody se filtraron sobre filtros sin salida de 0,2 µm y se midió la absorbancia a 280 nm (A280) de los productos biespecíficos para determinar la concentración final. Las muestras se almacenaron a una temperatura de 2-8 °C durante al menos 24 horas antes de su uso posterior.

Ejemplo 13: Separación de mezclas de anticuerpos biespecíficos modificados asimétricamente utilizando la resina CaptureSelect KappaXL

Se empaquetó manualmente una columna que contenía aproximadamente 1 ml de resina empaquetada a partir de una suspensión homogénea de CaptureSelect KappaXL en una columna HiT Omnifit de 6,6 mm de diámetro, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La columna se preequilibró con solución salina tamponada con fosfato (PBS; fosfato de sodio 12,6 mM, cloruro de sodio 140 mM, pH 7,4; ThermoFisher). El producto de reacción de una reacción de intercambio DuoBody de IgG1-2F8-F405L-V110D con IgG1-7D8-K409R se preparó como se describe en el **Ejemplo 12**. Se cargaron entre 2,3 mg y 10 mg de muestra en la columna CaptureSelect KappaXL. La columna se lavó con PBS (ThermoFisher). La elución se realizó secuencialmente con Glicina HCl 0,1 M pH 4,0, Glicina HCl 0,1 M pH 3,5 y Glicina HCl 0,1 M pH 3,0. Como alternativa, la columna se lavó con citrato de sodio-NaOH 0,1 M pH 5,0 y eluyó con citrato de sodio-NaOH 0,1 M pH 3,5. La columna se lavó con guanidina HCl 6 M. Las fracciones que contenían una absorción significativa en el pico de 280 nm durante la elución a pH 3,5 se neutralizaron con unas pocas gotas de Tris HCl 2 M, pH 9,0, se agruparon y se dializaron a PBS (ThermoFisher). Las fracciones de carga y eluída se analizaron mediante cromatografía de interacción hidrófoba analítica y HP-SEC como se describe en los **Ejemplos 7, 15 y 17**.

Ejemplo 14: Separación de mezclas de anticuerpos biespecíficos modificados asimétricamente utilizando resina de proteína L

Se preequilibró una columna HiTrap Protein L de 5 ml (GE Healthcare) con solución salina tamponada con fosfato (PBS; fosfato de sodio 12,6 mM, cloruro de sodio 140 mM, pH 7,4; ThermoFisher o BBraun). El producto de reacción de una reacción de intercambio DuoBody de IgG1-2F8-F405L-S12P con IgG1-1014-169-K409R se preparó como se describe en el **Ejemplo 12**. Se cargaron aproximadamente 4 mg del producto de reacción en la columna Proteína L. El lavado de la columna se lavó secuencialmente con PBS (ThermoFisher o BBraun) y citrato de sodio-NaOH 0,02 M, pH 5. La elución se realizó secuencialmente con Glicina HCl 0,1 M pH 3,5, Glicina HCl 0,1 M pH 3,0 y Glicina HCl 0,1 M pH 2,5. Como alternativa, la elución se realizó secuencialmente con citrato de sodio 0,02 M, pH 5, y glicina HCl 0,1 M, pH 3,0. La columna se lavó con NaOH 0,015 M. Las fracciones que contenían una absorción significativa en el pico de 280 nm durante la elución a pH 3,5 o pH 3,0 se neutralizaron con unas pocas gotas de Tris HCl 2 M, pH 9,0, se agruparon y se dializaron a PBS (ThermoFisher o BBraun). Las fracciones de carga y eluída se analizaron mediante cromatografía analítica de intercambio catiónico, HP-SEC y CE-SDS como se describe en los **Ejemplos 7, 16 y 17**.

Ejemplo 15: Cuantificación del contenido de anticuerpos biespecíficos mediante cromatografía analítica de interacción hidrofóbica

Cromatografía líquida de alta presión (HPLC): se utilizó cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) para separar ambos anticuerpos parentales del producto de anticuerpo biespecífico, basándose en sus propiedades hidrofóbicas. Los anticuerpos parentales y las muestras de análisis se normalizaron en concentración y se diluyeron dos veces con el eluyente A de HIC (K_2HPO_4 15,4 mM, KH_2PO_4 9,6 mM, $(NH_4)_2SO_4$ 1,5 M; pH 7,0). Las moléculas de IgG con diferentes propiedades hidrofóbicas se separaron utilizando una columna HIC-HPLC Butil-NPR, 2,5 μ m, de 4,6 x 35 mm (Tosoh Bioscience) con un caudal de 1 ml/min. Se inyectaron 50 μ l de muestra y la elución se realizó con un gradiente de 12 minutos de eluyente A HIC (K_2HPO_4 15,4 mM, KH_2PO_4 9,6 mM, $(NH_4)_2SO_4$ 1,5 M; pH 7,0) al eluyente B de HIC (K_2HPO_4 15,4 mM, KH_2PO_4 9,6 mM; pH 7,0) con detección a 280 nm. Se utilizó el software Empower 3 (Waters) para asignar e integrar áreas de pico. Se utilizaron cromatogramas de los anticuerpos parentales como referencia para identificar su posición en el producto final.

Ejemplo 16: Cuantificación del contenido de anticuerpos biespecíficos mediante cromatografía analítica de intercambio catiónico

Se usó cromatografía líquida de alta presión (HPLC): cromatografía analítica de intercambio catiónico (CIEX) para separar ambos anticuerpos parentales del producto de anticuerpo biespecífico, en función de sus propiedades cargadas. Se inyectaron en la HPLC anticuerpos parentales y muestras de análisis a 1 mg/ml en la fase móvil A ($NaPO_4$ 10 mM, pH 7,0). Las moléculas de IgG con carga diferente se separaron utilizando un ProPac WCX-10, 4 mm x 250 mm, columna analítica con un caudal de 1 ml/min. Se inyectaron 50 μ l de muestra y la elución se realizó con un gradiente de Fase Móvil A ($NaPO_4$ 10 mM, pH 7,0) a Fase Móvil B ($NaPO_4$ 10 mM, pH 7,0, NaCl 0,25 M) con detección a 280 nm. Se utilizó el software Empower 3 (Waters) para asignar e integrar áreas de pico. Se utilizaron cromatogramas de los anticuerpos parentales como referencia para identificar su posición en el producto final.

Ejemplo 17: Cuantificación del contenido de monómero de anticuerpos mediante HP-SEC

El fraccionamiento HP-SEC se realizó utilizando una unidad de separación Waters Alliance 2695 (Waters, Etten-Leur, Países Bajos) conectada a una columna TSK HP-SEC (G3000SWxl; Tosoh Biosciences, via Omnilabo, Breda, Países Bajos) y un detector de absorbancia dual λ Waters 2487 (Waters). Las muestras se procesaron a 1 ml/min. Los resultados se procesaron utilizando el software Empower versión 2002 y se expresaron por pico como porcentaje de la altura total del pico.

Ejemplo 18: Determinación de la temperatura de fusión mediante fluorimetría diferencial de barrido

Se realizaron mediciones de fluorimetría de barrido diferencial para determinar el punto medio (temperatura) de desarrollo (punto de fusión, T_m). El tinte Sypro Orange (tinción de gel de proteína SYPRO Orange (concentrado 5000x en DMSO), Invitrogen) se diluyó 325 veces en PBS. Las muestras de anticuerpos se diluyeron a 1 mg/ml en PBS y se añadieron 5 μ l de la muestra diluida a 20 μ l de Sypro Orange diluido en placas de PCR de 96 pocillos iCycler iQ. La fluorescencia se midió en un sistema de detección Bio-Rad CFX96 Deep Well Real-Time tras la incubación a una temperatura creciente de 25 °C a 95 °C en incrementos de 0,5 °C (excitación 485 nm, emisión 575 nm). Los datos se analizaron utilizando el software Bio-Rad CFX Manager 3.1 y el software determinó los puntos de fusión a partir de los gráficos de fluorescencia versus temperatura.

Las Figuras 7 y 8 muestran que una purificación de una sola etapa utilizando la resina CaptureSelect KappaXL o la resina HiTrap Proteína L puede separar los anticuerpos biespecíficos de los anticuerpos parentales residuales. La purificación del producto de reacción de un intercambio 1,3:1 de IgG1-2F8-F405L-V110D $\times$ IgG1-7D8-K409R en resina CaptureSelect KappaXL mostró un pico de elución agudo (Figura 7A) que contenía >98 % de anticuerpo biespecífico (Figura 7B, C). De manera análoga, la purificación del producto de reacción de un intercambio 1,3:1 de IgG1-2F8-F405L-S12P $\times$ IgG1-1014-169-K409R en resina de proteína L mostró un pico de elución agudo (Figura 8A) que contenía >98 % de anticuerpo biespecífico (Figura 8B,C). El producto final de ambas purificaciones contenía <1 % de multímeros (Figuras 7D,E, 8D, E), que muestra que ni la reacción de intercambio de DuoBody ni el pulido inducen agregación o fragmentación. Las mutaciones puntuales S12P y V110D no afectan a las temperaturas de fusión térmica, como se infiere de las mediciones de fluorimetría de barrido diferencial (Tabla 5).

Ejemplo 19: Unión de S12P y V110D que contienen anticuerpos a células que expresan CD20 o EGFR recombinante

La unión de anticuerpos IgG1-7D8, IgG1-7D8-K409R, IgG1-7D8-K409R-S12P e IgG1-7D8-K409R-V110D (específica de CD20), IgG1-2F8, IgG1-2F8-F405L, IgG1-2F8-F405L-V110D e IgG1-2F8-F405L-S12P (específica de EGFR) e IgG1-2F8/7D8 biespecífica (bs), bsIgG1-2F8-S12P/7D8, bsIgG1-2F8/7D8-S12P, bsIgG1-2F8-V110D/7D8 y bsIgG1-2F8/7D8-V110D a células Ramos positivas para CD20 o EGFR recombinante se analizaron mediante análisis FACS o ELISA, respectivamente.

Para la FACS, se incubaron células (1×10^5 células/pocillo) en placas de poliestireno de 96 pocillos de fondo redondo (Greiner bio-one 650101) con diluciones en serie de preparaciones de anticuerpos (intervalo de 14 a 10000 ng/ml en diluciones triples) en 100 μ l de PBS/BSA al 0,1 %/0,02 % de azida a 4 °C durante 30 minutos. Después de lavar dos veces en PBS/0,1 % BSA/0,02 % de azida, las células se incubaron en 100 μ l con el anticuerpo secundario a 4 °C durante 30 minutos. Como anticuerpo secundario, se usó IgG antihumana de cabra conjugada con R-ficoeritrina (PE) F(ab')₂ (109-116-098, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA) diluida 1/100 en PBS/0,1 % BSA/0,02 % de azida para todos los experimentos. A continuación, las células se lavaron dos veces en PBS/0,1 % de BSA/0,02 % de azida, se resuspendieron en 150 μ l de PBS/0,1 % de BSA/0,02 % de azida y se analizaron en un equipo FACS Cantoll (BD Biosciences). Para el ELISA, las placas de ELISA de 96 pocillos (Greiner bio-one, Frickenhausen, Alemania) se recubrieron durante la noche con 2 μ g/ml (100 μ l/pocillo) de dominio extracelular recombinante de EGFR en PBS a 4 °C. Las placas se lavaron una vez con PBST. Se transfirieron series de diluciones de las muestras de anticuerpos (intervalo de 14 a 10000 ng/ml en diluciones triples) en PBST/BSA al 0,2 % (PBSTB) a las placas ELISA recubiertas (100 μ l/pocillo) y se incubaron en un agitador de placas (300 rpm) durante 60 minutos a temperatura ambiente (TA). Se descartaron las muestras y las placas se lavaron una vez con PBS/Tween 20 al 0,05 % (PBST). A continuación, las placas se incubaron en un agitador de placas (300 rpm) con una IgG antihumana de cabra (Fc) conjugada con HRP (109-035-098, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Westgrove, PA, EE. UU.) diluida 1:5.000 en PBSTB (100 μ l/pocillo) durante 60 minutos a TA. Las placas se lavaron una vez con PBS/Tween 20 al 0,05 % (PBST). Se añadió ABTS (50 mg/ml; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) (100 μ l/pocillo) y se incubó protegido de la luz durante 30 minutos a TA. La reacción se detuvo con ácido oxálico al 2 % (100 μ l/pocillo; Riedel de Haen Seelze, Alemania). Después de 10 minutos a TA, la absorbancia a 405 nm se midió en un lector de placas ELISA. Las curvas de unión se analizaron mediante regresión no lineal (dosis-respuesta sigmoidea con pendiente variable) utilizando el programa informático GraphPad Prism V5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.).

Las Figuras 9A y 9B muestran que la unión de las variantes de anticuerpos IgG-7D8 y bsIgG1-2F8x7D8 a las células de Ramos es comparable. Las Figuras 9C y 9D muestran que la unión de las variantes de anticuerpos IgG1-2F8 y bsIgG1-2F8x7D8 al EGFR recombinante es comparable. En conjunto, estos datos muestran que las mutaciones S12P o V110D no afectan a la unión al antígeno.

Ejemplo 20: Muerte celular mediada por CDC de células que expresan CD20 mediante anticuerpos que contienen S12P o V110D

El anticuerpo CD20 IgG1-7D8 puede matar eficazmente las células que expresan CD20, tales como las células Daudi, por citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Anteriormente se demostró que en la versión IgG1-7D8-K409R del anticuerpo, la actividad CDC no se vio comprometida (Labrijn *et al.*, PNAS 2013, 110: 5145-50). Aquí, se comprobó

si los mutantes IgG1-7D8-K409R-S12P e IgG1-7D8-K409R-V110D todavía eran capaces de inducir CDC de células que expresan CD20.

El anticuerpo IgG1-b12 específico de la gp120 del VIH-1, no capaz de unirse a las células Daudi se incluyó como control negativo.

Se preincubaron 10^5 de células Daudi durante 15 minutos con una serie de concentraciones de anticuerpo en 80 μ l de medio RPMI suplementado con BSA al 0,1 % en un agitador a temperatura ambiente. Se añadieron 20 μ l de suero humano normal (NHS) como fuente de complemento (concentración final de NHS del 20 %) y se incubaron durante 45 minutos a 37 °C. Se añadieron 30 μ l de medio RPMI enfriado con hielo suplementado con BSA al 0,1 % para detener la reacción de CDC. Las células muertas y viables se discriminaron añadiendo 10 μ l de yoduro de propidio (PI) a 10 μ g/ml (concentración final de 1 μ g/ml) y análisis FACS.

La **Figura 10** muestra el efecto de las mutaciones *knock-out* de afinidad sobre las funciones efectoras de los anticuerpos. La **Figura 10A** muestra que la muerte celular mediada por CDC de células Daudi que expresan CD20 por IgG1-7D8, IgG1-7D8-K409R, IgG1-7D8-K409R-S12P e IgG1-7D8-K409R-V110D son comparables. Por tanto, las mutaciones S12P o V110D en la cadena ligera no afectan a la CDC. Las células de Daudi expresan CD20 pero no EGFR, lo que da como resultado en la unión monovalente de los anticuerpos biespecíficos, bslgG1-2F8/7D8, bslgG1-2F8-S12P/7D8, bslgG1-2F8/7D8-S12P, bslgG1-2F8-V110D/7D8 y bslgG1-2F8/7D8-V110D. La **Figura 10B** muestra que todos los anticuerpos biespecíficos inducen la destrucción celular mediada por CDC de las células que expresan CD20 con una eficacia comparable. Estos datos indican que las mutaciones S12P o V110D no afectan a la CDC.

Ejemplo 21: Muerte celular mediada por ADCC de células que expresan CD20 mediante anticuerpos que contienen S12P o V110D

Los anticuerpos biespecíficos se generaron mediante intercambio de brazo Fab controlado inducido por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L $\times$ IgG1-7D8-K409R o IgG1-2F8-F405L-V110D $\times$ IgG1-7D8-K409R, bslgG1-2F8/7D8 y bslgG1-2F8-V110D/7D8, respectivamente.

El anticuerpo CD20 IgG1-7D8 también puede matar eficazmente las células que expresan CD20, tales como las células Daudi, por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Anteriormente se demostró que en la versión IgG1-7D8-K409R del anticuerpo, la actividad de ADCC no se vio comprometida (Labrijn *et al.*, PNAS 2013, 110: 5145-50). Aquí, se comprobó si los mutantes IgG1-7D8-S12P e IgG1-7D8-V110D todavía eran capaces de inducir ADCC de células que expresan CD20. El anticuerpo IgG1-b12 específico de la gp120 del VIH-1, no capaz de unirse a las células Daudi se incluyó como control negativo.

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés), células efectoras) de sangre completa de un donante sano utilizando tubos Leucosep® (Greiner Bio-one, n.º de cat. 227290) según las recomendaciones del fabricante. Las células diana se marcaron añadiendo 100 μ Ci de 51 Cr a 5x10⁶ células A431 en 1 ml de medio RPMI suplementado con 0,1 % de BSA e incubando durante 60 minutos en un baño de agua con agitación a 37 °C. Las células marcadas se lavaron y se resuspendieron en RPMI suplementado con BSA al 0,1 %. Se preincubaron 5x10⁴ células diana marcadas en RPMI suplementado con BSA al 0,1 % en 100 μ l durante 15 minutos con la serie de concentraciones de anticuerpos (intervalo de concentración final de 0-10 μ g/ml en el ensayo de ADCC en diluciones triples) a temperatura ambiente. El ensayo ADCC se inició añadiendo 50 μ l de células efectoras (5 x 10⁶ células) en una relación E:T de 100:1. Después de 4 horas a 37 °C, se midió la liberación de 51 Cr de experimentos por triplicado en un contador de centelleo como recuentos por minuto (cpm). El porcentaje de toxicidad celular se calculó mediante la siguiente fórmula: porcentaje de lisis específica = (cpm experimental - cpm basal)/(cpm máxima - cpm basal) $\times$ 100. La liberación máxima de 51 Cr se determinó añadiendo 50 μ l de Triton X-100 al 5 % a 50 μ l de células diana (5 x 10⁴ células), y la liberación basal se midió en ausencia de anticuerpos sensibilizantes y células efectoras.

La **Figura 10** muestra el efecto de las mutaciones *knock-out* de afinidad sobre las funciones efectoras de los anticuerpos. La **Figura 10C** muestra que la muerte celular mediada por ADCC de células Daudi que expresan CD20 por IgG1-7D8, IgG1-7D8-K409R, IgG1-7D8-K409R-S12P e IgG1-7D8-K409R-V110D son comparables. Las células de Daudi no expresan EGFR, por lo tanto bslgG1-2F8/7D8, bslgG1-2F8-S12P/7D8, bslgG1-2F8/7D8-S12P, bslgG1-2F8-V110D/7D8 y bslgG1-2F8/7D8-V110D se unen de forma monovalente. La **Figura 10D** muestra que todos los anticuerpos biespecíficos inducen la destrucción celular mediada por ADCC de las células que expresan CD20 con una eficacia comparable. En conjunto, estos datos indican que la capacidad de ADCC no se ve afectada por las mutaciones V110D o S12P.

Ejemplo 22: Muerte celular mediada por ADCC de células que expresan EGFR mediante anticuerpos que contienen V110D o S12P

El anticuerpo EGFR IgG1-2F8 puede matar células que expresan EGFR, tales como A431, por ADCC. Anteriormente se demostró que en la versión IgG1-2F8-F405L del anticuerpo, la actividad de ADCC no se vio comprometida (Labrijn *et al.*, PNAS 2013, 110: 5145-50). Aquí, se probó si los mutantes IgG1-2F8-F405L-V110D e IgG1-2F8-F405L-S12P todavía eran capaces de inducir ADCC de células que expresan EGFR (como se describe en el **Ejemplo 21**). Las

células A431 no expresan CD20 ni gp120 de VIH-1 y, por lo tanto, el anticuerpo CD20 IgG1-7D8 y el anticuerpo IgG1-b12 de gp120 de VIH-1, no inducen ADCC de estas células.

La **Figura 10** muestra el efecto de las mutaciones *knock-out* de afinidad sobre las funciones efectoras de los anticuerpos. La **Figura 10E** muestra que la destrucción celular mediada por ADCC de células A431 que expresan EGFR por IgG1-2F8-F405L, IgG1-2F8-F405L-V110D e IgG1-2F8-F405L-S12P es comparable. Las células A431 no expresan CD20, por lo tanto bslgG1-2F8/7D8, bslgG1-2F8-S12P/7D8, bslgG1-2F8/7D8-S12P, bslgG1-2F8-V110D/7D8 y bslgG1-2F8/7D8-V110D se unen de forma monovalente. La **Figura 10F** muestra que todos los anticuerpos biespecíficos inducen la destrucción celular mediada por ADCC de las células que expresan EGFR con una eficacia comparable. En conjunto, estos datos indican que la capacidad de ADCC no se ve afectada por las mutaciones V110D o S12P.

Ejemplo 23: Análisis in vivo de la farmacocinética de V110D que contiene anticuerpos

El anticuerpo parental IgG1-2F8-F405L-V110D y -bslgG1-2F8/7D8 y bslgG1-2F8-V110D/7D8, se inyectaron en ratones SCID para analizar sus propiedades farmacocinéticas. Para esto, a tres grupos de ratones (3 ratones por grupo) se les inyectaron por vía intravenosa en la vena de la cola 200 µl de anticuerpo purificado: (1) 100 µg (/ratón) de bslgG1-2F8/7D8; (2) 100 µg de bslgG1-2F8-V110D/7D8; (3) 100 µg de IgG1-2F8-F405L-V110D. Se recogieron muestras de sangre (50-100 µl) mediante punción en el carrillo a intervalos de tiempo predeterminados después de la administración de anticuerpos (10 min, 3 h, 1, 2, 7, 14, 21 días). La sangre se recogió en viales que contenían heparina y se centrifugó durante 10 minutos a 14.000 g. El plasma se almacenó a -20 °C antes de realizar más análisis.

En un experimento distinto, el anticuerpo parental IgG1-2F8-F405L-S12P y bslgG1-2F8/7D8 y bslgG1-2F8-S12P/7D8, se inyectaron en ratones SCID para analizar sus propiedades farmacocinéticas. Como se ha descrito anteriormente, a los grupos (3 ratones por grupo) se les inyectó por vía intravenosa en la vena de la cola: (1) 100 µg (/ratón) de bslgG1-2F8/7D8; (2) 100 µg de bslgG1-2F8-S12P/7D8; o (3) 100 µg de IgG1-2F8-F405L-S12P. Se recogieron muestras de sangre (50-100 µl) mediante punción en el carrillo a intervalos de tiempo predeterminados después de la administración de anticuerpos (10 min, 3 h, 1, 2, 7, 15, 21 días). La sangre se recogió en viales que contenían heparina y se centrifugó durante 10 minutos a 14.000 g. El plasma se almacenó a -20 °C antes de realizar más análisis.

Las concentraciones de IgG total en las muestras de plasma se analizaron mediante ELISA. En pocas palabras, las placas de ELISA (Greiner bio-one, Frickenhausen, Alemania) se recubrieron durante la noche con 2 µg/ml (100 µl/pocillo) de IgG antihumana de ratón (clon MH16-1; CLB; n.º de cat. M1268) en PBS a 4 °C. Las placas se lavaron una vez con PBST. Se transfirieron series de diluciones de muestras de suero en PBST/BSA al 0,2 % (PBSTB) a placas ELISA recubiertas (100 µl/pocillo) y se incubaron en un agitador de placas (300 rpm) durante 60 minutos a temperatura ambiente (TA). Se descartaron las muestras y las placas se lavaron una vez con PBS/Tween 20 al 0,05 % (PBST). A continuación, las placas se incubaron en un agitador de placas (300 rpm) con IgG antihumana de cabra conjugada con HRP (clon 11H; Jackson; n.º de cat. 109-035-098; 1:10.000) en PBSTB (100 µl/pocillo) durante 60 minutos a TA. Las placas se lavaron una vez con PBS/Tween 20 al 0,05 % (PBST). Se añadió ABTS (50 mg/ml; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) (100 µl/pocillo) y se incubó protegido de la luz durante 30 minutos a TA. La reacción se detuvo con ácido oxálico al 2 % (100 µl/pocillo; Riedel de Haen, Seelze, Alemania). Después de 10 minutos a TA, la absorbancia a 405 nm se midió en un lector de placas ELISA.

Las **Figuras 11A** y **Figura 11B** mostrar las concentraciones plasmáticas totales de anticuerpos y las tasas de aclaramiento plasmático, respectivamente. Los perfiles farmacocinéticos y las tasas de aclaramiento fueron idénticos en todos los grupos y similares a los datos históricos de IgG1 SV (los niveles previstos en LA **Figura 11A**). Esto indica que las propiedades farmacocinéticas no se ven afectadas por la mutación V110D.

Tabla 1: Variantes de cadena L Kappa IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R

IgG1-2F8-F405L-mmCL(F135L)	IgG 1-2F8-F405L-G157N	IgG1-2F8-F405L-S182T
IgG1-2F8-F405L-V110D	IgG1-2F8-F405L-N158G	IgG1-2F8-F405L-A193T
IgG1-2F8-F405L-E143D	IgG1-2F8-F405L-E161N	IgG1-2F8-F405L-T206V
IgG1-2F8-F405L-A144I	IgG1-2F8-F405L-E165D	
IgG1-2F8-F405L-S9L	IgG1-2F8-F405L-S12P	IgG1-2F8-F405L-R18P
IgG1-2F8-F405L-T20S-T22S	IgG1-2F8-F405L-R24S	IgG1-2F8-F405L-K107L
IgG1-7D8-K409R-V110A	IgG1-7D8-K409R-V110D	IgG1-7D8-K409R-V110E
IgG1-7D8-K409R-V110F	IgG1-7D8-K409R-V110G	IgG1-7D8-K409R-V110H
IgG1-7D8-K409R-V110I	IgG1-7D8-K409R-V110K	IgG1-7D8-K409R-V110L

IgG1-7D8-K409R-V110M	IgG1-7D8-K409R-V110N	IgG1-7D8-K409R-V110P
IgG1-7D8-K409R-V110Q	IgG1-7D8-K409R-V110R	IgG1-7D8-K409R-V110S
IgG1-7D8-K409R-V110T	IgG1-7D8-K409R-V110W	IgG1-7D8-K409R-V110Y

Tabla 2 Comportamiento de unión de IgG1-2F8-F405L y variantes a la resina KappaSelect

Variante IgG1-2F8-F405L	Afinidad
IgG1-2F8-F405L	+++
IgG1-2F8-F405L-V110D	-
IgG1-2F8-F405L-E143D	++
IgG1-2F8-F405L-A144I	+++
IgG1-2F8-F405L-G157N	+++
IgG1-2F8-F405L-N158G	+++
IgG1-2F8-F405L-E161N	+++
IgG1-2F8-F405L-E165D	+++
IgG1-2F8-F405L-S182T	+++

Tabla 3 Comportamiento de unión de IgG1-7D8-K409R y variantes de la resina CaptureSelect KappaXL

Variante IgG1-7D8-K409R	Afinidad
IgG1-7D8-K409R	+++
IgG1-7D8-K409R-V110A	+++
IgG1-7D8-K409R-V110D	-
IgG1-7D8-K409R-V110E	+
IgG1-7D8-K409R-V110F	++
IgG1-7D8-K409R-V110G	+++
IgG1-7D8-K409R-V110H	+
IgG1-7D8-K409R-V110I	++
IgG1-7D8-K409R-V110K	+
IgG1-7D8-K409R-V110L	+++
IgG1-7D8-K409R-V110M	+++
IgG1-7D8-K409R-V110N	+
IgG1-7D8-K409R-V110P	+
IgG1-7D8-K409R-V110Q	+
IgG1-7D8-K409R-V110R	-
IgG1-7D8-K409R-V110S	++
IgG1-7D8-K409R-V110T	++
IgG1-7D8-K409R-V110W	+
IgG1-7D8-K409R-V110Y	++

Tabla 4 Comportamiento de unión de IgG1-2F8-F405L y variantes a la resina de proteína L

Variante IgG1-2F8-F405L	Afinidad
IgG1-2F8-F405L	+++

IgG1-2F8-F405L-S9L	+++
IgG 1-2F8-F405L-S 12P	-
IgG1-2F8-F405L-R18P	+++
IgG1-2F8-F405L-T20S-T22S	+++
IgG1-2F8-F405L-R24S	+++
IgG1-2F8-F405L-K107L	+++

Tabla 5 Determinación del punto de fusión de variantes de IgG1 determinadas mediante fluorimetría diferencial de barrido

Variante de anticuerpo	Tm1 promedio (°C)	Tm2 promedio (°C)
IgG1-2F8-F405L	67,0	74,5
IgG1-2F8-F405L-S12P	67,0	74,5
IgG1-2F8-F405L-V110D	67,0	74,5
IgG1-7D8-K409R	66,3	-
BsIgG1-2F8/7D8	67,5	73,5
BsIgG1-2F8-S12P/7D8	67,3	73,5
BsG1-2F8-V110D/7D8	67,5	73,5

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo biespecífico o multiespecífico que comprende:

- 5 a. un primer par de cadena ligera/cadena pesada que comprende una primera región VL y una primera región VH que tiene una primera especificidad de unión y que comprende una primera región constante de cadena ligera kappa y una primera región constante de cadena pesada; y
- b. un segundo par de cadena ligera/cadena pesada que comprende una segunda región VL y una segunda región VH que tiene una segunda especificidad de unión y que comprende una segunda región constante de cadena
- 10 ligera kappa y una segunda región constante de cadena pesada;
- en donde la primera y la segunda cadena ligera son cadenas ligeras kappa humanas o humanizadas y dicha primera cadena ligera kappa comprende una sustitución de aminoácido seleccionada entre V110D, V110R, V110E, V110H, V110K, V110N, V110P, V110Q, V110W o E143D cuando se utiliza el sistema de numeración de EU.

15 2. El anticuerpo biespecífico o multiespecífico de la reivindicación 1, en donde la primera cadena ligera comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas entre V110D y E143D cuando se utiliza el sistema de numeración EU.

20 3. El anticuerpo biespecífico o multiespecífico de las reivindicaciones 1 ó 2, en donde la primera cadena ligera comprende la sustitución del aminoácido E143D cuando se utiliza el sistema de numeración EU.

4. El anticuerpo biespecífico o multiespecífico de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la segunda cadena ligera comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas entre V110D y E143D cuando se usa el sistema de numeración EU y S12P cuando se usa el sistema de numeración IMGT.

25 5. El anticuerpo biespecífico o multiespecífico de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la segunda cadena ligera comprende la sustitución de aminoácidos V110D, V110R, V110E, V110H, V110K, V110N, V110P, V110Q o V110W, preferentemente, V110D o V110R, siendo V110D el más preferido, cuando se utiliza el sistema de numeración EU.

30 6. El anticuerpo biespecífico o multiespecífico de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la segunda cadena ligera comprende la sustitución del aminoácido E143D cuando se utiliza el sistema de numeración EU.

35 7. El anticuerpo biespecífico o multiespecífico de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la segunda cadena ligera comprende la sustitución de aminoácidos S12P cuando se usa el sistema de numeración IMGT.

8. El anticuerpo biespecífico o multiespecífico de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la primera y segunda cadenas ligeras no están sustituidas en las mismas posiciones.

40 9. El anticuerpo biespecífico o multiespecífico de cualquiera de las reivindicaciones anteriores que es un anticuerpo biespecífico.

45 10. El anticuerpo biespecífico o multiespecífico de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que es un anticuerpo multiespecífico.

11. Un método para producir un producto de anticuerpo biespecífico o multiespecífico que comprende

- a. proporcionar un primer anticuerpo que tiene una primera especificidad de unión, comprendiendo dicho primer anticuerpo dos pares de cadena ligera/cadena pesada, en donde cada cadena ligera es una cadena ligera kappa humana o humanizada que comprende una modificación en donde dicha modificación es la sustitución de aminoácidos S12P cuando se usa el sistema de numeración IMGT que reduce o elimina la unión de la cadena ligera a la Proteína L;
- 50 b. proporcionar un segundo anticuerpo que tiene una segunda especificidad de unión, comprendiendo dicho segundo anticuerpo dos pares de cadena ligera/cadena pesada, en donde cada cadena ligera es una cadena ligera kappa humana o humanizada que no está modificada con respecto a la unión a la proteína L;
- 55 c. incubar dichos primer y segundo anticuerpos en condiciones que permitan la formación de un anticuerpo biespecífico o multiespecífico, cuyo anticuerpo biespecífico o multiespecífico comprende:
- un primer par de cadena ligera/cadena pesada de dicho primer anticuerpo que tiene una primera especificidad de unión y que tiene dicha modificación para reducir o eliminar la unión de la cadena ligera kappa humana o humanizada a la Proteína L;
- 60 y que comprende un segundo par de cadena ligera/cadena pesada de dicho segundo anticuerpo que tiene una segunda especificidad de unión en donde la cadena ligera es una cadena ligera kappa humana o humanizada que no está modificada con respecto a la unión a la Proteína L;
- d. aislar el anticuerpo biespecífico o multiespecífico basándose en la capacidad del anticuerpo biespecífico o multiespecífico para unirse a la proteína L.
- 65

12. El método según la reivindicación 11, en donde en c) el primer anticuerpo se proporciona en exceso de masa en comparación con el segundo anticuerpo.

13. El método según la reivindicación 12, en donde en c) el primer anticuerpo se proporciona en al menos un exceso de masa de 1,1 veces en comparación con el segundo anticuerpo, tal como un exceso de masa de al menos 1,2 veces, tal como un exceso de masa de al menos 1,3 veces.

14. El método según cualquiera de las reivindicaciones 11-13, en donde la segunda cadena ligera del anticuerpo comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas entre V110R, V110D, V110E, V110H, V110K, V110N, V110P, V110Q, V110W o E143D cuando se utiliza el sistema de numeración de EU.

15. Un método para aislar un anticuerpo biespecífico o multiespecífico, que comprende aislar de una mezcla de anticuerpos un anticuerpo biespecífico o multiespecífico que tiene cadenas ligeras kappa humanas o humanizadas modificadas diferencialmente que comprenden sustituciones de aminoácidos de S12P cuando se utiliza el sistema de numeración IMGT, en donde la modificación da como resultado un anticuerpo biespecífico o multiespecífico con una cadena ligera heterodimérica cuyos monómeros tienen una afinidad diferencial por la Proteína L y el anticuerpo biespecífico o multiespecífico se aísla de la mezcla basándose en su afinidad por la Proteína L.

16. El método de la reivindicación 15, en donde las cadenas ligeras modificadas diferencialmente no son inmunogénicas o sustancialmente no inmunogénicas en un ser humano.

Figura 1

	1	1	1	1	1	1
	1	2	3	4	5	6
CON REACCIÓN CRUZADA	90123456789012345678901234567890123456789012345678	901				
UP P01834 IGKC1_Homsap	TVAAPSVFIFPPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN	SQE				
IMGT M11736 IGKC2_Homsap	TVAAPSVFIFPPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN	SQE				
IMGT M11737 IGKC3_Homsap	TVAAPSVFIFPPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN	SQE				
GB AF017732 IGKC4_Homsap	TVAAPSVFIFPPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN	SQE				
GB AF113887 IGKC5_Homsap	TVAAPSVFIFPPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN	SQE				
GB AJ619771 IGKC_Macfas	AVAAPSVFIFPPPSDEQVKSGTYSVVCLLNNFYPREASVKWKVDGAVQTGN	SQE				
GB FJ795855 IGKC_Macmul	AVAAPSVLIFPPPSDEQVKSGTYSVVCLLNNFYPREASVKWKVDGVLKTGN	SQE				
CONSENSO +	VAAPSV IFPPS Q KSGT SVVCLLNNFYPREA V KVD GN SQE					
SIN REACTIVIDAD CRUZADA	ADAAPTVSIFPPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNG	VLN				
UP P01837 IGKC_Musmus	FKSTPTLTVFPPPSSEELKENKATLVCLISNFSPPSGVTVAWKANGTPTITQG	VDT				
UP P01844 IGLC2_Musmus	FKSTPTLTVMPPPSPEELQENKATLVCLISNFSPPSGVTVAWKANGTPTITQG	VDT				
UP P01845 IGLC3_Musmus	PKANPTVTLFPPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAG	VET				
UP P0CG04 IGLC1_Homsap	PKAAPSVTLFPPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAG	VET				
UP P0CG05 IGLC2_Homsap	PKAAPSVTLFPPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAG	VET				
UP P0CG06 IGLC3_Homsap	PKAAPSVTLFPPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPPAKAG	VET				
UP P0CF74 IGLC6_Homsap	PKAAPSVTLFPPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVNTG	VET				
UP A0M8Q6 IGLC7_Homsap	PKAAPSVTLFPPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKVG	VET				
IMGT V01241 IGKC_Ratnor	ADAAPTVSIFPPSTEQLATGGASVVCFLNNFYPRDISVKWKIDGTEREDG	VLD				
IMGT K01360 IGKC1_Orycun	DPVAPTVLIFPPAADQVATGTVTIVCVANKYFPDVT VTWEVDGTTTQTTG	IEN				
IMGT X00232 IGKC2_Orycun	DPVAPSVLLFPPPSKEELTGTGTATIVCVANKFYPSGITVWKKVDGTTTQSSG	IEN				
GB AEM45014 IGKC_Bostau	SDAEPSSVFLFPPPSDEQLKGTGTVSVVCLVNDFFYPKDINVKWKVDGVTQSSSNFON					
CONSENSO -	V EA GN S E					
PISA (INTERFAZ)	+ ++ + ++ + +++++ +					
SELECCIONADO	* ** ** *					
	1	1	1	2	2	
	7	8	9	0	1	
CON REACCIÓN CRUZADA	23456789012345678901234567890123456789012345678901234					
UP P01834 IGKC1_Homsap	SVTEQDSKSDSTYSLSSSTLTLSKADYEKKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC					
IMGT M11736 IGKC2_Homsap	SVTEQESKSDSTYSLSSSTLTLSKADYEKKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC					
IMGT M11737 IGKC3_Homsap	SVTEQESKSDSTYSLSSSTLTLSKADYEKKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC					
GB AF017732 IGKC4_Homsap	SVTEQDSKSDSTYSLSSSTLTLSKADYEKKHLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC					
GB AF113887 IGKC5_Homsap	SVTEQDSKSDSTYSLSSSTLTLSKADYEKKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC					
GB AJ619771 IGKC_Macfas	SVTEQDSKSDNTYSLSSSTLTLSSTDYQSHNVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC					
GB FJ795855 IGKC_Macmul	SVTEQDSKSDNTYSLSSSTLTLSSTDYQSHNVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC					
CONSENSO +	SVTE SKD TYSLS TLTL DY H YA EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC					
SIN REACTIVIDAD CRUZADA	SWTDQDSKSDSTYMSSTLTLTKEDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRECE					
UP P01837 IGKC_Musmus	SNPTKEGN KFMASFLHLTSDQWRSHNSFTCQVTHEGDT VEKSLSPAECCL					
UP P01844 IGLC2_Musmus	SNPTKEDN KYMASFLHLTSDQWRSHNSFTCQVTHEGDT VEKSLSPAECCL					
UP P01845 IGLC3_Musmus	TKPSKQSN NKYAASSYLSLTPEQWKSRRSYSCQVTHEGST VEKTVAPTECS					
UP P0CG04 IGLC1_Homsap	TTPSKQSN NKYAASSYLSLTPEQWKSRRSYSCQVTHEGST VEKTVAPTECS					
UP P0CG05 IGLC2_Homsap	TTPSKQSN NKYAASSYLSLTPEQWKSRRSYSCQVTHEGST VEKTVAPTECS					
UP P0CG06 IGLC3_Homsap	TTPSKQSN NKYAASSYLSLTPEQWKSRRSYSCQVTHEGST VEKTVAPTECS					
UP P0CF74 IGLC6_Homsap	TTPSKQSN NKYAASSYLSLTPEQWKSRRSYSCQVTHEGST VEKTVAPTECS					
UP A0M8Q6 IGLC7_Homsap	TKPSKQSN NKYAASSYLSLTPEQWKSRRSYSCRVTHEGST VEKTVAPTECS					
IMGT V01241 IGKC_Ratnor	SVTDQDSKSDSTYMSSTLTLSKADYESHNLTYCEVVKHT3GGSPVVKSFNRGEC					
IMGT K01360 IGKC1_Orycun	SKTPQNSADCTYNLSSTLTLTSTQYNSHREYTKCVT QGTT3 VVQSFRRGDC					
IMGT X00232 IGKC2_Orycun	SKTPQSPEDNTYSLSSSTLTLSAQYNSHVSVTCEV QGSASPIVQSFNRGDC					
GB AEM45014 IGKC_Bostau	SFTDQDSKSKSTYSLSSILFLPSSEYQSHNAYTCEVSHKSLTTALVKSFKNEC					
CONSENSO -	E S A T					
PISA (INTERFAZ)	+ + +++ + +					
SELECCIONADO	* *					

Figura 2

	1	2	3	4	5	6
PDB 1M88_A	123456789012345678901234567890123456789012345678901234					
PDB 1HE2_A	DIVMSQSPSSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLNSRTRKNZLAWYQKNPGQSKVLLIYWA-----					
2F0_VL	DIQMTQSPFSSLSASVGRVTITFRTSQSI-----SSYLHWYQKNPGKAFKLLIYAA-----					
SP P01617 KV204	AIQLTQSPFSSLSASVGRVTITTCRASQDI-----SSALVWYQKNPGKAFKLLIYDA-----					
SP P01699 LV101	DIVMTQSPPLSLFVTEGEPASISCRSSQSLIHS-DGFYLNWYQKNPGQSPZLLIYAL-----					
PISA (INTERFAZ)	QSVLTQPP SASGTPGQRTVITSCSGENFDI-----GENSVWYQVHFGTAPRLLIYSS-----					
SELECCIONADO	+++++ * * * * *	+++++ * * * * *				
PDB 1M88_A	7	8	9	1	1	1
PDB 1HE2_A	567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567					
2F0_VL	STRESGVP-DRFTGNG--SGTDFTLTISSVQAEQAVYICKQAYI-----PPLTFQAGTKLELK					
SP P01617 KV204	SSLQSGVP-SRFSGSG--SGTDFTLTISSLQPEDFATYTCQSSYS-----TERTFQCGTKAVEIK					
SP P01699 LV101	SSLESQVP-SRFSGSE--SGTDFTLTISSLQPEDFATYTCQSSYS-----YPLTFQGGTKAVEIK					
PISA (INTERFAZ)	SNRASGVP-DRFSGSG--SGTDFTLTKISRVEAEDVGVIYCKZALQ-----APITFCQGTALRIK					
SELECCIONADO	DQRSSGVP-DRFSGSK--SGTSASLAISGLQSENEADYCATWDDS--IDGPFVFGGTKVTVL	+				+

Figura 3

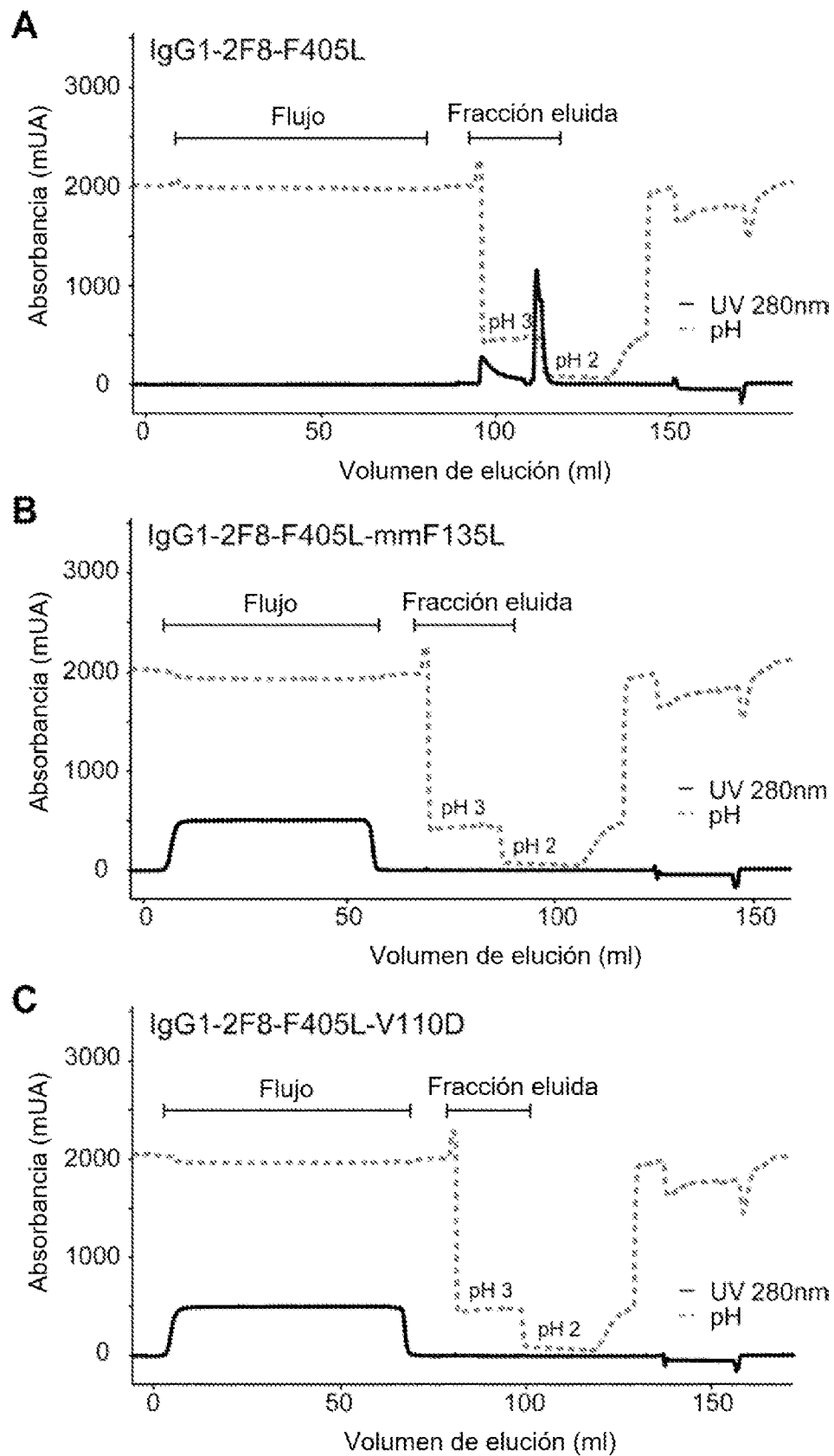


Figura 3 (continuación)

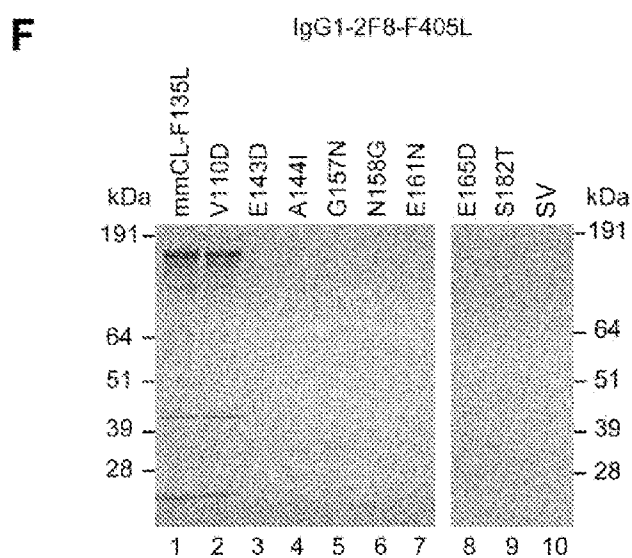
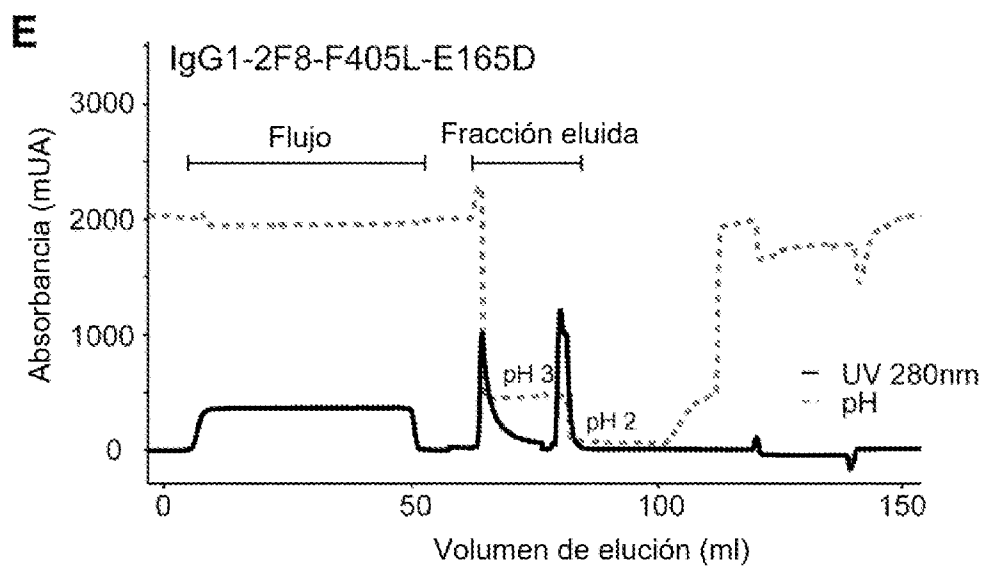
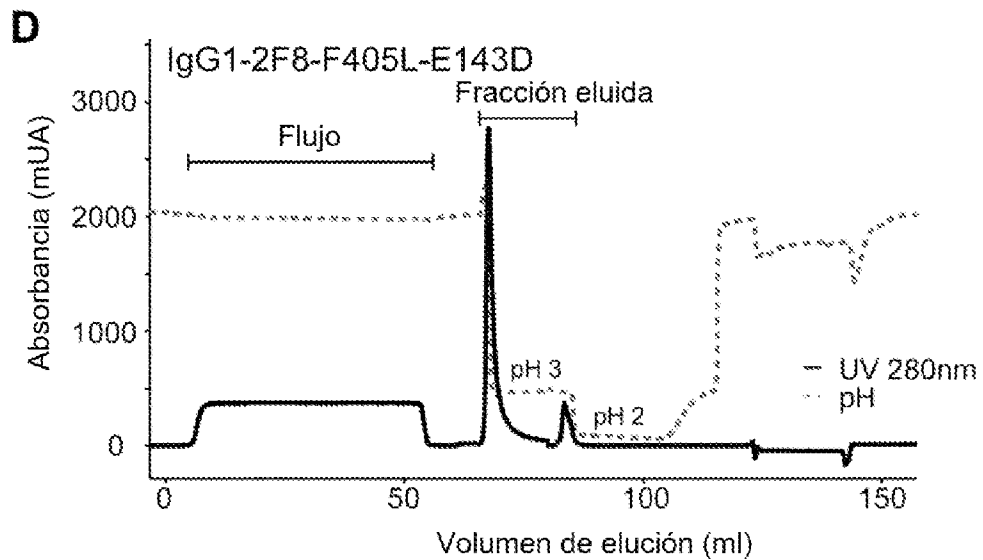


Figura 4

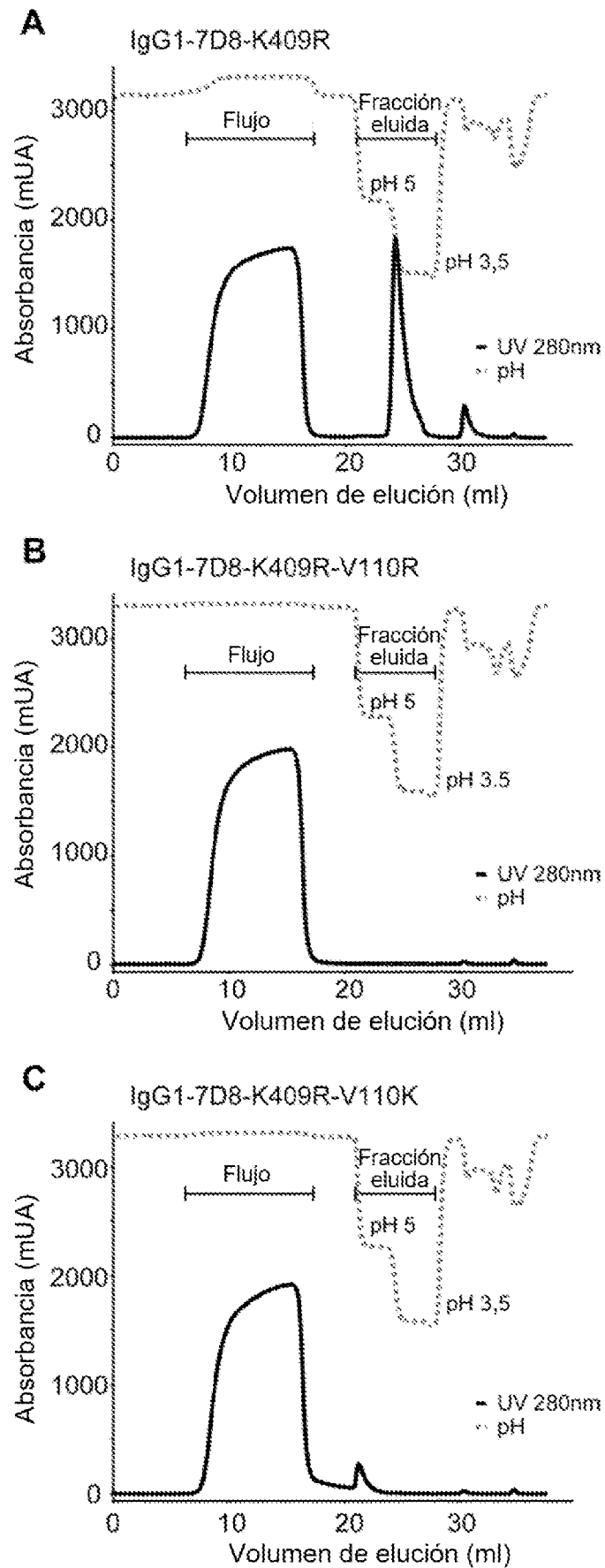
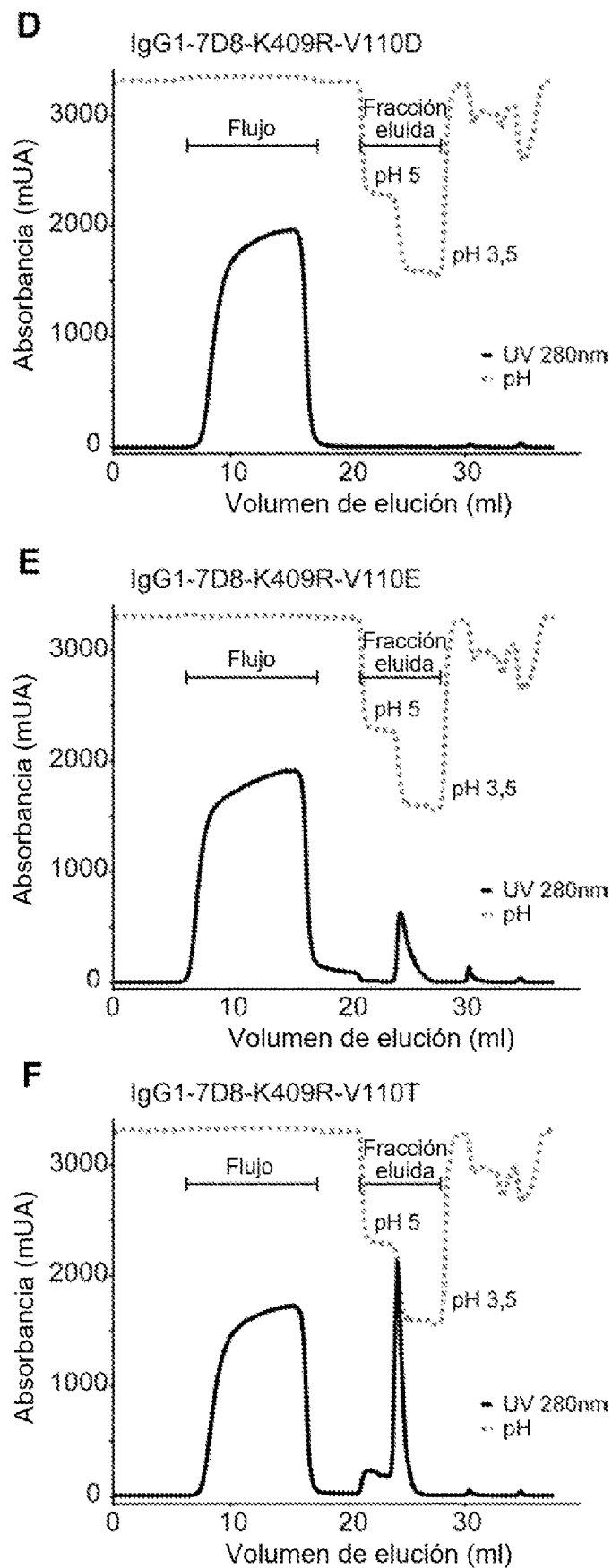


Figura 4 (continuación)



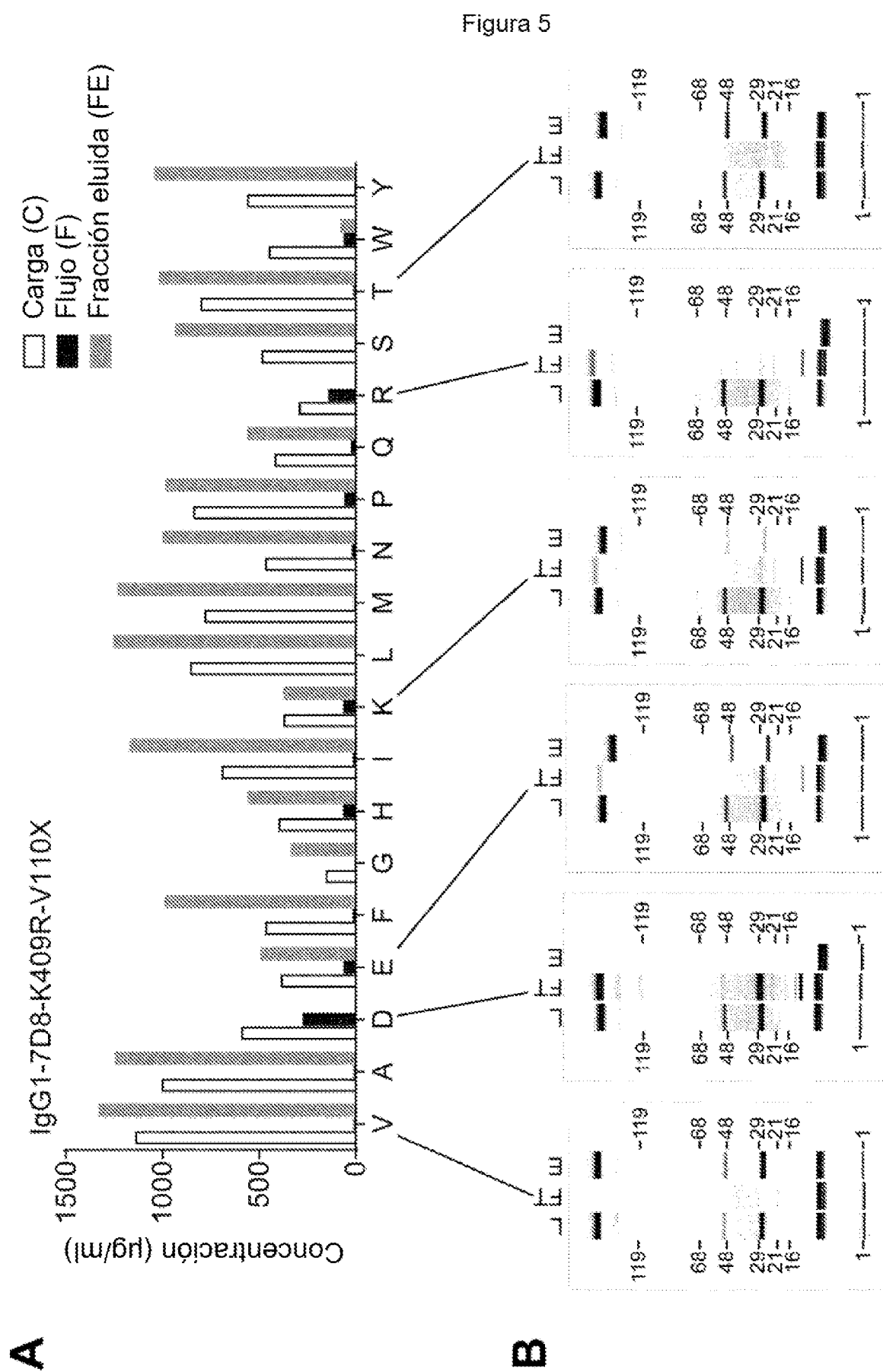


Figura 6

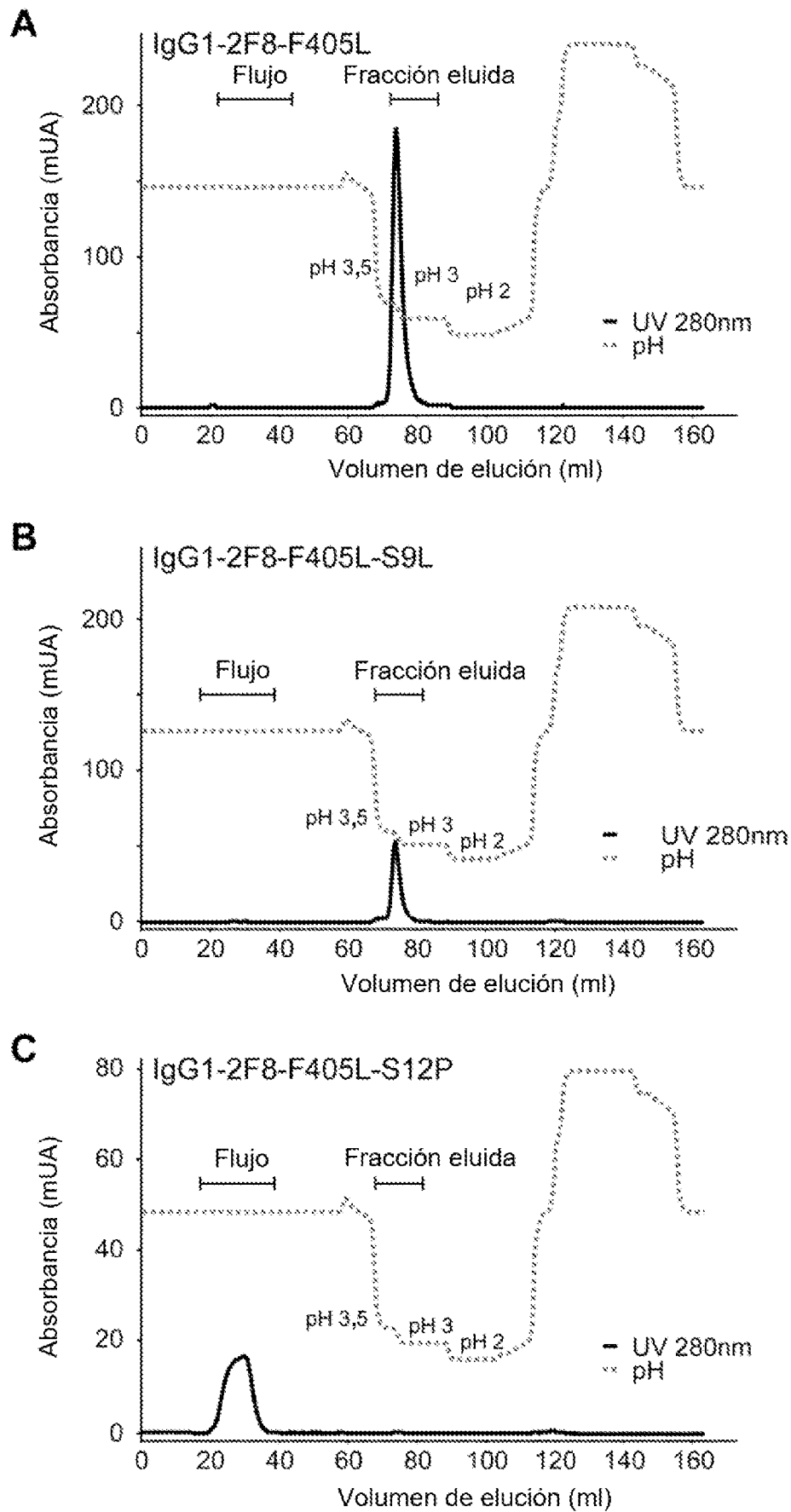


Figura 7

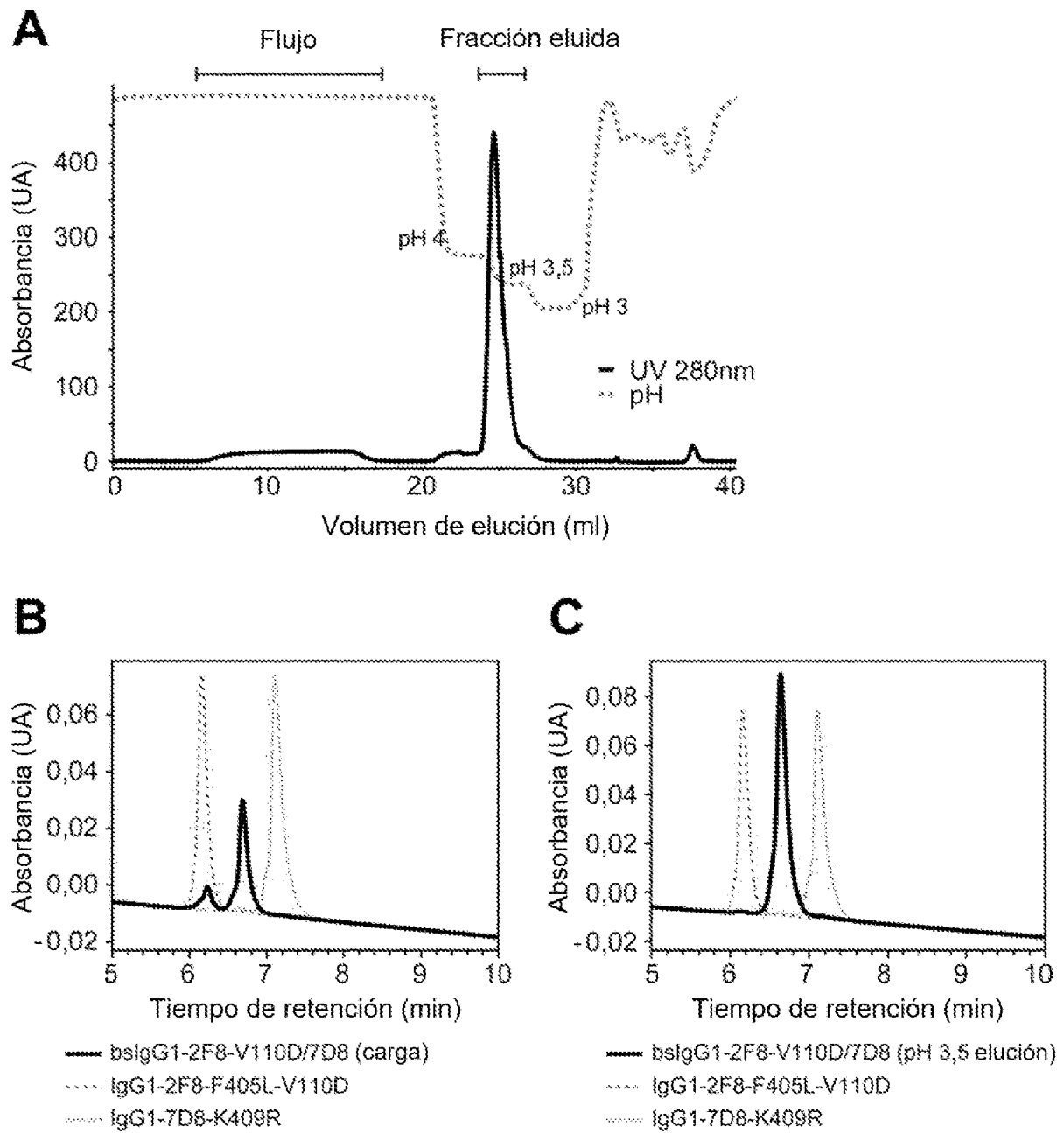
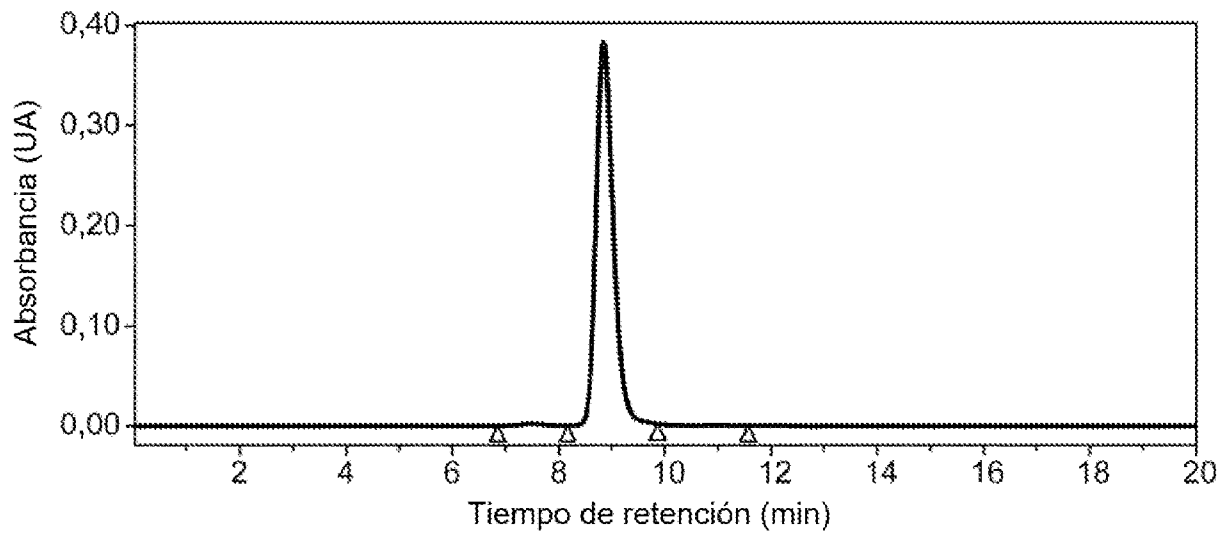


Figura 7 (continuación)

D



E

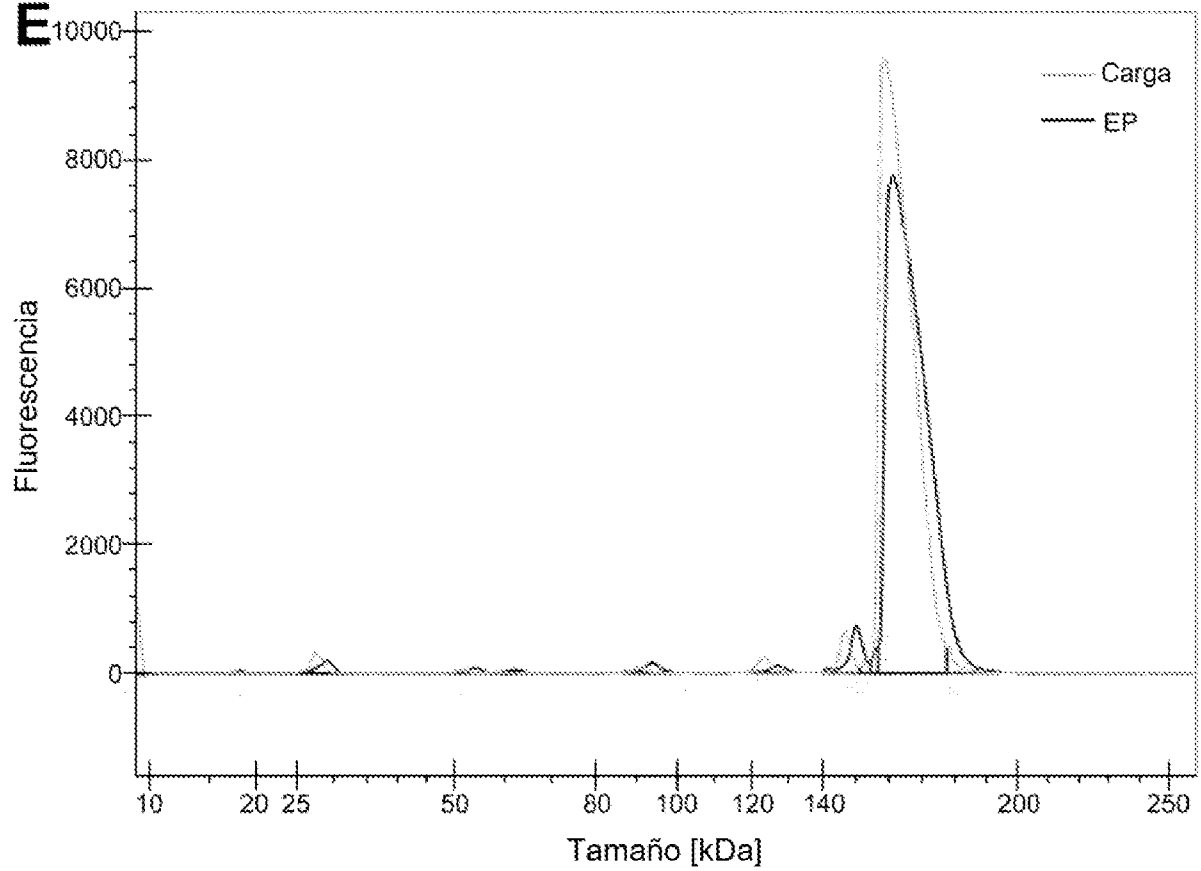


Figura 8

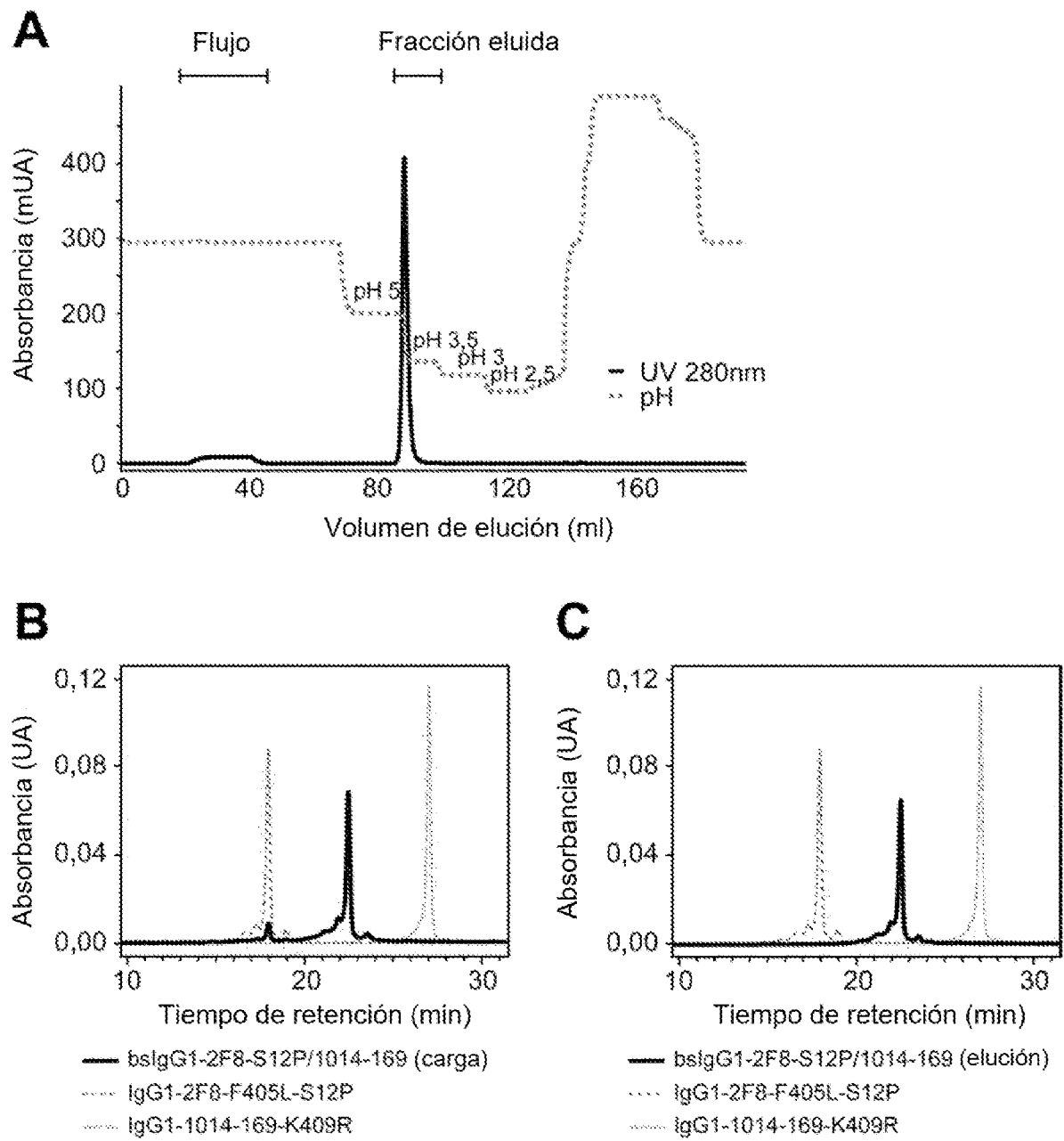
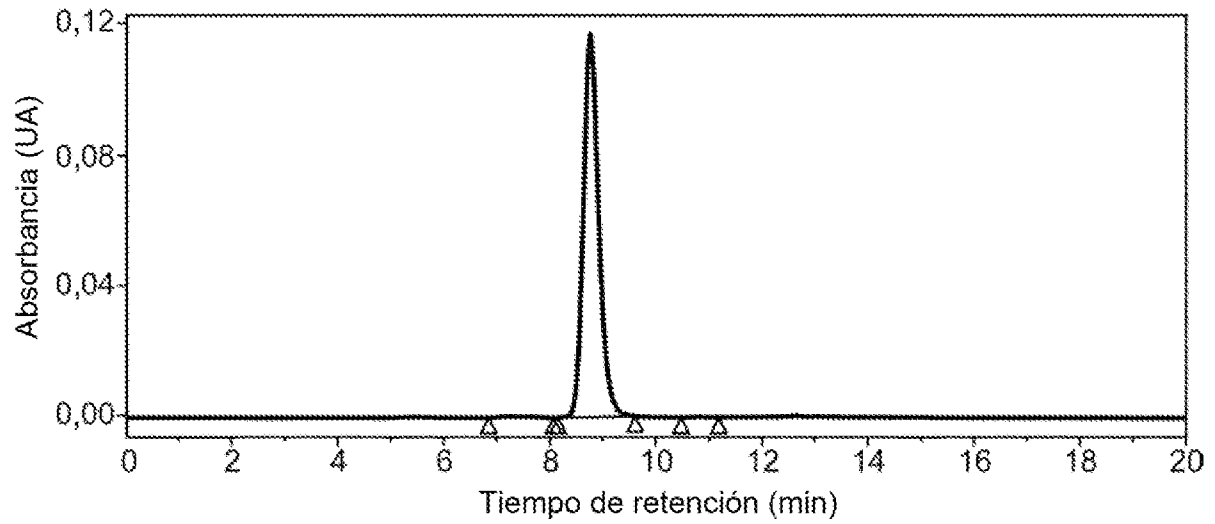


Figura 8 (continuación)

D



E

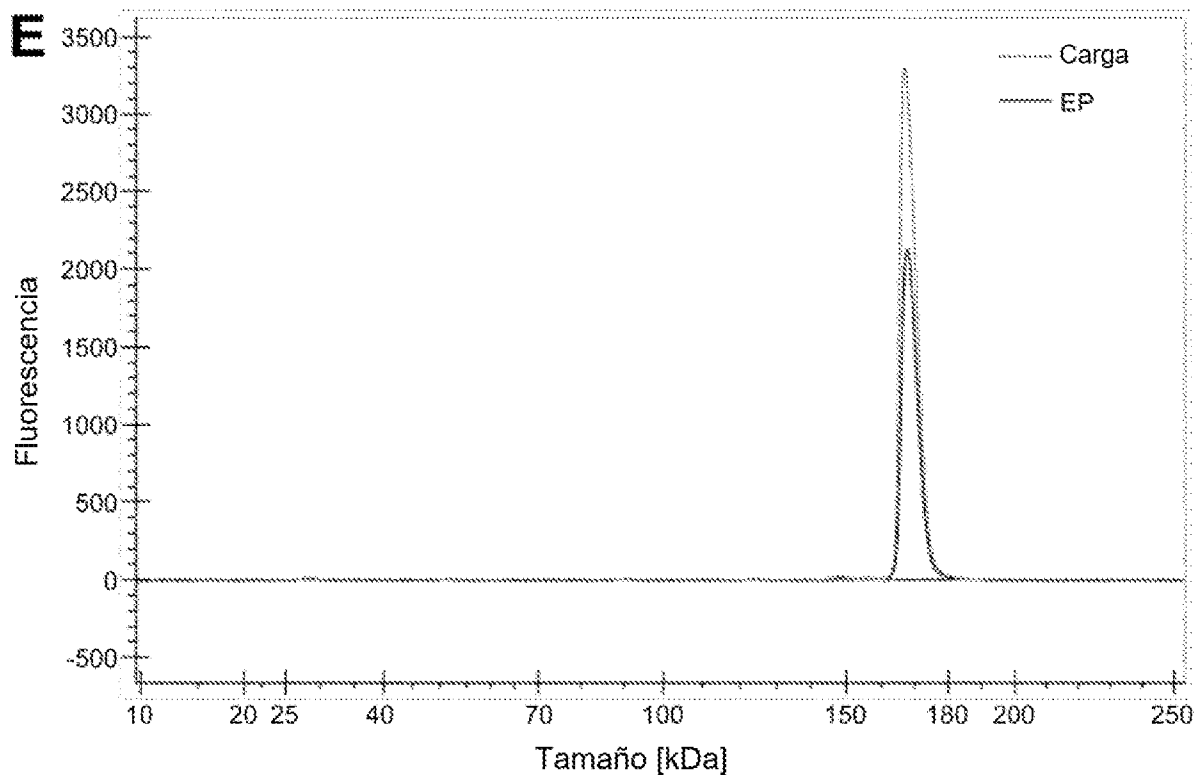


Figura 9

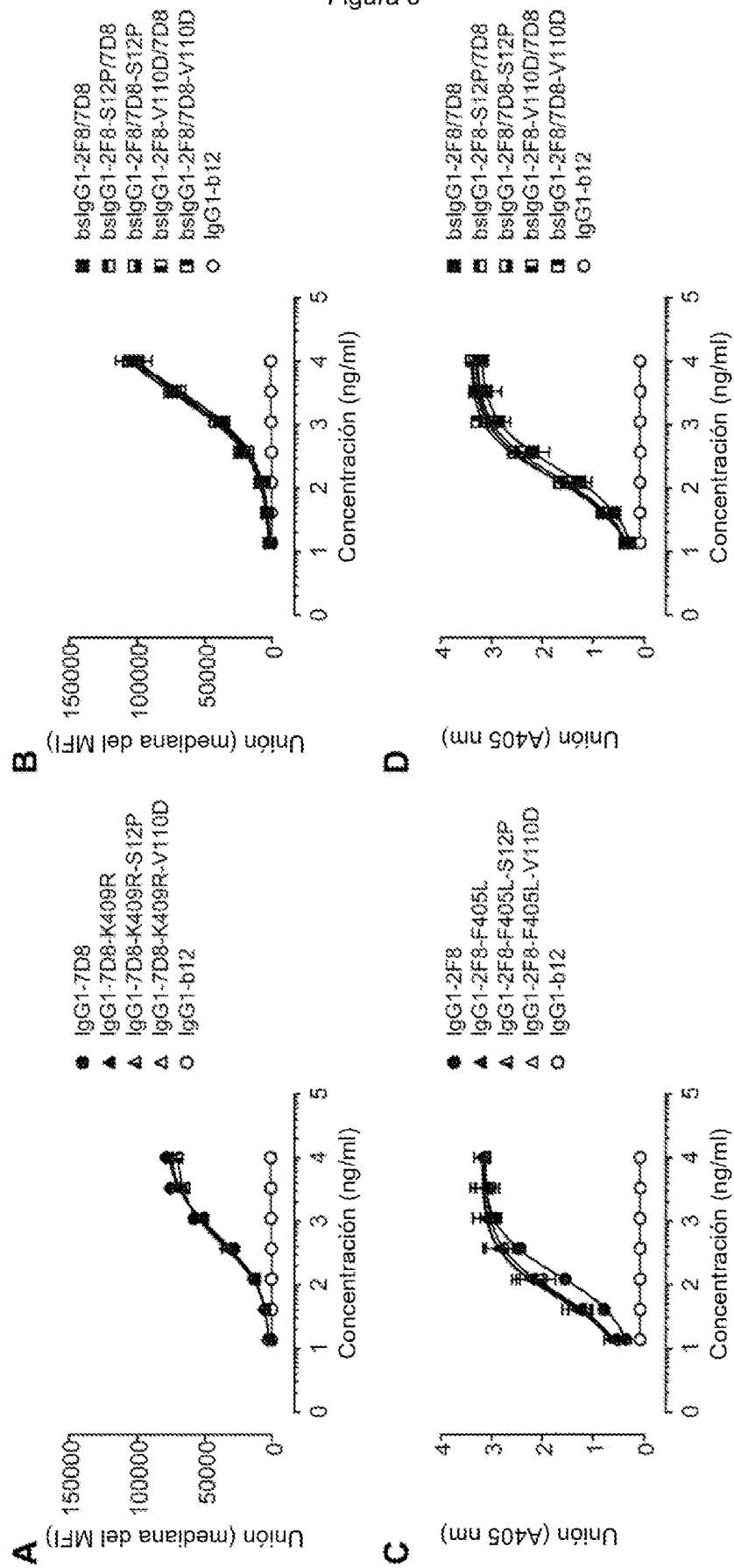


Figura 10

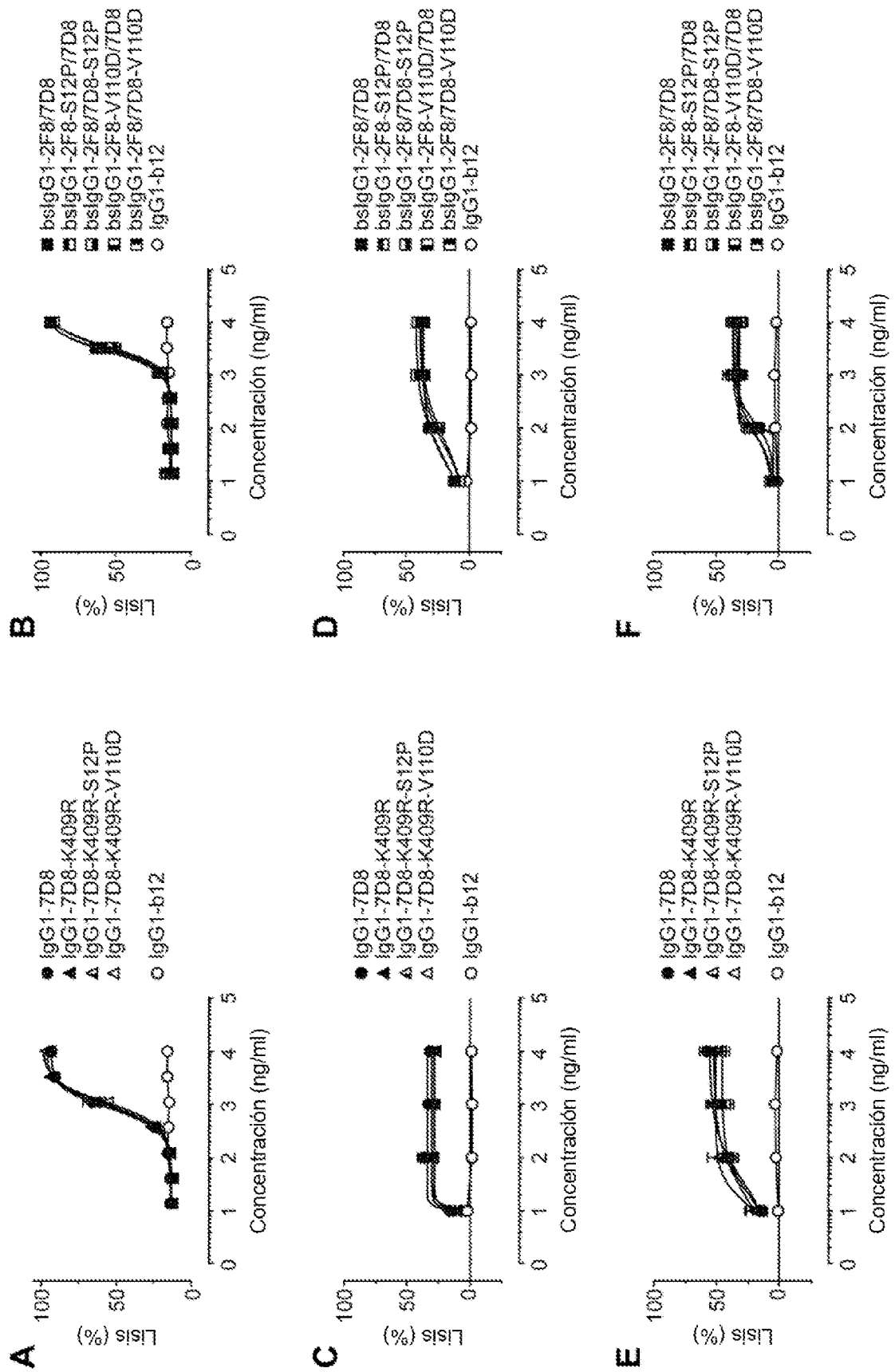


Figura 11

