

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 988 363**

51 Int. Cl.:

C07K 1/18 (2006.01)

C07K 1/22 (2006.01)

C07K 16/06 (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.06.2017** **PCT/US2017/038007**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.12.2017** **WO17218977**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2017** **E 17751870 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2024** **EP 3472177**

54 Título: **Purificación de anticuerpos multiespecíficos**

30 Prioridad:

17.06.2016 US 201662351908 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.11.2024

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

GIESE, GLEN SCOTT;
ROSENBERG, EVA;
SALLIER, BERNARD;
KONRAD, SUSANNE;
KOEHNLEIN, WOLFGANG;
WILLMANN, STEFFEN;
BIALAS, AGATHE;
KALEAS-CARROLL, KIMBERLY ANN y
YIGZAW, YINGES

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 988 363 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

Purificación de anticuerpos multiespecíficos

5 Campo de la invención

Se proporcionan procedimientos para purificar anticuerpos multiespecíficos de una composición que comprende el anticuerpo multiespecífico y al menos una impureza, que incluye al menos una impureza específica del producto. En algunos modos de realización, la impureza específica del producto es, por ejemplo, un precursor, agregado y/o variante del anticuerpo multiespecífico. También se proporcionan anticuerpos multiespecíficos purificados de acuerdo con los procedimientos, y composiciones y formulaciones que comprenden dichos anticuerpos multiespecíficos.

Antecedentes de la invención

Para que las proteínas biofarmacéuticas recombinantes sean aceptables para su administración a pacientes humanos, es importante que las impurezas residuales resultantes del procedimiento de fabricación y purificación se retiren del producto biológico final. Estos componentes del procedimiento incluyen proteínas de medio de cultivo, ligandos de afinidad por inmunoglobulinas, virus, endotoxina, ADN y proteínas de célula huésped (HCP). El desarrollo de nuevos formatos de anticuerpos, tales como los anticuerpos multiespecíficos, presenta nuevos desafíos, ya que los procedimientos convencionales de fabricación y purificación son inadecuados para retirar suficientemente las impurezas específicas del producto, que incluyen los brazos de anticuerpo no emparejados y los anticuerpos mal ensamblados.

En comparación con la purificación de anticuerpos estándar, la purificación de anticuerpos multiespecíficos de medios de producción presenta desafíos únicos. Mientras que un anticuerpo bivalente mono-específico estándar da como resultado la dimerización de subunidades idénticas de cadena pesada/cadena ligera, la producción de un anticuerpo multiespecífico requiere la dimerización de al menos dos subunidades diferentes de cadena pesada/cadena ligera, cada una comprendiendo una cadena pesada diferente así como una cadena ligera diferente. La producción y purificación del anticuerpo multiespecífico final correcto y completo, con cantidades mínimas de moléculas mal emparejadas, mal ensambladas o incompletas presenta diferentes desafíos. Con frecuencia se observan errores de emparejamiento de cadena (por ejemplo, homodimerización de péptidos idénticos de cadena pesada o asociaciones incorrectas de cadena pesada/cadena ligera), así como ensamblaje proteico incompleto debido a la expresión desequilibrada de las células huésped de las diferentes cadenas de anticuerpos. Las impurezas específicas del producto observadas habitualmente incluyen semianticuerpos ($1/2$) (que comprenden un único par de cadena pesada/cadena ligera), tres cuartos de anticuerpos ($3/4$) (que comprenden un anticuerpo completo que carece de una única cadena ligera) y homodímeros. Se pueden observar impurezas adicionales específicas del producto dependiendo del formato multiespecífico usado. Por ejemplo, cuando un dominio variable del anticuerpo multiespecífico se construye como un Fab monocatenario (scFab), se puede observar un subproducto de $5/4$ de anticuerpo (que comprende un dominio variable de la cadena pesada o ligera adicional). Dichas impurezas correspondientes específicas del producto no aparecerían en la producción de anticuerpos estándar.

Las técnicas de purificación convencionales diseñadas para retirar impurezas relacionadas con el procedimiento, tales como HCP, ADN, endotoxinas y otros materiales que tienen características y propiedades muy diferentes a las de los anticuerpos, pueden resultar inadecuadas cuando se implementan para retirar impurezas que son más similares a los anticuerpos multiespecíficos. Como tal, existe la necesidad de desarrollar esquemas de fabricación y purificación que retiren eficazmente las impurezas específicas del producto y proporcionen una cantidad suficiente del anticuerpo multiespecífico correcto y completo. El documento WO2015/070068 divulga un procedimiento para producir una preparación de anticuerpo con impurezas reducidas usando dos etapas diferentes de cromatografía de modo mixto. Los documentos WO2016/018740 y XIAOYU YANG *et al.* (Analysis and purification of IgG4 bispecific antibodies by a mixed-mode chromatography, 2015) divulgan procedimientos para purificar un anticuerpo bispecífico.

55 Sumario de la invención

El alcance de la invención se define por las reivindicaciones.

Como se describe y ejemplifica en el presente documento, los solicitantes han descubierto que el uso de al menos dos etapas de cromatografía de modo mixto (también denominada en el presente documento multi-modal o multimodal) después de una etapa de cromatografía de captura inicial da como resultado una mayor retirada de las impurezas específicas del producto y un procedimiento mejorado para purificar anticuerpos multiespecíficos.

Por tanto, un modo de realización de la presente invención es un procedimiento para purificar un anticuerpo multiespecífico de una composición que comprende el anticuerpo multiespecífico y una impureza, en el que el anticuerpo multiespecífico comprende múltiples brazos, cada brazo comprendiendo una unidad de VH/VL, en el

que cada brazo del anticuerpo multiespecífico se produce por separado, comprendiendo el procedimiento las etapas secuenciales de

a) someter cada brazo del anticuerpo multiespecífico a cromatografía de captura para producir eluidos de captura para cada brazo del anticuerpo multiespecífico,

b) formar una mezcla que comprende eluidos de captura de cada brazo del anticuerpo multiespecífico en condiciones suficientes para producir una composición que comprende el anticuerpo multiespecífico,

c) someter la composición que comprende el anticuerpo multiespecífico a una primera cromatografía de modo mixto para generar un primer eluido de modo mixto, y

d) someter el primer eluido de modo mixto a una segunda cromatografía de modo mixto para generar un segundo eluido de modo mixto, y

e) recoger una fracción que comprende el anticuerpo multiespecífico,

en el que el procedimiento reduce la cantidad de una impureza específica del producto de la composición, en el que la impureza específica del producto es uno o más de brazos de anticuerpo no emparejados y homodímeros de anticuerpos,

en el que a) la primera cromatografía de modo mixto es una cromatografía de intercambio catiónico de modo mixto y la segunda cromatografía de modo mixto es una cromatografía de intercambio aniónico de modo mixto; o

en el que b) la primera cromatografía de modo mixto es una cromatografía de intercambio aniónico de modo mixto y la segunda cromatografía de modo mixto es una cromatografía de intercambio catiónico de modo mixto; en el que la cromatografía de intercambio aniónico de modo mixto comprende una amina cuaternaria y un resto hidrófobo y la cromatografía de intercambio catiónico de modo mixto comprende una N-bencil-n-metiletanolamina,

en el que el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo biespecífico;

y en el que el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo biespecífico de botón en ojal (KiH).

En un modo de realización, la primera cromatografía de modo mixto se lleva a cabo en modo de unión y elución o en modo de flujo continuo.

En un modo de realización, la segunda cromatografía de modo mixto se lleva a cabo en modo de unión y elución o en modo de flujo continuo.

En un modo de realización, la cromatografía de intercambio aniónico de modo mixto comprende una amina cuaternaria y un resto hidrófobo enlazado a agarosa altamente reticulada.

En un modo de realización, la fracción contiene al menos un 95 % de anticuerpo multiespecífico.

En un modo de realización, la fracción contiene no más de un 5 % de brazos de anticuerpo no emparejados o no más de un 5 % de homodímeros de anticuerpos.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1A representa un primer esquema de purificación usado en el ejemplo 1.

La FIG. 1B representa un segundo esquema de purificación usado en el ejemplo 1.

La FIG. 1C representa un tercer esquema de purificación usado en el ejemplo 1.

La FIG. 2 representa un esquema de purificación usado en el ejemplo 2.

La FIG. 3A representa un primer esquema de purificación usado en el ejemplo 3.

La FIG. 3B representa un segundo esquema de purificación usado en el ejemplo 3.

La FIG. 4 representa un esquema de purificación usado en el ejemplo 4.

La FIG. 5A representa un primer esquema de purificación usado en el ejemplo 6.

La FIG. 5B representa un segundo esquema de purificación usado en el ejemplo 6.

La FIG. 6A representa un primer esquema de purificación usado en el ejemplo 7.

La FIG. 6B representa un segundo esquema de purificación usado en el ejemplo 7.

La FIG. 7A representa un primer esquema de purificación descrito en el ejemplo 8.

La FIG. 7B representa un segundo esquema de purificación descrito en el ejemplo 8.

La FIG. 7C representa un tercer esquema de purificación descrito en el ejemplo 8.

Descripción detallada de la invención

El alcance de la invención se define por las reivindicaciones.

En el presente documento se proporcionan procedimientos para purificar un anticuerpo multiespecífico (tal como un anticuerpo biespecífico o un $F(ab')_2$ divalente) que comprende las etapas secuenciales de someter una composición que comprende el anticuerpo multiespecífico a a) cromatografía de captura, b) una primera cromatografía de modo mixto, y c) una segunda cromatografía de modo mixto. En la presente invención se proporcionan procedimientos para purificar un anticuerpo multiespecífico en el que los brazos individuales del anticuerpo multiespecífico se producen cada uno en cultivos separados y se purifican cada uno por separado mediante cromatografía de captura. Los brazos del anticuerpo purificado se ensamblan a continuación para producir el anticuerpo multiespecífico. A continuación, el anticuerpo multiespecífico ensamblado se somete a una primera cromatografía de intercambio de modo mixto seguido de una segunda cromatografía de modo mixto. Como se describe en más detalle a continuación, cada una de la cromatografía de captura, la primera cromatografía de modo mixto y/o la segunda cromatografía de modo mixto opcionalmente vienen precedidas y/o seguidas por una o más etapas de cromatografía adicionales. Los términos "cromatografía de modo mixto" y "cromatografía multimodal" se usan de manera intercambiable en el presente documento.

Se informa de composiciones que comprenden anticuerpos multiespecíficos que tienen niveles reducidos de una o más impurezas específicas del procedimiento y/o específicas del producto, tales como brazos de anticuerpo no emparejados, homodímeros, agregados, especies de bajo peso molecular, variantes ácidas y básicas. Se informa de composiciones que comprenden anticuerpos multiespecíficos que tienen niveles reducidos de una o más impurezas específicas del procedimiento, tales como, por ejemplo, proteína de célula huésped procariota, proteína de célula huésped eucariota (tales como proteínas de CHO o "CHOP"), ácido nucleico y chaperonas (tales como chaperonas procariotas, por ejemplo, FkpA, DsbA y DsbC).

Se informa de usos de los procedimientos como se informan en el presente documento para la purificación de un polipéptido heterodimérico que contiene Fc y para la reducción de impurezas relacionadas con polipéptidos heterodiméricos que contienen Fc. Se consigue una reducción mejorada de las impurezas específicas del producto. En el caso de impurezas específicas de CrossMab, se logra una reducción de, por ejemplo, $\frac{3}{4}$ de anticuerpos.

Definiciones

Los términos "polipéptido" y "proteína" se usan de manera intercambiable en el presente documento para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados, y se puede interrumpir por restos no aminoacídicos. Los términos también engloban un polímero de aminoácidos que se ha modificado naturalmente o por intervención; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glucosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de marcado. También se incluyen dentro de la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Los términos "polipéptido" y "proteína", como se usan en el presente documento, engloban específicamente anticuerpos.

Polipéptido "purificado" (por ejemplo, anticuerpo o inmunoadhesina) significa que se ha incrementado la pureza del polipéptido, de modo que exista en una forma que sea más pura que la que existe en su entorno natural y/o que cuando inicialmente se sintetiza y/o amplifica en condiciones de laboratorio. La pureza es un término relativo y no significa necesariamente pureza absoluta. Los términos "purificar", "separar" o "aislar", como se usan de manera intercambiable en el presente documento, se refieren a incrementar el grado de pureza de una molécula deseada (tal como un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico) a partir de una composición o muestra que comprende la molécula deseada y una o más impurezas. Típicamente, el grado de pureza de la molécula deseada se incrementa retirando (completa o parcialmente) al menos una impureza de la composición.

Un anticuerpo multiespecífico "que se une a un antígeno de interés" es uno que se une al antígeno, por ejemplo, una proteína, con suficiente afinidad, de modo que el anticuerpo multiespecífico sea útil como agente diagnóstico

y/o terapéutico en el reconocimiento de una proteína o una célula o un tejido que expresa la proteína, y no reacciona significativamente de forma cruzada con otras proteínas. En dichos modos de realización, el grado de unión del anticuerpo multiespecífico a una proteína "no diana" será menos de aproximadamente un 10 % de la unión del anticuerpo multiespecífico a su proteína diana particular según lo determinado por, por ejemplo, análisis de clasificación de células activada por fluorescencia (FACS), radioinmunoprecipitación (RIA) o ELISA, etc. Con respecto a la unión de un anticuerpo multiespecífico a una molécula diana, el término "unión específica" o "se une específicamente a" o es "específico para" un polipéptido particular o un epítipo en un polipéptido diana particular significa una unión que es diferente de forma medible de una interacción no específica (por ejemplo, una interacción no específica puede ser la unión a la una seroalbúmina bovina o caseína). La unión específica se puede medir, por ejemplo, determinando la unión de una molécula en comparación con la unión de una molécula de control. Por ejemplo, se puede determinar la unión específica por competencia con una molécula de control que sea similar a la diana, por ejemplo, un exceso de diana no marcada. En este caso, se indica la unión específica si la unión de la diana marcada a una sonda se inhibe de forma competitiva por la diana no marcada en exceso. El término "unión específica" o "se une específicamente a" o "es específico para" un polipéptido particular o un epítipo en una diana polipeptídica particular, como se usa en el presente documento, se puede presentar, por ejemplo, por una molécula que tiene una K_d para la diana de al menos aproximadamente 200 nM, de forma alternativa al menos aproximadamente 150 nM, de forma alternativa al menos aproximadamente 100 nM, de forma alternativa al menos aproximadamente 60 nM, de forma alternativa al menos aproximadamente 50 nM, de forma alternativa al menos aproximadamente 40 nM, de forma alternativa al menos aproximadamente 30 nM, de forma alternativa al menos aproximadamente 20 nM, de forma alternativa al menos aproximadamente 10 nM, de forma alternativa al menos aproximadamente 8 nM, de forma alternativa al menos aproximadamente 6 nM, de forma alternativa al menos aproximadamente 4 nM, de forma alternativa al menos aproximadamente 2 nM, de forma alternativa al menos aproximadamente 1 nM o una afinidad mayor. En un modo de realización, el término "unión específica" se refiere a la unión donde una proteína de unión a antígeno multiespecífica se une a un polipéptido particular o epítipo en un polipéptido particular sin unirse sustancialmente a ningún otro polipéptido o epítipo de polipéptido.

"Afinidad de unión" se refiere en general a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo multiespecífico) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique de otro modo, como se usa en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañero Y se puede representar en general por la constante de disociación (K_d). Por ejemplo, la K_d puede ser aproximadamente 200 nM o menos, aproximadamente 150 nM o menos, aproximadamente 100 nM o menos, aproximadamente 60 nM o menos, aproximadamente 50 nM o menos, aproximadamente 40 nM o menos, aproximadamente 30 nM o menos, aproximadamente 20 nM o menos, aproximadamente 10 nM o menos, aproximadamente 8 nM o menos, aproximadamente 6 nM o menos, aproximadamente 4 nM o menos, aproximadamente 2 nM o menos o aproximadamente 1 nM o menos. La afinidad se puede medir por procedimientos comunes conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. Los anticuerpos de baja afinidad en general se unen al antígeno lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad en general se unen al antígeno más rápidamente y tienden a permanecer unidos más tiempo. Una variedad de procedimientos de medición de la afinidad de unión son conocidos en la técnica, pudiéndose usar cualquiera de ellos para los propósitos de los procedimientos y las composiciones proporcionados en el presente documento.

En un modo de realización, la " K_d " o "valor de K_d " de acuerdo con la presente invención se mide usando ensayos de resonancia de plasmón superficial usando un BIAcore™-2000 o un BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con chips de CM5 de diana (por ejemplo, antígeno) inmovilizada a ~10 unidades de respuesta (UR). En resumen, se activan chips de biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore, Inc.) con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, en 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de la inyección a un caudal de 5 µl/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos sin reaccionar. Para las mediciones cinéticas, se inyectan diluciones en serie de dos veces de Fab (por ejemplo, de 0,78 nM a 500 nM) en PBS con Tween 20 al 0,05 % (PBST) a 25 °C a un caudal de aproximadamente 25 µl/min. Se calculan las tasas de asociación (k_{as}) y tasas de disociación (k_{dis}) usando un modelo de Langmuir de unión uno a uno sencillo (programa informático de evaluación de BIAcore versión 3.2) ajustando simultáneamente el sensograma de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (K_d) se calcula como la proporción k_{dis}/k_{as} . Véase, por ejemplo, Chen *et al.*, J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999). Si la velocidad de asociación excede $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ por el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, entonces la velocidad de asociación se puede determinar usando una técnica de extinción fluorescente que mide el incremento o disminución en la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda 16 nm) a 25 °C de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno como se mide en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con interrupción de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-Aminco serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

"Activo" o "actividad" para los propósitos del presente documento se refiere a la(s) forma(s) de un polipéptido (tal como un anticuerpo multiespecífico) que retiene(n) una actividad biológica y/o inmunológica de un polipéptido natural, en el que actividad "biológica" hace referencia a una función biológica (inhibidora o estimuladora) causada por un polipéptido natural que no sea la capacidad para inducir la producción de un anticuerpo contra un epítipo antigénico que posee un polipéptido natural, y una actividad "inmunológica" hace referencia a la capacidad para inducir la producción de un anticuerpo contra un epítipo antigénico que posee un polipéptido natural.

"Biológicamente activo" y "actividad biológica" y "características biológicas" con respecto a una proteína de unión a antígeno multiespecífica proporcionada en el presente documento, tal como un anticuerpo, fragmento o derivado del mismo, significa que tiene la capacidad de unirse a una molécula biológica, excepto cuando se especifique de otro modo.

El término "anticuerpo" en el presente documento se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpo siempre que presenten la actividad biológica deseada. El término "inmunoglobulina" (Ig) se usa de manera intercambiable con anticuerpo en el presente documento.

Los anticuerpos son moléculas de inmunoglobulina naturales que tienen estructuras variables, todas basadas en el plegamiento de inmunoglobulina. Por ejemplo, los anticuerpos IgG tienen dos cadenas "pesadas" y dos cadenas "ligeras" que se unen por enlaces disulfuro para formar un anticuerpo funcional. Cada cadena pesada y ligera comprende por sí misma una región "constante" (C) y una "variable" (V). Las regiones V determinan la especificidad de unión a antígeno del anticuerpo, mientras que las regiones C proporcionan soporte y función estructurales en las interacciones no específicas de antígeno con efectores inmunitarios. La especificidad de unión a antígeno de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo es la capacidad de un anticuerpo de unirse específicamente a un antígeno particular.

La especificidad de unión a antígeno de un anticuerpo se determina mediante las características estructurales de la región V. La variabilidad no se distribuye uniformemente en el tramo de 110 aminoácidos de los dominios variables. En cambio, las regiones V consisten en tramos relativamente invariables denominados regiones estructurales (FR) de 15-30 aminoácidos separados por regiones más cortas de variabilidad extrema denominadas "regiones hipervariables" que tienen cada una 9-12 aminoácidos de longitud. Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera naturales comprenden cada uno cuatro FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina β , conectadas mediante tres regiones hipervariables que forman bucles que conectan y, en algunos casos, forman parte de, la estructura de lámina β . Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen unidas en estrecha proximidad por las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

Cada región V comprende típicamente tres regiones determinantes de la complementariedad ("CDR", cada una de las cuales contiene un "bucle hipervariable") y cuatro regiones estructurales. Un sitio de unión de anticuerpo, la unidad estructural mínima necesaria para unirse con afinidad sustancial a un antígeno deseado concreto, por lo tanto, incluirá típicamente las tres CDR y al menos tres, preferentemente cuatro, regiones estructurales intercaladas entre ellas para mantener y presentar las CDR en la conformación apropiada. Los anticuerpos clásicos de cuatro cadenas tienen sitios de unión a antígeno que se definen por los dominios V_H y V_L en cooperación. Determinados anticuerpos, tales como anticuerpos de camello y tiburón, carecen de cadenas ligeras y se basan en sitios de unión formados únicamente por cadenas pesadas. Se pueden preparar inmunoglobulinas genomanipuladas de dominio único en las que los sitios de unión se forman por cadenas pesadas o cadenas ligeras solas, en ausencia de cooperación entre V_H y V_L .

El término "variable" se refiere al hecho de que determinadas porciones de los dominios variables difieren ampliamente en secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente por los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos llamados regiones hipervariables, tanto en los dominios variables de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se llaman regiones estructurales (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera naturales comprenden cada uno cuatro FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina β , conectadas mediante tres regiones hipervariables que forman bucles que conectan y, en algunos casos, forman parte de, la estructura de lámina β . Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen unidas en estrecha proximidad por las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

El término "región hipervariable", cuando se usa en el presente documento, se refiere a los residuos aminoacídicos de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable puede comprender residuos aminoacídicos de una "región determinante de la complementariedad" o "CDR" (por ejemplo, alrededor de aproximadamente los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el V_L, y alrededor de aproximadamente 31-35B (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el V_H (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. 1991)) y/o los residuos de un "bucle hipervariable" (por ejemplo, los residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el V_L, y 26-32 (H1), 52A-55 (H2) y 96-101 (H3) en el V_H (Chothia y Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)).

Los residuos de la "región estructural" o "FR" son los residuos del dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable, como se define en el presente documento.

La "región bisagra" en el contexto de un anticuerpo o semianticuerpo se define, en general, como el tramo de Glu216 a Pro230 de IgG1 humana (Burton, *Molec. Immunol.* 22:161-206 (1985)). Las regiones bisagra de otros isotipos de IgG se pueden alinear con la secuencia de IgG1 colocando el primer y último residuos de cisteína formando enlaces S-S entre cadenas pesadas en las mismas posiciones.

La "región bisagra inferior" de una región Fc se define normalmente como el tramo de residuos inmediatamente C terminal a la región bisagra, es decir, los residuos de 233 a 239 de la región Fc. Antes de la presente solicitud, la unión de FcγR se atribuía en general a residuos aminoacídicos en la región bisagra inferior de una región Fc de IgG.

El "dominio CH2" de una región Fc de IgG humana normalmente se extiende de aproximadamente el residuo 231 a aproximadamente el 340 de la IgG. El dominio CH2 es único porque no está estrechamente emparejado con otro dominio. Más bien, dos cadenas glucídicas ramificadas unidas a N se intercalan entre los dos dominios CH2 de una molécula de IgG natural intacta. Se ha especulado que el carbohidrato puede proporcionar un sustituto para el emparejamiento dominio-dominio y ayudar a estabilizar el dominio CH2. Burton, *Molec. Immunol.* 22:161-206 (1985).

El "dominio CH3" comprende el tramo de residuos C terminal a un dominio CH2 en una región Fc (es decir, de aproximadamente el residuo aminoacídico 341 a aproximadamente el residuo aminoacídico 447 de una IgG).

Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, que comprende preferentemente la región de unión a antígeno del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; diacuerpos en tándem (taDb), anticuerpos lineales (por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.641.870, ejemplo 2; Zapata *et al.*, *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062 (1995)); anticuerpos de un solo brazo, anticuerpos de dominio variable único, minicuerpos, moléculas de anticuerpo monocatenario; anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, incluyendo, pero sin limitarse a, Db-Fc, taDb-Fc, taDb-CH3, (scFV)₄-Fc, di-scFv, bi-scFv o (di,tri)-scFv en tándem); y ligadores biespecíficos de linfocitos T (BiTE).

La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab", y un fragmento "Fc" residual, una designación que refleja la capacidad de cristalizar fácilmente. El fragmento Fab consiste en una cadena L completa junto con el dominio de la región variable de la cadena H (VH) y el primer dominio constante de una cadena pesada (CH1). El tratamiento con pepsina de un anticuerpo proporciona un único fragmento F(ab')₂ grande que corresponde aproximadamente a dos fragmentos Fab unidos por disulfuro que tienen actividad de unión a antígeno divalente y todavía pueden reticular el antígeno. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por tener pocos residuos adicionales en el extremo carboxílico del dominio CH1, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra de anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para un Fab' en el que el/los residuo(s) de cisteína de los dominios constantes porta(n) un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También son conocidos otros acoplamiento químicos de fragmentos de anticuerpo.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento de antígeno y de unión a antígeno completo. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de una cadena pesada y de una cadena ligera en estrecha asociación no covalente. Es en esta configuración en la que las tres regiones hipervariables de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero V_H-V_L. Conjuntamente, las seis regiones hipervariables confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un dominio variable único (o la mitad de un Fv que comprenda solo tres regiones hipervariables específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que todo el sitio de unión.

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos residuos en el

extremo carboxílico del dominio CH1 de la cadena pesada, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para Fab' en el que el/los residuo(s) de cisteína de los dominios constantes porta(n) al menos un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se producían originalmente como pares de fragmentos Fab' que tenían cisteínas bisagra entre ellos. También son conocidos otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

Se pueden asignar las "cadenas ligeras" de los anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado a uno de dos tipos claramente distintos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, se pueden asignar anticuerpos a clases diferentes. Existen cinco clases principales de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de ellas se pueden dividir, además, en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos se llaman α, δ, ε, γ y μ, respectivamente. Son bien conocidas las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas.

Los fragmentos de anticuerpo "Fv monocatenario" o "scFv" comprenden los dominios V_H y V_L del anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. En algunos modos de realización, el polipéptido de Fv comprende además un conector polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que posibilita que el scFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de los scFv, véase, por ejemplo, Plückthun, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994).

El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo dichos fragmentos un dominio variable de la cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica (V_H-V_L). Usando un conector que sea demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se obliga a que los dominios se emparejen con los dominios complementarios de otra cadena y creen dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen más completamente, por ejemplo, en el documento EP 404.097; documento WO 93/11161; y Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

El término "semianticuerpo" o "hemímero", como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido de unión a antígeno monovalente. En determinados modos de realización, un semianticuerpo o hemímero comprende una unidad VH/VL y, opcionalmente, al menos una porción de un dominio constante de inmunoglobulina. En determinados modos de realización, un semianticuerpo o hemímero comprende una cadena pesada de inmunoglobulina asociada a una cadena ligera de inmunoglobulina, o un fragmento de unión a antígeno de la misma. En determinados modos de realización, un semianticuerpo o hemímero es monoespecífico, es decir, se une a un único antígeno o epítipo. Un experto en la técnica apreciará fácilmente que un semianticuerpo puede tener un dominio de unión a antígeno que consiste en un dominio variable único, por ejemplo, que se origina de un camélido.

El término "unidad VH/VL" se refiere a la región de unión a antígeno de un anticuerpo que comprende al menos una HVR VH y al menos una HVR VL. En determinados modos de realización, la unidad VH/VL comprende al menos una, al menos dos o las tres HVR VH y al menos una, al menos dos o las tres HVR VL. En determinados modos de realización, la unidad VH/VL comprende además al menos una porción de una región estructural (FR). En algunos modos de realización, una unidad VH/VL comprende tres HVR VH y tres HVR VL. En algunos modos de realización de este tipo, una unidad VH/VL comprende al menos una, al menos dos, al menos tres o las cuatro FR VH y al menos una, al menos dos, al menos tres o las cuatro FR VL.

El término "anticuerpo multiespecífico" se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente un anticuerpo que comprende un dominio de unión a antígeno que tiene especificidad poliepitópica (es decir, se puede unir específicamente a dos o más epítopos diferentes en una molécula biológica o se puede unir específicamente a epítopos en dos o más moléculas biológicas diferentes). En algunos modos de realización, un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo multiespecífico (tal como un anticuerpo biespecífico o un F(ab')₂ divalente) comprende dos unidades VH/VL, en el que una primera unidad VH/VL se une específicamente a un primer epítipo y una segunda unidad VH/VL se une específicamente a un segundo epítipo, en el que cada unidad VH/VL comprende un dominio variable de la cadena pesada (VH) y un dominio variable de la cadena ligera (VL). Dichos anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos de longitud completa, anticuerpos que tienen dos o más dominios VL y VH, fragmentos de anticuerpo tales como Fab, Fv, dsFv, scFv, diacuerpos, diacuerpos y triacuerpos biespecíficos, fragmentos de anticuerpo que se han enlazado covalente o no covalentemente. Una unidad VH/VL que comprende además al menos una porción de una región constante de cadena pesada y/o al menos una porción de una región constante de cadena ligera también se puede denominar "hemímero" o "semianticuerpo". En algunos modos de realización, un semianticuerpo comprende al menos una porción de una única región variable de cadena pesada y al menos una porción de una única región variable de cadena ligera. En algunos modos de realización de este tipo, un anticuerpo biespecífico que comprende dos semianticuerpos y se une a dos antígenos

comprende un primer semianticuerpo que se une al primer antígeno o primer epítipo pero no al segundo antígeno o segundo epítipo y un segundo semianticuerpo que se une al segundo antígeno o segundo epítipo y no al primer antígeno o primer epítipo. De acuerdo con algunos modos de realización, el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo IgG que se une a cada antígeno o epítipo con una afinidad de 5 M a 0,001 pM, de 3 M a 0,001 pM, de 1 M a 0,001 pM, de 0,5 M a 0,001 pM o de 0,1 M a 0,001 pM. En algunos modos de realización, un hemímero comprende una porción suficiente de una región variable de cadena pesada para permitir que se formen enlaces disulfuro intramoleculares con un segundo hemímero. En algunos modos de realización, un hemímero comprende una mutación de botón o una mutación de ojal, por ejemplo, para permitir la heterodimerización con un segundo hemímero o semianticuerpo que comprende una mutación de ojal o una mutación de botón complementaria. Las mutaciones de botón y las mutaciones de ojal se analizan más adelante.

Un "anticuerpo biespecífico" es un anticuerpo multiespecífico que comprende un dominio de unión a antígeno que se puede unir específicamente a dos epítopos diferentes en una molécula biológica o se puede unir específicamente a epítopos en dos moléculas biológicas diferentes. Un anticuerpo biespecífico también se puede denominar en el presente documento como que tiene "doble especificidad" o como "doblemente específico". A menos que se indique de otro modo, el orden en que se enumeran los antígenos unidos por un anticuerpo biespecífico en un nombre de anticuerpo biespecífico es arbitrario. En algunos modos de realización, un anticuerpo biespecífico comprende dos semianticuerpos, en los que cada semianticuerpo comprende una única región variable de cadena pesada y, opcionalmente, al menos una porción de una región constante de cadena pesada, y una única región variable de cadena ligera y, opcionalmente, al menos una porción de una región constante de cadena ligera. En determinados modos de realización, un anticuerpo biespecífico comprende dos semianticuerpos, en los que cada semianticuerpo comprende una única región variable de cadena pesada y una única región variable de cadena ligera y no comprende más de una única región variable de cadena pesada y no comprende más de una única región variable de la cadena ligera. En algunos modos de realización, un anticuerpo biespecífico comprende dos semianticuerpos, en los que cada semianticuerpo comprende una única región variable de cadena pesada y una única región variable de cadena ligera, y en los que el primer semianticuerpo se une a un primer antígeno y no a un segundo antígeno y el segundo semianticuerpo se une al segundo antígeno y no al primer antígeno.

El término tecnología "botón en ojal" o "KiH", como se usa en el presente documento, se refiere a la tecnología que dirige el emparejamiento de dos polipéptidos conjuntamente *in vitro* o *in vivo* introduciendo una protuberancia (botón) en un polipéptido y una cavidad (ojal) en el otro polipéptido en una interfase en la que interactúan. Por ejemplo, se han introducido KiH en las interfases de unión Fc:Fc, interfases CL:CH1 o interfases VH/VL de anticuerpos (véanse, por ejemplo, los documentos US 2011/0287009, US2007/0178552, WO 96/027011, WO 98/050431 y Zhu *et al.* (1997) *Protein Science* 6:781-788). En algunos modos de realización, los KiH impulsan el emparejamiento entre sí de dos cadenas pesadas diferentes durante la fabricación de anticuerpos multiespecíficos. Por ejemplo, los anticuerpos multiespecíficos que tienen KiH en sus regiones Fc pueden comprender además dominios variables únicos enlazados a cada región Fc, o comprender además dominios variables de la cadena pesada diferentes que se emparejan con dominios variables de la cadena ligera similares o diferentes. También se puede usar la tecnología KiH para emparejar entre sí dos dominios extracelulares de receptores diferentes o cualquier otra secuencia polipeptídica que comprenda secuencias de reconocimiento de la diana diferentes (por ejemplo, que incluyan anticuerpos, peptidocuerpos y otras fusiones de Fc).

El término "mutación de botón", como se usa en el presente documento, se refiere a una mutación que introduce una protuberancia (botón) en un polipéptido en una interfase en la que el polipéptido interactúa con otro polipéptido. En algunos modos de realización, el otro polipéptido tiene una mutación de ojal (véanse, por ejemplo, los documentos US 5.731.168, US 5.807.706, US 5.821.333, US 7.695.936, US 8.216.805, cada uno incorporado en el presente documento a modo de referencia en su totalidad).

El término "mutación de ojal", como se usa en el presente documento, se refiere a una mutación que introduce una cavidad (ojal) en un polipéptido en una interfase en la que el polipéptido interactúa con otro polipéptido. En algunos modos de realización, el otro polipéptido tiene una mutación de botón (véanse, por ejemplo, los documentos US 5.731.168, US 5.807.706, US 5.821.333, US 7.695.936, US 8.216.805, cada uno incorporado en el presente documento a modo de referencia en su totalidad).

La expresión "anticuerpos de dominio único" (sdAb) o "anticuerpos de dominio variable único (SVD)" se refiere, en general, a anticuerpos en los que un dominio variable único (VH o VL) puede conferir unión a antígeno. En otras palabras, el dominio variable único no necesita interactuar con otro dominio variable para reconocer el antígeno diana. Los ejemplos de anticuerpos de dominio único incluyen los derivados de camélidos (llamas y camellos) y peces cartilaginosos (por ejemplo, tiburones nodriza) y los derivados de procedimientos recombinantes de anticuerpos humanos y de ratón (*Nature* (1989) 341:544-546; *Dev Comp Immunol* (2006) 30:43-56; *Trend Biochem Sci* (2001) 26:230-235; *Trends Biotechnol* (2003):21:484-490; documento WO 2005/035572; documento WO 03/035694; *FEBS Lett* (1994) 339:285-290; documento WO00/29004; documento WO 02/051870).

El término "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que

comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto por posibles variantes que pueden surgir durante la producción del anticuerpo monoclonal, estando presentes, en general, dichas variantes en cantidades despreciables. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en tanto que no están contaminados por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se debe interpretar como que requiere la producción del anticuerpo mediante ningún procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con los procedimientos proporcionados en el presente documento se pueden preparar mediante el procedimiento de hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, *Nature* 256:495 (1975), o se pueden preparar mediante procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también se pueden aislar de colecciones de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991), por ejemplo.

Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpos particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (patente de EE. UU. n.º 4.816.567; Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en el presente documento incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión a antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, mono del viejo mundo, tal como babuino, macaco de la India o macaco cangrejero) y secuencias de la región constante humanas (patente de EE. UU. n.º 5.693.780).

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano, que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región estructural (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donante. Se pueden preparar estas modificaciones para refinar adicionalmente el funcionamiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana, excepto por las sustituciones en FR como se indica anteriormente. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véanse Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992).

Para los propósitos del presente documento, un "anticuerpo intacto" es uno que comprende dominios variables pesados y ligeros, así como una región Fc. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia natural (por ejemplo, dominios constantes de secuencia natural humana) o una variante de secuencia de aminoácidos de los mismos. Preferentemente, el anticuerpo intacto tiene una o más funciones efectoras.

Los "anticuerpos naturales" son normalmente glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 dalton, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera se enlaza a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro covalente, aunque el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de isotipos de inmunoglobulina diferentes. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracatenarios espaciados regularmente. Cada cadena pesada tiene, en un extremo, un dominio variable (V_H) seguido de varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable (V_L) en un extremo y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera se alinea con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que residuos aminoácidos particulares forman una interfase entre los dominios variables de la cadena ligera y de la cadena pesada.

Un "anticuerpo no marcado" es un anticuerpo (como se define en el presente documento) que no se conjuga con una molécula heteróloga, tal como un resto citotóxico o radiomarcador.

Como se usa en el presente documento, el término "inmunoadhesina" designa moléculas que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una "adhesina") con las funciones efectoras de los dominios constantes de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmunoadhesinas comprenden una fusión de una secuencia

de aminoácidos con una especificidad de unión deseada, siendo dicha secuencia de aminoácidos distinta del sitio de reconocimiento y unión a antígeno de un anticuerpo (es decir, es "heteróloga" en comparación con una región constante de un anticuerpo), y una secuencia del dominio constante de inmunoglobulina (por ejemplo, secuencia del CH2 y/o CH3 de una IgG). Las secuencias de adhesina ejemplares incluyen secuencias de aminoácidos contiguas que comprenden una porción de un receptor o un ligando que se une a una proteína de interés. Las secuencias de adhesinas también pueden ser secuencias que se unen a una proteína de interés, pero no son secuencias de receptor o ligando (por ejemplo, secuencias de adhesina en peptidocitos). Dichas secuencias polipeptídicas se pueden seleccionar o identificar por diversos procedimientos, incluyen técnicas de presentación en fagos y procedimientos de clasificación de alto rendimiento. La secuencia del dominio constante de inmunoglobulina en la inmunoadhesina se puede obtener a partir de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3 o IgG-4, IgA (incluyendo IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD o IgM.

En determinados modos de realización, la región Fc que contiene el polipéptido heterodimérico es un anticuerpo, un anticuerpo biespecífico o proteínas de fusión Fc.

En determinados modos de realización, la proteína de fusión Fc producida de acuerdo con un procedimiento proporcionado en el presente documento es una inmunocitocina dirigida. En determinados modos de realización, la inmunocitocina dirigida es una inmunocitocina CEA-IL2v. En determinados modos de realización, la inmunocitocina CEA-IL2v es RG7813. En determinados modos de realización, la inmunocitocina dirigida es una inmunocitocina FAP-IL2v. En determinados modos de realización, la inmunocitocina FAP-IL2v es RG7461.

En determinados modos de realización, un anticuerpo multiespecífico (tal como un anticuerpo biespecífico) producido de acuerdo con un procedimiento proporcionado en el presente documento se une a CEA y a al menos una molécula diana adicional. En determinados modos de realización, un anticuerpo multiespecífico (tal como un anticuerpo biespecífico) producido de acuerdo con un procedimiento proporcionado en el presente documento se une a una citocina dirigida a tumor y a al menos una molécula diana adicional. En determinados modos de realización, un anticuerpo multiespecífico producido de acuerdo con un procedimiento proporcionado en el presente documento se fusiona a IL2v (es decir, una variante de interleucina 2) y a al menos una molécula diana adicional. En determinados modos de realización, un anticuerpo multiespecífico producido de acuerdo con un procedimiento proporcionado en el presente documento es un anticuerpo biespecífico de linfocitos T (es decir, un ligador biespecífico de linfocitos T o BiTE).

En algunos modos de realización, las "funciones efectoras" de un anticuerpo se refieren a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia natural o una región Fc de variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo y varían con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento; unión al receptor de Fc; citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación por disminución de receptores de superficie celular.

La "citotoxicidad dependiente del complemento" o "CDC" se refiere a la capacidad de una molécula de lisar una diana en presencia del complemento. La vía de activación del complemento se inicia mediante la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a una molécula (por ejemplo, un polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo)) que forma complejos con un antígeno afín. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996).

"Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos" y "ADCC" se refieren a una reacción celular en la que células citotóxicas inespecíficas que expresan los receptores de Fc (FcR) (por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen un anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente provocan la lisis de la célula diana. Las células primarias para mediar en la ADCC, los linfocitos NK, expresan solo FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés se puede realizar un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en la patente de EE. UU. n.º 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). De forma alternativa, o adicionalmente, se puede evaluar *in vivo* la actividad de ADCC de la molécula de interés, por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 95:652-656 (1998).

Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. En algunos modos de realización, las células expresan al menos FcγRIII y llevan a cabo la función efectora ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que median en la ADCC incluyen leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica (PBMC), linfocitos citolíticos naturales (NK), monocitos, linfocitos T citotóxicos y neutrófilos; siendo preferentes los PBMC y los linfocitos NK.

Los términos "receptor de Fc" o "FcR" se usan para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. En algunos modos de realización, el FcR es un FcR humano de secuencia natural. Además, un FcR

preferente es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas empalmadas de forma alternativa de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor de activación") y FcγRIIB (un "receptor de inhibición"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplásmicos de los mismos. El receptor de activación FcγRIIA contiene un motivo tirosínico de activación del inmunorreceptor (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor de inhibición FcγRIIB contiene un motivo tirosínico de inhibición del inmunorreceptor (ITIM) en su dominio citoplásmico. (véase Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991); Capel *et al.*, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); y de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). Otros FcR, incluyendo los que se vayan a identificar en el futuro, se engloban por el término "FcR" en el presente documento. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)).

Los términos "célula huésped", "línea de células huésped" y "cultivo de células huésped" se usan de manera intercambiable y se refieren a células en las que se ha introducido ácido nucleico exógeno, incluyendo la descendencia de dichas células. Las células huésped incluyen "transformantes" y "células transformadas" que incluyen la célula transformada primaria y la descendencia derivada de la misma independientemente del número de pases. La descendencia puede no ser completamente idéntica en contenido de ácido nucleico a una célula original, sino que puede contener mutaciones. La descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la cribada o seleccionada en la célula transformada originalmente se incluye en el presente documento.

"Impurezas" se refiere a materiales que son diferentes del producto polipeptídico deseado. La impureza se puede referir a polipéptidos específicos del producto, tales como anticuerpos de un solo brazo y anticuerpos mal ensamblados, variantes de anticuerpos que incluyen variantes básicas y variantes ácidas, y agregados. Otras impurezas incluyen impurezas específicas del procedimiento que incluyen, sin limitación: materiales de la célula huésped tal como una proteína de célula huésped (HCP); proteína A lixiviada; ácido nucleico; otro polipéptido; endotoxina; contaminante vírico; componente del medio de cultivo celular, etc. En algunos ejemplos, la impureza puede ser una HCP de, por ejemplo, pero sin limitarse a, una célula bacteriana tal como una célula de *E. coli* (ECP), una célula de insecto, una célula procariota, una célula eucariota, una célula de levadura, una célula de mamífero, una célula aviar, una célula fúngica. En algunos ejemplos, la impureza puede ser una HCP de una célula de mamífero, tal como una célula CHO, es decir, una proteína de células CHO (CHOP). La impureza se puede referir a proteínas accesorias usadas para facilitar la expresión, plegamiento o ensamblaje de anticuerpos multiespecíficos; por ejemplo, chaperonas procariotas tales como FkpA, DsbA y DsbC.

"Complejo" o "en forma de complejos", como se usa en el presente documento, se refiere a la asociación de dos o más moléculas que interactúan entre sí a través de enlaces y/o fuerzas (por ejemplo, fuerzas de van der Waals, hidrófobas, hidrófilas) que no son enlaces peptídicos. En un modo de realización, el complejo es heteromultimérico. Se debe entender que el término "complejo proteico" o "complejo polipeptídico", como se usa en el presente documento, incluye complejos que tienen una entidad no proteica conjugada a una proteína en el complejo proteico (por ejemplo, incluyendo, pero sin limitarse a, moléculas químicas tales como una toxina o un agente de detección).

Un ácido nucleico "aislado" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se ha separado de un componente de su entorno natural. Un ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que contienen habitualmente la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente de forma extracromosómica o en una localización cromosómica que es diferente de su localización cromosómica natural.

El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia polipeptídica de referencia se define como el porcentaje de residuos aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos aminoácidos en la secuencia polipeptídica de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. Se puede lograr la alineación para los propósitos de determinación del porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos de diversas formas que están dentro de la habilidad en la técnica, por ejemplo, usando un programa informático disponible públicamente, tal como el programa informático BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar parámetros apropiados para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr la alineación máxima sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. En determinados modos de realización, los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos se generan usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 se creó por Genentech, Inc., y el código fuente se ha presentado con la documentación de usuario en la Oficina de Derechos de Autor de EE. UU., Washington D.C., 20559, donde se ha registrado con el n.º de registro de derechos de autor de EE. UU. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente de Genentech, Inc., South San Francisco, California, o se puede compilar a partir del código fuente. El programa ALIGN-2 se debe compilar para su uso en un sistema operativo UNIX, incluyendo UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias se establecen por el programa ALIGN-2 y no varían.

En situaciones donde se emplea ALIGN-2 para las comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos dada B (que se puede parafrasear de forma alternativa como una secuencia de aminoácidos dada A que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos dada B) se calcula como sigue:

100 veces la fracción X/Y

donde X es el número de residuos aminoacídicos puntuados como emparejamientos idénticos por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en esa alineación del programa de A y B, y donde Y es el número total de residuos aminoacídicos en B. Se apreciará que, si la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no igualará el % de identidad de secuencia de aminoácidos de B con respecto a A. A menos que se establezca específicamente de otro modo, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usados en el presente documento se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente precedente usando el programa informático ALIGN-2.

El término "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que está implicado en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo natural tienen, en general, estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones estructurales (FR) conservadas y tres regiones hipervariables (HVR). (Véase, por ejemplo, Kindt *et al.*, *Kuby Immunology*, 6.^a ed., W.H. Freeman and Co., página 91 (2007)). Un dominio VH o VL único puede ser suficiente para conferir especificidad de unión a antígeno. Además, los anticuerpos que se unen a un antígeno particular se pueden aislar usando un dominio VH o VL de un anticuerpo que se une al antígeno para cribar una colección de dominios VL o VH complementarios, respectivamente. Véase, por ejemplo, Portolano *et al.*, *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson *et al.*, *Nature* 352:624-628 (1991).

El término "vector", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede propagar otro ácido nucleico al que se enlaza. El término incluye el vector como una estructura de ácido nucleico autorreplicante, así como el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en la que se ha introducido. Determinados vectores pueden dirigir la expresión de los ácidos nucleicos a los que se enlazan de forma funcional. Dichos vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión".

El término "secuencial", como se usa en el presente documento con respecto a la cromatografía, se refiere a etapas de cromatografía en una secuencia específica; por ejemplo, una primera etapa de cromatografía seguida de una segunda etapa de cromatografía seguida de una tercera etapa de cromatografía, etc. Se pueden incluir etapas adicionales entre las etapas de cromatografía secuenciales.

El término "continuo", como se usa en el presente documento con respecto a la cromatografía, se refiere a que presenta un primer material de cromatografía y un segundo material de cromatografía conectados directamente o algún otro mecanismo que permita un flujo continuo entre los dos materiales de cromatografía.

"Densidad de carga" se refiere a la cantidad, por ejemplo, gramos, de composición puesta en contacto con un volumen de material de cromatografía, por ejemplo, litros. En algunos ejemplos, la densidad de carga se expresa en g/l.

Una "muestra" se refiere a una pequeña porción de una cantidad mayor de material. En general, las pruebas de acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento se realizan en una muestra. Típicamente, la muestra se obtiene de una preparación de polipéptidos recombinantes obtenida, por ejemplo, de líneas celulares que expresan el polipéptido recombinante cultivadas, también denominadas en el presente documento "líneas celulares de producto", o de células huésped cultivadas. Como se usa en el presente documento, las "células huésped" no contienen genes para la expresión de polipéptidos recombinantes de interés o productos. Se puede obtener una muestra de, por ejemplo, pero sin limitarse a, caldo de cultivo celular extraído, de un agrupamiento en curso en una determinada etapa en un procedimiento de purificación, o del producto purificado final. La muestra también puede incluir diluyentes, tampones, detergentes y especies contaminantes, desechos y similares que se encuentran mezclados con la molécula deseada (tal como un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico).

La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en el presente documento incluye (y describe) variaciones que se dirigen a ese valor o parámetro *per se*. Por ejemplo, la descripción en referencia a "aproximadamente X" incluye la descripción de "X".

Se entiende que los aspectos y modos de realización de la invención descrita en el presente documento incluyen "que comprende", "que consiste en" y "que consiste esencialmente en" aspectos y modos de realización.

Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un/a", "o" y "el/la"

incluyen las referencias plurales, a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. Se entiende que los aspectos y variaciones de la invención descrita en el presente documento incluyen "que consisten en" y/o "que consisten esencialmente en" aspectos y variaciones.

5 **Procedimientos de purificación de un anticuerpo multiespecífico**

En el presente documento se proporcionan procedimientos para purificar un anticuerpo multiespecífico. En determinados modos de realización, el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo biespecífico. En determinados modos de realización, el anticuerpo multiespecífico es un $F(ab')_2$ divalente que comprende un primer $F(ab)$ que se une a una primera diana y un segundo $F(ab)$ que se une a una segunda diana. En determinados modos de realización, el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo doblemente específico, es decir, un anticuerpo que tiene dos brazos de unión a antígeno que son idénticos en su secuencia de aminoácidos, y en el que cada brazo Fab puede reconocer dos antígenos (tal como un anticuerpo Fab de doble acción).

En algunos aspectos, la purificación del anticuerpo multiespecífico comprende las etapas secuenciales de cromatografía de captura, una primera cromatografía de modo mixto y una segunda cromatografía de modo mixto. En algunos modos de realización, el anticuerpo multiespecífico se ensambla después de la cromatografía de captura.

En algunos modos de realización, el anticuerpo multiespecífico (tal como un anticuerpo biespecífico o un $F(ab')_2$ divalente) comprende dos o más brazos de anticuerpo en los que diferentes brazos de anticuerpo se unen a diferentes epítomos. En determinados modos de realización, los diferentes epítomos están en el mismo antígeno. En determinados modos de realización, cada epítomo está en un antígeno diferente. En determinados modos de realización, los brazos de anticuerpo comprenden unidades VH/VL. En determinados modos de realización, los brazos de anticuerpo comprenden hemímeros, también conocidos como semianticuerpos. Para facilitar el ensamblaje, en determinados modos de realización, la cadena pesada de un brazo de anticuerpo se modifica para que comprenda un "botón" y la cadena pesada de otro brazo de anticuerpo comprende un "ojal", de modo que el botón de la primera cadena pesada encaje en el ojal de la segunda cadena pesada.

En determinados modos de realización, cada brazo del anticuerpo multiespecífico se produce en un cultivo celular separado. Después de la expresión del brazo de anticuerpo en la célula huésped, se recoge y homogeneiza el caldo de células completas y se extrae el brazo de anticuerpo. En determinados modos de realización se añade polietilenimina (PEI) al lisado celular antes de la cromatografía. En algunos modos de realización, el lisado celular se centrifuga antes de la cromatografía. A continuación, cada brazo del anticuerpo multiespecífico se purifica mediante cromatografía de captura (de modo que cada brazo se purifica en una columna o membrana de cromatografía separada). En determinados modos de realización, la cromatografía de captura es una cromatografía de afinidad. En determinados modos de realización, la cromatografía de afinidad es una cromatografía con proteína A. En determinados modos de realización, la cromatografía de afinidad es una cromatografía con proteína G. En determinados modos de realización, la cromatografía de afinidad es una cromatografía con proteína A/G. En determinados modos de realización, la cromatografía de afinidad es una cromatografía con proteína L. Después de la cromatografía de captura, los brazos de anticuerpo purificados se pueden analizar; por ejemplo, mediante SDS-PAGE, cromatografía SEC, espectrometría de masas, etc. Los brazos purificados del anticuerpo multiespecífico se combinan a continuación y se deja que se ensamblen, como se analiza en más detalle en otra parte del presente documento.

En otros modos de realización, cada brazo del anticuerpo multiespecífico se produce en un cultivo celular separado. Después de la expresión del brazo de anticuerpo en la célula huésped, se recoge y homogeneiza el caldo de células completas. A continuación, se mezclan los homogeneizados celulares de cada cultivo y se extraen los brazos de anticuerpo combinados. En algunos modos de realización se añade polietilenimina (PEI) al lisado celular antes de la cromatografía. En algunos modos de realización, el lisado celular se centrifuga antes de la cromatografía. A continuación, los brazos combinados del anticuerpo multiespecífico se purifican mediante cromatografía de afinidad. En algunos modos de realización, la cromatografía de afinidad es una cromatografía con proteína A. En este punto, los brazos de anticuerpo purificados se pueden analizar; por ejemplo, mediante SDS-PAGE, cromatografía SEC, espectrometría de masas, etc. Los brazos purificados del anticuerpo multiespecífico se combinan a continuación y se deja que se ensamblen mediante los procedimientos descritos en el presente documento.

Se informa que el anticuerpo multiespecífico se produce en el mismo cultivo celular. Después de la expresión del brazo de anticuerpo en la célula huésped, se recoge y homogeneiza el caldo de células completas y se extraen los brazos de anticuerpo. En algunos modos de realización se añade polietilenimina (PEI) al lisado celular antes de la cromatografía. En algunos modos de realización, el lisado celular se centrifuga antes de la cromatografía. A continuación, los brazos del anticuerpo multiespecífico se purifican mediante cromatografía de afinidad. En algunos modos de realización, la cromatografía de afinidad es una cromatografía con proteína A. En este punto, los brazos de anticuerpo purificados se pueden analizar; por ejemplo, mediante SDS-PAGE, cromatografía SEC, espectrometría de masas, etc. Los brazos purificados del anticuerpo multiespecífico se deja que se ensamblan a continuación mediante los procedimientos descritos en el presente documento.

En algunos modos de realización, la concentración final de PEI en el lisado celular es al menos aproximadamente cualquiera de un 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 0,6 %, 0,7 %, 0,8 %, 0,9 %, 1,0 %, 2,0 %, 3,0 %, 4,0 % o 5,0 %. En algunos modos de realización, la concentración final de PEI en el lisado celular es de entre aproximadamente cualquiera de un 0,1 % y 5 %, 0,1 % y 1 %, 0,1 % y 0,5 %, 0,5 % y 5 %, 0,5 % y 1 % o 1 % y 5 %. En algunos modos de realización, el lisado celular que comprende PEI se mantiene durante más de aproximadamente cualquiera de 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 7 h, 8 h, 9 h, 10 h, 12 h, 14 h, 16 h, 18 h, 20 h o 24 h. En algunos modos de realización, el lisado celular que comprende PEI se mantiene durante entre aproximadamente uno cualquiera de 1 h y 24 h, 1 h y 6 h, 6 h y 12 h, 12 h y 18 h, 18 h y 24 h. En algunos modos de realización, el lisado celular que comprende PEI se mantiene durante entre aproximadamente uno cualquiera de 10 h y 14 h. En algunos modos de realización, el lisado celular que comprende PEI se mantiene entre aproximadamente 4 °C y 37 °C. En algunos modos de realización, el lisado celular que comprende PEI se mantiene aproximadamente a temperatura ambiente.

En algunos modos de realización, el lisado celular se clarifica por centrifugación antes de la cromatografía. En algunos modos de realización, el lisado celular se filtra antes de la cromatografía. En algunos modos de realización, el lisado celular se filtra a través de un filtro de 0,22 µm antes de la cromatografía.

Los ejemplos de cromatografía de afinidad incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, cromatografía con proteína A, cromatografía con proteína G, cromatografía con proteína A/G o cromatografía con proteína L. Los ejemplos de material de cromatografía de afinidad incluyen, pero no se limitan a, ProSep®-vA, ProSep® Ultra Plus, Protein A Sepharose® Fast Flow, Toyopearl® AF-rProtein A, MabSelect™, MabSelect SuRe™, MabSelect SuRe™ LX, KappaSelect, CaptureSelect™ y CaptureSelect™ FcXL. En determinados modos de realización, el material de cromatografía de afinidad está en una columna. En determinados modos de realización, la cromatografía de afinidad se realiza en "modo de unión y elución" (de forma alternativa, denominado "procedimiento de unión y elución"). "Modo de unión y elución" se refiere a una técnica de separación de productos en la que un producto (tal como el anticuerpo multiespecífico) en la muestra se une al material de cromatografía de afinidad y, posteriormente, se eluye del material de cromatografía de afinidad. En algunos modos de realización, la elución es una elución escalonada, en la que la composición de la fase móvil cambia de forma gradual, en una o varias ocasiones, durante el procedimiento de elución. En determinados modos de realización, la elución es una elución con gradiente, en la que la composición de la fase móvil cambia de forma continua durante el procedimiento de elución. En determinados modos de realización, el material de cromatografía de afinidad es una membrana. En determinados modos de realización, la cromatografía de afinidad es una cromatografía con proteína A. En determinados modos de realización, la cromatografía con proteína A es cromatografía con MAbSelect SuRe. En determinados modos de realización, la cromatografía de afinidad es cromatografía con CaptureSelect. En determinados modos de realización, la cromatografía de afinidad es cromatografía con CaptureSelect FcXL.

En determinados modos de realización, el eluido de la etapa de cromatografía de afinidad se aplica posteriormente a una primera cromatografía de modo mixto. En determinados modos de realización, el primer material de modo mixto comprende grupos funcionales capaces de una o más de las siguientes funcionalidades: intercambio aniónico, intercambio catiónico, enlaces de hidrógeno, interacciones de unión pi-pi, interacciones hidrófilas, interacciones tiófilas e interacciones hidrófobas. En determinados modos de realización, el primer material de modo mixto comprende grupos funcionales capaces de intercambio aniónico e interacciones hidrófobas. En determinados modos de realización, el primer material de modo mixto comprende grupos funcionales capaces de intercambio catiónico e interacciones hidrófobas. En determinados modos de realización, el primer material de modo mixto contiene N-bencil-N-metiletanolamina, 4-mercapto-etil-piridina, ácido 2-benzamido-4-mercaptobutanoico, hexilamina o fenilpropilamina, o polialilamina reticulada. Los ejemplos de materiales de modo mixto incluyen resina Capto™ Adhere, resina Capto™ MMC, resina MEP HyperCel™, resina HEA HyperCel™, resina PPA HyperCel™, Eshmuno® HCX, Capto™ Adhere ImpRes, Capto™ MMC Impres, membrana Nuvia™ cPrime™. En algunos modos de realización, el primer material de modo mixto es resina Capto™ Adhere. En determinados modos de realización, el primer material de modo mixto es resina Capto™ Adhere. En determinados modos de realización, el primer material de modo mixto es resina Capto™ MMC. En determinados modos de realización, la primera cromatografía de modo mixto no incluye cromatografía con hidroxiapatita cerámica. En determinados modos de realización, la primera cromatografía de modo mixto se realiza en modo de "unión y elución". En algunos modos de realización, la elución es una elución escalonada. En determinados modos de realización, la elución es elución con gradiente. En determinados modos de realización, la primera cromatografía de modo mixto se realiza en modo "de flujo continuo". En determinados modos de realización de lo anterior, el primer material de modo mixto está en una columna. En determinados modos de realización de lo anterior, el primer material de modo mixto está en una membrana.

En determinados modos de realización, la cromatografía de captura y la primera cromatografía de modo mixto son continuas, por ejemplo, en las que el material de cromatografía de captura y el primer material de modo mixto están conectados directamente o conectados mediante algún otro mecanismo que permite un flujo continuo entre el material de cromatografía de captura y el primer material de modo mixto. En determinados modos de realización, la cromatografía de captura y la primera cromatografía de modo mixto son contiguas, en las que la primera cromatografía de modo mixto se realiza directamente después de la cromatografía de captura.

En determinados modos de realización, el eluido de la cromatografía de captura se somete a una o más etapas adicionales de cromatografía antes de aplicarlo a la primera resina de modo mixto. Por ejemplo, el eluido de la cromatografía de captura se puede someter a una cualquiera de una o más de las siguientes etapas de cromatografía en cualquier orden y/o en cualquier combinación antes de someterse a una primera cromatografía de modo mixto: cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de afinidad, cromatografía con hidroxiapatita cerámica (CHT), cromatografía de líquidos de interacción hidrófila (HILIC), etc.

La cromatografía de interacción hidrófoba es una técnica de cromatografía de líquidos que separa biomoléculas de acuerdo con la hidrofobia. Los ejemplos de materiales de cromatografía HIC incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, Toyopearl® Hexyl-650, Toyopearl® Butyl-650, Toyopearl® Phenyl-650, Toyopearl® Ether-650, HiTrap® Sepharose, Octyl Sepharose®, Phenyl Sepharose® o Butyl Sepharose®. En algunos modos de realización, el material de cromatografía HIC comprende Phenyl Sepharose. En determinados modos de realización, la cromatografía HIC se realiza en modo de "unión y elución". En algunos modos de realización, la cromatografía HIC se realiza en modo "de flujo continuo". En algunos modos de realización de lo anterior, el material de cromatografía HIC está en una columna. En algunos modos de realización de lo anterior, el material de cromatografía HIC está en una membrana.

El material de cromatografía de intercambio aniónico es una fase sólida que está cargada positivamente y tiene aniones libres para intercambiarlos con aniones en una solución acuosa (tal como una composición que comprende un anticuerpo multiespecífico y una impureza) que se pasa sobre o a través de la fase sólida. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el material de intercambio aniónico puede ser una membrana, un monolito o resina. En un modo de realización, el material de intercambio aniónico puede ser una resina. En algunos modos de realización, el material de intercambio aniónico puede comprender una amina primaria, una amina secundaria, una amina terciaria o un grupo funcional de ion amonio cuaternario, un grupo funcional poliamina o un grupo funcional dietilaminoetilo. Los ejemplos de materiales de intercambio aniónico son conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, Poros® HQ 50, Poros® PI 50, Poros® D, Mustang® Q, Q Sepharose® Fast Flow (QSFF), resina Accell™ Plus Quaternary Methyl Amine (QMA), Sartobind STIC® y DEAE-Sepharose®. En algunos modos de realización, la cromatografía de intercambio aniónico se realiza en modo "de unión y elución". En algunos modos de realización, la cromatografía de intercambio aniónico se realiza en modo "de flujo continuo". En algunos modos de realización de lo anterior, el material de cromatografía de intercambio aniónico está en una columna. En algunos modos de realización de lo anterior, el material de cromatografía de intercambio aniónico es una membrana.

El material de cromatografía de intercambio catiónico es una fase sólida que está cargada negativamente y tiene aniones libres para intercambiarlos con cationes en una solución acuosa (tal como una composición que comprende un anticuerpo multiespecífico y una impureza) que se pasa sobre o a través de la fase sólida. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el material de intercambio catiónico puede ser una membrana, un monolito o resina. En algunos modos de realización, el material de intercambio catiónico puede ser una resina. El material de intercambio catiónico puede comprender un grupo funcional ácido carboxílico o un grupo funcional ácido sulfónico tal como, pero sin limitarse a, sulfonato, carboxílico, ácido carboximiltsulfónico, sulfoisobutilo, sulfoetilo, carboxilo, sulfopropilo, sulfonilo, sulfoxietilo u ortofosfato. En algunos modos de realización de lo anterior, el material de cromatografía de intercambio catiónico es una columna de cromatografía de intercambio catiónico. En algunos modos de realización de lo anterior, el material de cromatografía de intercambio catiónico es una membrana de cromatografía de intercambio catiónico. Los ejemplos de materiales de intercambio catiónico que se conocen en la técnica incluyen, pero no se limitan a, Mustang® S, Sartobind® S, SO₃ Monolith (tal como, por ejemplo, CIM®, CIMmultus® y CIMac® SO₃), S Ceramic HyperD®, Poros® XS, Poros® HS 50, Poros® HS 20, sulphopropyl-Sepharose® Fast Flow (SPSFF), SP-Sepharose® XL (SPXL), CM Sepharose® Fast Flow, Capto™ S, Fractogel® EMD Se Hicap, Fractogel® EMD SO₃⁻ o Fractogel® EMD COO⁻. En algunos modos de realización, la cromatografía de intercambio catiónico se realiza en modo "de unión y elución". En algunos modos de realización, la cromatografía de intercambio catiónico se realiza en modo "de flujo continuo". En algunos modos de realización de lo anterior, el material de cromatografía de intercambio catiónico está en una columna. En algunos modos de realización de lo anterior, el material de cromatografía de intercambio catiónico está en una membrana.

Los grupos funcionales del material de cromatografía con hidroxiapatita (Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂) comprenden pares de iones de calcio cristalinos (sitios C) cargados positivamente y grupos de seis átomos de oxígeno cargados negativamente asociados con tripletes de fosfatos cristalinos (sitios P). Los sitios C, los sitios P y los hidroxilos se distribuyen en un patrón fijo en la superficie cristalina. Típicamente, las proteínas se adsorben en hidroxiapatita en una concentración baja (por ejemplo, 10-25 mM) de tampón fosfato, aunque determinadas proteínas ácidas se pueden adsorber si se cargan en agua, solución salina o un tampón sin fosfato. Normalmente, las proteínas se eluyen mediante un gradiente creciente de fosfato, aunque también se pueden usar gradientes de iones Ca²⁺, Mg²⁺ o Cl⁻, tal como, por ejemplo, para la elución selectiva de proteínas básicas. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el material de cromatografía con hidroxiapatita puede ser una resina. En algunos modos de realización, el material de cromatografía con

hidroxiapatita puede ser una resina. En algunos modos de realización de lo anterior, el material de cromatografía con hidroxiapatita es una columna. Los ejemplos de materiales de cromatografía con hidroxiapatita que se conocen en la técnica incluyen, pero no se limitan a, CHT™ Ceramic Hydroxyapatite, soporte CHT Ceramic Hydroxyapatite Type I, soporte CHT Ceramic Hydroxyapatite Type II. En algunos modos de realización, la cromatografía con hidroxiapatita se realiza en modo "de unión y elución". En algunos modos de realización, la cromatografía con hidroxiapatita se realiza en modo "de flujo continuo".

En un modo de realización, el procedimiento como se informa en el presente documento puede comprender además un procedimiento para separar un anticuerpo biespecífico que comprende un dominio Fc de una solución que comprende dicho anticuerpo biespecífico, comprendiendo dicho procedimiento (a) poner en contacto dicha solución con un medio de cromatografía con hidroxiapatita, (b) adsorber dichos anticuerpos biespecíficos en dicho medio de cromatografía con hidroxiapatita, y (c) eluir dicho anticuerpo biespecífico de dicho medio de cromatografía con hidroxiapatita en presencia de iones cloruro, en el que dicha solución comprende además uno o más fragmentos de dicho anticuerpo biespecífico, dichos uno o más fragmentos comprenden un dominio Fc; y/o en el que dicha solución comprende además uno o más polipéptidos que tienen un peso molecular mayor que el peso molecular de dicho anticuerpo biespecífico y comprende al menos una de las dos cadenas pesadas de dicho anticuerpo biespecífico, dichos uno o más polipéptidos comprenden además un dominio Fc como se refiere en el documento WO2015024896.

En determinados modos de realización, el eluido de la cromatografía de captura se somete a cromatografía de intercambio aniónico. En determinados modos de realización, el material de cromatografía de intercambio aniónico es Q Sepharose® Fast Flow (QSFF). En determinados modos de realización, la cromatografía de intercambio aniónico se realiza en modo "de unión y elución".

En determinados modos de realización, un eluido recogido después de la primera cromatografía de modo mixto se aplica posteriormente a una segunda cromatografía de modo mixto. En determinados modos de realización, el segundo material de modo mixto comprende grupos funcionales capaces de una o más de las siguientes funcionalidades: intercambio aniónico, intercambio catiónico, enlaces de hidrógeno, interacciones de unión pi-pi, interacciones hidrófilas, interacciones tiófilas e interacciones hidrófobas. En determinados modos de realización, el segundo material de modo mixto comprende grupos funcionales capaces de intercambio aniónico e interacciones hidrófobas. En determinados modos de realización, el segundo material de modo mixto comprende grupos funcionales capaces de intercambio catiónico e interacciones hidrófobas. En determinados modos de realización, el segundo material de modo mixto contiene N-bencil-N-metiletanolamina, 4-mercapto-etil-piridina, ácido 2-benzamido-4-mercaptobutanoico, hexilamina o fenilpropilamina, o polialilamina reticulada. Los ejemplos de materiales de modo mixto incluyen resina Capto™ Adhere, resina Capto™ MMC, resina MEP HyperCel™, resina HEA HyperCel™, Eshmuno® HCX, Capto™ Adhere ImpRes, Capto™ MMC Impres, membrana Nuvia™ cPrime™. En algunos modos de realización, el segundo material de modo mixto es resina Capto™ Adhere. En determinados modos de realización, el segundo material de modo mixto es resina Capto™ Adhere. En determinados modos de realización, el segundo material de modo mixto es resina Capto™ MMC. En determinados modos de realización, la segunda cromatografía de modo mixto no incluye cromatografía con hidroxiapatita cerámica. En determinados modos de realización, la segunda cromatografía de modo mixto se realiza en modo de "unión y elución". En algunos modos de realización, la elución es una elución escalonada. En determinados modos de realización, la elución es elución con gradiente. En determinados modos de realización, la primera cromatografía de modo mixto se realiza en modo "de flujo continuo". En determinados modos de realización de lo anterior, el segundo material de modo mixto está en una columna. En determinados modos de realización de lo anterior, el segundo material de modo mixto es una membrana.

En determinados modos de realización, la primera cromatografía de modo mixto y la segunda cromatografía de modo mixto son continuas, por ejemplo, en las que el material de cromatografía de captura y el primer material de modo mixto están conectados directamente o conectados mediante algún otro mecanismo que permite un flujo continuo entre el material de cromatografía de captura y el primer material de modo mixto. En determinados modos de realización, la primera cromatografía de modo mixto y la segunda cromatografía de modo mixto son contiguas, en las que la segunda cromatografía de modo mixto se realiza directamente después de la primera cromatografía de modo mixto.

En determinados modos de realización, el eluido de la primera cromatografía de modo mixto se somete a una o más operaciones adicionales de cromatografía antes de aplicarlo a la segunda resina de modo mixto. Por ejemplo, el eluido de la primera cromatografía de modo mixto se puede someter a una cualquiera de una o más de las siguientes etapas de cromatografía en cualquier orden y/o en cualquier combinación antes de someterse a una segunda cromatografía de modo mixto: cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de afinidad, cromatografía con hidroxiapatita cerámica (CHT), cromatografía de líquidos de interacción hidrófila (HILIC), etc.

En determinados modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el eluido de la segunda cromatografía de modo mixto se somete a una o más etapas adicionales de cromatografía.

Por ejemplo, el eluido de la segunda cromatografía de modo mixto se puede someter a una cualquiera de una o más de las siguientes etapas de cromatografía en cualquier orden y/o en cualquier combinación: cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de afinidad, cromatografía con hidroxiapatita cerámica (CHT), cromatografía de líquidos de interacción hidrófila (HILIC), cromatografía de modo mixto, etc.

En determinados modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, los procedimientos comprenden el uso de un tampón. Se pueden emplear diversos tampones durante la purificación del anticuerpo multiespecífico dependiendo, por ejemplo, del pH deseado del tampón, la conductividad deseada del tampón, las características del anticuerpo multiespecífico que se está purificando y el procedimiento de purificación. El tampón puede ser un tampón de carga, un tampón de equilibrado o un tampón de lavado. En determinados modos de realización, uno o más del tampón de carga, el tampón de equilibrado y/o el tampón de lavado son iguales. En determinados modos de realización, el tampón de carga, el tampón de equilibrado y/o el tampón de lavado son diferentes. En determinados modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el tampón comprende una sal. En determinados modos de realización, el tampón comprende cloruro de sodio, acetato de sodio, Tris HCl, acetato de Tris, fosfato de sodio, fosfato de potasio, MES, CHES, MOPS, BisTris, arginina, arginina HCl o una mezcla de los mismos. En determinados modos de realización, el tampón es un tampón de cloruro de sodio. En algunos modos de realización, el tampón es un tampón de acetato de sodio. En determinados modos de realización, el tampón es tampón Tris, arginina, fosfato, MES, CHES o MOPS.

"Carga" se refiere a la composición que se carga en un material de cromatografía. El tampón de carga es el tampón usado para cargar la composición (por ejemplo, una composición que comprende un anticuerpo multiespecífico y una impureza o una composición que comprende un brazo de anticuerpo y una impureza) sobre un material de cromatografía (tal como uno cualquiera de los materiales de cromatografía descritos en el presente documento). El material de cromatografía se puede equilibrar con un tampón de equilibrado antes de cargar la composición que se va a purificar. El tampón de lavado se usa después de cargar la composición sobre un material de cromatografía. Se usa un tampón de elución para eluir el polipéptido de interés de la fase sólida.

La carga de una composición que comprende el anticuerpo multiespecífico (tal como una composición que comprende el anticuerpo multiespecífico y una impureza) en cualquiera de los materiales de cromatografía descritos en el presente documento se puede optimizar para la separación del anticuerpo multiespecífico de la impureza. En algunos modos de realización, la carga de la composición que comprende el anticuerpo multiespecífico (tal como una composición que comprende el anticuerpo multiespecífico y una impureza) sobre el material de cromatografía se optimiza para la unión del anticuerpo multiespecífico al material de cromatografía cuando la cromatografía se realiza en modo de unión y elución (por ejemplo, cromatografía de afinidad, cromatografía de modo mixto y cromatografía de intercambio iónico, como se designan en el presente documento).

Conductividad se refiere a la capacidad de una solución acuosa de conducir una corriente eléctrica entre dos electrodos. En solución, la corriente fluye mediante transporte iónico. Por lo tanto, con una cantidad creciente de iones presentes en la solución acuosa, la solución tendrá una conductividad mayor. La unidad de medida básica para la conductividad es el siemensio (mS/cm) o los ohmios (mho), y se puede medir usando un conductímetro, tal como diversos modelos de conductímetros Orion. Puesto que la conductividad electrolítica es la capacidad de los iones en una solución de transportar corriente eléctrica, se puede alterar la conductividad de una solución cambiando la concentración de iones en la misma. Por ejemplo, se pueden alterar la concentración de un agente de tamponamiento y/o la concentración de una sal (por ejemplo, cloruro de sodio, acetato de sodio o cloruro de potasio) en la solución para lograr la conductividad deseada. Preferentemente, se modifica la concentración de sal de los diversos tampones para lograr la conductividad deseada.

Por ejemplo, en determinados modos de realización, la composición que comprende el anticuerpo multiespecífico (tal como una composición que comprende el anticuerpo multiespecífico y una impureza) se carga sobre el material de cromatografía, por ejemplo, una columna de cromatografía que comprende uno cualquiera de los materiales de cromatografía descritos en el presente documento, en un tampón de carga a varios valores de pH diferentes mientras la conductividad del tampón de carga es constante. De forma alternativa, la solución que comprende el anticuerpo multiespecífico se puede cargar sobre el material de cromatografía en un tampón de carga a varias conductividades diferentes mientras que el pH del tampón de carga es constante. Una vez completada la carga de la composición que comprende el anticuerpo multiespecífico (tal como una composición que comprende el anticuerpo multiespecífico y una impureza) sobre el material de cromatografía y la elución del anticuerpo multiespecífico del material de cromatografía en una fracción de agrupamiento, la cantidad de impureza restante en la fracción de agrupamiento proporciona información con respecto a la separación del anticuerpo multiespecífico de la impureza para un pH o conductividad dado. Asimismo, para la cromatografía donde el anticuerpo multiespecífico fluye a través del material de cromatografía, el tampón de carga se optimiza para el pH y la conductividad, de modo que el anticuerpo multiespecífico fluya a través de la cromatografía mientras el material de cromatografía retiene la impureza o fluye a través del material de cromatografía a una velocidad diferente que el anticuerpo multiespecífico.

En algunos modos de realización, la densidad de carga de la solución que comprende el anticuerpo multiespecífico o los brazos de anticuerpo es mayor que aproximadamente cualquiera de 10 g/l, 20 g/l, 30 g/l, 40 g/l, 50 g/l, 60 g/l, 70 g/l, 80 g/l, 90 g/l, 100 g/l, 110 g/l, 120 g/l, 130 g/l, 140 g/l o 150 g/l del material de cromatografía de afinidad (por ejemplo, material de cromatografía con proteína A). En algunos modos de realización, la densidad de carga de la solución que comprende el anticuerpo multiespecífico o los brazos de anticuerpo es de entre aproximadamente cualquiera de 10 g/l y 20 g/l, 20 g/l y 30 g/l, 30 g/l y 40 g/l, 40 g/l y 50 g/l, 50 g/l y 60 g/l, 60 g/l y 70 g/l, 70 g/l y 80 g/l, 80 g/l y 90 g/l, 90 g/l y 100 g/l del material de cromatografía de captura (tal como un material de cromatografía de afinidad, por ejemplo, un material de cromatografía con proteína A, un material de cromatografía con proteína G, un material de cromatografía con proteína A/G o un material de cromatografía con proteína L).

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el eluido obtenido después de la cromatografía de captura se carga sobre un material de cromatografía de intercambio aniónico (por ejemplo, Q Sepharose® Fast Flow (QSFF)). En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el eluido obtenido después de la cromatografía de captura se carga sobre un material de cromatografía de intercambio aniónico a una densidad de carga del anticuerpo multiespecífico mayor que aproximadamente cualquiera de 30 g/l, 40 g/l, 50 g/l, 60 g/l, 70 g/l, 80 g/l, 90 g/l, 100 g/l, 110 g/l, 120 g/l, 130 g/l, 140 g/l o 150 g/l del material de cromatografía de intercambio aniónico (por ejemplo, Q Sepharose® Fast Flow (QSFF)). En algunos modos de realización, el eluido obtenido después de la cromatografía de captura se carga sobre un material de cromatografía de intercambio aniónico a una densidad de carga del anticuerpo multiespecífico entre aproximadamente cualquiera de 10 g/l y 20 g/l, 20 g/l y 30 g/l, 30 g/l y 40 g/l, 40 g/l y 50 g/l, 50 g/l y 60 g/l, 60 g/l y 70 g/l, 70 g/l y 80 g/l, 80 g/l y 90 g/l, 90 g/l y 100 g/l del material de cromatografía de intercambio aniónico (por ejemplo, Q Sepharose® Fast Flow (QSFF)).

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el eluido obtenido después de la cromatografía de captura (opcionalmente después de la cromatografía de captura y una o más etapas adicionales de cromatografía que comprenden cualquiera de las operaciones de cromatografía descritas en el presente documento) se carga sobre un primer material de cromatografía de modo mixto a una densidad de carga del anticuerpo multiespecífico mayor que aproximadamente cualquiera de 30 g/l, 40 g/l, 50 g/l, 60 g/l, 70 g/l, 80 g/l, 90 g/l, 100 g/l, 110 g/l, 120 g/l, 130 g/l, 140 g/l, o 150 g/l del primer material de cromatografía de modo mixto (por ejemplo, material de cromatografía Capto™ Adhere o un material de cromatografía Capto™ MMC). En algunos modos de realización, el eluido obtenido después de la cromatografía de captura se carga sobre un primer material de cromatografía de modo mixto a una densidad de carga del anticuerpo multiespecífico entre aproximadamente cualquiera de 10 g/l y 20 g/l, 20 g/l y 30 g/l, 30 g/l y 40 g/l, 40 g/l y 50 g/l, 50 g/l y 60 g/l, 60 g/l y 70 g/l, 70 g/l y 80 g/l, 80 g/l y 90 g/l, 90 g/l y 100 g/l del primer material de cromatografía de modo mixto (por ejemplo, material de cromatografía Capto™ Adhere o un material de cromatografía Capto™ MMC).

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el eluido obtenido después de la primera cromatografía de modo mixto se carga sobre un segundo material de cromatografía de modo mixto a una densidad de carga del anticuerpo multiespecífico mayor que aproximadamente cualquiera de 30 g/l, 40 g/l, 50 g/l, 60 g/l, 70 g/l, 80 g/l, 90 g/l, 100 g/l, 110 g/l, 120 g/l, 130 g/l, 140 g/l, o 150 g/l del segundo material de cromatografía de modo mixto (por ejemplo, material de cromatografía Capto™ Adhere o un material de cromatografía Capto™ MMC). En algunos modos de realización, el eluido obtenido después de la primera cromatografía de modo mixto se carga sobre el segundo material de cromatografía de modo mixto a una densidad de carga del anticuerpo multiespecífico entre aproximadamente cualquiera de 10 g/l y 20 g/l, 20 g/l y 30 g/l, 30 g/l y 40 g/l, 40 g/l y 50 g/l, 50 g/l y 60 g/l, 60 g/l y 70 g/l, 70 g/l y 80 g/l, 80 g/l y 90 g/l, 90 g/l y 100 g/l del material de cromatografía de modo mixto (por ejemplo, material de cromatografía Capto™ Adhere o un material de cromatografía Capto™ MMC).

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el eluido obtenido después de la segunda cromatografía de modo mixto se carga sobre un material de cromatografía posterior (tal como un material de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), material de cromatografía de intercambio aniónico, material de cromatografía de intercambio catiónico, material de cromatografía de exclusión por tamaño, material de cromatografía de afinidad o un material de cromatografía de modo mixto adicional) a una densidad de carga del anticuerpo multiespecífico mayor que aproximadamente cualquiera de 30 g/l, 40 g/l, 50 g/l, 60 g/l, 70 g/l, 80 g/l, 90 g/l, 100 g/l, 110 g/l, 120 g/l, 130 g/l, 140 g/l o 150 g/l del material de cromatografía posterior. En algunos modos de realización, el eluido obtenido después de la segunda cromatografía de modo mixto se carga sobre el material de cromatografía posterior (tal como un material de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), material de cromatografía de intercambio aniónico, material de cromatografía de intercambio catiónico, material de cromatografía de exclusión por tamaño, material de cromatografía de afinidad o un material de cromatografía de modo mixto adicional) a una densidad de carga del anticuerpo multiespecífico entre aproximadamente cualquiera de 10 g/l y 20 g/l, 20 g/l y 30 g/l, 30 g/l y 40 g/l, 40 g/l y 50 g/l, 50 g/l y 60 g/l, 60 g/l y 70 g/l, 70 g/l y 80 g/l, 80 g/l y 90 g/l, 90 g/l y 100 g/l del material de cromatografía posterior.

La elución, como se usa en el presente documento, es la retirada del producto, por ejemplo, el anticuerpo multiespecífico o el brazo de anticuerpo, del material de cromatografía. El tampón de elución es el tampón usado para eluir el anticuerpo multiespecífico u otro producto de interés de un material de cromatografía. En muchos

casos, un tampón de elución tiene una característica física diferente del tampón de carga. Por ejemplo, el tampón de elución puede tener una conductividad diferente del tampón de carga o un pH diferente del tampón de carga. En algunos modos de realización, el tampón de elución tiene una conductividad menor que el tampón de carga. En algunos modos de realización, el tampón de elución tiene una conductividad mayor que el tampón de carga. En algunos modos de realización, el tampón de elución tiene un pH menor que el tampón de carga. En algunos modos de realización, el tampón de elución tiene un pH mayor que el tampón de carga. En algunos modos de realización, el tampón de elución tiene una conductividad diferente y un pH diferente que el tampón de carga. El tampón de elución puede tener cualquier combinación de conductividad mayor o menor y pH mayor o menor.

En determinados modos de realización, la elución del anticuerpo multiespecífico del material de cromatografía se optimiza para proporcionar el producto con una impureza mínima y con un volumen de elución o volumen de agrupamiento mínimo. Por ejemplo, la composición que contiene el anticuerpo multiespecífico (por ejemplo, anticuerpo biespecífico) o los brazos de anticuerpo se puede cargar sobre el material de cromatografía, por ejemplo, una columna de cromatografía, en un tampón de carga. Una vez completada la carga, el anticuerpo multiespecífico o el brazo de anticuerpo se eluye con tampones a varios valores de pH diferentes mientras la conductividad del tampón de elución es constante. De forma alternativa, el anticuerpo multiespecífico o el brazo de anticuerpo puede eluir del material de cromatografía en un tampón de elución a varias conductividades diferentes mientras el pH del tampón de elución es constante. Una vez completada la elución del anticuerpo multiespecífico (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico) o el brazo de anticuerpo del material de cromatografía, la cantidad de una impureza en la fracción de agrupamiento proporciona información con respecto a la separación del anticuerpo multiespecífico o el brazo de anticuerpo de las impurezas para un pH o conductividad dado. La elución del anticuerpo multiespecífico o brazo de anticuerpo en un alto número de volúmenes de columna (por ejemplo, ocho volúmenes de columna) indica "prolongación" del perfil de elución. En algunos modos de realización se minimiza la prolongación de la elución.

Se pueden emplear diversos tampones dependiendo, por ejemplo, del pH deseado del tampón, la conductividad deseada del tampón, las características de la proteína de interés, el material de cromatografía y el procedimiento de purificación (por ejemplo, modo "de unión y elución" o "de flujo continuo"). En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, los procedimientos comprenden el uso de al menos un tampón. El tampón puede ser un tampón de carga, un tampón de equilibrado, un tampón de elución o un tampón de lavado. En algunos modos de realización, uno o más del tampón de carga, el tampón de equilibrado, el tampón de elución y/o el tampón de lavado (tal como un tampón de carga, un tampón de equilibrado y/o un tampón de lavado usados para la cromatografía de captura, la primera cromatografía de modo mixto, la segunda cromatografía de modo mixto y/o cualquier cromatografía adicional, tal como cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía HIC, cromatografía de exclusión por tamaño, una cromatografía de modo mixto adicional, etc.) son iguales. En algunos modos de realización, el tampón de carga, el tampón de equilibrado y/o el tampón de lavado (tal como un tampón de carga, un tampón de equilibrado y/o un tampón de lavado usados para la cromatografía de captura, la primera cromatografía de modo mixto, la segunda cromatografía de modo mixto y/o cualquier cromatografía adicional, tal como cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía HIC, cromatografía de exclusión por tamaño, una cromatografía de modo mixto adicional, etc.) son diferentes. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el tampón comprende una sal. El tampón de carga (tal como un tampón de carga, un tampón de equilibrado y/o un tampón de lavado usados para la cromatografía de captura, la primera cromatografía de modo mixto, la segunda cromatografía de modo mixto y/o cualquier cromatografía adicional, tal como cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía HIC, cromatografía de exclusión por tamaño, una cromatografía de modo mixto adicional, etc.) puede comprender cloruro de sodio, acetato de sodio, Tris, arginina, fosfato, MOPS, MES, CHES, BisTris, sulfato de amonio, sulfato de sodio, citrato, succinato o mezclas de los mismos. En determinados modos de realización, el tampón es un tampón de cloruro de sodio. En algunos modos de realización, el tampón es un tampón de acetato de sodio. En determinados modos de realización, el tampón es tampón Tris, arginina, fosfato, MES, CHES o MOPS. En algunos modos de realización, el tampón comprende Tris. En algunos modos de realización, el tampón comprende arginina.

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el tampón de carga (tal como un tampón de carga usado para la cromatografía de captura, la primera cromatografía de modo mixto, la segunda cromatografía de modo mixto y/o cualquier cromatografía adicional, tal como cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía HIC, cromatografía de exclusión por tamaño, una cromatografía de modo mixto adicional, etc.) tiene una conductividad mayor que aproximadamente cualquiera de 1,0 mS/cm, 1,5 mS/cm, 2,0 mS/cm, 2,5 mS/cm, 3,0 mS/cm, 3,5 mS/cm, 4,0 mS/cm, 4,5 mS/cm, 5,0 mS/cm, 5,5 mS/cm, 6,0 mS/cm, 6,5 mS/cm, 7,0 mS/cm, 7,5 mS/cm, 8,0 mS/cm, 8,5 mS/cm, 9,0 mS/cm, 9,5 mS/cm, 10 mS/cm o 20 mS/cm. La conductividad puede ser de entre aproximadamente cualquiera de 1 mS/cm y 20 mS/cm, 4 mS/cm y 10 mS/cm, 4 mS/cm y 7 mS/cm, 5 mS/cm y 17 mS/cm, 5 mS/cm y 10 mS/cm o 5 mS/cm y 7 mS/cm. En algunos modos de realización, la conductividad es de aproximadamente cualquiera de 1,0 mS/cm, 1,5 mS/cm, 2,0 mS/cm, 2,5 mS/cm, 3,0 mS/cm, 3,5 mS/cm, 4 mS/cm, 4,5 mS/cm, 5,0 mS/cm, 5,5 mS/cm, 6,0 mS/cm, 6,5 mS/cm, 7,0 mS/cm, 7,5 mS/cm, 8,0 mS/cm, 8,5 mS/cm, 9,0 mS/cm, 9,5 mS/cm, 10 mS/cm o 20 mS/cm. En un aspecto, la conductividad es la conductividad del tampón de carga, el tampón de equilibrado y/o el tampón de lavado. En algunos modos de realización, la conductividad de uno

o más del tampón de carga, el tampón de equilibrado y el tampón de lavado (tal como un tampón de carga, un tampón de equilibrado y/o un tampón de lavado usados para la cromatografía de captura, la primera cromatografía de modo mixto, la segunda cromatografía de modo mixto y/o cualquier cromatografía adicional, tal como cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía HIC, cromatografía de exclusión por tamaño, una cromatografía de modo mixto adicional, etc.) son iguales. En algunos modos de realización, la conductividad del tampón de carga es diferente de la conductividad del tampón de lavado y/o del tampón de equilibrado.

En algunos modos de realización, el tampón de elución (tal como un tampón de elución para la cromatografía de captura, la primera cromatografía de modo mixto, la segunda cromatografía de modo mixto y/o cualquier cromatografía adicional, tal como cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía HIC, cromatografía de exclusión por tamaño, una cromatografía de modo mixto adicional, etc.) tiene una conductividad inferior a la conductividad del tampón de carga. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el tampón de elución (tal como el tampón de elución para la cromatografía de captura, la primera cromatografía de modo mixto, la segunda cromatografía de modo mixto y/o cualquier cromatografía adicional, tal como cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía HIC, cromatografía de exclusión por tamaño, una cromatografía de modo mixto adicional, etc.) tiene una conductividad de menos de aproximadamente cualquiera de 0 mS/cm, 0,5 mS/cm, 1,0 mS/cm, 1,5 mS/cm, 2,0 mS/cm, 2,5 mS/cm, 3,0 mS/cm, 3,5 mS/cm, 4,0 mS/cm, 4,5 mS/cm, 5,0 mS/cm, 5,5 mS/cm, 6,0 mS/cm, 6,5 mS/cm o 7,0 mS/cm. La conductividad puede ser de entre aproximadamente cualquiera de 0 mS/cm y 7 mS/cm, 1 mS/cm y 7 mS/cm, 2 mS/cm y 7 mS/cm, 3 mS/cm y 7 mS/cm, o 4 mS/cm y 7 mS/cm, 0 mS/cm y 5,0 mS/cm, 1 mS/cm y 5 mS/cm, 2 mS/cm y 5 mS/cm, 3 mS/cm y 5 mS/cm o 4 mS/cm y 5 mS/cm. En algunos modos de realización, la conductividad del tampón de elución (tal como el tampón de elución usado para la cromatografía de captura, la primera cromatografía de modo mixto, la segunda cromatografía de modo mixto y/o cualquier cromatografía adicional, tal como cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía HIC, cromatografía de exclusión por tamaño, una cromatografía de modo mixto adicional, etc.) es de aproximadamente cualquiera de 0 mS/cm, 0,5 mS/cm, 1,0 mS/cm, 1,5 mS/cm, 2,0 mS/cm, 2,5 mS/cm, 3,0 mS/cm, 3,5 mS/cm, 4 mS/cm, 4,5 mS/cm, 5,0 mS/cm, 5,5 mS/cm, 6,0 mS/cm, 6,5 mS/cm o 7,0 mS/cm.

En algunos modos de realización, el tampón de elución tiene una conductividad mayor que la conductividad del tampón de carga. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el tampón de elución (tal como el tampón de elución usado para la cromatografía de captura, la primera cromatografía de modo mixto, la segunda cromatografía de modo mixto y/o cualquier cromatografía adicional, tal como cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía HIC, cromatografía de exclusión por tamaño, una cromatografía de modo mixto adicional, etc.) tiene una conductividad mayor que aproximadamente cualquiera de 5,5 mS/cm, 6,0 mS/cm, 6,5 mS/cm, 7,0 mS/cm, 7,5 mS/cm, 8,0 mS/cm, 8,5 mS/cm, 9,0 mS/cm, 9,5 mS/cm, 10 mS/cm, 11 mS/cm, 12 mS/cm, 13 mS/cm, 14 mS/cm, 15 mS/cm, 16 mS/cm, 17,0 mS/cm, 18,0 mS/cm, 19,0 mS/cm, 20,0 mS/cm, 21,0 mS/cm, 22,0 mS/cm, 23,0 mS/cm, 24,0 mS/cm, 25,0 mS/cm, 26,0 mS/cm, 27,0 mS/cm, 28,0 mS/cm, 29,0 mS/cm o 30,0 mS/cm. La conductividad puede ser de entre aproximadamente cualquiera de 5,5 mS/cm y 30 mS/cm, 6,0 mS/cm y 30 mS/cm, 7 mS/cm y 30 mS/cm, 8 mS/cm y 30 mS/cm, 9 mS/cm y 30 mS/cm o 10 mS/cm y 30 mS/cm. En algunos modos de realización, la conductividad del tampón de elución es de aproximadamente cualquiera de 5,5 mS/cm, 6,0 mS/cm, 6,5 mS/cm, 7,0 mS/cm, 7,5 mS/cm, 8,0 mS/cm, 8,5 mS/cm, 9,0 mS/cm, 9,5 mS/cm, 10 mS/cm, 11 mS/cm, 12 mS/cm, 13 mS/cm, 14 mS/cm, 15 mS/cm, 16 mS/cm, 17,0 mS/cm, 18,0 mS/cm, 19,0 mS/cm, 20,0 mS/cm, 21,0 mS/cm, 22,0 mS/cm, 23,0 mS/cm, 24,0 mS/cm, 25,0 mS/cm, 26,0 mS/cm, 27,0 mS/cm, 28,0 mS/cm, 29,0 mS/cm o 30,0 mS/cm. En algunos aspectos de cualquiera de los modos de realización anteriores, la conductividad del tampón de elución (tal como el tampón de elución para la cromatografía de captura, la primera cromatografía de modo mixto, la segunda cromatografía de modo mixto y/o cualquier cromatografía adicional, tal como cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía HIC, cromatografía de exclusión por tamaño, una cromatografía de modo mixto adicional, etc.) se cambia respecto del tampón de carga y/o de lavado mediante un gradiente escalonado o mediante un gradiente lineal.

En algunos modos de realización, la solución que comprende el anticuerpo multiespecífico se carga sobre el primer material de cromatografía de modo mixto en un tampón de carga con una conductividad de aproximadamente <6,5 mS/cm y el polipéptido se eluye del primer material de cromatografía mixta en un tampón de elución con una conductividad de aproximadamente 1,5 mS/cm. En algunos modos de realización, el tampón de carga tiene una conductividad de aproximadamente 6,5 mS/cm y el tampón de elución tiene una conductividad de aproximadamente 3 mS/cm. En algunos modos de realización, el tampón de carga tiene una conductividad de aproximadamente 5,5 mS/cm y el tampón de elución tiene una conductividad de aproximadamente 2 mS/cm. En algunos modos de realización, el tampón de carga tiene una conductividad de aproximadamente 5,5 mS/cm y el tampón de elución tiene una conductividad de aproximadamente 1 mS/cm. En otros modos de realización de los modos de realización anteriores, el primer material de cromatografía de modo mixto es una resina Capto™ Adhere. En otros modos de realización de los modos de realización anteriores, el primer material de cromatografía de modo mixto es una resina Capto™ MMC.

En algunos aspectos de cualquiera de los modos de realización anteriores, la conductividad del tampón de elución se cambia respecto del tampón de carga y/o de lavado mediante un gradiente escalonado o mediante un gradiente lineal. En algunos modos de realización, la composición que comprende un anticuerpo multiespecífico se carga sobre una primera cromatografía de modo mixto (por ejemplo, una cromatografía con Capto™ Adhere o una cromatografía con Capto™ MMC) a $<6,5$ mS/cm y el anticuerpo multiespecífico se eluye de la primera cromatografía de modo mixto mediante un gradiente de conductividad escalonado hasta aproximadamente 1,5 mS/cm.

En algunos modos de realización, la solución que comprende el anticuerpo multiespecífico se carga sobre el segundo material de cromatografía de modo mixto en un tampón de carga con una conductividad de aproximadamente $<6,5$ mS/cm y el polipéptido se eluye del segundo material de cromatografía mixta en un tampón de elución con una conductividad de aproximadamente 1,5 mS/cm. En algunos modos de realización, el tampón de carga tiene una conductividad de aproximadamente 6,5 mS/cm y el tampón de elución tiene una conductividad de aproximadamente 3 mS/cm. En algunos modos de realización, el tampón de carga tiene una conductividad de aproximadamente 5,5 mS/cm y el tampón de elución tiene una conductividad de aproximadamente 2 mS/cm. En algunos modos de realización, el tampón de carga tiene una conductividad de aproximadamente 5,5 mS/cm y el tampón de elución tiene una conductividad de aproximadamente 1 mS/cm. En otros modos de realización de los modos de realización anteriores, el segundo material de cromatografía de modo mixto es una resina Capto™ Adhere. En otros modos de realización de los modos de realización anteriores, el segundo material de cromatografía de modo mixto es una resina Capto™ MMC.

En algunos aspectos de cualquiera de los modos de realización anteriores, la conductividad del tampón de elución se cambia respecto del tampón de carga y/o de lavado mediante un gradiente escalonado o mediante un gradiente lineal. En algunos modos de realización, la composición que comprende un anticuerpo multiespecífico se carga sobre una segunda cromatografía de modo mixto (por ejemplo, una cromatografía con Capto™ Adhere o una cromatografía con Capto™ MMC) a $<6,5$ mS/cm y el anticuerpo multiespecífico se eluye de la segunda cromatografía de modo mixto mediante un gradiente de conductividad escalonado hasta aproximadamente 1,5 mS/cm.

En algunos modos de realización, la composición que comprende un anticuerpo multiespecífico se carga en una cromatografía de intercambio aniónico (por ejemplo, una cromatografía con QSFF) a $<2,5$ mS/cm y el anticuerpo multiespecífico se eluye de la cromatografía de intercambio aniónico mediante un gradiente de conductividad escalonado hasta aproximadamente 8,6 mS/cm.

En algunos modos de realización, la composición que comprende un anticuerpo multiespecífico se carga en una cromatografía de intercambio catiónico (por ejemplo, una cromatografía con POROS 50HS) a aproximadamente 5,0 mS/cm y el anticuerpo multiespecífico se eluye de la cromatografía de intercambio catiónico mediante un gradiente de conductividad escalonado hasta aproximadamente 27,5 mS/cm.

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el tampón de carga (tal como un tampón de carga usado para la cromatografía de captura, la primera cromatografía de modo mixto, la segunda cromatografía de modo mixto y/o cualquier cromatografía adicional, tal como cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía HIC, cromatografía de exclusión por tamaño, una cromatografía de modo mixto adicional, etc.) tiene un pH de menos de aproximadamente cualquiera de 10, 9, 8, 7, 6 o 5, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el tampón de carga (tal como un tampón de carga usado para la cromatografía de captura, la primera cromatografía de modo mixto, la segunda cromatografía de modo mixto y/o cualquier cromatografía adicional, tal como cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía HIC, cromatografía de exclusión por tamaño, una cromatografía de modo mixto adicional, etc.) tiene un pH mayor que aproximadamente cualquiera de 4, 5, 6, 7, 8 o 9, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores. El tampón de carga (tal como un tampón de carga usado para la cromatografía de captura, la primera cromatografía de modo mixto, la segunda cromatografía de modo mixto y/o cualquier cromatografía adicional, tal como cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía HIC, cromatografía de exclusión por tamaño, una cromatografía de modo mixto adicional, etc.) puede tener un pH de entre aproximadamente cualquiera de 4 y 9, 4 y 8, 4 y 7, 5 y 9, 5 y 8, 5 y 7, 5 y 6, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores. En algunos modos de realización, el pH del tampón de carga (tal como un tampón de carga usado para la cromatografía de captura, la primera cromatografía de modo mixto, la segunda cromatografía de modo mixto y/o cualquier cromatografía adicional, tal como cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía HIC, cromatografía de exclusión por tamaño, una cromatografía de modo mixto adicional, etc.) tiene un pH de aproximadamente cualquiera de 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5 u 8, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores. El pH puede ser el pH del tampón de carga, el tampón de equilibrado o el tampón de lavado (tal como un tampón de carga, tampón de equilibrado y/o tampón de lavado usados para la cromatografía de captura, la primera cromatografía de modo mixto, la segunda cromatografía de modo mixto y/o cualquier cromatografía adicional, tal como cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía HIC, cromatografía de exclusión por tamaño, una cromatografía de modo mixto adicional, etc.). En algunos modos de

realización, el pH de uno o más del tampón de carga, el tampón de equilibrado y/o el tampón de lavado son iguales. En algunos modos de realización, el pH del tampón de carga es diferente del pH del tampón de equilibrado y/o el tampón de lavado.

5 En algunos modos de realización, el tampón de elución (tal como un tampón de elución para la cromatografía de captura, la primera cromatografía de modo mixto, la segunda cromatografía de modo mixto y/o cualquier cromatografía adicional, tal como cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía HIC, cromatografía de exclusión por tamaño, una cromatografía de modo mixto adicional, etc.) tiene un pH inferior al pH del tampón de carga. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos
10 descritos en el presente documento, el tampón de elución tiene un pH de menos de aproximadamente cualquiera de 8, 7, 6, 5, 4, 3 o 2, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores. El pH del tampón de elución puede ser de entre aproximadamente cualquiera de 4 y 9, 4 y 8, 4 y 7, 4 y 6, 4 y 5, 5 y 9, 5 y 8, 5 y 7, 5 y 6, 6 y 9, 6 y 8, 6 y 7, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores. En algunos modos de realización, el pH del tampón de elución (tal como un tampón de elución para la cromatografía de captura, la primera cromatografía de modo mixto, la
15 segunda cromatografía de modo mixto y/o cualquier cromatografía adicional, tal como cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía HIC, cromatografía de exclusión por tamaño, una cromatografía de modo mixto adicional, etc.) es de aproximadamente cualquiera de 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5 o 9,0, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores.

20 En algunos modos de realización, el tampón de elución (tal como un tampón de elución para la cromatografía de captura, la primera cromatografía de modo mixto, la segunda cromatografía de modo mixto y/o cualquier cromatografía adicional, tal como cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía HIC, cromatografía de exclusión por tamaño, una cromatografía de modo mixto adicional, etc.) tiene un pH mayor que el pH del tampón de carga. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos
25 descritos en el presente documento, el tampón de elución (tal como un tampón de carga para la primera cromatografía de modo mixto, la segunda cromatografía de modo mixto y/o cualquier cromatografía adicional, tal como cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía HIC, cromatografía de exclusión por tamaño, una cromatografía de modo mixto adicional, etc.) tiene un pH mayor que aproximadamente cualquiera de 5, 6, 7, 8 o 9, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores. En algunos
30 modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el tampón de elución (tal como un tampón de elución para la cromatografía de captura) tiene un pH mayor que aproximadamente cualquiera de 2, 4 o 4, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores. El pH del tampón de elución (tal como un tampón de elución para la cromatografía de captura, la primera cromatografía de modo mixto, la segunda cromatografía de modo mixto y/o cualquier cromatografía adicional, tal como cromatografía de intercambio
35 aniónico, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía HIC, cromatografía de exclusión por tamaño, una cromatografía de modo mixto adicional, etc.) puede ser de entre aproximadamente cualquiera de 2 y 9, 3 y 9, 4 y 9, 2 y 8, 3 y 8, 4 y 8, 2 y 7, 3 y 7, 4 y 7, 2 y 6, 3 y 6, y 4 y 6, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores. En algunos modos de realización, el pH del tampón de elución es de aproximadamente cualquiera de 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores.

40 En algunos modos de realización, la solución que comprende un anticuerpo multiespecífico o brazo de anticuerpo se carga en una cromatografía de afinidad (por ejemplo, una cromatografía con proteína A) a un pH de aproximadamente 7 y el anticuerpo multiespecífico o brazo de anticuerpo se eluye de la cromatografía de afinidad mediante un gradiente escalonado hasta un pH de aproximadamente 2,9.

45 En algunos aspectos de cualquiera de los modos de realización anteriores, el pH del tampón de elución (tal como un tampón de elución para la cromatografía de captura, la primera cromatografía de modo mixto, la segunda cromatografía de modo mixto y/o cualquier cromatografía adicional, tal como cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía HIC, cromatografía de exclusión por tamaño, una cromatografía de modo mixto adicional, etc.) se cambia respecto del tampón de carga y/o de lavado mediante un gradiente escalonado o mediante un gradiente lineal.

50 En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el caudal es menos de aproximadamente cualquiera de 50 VC/h, 40 VC/h o 30 VC/h. El caudal puede ser de entre aproximadamente cualquiera de 5 VC/h y 50 VC/h, 10 VC/h y 40 VC/h o 18 VC/h y 36 VC/h. En algunos modos de realización, el caudal es de aproximadamente cualquiera de 9 VC/h, 18 VC/h, 25 VC/h, 30 VC/h, 36 VC/h o 40 VC/h. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el caudal es menos de aproximadamente cualquiera de 100 cm/h, 75 cm/h o 50 cm/h. El caudal puede ser de entre aproximadamente cualquiera de 25 cm/h y 150 cm/h, 25 cm/h y 100 cm/h, 50 cm/h y 100 cm/h o
60 65 cm/h y 85 cm/h.

La altura del lecho es la altura del material de cromatografía usado. En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, la altura del lecho es mayor que aproximadamente cualquiera de 5 cm, 10 cm, 15 cm, 20 cm, 25 cm, 30 cm, 35 cm, 40 cm, 45 cm o 50 cm. En algunos modos de
65 realización, la altura del lecho es de entre aproximadamente 5 cm y 50 cm. En algunos modos de realización, la altura del lecho se determina en base a la cantidad de polipéptido o contaminantes en la carga.

En algunos modos de realización, la cromatografía es en una columna o recipiente con un volumen mayor de aproximadamente 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 7 ml, 8 ml, 9 ml, 10 ml, 15 ml, 20 ml, 25 ml, 30 ml, 40 ml, 50 ml, 75 ml, 100 ml, 200 ml, 300 ml, 400 ml, 500 ml, 600 ml, 700 ml, 800 ml, 900 ml, 1 l, 2 l, 3 l, 4 l, 5 l, 6 l, 7 l, 8 l, 9 l, 10 l, 25 l, 50 l, 100 l, 200 l, 300 l, 400 l, 500 l, 600 l, 700 l, 800 l, 900 l o 1000 l.

En algunos modos de realización se recogen fracciones de la cromatografía. En algunos modos de realización, las fracciones recogidas son mayores de aproximadamente 0,01 VC, 0,02 VC, 0,03 VC, 0,04 VC, 0,05 VC, 0,06 VC, 0,07 VC, 0,08 VC, 0,09 VC, 0,1 VC, 0,2 VC, 0,3 VC, 0,4 VC, 0,5 VC, 0,6 VC, 0,7 VC, 0,8 VC, 0,9 VC, 1,0 VC, 2,0 VC, 3,0 VC, 4,0 VC, 5,0 VC, 6,0 VC, 7,0 VC, 8,0 VC, 9,0 VC o 10,0 VC.

En determinados modos de realización se agrupan las fracciones que contienen el producto purificado o parcialmente purificado, por ejemplo, el anticuerpo multiespecífico (tal como un anticuerpo biespecífico) o el brazo de anticuerpo. La cantidad de polipéptido en una fracción se puede determinar por un experto en la técnica; por ejemplo, la cantidad de polipéptido en una fracción se puede determinar por espectroscopia UV. En determinados modos de realización, las fracciones se recogen cuando la DO_{280} es mayor que aproximadamente cualquiera de 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 y 1,0. En determinados modos de realización, las fracciones se recogen cuando la DO_{280} es de entre aproximadamente cualquiera de 0,5 y 1,0, 0,6 y 1,0, 0,7 y 1,0, 0,8 y 1,0 o 0,9 y 1,0. En determinados modos de realización se agrupan las fracciones que contienen anticuerpo multiespecífico (por ejemplo, anticuerpo biespecífico) o brazo de anticuerpo detectable.

La impureza es una impureza específica del producto. Los ejemplos de impurezas específicas del producto incluyen, pero no se limitan a, semianticuerpos no emparejados, cadenas ligeras de anticuerpo no emparejadas, cadenas pesadas no emparejadas, fragmentos de anticuerpos, homodímeros (por ejemplo, semidímeros emparejados de un anticuerpo biespecífico que comprenden la misma cadena pesada y ligera), agregados, especies de alto peso molecular (MHWS) (tales como especies de muy alto peso molecular (vHMWS)), anticuerpos multiespecíficos con disulfuros con errores de emparejamiento, dímeros de la cadena ligera, dímeros de la cadena pesada, especies de bajo peso molecular (LMWS) y variantes de carga (tales como variantes ácidas y variantes básicas del anticuerpo).

En determinados modos de realización, los procedimientos proporcionados en el presente documento retiran o reducen el nivel del semianticuerpo no emparejado de una composición que comprende un anticuerpo multiespecífico (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico) y semianticuerpo no emparejado. En la técnica se conocen procedimientos para medir la presencia o el nivel de semianticuerpo no emparejado en una composición; por ejemplo, mediante espectrometría de masas (tal como cromatografía de líquidos-espectrometría de masas), CE-SDS, HPLC de fase inversa, HPLC HIC. En determinados modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, la cantidad de semianticuerpo no emparejado en una composición (tal como una fracción de cromatografía) recuperada de una o más etapas de purificación se reduce en más de aproximadamente cualquiera de un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 %, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores. En determinados modos de realización, la cantidad del semianticuerpo no emparejado en una composición (tal como una fracción de cromatografía) recuperada de una o más etapas de purificación se reduce entre aproximadamente cualquiera de un 10 % y un 95 %; un 10 % y un 99 %; un 20 % y un 95 %; un 20 % y un 99 %; un 30 % y un 95 %; un 30 % y un 99 %; un 40 % y un 95 %; un 40 % y un 99 %; un 50 % y un 95 %; un 50 % y un 99 %; un 60 % y un 95 %; un 60 % y un 99 %; un 70 % y un 95 %; un 70 % y un 99 %; un 80 % y un 95 %; un 80 % y un 99 %; un 90 % y un 95 %; o un 90 % y un 99 %. En algunos modos de realización, la cantidad del semianticuerpo no emparejado en una composición (tal como una fracción de cromatografía) se reduce en aproximadamente cualquiera de un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 %. En determinados modos de realización, la reducción de la presencia o nivel de semianticuerpo no emparejado se determina comparando la cantidad de semianticuerpo no emparejado en la composición (tal como una fracción de cromatografía) recuperada de una(s) etapa(s) de purificación con la cantidad de semianticuerpo no emparejado en la composición antes de la(s) etapa(s) de purificación.

En determinados modos de realización, los procedimientos proporcionados en el presente documento retiran o reducen el nivel del homodímero de una composición que comprende un anticuerpo multiespecífico (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico) y homodímero. En la técnica se conocen procedimientos para medir la presencia o el nivel de homodímero en una composición; por ejemplo, mediante espectrometría de masas (tal como cromatografía de líquidos-espectrometría de masas), HPLC de fase inversa, HPLC HIC. En determinados modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, la cantidad de homodímero en una composición (tal como una fracción de cromatografía) recuperada de una o más etapas de purificación se reduce en más de aproximadamente cualquiera de un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 %, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores. En determinados modos de realización, la cantidad de homodímero en una composición (tal como una fracción de cromatografía) recuperada de una o más etapas de purificación se reduce entre aproximadamente cualquiera de un 10 % y un 95 %; un 10 % y un 99 %; un 20 % y un 95 %; un 20 % y un 99 %; un 30 % y un 95 %; un 30 % y un 99 %; un 40 % y un 95 %; un 40 % y un 99 %; un 50 % y un 95 %; un 50 % y un 99 %; un 60 % y un 95 %; un 60 % y un 99 %; un 70 % y un 95 %; un 70 % y un 99 %; un 80 % y un 95 %; un 80 % y un 99 %; un 90 % y un 95 %; o un 90 % y un 99 %.

95 %; un 60 % y un 99 %; un 70 % y un 95 %; un 70 % y un 99 %; un 80 % y un 95 %; un 80 % y un 99 %; un 90 % y un 95 %; o un 90 % y un 99 %. En algunos modos de realización, la cantidad de homodímero en una composición (tal como una fracción de cromatografía) se reduce en aproximadamente cualquiera de un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 %. En determinados modos de realización, la reducción de la presencia o nivel de homodímero se determina comparando la cantidad de homodímero en la composición (tal como una fracción de cromatografía) recuperada de una(s) etapa(s) de purificación con la cantidad de homodímero en la composición antes de la(s) etapa(s) de purificación.

En determinados modos de realización, en el presente documento se proporciona un procedimiento para purificar un anticuerpo biespecífico que comprende un primer brazo y un segundo brazo, en el que el primer y el segundo brazo se producen por separado, comprendiendo el procedimiento: someter el primer y el segundo brazo a cromatografía de captura (tal como una cualquiera o una combinación de las etapas de cromatografía de captura descritas en otra parte del presente documento) realizada en modo de unión y elución para producir el primer y el segundo eluido de captura; formar una mezcla que comprende el primer y el segundo eluido de captura en condiciones suficientes para producir una composición que comprende el anticuerpo multiespecífico, someter la composición que comprende el anticuerpo multiespecífico a cromatografía de intercambio aniónico (por ejemplo, cromatografía con Q Sepharose® Fast Flow (QSFF)) en modo de unión y elución para producir un eluido de intercambio aniónico, en el que la elución es una elución con gradiente; someter el eluido de intercambio aniónico a cromatografía de intercambio aniónico de modo mixto (por ejemplo, cromatografía con Capto™ Adhere) en modo de unión y elución para producir un primer eluido de modo mixto, en el que la elución es una elución con gradiente; y someter el primer eluido de modo mixto a cromatografía de intercambio catiónico de modo mixto (por ejemplo, cromatografía con Capto™ MMC) en modo de unión y elución para producir un segundo eluido de modo mixto, en el que la elución es una elución con gradiente, y recoger una fracción que comprende el anticuerpo biespecífico, en el que el procedimiento reduce una cantidad de una impureza en la fracción con respecto a la mezcla que comprende el primer y el segundo brazo.

En determinados modos de realización, en el presente documento se proporciona un procedimiento para purificar un anticuerpo biespecífico que comprende un primer brazo y un segundo brazo, en el que el primer y el segundo brazo se producen por separado, comprendiendo el procedimiento: someter el primer y el segundo brazo a cromatografía de captura (tal como una cualquiera o una combinación de las etapas de cromatografía de captura descritas en otra parte del presente documento) en modo de unión y elución para producir el primer y el segundo eluido de captura; formar una mezcla que comprende el primer y el segundo eluido de captura en condiciones suficientes para producir una composición que comprende el anticuerpo multiespecífico, someter la composición que comprende el anticuerpo multiespecífico a cromatografía de intercambio catiónico de modo mixto (por ejemplo, cromatografía con Capto™ MMC) en modo de unión y elución para producir un primer eluido de modo mixto, en el que la elución es una elución escalonada en sal y pH; y someter el primer eluido de modo mixto a cromatografía de intercambio aniónico de modo mixto (por ejemplo, cromatografía con Capto™ Adhere) en modo de flujo continuo para producir un segundo eluido de modo mixto, y recoger una fracción que comprende el anticuerpo biespecífico, en el que el procedimiento reduce una cantidad de una impureza en la fracción con respecto a la mezcla que comprende el primer y el segundo brazo.

En determinados modos de realización, en el presente documento se proporciona un procedimiento para purificar un anticuerpo biespecífico que comprende un primer brazo y un segundo brazo, en el que el primer y el segundo brazo se producen por separado, comprendiendo el procedimiento: someter el primer y el segundo brazo a cromatografía de captura (tal como una cualquiera o una combinación de las etapas de cromatografía de captura descritas en otra parte del presente documento) en modo de unión y elución para producir el primer y el segundo eluido de captura; formar una mezcla que comprende el primer y el segundo eluido de captura en condiciones suficientes para producir una composición que comprende el anticuerpo multiespecífico, someter la composición que comprende el anticuerpo multiespecífico a cromatografía de intercambio aniónico de modo mixto (por ejemplo, cromatografía con Capto™ Adhere) en modo de unión y elución, en el que la elución es una elución escalonada, para producir un primer eluido de modo mixto; y someter el primer eluido de modo mixto a cromatografía de intercambio catiónico de modo mixto (por ejemplo, cromatografía con Capto™ MMC) en modo de unión y elución para producir un segundo eluido de modo mixto, en el que la elución es una elución escalonada; someter el segundo eluido de modo mixto a cromatografía de interacción hidrófoba (por ejemplo, cromatografía con Hexyl-650C) en modo de flujo continuo para producir un eluido de interacción hidrófoba; y recoger una fracción que comprende el anticuerpo biespecífico, en el que el procedimiento reduce una cantidad de una impureza en la fracción con respecto a la mezcla que comprende el primer y el segundo brazo.

En determinados modos de realización, en el presente documento se proporciona un procedimiento para purificar un anticuerpo biespecífico (tal como un $F(ab')_2$ biespecífico) que comprende un primer brazo y un segundo brazo, en el que el primer y el segundo brazo se producen por separado, comprendiendo el procedimiento: someter el primer brazo a cromatografía de captura (tal como una cualquiera o una combinación de las etapas de cromatografía de captura descritas en otra parte del presente documento) en modo de unión y elución para producir un primer eluido de captura; someter el primer eluido de captura a cromatografía de intercambio catiónico de modo mixto (por ejemplo, cromatografía con Capto™ MMC) en modo de unión y elución para producir un primer eluido de modo mixto; someter el segundo brazo a cromatografía de captura (tal como una cualquiera o una

combinación de las etapas de cromatografía de captura descritas en otra parte del presente documento) en modo de unión y elución para producir un segundo eluido de captura; formar una mezcla que comprende el primer eluido de modo mixto y el segundo eluido de captura en condiciones suficientes para producir una composición que comprende el anticuerpo multiespecífico, someter la composición que comprende el anticuerpo multiespecífico a cromatografía de intercambio aniónico de modo mixto (por ejemplo, tal como cromatografía con Capto™ Adhere) para producir un segundo eluido de modo mixto; y someter el segundo eluido de modo mixto a cromatografía de intercambio catiónico (por ejemplo, tal como cromatografía con POROS® 50 HS) en modo de unión y elución para producir un eluido de intercambio catiónico; someter el eluido de intercambio catiónico a cromatografía de intercambio catiónico de modo mixto posterior en modo de unión y eluido para producir un tercer eluido de modo mixto; y recoger una fracción que comprende el anticuerpo biespecífico, en el que el procedimiento reduce una cantidad de una impureza en la fracción con respecto a la mezcla que comprende el primer y el segundo brazo.

En determinados modos de realización, en el presente documento se proporciona un procedimiento para purificar un anticuerpo biespecífico (tal como un F(ab')₂ biespecífico) que comprende un primer brazo y un segundo brazo, en el que el primer y el segundo brazo se producen por separado, comprendiendo el procedimiento: someter el primer brazo a cromatografía de captura (tal como una cualquiera o una combinación de las etapas de cromatografía de captura descritas en otra parte del presente documento) en modo de unión y elución para producir un primer eluido de captura; someter el primer eluido de captura a cromatografía de intercambio catiónico de modo mixto (por ejemplo, cromatografía con Capto™ MMC) en modo de unión y elución para producir un primer eluido de modo mixto; someter el segundo brazo a cromatografía de captura (tal como una cualquiera o una combinación de las etapas de cromatografía de captura descritas en otra parte del presente documento) en modo de unión y elución para producir un segundo eluido de captura; formar una mezcla que comprende el primer eluido de modo mixto y el segundo eluido de captura en condiciones suficientes para producir una composición que comprende el anticuerpo multiespecífico, someter la composición que comprende el anticuerpo multiespecífico a cromatografía de intercambio aniónico de modo mixto (por ejemplo, tal como cromatografía con Capto™ Adhere) para producir un segundo eluido de modo mixto; y someter el segundo eluido de modo mixto a cromatografía de intercambio catiónico de modo mixto posterior (por ejemplo, cromatografía con Capto™ MMC) en modo de unión y elución para producir un tercer eluido de modo mixto; y recoger una fracción que comprende el anticuerpo biespecífico, en el que el procedimiento reduce una cantidad de una impureza en la fracción con respecto a la mezcla que comprende el primer y el segundo brazo.

En algunos modos de realización, el anticuerpo multiespecífico (tal como anticuerpo biespecífico) se purifica además mediante filtración vírica. La filtración vírica es la retirada de contaminantes víricos en una corriente de alimentación de purificación de polipéptidos. Los ejemplos de filtración vírica incluyen, por ejemplo, ultrafiltración y microfiltración. En algunos modos de realización, el polipéptido se purifica usando un filtro de parvovirus.

En algunos modos de realización, el anticuerpo multiespecífico se concentra después de la cromatografía (por ejemplo, después de la segunda cromatografía de modo mixto o después de una o más etapas de cromatografía realizadas después de la segunda cromatografía de modo mixto). Se conocen en la técnica ejemplos de procedimientos de concentración e incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, ultrafiltración y diafiltración (UFDF). En algunos modos de realización, el anticuerpo multiespecífico se concentra mediante una primera ultrafiltración, una diafiltración y una segunda ultrafiltración. En algunos modos de realización, la ultrafiltración y/o diafiltración usa un filtro con un valor límite de menos de aproximadamente cualquiera de 5 kDal, 10 kDal, 15 kDal, 20 kDal o 25 kDal o 30 kDal. En algunos modos de realización, el retenido de la primera ultrafiltración se diafiltra en una formulación farmacéutica.

En algunos modos de realización, la concentración del anticuerpo multiespecífico después de la concentración es de aproximadamente cualquiera de 10 mg/ml, 20 mg/ml, 30 mg/ml, 40 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml, 70 mg/ml, 80 mg/ml, 90 mg/ml, 100 mg/ml, 110 mg/ml, 120 mg/ml, 130 mg/ml, 140 mg/ml, 150 mg/ml, 160 mg/ml, 170 mg/ml, 180 mg/ml, 190 mg/ml, 200 mg/ml o 300 mg/ml. En algunos modos de realización, la concentración de anticuerpo multiespecífico es de entre aproximadamente cualquiera de 10 mg/ml y 20 mg/ml, 20 mg/ml y 30 mg/ml, 30 mg/ml y 40 mg/ml, 40 mg/ml y 50 mg/ml, 50 mg/ml y 60 mg/ml, 60 mg/ml y 70 mg/ml, 70 mg/ml y 80 mg/ml, 80 mg/ml y 90 mg/ml, 90 mg/ml y 100 mg/ml, 100 mg/ml y 110 mg/ml, 110 mg/ml y 120 mg/ml, 120 mg/ml y 130 mg/ml, 130 mg/ml y 140 mg/ml, 140 mg/ml y 150 mg/ml, 150 mg/ml y 160 mg/ml, 160 mg/ml y 170 mg/ml, 170 mg/ml y 180 mg/ml, 180 mg/ml y 190 mg/ml, 190 mg/ml y 200 mg/ml, 200 mg/ml o 300 mg/ml.

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, los procedimientos comprenden además combinar el polipéptido purificado de los procedimientos de purificación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunos modos de realización, el anticuerpo multiespecífico se formula en una formulación farmacéutica mediante ultrafiltración/diafiltración.

En determinados modos de realización, los procedimientos proporcionados en el presente documento producen una composición que comprende un anticuerpo multiespecífico que tiene una pureza que es superior a aproximadamente cualquiera de un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %. En determinados modos de realización, el anticuerpo multiespecífico de la composición tiene una pureza superior a aproximadamente cualquiera de un 96 %, 97 %, 98 % o 99 %.

En determinados modos de realización, los procedimientos proporcionados en el presente documento producen una composición que comprende el anticuerpo multiespecífico que contiene no más de aproximadamente cualquiera de un 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 0,6 %, 0,7 %, 0,8 %, 0,9 %, 1 %, 1,5 %, 2 %, 2,5 %, 3 %, 3,5 %, 4 %, 4,5 %, 5 %, 5,5 %, 6 %, 6,5 %, 7 %, 7,5 %, 8 %, 8,5 %, 9 %, 9,5 % o 10 % de brazos de anticuerpo no emparejados. En determinados modos de realización, los procedimientos proporcionados en el presente documento producen una composición que comprende el anticuerpo multiespecífico que contiene no más de aproximadamente cualquiera de un 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 0,6 %, 0,7 %, 0,8 %, 0,9 %, 1 %, 1,5 %, 2 %, 2,5 %, 3 %, 3,5 %, 4 %, 4,5 %, 5 %, 5,5 %, 6 %, 6,5 %, 7 %, 7,5 %, 8 %, 8,5 %, 9 %, 9,5 % o 10 % de homodímero. En determinados modos de realización se proporciona una composición que comprende un anticuerpo multiespecífico purificado de acuerdo con uno cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento.

En determinados modos de realización, el anticuerpo multiespecífico de la composición tiene una pureza superior a aproximadamente cualquiera de un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 %. En determinados modos de realización, el anticuerpo multiespecífico de la composición tiene una pureza superior a aproximadamente cualquiera de un 96 %, 97 %, 98 % o 99 %.

En determinados modos de realización, la composición que comprende el anticuerpo multiespecífico contiene no más de aproximadamente cualquiera de un 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 0,6 %, 0,7 %, 0,8 %, 0,9 %, 1 %, 1,5 %, 2 %, 2,5 %, 3 %, 3,5 %, 4 %, 4,5 %, 5 %, 5,5 %, 6 %, 6,5 %, 7 %, 7,5 %, 8 %, 8,5 %, 9 %, 9,5 % o 10 % de brazos de anticuerpo no emparejados.

En determinados modos de realización se proporciona una composición que comprende un anticuerpo biespecífico purificado de acuerdo con uno cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento. El anticuerpo biespecífico es un anticuerpo de botón en ojal (KiH), por ejemplo, un anticuerpo biespecífico KiH. En algunos modos de realización, el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo biespecífico CrossMab.

En determinados modos de realización se proporciona una composición que comprende un anticuerpo biespecífico que tiene una pureza que es superior a aproximadamente cualquiera de un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %. En determinados modos de realización, el anticuerpo biespecífico de la composición tiene una pureza superior a aproximadamente cualquiera de un 96 %, 97 %, 98 % o 99 %. El anticuerpo biespecífico es un anticuerpo de botón en ojal (KiH), por ejemplo, un anticuerpo biespecífico KiH. En algunos modos de realización, el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo biespecífico CrossMab.

En determinados modos de realización se proporciona una composición que comprende un anticuerpo biespecífico que contiene no más de aproximadamente cualquiera de un 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 0,6 %, 0,7 %, 0,8 %, 0,9 %, 1 %, 1,5 %, 2 %, 2,5 %, 3 %, 3,5 %, 4 %, 4,5 %, 5 %, 5,5 %, 6 %, 6,5 %, 7 %, 7,5 %, 8 %, 8,5 %, 9 %, 9,5 % o 10 % de brazos de anticuerpo no emparejados. En determinados modos de realización se proporciona una composición que comprende un anticuerpo biespecífico que contiene no más de aproximadamente cualquiera de un 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 0,6 %, 0,7 %, 0,8 %, 0,9 %, 1 %, 1,5 %, 2 %, 2,5 %, 3 %, 3,5 %, 4 %, 4,5 %, 5 %, 5,5 %, 6 %, 6,5 %, 7 %, 7,5 %, 8 %, 8,5 %, 9 %, 9,5 % o 10 % de homodímero.

En determinados modos de realización, el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo biespecífico que se une a ANG2 y VEGF.

En determinados modos de realización, el anticuerpo biespecífico comprende un primer sitio de unión a antígeno que comprende como dominio variable de la cadena pesada (VH) la SEQ ID NO: 1 y como dominio variable de la cadena ligera (VL) la SEQ ID NO: 2; y un segundo sitio de unión a antígeno que comprende como dominio variable de la cadena pesada (VH) la SEQ ID NO: 3 y como dominio variable de la cadena ligera (VL) la SEQ ID NO: 4. En determinados modos de realización, el anticuerpo biespecífico comprende una primera cadena pesada con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y una segunda cadena pesada con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y una primera cadena ligera con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y una segunda cadena ligera con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. En determinados modos de realización, el anticuerpo biespecífico comprende un primer sitio de unión a antígeno que comprende como dominio variable de la cadena pesada (VH) la SEQ ID NO: 5 y como dominio variable de la cadena ligera (VL) la SEQ ID NO: 6; y un segundo sitio de unión a antígeno que comprende como dominio variable de la cadena pesada (VH) la SEQ ID NO: 7 y como dominio variable de la cadena ligera (VL) la SEQ ID NO: 8. En determinados modos de realización, el anticuerpo biespecífico comprende una primera cadena pesada con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y una segunda cadena pesada con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y una primera cadena ligera con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y una segunda cadena ligera con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16. Las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1-16 se proporcionan en la tabla 4 a continuación:

Tabla 4

SEQ ID NO: 1	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFT NYGMNWVRQA PGKGLEWVGW INTYTGEPTY AADFKRRRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAED TAVYYCAKYP HYYGSSHWYF DVWGQGTTLVT VSS
SEQ ID NO: 2	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKVLIIYF TSSLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQ GTKVEIK
SEQ ID NO: 3	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT GYYMHWVRQA PGQGLEWMGW INPNSGGTNY AQKFQGRVTM TRDTSISTAY MELSRRLSDD TAVYYCARSP NPYYYDSSGY YYPGAFDIWG QGTMVTVS
SEQ ID NO: 4	QPGLTQPPSV SVAPGQTARI TCGGNNIGSK SVHWYQQKPG QAPVLVYDD SDRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISRVEAG DEADYYCQVW DSSSDHYVFG TGTKVTVL
SEQ ID NO: 5	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYDFT HYGMNWVRQA PGKGLEWVGW INTYTGEPTY AADFKRRRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAED TAVYYCAKYP YYYGTSHWYF DVWGQGTTLVT VSS
SEQ ID NO: 6	DIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKVLIIYF TSSLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQ GTKVEIK
SEQ ID NO: 7	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT GYYMHWVRQA PGQGLEWMGW INPNSGGTNY AQKFQGRVTM TRDTSISTAY MELSRRLSDD TAVYYCARSP NPYYYDSSGY YYPGAFDIWG QGTMVTVSS
SEQ ID NO: 8	SYVLTQPPSV SVAPGQTARI TCGGNNIGSK SVHWYQQKPG QAPVLVYDD SDRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISRVEAG DEADYYCQVW DSSSDHWVFG GGTKLTVLGQ
SEQ ID NO: 9	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT GYYMHWVRQA PGQGLEWMGW INPNSGGTNY AQKFQGRVTM TRDTSISTAY MELSRRLSDD TAVYYCARSP NPYYYDSSGY YYPGAFDIWG QGTMVTVSSA SVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC DKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVCTLPSS RDELTKNQVS LSCAVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLVSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLG PGK
SEQ ID NO: 10	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFT NYGMNWVRQA PGKGLEWVGW INTYTGEPTY AADFKRRRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAED TAVYYCAKYP HYYGSSHWYF DVWGQGTTLVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDKK VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPC RDELTKNQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLG PGK
SEQ ID NO: 11	QPGLTQPPSV SVAPGQTARI TCGGNNIGSK SVHWYQQKPG QAPVLVYDD SDRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISRVEAG DEADYYCQVW DSSSDHYVFG TGTKVTVLSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSC
SEQ ID NO: 12	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKVLIIYF TSSLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK

SEQ ID NO: 13	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYDFT HYGMNWVRQA PGKGLEWVGW INTYTGEPTY AADFKRRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAED TAVYYCAKYP YYYGTSHWYF DVWGQGT LVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDK VEPKSCDKTH TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP PKPKDTLMAS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLAQDWL NGKEYKCKVS NKALGAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPC RDELTKNQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN AYTQKSLSLS PGK
SEQ ID NO: 14	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT GYYMHWVRQA PGQGLEWMGW INPNSGGTNY AQKFQGRVTM TRDTSISTAY MELSRLRSDD TAVYYCARSP NPYYDSSGY YYPGAFDIWG QGTMTVTSSA SVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYSLSST LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC DKTH TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP PKPKDTLMAS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLAQDWL NGKEYKCKVS NKALGAPIEK TISKAKGQPR EPQVCTLPPS RDELTKNQVS LSCAVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLVSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN AYTQKSLSLS PGK
SEQ ID NO: 15	DIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKVL IYF TSSLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK
SEQ ID NO: 16	SYVLTQPPSV SVAPGQTARI TCGGNNIGSK SVHWYQQKPG QAPVLVYDD SDRPSGIPER FSGNSGNTA TLTISRVEAG DEADYYCQVW DSSSDHWVFG GGTKLTVLSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSC

En el presente documento se informa de un procedimiento para purificar un anticuerpo biespecífico que se une a ANG2 y VEGF con un procedimiento de cromatografía de múltiples etapas en el que el procedimiento comprende una etapa de cromatografía de afinidad, seguida de una etapa de cromatografía de intercambio aniónico multimodal, seguida de una etapa de cromatografía de intercambio catiónico multimodal y purificar de este modo el anticuerpo biespecífico que se une a ANG2 y VEGF, en el que el anticuerpo biespecífico que se une a ANG2 y VEGF comprende un primer sitio de unión a antígeno que comprende como dominio variable de la cadena pesada (VH) la SEQ ID NO: 1 y como dominio variable de la cadena ligera (VL) la SEQ ID NO: 2; y un segundo sitio de unión a antígeno que comprende como dominio variable de la cadena pesada (VH) la SEQ ID NO: 3 y como dominio variable de la cadena ligera (VL) la SEQ ID NO: 4 o que comprende un primer sitio de unión a antígeno que comprende como dominio variable de la cadena pesada (VH) la SEQ ID NO: 5 y como dominio variable de la cadena ligera (VL) la SEQ ID NO: 6; y un segundo sitio de unión a antígeno que comprende como dominio variable de la cadena pesada (VH) la SEQ ID NO: 7 y como dominio variable de la cadena ligera (VL) la SEQ ID NO: 8.

En un modo de realización, el anticuerpo biespecífico que se une a ANG2 y VEGF comprende a) la cadena pesada y la cadena ligera de un primer anticuerpo de longitud completa que comprende el primer sitio de unión a antígeno; y b) la cadena pesada modificada y la cadena ligera modificada de un anticuerpo de longitud completa que comprende el segundo sitio de unión a antígeno, en el que los dominios constantes CL y CH1 se reemplazan entre sí.

Polipéptidos

Anticuerpos monoclonales

En algunos modos de realización, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales. Se obtienen anticuerpos monoclonales de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto por posibles variantes que surjan durante la producción del anticuerpo monoclonal, estando presentes, en general, dichas variantes en cantidades menores. Por tanto, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que no es una mezcla de anticuerpos discretos o policlonales.

Por ejemplo, se pueden preparar los anticuerpos monoclonales usando el procedimiento de hibridoma descrito por

primera vez por Kohler *et al.*, *Nature* 256:495 (1975), o se pueden preparar mediante procedimientos de ADN recombinante (patente de EE. UU n.º 4.816.567).

En el procedimiento de hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado se inmuniza como se describe en el presente documento para inducir linfocitos que producen o pueden producir anticuerpos que se unirán específicamente al polipéptido usado para la inmunización. De forma alternativa, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*. Los linfocitos se fusionan a continuación con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)).

Las células de hibridoma preparadas de este modo se siembran y cultivan en un medio de cultivo adecuado que contenga preferentemente una o más sustancias que inhiban el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma originales no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma originales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá típicamente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), evitando dichas sustancias el crecimiento de células carentes de HGPRT.

En algunos modos de realización, las células de mieloma son aquellas que se fusionan eficazmente, soportan una producción estable de alto nivel de anticuerpo mediante las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Entre estas, en algunos modos de realización, las líneas celulares de mieloma son líneas de mieloma murino, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California EE. UU., y células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles de la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, EE. UU. También se han descrito líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

El medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma se somete a ensayo para determinar la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. En algunos modos de realización se determina la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoanálisis (RIA) o ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA).

La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se puede determinar, por ejemplo, por el análisis de Scatchard de Munson *et al.*, *Anal. Biochem.* 107:220 (1980).

Después de que se identifiquen células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitante y cultivar mediante procedimientos estándar (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma se pueden cultivar *in vivo* como tumores ascíticos en un animal.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, líquido ascítico o suero por procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales, tales como, por ejemplo, polipéptido A-Sepharose, cromatografía con hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, cromatografía de afinidad o cromatografía de intercambio iónico.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que se puedan unir específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). En algunos modos de realización, las células de hibridoma sirven como una fuente de dicho ADN. Una vez aislado, se puede colocar el ADN en vectores de expresión, que, a continuación, se transfectan en células huésped, tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de riñón embrionario humano (HEK) 293, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma, que, de otro modo, no producen polipéptido inmunoglobulínico, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Los artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica el anticuerpo incluyen Skerra *et al.*, *Curr. Opinion in Immunol.* 5:256-262 (1993) y Plückthun, *Immunol. Revs.*, 130:151-188 (1992).

En otro modo de realización, se pueden aislar anticuerpos o fragmentos de anticuerpo a partir de colecciones de fagos con anticuerpos generadas usando las técnicas descritas en McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554 (1990). Clackson *et al.*, *Nature* 352:624-628 (1991) y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, usando colecciones de fagos. Las publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo nM) mediante reordenamiento de cadenas (Marks *et al.*, *Bio/Technology* 10:779-783 (1992)), así como la infección combinatoria y la recombinación *in vivo* como una estrategia para construir colecciones de fagos muy grandes (Waterhouse *et al.*, *Nuc. Acids. Res.* 21:2265-2266 (1993)). Por tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas tradicionales de hibridoma

de anticuerpos monoclonales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

También se puede modificar el ADN, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante para los dominios constantes de la cadena pesada y ligera humana en lugar de las secuencias murinas homólogas (patente de EE. UU. n.º 4.816.567; Morrison *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 81:6851 (1984)), o uniendo covalentemente a la secuencia codificante de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido no inmunoglobulínico.

Típicamente, dichos polipéptidos no inmunoglobulínicos se sustituyen con los dominios constantes de un anticuerpo, o se sustituyen con los dominios variables de un sitio de combinación con antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprenda un sitio de combinación con antígeno que tenga especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación con antígeno que tenga especificidad por un antígeno diferente.

En algunos modos de realización de cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, el anticuerpo es IgA, IgD, IgE, IgG o IgM. En algunos modos de realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal IgG.

Fragmentos de anticuerpo

En algunos modos de realización, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo. Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaban por medio de digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto *et al.*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) y Brennan *et al.*, *Science* 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos se pueden producir ahora directamente mediante células huésped recombinantes. Por ejemplo, se pueden aislar los fragmentos de anticuerpo de las colecciones de fagos con anticuerpos analizadas anteriormente. De forma alternativa, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de *E. coli* y acoplar químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, se pueden aislar fragmentos F(ab')₂ directamente del cultivo de células huésped recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán evidentes para el profesional experto. En otros modos de realización, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véase el documento WO 93/16185; la patente de EE. UU. n.º 5.571.894 y la patente de EE. UU. n.º 5.587.458. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. 5.641.870, por ejemplo. Dichos fragmentos de anticuerpo lineal pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

En algunos modos de realización se proporcionan fragmentos de los anticuerpos descritos en el presente documento. En algunos modos de realización, el fragmento de anticuerpo es un fragmento de unión a antígeno. En algunos modos de realización, el fragmento de unión a antígeno se selecciona del grupo que consiste en un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')₂, un scFv, un Fv y un diacuerpo.

Variantes y modificaciones de los polipéptidos

En determinados modos de realización se contemplan variantes de secuencia de aminoácidos de las proteínas del presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas de la proteína. Se pueden preparar variantes de secuencia de aminoácidos de una proteína introduciendo modificaciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo o mediante síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, delecciones de y/o inserciones en y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos de la proteína. Se puede preparar cualquier combinación de delección, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas.

"Variante de polipéptido" significa un polipéptido, por ejemplo, un polipéptido activo, como se define en el presente documento, que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia natural de longitud completa del polipéptido, una secuencia de polipéptido que carece del péptido señalizador, un dominio extracelular de un polipéptido, con o sin el péptido señalizador. Dichas variantes de polipéptido incluyen, por ejemplo, polipéptidos en los que se añaden o delecionan uno o más residuos aminoacídicos en el extremo N o C de la secuencia de aminoácidos natural de longitud completa. Habitualmente, una variante de polipéptido tendrá al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, de forma alternativa, al menos aproximadamente cualquiera de un 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos, con respecto a una secuencia de polipéptido de secuencia natural de longitud completa, una secuencia de polipéptido que carece del péptido señalizador, un dominio extracelular de un polipéptido, con o sin el péptido señalizador. Opcionalmente, los polipéptidos variantes no tendrán más de una sustitución aminoacídica conservadora en comparación con la secuencia de polipéptido natural, de forma alternativa, no más de aproximadamente cualquiera de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones aminoacídicas conservadoras en comparación con la secuencia de polipéptido natural.

El polipéptido variante se puede trancar en el extremo N o en el extremo C, o puede carecer de residuos internos, por ejemplo, cuando se compara con un polipéptido natural de longitud completa. Determinados polipéptidos variantes pueden carecer de residuos aminoacídicos que no sean esenciales para una actividad biológica deseada. Estos polipéptidos variantes con truncamientos, deleciones e inserciones se pueden preparar mediante cualquiera de varias técnicas convencionales. Los polipéptidos variantes deseados se pueden sintetizar químicamente. Otra técnica adecuada implica aislar y amplificar un fragmento de ácido nucleico que codifica un polipéptido variante deseado, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos que definen los extremos deseados del fragmento de ácido nucleico se emplean en los cebadores 5' y 3' en la PCR. Preferentemente, los polipéptidos variantes comparten al menos una actividad biológica y/o inmunitaria con el polipéptido natural divulgado en el presente documento.

Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxiterminales que varían en longitud desde un residuo hasta polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuenciales de residuos aminoacídicos únicos o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo de metionilo N terminal o el anticuerpo fusionado a un polipéptido citotóxico. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión en el extremo N o C del anticuerpo a una enzima o un polipéptido que incrementa la semivida en suero del anticuerpo.

Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del polipéptido. Las variantes de secuencia de aminoácidos del polipéptido se preparan introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ácido nucleico del anticuerpo o por síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de y/o inserciones en y/o sustituciones de residuos en las secuencias de aminoácidos del polipéptido. Se prepara cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácido también pueden alterar los procesos postraduccionales del polipéptido (por ejemplo, anticuerpo), tales como el cambio del número o posición de los sitios de glucosilación.

Se pueden encontrar directrices para determinar qué residuo aminoacídico se puede insertar, sustituir o deleccionar sin afectar negativamente a la actividad deseada comparando la secuencia del polipéptido con la de moléculas de polipéptido conocidas homólogas y minimizando el número de cambios en la secuencia de aminoácidos realizados en regiones de homología alta.

Un procedimiento útil para la identificación de determinados residuos o regiones del polipéptido (por ejemplo, anticuerpo) que sean localizaciones preferentes para la mutagénesis se llama "mutagénesis por barrido de alanina" como se describe por Cunningham y Wells, Science 244:1081-1085 (1989). Aquí, un residuo o grupo de residuos diana (por ejemplo, residuos cargados, tales como Arg, Asp, His, Lys y Glu) se identifica y reemplaza por un aminoácido neutro o cargado negativamente (lo más preferentemente alanina o polialanina) para que afecten a la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Esas localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan, a continuación, introduciendo variantes adicionales u otras en, o para, los sitios de sustitución. Por tanto, aunque el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácidos está predeterminado, no es necesario que la naturaleza de la mutación *per se* esté predeterminada. Por ejemplo, para analizar el funcionamiento de una mutación en un sitio dado, se realiza una mutagénesis aleatoria o por barrido de Ala en el codón o región diana y se criban las variantes de anticuerpo expresadas para determinar la actividad deseada.

Otro tipo de variante es una variante de sustitución aminoacídica. Estas variantes tienen al menos un residuo aminoacídico en la molécula de anticuerpo reemplazado por un residuo diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis por sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones en FR. Si dichas sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces se pueden introducir cambios más sustanciales, denominados "sustituciones ejemplares" en la tabla 5, o como se describe adicionalmente más adelante con referencia a las clases de aminoácidos, y se criban los productos.

Tabla 5

Residuo original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones conservadoras
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu

Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; norleucina	Leu

Se consiguen modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del polipéptido seleccionando sustituciones que difieran significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura de la cadena principal del polipéptido en el área de sustitución, por ejemplo, como una conformación de lámina o hélice, (b) la carga o hidrofobia de la molécula en el sitio diana o (c) el volumen de la cadena lateral. Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo con las similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (en A. L. Lehninger, Biochemistry segunda ed., pp. 73-75, Worth Publishers, Nueva York (1975)):

- (1) no polares: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)
- (2) polares no cargados: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)
- (3) ácidos: Asp (D), Glu (E)
- (4) básicos: Lys (K), Arg (R), His (H)

De forma alternativa, los residuos naturales se pueden dividir en grupos basados en propiedades de cadena lateral comunes:

- (1) hidrófobos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) ácidos: Asp, Glu;
- (4) básicos: His, Lys, Arg;
- (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;
- (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservadoras conllevarán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase.

Cualquier residuo de cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación apropiada del anticuerpo también se puede sustituir, en general, por serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar la reticulación anómala. Por el contrario, se puede(n) añadir (un) enlace(s) de cisteína al polipéptido para mejorar su estabilidad (en particular, si el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento Fv).

Un ejemplo de variante de sustitución implica la sustitución de uno o más residuos de la región hipervariable de un anticuerpo original (por ejemplo, un anticuerpo humanizado). En general, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para su desarrollo adicional tendrá(n) propiedades biológicas mejoradas en relación con el anticuerpo original a partir del que se generan. Una manera conveniente de generar dichas variantes de sustitución implica la maduración en afinidad usando presentación en fagos. En resumen, se mutan varios sitios de la región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) para generar todas las posibles sustituciones aminoácidas en cada sitio. Las variantes de anticuerpo generadas así se presentan de una forma monovalente a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones con el producto del gen III de M13 empaquetadas en cada partícula. A continuación, se criban las variantes de presentación en fagos para determinar su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) como se divulga en el presente documento. Para identificar los sitios de la región hipervariable candidatos para la modificación, se puede realizar mutagénesis por barrido de alanina para identificar los residuos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión a antígeno. De forma alternativa, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y la diana. Dichos residuos de contacto y residuos cercanos son candidatos para la sustitución de acuerdo con las técnicas detalladas en el presente documento. Una vez que se generan dichas variantes, el panel de variantes se somete a cribado como se describe en el presente documento y se pueden seleccionar los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos pertinentes para su desarrollo adicional.

Otro tipo de variante de aminoácidos del polipéptido altera el patrón de glucosilación original del anticuerpo. El polipéptido puede comprender restos distintos a aminoácidos. Por ejemplo, se puede glucosilar el polipéptido. Dicha glucosilación se puede producir de forma natural durante la expresión del polipéptido en la célula huésped u organismo huésped, o puede ser una modificación intencionada surgida de la intervención humana. Por alteración se entiende eliminar uno o más restos glucídicos encontrados en el polipéptido y/o añadir uno o más sitios de glucosilación que no están presentes en el polipéptido.

La glucosilación del polipéptido es típicamente unida a N o bien unida a O. Unido a N se refiere a la fijación del resto glucídico a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la fijación enzimática del resto glucídico a la cadena lateral de asparagina. Por tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glucosilación potencial. La glucosilación unida a O se refiere a la fijación de uno de los glucídicos N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, lo más comúnmente serina o treonina, aunque también se puede usar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glucosilación al polipéptido se consigue convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de modo que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para sitios de glucosilación unidos a N). La alteración también se puede preparar mediante la adición de, o sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina con respecto a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glucosilación unidos a O).

Se puede conseguir la retirada de los restos glucídicos presentes en el polipéptido química o enzimáticamente o mediante sustitución por mutación de codones que codifican residuos aminoácidos que sirven como dianas para la glucosilación. Se puede lograr la escisión enzimática de restos glucídicos en polipéptidos mediante el uso de una variedad de endo y exoglucosidasas.

Otras modificaciones incluyen la desamidación de residuos de glutaminilo y asparaginilo con respecto a los residuos de glutamilo y aspartilo correspondientes, respectivamente, la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de residuos de serilo o treonilo, la metilación de los grupos γ -amino de las cadenas laterales de lisina, arginina e histidina, la acetilación de la amina N terminal y la amidación de cualquier grupo carboxilo C terminal.

Polipéptidos quiméricos

El polipéptido descrito en el presente documento se puede modificar de manera que forme moléculas quiméricas que comprendan el polipéptido fusionado a otro polipéptido heterólogo o secuencia de aminoácidos. En algunos modos de realización, una molécula quimérica comprende una fusión del polipéptido con un polipéptido de marca que proporciona un epítipo al que se puede unir selectivamente un anticuerpo anti-marca. La marca de epítipo se dispone, en general, en el extremo amínico o carboxílico del polipéptido. La presencia de dichas formas con marca de epítipo del polipéptido se puede detectar usando un anticuerpo frente al polipéptido de marca. Además, la provisión de la marca de epítipo posibilita que el polipéptido se purifique fácilmente mediante purificación por

afinidad usando un anticuerpo anti-marca u otro tipo de matriz de afinidad que se una a la marca de epítipo.

Anticuerpos multiespecíficos

Un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo multiespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión por al menos dos sitios diferentes. En determinados modos de realización, una de las especificidades de unión es por c-met y la otra es por cualquier otro antígeno. En determinados modos de realización, los anticuerpos biespecíficos se pueden unir a dos epítopos diferentes de c-met. También se pueden usar anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos en células que expresan c-met. Se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo.

Las técnicas para preparar anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero no se limitan a, coexpresión recombinante de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina que tienen especificidades diferentes (véanse Milstein y Cuello, *Nature* 305: 537 (1983)), documento WO 93/08829, y Traunecker *et al.*, *EMBO J.* 10:3655 (1991)), y genomanipulación por "botón en ojal" (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.731.168). Los anticuerpos multiespecíficos también se pueden preparar genomanipulando los efectos de conducción electrostática para preparar moléculas heterodímeros de Fc de anticuerpos (documento WO 2009/089004A1); reticulando dos o más anticuerpos o fragmentos (véanse, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.676.980, y Brennan *et al.*, *Science*, 229: 81 (1985)); usando cremalleras de leucina para producir anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)); usando tecnología de "diacuerpos" para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)); y usando dímeros de Fv monocatenarios (sFv) (véase, por ejemplo, Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)); y preparando anticuerpos trispecíficos como se describe, por ejemplo, en Tutt *et al.*, *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

El anticuerpo o fragmento en el presente documento también incluye los anticuerpos multiespecíficos descritos en los documentos WO 2009/080251, WO 2009/080252, WO 2009/080253, WO 2009/080254, WO 2010/112193, WO 2010/115589, WO 2010/136172, WO 2010/145792 y WO 2010/145793.

En el presente documento también se incluyen anticuerpos genomanipulados con tres o más sitios de unión a antígeno funcionales, incluyendo los "anticuerpos pulpo" (véase, por ejemplo, el documento US 2006/002557A1).

El anticuerpo o fragmento en el presente documento también incluye un "Fab de doble acción" (DAF) que comprende un sitio de unión a antígeno que se une a un primer epítipo (por ejemplo, en un primer antígeno) así como en otro epítipo diferente (por ejemplo, en el primer antígeno o en un segundo antígeno diferente) (véase, por ejemplo, el documento US 2008/0069820; Bostrom *et al.* (2009) *Science*, 5921, 1610-1614).

En la técnica se conocen procedimientos para preparar anticuerpos biespecíficos. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas pesadas tienen especificidades diferentes (Milstein y Cuello, *Nature*, 305: 537 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, estos híbridos (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las que solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, lo que normalmente se hace por etapas de cromatografía de afinidad, es bastante engorrosa, y los rendimientos del producto son bajos. Se divulgan procedimientos similares en el documento WO 93/08829 publicado el 13 de mayo de 1993 y en Traunecker *et al.*, *EMBO J.*, 10: 3655 (1991).

De acuerdo con un enfoque diferente y más preferente, los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan a secuencias del dominio constante de inmunoglobulina. La fusión es preferentemente con un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Es preferente tener la primera región constante de la cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión a la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones con la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad al ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en modos de realización en los que proporciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en proporciones iguales da como resultado altos rendimientos o cuando las proporciones no son de especial importancia.

En un modo de realización preferente de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos están compuestos de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se descubrió que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico

deseado de combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en solo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una forma de separación fácil. Este enfoque se divulga en el documento WO 94/04690. Para otros detalles de la generación de anticuerpos biespecíficos, véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

Tecnología de botón en ojal

De acuerdo con otro enfoque, la interfase entre un par de moléculas de anticuerpo se puede genomanipular para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La interfase preferente comprende al menos una parte del dominio CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este procedimiento se reemplazan una o más cadenas laterales de aminoácido pequeñas de la interfase de la primera molécula de anticuerpo por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano) (botones o protuberancias). Se crean "cavidades" compensatorias (ojales) de tamaño idéntico o similar a la(s) cadena(s) lateral(es) grande(s) en la interfase de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando cadenas laterales de aminoácido grandes por otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para incrementar el rendimiento del heterodímero frente a otros productos finales no deseados, tales como homodímeros. Se describen además botones y ojales en el presente documento.

El uso de botones en ojales como procedimiento de producción de anticuerpos multiespecíficos y/o anticuerpos de un brazo y/o inmunoadhesinas es bien conocido en la técnica. Véanse la patente de EE. UU. n.º 5.731.168 concedida el 24 de marzo de 1998 cedida a Genentech, la publicación PCT n.º W02009089004, publicada el 16 de julio de 2009 y cedida a Amgen, y la publicación de patente de EE. UU. n.º 20090182127, publicada el 16 de julio de 2009 y cedida a Novo Nordisk A/S. Véanse también Marvin and Zhu, *Acta Pharmacologica Sincia* (2005) 26(6):649-658 y Kontermann (2005) *Acta Pharmacol. Sin.*, 26:1-9. Aquí se proporciona un breve análisis.

Una "protuberancia" se refiere a al menos una cadena lateral de aminoácido que sobresale de la interfase de un primer polipéptido y es, por lo tanto, posicionable en una cavidad compensatoria en la interfase contigua (es decir, la interfase de un segundo polipéptido) para estabilizar el heteromultímero y, de este modo, favorecer la formación de heteromultímeros sobre la formación de homomultímeros, por ejemplo. La protuberancia puede existir en la interfase original o se puede introducir sintéticamente (por ejemplo, alterando el ácido nucleico que codifica la interfase). Normalmente, el ácido nucleico que codifica la interfase del primer polipéptido se altera para codificar la protuberancia. Para lograr esto, el ácido nucleico que codifica al menos un residuo aminoácido "original" en la interfase del primer polipéptido se reemplaza por el ácido nucleico que codifica al menos un residuo aminoácido "de importación" que tiene un volumen de cadena lateral mayor que el residuo aminoácido original. Se apreciará que puede haber más de un residuo original y su correspondiente residuo de importación. El límite superior para el número de residuos originales que se reemplazan es el número total de residuos en la interfase del primer polipéptido. Los volúmenes de cadena lateral de los diversos residuos amino se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 6: Propiedades de aminoácidos

Aminoácido	Abreviatura de una letra	MASA ^a (daltons)	VOLUMEN ^b (ångstrom ³)	Área de superficie accesible ^c (ångstrom ²)
Alanina (Ala)	A	71,08	88,6	115
Arginina (Arg)	R	156,20	173,4	225
Asparagina (Asn)	N	114,11	117,7	160
Ácido aspártico (Asp)	D	115,09	111,1	150
Cisteína (Cys)	C	103,14	108,5	135
Glutamina (Gln)	Q	128,14	143,9	180
Ácido glutámico (Glu)	E	129,12	138,4	190
Glicina (Gly)	G	57,06	60,1	75
Histidina (His)	H	137,15	153,2	195
Isoleucina (Ile)	I	113,17	166,7	175
Leucina (Leu)	L	113,17	166,7	170
Lisina (Lys)	K	128,18	168,6	200
Metionina (Met)	M	131,21	162,9	185
Fenilalanina (Phe)	F	147,18	189,9	210

Prolina (Pro)	P	97,12	122,7	145
Serina (Ser)	S	87,08	89,0	115
Treonina (Thr)	T	101,11	116,1	140
Triptófano (Trp)	W	186,21	227,8	255
Tirosina (Tyr)	Y	163,18	193,6	230
Valina (Val)	V	99,14	140,0	155

^a Peso molecular del aminoácido menos el del agua. Valores de Handbook of Chemistry and Physics, 43.^a ed. Cleveland, Chemical Rubber Publishing Co., 1961.

5 ^b Valores de A.A. Zamyatnin, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 24:107-123, 1972.

^c Valores de C. Chothia, *J. Mol. Biol.* 105:1-14, 1975. El área de superficie accesible se define en las figuras 6-20 de esta referencia.

10 Los residuos de importación preferentes para la formación de una protuberancia, en general, son residuos aminoácidos naturales y se seleccionan preferentemente de arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W). Los más preferentes son triptófano y tirosina. En un modo de realización, el residuo original para la formación de la protuberancia tiene un volumen de cadena lateral pequeño, tal como alanina, asparagina, ácido aspártico, glicina, serina, treonina o valina. Las sustituciones aminoácidas ejemplares en el dominio CH3 para formar la
15 protuberancia incluyen, sin limitación, la sustitución T366W.

Una "cavidad" se refiere a al menos una cadena lateral de aminoácido que se retrae de la interfase de un segundo polipéptido y, por lo tanto, aloja una protuberancia correspondiente en la interfase adyacente de un primer polipéptido. La cavidad puede existir en la interfase original o se puede introducir sintéticamente (por ejemplo, alterando el ácido nucleico que codifica la interfase). Normalmente, el ácido nucleico que codifica la interfase del segundo polipéptido se altera para codificar la cavidad. Para lograr esto, el ácido nucleico que codifica al menos un residuo aminoácido "original" en la interfase del segundo polipéptido se reemplaza por el ADN que codifica al menos un residuo aminoácido "de importación" que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño que el residuo aminoácido original. Se apreciará que puede haber más de un residuo original y su correspondiente residuo de importación. El límite superior para el número de residuos originales que se reemplazan es el número total de residuos en la interfase del segundo polipéptido. Los volúmenes de cadena lateral de los diversos residuos amino se muestran en la tabla 2 anterior. Los residuos importados preferentes para la formación de una cavidad son normalmente residuos aminoácidos naturales y se seleccionan preferentemente de alanina (A), serina (S), treonina (T) y valina (V). Los más preferentes son serina, alanina o treonina. En un modo de realización, el residuo original para la formación de la cavidad tiene un volumen de cadena lateral grande, tal como tirosina, arginina, fenilalanina o triptófano. Las sustituciones aminoácidas ejemplares en el dominio CH3 para generar la cavidad incluyen, sin limitación, las sustituciones T366S, L368A e Y407A.

Un residuo aminoácido "original" es uno que se reemplaza por un residuo "de importación" que puede tener un volumen de cadena lateral más pequeño o más grande que el residuo original. El residuo aminoácido de importación puede ser un residuo aminoácido natural o no natural, pero preferentemente es el primero. Los residuos aminoácidos "naturales" son los residuos codificados por el código genético y enumerados en la tabla 2 anterior. Por residuo aminoácido "no natural" se quiere decir un residuo que no se codifica por el código genético, pero que puede unir de forma covalente residuo(s) aminoácido(s) contiguo(s) en la cadena polipeptídica. Los ejemplos de residuos aminoácidos no naturales son norleucina, ornitina, norvalina, homoserina y otros análogos de residuos aminoácidos, tales como los descritos en Ellman *et al.*, *Meth. Enzym.* 202:301-336 (1991), por ejemplo. Para generar dichos residuos aminoácidos no naturales se pueden usar los procedimientos de Noren *et al.* *Science* 244: 182 (1989) y Ellman *et al.*, *supra*. En resumen, esto implica activar químicamente un ARNt supresor con un residuo aminoácido no natural, seguido de transcripción y traducción *in vitro* del ARN. Los procedimientos proporcionados en el presente documento implican reemplazar al menos un residuo aminoácido original, pero se puede reemplazar más de un residuo original. Normalmente, no más de los residuos totales en la interfase del primer o segundo polipéptido comprenderán residuos aminoácidos originales que se reemplazan. Típicamente, los residuos originales para reemplazo están "enterrados". Por "enterrado" se quiere decir que el residuo es esencialmente inaccesible para el disolvente. En general, el residuo de importación no es cisteína para prevenir la posible oxidación o emparejamiento erróneo de los enlaces disulfuro.
50

La protuberancia es "posicionable" en la cavidad, lo que significa que la localización espacial de la protuberancia y la cavidad en la interfase de un primer polipéptido y segundo polipéptido respectivamente y los tamaños de la protuberancia y la cavidad son tales que la protuberancia se puede localizar en la cavidad sin perturbar significativamente la asociación normal del primer y segundo polipéptidos en la interfase. Puesto que las protuberancias tales como Tyr, Phe y Trp típicamente no se extienden perpendicularmente del eje de la interfase y tienen conformaciones preferentes, la alineación de una protuberancia con una cavidad correspondiente se basa en modelar el par protuberancia/cavidad en base a una estructura tridimensional, tal como la obtenida por
55

cristalografía de rayos X o resonancia magnética nuclear (RMN). Esto se puede lograr usando técnicas ampliamente aceptadas en la técnica.

Por "ácido nucleico original o molde" se quiere decir el ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés que se puede "alterar" (es decir, genomanipular o mutar) para codificar una protuberancia o cavidad. El ácido nucleico original o de partida puede ser un ácido nucleico natural o puede comprender un ácido nucleico que se ha sometido a alteración previa (por ejemplo, un fragmento de anticuerpo humanizado). Por "alterar" el ácido nucleico se quiere decir que el ácido nucleico original se muta insertando, delecionando o reemplazando al menos un codón que codifica un residuo aminoacídico de interés. Normalmente, un codón que codifica un residuo original se reemplaza por un codón que codifica un residuo de importación. Las técnicas para modificar genéticamente un ADN de este modo se han revisado en *Mutagenesis: a Practical Approach*, M.J. McPherson, Ed., (IRL Press, Oxford, Reino Unido (1991), e incluyen mutagénesis dirigida a sitio, mutagénesis con casete y mutagénesis por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), por ejemplo. Al mutar un ácido nucleico original/molde, se altera por tanto de forma correspondiente un polipéptido original/molde codificado por el ácido nucleico original/molde.

La protuberancia o cavidad se puede "introducir" en la interfase de un primer o segundo polipéptido por medios sintéticos, por ejemplo, por técnicas recombinantes, síntesis de péptidos *in vitro*, las técnicas para introducir residuos aminoacídicos no naturales descritas previamente, por acoplamiento enzimático o químico de péptidos o alguna combinación de estas técnicas. En consecuencia, la protuberancia o cavidad que se "introduce" es "no natural", lo que significa que no existe en la naturaleza o en el polipéptido original (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal humanizado).

En general, el residuo aminoacídico de importación para formar la protuberancia tiene un número relativamente pequeño de "rotámeros" (por ejemplo, aproximadamente 3-6). Un "rotámero" es una conformación energéticamente favorable de una cadena lateral de aminoácidos. El número de rotámeros de los diversos residuos aminoacídicos se revisa en Ponders y Richards, *J. Mol. Biol.* 193: 775-791 (1987).

En un modo de realización, un primer polipéptido con Fc y un segundo polipéptido con Fc se encuentran/interaccionan en una interfase. En algunos modos de realización en los que el primer y segundo polipéptido con Fc se encuentran en una interfase, la interfase del segundo polipéptido con Fc (secuencia) comprende una protuberancia (también denominada "botón") que es posicionable en una cavidad (también denominada "ojal") en la interfase del primer polipéptido con Fc (secuencia). En un modo de realización, el primer polipéptido con Fc se ha alterado a partir de un polipéptido molde/original para codificar la cavidad o el segundo polipéptido con Fc se ha alterado a partir de un polipéptido molde/original para codificar la protuberancia, o ambos. En un modo de realización, el primer polipéptido con Fc se ha alterado a partir de un polipéptido molde/original para codificar la cavidad y el segundo polipéptido con Fc se ha alterado a partir de un polipéptido molde/original para codificar la protuberancia. En un modo de realización, la interfase del segundo polipéptido con Fc comprende una protuberancia que es posicionable en una cavidad en la interfase del primer polipéptido con Fc, en la que la cavidad o protuberancia, o ambas, se han introducido en la interfase del primer y segundo polipéptidos con Fc, respectivamente. En algunos modos de realización en los que el primer y segundo polipéptido con Fc se encuentran en una interfase, la interfase del primer polipéptido con Fc (secuencia) comprende una protuberancia que es posicionable en una cavidad en la interfase del segundo polipéptido con Fc (secuencia). En un modo de realización, el segundo polipéptido con Fc se ha alterado a partir de un polipéptido molde/original para codificar la cavidad o el primer polipéptido con Fc se ha alterado a partir de un polipéptido molde/original para codificar la protuberancia, o ambos. En un modo de realización, el segundo polipéptido con Fc se ha alterado a partir de un polipéptido molde/original para codificar la cavidad y el primer polipéptido con Fc se ha alterado a partir de un polipéptido molde/original para codificar la protuberancia. En un modo de realización, la interfase del primer polipéptido con Fc comprende una protuberancia que es posicionable en una cavidad en la interfase del segundo polipéptido con Fc, en la que la protuberancia o cavidad, o ambas, se han introducido en la interfase del primer y segundo polipéptidos con Fc, respectivamente.

En un modo de realización, la protuberancia y la cavidad comprenden cada una un residuo aminoacídico natural. En un modo de realización, el polipéptido con Fc que comprende la protuberancia se genera reemplazando un residuo original de la interfase de un polipéptido molde/original por un residuo de importación que tiene un volumen de cadena lateral más grande que el residuo original. En un modo de realización, el polipéptido con Fc que comprende la protuberancia se genera por un procedimiento que comprende una etapa en la que el polinucleótido que codifica un residuo original de la interfase de dicho polipéptido se reemplaza por un polinucleótido que codifica un residuo de importación que tiene un volumen de cadena lateral más grande que el original. En un modo de realización, el residuo original es treonina. En un modo de realización, el residuo original es T366. En un modo de realización, el residuo de importación es arginina (R). En un modo de realización, el residuo de importación es fenilalanina (F). En un modo de realización, el residuo de importación es tirosina (Y). En un modo de realización, el residuo de importación es triptófano (W). En un modo de realización, el residuo de importación es R, F, Y o W. En un modo de realización se genera una protuberancia reemplazando dos o más residuos en un polipéptido molde/original. En un modo de realización, el polipéptido con Fc que comprende una protuberancia comprende el reemplazo de treonina en la posición 366 por triptófano, numeración de aminoácidos de acuerdo con el esquema de numeración EU de Kabat *et al.* (pp. 688-696 en *Sequences of proteins of immunological interest*, 5.^a ed., vol. 1

(1991; NIH, Bethesda, MD)).

En algunos modos de realización, el polipéptido con Fc que comprende una cavidad se genera reemplazando un residuo original en la interfase de un polipéptido molde/original por un residuo de importación que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño que el residuo original. Por ejemplo, se puede generar el polipéptido con Fc que comprende la cavidad por un procedimiento que comprende una etapa en la que el polinucleótido que codifica un residuo original de la interfase de dicho polipéptido se reemplaza por un polinucleótido que codifica un residuo de importación que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño que el original. En un modo de realización, el residuo original es treonina. En un modo de realización, el residuo original es leucina. En un modo de realización, el residuo original es tirosina. En un modo de realización, el residuo de importación no es cisteína (C). En un modo de realización, el residuo de importación es alanina (A). En un modo de realización, el residuo de importación es serina (S). En un modo de realización, el residuo de importación es treonina (T). En un modo de realización, el residuo de importación es valina (V). Se puede generar una cavidad reemplazando uno o más residuos originales de un polipéptido molde/original. Por ejemplo, en un modo de realización, el polipéptido con Fc que comprende una cavidad comprende el reemplazo de dos o más aminoácidos originales seleccionados del grupo que consiste en treonina, leucina y tirosina. En un modo de realización, el polipéptido con Fc que comprende una cavidad comprende dos o más residuos de importación seleccionados del grupo que consiste en alanina, serina, treonina y valina. En algunos modos de realización, el polipéptido con Fc que comprende una cavidad comprende el reemplazo de dos o más aminoácidos originales seleccionados del grupo que consiste en treonina, leucina y tirosina, y en el que dichos aminoácidos originales se reemplazan por residuos de importación seleccionados del grupo que consiste en alanina, serina, treonina y valina. En algunos modos de realización, un aminoácido original que se reemplaza es T366, L368 y/o Y407. En un modo de realización, el polipéptido de Fc que comprende una cavidad comprende el reemplazo de treonina en la posición 366 por serina, numeración de aminoácidos de acuerdo con el esquema de numeración EU de Kabat *et al. supra*. En un modo de realización, el polipéptido de Fc que comprende una cavidad comprende el reemplazo de leucina en la posición 368 por alanina, numeración de aminoácidos de acuerdo con el esquema de numeración EU de Kabat *et al. supra*. En un modo de realización, el polipéptido de Fc que comprende una cavidad comprende el reemplazo de tirosina en la posición 407 por valina, numeración de aminoácidos de acuerdo con el esquema de numeración EU de Kabat *et al. supra*. En un modo de realización, el polipéptido de Fc que comprende una cavidad comprende dos o más reemplazos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en T366S, L368A y Y407V, numeración de aminoácidos de acuerdo con el esquema de numeración EU de Kabat *et al. supra*. En algunos modos de realización de estos fragmentos de anticuerpo, el polipéptido de Fc que comprende la protuberancia comprende el reemplazo de treonina en la posición 366 por triptófano, numeración de aminoácidos de acuerdo con el esquema de numeración EU de Kabat *et al. supra*.

En un modo de realización, el anticuerpo comprende mutaciones en Fc que constituyen "botones" y "ojales" como se describe en el documento WO2005/063816. Por ejemplo, una mutación de ojal puede ser una o más de T366A, L368A y/o Y407V en un polipéptido de Fc y una mutación de botón puede ser T366W en una cadena principal de IgG1 o IgG4. Se pueden preparar mutaciones equivalentes en otros isotipos de inmunoglobulinas por un experto en la técnica. Además, el experto en la técnica apreciará fácilmente que es preferente que los dos semianticuerpos usados para el compuesto biespecífico sean del mismo isotipo.

Tecnología CrossMab

Schaefer *et al.* (Roche Diagnostics GmbH), describen un procedimiento para expresar dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, derivadas de dos anticuerpos existentes, como anticuerpos IgG biespecíficos bivalentes humanos sin el uso de conectores artificiales (PNAS (2011) 108(27): 11187-11192 y el documento US 2009/0232811). El procedimiento implica intercambiar uno o más dominios de la cadena pesada y cadena ligera dentro del fragmento de unión a antígeno (Fab) de una mitad del anticuerpo biespecífico (CrossMab). La asociación correcta de las cadenas ligeras y sus cadenas pesadas afines se logra mediante el intercambio de dominios de la cadena pesada y cadena ligera dentro del fragmento de unión a antígeno (Fab) de una mitad del anticuerpo biespecífico. Este "cruce" conserva la afinidad de unión a antígeno, pero hace que los dos brazos sean tan diferentes que ya no se puede producir un emparejamiento erróneo de las cadenas ligeras. Véanse los documentos WO2009/080251, WO2009/080252, WO2009/080253, WO2009/080254, WO 2010/115589, WO 2010/136172, WO 2010/145792 y WO 2010/145793, cada uno incorporado en el presente documento a modo de referencia en su totalidad. A pesar de estas ventajas recientes, por ejemplo, debido al desarrollo de metodologías como "botón en ojal" (KiH) o la tecnología "CrossMab", la expresión de anticuerpos multiespecíficos todavía puede dar lugar a la formación no deseada de impurezas específicas del producto asociadas específicamente con su producción. Estas impurezas específicas del producto, por ejemplo, pueden incluir 1/2 de anticuerpos (que comprenden un único par de la cadena pesada/cadena ligera), 3/4 de anticuerpos (que comprenden un anticuerpo completo que carece de una única cadena ligera) o un subproducto de 5/4 de anticuerpo (que comprende un dominio variable adicional de la cadena pesada o ligera).

Tecnología BiTE

Otro formato, usado para moléculas de ligadores biespecíficos de linfocitos T (BiTE) (véase, por ejemplo, Wolf *et al.*

(2005) Drug Discovery Today 10:1237-1244)), se basa en módulos de fragmento monocatenario variable (scFv). Un scFv consiste en regiones variables de la cadena ligera y pesada de un anticuerpo fusionadas por medio de un conector flexible, que, en general, se puede plegar apropiadamente y de modo que las regiones se puedan unir al antígeno afin. Un BiTE concatena dos scFv de diferentes especificidades en tándem en una única cadena. Esta configuración impide la producción de moléculas con dos copias de la misma región variable de la cadena pesada. Además, la configuración del conector se diseña para garantizar el emparejamiento correcto de las respectivas cadenas ligera y pesada.

Otros formatos de anticuerpo biespecífico

Strop *et al.* (Rinat-Pfizer Inc.) describen un procedimiento para producir anticuerpos biespecíficos estables expresando y purificando dos anticuerpos de interés por separado y, a continuación, mezclándolos en condiciones redox específicas (J. Mol. Biol. (2012) 420:204-19).

Se pueden incorporar otros dominios de heterodimerización que tengan una fuerte preferencia por formar heterodímeros sobre homodímeros en las presentes proteínas de unión a antígeno multiespecíficas. Los ejemplos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, los documentos WO2007147901 (Kjærgaard *et al.* – Novo Nordisk: que describe interacciones iónicas); WO 2009089004 (Kannan *et al.* – Amgen: que describe efectos de conducción electrostática); WO 2010/034605 (Christensen *et al.* – Genentech; que describe superhélices). Véase también, por ejemplo, Pack, P. & Plueckthun, A., Biochemistry 31, 1579-1584 (1992) que describe la cremallera de leucinas o Pack *et al.*, Bio/Technology 11, 1271-1277 (1993) que describe el motivo de hélice-giro-hélice. La frase "dominio de heteromultimerización" y "dominio de heterodimerización" se usan de manera intercambiable en el presente documento. En determinados modos de realización, la proteína de unión a antígeno multiespecífica comprende uno o más dominios de heterodimerización.

Zhu *et al.* (Genentech) han genomanipulado mutaciones en la interfase VL/VH de una construcción de diacuerpo que consiste en fragmentos de anticuerpo de dominio variante completamente desprovistos de dominios constantes, y generaron un diacuerpo heterodimérico (Protein Science (1997) 6:781-788). De forma similar, Igawa *et al.* (Chugai) también han genomanipulado mutaciones en la interfase VL/VH de un diacuerpo monocatenario para promover la expresión selectiva e inhibir la isomerización conformacional del diacuerpo (Protein Engineering, Design & Selection (2010) 23:667-677).

La publicación de patente de EE. UU. n.º 2009/0182127 (Novo Nordisk, Inc.) describe la generación de anticuerpos biespecíficos modificando residuos aminoácidos en la interfase de Fc y en la interfase CH1:CL de pares de las cadena ligera-pesada que reducen la capacidad de la cadena ligera de un par para interactuar con la cadena pesada del otro par.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado se puede acoplar a avidina, el otro, a biotina. Por ejemplo, se han propuesto dichos anticuerpos para dirigir células del sistema inmunitario a células indeseadas (patente de EE. UU. n.º 4.676.980) y para el tratamiento de la infección por el VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 03089). Se pueden preparar anticuerpos heteroconjugados usando cualquier procedimiento de reticulación conveniente. Los agentes de reticulación adecuados son bien conocidos en la técnica y se divulgan en la patente de EE. UU. n.º 4.676.980, junto con varias técnicas de reticulación.

En la literatura también se han descrito técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos usando un enlace químico. Brennan *et al.*, Science, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que se escinden proteolíticamente anticuerpos intactos para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente arsenito de sodio de formación de complejos con ditiol para estabilizar los ditiolos vecinos y evitar la formación de disulfuro intermolecular. A continuación, los fragmentos Fab' generados se convierten en derivados de tionitrobenzoato (TNB). A continuación, uno de los derivados Fab'-TNB se reconvierte en Fab'-tiol por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden usar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpo biespecífico directamente del cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucinas. Kostelny *et al.*, J. Immunol., 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos de cremalleras de leucinas de las proteínas Fos y Jun se enlazaron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes por fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y, a continuación, se volvieron a oxidar para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este procedimiento también se puede utilizar para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpos" descrita por Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico. Los fragmentos comprenden un dominio variable de la cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (VL) por un conector que es demasiado corto

para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena. En consecuencia, se obliga a que los dominios VH y VL de un fragmento se emparejen con los dominios VL y VH complementarios de otro fragmento, formando de este modo dos sitios de unión a antígeno. También se ha informado de otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico mediante el uso de dímeros de Fv monocatenario (scFv). Véase Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

En Klein *et al.* (2012) *mAbs* 4:6, 653-663; Spiess *et al.* (2015) "Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies" *Mol. Immunol.* publicado en línea el 27 de enero de 2015; doi:10.1016/j.molimm.2015.01.003; y Kontermann *et al.* (2015) *Drug Discovery Today* 20, 838-847 se proporcionan revisiones de diversos formatos de anticuerpos biespecíficos y multiespecíficos.

Polinucleótidos, vectores, células huésped y procedimientos recombinantes

Los anticuerpos multiespecíficos usados en los procedimientos de purificación descritos en el presente documento se pueden obtener usando procedimientos bien conocidos en la técnica, incluyendo los procedimientos de recombinación. Las siguientes secciones proporcionan directrices sobre estos procedimientos.

Polinucleótidos

"Polinucleótido" o "ácido nucleico", como se usa de manera intercambiable en el presente documento, se refiere a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud e incluyen ADN y ARN.

Se pueden obtener polinucleótidos que codifican polipéptidos de cualquier fuente incluyendo, pero sin limitarse a, una colección de ADNc preparada a partir de tejido que se cree que posee el ARNm del polipéptido y lo expresa a un nivel detectable. En consecuencia, se pueden obtener convenientemente polinucleótidos que codifican polipéptidos de una colección de ADNc preparada a partir de tejido humano. También se puede obtener el gen que codifica el polipéptido de una colección genómica o por procedimientos sintéticos conocidos (por ejemplo, síntesis automatizada de ácidos nucleicos).

Por ejemplo, el polinucleótido puede codificar toda una cadena de molécula de inmunoglobulina, tal como una cadena ligera o una cadena pesada. Una cadena pesada completa no solo incluye una región variable de la cadena pesada (V_H), sino también una región constante de la cadena pesada (C_H), que típicamente comprenderá tres dominios constantes: C_H1, C_H2 y C_H3; y una región "bisagra". En algunas situaciones, es deseable la presencia de una región constante.

Otros polipéptidos que se pueden codificar por el polinucleótido incluyen fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno, tales como anticuerpos de dominio único ("dAb"), Fv, scFv, Fab' y F(ab')₂ y "minicuerpos". Los minicuerpos son (típicamente) fragmentos de anticuerpo bivalente a partir de los que se ha escindido el dominio C_H1 y C_K o C_L. Como los minicuerpos son más pequeños que los anticuerpos convencionales, deberían lograr una mejor penetración en el tejido en el uso clínico/diagnóstico, aunque al ser bivalentes deberían retener una afinidad de unión mayor que los fragmentos de anticuerpo monovalentes, tales como dAb. En consecuencia, a menos que el contexto lo indique de otro modo, el término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, engloba no sólo moléculas de anticuerpo entero sino también fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno del tipo analizado anteriormente. Preferentemente, cada región estructural presente en el polipéptido codificado comprenderá al menos una sustitución aminoacídica con respecto a la región estructural aceptadora humana correspondiente. Por tanto, por ejemplo, las regiones estructurales pueden comprender, en total, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince sustituciones aminoacídicas con respecto a las regiones estructurales aceptadoras.

Convenientemente, los polinucleótidos descritos en el presente documento se pueden aislar y/o purificar. En algunos modos de realización, los polinucleótidos son polinucleótidos aislados.

El término "polinucleótido aislado" pretende indicar que la molécula se retira o se separa de su entorno normal o natural o se ha producido de tal manera que no está presente en su entorno normal o natural. En algunos modos de realización, los polinucleótidos son polinucleótidos purificados. El término purificado pretende indicar que se han retirado al menos algunas moléculas o sustancias contaminantes.

De forma adecuada, los polinucleótidos están sustancialmente purificados, de modo que los polinucleótidos relevantes constituyan los polinucleótidos dominantes (es decir, más abundantes) presentes en una composición.

Expresión de polinucleótidos

La descripción a continuación se refiere principalmente a la producción de polipéptidos cultivando células transformadas o transfectadas con un vector que contiene polinucleótidos que codifican polipéptidos. Se contempla, por supuesto, que se puedan emplear procedimientos alternativos, que sean bien conocidos en la técnica, para preparar polipéptidos. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos apropiada, o porciones de la misma,

se puede producir por síntesis de péptidos directa usando técnicas en fase sólida (véase, por ejemplo, Stewart *et al.*, *Solid-Phase Peptide Synthesis* W.H. Freeman Co., San Francisco, Calif. (1969); Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2154 (1963)). Se puede realizar la síntesis de proteínas *in vitro* usando técnicas manuales o por automatización. La síntesis automatizada se puede conseguir, por ejemplo, usando un sintetizador de péptidos de Applied Biosystems (Foster City, Calif.) usando las instrucciones del fabricante. Se pueden sintetizar químicamente por separado diversas porciones del polipéptido y combinar usando procedimientos químicos o enzimáticos para producir el polipéptido deseado.

Los polinucleótidos como se describen en el presente documento se insertan en (un) vector(es) de expresión para la producción de los polipéptidos. El término "secuencias de control" se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante enlazada de forma funcional en un organismo huésped particular. Las secuencias de control incluyen, pero no se limitan a, promotores (por ejemplo, promotores asociados de forma natural o heterólogos), secuencias señal, elementos potenciadores y secuencias de terminación de la transcripción.

Un ácido nucleico está "enlazado de forma funcional" cuando se dispone en una relación funcional con otra secuencia de polinucleótido. Por ejemplo, los ácidos nucleicos para una presecuencia o líder secretor están enlazados de forma funcional a ácidos nucleicos para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está enlazado de forma funcional a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está enlazado de forma funcional a una secuencia codificante si se sitúa para facilitar la traducción. En general, "enlazado de forma funcional" significa que las secuencias de ácido nucleico que están enlazadas son contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. El enlace se logra por fijación en sitios de restricción accesibles. Si no existen dichos sitios, se usan adaptadores o conectores oligonucleotídicos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

Para anticuerpos, las cadenas ligera y pesada se pueden clonar en el mismo o en diferentes vectores de expresión. Los segmentos de ácido nucleico que codifican las cadenas de inmunoglobulina están enlazados de forma funcional a secuencias de control en el/los vector(es) de expresión que garantiza(n) la expresión de polipéptidos inmunoglobulínicos.

Para CrossMab que comprenden cuatro cadenas polipeptídicas diferentes, se usan cuatro casetes de expresión. Estos se pueden clonar en de dos a cuatro vectores de expresión diferentes. Cada uno de los segmentos de ácido nucleico que codifican las cadenas de inmunoglobulina están enlazados de forma funcional a secuencias de control en el/los vector(es) de expresión que garantiza(n) la expresión de polipéptidos inmunoglobulínicos. Si dos o más casetes de expresión están comprendidos en el mismo vector de expresión, estos se pueden organizar de forma unidireccional o bidireccional.

Los vectores que contienen las secuencias polinucleotídicas (por ejemplo, las secuencias que codifican la cadenas pesada variable y/o ligera variable y las secuencias de control de expresión opcionales) se pueden transferir a una célula huésped por procedimientos bien conocidos, que varían dependiendo del tipo de huésped celular. Por ejemplo, la transfección con cloruro de calcio se utiliza comúnmente para células procariotas, mientras que el tratamiento con fosfato de calcio, electroporación, lipofección, biolística o transfección basada en virus se pueden usar para otros huéspedes celulares. (Véase, en general, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press, 2.^a ed., 1989)). Otros procedimientos usados para transformar células de mamífero incluyen el uso de polibreno, fusión de protoplastos, liposomas, electroporación y microinyección. Para la producción de animales transgénicos, los transgenes se pueden microinyectar en ovocitos fertilizados, o se pueden incorporar al genoma de células madre embrionarias, y los núcleos de dichas células se pueden transferir a ovocitos desnucleados.

Vectores

El término "vector" incluye vectores de expresión y vectores de transformación y vectores transportadores.

El término "vector de expresión" significa una construcción que se puede expresar *in vivo* o *in vitro*.

El término "vector de transformación" significa una construcción que se puede transferir de una entidad a otra entidad, que puede ser de la especie o puede ser de una especie diferente. Si la construcción se puede transferir de una especie a otra, tal como de un plásmido de *Escherichia coli* a una bacteria, tal como del género *Bacillus*, entonces el vector de transformación se llama a veces "vector transportador". Incluso puede ser una construcción que se pueda transferir de un plásmido de *E. coli* a una *Agrobacterium* a una planta.

Los vectores se pueden transformar en una célula huésped adecuada como se describe a continuación para proporcionar la expresión de un polipéptido. Diversos vectores están disponibles públicamente. El vector puede estar, por ejemplo, en forma de plásmido, cósmido, partícula vírica o fago. La secuencia de ácido nucleico apropiada se puede insertar en el vector por una variedad de procedimientos. En general, el ADN se inserta en (un)

sitio(s) de endonucleasa de restricción apropiado(s) usando técnicas conocidas en la técnica. La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de estos componentes emplea técnicas de fijación estándar que son conocidas por el experto en la técnica.

Los vectores pueden ser, por ejemplo, vectores plasmídicos, de virus o fagos provistos de un origen de replicación, opcionalmente un promotor para la expresión del dicho polinucleótido y opcionalmente un regulador del promotor. Los vectores pueden contener uno o más genes marcadores seleccionables que son bien conocidos en la técnica.

Típicamente, estos vectores de expresión son replicables en los organismos huésped, como episomas o bien como parte integrante del ADN cromosómico del huésped.

Para la producción de anticuerpos multiespecíficos, los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo multiespecífico (o un brazo del anticuerpo multiespecífico, es decir, un par de cadena pesada/cadena ligera) típicamente se aíslan y se insertan en vectores replicables para clonación, amplificación y/o expresión adicionales. El ADN que codifica el anticuerpo se aísla y secuencía fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que se pueden unir específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo). Están disponibles muchos vectores. La elección del vector depende en parte de la célula huésped que se va a usar. Se apreciará que se pueden usar regiones constantes de cualquier isotipo para este propósito, incluyendo las regiones constantes de IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, y que dichas regiones constantes se pueden obtener a partir de cualquier especie humana o animal.

Células huésped

La célula huésped puede ser una bacteria, una levadura u otra célula fúngica, célula de insecto, una célula vegetal, o una célula de mamífero, por ejemplo.

Se puede usar un organismo huésped multicelular transgénico que se ha manipulado genéticamente para producir un polipéptido. El organismo puede ser, por ejemplo, un organismo mamífero transgénico (por ejemplo, una línea de cabra o ratón transgénico).

Los procariotas adecuados incluyen, pero no se limitan a, eubacterias, tales como organismos gramnegativos o grampositivos, por ejemplo, *Enterobacteriaceae* tales como *E. coli*. Diversas cepas de *E. coli* están disponibles públicamente, tales como *E. coli* K12 cepa MM294 (ATCC 31.446); *E. coli* X1776 (ATCC 31.537); *E. coli* cepa W3110 (ATCC 27.325) y K5 772 (ATCC 53.635). Otras células huésped procariotas adecuadas incluyen *Enterobacteriaceae* tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans* y *Shigella*, así como *Bacilli* tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa* y *Streptomyces*. Estos ejemplos son ilustrativos en lugar de limitantes. La cepa W3110 es un huésped o huésped original en particular preferente porque es una cepa huésped común para fermentaciones de producto de polinucleótidos recombinantes. Preferentemente, la célula huésped segrega cantidades mínimas de enzimas proteolíticas. Por ejemplo, la cepa W3110 se puede modificar para efectuar una mutación genética en los genes que codifican polipéptidos endógenos para el huésped, incluyendo los ejemplos de dichos huéspedes *E. coli* W3110 cepa 1A2, que tiene el genotipo completo *tonA*; *E. coli* W3110 cepa 9E4, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3*; *E. coli* W3110 cepa 27C7 (ATCC 55, 244), que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT kan*; *E. coli* W3110 cepa 37D6, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT rbs7 ilvG kan*; *E. coli* W3110 cepa 40B4, que es la cepa 37D6 con una mutación de eliminación de *degP* no resistente a kanamicina y una cepa de *E. coli* que tiene proteasa periplásmica mutante. De forma alternativa, son adecuados procedimientos de clonación *in vitro*, por ejemplo, PCR u otras reacciones de la polimerasa de ácido nucleico. En algunos modos de realización, la célula huésped procariota (por ejemplo, una célula huésped de *E. coli*) expresa una o más chaperonas para facilitar el plegamiento y ensamblaje del anticuerpo. En algunos modos de realización, la chaperona es una o más de FkpA, DsbA o DsbC. En algunos modos de realización, la chaperona se expresa a partir de un gen de chaperona endógeno. En algunos modos de realización, la chaperona se expresa a partir de un gen de chaperona exógeno. En algunos modos de realización, el gen de chaperona es un gen de chaperona de *E. coli* (por ejemplo, un gen de FkpA de *E. coli*, un gen de DsbA de *E. coli* y/o un gen de DsbC de *E. coli*).

En estos huéspedes procariotas, se pueden reparar vectores de expresión, que típicamente contendrán secuencias de control de expresión compatibles con la célula huésped (por ejemplo, un origen de replicación). Además, estarán presentes varios de una variedad de promotores bien conocidos, tales como el sistema promotor de lactosa, un sistema promotor de triptófano (*trp*), un sistema promotor de beta-lactamasa o un sistema promotor del fago lambda. Los promotores controlarán típicamente la expresión, opcionalmente con una secuencia operadora, y tendrán secuencias de sitios de unión a ribosoma y similares, para iniciar y completar la transcripción y traducción.

Se pueden usar microbios eucariotas para la expresión. Los microbios eucariotas, tales como hongos filamentosos o levaduras, son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican polipéptidos.

Saccharomyces cerevisiae es un microorganismo huésped eucariota inferior usado comúnmente. Otros incluyen *Schizosaccharomyces pombe*; huéspedes de *Kluyveromyces* tales como, por ejemplo, *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574), *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilae* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *Yarrowia* (documento EP 402.226); *Pichia pastoris*; *Candida*; *Trichoderma reesei*; *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis* y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, huéspedes de *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, y *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*. Las levaduras metilotróficas son adecuadas en el presente documento e incluyen, pero no se limitan a, levaduras que pueden crecer en metanol, seleccionadas de los géneros que consisten en *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* y *Rhodotorula*. *Saccharomyces* es un huésped de levadura preferente, con vectores adecuados que tienen secuencias de control de la expresión (por ejemplo, promotores), un origen de replicación, secuencias de terminación y similares según se desee. Los promotores típicos incluyen 3-fosfoglicerato cinasa y otras enzimas glucolíticas. Los promotores de levaduras inducibles incluyen, entre otros, promotores de alcohol deshidrogenasa, isocitocromo C y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa.

Además de microorganismos, también se puede usar el cultivo de células de tejido de mamífero para expresar y producir los polipéptidos como se describe en el presente documento y, en algunos casos, es preferente (véase Winnacker, *From Genes to Clones*, VCH Publishers, N.Y., N.Y. (1987). Para algunos modos de realización, pueden ser preferentes las células eucariotas, porque se han desarrollado en la técnica varias líneas de células huésped adecuadas que pueden segregar polipéptidos heterólogos (por ejemplo, inmunoglobulinas intactas), e incluyen líneas celulares CHO, diversas líneas celulares COS, células HeLa, preferentemente, líneas celulares de mieloma o linfocitos B transformados o hibridomas. En algunos modos de realización, la célula huésped de mamífero es una célula CHO.

En algunos modos de realización, la célula huésped es una célula huésped de vertebrado. Los ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para su cultivo en suspensión); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/DHFR⁻ (línea CHO o CHO-DP-12); células de Sertoli de ratón; células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI; células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

Generación de anticuerpos multiespecíficos usando células huésped procariotas

Construcción del vector

Las secuencias de polinucleótidos que codifican los componentes polipeptídicos del anticuerpo multiespecífico que se va a purificar de acuerdo con un procedimiento proporcionado en el presente documento se pueden obtener usando técnicas recombinantes estándar. Se pueden aislar secuencias de polinucleótido deseadas y secuenciar a partir de células productoras de anticuerpos, tales como células de hibridoma. De forma alternativa, se pueden sintetizar polinucleótidos usando un sintetizador de nucleótidos o técnicas de PCR. Una vez obtenidas, las secuencias que codifican los polipéptidos (tales como dos o más cadenas pesadas y/o dos o más cadenas ligeras) se insertan en un vector recombinante que puede replicar y expresar polinucleótidos heterólogos en una célula huésped (tal como una célula de *E. coli*). Se pueden usar muchos vectores que están disponibles y son conocidos en la técnica para el propósito de los procedimientos y composiciones proporcionados en el presente documento. La selección de un vector apropiado dependerá principalmente del tamaño de los ácidos nucleicos que se van a insertar en el vector y de la célula huésped particular que se va a transformar con el vector. Cada vector contiene diversos componentes, dependiendo de su función (amplificación o expresión de polinucleótido heterólogo, o ambas) y de su compatibilidad con la célula huésped particular en la que reside. Los componentes del vector, en general, incluyen, pero no se limitan a: un origen de replicación, un gen marcador de selección, un promotor, un sitio de unión a ribosoma (RBS), una secuencia señal, la inserción de ácido nucleico heterólogo y una secuencia de terminación de la transcripción.

En general, se usan vectores plasmídicos que contienen secuencias de replicación y de control que se derivan de especies compatibles con la célula huésped en conexión con estos huéspedes. Habitualmente, el vector lleva un sitio de replicación, así como secuencias de marcaje que pueden proporcionar una selección fenotípica en las células transformadas. Por ejemplo, *E. coli* típicamente se transforma usando pBR322, un plásmido derivado de una especie de *E. coli*. pBR322 contiene genes que codifican la resistencia a ampicilina (Amp) y tetraciclina (Tet) y, por tanto, proporciona medios fáciles para identificar células transformadas. pBR322, sus derivados u otros plásmidos microbianos o bacteriófagos también pueden contener, o modificarse para que contengan, promotores que se pueden usar por el organismo microbiano para la expresión de proteínas endógenas. Los ejemplos de derivados de pBR322 usados para la expresión de anticuerpos particulares se describen en detalle en Carter *et al.*,

patente de EE. UU. n.º 5.648.237.

Además, se pueden usar vectores de fagos que contienen las secuencias del replicón y de control que son compatibles con el microorganismo huésped como vectores de transformación en conexión con estos huéspedes. Por ejemplo, se puede utilizar un bacteriófago tal como GEM™-11 en la preparación de un vector recombinante que se puede usar para transformar células huésped susceptibles tales como *E. coli* LE392.

Un vector de expresión puede comprender dos o más pares promotor-cistrón, que codifican cada uno de los componentes polipeptídicos. Un promotor es una secuencia reguladora no traducida localizada en dirección 5' con respecto a un cistrón que modula su expresión. Típicamente, los promotores procarióticos se encuentran en dos clases, inducibles y constitutivos. Un promotor inducible es un promotor que inicia un incremento en los niveles de transcripción del cistrón bajo su control en respuesta a cambios en la condición de cultivo, por ejemplo, la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura.

Un gran número de promotores reconocidos por una variedad de células huésped potenciales son bien conocidos. El promotor seleccionado se puede enlazar de forma funcional al ADN cistrón que codifica la cadena ligera o pesada retirando el promotor del ADN fuente por medio de la digestión con enzimas de restricción e insertando la secuencia del promotor aislado en un vector. Se puede usar tanto la secuencia del promotor natural como muchos promotores heterógenos para dirigir la amplificación y/o expresión de los genes diana. En algunos modos de realización se utilizan promotores heterólogos, ya que, en general, permiten una mayor transcripción y mayores rendimientos del gen diana expresado en comparación con el promotor para el polipéptido diana natural.

Los promotores adecuados para su uso con huéspedes procariotas incluyen el promotor de PhoA, los sistemas promotores de β -lactamasa y lactosa, un sistema promotor de triptófano (*trp*) y promotores híbridos, tales como el promotor de *tac* o el de *trc*. Sin embargo, otros promotores que son funcionales en bacterias (tales como otros promotores bacterianos o de fagos conocidos) también son adecuados. Sus secuencias de nucleótidos se han publicado, posibilitando de este modo que un experto los fije de forma funcional a cistrones que codifican las cadenas ligera y pesada diana (Siebenlist *et al.*, (1980) *Cell* 20: 269) usando conectores o adaptadores para suministrar cualquier sitio de restricción necesario.

La región de iniciación traduccional (TIR) es un determinante principal del nivel traduccional global de una proteína. La TIR incluye el polinucleótido que codifica la secuencia señal, y se extiende desde inmediatamente en dirección 5' de la secuencia Shine-Dalgarno hasta aproximadamente veinte nucleótidos en dirección 3' del codón de iniciación. En general, el vector comprenderá una TIR. Las TIR y TIR variantes son conocidas en la técnica y los procedimientos para generar las TIR son conocidos en la técnica. Se puede crear una serie de variantes de secuencia de ácido nucleico con un intervalo de fuerzas traduccionales, proporcionando, de este modo, un medio conveniente por el que ajustar este factor para la secreción óptima de muchos polipéptidos diferentes. El uso de un gen indicador fusionado a estas variantes, tal como PhoA, proporciona un procedimiento de cuantificación de las fuerzas traduccionales relativas de regiones de iniciación traduccional diferentes. Las TIR variantes o mutantes se pueden proporcionar en el fondo de un vector plasmídico, proporcionando, de este modo, un conjunto de plásmidos en los que se puede insertar un gen de interés y medir su expresión, para establecer un intervalo óptimo de fuerzas traduccionales para la máxima expresión del polipéptido maduro. Se divulgan TIR variantes en el documento USP 8.241.901.

En un aspecto, cada cistrón dentro del vector recombinante comprende un componente de secuencia señal de secreción que dirige la translocación de los polipéptidos expresados a través de una membrana. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN del polipéptido diana que se inserta en el vector. La secuencia señal seleccionada debe ser una que sea reconocida y procesada (es decir, escindida por una peptidasa señal) por la célula huésped. Para las células huésped procariotas que no reconocen y procesan las secuencias señal naturales con respecto a los polipéptidos heterólogos, la secuencia señal se sustituye con una secuencia señal procariótica. Dichas secuencias son bien conocidas en la técnica. Además, el vector puede comprender una secuencia señal seleccionada del grupo que consiste en fosfatasa alcalina, penicilinasa, Lpp o líderes de enterotoxina termoestable II (STII), LamB, PhoE, PelB, OmpA y MBP.

En un aspecto, uno o más polinucleótidos (por ejemplo, vectores de expresión) codifican conjuntamente un anticuerpo. En un modo de realización, un único polinucleótido codifica la cadena ligera del anticuerpo y un polinucleótido separado codifica la cadena pesada del anticuerpo. En un modo de realización, un único polinucleótido codifica la cadena ligera y cadena pesada del anticuerpo. En algunos modos de realización, uno o más polinucleótidos (por ejemplo, vectores de expresión) codifican conjuntamente un anticuerpo de un brazo. En un modo de realización, un único polinucleótido codifica (a) la cadena ligera y pesada del anticuerpo de un brazo, y (b) el polipéptido con Fc. En un modo de realización, un único polinucleótido codifica la cadena ligera y pesada del anticuerpo de un brazo, y un polinucleótido separado codifica el polipéptido con Fc. En un modo de realización, polinucleótidos separados codifican el componente de cadena ligera del anticuerpo de un brazo, el componente de cadena pesada del anticuerpo de un brazo y el polipéptido con Fc, respectivamente. La producción de un anticuerpo de un brazo se describe, por ejemplo, en el documento WO2005063816.

Las células huésped procariotas adecuadas para expresar los anticuerpos incluyen *Archaeobacteria* y *Eubacteria*, tales como organismos gramnegativos o grampositivos. Los ejemplos de bacterias útiles incluyen *Escherichia* (por ejemplo, *E. coli*), *Bacilli* (por ejemplo, *B. subtilis*), *Enterobacteria*, especies de *Pseudomonas* (por ejemplo, *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescans*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla* o *Paracoccus*. En un modo de realización se usan células gramnegativas. En un modo de realización se usan células de *E. coli* como células huésped. Los ejemplos de cepas de *E. coli* incluyen la cepa W3110 (Bachmann, *Cellular and Molecular Biology*, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219; n.º de depósito ATCC 27.325) y derivados de la misma, incluyendo la cepa 33D3 que tiene el genotipo W3110 Δ h_uA (Δ tonA) ptr3 lac lq lacL8 Δ ompT Δ (nmpc-fepE) degP41 kanR (pat. de EE. UU. n.º 5.639.635) y las cepas 63C1 y 64B4. En algunos modos de realización, la cepa de *E. coli* es un derivado de W3110 denominado 62A7 (Δ h_uA (Δ tonA) ptr3, lac lq, lacL8, ompT Δ (nmpc-fepE) Δ degP ilvG reparado). Otras cepas y derivados de las mismas, tales como *E. coli* 294 (ATCC 31.446), *E. coli* B, *E. coli* λ 1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* RV308 (ATCC 31.608) también son adecuados. Estos ejemplos son ilustrativos en lugar de limitantes. Los procedimientos para construir derivados de cualquiera de las bacterias mencionadas anteriormente que tienen genotipos definidos son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Bass *et al.*, *Proteins*, 8:309-314 (1990). En general, es necesario seleccionar las bacterias apropiadas teniendo en cuenta la replicabilidad del replicón en las células de una bacteria. Por ejemplo, se pueden usar adecuadamente las especies *E. coli*, *Serratia* o *Salmonella* como huésped cuando se usan plásmidos bien conocidos, tales como pBR322, pBR325, pACYC177 o pKN410 para suministrar el replicón. Típicamente, la célula huésped debe secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas y se pueden incorporar de forma deseable inhibidores de proteasas adicionales en el cultivo celular.

Para mejorar el rendimiento de producción y la calidad de los polipéptidos en los cultivos bacterianos, se pueden modificar las células bacterianas. Por ejemplo, para mejorar el ensamblaje y el plegamiento adecuados de los polipéptidos de anticuerpos segregados, la célula huésped bacteriana puede comprender vectores adicionales que expresen proteínas chaperonas, tales como FkpA y proteínas Dsb (DsbB, DsbC, DsbD y/o DsbG) que se pueden usar para cotransformar las células procariotas del huésped. Se ha demostrado que las proteínas chaperonas facilitan el plegamiento y la solubilidad apropiados de proteínas heterógenas producidas en células huésped bacterianas.

Producción de anticuerpos multiespecíficos

Las células huésped se transforman con los vectores de expresión descritos anteriormente y se cultivan en medios de nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

Transformación quiere decir introducir ADN en el huésped procariota de modo que el ADN sea replicable, como un elemento extracromosómico o bien como integrante cromosómico. Dependiendo de la célula huésped usada, la transformación se realiza usando técnicas estándar apropiadas para dichas células. El tratamiento con calcio que emplea cloruro de calcio se usa, en general, para células bacterianas que contienen barreras de pared celular sustanciales. Otro procedimiento para la transformación emplea polietilenglicol/DMSO. Aún otra técnica usada es la electroporación.

Las células procariotas usadas para producir los polipéptidos purificados de acuerdo con los procedimientos proporcionados en el presente documento se cultivan en medios conocidos en la técnica y adecuados para el cultivo de las células huésped seleccionadas. Los ejemplos de medios adecuados incluyen caldo Luria (LB) más los complementos de nutrientes necesarios. En algunos modos de realización, el medio también contiene un agente de selección, elegido en base a la construcción del vector de expresión, para permitir selectivamente el crecimiento de células procariotas que contienen el vector de expresión. Por ejemplo, se añade ampicilina a los medios para el cultivo de células que expresan el gen resistente a ampicilina.

También se puede incluir cualquier complemento necesario, además de las fuentes de carbono, nitrógeno y fosfato inorgánico, a concentraciones apropiadas, introducido solo o como una mezcla con otro complemento o medio, tal como una fuente de nitrógeno compleja. Opcionalmente, el medio de cultivo puede contener uno o más agentes reductores seleccionados del grupo que consiste en glutatión, cisteína, cistamina, tioglicolato, ditiotritol y ditiotreitól.

Las células huésped procariotas se cultivan a temperaturas adecuadas. Para el cultivo de *E. coli*, por ejemplo, la temperatura preferente varía de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 39 °C, más preferentemente de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 37 °C, incluso más preferentemente a aproximadamente 30 °C. El pH del medio puede ser cualquier pH que varíe de aproximadamente 5 a aproximadamente 9, dependiendo principalmente del organismo huésped. Para *E. coli*, el pH es preferentemente de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,4 y más preferentemente de aproximadamente 7,0.

Si se usa un promotor inducible en el vector de expresión, se induce la expresión de proteínas en condiciones adecuadas para la activación del promotor. En un aspecto se usan promotores de PhoA para controlar la transcripción de los polipéptidos. En consecuencia, las células huésped transformadas se cultivan en un medio

limitante de fosfato para la inducción. Preferentemente, el medio limitante de fosfato es el medio C.R.A.P. (véase, por ejemplo, Simmons *et al.*, *J. Immunol. Methods* (2002), 263:133-147) o los medios descritos en el documento WO2002/061090. Se puede usar una variedad de otros inductores, de acuerdo con la construcción del vector empleada, como es conocido en la técnica.

En un modo de realización, los polipéptidos expresados que se van a purificar usando los procedimientos proporcionados en el presente documento se segregan en y recuperan del periplasma de las células huésped. La recuperación de proteínas típicamente implica romper el microorganismo, en general, por medios tales como choque osmótico, sonicación o lisis. Una vez que se rompen las células, se pueden retirar los restos celulares o células enteras por centrifugación o filtración. Las proteínas se pueden purificar adicionalmente, por ejemplo, por cromatografía en resina de afinidad. De forma alternativa, las proteínas se pueden transportar en el medio de cultivo y aislar en el mismo. Las células se pueden retirar del cultivo y filtrar y concentrar el sobrenadante del cultivo para purificación adicional de las proteínas producidas. Los polipéptidos expresados se pueden aislar e identificar adicionalmente usando procedimientos comúnmente conocidos, tales como electroforesis en gel de poli(acrilamida) (PAGE) y ensayo de inmunoelectrotransferencia.

En un aspecto, la producción de anticuerpos se lleva a cabo en grandes cantidades mediante un procedimiento de fermentación. Están disponibles diversos procedimientos de fermentación por lote alimentado a gran escala para la producción de polipéptidos recombinantes. Las fermentaciones a gran escala tienen al menos 1000 litros de capacidad, preferentemente de aproximadamente 1000 a 100.000 litros de capacidad. Estos fermentadores usan impulsores con agitador para distribuir oxígeno y nutrientes, especialmente glucosa (la fuente de carbono/energía preferente). La fermentación a pequeña escala se refiere, en general, a la fermentación en un fermentador que no tenga más de aproximadamente 100 litros de capacidad volumétrica, y que pueda variar de aproximadamente 1 litro a aproximadamente 100 litros.

En un procedimiento de fermentación, la inducción de la expresión de proteínas típicamente se inicia después de que las células se hayan cultivado en condiciones adecuadas hasta una densidad deseada, por ejemplo, una DO₅₅₀ de aproximadamente 180-220, fase en la que las células están en la fase estacionaria temprana. Se puede usar una variedad de inductores, de acuerdo con la construcción del vector empleada, como es conocido en la técnica y se describe anteriormente. Las células se pueden cultivar durante periodos más cortos antes de la inducción. Las células se inducen normalmente durante aproximadamente 12-50 horas, aunque se puede usar un tiempo de inducción más largo o más corto.

Para mejorar el rendimiento de producción y la calidad de los polipéptidos, se pueden modificar diversas condiciones de fermentación. Por ejemplo, para mejorar el ensamblaje y el plegamiento adecuados de los polipéptidos de anticuerpos segregados, se pueden usar vectores adicionales que expresan proteínas chaperonas, tales como FkpA, DsbA y/o DsbC, para cotransformar las células procariotas del huésped. Se ha demostrado que las proteínas chaperonas facilitan el plegamiento y la solubilidad apropiados de proteínas heterógenas producidas en células huésped bacterianas. En algunos modos de realización, FkpA, DsbA y/o DsbC se expresan en la célula huésped bacteriana.

Para minimizar la proteólisis de proteínas heterógenas expresadas (especialmente las que son proteolíticamente sensibles), se pueden usar determinadas cepas huésped carentes de enzimas proteolíticas. Por ejemplo, se pueden modificar cepas de células huésped para efectuar una mutación/mutaciones genética(s) en los genes que codifican proteasas bacterianas conocidas, tales como proteasa III, OmpT, DegP, Tsp, proteasa I, proteasa Mi, proteasa V, proteasa VI y combinaciones de las mismas. Están disponibles algunas cepas carentes de proteasa de *E. coli* y se describen, por ejemplo, en Joly *et al.*, (1998), *supra*; Georgiou *et al.*, patente de EE. UU. n.º 5.264.365; Georgiou *et al.*, patente de EE. UU. n.º 5.508.192; Hara *et al.*, *Microbial Drug Resistance*, 2:63-72 (1996).

En un modo de realización se usan cepas de *E. coli* carentes de enzimas proteolíticas y transformadas con plásmidos que expresan una o más proteínas chaperonas como células huésped en el sistema de expresión.

Generación de anticuerpos multiespecíficos usando células huésped eucariotas

Componente de secuencia señal

Un vector para su uso en una célula huésped eucariota puede contener opcionalmente una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína o polipéptido maduro de interés. La secuencia señal heterógena seleccionada preferentemente es una que se reconoce y se procesa (es decir, se escinde por una peptidasa señal) por la célula huésped. En la expresión de células de mamífero, están disponibles secuencias señal de mamífero así como secuencias líder secretoras víricas, por ejemplo, la señal gD del herpes simple. El ADN para dicha región precursora se fija en el marco de lectura al ADN que codifica la(s) proteína(s) heteromultimérica(s) deseada(s) (por ejemplo, anticuerpos).

Origen de replicación

En general, no es necesario un componente de origen de replicación para vectores de expresión de mamífero. Por ejemplo, típicamente se puede usar el origen SV40, pero solo porque contiene el promotor temprano.

Componente de gen de selección

Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también denominado un marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan carencias auxotróficas, cuando sea pertinente, o (c) administran nutrientes críticos no disponibles en medios complejos.

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula huésped. Las células que se transforman con éxito con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia a fármaco y, por tanto, sobreviven a la pauta de selección. Los ejemplos de dicha selección dominante usan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Otro ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero son los que permiten la identificación de células competentes para aceptar el ácido nucleico del anticuerpo, tales como DHFR, timidina cinasa, metalotioneína I y II, preferentemente genes de metalotioneína de primate, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc.

Por ejemplo, en primer lugar se identifican células transformadas con el gen de selección de DHFR cultivando todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Una célula huésped apropiada cuando se emplea DHFR natural es la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) carente de actividad DHFR (por ejemplo, ATCC CRL-9096).

De forma alternativa, se pueden seleccionar células huésped (en particular huéspedes naturales que contienen DHFR endógena) transformadas o cotransformadas con secuencias de ADN que codifican un anticuerpo, proteína DHFR natural y otro marcador seleccionable tal como aminoglucósido 3'-fosfotransferasa (APH) por crecimiento celular en medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable tal como un antibiótico aminoglucosídico, por ejemplo, canamicina, neomicina o G418. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.965.199.

Componente de promotor

Los vectores de expresión y clonación normalmente contienen un promotor que se reconoce por el organismo huésped y se enlaza de forma funcional al ácido nucleico de polipéptido(s) que contiene(n) bisagra(s) deseado(s) (por ejemplo, anticuerpo). Las secuencias promotoras son conocidas para los eucariotas. Prácticamente todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente de 25 a 30 bases en dirección 5' del sitio donde se inicia la transcripción. Otra secuencia encontrada de 70 a 80 bases en dirección 5' del inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT, donde N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucariotas hay una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola poli A en el extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan de forma adecuada en vectores de expresión eucariotas.

La transcripción de la cadena pesada y/o la cadena ligera de vectores en células huésped de mamífero se controla, por ejemplo, por promotores obtenidos de genomas de virus tales como, por ejemplo, poliomavirus, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y virus de simio 40 (SV40), de promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, o de promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células huésped.

Los promotores tempranos y tardíos del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación vírico de SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción de Hind III E. Un sistema para expresar ADN en huéspedes mamíferos usando el virus del papiloma bovino como vector se divulga en la patente de EE. UU. n.º 4.419.446. Una modificación de este sistema se describe en la patente de EE. UU. n.º 4.601.978. Véase también Reyes *et al.*, *Nature* 297:598-601 (1982) sobre la expresión de ADNc de β -interferón humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina cinasa del virus del herpes simple. De forma alternativa, se puede usar la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous como promotor.

Componente de elemento potenciador

La transcripción de ADN que codifica el/los polipéptido(s) que contiene(n) bisagra(s) deseado(s) (por ejemplo, anticuerpo) por eucariotas superiores se puede incrementar insertando una secuencia potenciadora en el vector. Ahora son conocidas muchas secuencias potenciadoras de genes de mamíferos (por ejemplo, genes de globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Además, uno puede usar un potenciador de un virus de célula

eucariota. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador de promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, *Nature* 297:17-18 (1982) para una descripción de los elementos para potenciar la activación de promotores eucariotas. El potenciador se puede empalmar en el vector en una posición 5' o 3' a la secuencia que codifica el polipéptido de anticuerpo, siempre que se logre la potenciación, pero en general se localiza en un sitio 5' del promotor.

Componente finalizador de la transcripción

Los vectores de expresión usados en células huésped eucariotas también contendrán típicamente las secuencias necesarias para la finalización de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias están comúnmente disponibles de regiones no traducidas 5' y, ocasionalmente, 3' de ADN o ADNc eucariotas o víricos. Estas regiones contienen segmentos nucleotídicos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm que codifica un anticuerpo. Un componente finalizador de la transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Véanse el documento WO 94/11026 y el vector de expresión divulgado en el mismo.

Selección y transformación de células huésped

Las células huésped adecuadas para la clonación o expresión del ADN en los vectores de la presente invención incluyen células eucariotas superiores descritas en el presente documento, incluyendo células huésped de vertebrado. La propagación de células de vertebrado en cultivo (cultivo tisular) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Los ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles son la línea de riñón de mono CV1 transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para cultivo en suspensión, Graham *et al.*, *J. Gen. Viral.* 36:59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/DHFR (CHO, Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón caninas (MOCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

Las células huésped se transforman con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente para la producción de polipéptido(s) que contiene(n) bisagra(s) deseado(s) (por ejemplo, anticuerpo) y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

Cultivo de las células huésped

Las células huésped usadas para producir un anticuerpo multiespecífico (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico) se pueden cultivar en una variedad de medios. Los medios disponibles comercialmente tales como F10 de Ham (Sigma), medio esencial mínimo (MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y medio Eagle modificado de Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para cultivar las células huésped. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham *et al.*, *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes *et al.*, *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), patentes de EE. UU. n.ºs 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; documentos WO 90/03430; WO 87/00195; o patente de EE. UU. Re. 30.985 se pueden usar como medios de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios se puede complementar según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMYCIN™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos presentes normalmente en concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. Cualquier otro complemento necesario también se puede incluir en concentraciones apropiadas que serían conocidas para los expertos en la técnica. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares son las usadas previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión, y serán evidentes para el experto en la técnica.

Formación/ensamblaje de anticuerpos multiespecíficos

En determinados modos de realización, en el presente documento se proporcionan procedimientos para producir anticuerpos multiespecíficos. En determinados modos de realización, los anticuerpos multiespecíficos se producen produciendo por separado semianticuerpos, comprendiendo cada semianticuerpo una unidad de VH/VL que se une a un epítipo específico (por ejemplo, diferentes epítopos en una única diana, o diferentes epítopos en dos o más dianas). En algunos modos de realización, cada semianticuerpo se produce por separado en una célula huésped. En algunos modos de realización, cada uno de los semianticuerpos se produce en la misma célula huésped. Los semianticuerpos se mezclan y se permite su ensamblaje para formar el anticuerpo multiespecífico.

En algunos modos de realización, cada uno de los semianticuerpos se produce conjuntamente en la misma célula huésped. En algunos modos de realización, la célula huésped (tal como una célula huésped procariota, por ejemplo, una célula de *E. coli*) expresa una chaperona, tal como FkpA, DsbA y/o DsbC, para facilitar el plegamiento del semianticuerpo.

En algunos modos de realización, los semianticuerpos que contienen las mutaciones de botón o bien de ojal se generan en cultivos separados expresando las construcciones de las cadenas pesada y ligera en una célula huésped bacteriana, por ejemplo, *E. coli*. Cada semianticuerpo se puede purificar por separado por cromatografía de afinidad con proteína A. Los extractos celulares clarificados del semianticuerpo de botón y ojal se pueden purificar con una columna de proteína A. Los semianticuerpos purificados en proteína A con diferente especificidad se pueden ensamblar para formar un anticuerpo biespecífico en una reacción redox *in vitro* en presencia de un agente reductor.

En algunos modos de realización, los semianticuerpos que contienen las mutaciones de botón o bien de ojal se generan en el mismo cultivo expresando las construcciones de las cadenas pesada y ligera en la misma célula huésped bacteriana, por ejemplo, una célula huésped de *E. coli* o una célula huésped CHO. Los semianticuerpos se pueden purificar por cromatografía de afinidad con proteína A. Los extractos celulares clarificados de los semianticuerpos de botón y ojal se pueden purificar con una columna de proteína A. Los semianticuerpos purificados en proteína A con diferente especificidad se pueden ensamblar para formar un anticuerpo biespecífico en una reacción redox *in vitro* en presencia de un agente reductor.

Se puede usar cualquier procedimiento adecuado para preparar una condición reductora deseada. Por ejemplo, se puede preparar una condición reductora deseada añadiendo un reductor/agente reductor a la reacción (tal como una mezcla de ensamblaje descrita en el presente documento). Los reductores adecuados incluyen, sin limitación, ditioneitol (DTT), tris-(2-carboxietil)fosfina (TCEP), ácido tioglicólico, ácido ascórbico, ácido tiolacético, glutatión (GSH), beta-mercaptoetilamina, cisteína/cistina, GSH/disulfuro de glutatión (GSSG), cisteamina/cistamina, glicilcisteína y beta-mercaptoetanol, preferentemente GSH. En determinados modos de realización particulares, el reductor es un reductor débil que incluye, sin limitación, GSH, beta-mercaptoetilamina, cisteína/cistina, GSH/GSSG, cisteamina/cistamina, glicilcisteína y beta-mercaptoetanol, preferentemente GSH. En determinados modos de realización preferentes, el reductor es GSH. En determinados modos de realización, el reductor no es DTT. Está dentro de la capacidad de un experto en la técnica seleccionar reductores adecuados a concentraciones adecuadas y en condiciones experimentales adecuadas para lograr en una reacción la condición reductora deseada. Por ejemplo, L-glutatión reducido 10 mM en una solución con una concentración de proteína de anticuerpo biespecífica de 10 g/l a 20 °C dará como resultado un potencial de oxidorreducción inicial de aproximadamente -400 mV. Por ejemplo, el glutatión añadido a una mezcla de ensamblaje crea una condición débilmente reductora que es ventajosa para el ensamblaje biespecífico de botón en ojal. Otros reductores en una clase similar tal como BMEA (beta-mercaptoetilamina) pueden tener un efecto similar. Véase el documento WO2013/055958, incorporado en el presente documento a modo de referencia en su totalidad. La condición reductora de la reacción se puede estimar y medir usando cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, la condición reductora se puede medir usando un indicador de resazurina (decoloración de azul a incoloro en condiciones reductoras). Para una medición más precisa, se puede usar un potenciómetro de oxidorreducción (tal como un electrodo ORP fabricado por BROADLEY JAMES®).

En determinados modos de realización particulares, la condición reductora es una condición reductora débil. El término "reductor débil" o "condición reductora débil" como se usa en el presente documento se refiere a un agente reductor o una condición reductora preparada por el agente reductor que tiene un potencial de oxidación negativo a 25 °C. El potencial de oxidación del reductor es preferentemente de entre -50 a -600 mV, de -100 a -600 mV, de -200 a -600 mV, de -100 a -500 mV, de -150 a -300 mV, más preferiblemente de entre aproximadamente -300 a -500 mV, lo más preferiblemente de aproximadamente -400 mV, cuando el pH es de entre 7 y 9, y la temperatura es de entre 15 °C y 39 °C. Un experto en la técnica podrá seleccionar reductores adecuados para preparar una condición reductora deseada. El investigador experto reconocerá que un reductor fuerte, es decir, uno que tiene un potencial de oxidación más negativo que los reductores mencionados anteriormente para la misma concentración, pH y temperatura, se puede usar a una concentración menor. En un modo de realización preferente, las proteínas podrán formar enlaces disulfuro en presencia del reductor cuando se incuban en las condiciones citadas anteriormente. Los ejemplos de un reductor débil incluyen, sin limitación, glutatión, beta-mercaptoetilamina, cistina/cisteína, GSH/GSSG, cisteamina/cistamina, glicilcisteína y beta-mercaptoetanol. En determinados modos de realización se puede usar un potencial de oxidación similar al de la proporción molar 200X de GSH:anticuerpo como punto de referencia para una condición reductora débil en la que se puede esperar un ensamblaje eficaz usando otros reductores.

Las concentraciones de glutatión se pueden expresar en términos de molaridad o en términos de proporción molar o exceso molar con respecto a la cantidad de semianticuerpos presentes en la mezcla de ensamblaje. Usando una proporción molar diana del reductor se controla la concentración de proteína en la mezcla de ensamblaje; esto evita el exceso de reducción o el defecto de reducción como resultado de las concentraciones de proteína variables. En determinados otros modos de realización, el reductor se añade a la mezcla de ensamblaje en un exceso molar de 2-600X, 2-200X, 2-300X, 2-400X, 2-500X, 2-20X, 2-8X, 20-50X, 50-600X, 50-200X, o 100-300X, preferentemente

un exceso molar de 50-400X o 50-150X, más preferentemente de 100-300X, y lo más preferentemente de 200X o 100X, con respecto a la cantidad total de semianticuerpos. En determinados modos de realización, la mezcla de ensamblaje tiene un pH de entre 7 y 9, preferentemente un pH de 8,5 u 8,3.

También se proporcionan inmunoconjugados (denominados de manera intercambiable "conjugados anticuerpo-fármaco" o "CAF") que comprenden cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento conjugado a, por ejemplo, un agente citotóxico, tal como un agente quimioterápico, un fármaco, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma) o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado).

Antígenos/Moléculas diana

Los ejemplos de moléculas que se pueden seleccionar por un anticuerpo multiespecífico purificado de acuerdo con un procedimiento descrito en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, proteínas séricas solubles y sus receptores y otras proteínas unidas a la membrana (por ejemplo, adhesinas). En determinados modos de realización, un anticuerpo multiespecífico purificado de acuerdo con un procedimiento descrito en el presente documento puede unir una, dos o más citocinas, proteínas relacionadas con citocina y receptores de citocinas seleccionados del grupo que consiste en 8MPI, 8MP2, 8MP38 (GDF10), 8MP4, 8MP6, 8MP8, CSFI (M-CSF), CSF2 (GM-CSF), CSF3 (G-CSF), EPO, FGF1 (α FGF), FGF2 (β FGF), FGF3 (int-2), FGF4 (HST), FGF5, FGF6 (HST-2), FGF7 (KGF), FGF9, FGF10, FGF11, FGF12, FGF12B, FGF14, FGF16, FGF17, FGF19, FGF20, FGF21, FGF23, IGF1, IGF2, IFNA1, IFNA2, IFNA4, IFNA5, IFNA6, IFNA7, IFN81, IFNG, IFNWI, FELI, FEL1 (EPSELON), FEL1 (ZETA), IL 1A, IL 1B, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL 11, IL 12A, IL 12B, IL 13, IL 14, IL 15, IL 16, IL 17, IL 17B, IL 18, IL 19, IL20, IL22, IL23, IL24, IL25, IL26, IL27, IL28A, IL28B, IL29, IL30, IL33, PDGFA, PDGFB, TGFA, TGFB1, TGFB2, TGFB3, LTA (TNF- β), LTB, TNF (TNF- α), TNFSF4 (ligando OX40), TNFSF5 (ligando CD40), TNFSF6 (FasL), TNFSF7 (ligando CD27), TNFSF8 (ligando CD30), TNFSF9 (ligando 4-1 BB), TNFSF10 (TRAIL), TNFSF11 (TRANCE), TNFSF12 (APO3L), TNFSF13 (April), TNFSF13B, TNFSF14 (HVEM-L), TNFSF15 (VEGI), TNFSF18, HGF (VEGFD), VEGF, VEGFB, VEGFC, IL1R1, IL1R2, IL1RL1, IL1RL2, IL2RA, IL2RB, IL2RG, IL3RA, IL4R, IL5RA, IL6R, IL7R, IL8RA, IL8RB, IL9R, IL10RA, IL10RB, IL 11RA, IL12RB1, IL12RB2, IL13RA1, IL13RA2, IL15RA, IL17R, IL18R1, IL20RA, IL21R, IL22R, IL1HY1, IL1RAP, IL1RAPL1, IL1RAPL2, IL1RN, IL6ST, IL18BP, IL18RAP, IL22RA2, AIF1, HGF, LEP (leptina), PTN y THPO.

En determinados modos de realización, un anticuerpo multiespecífico purificado de acuerdo con un procedimiento descrito en el presente documento que puede unir es una quimiocina, receptor de quimiocina o una proteína relacionada con quimiocina seleccionada del grupo que consiste en CCL1 (1-309), CCL2 (MCP-1/MCAF), CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL8 (mcp-2), CCL11 (eotaxina), CCL13 (MCP-4), CCL 15 (MIP-1 δ), CCL 16 (HCC-4), CCL 17 (TARC), CCL 18 (PARC), CCL 19 (MDP-3b), CCL20 (MIP-3 α), CCL21 (SLC/exodus-2), CCL22 (MDC/STC-1), CCL23 (MPIF-1), CCL24 (MPIF-2/eotaxina-2), CCL25 (TECK), CCL26 (eotaxina-3), CCL27 (CTACK/ILC), CCL28, CXCL1 (GRO1), CXCL2 (GR02), CXCL3 (GR03), CXCL5 (ENA-78), CXCL6 (GCP-2), CXCL9 (MIG), CXCL 10 (IP 10), CXCL 11 (1-TAC), CXCL 12 (SDF1), CXCL 13, CXCL 14, CXCL 16, PF4 (CXCL4), PPBP (CXCL7), CX3CL 1 (SCYDI), SCYE1, XCL1 (linfotactina), XCL2 (SCM-1 β), BLRI (MDR15), CCBP2 (D6/JAB61), CCRI (CKRLHM145), CCR2 (mcp-IRB IRA), CCR3 (CKR3/CMKBR3), CCR4, CCR5 (CMKBR5/ChemR13), CCR6 (CMKBR6/CKR-L3/STRL22/DRY6), CCR7 (CKR7/EBI1), CCR8 (CMKBR8/TER1/CKR-L1), CCR9 (GPR-9-6), CCRL1 (VSHK1), CCRL2 (L-CCR), XCR1 (GPR5/CCXCR1), CMKLR1, CMKOR1 (RDC1), CX3CR1 (V28), CXCR4, GPR2 (CCR10), GPR31, GPR81 (FKSG80), CXCR3 (GPR9/CKR-L2), CXCR6 (TYMSTR/STRL33/Bonzo), HM74, IL8RA (IL8R α), IL8RB (IL8R β), LTB4R (GPR16), TCP10, CKLFSF2, CKLFSF3, CKLFSF4, CKLFSF5, CKLFSF6, CKLFSF7, CKLFSF8, BDNF, C5R1, CSF3, GRCC10 (CIO), EPO, FY (DARC), GDF5, HDF1, HDF1 α , DL8, PRL, RGS3, RGS13, SDF2, SLIT2, TLR2, TLR4, TREM1, TREM2 y VHL.

En determinados modos de realización, un anticuerpo multiespecífico purificado de acuerdo con un procedimiento descrito en el presente documento puede unir una o más dianas seleccionadas del grupo que consiste en ABCF1; ACVR1; ACVR1B; ACVR2; ACVR2B; ACVRL1; ADORA2A; agrecano; AGR2; AICDA; AIF1; AIG1; AKAP1; AKAP2; AMH; AMHR2; ANGPTL; ANGPT2; ANGPTL3; ANGPTL4; ANPEP; APC; APOC1; AR; AZGP1 (zinc-a-glucoproteína); B7.1; B7.2; BAD; BAFF (BLys); BAG1; BAI1; BCL2; BCL6; BDNF; BLNK; BLRI (MDR15); BMP1; BMP2; BMP3B (GDF10); BMP4; BMP6; BMP8; BMPR1A; BMPR1B; BMPR2; BPAG1 (plectina); BRCA1; C19orf10 (IL27w); C3; C4A; C5; C5R1; CA125; CA15-3; CA19-9; CANT1; CASP1; CASP4; CAV1; CCBP2 (D6/JAB61); CCL1 (1-309); CCL11 (eotaxina); CCL13 (MCP-4); CCL15 (MIP1 δ); CCL16 (HCC-4); CCL17 (TARC); CCL18 (PARC); CCL19 (MIP-3 β); CCL2 (MCP-1); MCAF; CCL20 (MIP-3 α); CCL21 (MTP-2); SLC; exodus-2; CCL22 (MDC/STC-1); CCL23 (MPIF-1); CCL24 (MPIF-2/eotaxina-2); CCL25 (TECK); CCL26 (eotaxina-3); CCL27 (CTACK/ILC); CCL28; CCL3 (MTP-1 α); CCL4 (MDP-1 β); CCL5(RANTES); CCL7 (MCP-3); CCL8 (mcp-2); CCNA1; CCNA2; CCND1; CCNE1; CCNE2; CCR1 (CKR1/HM145); CCR2 (mcp-IR β /RA); CCR3 (CKR/ CMKBR3); CCR4; CCR5 (CMKBR5/ChemR13); CCR6 (CMKBR6/CKR-L3/STRL22/DRY6); CCR7 (CKBR7/EBI1); CCR8 (CMKBR8/TER1/CKR-L1); CCR9 (GPR-9-6); CCRL1 (VSHK1); CCRL2 (L-CCR); CD11a; CD13; CD164; CD19; CD1C; CD20; CD200; CD22; CD23; CD24; CD28; CD3; CD30; CD31; CD33; CD34; CD35; CD37; CD38; CD39; CD3E; CD3G; CD3Z; CD4; CD40; CD40L; CD41; CD44; LCA/CD45; CD45RA; CD45RB; CD45RO; CD5; CD52; CD69; CD7; CD71; CD72; CD74; CD79A; CD79B; CD8; CD80; CD81; CD83; CD86; CD95/Fas; CD99; CD100;

CD106; CDH1 (E-caderina); CD9/p24; CDH10; CD11a; CD11c; CD13; CD14; CD19; CD20; CDH12; CDH13; CDH18; CDH19; CDH20; CDH5; CDH7; CDH8; CDH9; CDK2; CDK3; CDK4; CDK5; CDK6; CDK7; CDK9; CDKN1A (p21/WAF1/Cip1); CDKN1B (p27/Kip1); CDKN1C; CDKN2A (P16INK4a); CDKN2B; CDKN2C; CDKN3; CEA; CEBPB; CER1; CHGA; CHGB; quitinasa; CHST10; CKLFSF2; CKLFSF3; CKLFSF4; CKLFSF5; CKLFSF6; CKLFSF7; CKLFSF8; CLDN3; CLDN7 (claudina-7); CLN3; CLU (clusterina); C-MET; CMKLR1; CMKOR1 (RDC1); CNR1; COL 18A1; COL1A1; COL4A3; COL6A1; CR2; CRP; CSFI (M-CSF); CSF2 (GM-CSF); CSF3 (G-CSF); CTLA4; CTNNB1 (b-catenina); CTSD (cathepsina B); CTSD (cathepsina D); CX3CL1 (SCYDI); CX3CR1 (V28); CXCL1 (GRO1); CXCL10 (IP-10); CXCL11 (I-TAC/IP-9); CXCL12 (SDF1); CXCL13; CXCL14; CXCL16; CXCL2 (GRO2); CXCL3 (GRO3); CXCL5 (ENA-78/LIX); CXCL6 (GCP-2); CXCL9 (MIG); CXCR3 (GPR9/CKR-L2); CXCR4; CXCR6 (TYMSTR/STRL33/Bonzo); CYB5; CYC1; CYSLTR1; citoqueratinas; DAB2IP; DES; DKFZp451J0118; DNCL1; DPP4; E2F1; ECGF1; EDG1; EFNA1; EFNA3; EFNB2; EGF; EGFR; ELAC2; ENG; ENO1; ENO2; ENO3; EPHB4; EPO; ERBB2 (Her-2); EREG; ERK8; ESR1; receptor estrogénico; receptor progesterónico; ESR2; F3 (TF); FADD; FasL; FASN; FCER1A; FCER2; FCGR3A; FGF; FGF1 (αFGF); FGF10; FGF11; FGF12; FGF12B; FGF13; FGF14; FGF16; FGF17; FGF18; FGF19; FGF2 (bFGF); FGF20; FGF21; FGF22; FGF23; FGF3 (int-2); FGF4 (HST); FGF5; FGF6 (HST-2); FGF7 (KGF); FGF8; FGF9; FGFR1; FGFR3; FIGF (VEGFD); FEL1 (EPSILON); fibrina; FIL1 (ZETA); FLJ12584; FLJ25530; FLRT1 (fibronectina); FLT1; FOS; FOSL1 (FRA-1); FY (DARC); GABRP (GABAa); GAGEB1; GAGEC1; GALNAC4S-6ST; GATA3; GDF5; GF11; GGT1; GM-CSF; GNAS1; GNRH1; GPR2 (CCR10); GPR31; GPR44; GPR81 (FKSG80); GRCCIO (CIO); GRP; GSN (gelsolina); GSTP1; HAVCR2; HDAC4; HDAC5; HDAC7A; HDAC9; HGF; HIF1A; HOP1; histamina y receptores de histamina; HLA-A; HLA-DRA; HM74; HMOX1; proteínas del HPV; HUMCYT2A; ICEBERG; ICOSL; 1D2; IFN-α; IFNA1; IFNA2; IFNA4; IFNA5; IFNA6; IFNA7; IFNB1; IFNGamma; ITGB7; DFNW1; IGBP1; IGF1; IGF1R; IGF2; IGFBP2; IGFBP3; IGFBP6; interleucinas tales como IL1-IL36 o sus receptores, incluyendo IL-1; IL10; IL10RA; IL10RB; IL11; IL11RA; IL-12; IL12A; IL12B; IL12RB1; IL12RB2; IL13; IL13RA1; IL13RA2; IL14; IL15; IL15RA; IL16; IL17; IL17B; IL17C; IL17R; IL18; IL18BP; IL18R1; IL18RAP; IL19; IL1A; IL1B; IL1F10; IL1F5; IL1F6; IL1F7; IL1F8; IL1F9; IL1HY1; IL1R1; IL1R2; IL1RAP; IL1RAPL1; IL1RAPL2; IL1RL1; IL1RL2; IL1RN; IL2; IL20; IL20RA; IL21 R; IL22; IL22RA; IL23; IL24; IL25; IL26; IL27; IL28A; IL28B; IL29; IL2RA; IL2RB; IL2RG; IL3; IL30; IL3RA; IL33; IL4; IL4R; IL5; IL5RA; IL6; IL6R; IL6ST (glucoproteína 130); P-glucoproteína; EL7; EL7R; EL8; IL8RA; DL8RB; IL8RB; DL9; DL9R; DLK; INHA; INHBA; INSL3; INSL4; IRAK1; ERAK2; ITGA1; ITGA2; ITGA3; ITGA6 (integrina α6); ITGAV; ITGB3; ITGB4 (integrina β4); JAG1; JAK1; JAK3; JUN; K6HF; KAI1; KDR; queratina; KITLG; KLF5 (GC Box BP); KLF6; KLK10; KLK12; KLK13; KLK14; KLK15; KLK3; KLK4; KLK5; KLK6; KLK9; KRT1; KRT19 (queratina 19); KRT2A; KHTHB6 (queratina de tipo H específica del cabello; cadena ligera kappa; cadena ligera lambda; LAMAS; LEP (leptina); Lingo-p75; Lingo-Troy; LPS; LTA (TNF-β); LTB; LTB4R (GPR16); LTB4R2; LTBR; LEWIS-xMACMARCKS; MAG o Omgp; MAP2K7 (c-Jun); MDK; MIB1; proteínas de los melanosomas; midkina; MEF; MIP-2; MKI67; (Ki-67); MMP2; MMP9; MS4A1; MSMB; MT3 (metalotioneína-111); MTSS1; MUC1 (mucina); MYC; MYO88; NCK2; neurocano; NFKB1; NFKB2; NGFB (NGF); NGFR; NgR-Lingo; NgR-Nogo66 (Nogo); NgR-p75; NgR-Troy; NME1 (NM23A); NOX5; NPPB; NR0B1; NR0B2; NR1D1; NR1D2; NR1H2; NR1H3; NR1H4; NR112; NR113; NR2C1; NR2C2; NR2E1; NR2E3; NR2F1; NR2F2; NR2F6; NR3C1; NR3C2; NR4A1; NR4A2; NR4A3; NR5A1; NR5A2; NR6A1; NRP1; NRP2; NT5E; NTN4; ODZ1; OPRD1; P2RX7; PAP; PART1; PATE; PAWR; PCA3; PCNA; POGFA; POGFB; PECAM1; PF4 (CXCL4); PGF; PGR; fosfacano; PIAS2; PIK3CG; PLAU (uPA); PLG; PLXDC1; PPBP (CXCL7); PPID; PRI; PRKCQ; PRKDI; PRL; PROC; PROK2; PSA; PSAP; PSCA; PTAFR; PTEN; PTGS2 (COX-2); PTN; p53; RAC2 (p21 Rac2); RAS; Rb; RARB; RGS1; RGS13; RGS3; RNF110 (ZNF144); ROBO2; S100A2; SCGB1D2 (lipofilina B); SCGB2A1 (mamaglobina 2); SCGB2A2 (mamaglobina 1); SCYE1 (citocina activadora de monocitos endoteliales); S-100 SDF2; SERPINA1; SERPINA3; SERP1NB5 (maspina); SERPINE1 (PAI-1); SERPDMF1; SHBG; SLA2; SLC2A2; SLC33A1; SLC43A1; SLIT2; SPPI; SPRR1B (Sprl); ST6GAL1; STAB1; STAT6; STEAP; STEAP2; TB4R2; TBX21; TCPIO; TOGFI; TEK; TGFA; TGFB1; un antígeno específico del tumor de la superficie celular o transmembrana (TAA) tal como un TAA descrito en el documento USP 7.521.541;TAU; TGFB11I; TGFB2; TGFB3; TGFB1; TGFBRI; TGFBRI2; TGFB3; TH1L; THBS1 (trombospondina-1); THBS2; THBS4; THPO; TIE (Tie-1); TMP3; factor tisular; TLR1; TLR2; TLR3; TLR4; TLR5; TLR6; TLR7; TLR8; TLR9; TLR10; antígeno Tn TNF; TNF-α; TNFAEP2 (B94); TNFAIP3; TNFRSFIIA; TNFRSF1A; TNFRSF1B; TNFRSF21; TNFRSF5; TNFRSF6 (Fas); TNFRSF7; TNFRSF8; TNFRSF9; TNFSF10 (TRAIL); TNFSF11 (TRANCE); TNFSF12 (AP03L); TNFSF13 (April); TNFSF13B; TNFSF14 (HVEM-L); TNFSF15 (VEGI); TNFSF18; TNFSF4 (ligando OX40); TNFSF5 (ligando CD40); TNFSF6 (FasL); TNFSF7 (ligando CD27); TNFSFS (ligando CD30); TNFSF9 (ligando 4-1 BB); TOLLIP; receptores del tipo toll; TOP2A (topoisomerasa Ea); TP53; TPM1; TPM2; TRADD; TRAF1; TRAF2; TRAF3; TRAF4; TRAF5; TRAF6; TREM1; TREM2; TRPC6; TSLP; TWEAK; ubiquitina; VEGF; VEGFB; VEGFC; versicano; VHL C5; vimentinas; VLA-4; XCL1 (linfotactina); XCL2 (SCM-Ib); XCRI (GPR5/ CCXCRI); YY1; y ZFPM2.

En determinados modos de realización, las moléculas diana para anticuerpos multispecíficos purificados de acuerdo con un procedimiento proporcionado en el presente documento incluyen proteínas CD tales como los miembros CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, CD20, CD34; CD64, CD200 de la familia del receptor ErbB tales como el receptor de EGF, receptor HER2, HER3 o HER4; moléculas de adhesión celular tales como LFA-1, Mad, p150.95, VLA-4, ICAM-1, VCAM, integrina alfa4/beta7 e integrina alfa5/beta3 incluyendo subunidades alfa o bien beta de las mismas (por ejemplo, anticuerpos anti-CD11a, anti-CD18 o anti-CD11b); factores de crecimiento tales como VEGF (VEGF-A), FGFR, Angl, KLB, VEGF-C; factor tisular (TF); interferón alfa (alfalFN); TNFalfa, una interleucina, tal como IL-1 beta, IL-3, IL-4, IL-5, IL-S, IL-9, IL-13, IL 17 AF, IL-1S, IL13; IL-13R alfa1, IL13R alfa2, IL14 IL-4R, IL-5R, IL-9R. IgE: antígenos del grupo sanguíneo: receptor flk2/flt3: receptor de obesidad (OB): receptor mpl: CTLA-4:

RANKL, RANK, proteína F de VRS, proteína C, BR3, etc.

En determinados modos de realización, las moléculas diana para anticuerpos multiespecíficos purificados de acuerdo con un procedimiento proporcionado en el presente documento incluyen proteína relacionada con receptor de lipoproteína de baja densidad (LRP)-1 o LRP-8 o receptor de transferrina, y al menos una diana seleccionada del grupo que consiste en 1) beta-secretasa (BACE1 o BACE2), 2) alfa-secretasa, 3) gamma-secretasa, 4) tau-secretasa, 5) proteína precursora amiloide (APP), 6) receptor de muerte 6 (DR6), 7) péptido beta-amiloide, 8) alfa-sinucleína, 9) parkina, 10) huntingtina, 11) p75 NTR, y 12) caspasa-6.

En determinados modos de realización, las moléculas diana para anticuerpos multiespecíficos purificados de acuerdo con un procedimiento proporcionado en el presente documento incluyen al menos dos moléculas diana seleccionadas del grupo que consiste en: IL-1 alfa e IL-1 beta, IL-12 e IL-1S; IL-13 e IL-9; IL-13 e IL-4; IL-13 e IL-5; IL-5 e IL-4; IL-13 e IL-1beta; IL-13 e IL-25; IL-13 y TARC; IL-13 y MDC; IL-13 y MEF; IL-13 y TGF- α ; IL-13 y agonista de LHR; IL-12 y TWEAK, IL-13 y CL25; IL-13 y SPRR2a; IL-13 y SPRR2b; IL-13 y ADAMS, IL-13 y PED2, IL13 e IL17; IL13 e IL4; IL13 e IL33; IL17A e IL 17F, CD3 y CD19, CD138 y CD20; CD138 y CD40; CD19 y CD20; CD20 y CD3; CD3S y CD13S; CD3S y CD20; CD3S y CD40; CD40 y CD20; CD-S e IL-6; CD20 y BR3, TNF alfa y TGF-beta, TNF alfa e IL-1 beta; TNF alfa e IL-2; TNF alfa e IL-3; TNF alfa e IL-4; TNF alfa e IL-5; TNF alfa e IL6; TNF alfa e IL8; TNF alfa e IL-9, TNF alfa e IL-10, TNF alfa e IL-11, TNF alfa e IL-12, TNF alfa e IL-13, TNF alfa e IL-14, TNF alfa e IL-15, TNF alfa e IL-16, TNF alfa e IL-17, TNF alfa e IL-18, TNF alfa e IL-19, TNF alfa e IL-20, TNF alfa e IL-23, TNF alfa e IFN alfa, TNF alfa y CD4, TNF alfa y VEGF, TNF alfa y MIF, TNF alfa e ICAM-1, TNF alfa y PGE4, TNF alfa y PEG2, TNF alfa y ligando RANK, TNF alfa y Te38, TNF alfa y BAFF, TNF alfa y CD22, TNF alfa y CTLA-4, TNF alfa y GP130, TNFa e IL-12p40, FGFR1 y KLB; VEGF y HER2, VEGF-A y HER2, VEGF-A y PDGF, HER1 y HER2, VEGFA y ANG2, VEGF-A y VEGF-C, VEGF-C y VEGF-D, HER2 y DR5, VEGF e IL-8, VEGF y MET, VEGFR y receptor MET, EGFR y MET, VEGFR y EGFR, HER2 y CD64, HER2 y CD3, HER2 y CD16, HER2 y HER3; EGFR (HER1) y HER2, EGFR y HER3, EGFR y HER4, IL-14 e IL-13, IL-13 y CD40L, IL4 y CD40L, TNFR1 e IL-1 R, TNFR1 e IL-6R y TNFR1 e IL-18R, EpCAM y CD3, MAPG y CD28, EGFR y CD64, CSPGs y RGM A; CTLA-4 y BTN02; IGF1 e IGF2; IGF 1/2 y Erb2B; MAG y RGM A; NgR y RGM A; NogoA y RGM A; OMGP y RGM A; POL-1 y CTLA-4; y RGM A y RGM B.

Se pueden usar antígenos o fragmentos de los mismos solubles, opcionalmente conjugados con otras moléculas, como inmunógenos para generar anticuerpos. Para moléculas transmembranarias, tales como receptores, se pueden usar fragmentos de estos (por ejemplo, el dominio extracelular de un receptor) como inmunógeno. De forma alternativa, se pueden usar células que expresan la molécula transmembranaria como inmunógeno. Se pueden derivar dichas células de una fuente natural (por ejemplo, líneas celulares de cáncer) o pueden ser células que se han transformado por técnicas recombinantes para expresar la molécula transmembranaria. Otros antígenos y formas de los mismos útiles para preparar anticuerpos serán evidentes para los expertos en la técnica.

Formulaciones y procedimientos para preparar las formulaciones

En el presente documento se proporcionan también formulaciones y procedimientos para preparar la formulación que comprende los anticuerpos multiespecíficos purificados mediante los procedimientos descritos en el presente documento. Por ejemplo, el polipéptido purificado se puede combinar con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las formulaciones de polipéptidos en algunos modos de realización se pueden preparar para su conservación mezclando un polipéptido que tenga el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales (*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16.^a edición, Osol, A., Ed., (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o de soluciones acuosas.

Los "vehículos", como se usan en el presente documento, incluyen vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables que no son tóxicos para la célula o mamífero que está expuesto a los mismos en las dosificaciones y concentraciones empleadas. A menudo, el vehículo fisiológicamente aceptable es una solución acuosa de pH tamponado.

Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; glúcidos tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEENTM, PLURONICSTM o polietilenglicol (PEG).

En algunos modos de realización, el polipéptido de la formulación de polipéptido mantiene la actividad funcional.

Las formulaciones que se vayan a usar para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se logra fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

Las formulaciones del presente documento pueden contener también más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se está tratando, preferentemente aquellos que tienen actividades complementarias que no resultan afectadas de manera adversa entre sí. Por ejemplo, además de un polipéptido, puede ser deseable incluir en la formulación un polipéptido adicional (por ejemplo, un anticuerpo). De forma alternativa o adicional, la composición puede comprender además un agente quimioterápico, un agente citotóxico, una citocina, un agente inhibidor del crecimiento, un agente antihormonal y/o un cardioprotector. Dichas moléculas están presentes de forma adecuada en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito previsto.

Artículos de fabricación

Los anticuerpos multiespecíficos purificados por los procedimientos descritos en el presente documento y/o las formulaciones que comprenden los polipéptidos purificados por los procedimientos descritos en el presente documento pueden estar contenidos en un artículo de fabricación. El artículo de fabricación puede comprender un recipiente que contiene el polipéptido y/o la formulación de polipéptido. Preferentemente, el artículo de fabricación comprende: (a) un recipiente que comprende una composición que comprende el polipéptido y/o la formulación de polipéptido descrita en el presente documento dentro del recipiente y (b) un prospecto con instrucciones para administrar la formulación a un sujeto.

El artículo de fabricación comprende un recipiente y una ficha técnica o prospecto en o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringuillas, etc. Los recipientes se pueden formar a partir de variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente retiene o contiene una formulación y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo de la composición es el polipéptido. La etiqueta o prospecto indica el uso de la composición en un sujeto con unas directrices específicas con respecto a las cantidades e intervalos de dosificación del polipéptido y de cualquier otro fármaco que se proporcione. El artículo de fabricación puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringuillas. En algunos modos de realización, el recipiente es una jeringa. En algunos modos de realización, la jeringa está además contenida dentro de un dispositivo de inyección. En algunos modos de realización, el dispositivo de inyección es un autoinyector.

El término "prospecto" se usa para hacer referencia a las instrucciones incluidas normalmente en envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, contraindicaciones, otros productos terapéuticos para combinar con el producto envasado y/o advertencias sobre el uso de tales productos terapéuticos.

Descripción del listado de secuencias

- SEQ ID NO: 1 dominio variable de la cadena pesada VH de <VEGF> de vanucizumab
- SEQ ID NO: 2 dominio variable de la cadena ligera VL de <VEGF> de vanucizumab
- SEQ ID NO: 3 dominio variable de la cadena pesada VH de <ANG-2> de vanucizumab
- SEQ ID NO: 4 dominio variable de la cadena ligera VL de <ANG-2> de vanucizumab
- SEQ ID NO: 5 dominio variable de la cadena pesada VH de <VEGF> de RG7716
- SEQ ID NO: 6 dominio variable de la cadena ligera VL de <VEGF> de RG7716
- SEQ ID NO: 7 dominio variable de la cadena pesada VH de <ANG-2> de RG7716
- SEQ ID NO: 8 dominio variable de la cadena ligera VL de <ANG-2> de RG7716
- SEQ ID NO: 9 cadena pesada de <ANG-2> de vanucizumab
- SEQ ID NO: 10 cadena pesada de <VEGF> de vanucizumab
- SEQ ID NO: 11 cadena ligera de <ANG-2> de vanucizumab

SEQ ID NO: 12 cadena ligera de <VEGF> de vanucizumab

SEQ ID NO: 13 cadena pesada de <VEGF> de RG7716

5 SEQ ID NO: 14 cadena pesada de <ANG-2> de RG7716

SEQ ID NO: 15 cadena ligera de <VEGF> de RG7716

10 SEQ ID NO: 16 cadena ligera de <ANG-2> de RG7716

Ejemplos

Ejemplo 1: Ensamblaje y purificación de un anticuerpo biespecífico anti-X1/anti-Y1

15 Se ensambló un anticuerpo biespecífico frente a las proteínas diana X1 e Y1 (anticuerpo biespecífico anti-X1/anti-Y1 o biespecífico aX1/Y1) como sigue. Cada semianticuerpo (aX1 (botón) y aY1 (ojal)) se sometió independientemente a una etapa de cromatografía de afinidad usando resina de proteína A (MabSelect SuRe, GE Healthcare). La etapa de la proteína A se completa independientemente para cada semianticuerpo usando condiciones de procedimiento similares pero dianas de diferentes densidades de carga. Las columnas de proteína A se desarrollaron a temperatura ambiente (15-30 °C) y la carga se enfrió a 12-18 °C. Las columnas de proteína A se prepararon aplicando tres volúmenes de columna de tampón de elución seguidos de tres volúmenes de columna de tampón de regeneración. A continuación, las columnas se equilibraron, se cargaron, se lavaron tres veces (lavado con tampón de equilibrado, lavado con fosfato potásico, lavado con tampón de equilibrado), se eluyeron y se regeneraron durante ciclos suficientes para procesar el material de carga. Se ajustó el pH del material agrupado de la columna de proteína A, si era necesario, mediante la adición de tampón de elución para alcanzar un pH $\leq 3,60$ y se mantuvo durante un mínimo de 120 minutos. Después de esta etapa, se ajustó el pH del material agrupado a pH $5,0 \pm 0,3$ para procesamiento adicional.

30 A continuación, se combinaron los agrupamientos de semianticuerpos obtenidos de la etapa de cromatografía con proteína A en una proporción molar 1:1 y se ajustó el pH a pH 8,2. Se añadió tampón de L-glutación 200 mM (91/9 % GSH/GSSG) a los agrupamientos combinados para lograr una proporción de 165 moles de L-glutación por cada mol de biespecífico que se formaba. El material se calentó a $32,0 \pm 2,0$ °C durante 8-24 horas. El agrupamiento ensamblado resultante se enfrió a 15-25 °C y, a continuación, se ajustó a pH 5,5.

35 El agrupamiento ensamblado con pH ajustado se sometió a continuación a una cromatografía de intercambio catiónico multimodal usando resina Capto™ MMC en modo de unión y elución. Se equilibró la columna con acetato de sodio 100 mM, pH 5,5. El agrupamiento de ensamblaje ajustado se cargó en la columna con 45 g/l de resina, seguido de un lavado con tampón de equilibrado y una segunda fase de lavado con HEPES 50 mM con acetato de sodio 25 mM a pH 8,0. El anticuerpo biespecífico se eluyó de la columna incrementando tanto la sal como el pH en una elución escalonada, usando HEPES 50 mM con acetato de sodio 245 mM a pH 8,0. El agrupamiento de intercambio catiónico se inició y finalizó en base a una absorbancia a 280 nm.

45 A continuación, el eluido de la etapa de cromatografía catiónica multimodal se sometió a cromatografía de intercambio aniónico multimodal usando la resina Capto™ Adhere en modo de flujo continuo. Se equilibró la columna de Capto™ Adhere con Tris 50 mM, acetato de sodio 85 mM, pH 8,0. El agrupamiento de producto de la etapa precedente se ajustó a una conductividad de 9,0 mS/cm con agua purificada y se cargó en la columna. El anticuerpo biespecífico fluyó a través de la columna, que se lavó a continuación con tampón de equilibrado. El agrupamiento de intercambio aniónico se inició y finalizó en base a una absorbancia a 280 nm. El esquema de purificación descrito anteriormente se representa en la **FIG. 1A**.

50 La tercera etapa de cromatografía retiró las impurezas residuales como ADN, proteína de la célula huésped y endotoxinas, así como variantes de productos incluyendo semianticuerpos, homodímeros y agregados. Cuando la carga de Capto™ Adhere se enriqueció con un 20 % de homodímero aY1, el procedimiento de cromatografía disminuyó el homodímero aY1 en aproximadamente 2 veces (un 8 % mediante EM y un 10 % mediante un ensayo basado en células para detectar impurezas relacionadas con el producto).

60 La comparación del esquema de purificación mostrado en la **FIG. 1A** con un esquema de purificación usando una resina de intercambio catiónico tradicional (CEX) (POROS XS) (véase la **FIG. 1B**) mostró que el uso de la resina multimodal mejoró la separación del anticuerpo biespecífico de las variantes relacionadas con el producto, especialmente los homodímeros. Por tanto, cuando el material agrupado de la etapa de cromatografía de afinidad se enriqueció con un 20 % de homodímeros de ojal, la cromatografía de intercambio catiónico multimodal disminuyó el homodímero de ojal a menos de un 2 % mediante espectrometría de masas (EM) y por debajo del límite de cuantificación de un 0,5 % mediante un ensayo basado en células para impurezas relacionadas con el producto.

Tabla 7: Separación del anticuerpo biespecífico anti-X1/anti-Y1 de las impurezas relacionadas con el

producto y con la célula huésped (resina POROS XS, modo de unión/elución)

Agrupamiento	Tampón de elución	Rendimiento (%)	CHOP (ng/mg)	SEC % (HMWS, 150 kD, 75 kD, LMWS)†			
CARGA	--	--	2060	8,8	80,5	6,9	3,8
Agrupamiento	NaOAc 127 mM, pH 6,5	90	654	0,3	90,3	8,0	1,4

Tabla 8: Separación del anticuerpo biespecífico de impurezas relacionadas con el producto y con la célula huésped (resina Capto MMC, modo de unión/elución)

Agrupamiento	Tampón de elución	Rendimiento (%)	CHOP (ng/mg)	SEC % (HMWS, 150 kD, 75 kD, LMWS)†			
CARGA	--	--	4080	8,4	89,3	1,4	0,3
Agrupamiento	NaOAc 244 mM, pH 8,0	80	236	0,9	98,5	0,5	0,1

150 kD = biespecífico y homodímero; **75 kD** = semianticuerpo; **CHOP** = proteína de células CHO; **HMWS** = especies de alto peso molecular; **LMWS** = especies de bajo peso molecular

La comparación entre una resina de intercambio aniónico tradicional (AEX) (QSFF) (véase la **FIG. 1C**) y una resina AEX multimodal (Capto™ Adhere) (véase la **FIG. 1A**), como se muestra en las tablas 9 y 10, demuestra que la resina AEX multimodal logró una separación significativamente mejor del anticuerpo biespecífico de las impurezas relacionadas con el producto en comparación con la resina AEX QSFF tradicional. QSFF enriqueció el pico principal en un 1 % y Adhere enriqueció el pico principal en un 10 %, debido a la retirada del semianticuerpo (75 kD) y los agregados, es decir, especies de alto peso molecular (HMWS). Una comparación directa de Capto Adhere y QSFF usando el mismo agrupamiento de Capto MMC mostró que la resina Capto Adhere logró una mejor eliminación de variantes de tamaño, variantes relacionadas con el producto, incluyendo semianticuerpo, y eliminación de proteínas de la célula huésped en comparación con QSFF (tabla 11).

Tabla 9: Separación del anticuerpo biespecífico de impurezas relacionadas con el producto y con la célula huésped (resina QSFF, modo de flujo continuo)

pH de carga	Conductividad de la carga (mS/cm)	Rendimiento (%)	CHOP (ng/mg)	SEC % (HMWS, 150 kD, 75 kD, LMWS)†				Homodímero anti-Y1 (ojal-ojal) en espec. masas (%)
CARGA	--	--	~300	0,5	92,5	5,9	1,1	--
8,0	5,1	93	<15	0,6	93,5	4,4	1,5	3
8,0	9,0	97	<9,8	0,6	92,4	5,3	1,7	3

150 kD = biespecífico y homodímero; **75 kD** = semianticuerpo; **CHOP** = proteína de células CHO; **HMWS** = especies de alto peso molecular; **LMWS** = especies de bajo peso molecular

Tabla 10: Separación del anticuerpo biespecífico de impurezas relacionadas con el producto y con la célula huésped (resina Capto™ Adhere, modo de flujo continuo)

Serie de columna		pH de carga	Conductividad de la carga (mS/cm)	Rendimiento total de proteínas (%)	CHOP (ppm)	SEC-HPLC % HMWS	SEC-HPLC % 75 kD	Homodímero ojal-oyal en espec. masas (%)
1	Carga	8,0	9,0	-	276	0,5	1,6	
	Agrupamiento	--	--	85	1,5	0,2	0,0	<2 % (LDC)
2	Carga	8,5	9,0	--	276	0,3	1,5	
	Agrupamiento	--	--	76	2,0	0,1	1,4	<2 % (LDC)

75 kD = semianticuerpo; CHOP = proteína de células CHO; HMWS = especies de alto peso molecular; LDC = límite de cuantificación

5 **Tabla 11: Comparación de Capto Adhere y QSFF**

	pH de carga	Conductividad de la carga (mS/cm)	Rendimiento total de proteínas (%)	CHOP (ppm)	SEC-HPLC % HMWS	SEC-HPLC % 75 kD
Carga	--	--	-	32	1,1	1,3
Agrupamiento de Capto Adhere	8,0	9,0	91	0,9	0,55	0,48
Agrupamiento de QSFF	8,0	9,0	100	<8,5	1,4	1,4

75 kD = semianticuerpo; CHOP = proteína de células CHO; HMWS = especie de alto peso molecular; LDC = límite de cuantificación

10

Los experimentos descritos anteriormente demuestran que el esquema de purificación representado en la **FIG. 1A** logró una separación significativamente mejor del anticuerpo biespecífico aX1/Y1 de las impurezas relacionadas con el producto en comparación con los esquemas de purificación de la **FIG. 1B** o **FIG. 1C**. En primer lugar, cuando el material agrupado de la etapa de cromatografía de afinidad se enriqueció con un 20 % de homodímeros de ojal, Capto MMC (es decir, resina de intercambio catiónico multimodal) disminuyó el homodímero de ojal a menos de un 2 % mediante espectrometría de masas (EM) y estuvo por debajo del límite de cuantificación de un 0,5 % mediante un ensayo basado en células para impurezas relacionadas con el producto. (Véanse las tablas 7 y 8). Esta separación no se logró usando POROS XS, es decir, una resina de intercambio catiónico tradicional. Además, CaptoAdhere (es decir, una resina de intercambio aniónico multimodal) enriqueció el pico principal en un 10 %, debido a la retirada de especies de alto peso molecular, tales como semianticuerpo (75 kD) y agregados, mientras que QSFF (es decir, una resina de intercambio aniónico tradicional) enriqueció el pico principal en solo un 1 %. Además, la combinación de dos resinas multimodales, una resina catiónica multimodal (CaptoMMC) seguida de una resina aniónica multimodal (CaptoAdhere), logró una mejor eliminación de variantes de tamaño, variantes relacionadas con el producto, incluyendo semianticuerpo, y eliminación de proteínas de la célula huésped en comparación con la combinación de la resina catiónica multimodal seguida de una resina de intercambio aniónico tradicional, QSFF (véase, por ejemplo, la tabla 11).

Se encontró una mejora similar en la retirada de variantes relacionadas con el producto y variantes de tamaño cuando se invirtió el orden de las resinas multimodales. En un experimento separado, también se logró una mejor separación del anticuerpo biespecífico aX1/Y1 de las impurezas relacionadas con el producto sometiendo al material agrupado de la etapa de cromatografía de afinidad primero a una resina aniónica multimodal, seguido de una resina catiónica multimodal.

35 **Ejemplo 2: Ensamblaje y purificación de un F(ab')₂ biespecífico**

Los intentos iniciales de lograr un $F(ab')_2$ biespecífico con un 90 % de pureza dieron como resultado rendimientos bajos (menos de un 10 % de material de partida). Al problema de mantener rendimientos aceptables sin pérdida de pureza se sumaron varios desafíos, incluyendo la inestabilidad de los intermedios del procedimiento y la presencia de variantes relacionadas con el producto, tales como homodímeros, cadenas ligeras y pesadas libres, y grupos salientes de Fab' sin reaccionar. Se desarrollaron novedosas operaciones unitarias para lograr un ensamblaje y purificación eficaces del $F(ab')_2$ biespecífico deseado. Se ensambló y purificó un $F(ab')_2$ biespecífico que comprende dos moléculas Fab' diferentes como se representa en el esquema proporcionado en la FIG. 2.

En primer lugar, se implementó una etapa de captura como sigue. Cada Fab' se capturó primero a partir de sobrenadantes de extracto de *E. coli* separados. Los sobrenadantes que contenían una de las dos semimoléculas de Fab' se sometieron a una etapa de captura usando resina de cromatografía de afinidad con CaptoL Protein L. La columna se equilibra usando un tampón de equilibrado de cloruro de sodio Tris 25 mM (pH 7,7). Después de la aplicación del material de carga a la columna, se lavó la columna con tampón de equilibrado (pH 7,7), seguido de un lavado con fosfato de potasio 0,4 M (pH 7), un lavado con reductor para retirar las caperuzas de cisteína y un lavado adicional con tampón de equilibrado, pH 7,7. A continuación, se eluyó el producto de Fab' de interés de la columna CaptoL usando un tampón de elución de ácido acético 0,1 M, pH 2,9. Se recogió el producto usando absorbancia a 280 nm.

El agrupamiento de la etapa de cromatografía con Capto L que contenía una primera semimolécula de Fab' (Fab' A) se ajustó a pH 5,5. Se añadió DPDS (disulfuro de dipiridilo) al agrupamiento de CaptoL ajustado a pH 5,5. El DPDS reacciona con la cisteína bisagra libre en la molécula de Fab' para formar un Fab' piridilado que se hace reaccionar con el tiol libre del Fab' disponible, promoviendo de este modo la formación de heterodímeros de $F(ab')_2$. Una vez formado, el Fab' A piridilado se cargó en una segunda columna de cromatografía para su purificación.

Para identificar las condiciones cromatográficas bajo las cuales se puede separar el Fab' piridilado de las impurezas (es decir, homodímero de Fab', especies de alto peso molecular (HMWS), monómero de Fab'), se caracterizaron los comportamientos de unión del homodímero de Fab', las especies de alto peso molecular (HMWS), el monómero de Fab' y el Fab' piridilado (pir-Fab') en la resina Capto MMC en un cribado con un coeficiente de reparto de 96 puntos de las condiciones de unión de la resina de cromatografía. Se cargó un agrupamiento de Fab' piridilado en una resina Capto™ MMC. Se predijo que el monómero de Fab' eluiría antes en el gradiente que el pir-Fab', mientras que se predijo que las HMWS y el homodímero de Fab' eluirían más tarde en el gradiente. La segunda molécula de Fab', Fab' B, se eluyó de la resina de cromatografía con CaptoL y, a continuación, se oxidó.

Los dos agrupamientos de Fab', que contenían Fab' A piridilado y Fab' B oxidado, se sometieron a continuación a condiciones adecuadas para el ensamblaje de la molécula biespecífica de $F(ab')_2$. Se combinaron los agrupamientos de CaptoL de Fab' A piridilado y Fab' B oxidado. El agrupamiento combinado se mantuvo durante un tiempo mínimo de ensamblaje para permitir la formación del $F(ab')_2$ biespecífico. A continuación, se acondicionó el agrupamiento de ensamblaje para cargarlo sobre la siguiente columna de cromatografía.

Se realizó un cribado de Kp de baja resolución (es decir, coeficiente de reparto) para caracterizar el comportamiento de unión de la mezcla de ensamblaje de $F(ab')_2$ en diferentes resinas de cromatografía. Se sometió a prueba una mezcla de ensamblaje (un 0 % de agregado, un 21,5 % de homodímero de Fab' A, un 43,9 % de $F(ab')_2$, un 10,3 % de monómero de Fab' A, un 8,8 % de Fab' A piridilado y un 15,5 % de monómero de Fab' B, medido mediante SEC-HPLC), cargándola en las siguientes resinas a una densidad de carga de 5 g/l_{resina}: resina Capto™ MMC, resina Capto™ Adhere, resina QSFF o resina POROS® 50HS. La composición de proteínas y la concentración de proteínas de cada placa de flujo continuo se analizaron por medio de SEC-HPLC. Estos datos se desconvolucionaron y usaron para generar curvas de contorno correspondientes al comportamiento de $F(ab')_2$, homodímero de Fab' A, homodímero de Fab' B, monómero de Fab' A y monómero de Fab' B en cada una de las cuatro resinas en las condiciones de prueba.

En base a las curvas de contorno, se predijo que Capto™ Adhere resolvería los monómeros de Fab' A, los homodímeros de Fab' A y los homodímeros de Fab' B. Específicamente, en una elución de unión y gradiente de pH en resina Capto™ Adhere, se predijo que el monómero de Fab' A y el homodímero de Fab' B eluirían antes que el pico principal de $F(ab')_2$, mientras que se predijo que el homodímero de Fab' A permanecería unido a la resina. Las curvas de contorno para QSFF mostraron que se predijo que ninguna de las especies se uniría a la resina QSFF para los intervalos de pH sometidos a prueba, lo que indica que no se lograría separar $F(ab')_2$ de las impurezas relacionadas con el producto por medio de cromatografía con QSFF. Las resinas de modo mixto proporcionaron la mejor separación del $F(ab')_2$ de las impurezas relacionadas con el producto en las condiciones experimentales. Las curvas de contorno de Capto™ MMC mostraron que se predijo que Capto™ MMC separaría el $F(ab')_2$ de sus impurezas específicas del producto eficazmente a un pH 5,5.

Después del ensamblaje del $F(ab')_2$ biespecífico, el agrupamiento de ensamblaje se somete a cromatografía AEX multimodal usando resina CaptoAdhere. Se determina el valor del agrupamiento de ensamblaje a pH 7,5 y se diluye a una conductividad de $\leq 5,5$ mS/cm. Se equilibra la columna con acetato de sodio 25 mM y tampón de equilibrado de Tris 50 mM, pH 7,5. El agrupamiento de ensamblaje se carga en una columna a una densidad de

carga de 25 g/l de resina. A continuación, se lava la columna con tampón de equilibrado. Se eluye la columna usando acetato de sodio 25 mM, MES 45 mM, tampón de elución de Tris 5 mM, pH 5,5 y el agrupamiento de elución se agrupa según la absorbancia A280.

Después de la AEX multimodal, se carga el material en una resina Poros 50 HS operada en modo de unión y elución. Se equilibra la columna Poros 50 HS con acetato de sodio 52 mM, pH 4,9. La carga se acondiciona a pH 5 y conductividad $\leq 3,3$ mS/cm. Se lava la columna con tampón de equilibrado. A continuación, se lava la columna con acetato de sodio 169 mM, pH 4,9. Se eluye la columna usando una elución escalonada usando un tampón de elución de acetato de sodio 247 mM, pH 4,9. Se recoge el agrupamiento según A280.

A continuación, el agrupamiento de la etapa de POROS 50 HS se somete a cromatografía CEX multimodal usando resina CaptoMMC. La etapa de CEX multimodal se opera en modo de unión y elución. Se equilibra la columna usando tampón de equilibrado de acetato de sodio 50 mM, pH 5,5. Se ajusta la carga a pH 5,0 y conductividad ≤ 5 mS/cm y se carga en la columna a una densidad de carga de 15 g/l. Se lava la columna con tampón de equilibrado. A continuación, se lava la columna con tampón de lavado 2 de acetato de sodio 140 mM, pH 5,5. Se eluye la columna con una elución con gradiente usando tampón de equilibrado y un tampón de elución de acetato de sodio 350 mM, pH 5,5. Se recoge el agrupamiento según la A280.

Como se muestra en la **tabla 12**, se logró la separación mejorada del producto de interés de $F(ab')_2$ biespecífico (100 kD) de las proteínas de *E. coli* y una variante relacionada con el producto de disulfuro deformado de 71 kD usando la resina CaptoTM MMC en comparación con cuando se usó la resina POROS[®] HS. Se logró una pureza mayor de un 95 % de $F(ab')_2$ biespecífico medida por SEC usando CaptoMMC como cuarta columna. También se logró menos de un 5 % de la variante relacionada con el producto de disulfuro deformado de 71 kD usando CaptoMMC como cuarta columna.

Tabla 12: Separación del $F(ab')_2$ de impurezas relacionadas con el producto y con la célula huésped (resina POROS[®] HS, modo de unión y elución frente a CaptoTM MMC, modo de unión y elución)

Agrupamiento	Rendimiento (%)	% $F(ab')_2$ (SEC)	% especies de 100 kD	% especies de 71 kD	ECP (ppm)
Material de carga (agrupamiento de Capto Adhere)	--	72,7	66,6	4,7	547
Agrupamiento de Poros [®] (4. ^a columna)	72	93,9	90,1	5,2	42
Agrupamiento de Capto TM MMC (4. ^a columna)	60	96,0	93,1	4,5	21

100 kD = producto de interés de $F(ab')_2$ biespecífico medido por CE-SDS; **71 kD** = variante relacionada con el producto con disulfuro deformado medida mediante CE-SDS; **% $F(ab')_2$** = % de biespecífico medido por SEC; **ECP** = proteínas de *E. coli*

Por tanto, el esquema de purificación representado en la **FIG. 2** mejoró significativamente el rendimiento de $F(ab')_2$ puro y redujo la cantidad de proteína de célula huésped en el agrupamiento de $F(ab')_2$ purificado en más de un 99 %, en comparación con el material de carga.

Ejemplo 3: Ensamblaje y purificación de un anticuerpo biespecífico anti-X2/anti-Y2

En otro ejemplo, se purificó un anticuerpo biespecífico como sigue. Cada semianticuerpo se produjo por separado y se sometió a cromatografía de afinidad, seguido de ensamblaje como se describe en el presente documento. Después del ensamblaje, el material de ensamblaje se sometió primero a una cromatografía de intercambio aniónico multimodal usando resina CaptoTM Adhere en modo de unión y elución. El material de ensamblaje se ajustó a pH 7,5 y se cargó en la columna que se había preequilibrado con tampón acetato/Tris 150 mM, pH 7,5. Después de la carga, se lavó la columna con tampón de equilibrado y se eluyó la proteína unida con acetato 25 mM, pH 5,0. La recogida del agrupamiento de elución se realizó en base a la señal de A280 nm. A continuación, el agrupamiento de elución de CaptoTM Adhere se sometió a una cromatografía de intercambio catiónico multimodal usando resina CaptoTM MMC en modo de unión y elución. El agrupamiento de elución de Capto Adhere se ajustó a pH 6,5 y se cargó en la columna Capto MMC preequilibrada en tampón de acetato 25 mM, MES 25 mM, pH 6,5. Después de la carga, se lavó la columna CaptoTM MMC con el tampón de equilibrado y se eluyó la proteína unida con acetato-Na 150 mM, MES 25 mM, pH 6,5. como tampón de elución de CaptoTM MMC. La recogida del agrupamiento se basó en la señal de A280 nm. Este esquema de purificación se representa en la **FIG. 3A**.

Como se muestra a continuación en las **tablas 13 y 14**, se logró una mayor separación del anticuerpo biespecífico de las impurezas específicas del procedimiento, tales como proteínas de *E. coli* y chaperonas (por ejemplo, fkpA, dsbA y dsbC) cuando se usó la cromatografía con Capto™ Adhere seguida de la cromatografía con Capto™ MMC (véase la **FIG. 3A**), en comparación con la cromatografía con Capto™ Adhere seguida de cromatografía con QSFF (véase la **FIG. 3B**). Además, se logró una mayor separación del anticuerpo biespecífico de las impurezas específicas del producto, tales como especies de muy alto peso molecular (vHMWS), especies de alto peso molecular (HMWS) y especies de bajo peso molecular (LMWS) cuando se usó la cromatografía con Capto™ Adhere seguida de cromatografía con Capto™ MMC (véase la **FIG. 3A**), en comparación con la cromatografía con Capto™ Adhere seguida de cromatografía con QSFF (véase la **FIG. 3B**). Véanse las **tablas 13 y 14**.

Tabla 13: Eliminación de impurezas específicas del procedimiento y del producto lograda con las etapas de Capto™ Adhere-QSFF en el procedimiento de anti-X2/Y2

Etapas	Niveles en ppm				Niveles en %			
	ECP	FkpA	DsbA	DsbC	vHMWS	HMWS	Principal	LMWS
anti-X2 MSS	6872	3983	38	80	0,1	4,1	ND	ND
anti-Y2 MSS	7640	2660	46	120	0,5	11,5	ND	ND
Ensamblaje	3441	1841	31	94	3,4	11,0	82	0,5
Capto™ Adhere	118	1689	5	35	1,6	5,8	95	0,0
QSFF	72	520	3	31	0,0	1,4	98	0,1

Tabla 14: Eliminación de impurezas relacionadas con el procedimiento y el producto lograda con las etapas de Capto™ Adhere-Capto™ MMC en el procedimiento de anti-X2/Y2

Etapas	Niveles en ppm				Niveles en %			
	ECP	FkpA	DsbA	DsbC	vHMWS	HMWS	Principal	LMWS
anti-X2 MSS	27090,5	3124	17	59	0,35	5,6	ND	ND
anti-Y2 MSS	5113,5	2632	23	79	3	11,6	ND	ND
Ensamblaje	1566	1782	18	39	6,1	8,2	83,7	2,1
Capto™ Adhere	49,5	1387	5	107	1,45	2,1	95,8	0,6
Capto™ MMC	15	96	1	2	0,15	0,25	99,55	0

Los experimentos descritos anteriormente demuestran que el esquema de purificación representado en la **FIG. 3A** (es decir, en el que se usó una cromatografía de intercambio aniónico multimodal seguida de una cromatografía de intercambio catiónico multimodal) logró una separación mejorada del anticuerpo biespecífico anti-X2Y2 de las impurezas relacionadas con el procedimiento y el producto en comparación con el esquema de purificación representado en la **FIG. 3B** (es decir, en el que se usó una cromatografía de intercambio aniónico multimodal seguida de una cromatografía de intercambio catiónico tradicional). Adicionalmente, el esquema de purificación representado en la **FIG. 3A** también logró un rendimiento mejorado de anticuerpo biespecífico anti-X2Y2 en comparación con el esquema de purificación representado en la **FIG. 3B**.

Ejemplo 4: Ensamblaje y purificación de un anticuerpo biespecífico anti-X3/anti-Y3

El semianticuerpo anti-X3 de botón se capturó en una columna de proteína A. Se equilibró la columna primero usando tampón de equilibrado de Tris 25 mM y cloruro de sodio 25 mM, pH 7,7. A continuación, se cargó sobrenadante de extracto de *E. coli* que contenía el semianticuerpo anti-X3 en la columna. Después de cargar el sobrenadante de extracto, se lavó la columna con tampón de equilibrado, seguido de tampón de lavado de fosfato de potasio 0,4 M, pH 7 y, a continuación, se lavó con tampón de equilibrado. A continuación, se eluyó el semianticuerpo anti-X3 usando tampón de elución de ácido acético 0,15 M, pH 2,9. Se recogió el agrupamiento de elución según la A280. Se determinó el valor del agrupamiento de elución a pH 5,0 y, a continuación, se conservó hasta la combinación con el semianticuerpo anti-Y3 de ojal. El semianticuerpo anti-Y3 de ojal se capturó usando el mismo procedimiento de proteína A descrito para el semianticuerpo anti-X3.

Los dos semianticuerpos se combinaron en una proporción de masa 1:1. Se añade arginina al agrupamiento de ensamblaje a una concentración final de 50 mM. El agrupamiento de los semianticuerpos combinados se diluyó 1:1 con histidina 200 mM, PVP al 8 %, pH 8. Se añadió L-glutatión reducido a un exceso molar de 200X (200 moles de glutatión por mol de anticuerpo biespecífico) para ensamblar los dos semianticuerpos. Se determinó el valor del agrupamiento de ensamblaje a pH 8,0 y, a continuación, se calentó a 35 grados Celsius durante seis horas. A continuación, se enfrió el agrupamiento a temperatura ambiente y se ajustó para cargarlo en la siguiente columna de cromatografía.

El agrupamiento de ensamblaje se cargó en una columna de intercambio aniónico QSFF. La columna se preequilibró primero con Tris 25 mM, cloruro de sodio 350 mM, pH 9,1, seguido de tampón de equilibrado de Tris 25 mM, cloruro de sodio 70 mM, pH 9,1. A continuación, se aplicó la carga ajustada a la columna a pH 8,5, conductividad $\leq 4,9$ mS/cm. A continuación, se lavó la columna con tampón de equilibrado. A continuación, se eluyó el agrupamiento usando tampón de equilibrado y tampón de elución de cloruro sódico 350 mM y Tris 25 mM. Se recogió el agrupamiento de elución según la A280.

A continuación, se ajustó el agrupamiento de QSFF para cargarlo en la siguiente columna. Se preequilibró una columna de intercambio aniónico multimodal CaptoAdhere con un tampón de preequilibrado de acetato de sodio 500 mM, pH 6,0, seguido de equilibrado con ocho volúmenes de columna de tampón de equilibrado de acetato de sodio 50 mM, pH 6,0. Se aplicó a la columna la carga ajustada a pH 6,0, conductividad ≤ 12 mS/cm. A continuación, se lavó la columna con tampón de equilibrado, seguido de tampón de lavado de arginina 0,1 M, pH 7,0, conductividad 7,5 mS/cm y, a continuación, se lavó con tampón de equilibrado. A continuación, se eluyó la columna con una elución con gradiente usando tampón de elución de acetato de sodio 50 mM, pH 5,0. Se recogió el agrupamiento de elución según la A280.

A continuación, se ajustó el agrupamiento de CaptoAdhere para cargarlo en la siguiente columna. Se preequilibró una columna de intercambio catiónico multimodal CaptoMMC con un tampón de preequilibrado de acetato de sodio 350 mM, pH 6,0, seguido de equilibrado con tampón de equilibrado de acetato de sodio 50 mM, pH 6,0. Se aplicó a la columna la carga ajustada a pH 6,0, conductividad $\leq 6,5$ mS/cm. A continuación, se lavó la columna con tampón de lavado de acetato de sodio 80 mM, pH 6,0. A continuación, se eluyó la columna con una elución con gradiente usando tampón de elución de acetato de sodio 350 mM, pH 6,0. Se recogió el agrupamiento de elución según la A280. Este esquema de purificación se representa en la **FIG. 4**.

Como se muestra a continuación en la **tabla 15**, un procedimiento de tres columnas (es decir, proteína A, seguida de QSFF, seguida de Capto™ Adhere) que comprendía solo una columna multimodal no logró una retirada suficiente de ECP. Someter el eluido de la cromatografía con Capto™ Adhere a una cuarta columna de cromatografía usando cromatografía con Capto™ MMC redujo el nivel de proteína de *E. coli* en más de tres veces con respecto al agrupamiento de Capto™ Adhere, disminuyó las HMWS a menos de un 1 % e incrementó el contenido de biespecífico a un 100 %.

Tabla 15

Etapa	% rendimiento	% HMWS	% biespecífico	ECP (ng/mg)
anti-X3 MSS	101	4	-	1513
anti-Y3 MSS	89	6	-	1864
Ensamblaje	100	11,4	88	2022
QSFF	65	1,6	96	597
CaptoAdhere	89	1,3	98	297
CaptoMMC	76	0,7	100	86

% biespecífico = % de anticuerpo biespecífico medido por HPLC de fase inversa; ECP = proteínas de célula huésped de *E. coli*; HMWS = especies de alto peso molecular medidas por SEC

Ejemplo 5: Materiales y procedimientos para los ejemplos 6 y 7

Anticuerpos

Los ejemplos 6-7 usan diversos anticuerpos ejemplares, incluyendo: un anticuerpo biespecífico que se une a Ang2 y VEGF-A (anticuerpo anti-Ang2/VEGF-A; vanucizumab; RG7221) como se describe en el documento WO

2011/117329 o SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4 o un anticuerpo biespecífico frente a VEGF-A y Ang2 (anticuerpo anti-VEGF-A/Ang2; RG7716) como se describe en el documento WO 2014/009465 o SEQ ID NO: 5 a SEQ ID NO: 8. También se incluyen en el presente documento varios anticuerpos, como se describe en los ejemplos a continuación.

Las técnicas y procedimientos descritos o a los que se hace referencia en el presente documento, en general, se entienden bien y se emplean comúnmente usando una metodología convencional por los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, las metodologías ampliamente utilizadas descritas en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3.^a edición (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel, *et al.* eds., (2003)); la serie Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Antibodies, A Laboratory Manual, and Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed. (1987)); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather y P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths and D.G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds.); Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan *et al.*, eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C.A. Janeway y P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: A Practical Approach (D. Catty, ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd y C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow y D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); y The Antibodies (M. Zanetti y J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995).

Pureza mediante HPLC con SE (exclusión por tamaño)

La SE-HPLC se usa para monitorizar la heterogeneidad de tamaño en condiciones naturales empleando una columna de HPLC SE para separar agregados, monómeros y fragmentos de anticuerpos. El eluido se monitoriza mediante absorbancia UV. La pureza se determina como porcentaje (área) del pico principal, suma de formas de HMWS y suma de formas de LMWS con respecto al total de todos los picos de proteína detectados.

Pureza mediante HPLC con IE (intercambio iónico)

La cromatografía de intercambio iónico con gradiente se usa para monitorizar cuantitativamente la heterogeneidad de carga de las muestras tratadas con carboxipeptidasa B empleando una columna de intercambio catiónico para separar la muestra en pico principal, región ácida y región básica. La detección se realiza mediante absorbancia UV. La pureza se determina como porcentaje (área) del pico principal, región ácida y región básica con respecto al total de todos los picos de proteína detectados.

Pureza mediante CE-SDS (Caliper)

Los procedimientos de SDS-PAGE convencionales para la separación de proteínas por electroforesis se han transferido a un formato de chip en los sistemas de ensayo Caliper GXII/LabChip GX (Caliper LifeScience, Inc./Perkin Elmer). Las proteínas se separan por su respectivo tamaño. Las muestras se preparan antes de la separación marcándolas con tintes fluorescentes que se puedan detectar y analizar de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se analizaron la pureza y la integridad de los anticuerpos después de cada etapa de purificación por CE-SDS usando la tecnología de Labchip microfluídica (Caliper Life Science, EE. UU.). Por lo tanto, la solución de analito se preparó y analizó en el sistema LabChip GXII usando un chip HT Protein Express. Los datos se analizaron usando el programa informático LabChip GX.

Contenido de proteína mediante UV

La concentración de proteína de la muestra se determina mediante UV. La absorción de proteína se corrige restando la absorción a 320 nm de la absorción a 280 nm. Este valor de absorbancia es directamente proporcional a la concentración de proteína. La concentración de proteína se calcula usando el coeficiente de extinción de 1,5 ml mg⁻¹ cm⁻¹.

Procedimientos de detección de proteínas de la célula huésped (HCP) y contenido de ADN

a) Ensayo con HCP CHO

El contenido de HCP CHO residual en muestras de procedimiento se determina por un inmunoanálisis de electroquimioluminiscencia (ECLIA) en el analizador de inmunoanálisis cobas e 411 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania).

El ensayo se basa en un principio de tipo sándwich que usa anticuerpo anti-HCP CHO policlonal de oveja.

Primera incubación: la proteína de célula huésped de ovario de hámster chino (HCP CHO) de una muestra de 15 µl (sin diluir y/o diluida) y un anticuerpo específico frente a HCP CHO policlonal conjugado con biotina forman un complejo de tipo sándwich, que se une a micropartículas recubiertas con estreptavidina por medio de interacción de biotina con estreptavidina.

Segunda incubación: después de la adición de anticuerpo específico frente a HCP CHO policlonal marcado con complejo de rubenio (complejo Tris(2,2'-bipiridil)rutenio(II)), se forma un complejo de tipo sándwich ternario en las micropartículas.

La mezcla de reacción se aspira en la cubeta de medición donde se capturan las micropartículas de forma magnética sobre la superficie del electrodo. A continuación, se retiran las sustancias no unidas en una etapa de lavado. La aplicación de un voltaje al electrodo, a continuación, induce una emisión quimioluminiscente que se mide por un fotomultiplicador.

La concentración de HCP CHO en la muestra de prueba se calcula finalmente a partir de una curva estándar de HCP CHO de concentración conocida.

b) Contenido de ADN

Se usa un ensayo basado en qPCR para la detección y cuantificación de ADN de CHO. El ADN de las muestras se extrae con un kit de extracción de ARN comercial usando una membrana a base de gel de sílice. El ADN extraído se somete a una PCR cuantitativa en tiempo real usando cebadores y sonda de PCR con un sistema de detección de secuencias. Se cuantifican los amplicones (producto amplificado) en proporción directa al incremento de la emisión de fluorescencia medida de forma continua durante la amplificación del ADN. Se usa una curva estándar para cuantificar la cantidad de ADN de células CHO en la muestra.

Ejemplo 6: Purificación de un anticuerpo biespecífico que se une a Ang2 y VEGF-A (anticuerpo anti-Ang2/anti-VEGF-A como se describe en el documento WO 2011/117329)

El fluido de cultivo celular recogido (HCCF) de un cultivo de expresión de CHO se procesó mediante cromatografía de afinidad con MabSelect SuRe en modo de unión-elución. Después de cargar el HCCF en la columna a una densidad de carga máxima de 38 g_{mAb}/l_{resina}, se lavó la columna con 5 volúmenes de columna de Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,2. A continuación, se realizó un lavado adicional con cinco volúmenes de columna de Tris/HCl 0,7 M, pH 7,2. La tercera etapa de lavado se llevó a cabo usando agua altamente purificada o Tris/HCl 10 mM, pH 7,5. El anticuerpo unido a la columna se eluyó usando acetato 50 mM, pH 3,4. El agrupamiento de elución se recogió en base a una DO₂₈₀ de 500 a 250 mAU (longitud del recorrido 1 cm), en un máximo de tres volúmenes de columna.

El agrupamiento de elución por afinidad se ajustó a pH 3,5 con ácido acético y se mantuvo durante 30 min. A continuación, se acondicionó el agrupamiento con Tris Base 1,5 M a pH 5,0 y se eliminó mediante filtración profunda. El agrupamiento de filtración profunda se acondicionó a pH 7 usando Tris Base 1,5 M y sirvió como carga de alimentación para la segunda etapa de cromatografía usando la resina de intercambio aniónico multimodal Capto adhere ImpRes.

Se equilibró la columna Capto adhere ImpRes con Tris acetato 50 mM, pH 7,0. Se cargó la columna equilibrada a una densidad de carga de 180 g_{mAb}/l_{resina} y se lavó con Tris acetato 20 mM, pH 7,0. El agrupamiento de elución se recogió en base a una DO₂₈₀ de 1000 a 4000 mAU (longitud del recorrido 1 cm).

El agrupamiento de la segunda etapa de cromatografía se acondicionó a pH 5,0 con ácido acético y sirvió como carga de alimentación para la tercera etapa de cromatografía final usando la resina de intercambio catiónico multimodal Capto MMC ImpRes. La tercera etapa de cromatografía se desarrolló en modo de unión y elución. Se equilibró la columna Capto MMC ImpRes con Tris/acetato 30 mM, pH 5,0 (tampón de equilibrado). Se cargó la columna equilibrada a una densidad de carga de 45 g_{mAb}/l_{resina} y se lavó con cinco volúmenes de columna de tampón de equilibrado. El segundo lavado se realizó usando diez volúmenes de columna de Tris/acetato 30 mM, pH 6,8, seguido de cinco volúmenes de columna de tampón de equilibrado. La etapa de lavado final se realizó usando diez volúmenes de columna de Tris/acetato 30 mM, pH 4,9, sulfato de sodio 500 mM. El anticuerpo unido a la columna se eluyó usando Tris/acetato 30 mM, pH 6,0, sulfato de sodio 500 mM. El agrupamiento de elución se recogió en base a una DO₂₈₀ de 3600 a 1000 mAU (longitud del recorrido 1 cm).

El agrupamiento de la tercera etapa de cromatografía se concentró y se intercambió el tampón por el tampón de formulación. El esquema de purificación descrito anteriormente se representa en la FIG. 5A.

Tabla 16: Datos analíticos de impurezas específicas del producto y del procedimiento después de las respectivas etapas de cromatografía

	Caliper no reducido
--	---------------------

Ang2/VEGF	³ / ₄ de anticuerpo [%]	Prepicos [%]	Pico principal [%]
Agrupamiento de elución de MabSelect SuRe	1,8	8,4	91,6
Agrupamiento de elución de Capto adhere ImpRes	1,1	5,9	94,1
Agrupamiento de elución de Capto MMC ImpRes (C3)	0,4	2	98
SE-HPLC			
Ang2/VEGF	HMW [%]	Pico principal [%]	LMW [%]
Agrupamiento de elución de MabSelect SuRe	5,5	94,2	0,32
Agrupamiento de elución de Capto adhere ImpRes	0,9	98,9	0,25
Agrupamiento de elución de Capto MMC ImpRes (C3)	0,7	99,2	0,02
IE-HPLC			
Ang2/VEGF	Ácido [%]	Pico principal [%]	Básico [%]
Agrupamiento de elución de MabSelect SuRe	29,8	29,8	29,8
Agrupamiento de elución de Capto adhere ImpRes	24,4	24,4	24,4
Capto MMC ImpRes (C3)	26,4	26,4	26,4
Agrupamiento de elución			
		HCP	ADN
Ang2/VEGF	HCP [ng/mg]		ADN [pg/mg]
Agrupamiento de elución de MabSelect SuRe	159		17
Agrupamiento de elución de Capto adhere ImpRes	11		1
Agrupamiento de elución de Capto MMC ImpRes (C3)	2		n.d.

Tabla 17: Comparación con el procedimiento que usa 4 columnas de cromatografía que comprenden cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de intercambio aniónico (procedimiento de 4 columnas (4C))

5

	Procedimiento de 3C de Ang2/VEGF (véase la FIG. 5A)	Procedimiento de 4C de Ang2/VEGF (véase la FIG. 5B)
Rendimiento global [%]	~50	~48
Área en SE-HPLC [%]		

Pico principal	99,3	98,7
Suma de formas HMW	0,7	1,1
HCP [ng/mg]	2	3
ADN [pg/mg]	<0,1	<0,1
Pico principal [%] (Caliper)	98	96
Área en IE-HPLC [%]		
Pico principal	57	57
Pico ácido	26	30
Pico básico	17	12

Se puede observar que, al usar un procedimiento de tres columnas que comprende MabSelect SuRe, Capto adhere y Capto MMC ImpRes HHL, se pueden reducir las impurezas relacionadas con el producto, tales como 3/4 de anticuerpos, prepicos, HMWS, LMWS e impurezas relacionadas con el procedimiento, tales como HCP y ADN, en comparación con el uso de un procedimiento de cuatro columnas que comprende cromatografía de captura, cromatografía de intercambio catiónico tradicional, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de intercambio aniónico tradicional.

Ejemplo 7: Purificación de un anticuerpo biespecífico frente a VEGF-A y Ang2 (anticuerpo anti-VEGF-A/anti-Ang2 como se describe en el documento WO 2014/009465)

El fluido de cultivo celular recogido (HCCF) de un cultivo de expresión de CHO se procesó mediante cromatografía de afinidad con Capture Select FcXL en modo de unión-elución. Después de cargar el HCCF en la columna a una densidad de carga máxima de 25 g_{mAb}/l_{resina}, se lavó la columna con 2 volúmenes de columna de Tris/HCl 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,2. A continuación, se realizó un lavado adicional con cinco volúmenes de columna de agua purificada PWII. El anticuerpo unido a la columna se eluyó usando ácido acético 30 mM, pH 3,2. El agrupamiento de elución se recogió en base a una DO₂₈₀ de 2500 a 1000 mAU (longitud del recorrido 1 cm).

El agrupamiento de elución por afinidad se ajustó a pH 3,4 con ácido acético y se mantuvo durante 60 min. A continuación, se acondicionó el agrupamiento con Tris Base 1,5 M a pH 5,0 y se eliminó mediante filtración profunda. El agrupamiento de filtración profunda se acondicionó a pH 7 usando Tris Base 1,5 M y sirvió como carga de alimentación para la segunda etapa de cromatografía usando la resina de intercambio aniónico multimodal Capto adhere. Como la conductividad de la carga fue <5 mS/cm, no fue necesario ningún ajuste de conductividad.

Se equilibró la columna Capto adhere con acetato de Tris 50 mM, pH 7,0. Se cargó la columna equilibrada a una densidad de carga de 170 g_{mAb}/l_{resina} y se lavó con acetato de Tris 50 mM, pH 7,0 (= tampón de equilibrado). El agrupamiento de elución se recogió en base a una DO₂₈₀ de 1000 a 2500 mAU (longitud del recorrido 1 cm), en un lavado con un máximo de 3 VC.

El agrupamiento de la segunda etapa de cromatografía se acondicionó a pH 5,0 con ácido acético y sirvió como carga de alimentación para la tercera etapa de cromatografía final usando la resina de intercambio catiónico multimodal Capto MMC ImpRes. La tercera etapa de cromatografía se desarrolló en modo de unión y elución. Se equilibró la columna CaptoMMC ImpRes con Tris/acetato 30 mM, Tris/citrato 30 mM, pH 5,0. Se cargó la columna equilibrada a una densidad de carga de 30 g_{mAb}/l_{resina} y se lavó con cinco volúmenes de columna de tampón de equilibrado. El segundo lavado se realizó usando diez volúmenes de columna de Tris/acetato 30 mM, Tris/citrato 30 mM, NaCl 150 mM, pH 5,0, seguido de cinco volúmenes de columna de tampón de equilibrado. La etapa de lavado final se realizó usando diez volúmenes de columna de Tris/acetato 30 mM, Tris/citrato 30 mM, NaCl 500 mM, pH 4,5. El anticuerpo unido a la columna se eluyó usando un gradiente de pH/sal de un 0-50 % de B en 40 volúmenes de columna. El tampón A era el tampón de equilibrado de Tris/acetato 30 mM, Tris/citrato 30 mM, pH

5,0 y el tampón B era Tris/acetato 30 mM, Tris/citrato 30 mM, NaCl 1,5 M, pH 8,5. El agrupamiento de elución se recogió en base a una DO₂₈₀ de 250 a 4500 mAU (longitud del recorrido 1 cm).

Tabla 18: Datos analíticos de impurezas específicas del producto y del procedimiento después de las respectivas etapas de cromatografía

	Caliper no reducido		
VEGF/Ang2	³ / ₄ de anticuerpo [%]	Prepicos [%]	Pico principal [%]
Agrupamiento de elución de Capture Select FcXL	2,57	8,43	91,16
Agrupamiento de elución de Capto adhere	1,64	5,84	94,16
Agrupamiento de elución de Capto MMC ImpRes	1,23	2,37	97,63
	SE-HPLC		
VEGF/Ang2	HMW [%]	Pico principal [%]	LMW [%]
Agrupamiento de elución de Capture Select FcXL	10,1	89,5	0,5
Agrupamiento de elución de Capto adhere	2,1	97,3	0,55
Agrupamiento de elución de Capto MMC ImpRes	0,7	99,3	0,04
	IE-HPLC		
VEGF/Ang2	Ácido [%]	Pico principal [%]	Básico [%]
Agrupamiento de elución de Capture Select FcXL	29,7	57,2	13,1
Agrupamiento de elución de Capto adhere	26,2	62,7	11,1
Agrupamiento de elución de Capto MMC ImpRes	25,8	67,3	7
	HCP		ADN
VEGF/Ang2	HCP [ng/mg]		ADN [pg/mg]
Agrupamiento de elución de Capture Select FcXL	8615		210
Agrupamiento de elución de Capto adhere	484		1,4
Agrupamiento de elución de Capto MMC ImpRes	7		1,7

Tabla 19: Comparación con el procedimiento que usa 4 columnas de cromatografía que comprenden cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de intercambio aniónico (procedimiento de 4 columnas (4C))

	VEGF/Ang2 Procedimiento de 3C	VEGF/Ang2 Procedimiento de 4C
--	----------------------------------	-------------------------------------

Rendimiento global [%]	~40	~25-35
Área en SE-HPLC [%]		
Pico principal	99,3	98,8
Suma de formas HMW	0,7	
HCP [ng/mg]	7	1
ADN [pg/mg]	1,7	<0,1
Pico principal [%] (Caliper/CE-SDS)	97,6	94,6
Área en IE-HPLC [%]		
Pico principal	67,3	72,2
Pico ácido	25,8	23,1
Pico básico	7,0	4,7

Se puede observar que, al usar Capto Adhere y Capto MMC ImpRes, se pueden reducir HHL, las impurezas relacionadas con el producto, tales como 3/4 de anticuerpos, prepicos, HMWS, LMWS e impurezas relacionadas con el procedimiento, tales como HCP y ADN.

Ejemplo 8: Ensamblaje y purificación de un anticuerpo biespecífico anti-X1/anti-Y1

Se ensambla un anticuerpo biespecífico frente a las proteínas diana X1 e Y1 (anticuerpo biespecífico anti-X1/anti-Y1 o biespecífico aX1/Y1) como sigue. Cada semianticuerpo (aX1 (botón) y aY1 (ojal)) se somete independientemente a una etapa de cromatografía de afinidad usando resina de proteína A (MabSelect SuRe, GE Healthcare), como se describe en el ejemplo 1.

A continuación, se combinan los agrupamientos de semianticuerpos obtenidos de la etapa de cromatografía con proteína A en una proporción molar de 1:1 y se ensamblan como se describe en el ejemplo 1. El agrupamiento ensamblado con pH ajustado se somete a continuación a una cromatografía de intercambio aniónico multimodal usando resina Capto™ Adhere en modo de flujo continuo. La columna Capto™ Adhere se equilibra como se describe en el ejemplo 1. El agrupamiento de productos de la etapa de ensamblaje del biespecífico se ajusta a una conductividad de 9,0 mS/cm con agua purificada y se carga en la columna. El anticuerpo biespecífico fluye a través de la columna, que se lava a continuación con tampón de equilibrado. El agrupamiento de intercambio aniónico se inicia y finaliza en base a una absorbancia a 280 nm.

El agrupamiento de los productos de la cromatografía de intercambio aniónico multimodal se somete a continuación a una cromatografía de intercambio catiónico multimodal usando resina Capto™ MMC en modo de unión y elución. La columna se equilibra como se describe en el ejemplo 1. El agrupamiento de los productos de la cromatografía aniónica multimodal se carga y se lava como se describe en el ejemplo 1. El anticuerpo biespecífico se eluye de la columna incrementando tanto la sal como el pH en una elución escalonada, como se describe en el ejemplo 1. El agrupamiento de intercambio catiónico se inicia y finaliza en base a una absorbancia a 280 nm. El esquema de purificación descrito anteriormente se representa en la **FIG. 7A**.

El grado de separación del anticuerpo biespecífico de las impurezas relacionadas con el producto y el procedimiento logrado usando el esquema de purificación que se muestra en la **FIG. 7A** se compara con el logrado usando los esquemas de purificación mostrados en las **FIGS. 7B y 7C**.

Se repite el experimento descrito anteriormente y el material agrupado de la etapa de cromatografía de afinidad se

enriquece con un 20 % de homodímeros de ojal. El grado de separación del anticuerpo biespecífico de las impurezas relacionadas con el producto y el procedimiento logrado usando el esquema de purificación que se muestra en la **FIG. 7A** se compara una vez más con el logrado usando los esquemas de purificación mostrados en las **FIGS. 7B y 7C**.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para purificar un anticuerpo multiespecífico de una composición que comprende el anticuerpo multiespecífico y una impureza, en el que el anticuerpo multiespecífico comprende múltiples brazos, cada brazo comprendiendo una unidad de VH/VL, en el que cada brazo del anticuerpo multiespecífico se produce por separado, comprendiendo el procedimiento las etapas secuenciales de
 - a) someter cada brazo del anticuerpo multiespecífico a cromatografía de captura para producir eluidos de captura para cada brazo del anticuerpo multiespecífico,
 - b) formar una mezcla que comprende eluidos de captura de cada brazo del anticuerpo multiespecífico en condiciones suficientes para producir una composición que comprende el anticuerpo multiespecífico,
 - c) someter la composición que comprende el anticuerpo multiespecífico a una primera cromatografía de modo mixto para generar un primer eluido de modo mixto, y
 - d) someter el primer eluido de modo mixto a una segunda cromatografía de modo mixto para generar un segundo eluido de modo mixto, y
 - e) recoger una fracción que comprende el anticuerpo multiespecífico, en el que el procedimiento reduce la cantidad de una impureza específica del producto de la composición,en el que la impureza específica del producto es uno o más de brazos de anticuerpo no emparejados y homodímeros de anticuerpo,
- en el que a) la primera cromatografía de modo mixto es una cromatografía de intercambio catiónico de modo mixto y la segunda cromatografía de modo mixto es una cromatografía de intercambio aniónico de modo mixto; o
- en el que b) la primera cromatografía de modo mixto es una cromatografía de intercambio aniónico de modo mixto y la segunda cromatografía de modo mixto es una cromatografía de intercambio catiónico de modo mixto;
- en el que la cromatografía de intercambio aniónico de modo mixto comprende una amina cuaternaria y un resto hidrófobo y la cromatografía de intercambio catiónico de modo mixto comprende una N-bencil-n-metiletanolamina,
- en el que el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo biespecífico;
- y en el que el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo biespecífico de botón en ojal (KiH).
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la primera cromatografía de modo mixto se lleva a cabo en modo de unión y elución o en modo de flujo continuo.
3. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que la segunda cromatografía de modo mixto se lleva a cabo en modo de unión y elución o en modo de flujo continuo.
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la cromatografía de intercambio aniónico de modo mixto comprende una amina cuaternaria y un resto hidrófobo enlazado a agarosa altamente reticulada.
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la fracción contiene al menos un 95 % de anticuerpo multiespecífico.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que la fracción contiene no más de un 5 % de brazos de anticuerpo no emparejados o no más de un 5 % de homodímeros de anticuerpos.

FIG. 1

A.

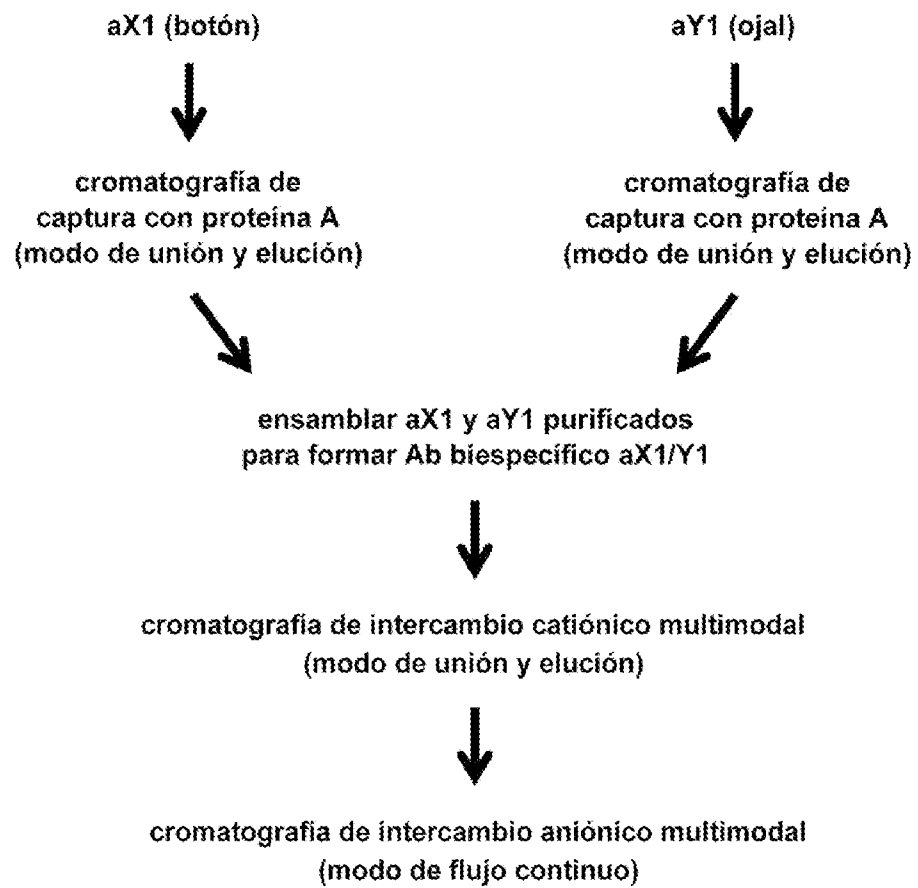


FIG. 1

B.

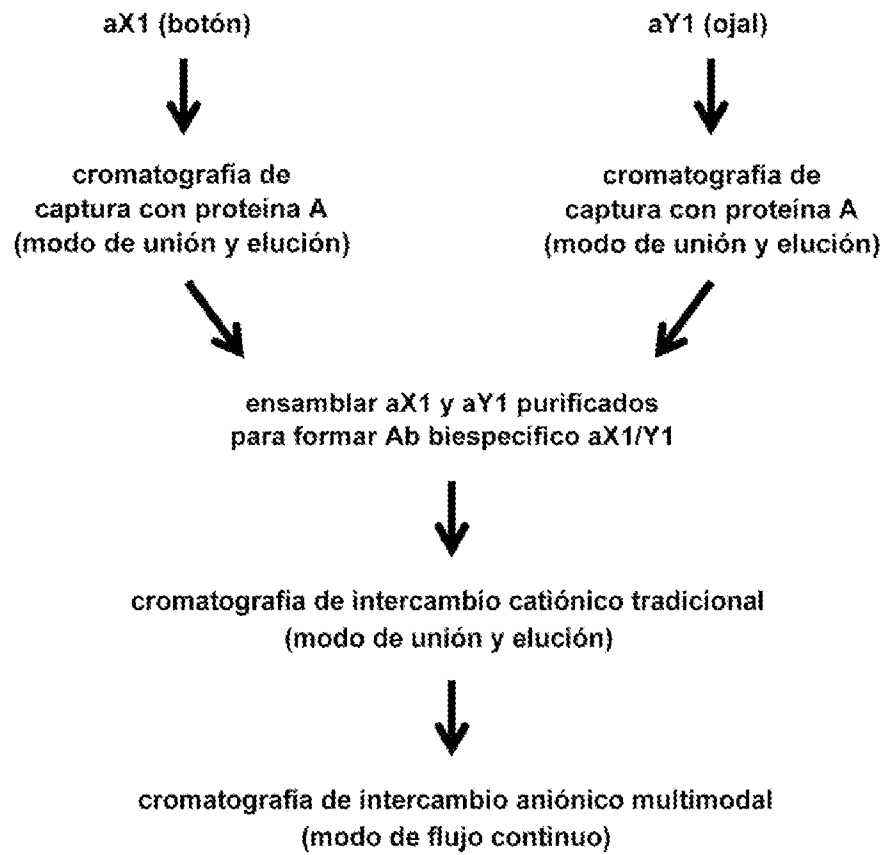


FIG. 1

C.

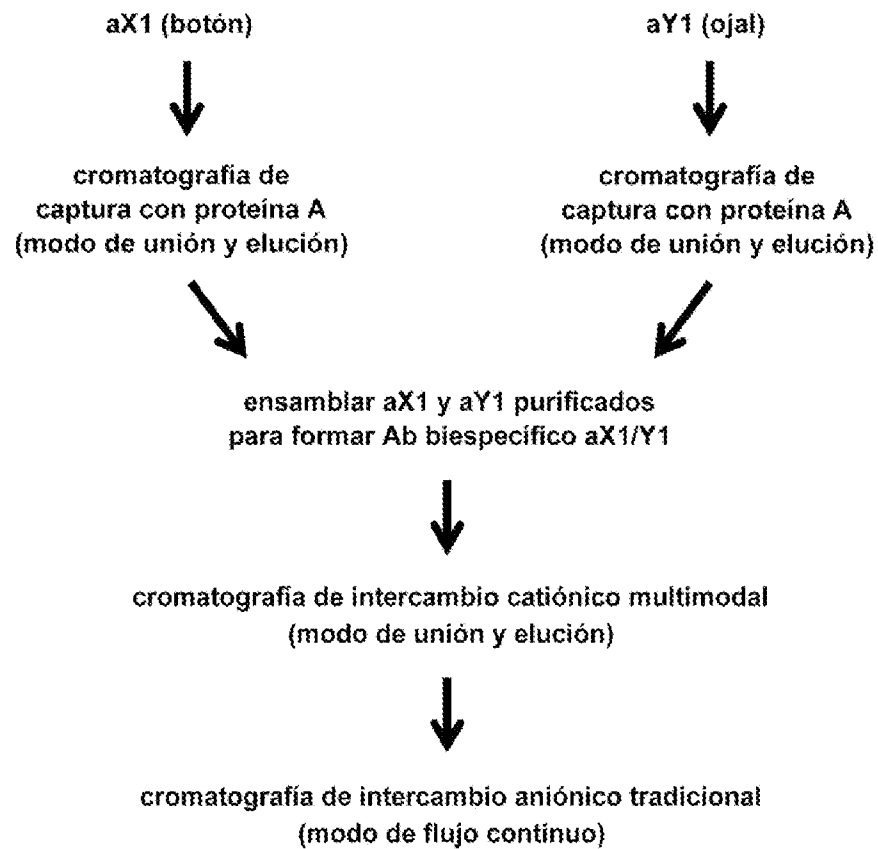


FIG. 2

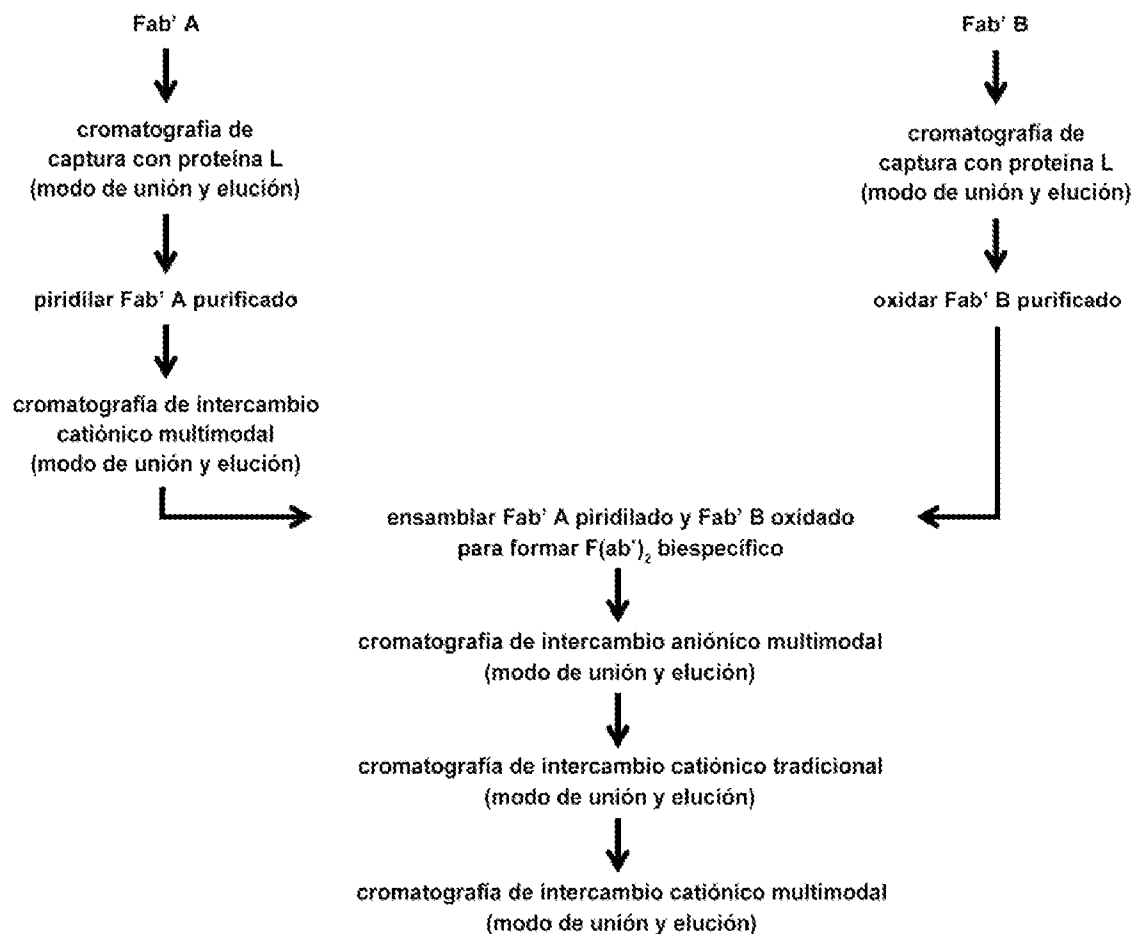


FIG. 3

A.

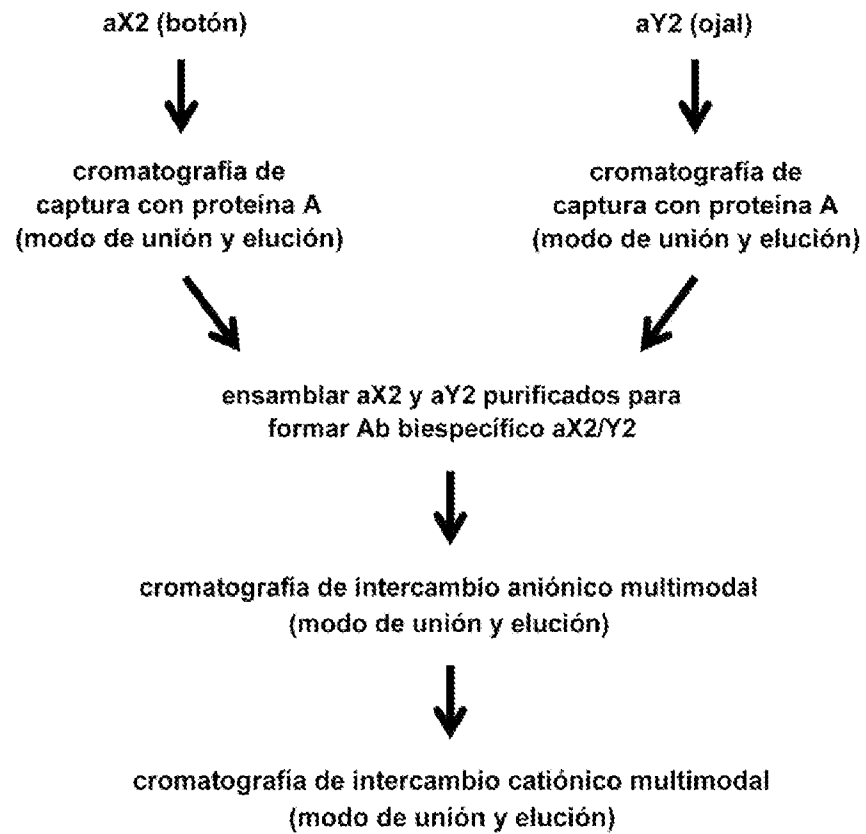


FIG. 3

B.

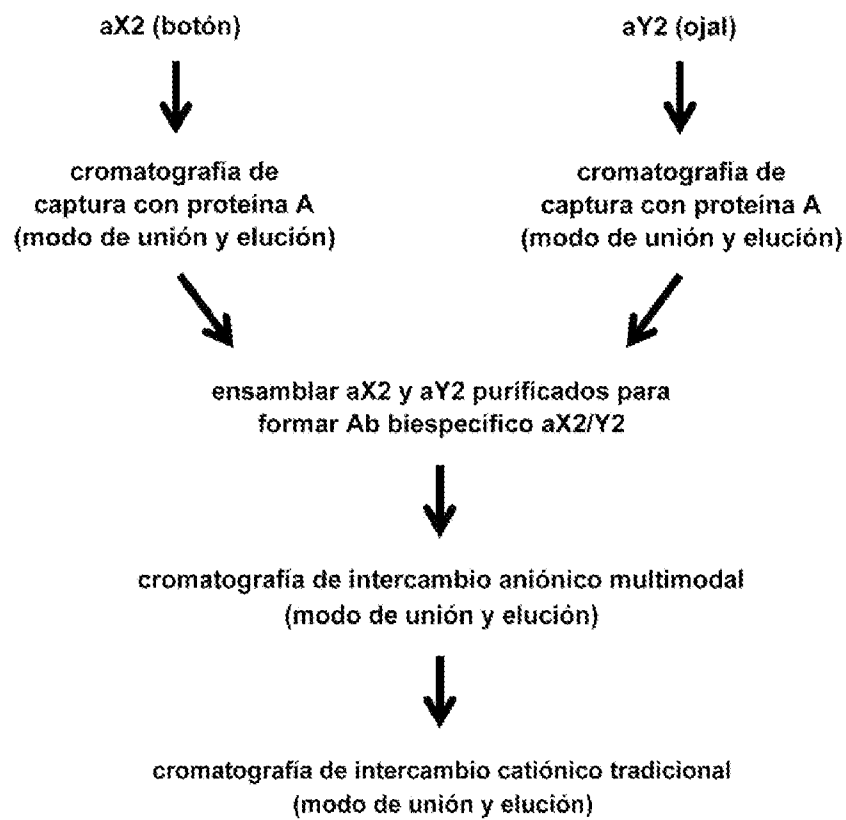


FIG. 4

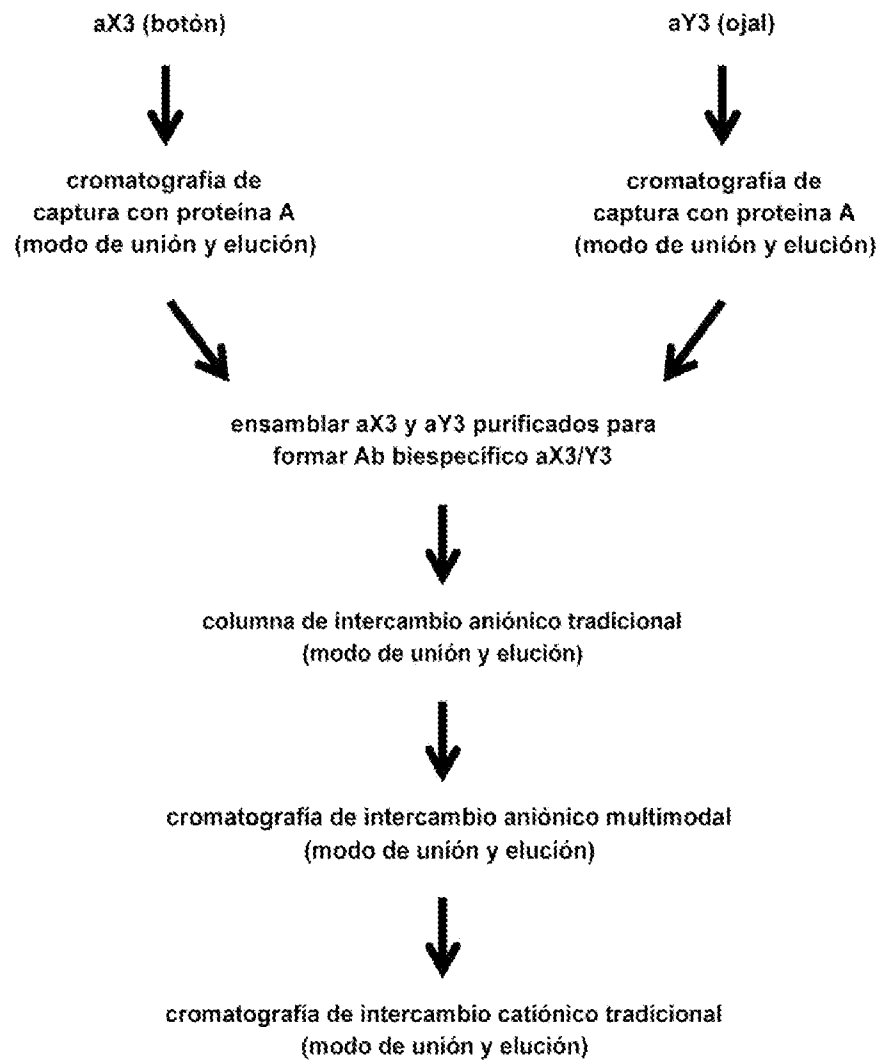


FIG. 5

A.

Fluido de cultivo celular recogido (HCCF)
de un cultivo de expresión de CHO que contiene
anticuerpo biespecífico anti-Ang2/anti-VEGF-A



cromatografía con proteína A
(unión y elución)



cromatografía de intercambio aniónico multimodal
(modo de unión y elución)



cromatografía de intercambio catiónico multimodal
(modo de unión y elución)

FIG. 5

B.

Fluido de cultivo celular recogido (HCCF)
de un cultivo de expresión de CHO que contiene
anticuerpo biespecífico anti-Ang2/anti-VEGF-A



cromatografía con proteína A
(unión y elución)



cromatografía de intercambio catiónico tradicional



cromatografía de interacción hidrófoba



cromatografía de intercambio aniónico tradicional

FIG. 6

A.

Fluido de cultivo celular recogido (HCCF)
de un cultivo de expresión de CHO que contiene
anticuerpo biespecifico anti-VEGF-A/anti-Ang2



cromatografía de afinidad anti-IgG
(unión y elución)



cromatografía de intercambio aniónico multimodal
(modo de unión y elución)



cromatografía de intercambio catiónico multimodal
(modo de unión y elución)

FIG. 6

B.

Fluido de cultivo celular recogido (HCCF)
de un cultivo de expresión de CHO que contiene
anticuerpo biespecífico anti-VEGF-A/anti-Ang2



cromatografía de afinidad anti-IgG
(unión y elución)



cromatografía de intercambio catiónico tradicional



cromatografía de interacción hidrófoba



cromatografía de intercambio aniónico tradicional

FIG. 7

A.

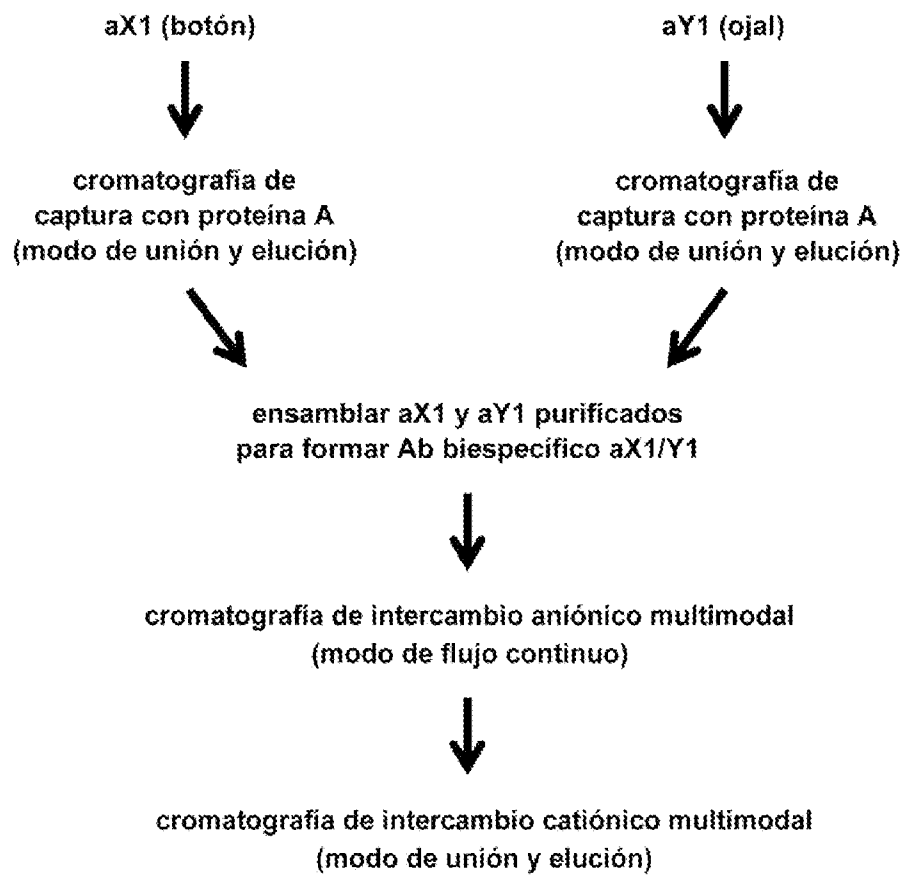


FIG. 7

B.

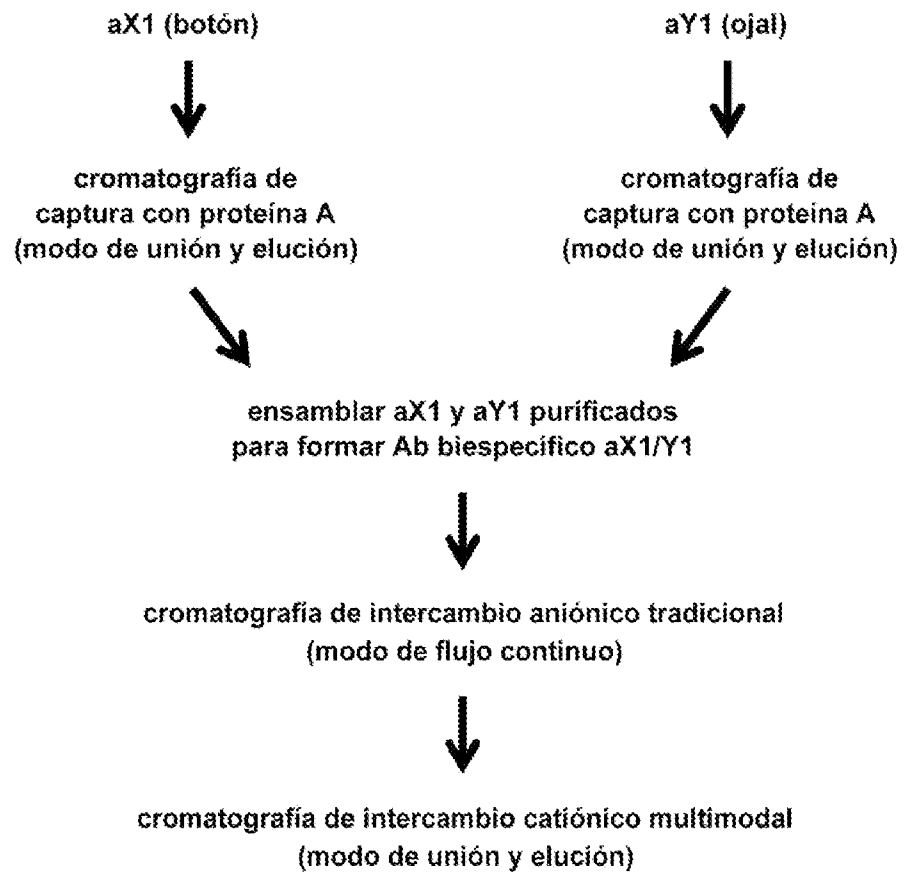


FIG. 7

C.

