

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 865 648**

51 Int. Cl.:

C07K 16/06 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2010** **E 15181155 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.04.2021** **EP 2975051**

54 Título: **Anticuerpos biespecíficos fácilmente aislados con formato de inmunoglobulina nativa**

30 Prioridad:

26.06.2009 US 220687 P

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

15.10.2021

73 Titular/es:

REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.
(100.0%)
777 Old Saw Mill River Road
Tarrytown, NY 10591, US

72 Inventor/es:

DAVIS, SAMUEL;
SMITH, ERIC;
MACDONALD, DOUGLAS y
OLSON, KARA LOUISE

74 Agente/Representante:

BERTRÁN VALLS, Silvia

Observaciones:

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

ES 2 865 648 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos biespecíficos fácilmente aislados con formato de inmunoglobulina nativa

5 **Campo de la invención**

La memoria descriptiva se refiere a anticuerpos o a proteínas de unión a antígeno que tienen heterodímeros de cadenas pesadas, es decir, dos cadenas pesadas de inmunoglobulina que difieren en al menos un aminoácido, lo que permite el aislamiento de la proteína de unión a antígeno basándose en una afinidad diferencial de una cadena pesada de inmunoglobulina y una cadena pesada de inmunoglobulina modificada o mutada hacia un reactivo de afinidad. La memoria descriptiva también se refiere a proteínas de unión a antígeno (incluyendo anticuerpos biespecíficos) que tienen regiones CH2 y CH3 de IgG con diferentes afinidades con respecto a la proteína A, lo que permite el rápido aislamiento mediante unión diferencial de las regiones de IgG a la proteína A.

15 **Antecedentes**

Los anticuerpos son moléculas multifuncionales, que portan una especificidad de unión única para un antígeno diana, así como la capacidad de interactuar con el sistema inmunitario a través de mecanismos que son independientes del antígeno. Muchos productos terapéuticos biológicos usados actualmente contra el cáncer son anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos que normalmente están sobreexpresados en la célula cancerosa seleccionada como diana. Cuando tales anticuerpos se unen a células tumorales, pueden desencadenar citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Desafortunadamente, las células cancerosas a menudo desarrollan mecanismos para suprimir estas respuestas inmunitarias normales.

En los últimos años, se han llevado a cabo esfuerzos para desarrollar productos terapéuticos similares a anticuerpos que tengan más de una especificidad de unión a antígeno, por ejemplo, anticuerpos biespecíficos. En el caso de terapias contra el cáncer, los formatos multiespecíficos podrían permitir la posibilidad de usar, por ejemplo, una especificidad para seleccionar como diana la molécula para un antígeno de células tumorales, la otra especificidad para desencadenar una respuesta que normalmente no está disponible para el sistema inmunitario. Los anticuerpos biespecíficos también pueden usarse como ligandos sustitutos para sistemas bicomponentes de receptores heterodiméricos que normalmente se activan por su ligando natural cuando se une a y se pone en contacto con ambos componentes.

Se han desarrollado numerosos formatos en la técnica para abordar oportunidades terapéuticas logradas por moléculas con múltiples especificidades de unión. Idealmente, tales moléculas deben ser proteínas que se comporten bien, que sean fáciles de producir y purificar y que posean propiedades *in vivo* favorables, por ejemplo, farmacocinética apropiada para un propósito previsto, inmunogenicidad mínima y, si fuese deseable, funciones efectoras de anticuerpos convencionales.

El modo más sencillo de producir un anticuerpo biespecífico (que expresa dos anticuerpos distintos en una sola célula) da lugar a múltiples especies, ya que las cadenas pesadas respectivas forman tanto homodímeros como heterodímeros, sin embargo sólo se desean los heterodímeros. Además, las cadenas ligera y pesada pueden emparejarse de manera inapropiada. A continuación se describen varios ejemplos de formatos que intentan abordar estos problemas de diferentes modos.

Un formato, usado para moléculas de captador biespecífico de células T (BiTE) (véase, por ejemplo, Wolf, E. *et al.* (2005) *Drug Discovery Today* 10:1237-1244)), se basa en módulos de fragmentos variables de cadena sencilla (scFv). Un scFv consiste en las regiones variables de cadena ligera y pesada de un anticuerpo fusionadas mediante un ligador flexible, que generalmente puede plegarse de manera apropiada y de modo que las regiones puedan unirse al antígeno relacionado. Un BiTE concatena dos scFv de especificidades diferentes en tándem en una única cadena (véase la figura 1A). Esta configuración impide la producción de moléculas con dos copias de la misma región variable de cadena pesada. Además, la configuración del ligador se diseña para garantizar un apareamiento correcto de las cadenas ligera y pesada respectivas.

El formato BiTE tiene varias desventajas. En primer lugar, las moléculas de scFv son notorias por su tendencia a agregarse. Y aunque la inmunogenicidad de los ligadores de scFv es supuestamente baja, no puede descartarse la posibilidad de generar anticuerpos contra un BiTE. La ausencia de una porción Fc en el formato BiTE también hace que su semivida en suero sea muy corta, y esto necesita la complicación de administraciones repetidas y frecuentes o la infusión continua mediante una bomba. Finalmente, la ausencia de un Fc también implica la ausencia de funciones efectoras medidas por Fc, lo que puede ser beneficioso en algunas circunstancias.

Un segundo formato (figura 1B) es un híbrido de un anticuerpo monoclonal de ratón y de rata, y se basa en una modificación de la cromatografía de afinidad con proteína A convencional (véase, por ejemplo, Lindhofer, H. *et al.* (1995) *J. Immunol.* 155:219-225)). En este formato, se producen juntos un anticuerpo IgG2a de ratón y un anticuerpo IgG2b de rata en la misma célula (por ejemplo, o bien como un quadroma, fusión de dos hibridomas, o bien en células

CHO modificadas por ingeniería). Dado que las cadenas ligeras de cada anticuerpo se asocian preferencialmente con las cadenas pesadas de sus especies relacionadas, sólo pueden formarse tres especies de anticuerpo distintas: los dos anticuerpos parentales y un heterodímero de los dos anticuerpos que comprende un par de cadenas pesada/ligera de cada uno, que se asocian mediante sus porciones Fc. El heterodímero deseado puede purificarse fácilmente a partir de esta mezcla debido a que sus propiedades de unión a la proteína A son diferentes de las de los anticuerpos parentales: el anticuerpo IgG2b de rata no se une a la proteína A, mientras que el anticuerpo IgG2a de ratón sí. En consecuencia, el heterodímero de ratón-rata se une a la proteína A pero eluye a un pH más alto que el homodímero IgG2a de ratón, y esto posibilita la purificación selectiva del heterodímero biespecífico. Al igual que el formato BiTE, este formato híbrido tiene dos sitios de unión a antígeno monovalente.

La desventaja del híbrido de ratón/rata es que, debido a que no es humano, probablemente provoque una respuesta inmunitaria en el paciente, lo que podría tener efectos secundarios perjudiciales (por ejemplo, reacciones con "HAMA" o "HARA"), y/o neutralice el producto terapéutico.

Un tercer formato, denominado "botones en agujeros" (*knobs-into-holes*) (figura 1C), se ha comentado en la técnica anterior como potencialmente útil para la producción de anticuerpos biespecíficos (patente estadounidense n.º 7.183.076). En esta estrategia, se modifican por ingeniería porciones Fc de dos anticuerpos para dar uno, un "botón" prominente y el otro un "agujero" complementario. Cuando se producen en la misma célula, se dice que las cadenas pesadas forman preferencialmente heterodímeros en lugar de homodímeros mediante la asociación de los "botones" modificados por ingeniería con los "agujeros" modificados por ingeniería. Los problemas de apareamiento correcto de las cadenas ligera-pesada se abordan eligiendo anticuerpos que tienen especificidades diferentes pero que emplean cadenas ligeras idénticas.

La desventaja de este formato es que la estrategia de "botones en agujeros" puede dar como resultado la producción de una cantidad significativa de homodímeros no deseables, por tanto, se necesitan etapas de purificación adicionales. Esta dificultad se agrava por el hecho de que las especies contaminantes son casi idénticas a las especies deseadas en muchas de sus propiedades. Las formas modificadas por ingeniería también pueden ser potencialmente inmunogénicas, ya que las mutaciones que producen los "botones" y los "agujeros" introducen secuencias extrañas.

Sigue existiendo la necesidad de un formato de anticuerpo biespecífico, en particular para aplicaciones terapéuticas, que minimice algunas o todas de las desventajas mencionadas anteriormente.

Lindhofer H *et al*, Journal of Immunology, American Association of Immunologists, EE.UU., vol. 155, n.º 1, 1 de julio de 1995, páginas 219-225, se refieren al apareamiento preferencial de las cadenas pesada/ligera restringido por las especies en cuadros de rata/ratón. Implicaciones para una purificación en una única etapa de anticuerpos biespecíficos.

El documento US 5 945 311 A se refiere a un método para producir anticuerpos biespecíficos heterólogos.

El documento US 2002/051780 A1 se refiere a anticuerpos biespecíficos y trispecíficos para la inducción de inmunidad antitumoral.

Jendeberg L *et al*, Journal of Immunological Methods, Elsevier Science Publishers B.V., Ámsterdam, NL, vol. 201, n.º 1, 14 de febrero de 1997, páginas 25-34, se refieren a la modificación por ingeniería de Fc1 y Fc3 de inmunoglobulina G humana para analizar la especificidad de subclases para la proteína A estafilocócica.

Deisenhofer J., Biochemistry, American Chemical Society, EE.UU., vol. 20, n.º 9, 28 de abril de 1981, páginas 2361-2370, se refieren al refinamiento cristalográfico y a modelos atómicos de un fragmento Fc humano y su complejo con un fragmento B de proteína A de *Staphylococcus aureus* a una resolución de 2,9 y 2,8 aa.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 ilustra tres formatos de anticuerpo biespecífico: (A) captador biespecífico de células T (BiTE); (B) híbrido de ratón-rata; y, (C) botones en agujeros con una cadena ligera común.

La figura 2 ilustra la modificación Fc Δ Adp: (A) alineación de regiones Fc de IgG1 (SEQ ID NO: 1) e IgG3 (SEQ ID NO: 3) humanas, que muestra la modificación Fc Δ Adp en un recuadro; (B) una representación esquemática de un anticuerpo biespecífico Fc Δ Adp.

La figura 3 ilustra una alineación de dominios CH3 humanos (empleando la numeración de exones IMGT y la numeración EU) de IgG1, IgG2 e IgG4, con y sin la modificación dipeptídica Δ Adp, así como de IgG3.

La figura 4 muestra un análisis en columna con proteína A para el aislamiento de anticuerpos biespecíficos, que muestra un perfil de elución que utilizan un gradiente por etapas.

La figura 5 muestra el perfil de unión BIAcore™ de IL4-Ra e IL-6Ra de las fracciones de columna eluidas de la

separación cromatográfica mostrada en la figura 4. Se capturaron anticuerpos en fracciones con anticuerpos anti-Fc inmovilizados y luego se sometieron a ensayo IL-4Ra o IL-6Ra solubles para determinar la unión a los anticuerpos capturados.

5 La figura 6 muestra un perfil farmacocinético de un anticuerpo biespecífico Fc Δ Adp (IL-6R Δ /IL-4R), un homodímero Fc Δ Adp (IL-6R Δ /IL-6R Δ), un anticuerpo IgG1 con secuencia de CH3 de tipo natural (IL-4R/IL-4R) y un anticuerpo monoespecífico de control.

10 La figura 7 ilustra la eficacia de un anticuerpo biespecífico CD20xCD3 Δ Adp en un ensayo de destrucción de células Raji.

La figura 8 ilustra un ensayo de destrucción de células (293) vecinas con el anticuerpo biespecífico CD20xCD3 Δ Adp.

15 La figura 9 muestra los resultados de experimentos de expresión usando diferentes heterodímeros mFc. Panel A: inmunotransferencia de tipo Western de la separación en función del pH de mIgG2a/mIgG2aPTTTK heterodimérico a partir de mIgG2a homodimérico e IgG2aPTTTK homodimérico; panel B: inmunotransferencia de tipo Western de la separación en función del pH de mIgG2a/mIgG2aTTTK heterodimérico a partir de mIgG2a homodimérico e IgG2aTTTK homodimérico; IP = entrada; FT = flujo continuo; W2 = segundo lavado (1x PBS pH 7,2); E1 = primera elución (citrato de Na 20 mM, NaCl 1 M pH 5,5); E2 = segunda elución (citrato de Na 20 mM, NaCl 1 M; 57% pH 5,5 + 43% pH 2,6); E3 = tercera elución (citrato de Na 20 mM, NaCl 1 M pH 2,6).

20 La figura 10 ilustra la formación preferencial de heterodímeros de IgG2a mutante con respecto a la formación de heterodímeros de isotipos mixtos (por ejemplo, mIgG2a y mIgG1), usando una razón de constructo IFNAR1:constructo IFNAR2 de 4:1. Carril 1: IFNAR1-IgG2a:IFNAR2-IgG1; Carril 2: IFNAR1-IgG2a:IFNAR2-IgG2aTTT; Carril 3: IFNAR1-IgG2a:IFNAR2-IgG2aTTTK; Carril 4: IFNAR1-IgG2a:IFNAR2-IgG2aPTTTK; Carril 5: IFNAR1-IgG2a:IFNAR2-IgG2aRF.

Sumario

30 La presente invención se define por las reivindicaciones.

La memoria descriptiva se basa, al menos en parte, en el empleo de dos secuencias de dominio constante de cadena pesada CH3 de inmunoglobulina que difieren en al menos un aminoácido en una proteína de unión a antígeno biespecífica. La diferencia en al menos un aminoácido da como resultado una capacidad mejorada para aislar la proteína, ya que la diferencia da como resultado una capacidad diferencial de las secuencias del dominio CH3 para unirse a un agente de afinidad.

40 En un aspecto, se proporciona una proteína de unión a antígeno que comprende un primer y un segundo polipéptido, comprendiendo el primer polipéptido, desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal, una primera región de unión a antígeno que se une selectivamente a un primer antígeno, seguido por una región constante que comprende una primera región CH3 de una IgG humana seleccionada de IgG1 (SEQ ID NO: 1), IgG2 (SEQ ID NO: 3), IgG4 (SEQ ID NO: 5) y una combinación de las mismas; y un segundo polipéptido que comprende, desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal, una segunda región de unión a antígeno que se une selectivamente a un segundo antígeno, seguido por una región constante que comprende una segunda región CH3 de una IgG humana seleccionada de IgG1, IgG2, IgG4 y una combinación de las mismas, en la que la segunda región CH3 comprende una modificación que reduce o elimina la unión del segundo dominio CH3 a la proteína A.

50 En una realización, la segunda región CH3 comprende una modificación 95R (mediante la numeración de exones IMGT; 435R mediante la numeración EU). En otra realización, la segunda región CH3 comprende además una modificación 96F (IMGT; 436F mediante EU). En realizaciones específicas, la segunda región CH3 se selecciona de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 6.

55 En una realización, la segunda región CH3 es de una IgG1 humana modificada (SEQ ID NO: 2), y comprende además una modificación seleccionada del grupo que consiste en D16E, L18M, N44S, K52N, V57M y V82I (IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M y V422I mediante EU).

60 En una realización, la segunda región CH3 es de una IgG2 humana modificada (SEQ ID NO: 4), y comprende además una modificación seleccionada del grupo que consiste en N44S, K52N y V82I (IMGT; N384S, K392N y V422I mediante EU).

En una realización, la segunda región CH3 es de una IgG4 humana modificada (SEQ ID NO: 6), y comprende además una modificación seleccionada del grupo que consiste en Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q y V82I (IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q y V422I mediante EU).

65 En una realización, el dominio CH3 es un dominio quimérico que comprende secuencias de dos o más de IgG1 humana, IgG2 humana, IgG3 humana e IgG4 humana.

En una realización, el dominio CH3 es de IgG1 humana, IgG2 humana o IgG4 humana, y la proteína de unión a antígeno comprende además un dominio CH1 y un dominio CH2, en el que el dominio CH1 y el dominio CH2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un dominio CH1 o CH2 de IgG1 humana, un dominio CH1 o CH2 de IgG2 humana, o un dominio quimérico de IgG1/IgG2 humana/humana o un dominio quimérico de IgG1/IgG3 humana/humana o un dominio quimérico de IgG2/IgG3 humana/humana o un dominio quimérico de IgG1/IgG4 humana/humana o un dominio quimérico de IgG3/IgG4 o un dominio quimérico de IgG2/IgG4. En una realización específica, los dominios quiméricos de IgG1/IgG2, IgG1/IgG3, IgG2/IgG3, IgG1/IgG4, IgG3/IgG4 y IgG2/IgG4 son no inmunogénicos o sustancialmente no inmunogénicos en un humano.

En una realización, la proteína de unión a antígeno comprende además una cadena ligera de inmunoglobulina. En una realización, la cadena ligera de inmunoglobulina se selecciona de una cadena ligera lambda humana y una cadena ligera kappa humana.

En una realización, una primera y una segunda región de unión a antígeno comprenden cada una al menos una CDR, en otra realización, al menos dos CDR, en otra realización, cada una comprende tres CDR. En una realización específica, las CDR son de una cadena pesada de inmunoglobulina. En otra realización específica, la cadena pesada es una cadena pesada humana.

En una realización, la primera región de unión a antígeno comprende un primer dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina y la segunda región de unión a antígeno comprende un segundo dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina.

En una realización, un primer y un segundo dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina se seleccionan independientemente de un dominio de ratón, rata, hámster, conejo, mono, simio y humano.

En una realización, un primer y un segundo dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina comprenden independientemente una CDR humana, una CDR de ratón, una CDR de rata, una CDR de conejo, una CDR de mono, una CDR de simio y una CDR humanizada. En una realización, la CDR es humana y está somáticamente mutada.

En una realización, un primer y un segundo dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina comprenden una región de entramado (FR) humana. En una realización, la FR humana es una FR humana somáticamente mutada.

En una realización, las regiones de unión a antígeno primera y/o segunda se obtienen mediante cribado de una biblioteca de fagos que comprende regiones variables de anticuerpo para determinar la reactividad hacia un antígeno de interés. En otra realización, las regiones de unión a antígeno primera y/o segunda se obtienen mediante inmunización de un animal no humano, tal como un ratón, una rata, un conejo, un mono o un simio, con un antígeno de interés e identificación de una secuencia de ácido nucleico de la región variable de anticuerpo que codifica para una región variable específica para el antígeno de interés. En una realización específica, el animal no humano comprende uno o más genes de la región variable de inmunoglobulina humana. En otra realización específica, el uno o más genes de la región variable de inmunoglobulina humana están presentes en el animal no humano de manera extracromosómica, como sustitución en un locus de inmunoglobulina endógena o como un transgén integrado al azar en el genoma del animal no humano. En una realización, las regiones de unión a antígeno primera y/o segunda se obtienen a partir de un hibridoma o un cuadroma; en otra realización, a partir del cribado de células inmunitarias de un animal no humano inmunizado usando clasificación celular.

En una realización, la proteína de unión a antígeno es un anticuerpo biespecífico. En una realización, el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo biespecífico completamente humano y tiene una afinidad por cada epítipo, independientemente, en el intervalo micromolar, nanomolar o picomolar.

En una realización, la proteína de unión a antígeno es no inmunogénica o sustancialmente no inmunogénica en un humano. En una realización específica, la proteína de unión a antígeno carece de un epítipo de células T humano no nativo. En una realización, la modificación de la región CH3 es no inmunogénica o sustancialmente no inmunogénica en un humano. En una realización específica, la modificación de la región CH3 no da como resultado un epítipo de células T humano no nativo.

En una realización, la proteína de unión a antígeno comprende una cadena pesada, en la que la cadena pesada es no inmunogénica o sustancialmente no inmunogénica en un humano. En una realización, la cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos que no contiene ningún epítipo de células T no nativo. En una realización, la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos cuya proteólisis no puede formar una secuencia de aminoácidos de aproximadamente 9 aminoácidos que sea inmunogénica en un humano. En una realización específica, el humano es un humano que está tratándose con la proteína de unión a antígeno. En una realización, la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos cuya proteólisis no puede formar una secuencia de aminoácidos de aproximadamente 13 a aproximadamente 17 aminoácidos que sea inmunogénica en un humano. En una realización específica, el humano es un humano que está tratándose con la proteína de unión a antígeno.

En un aspecto, se proporciona una proteína de unión biespecífica que comprende una modificación en CH2 y/o CH3 tal como se describe en el presente documento, en la que la proteína de unión biespecífica comprende un primer resto de unión que reconoce específicamente un antígeno en una célula B y un segundo resto de unión que reconoce específicamente un antígeno en una célula T.

En una realización, la proteína de unión es un anticuerpo biespecífico. En una realización específica, el anticuerpo biespecífico comprende una cadena pesada de IgG1 humana y una cadena pesada de IgG1 Δ Adp humana. En una realización, el primer resto de unión es un dominio variable de cadena pesada humano que reconoce específicamente CD20. En una realización, el segundo resto de unión es un dominio variable de cadena pesada humano que reconoce específicamente CD3. En una realización, el anticuerpo biespecífico muestra una CE₅₀ en un ensayo de destrucción de células Raji de aproximadamente 2,8-3,2 x 10⁻¹² M o de aproximadamente 2,8-3,0 x 10⁻¹² M, y muestra no más de aproximadamente el 1-10% o el 1-5% de destrucción por vecindad en un ensayo de destrucción de células vecinas, en el que la célula vecina no comprende ningún epítipo de CD20. En una realización específica, la célula vecina es una célula 293. En otra realización específica, la destrucción de células vecinas en el ensayo se mide a lo largo de una concentración de anticuerpo biespecífico de aproximadamente 10⁻⁸ M a aproximadamente 10⁻¹⁴ M.

En un aspecto, se proporciona un método para elaborar un anticuerpo biespecífico, que comprende: obtener una secuencia de ácido nucleico que codifica para una primera cadena pesada de inmunoglobulina que comprende un primer dominio variable que reconoce un primer epítipo, en el que la primera cadena pesada de inmunoglobulina comprende un dominio constante de isotipo IgG1, IgG2 o IgG4, o un dominio constante de isotipo quimérico de los mismos; obtener una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica para una segunda cadena pesada de inmunoglobulina que comprende un segundo dominio variable que reconoce un segundo epítipo, en el que la segunda cadena pesada de inmunoglobulina comprende un dominio constante de isotipo IgG1, IgG2 o IgG4, o un dominio constante de isotipo quimérico de los mismos, que comprende una modificación en su dominio CH3 que erradica o reduce la unión a la proteína A; obtener una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica para una cadena ligera de inmunoglobulina que se empareja con una primera y una segunda cadena pesada de inmunoglobulina; introducir las secuencias de ácido nucleico primera, segunda y tercera en una célula de mamífero; dejar que la célula exprese una inmunoglobulina, y aislar la inmunoglobulina usando proteína A.

En una realización, la célula se selecciona de CHO, COS, 293, HeLa y una célula retiniana que expresa una secuencia de ácido nucleico viral (por ejemplo, una célula PERC.6TM).

En un aspecto, se proporciona una proteína de unión a antígeno biespecífica que comprende una primera especificidad que se une a un antígeno y una segunda especificidad que activa un receptor, en la que la proteína de unión a antígeno biespecífica comprende un primer polipéptido que comprende un primer dominio CH3 de IgG1, IgG2 o IgG4 que comprende un determinante de unión a la proteína A, y un segundo polipéptido que comprende un segundo dominio CH3 de IgG1, IgG3 o IgG4 que carece del determinante de unión a la proteína A.

En una realización, la segunda especificidad que activa el receptor se une al receptor con una K_D que está en el intervalo molar, milimolar, micromolar, nanomolar o picomolar.

En una realización, la segunda especificidad se une a un receptor seleccionado de un receptor acoplado a proteína G, una tirosina cinasa receptora, una integrina y un receptor de tipo Toll.

En una realización, la segunda especificidad pone en contacto el receptor y provoca que el receptor, o una subunidad o una proteína asociada físicamente con el mismo, experimente la fosforilación de una serina, treonina o tirosina; provoca la ciclización de un nucleótido (por ejemplo, cAMP, cADP o cGMP); provoca la producción de un fosfatidilinositol o un derivado del mismo (por ejemplo, IP3 o PIP3); provoca la producción de un segundo mensajero lipídico (por ejemplo, diacilglicerol, ceramida, ácido lisofosfatídico, un eicosanoide); provoca la desfosforilación (por ejemplo, actividad fosfatasa); provoca la fosforilación de un lípido para formar un segundo mensajero; provoca la hidrólisis de un segundo mensajero; provoca la proteólisis; provoca la señalización redox; provoca la translocación de una proteína a un orgánulo celular (por ejemplo, al núcleo); provoca la agregación del receptor (consigo mismo) para formar homomultímeros o (con otros receptores) para formar heteromultímeros; o provoca la apertura o el cierre de un canal transmembrana.

En un aspecto, se proporciona un método para elaborar un anticuerpo biespecífico, que comprende: aislar un anticuerpo biespecífico de interés a partir de un cuádrima, en el que el anticuerpo biespecífico de interés comprende una primera cadena pesada que es un isotipo IgG1, IgG2 o IgG4, una segunda cadena pesada que es un isotipo IgG1, IgG2 o IgG4 que tiene un dominio constante que comprende una modificación en su dominio CH3 que erradica o reduce la unión a la proteína A, en el que el anticuerpo biespecífico de interés se aísla usando proteína A.

En un aspecto, se proporciona un método para elaborar un anticuerpo biespecífico, que comprende una etapa de aislar, a partir de una célula alterada o una mezcla de anticuerpos, un anticuerpo biespecífico que tiene dominios CH3 de IgG1, IgG2 o IgG4 diferencialmente modificados, en el que los dominios CH3 diferencialmente modificados no son inmunogénicos o son sustancialmente no inmunogénicos en un humano, y en el que la modificación da como resultado un anticuerpo biespecífico con una cadena pesada heterodimérica cuyos monómeros tienen una afinidad diferencial

por la proteína A, y el anticuerpo biespecífico se aísla a partir de la célula alterada o la mezcla usando proteína A.

En una realización, el anticuerpo biespecífico se aísla usando un soporte de afinidad de proteína A, en el que el anticuerpo biespecífico eluye a un pH de entre aproximadamente 3,9 y aproximadamente 4,4, entre aproximadamente 4,0 y aproximadamente 4,3, entre aproximadamente 4,1 y aproximadamente 4,2, o a aproximadamente pH 4,2. En una realización, el anticuerpo biespecífico eluye a un pH de aproximadamente 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4 ó 4,5.

En una realización, el anticuerpo biespecífico se aísla usando un soporte de afinidad de proteína A y un gradiente de una etapa de pH, en el que el gradiente o la etapa de pH incluye un modificador iónico. En una realización específica, el modificador iónico está presente a una concentración de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,0 molar. En una realización específica, el modificador iónico es una sal. En una realización, el modificador iónico se selecciona del grupo que consiste en las sales de acetato de berilio, litio, sodio y potasio; los bicarbonatos de sodio y potasio; los carbonatos de litio, sodio, potasio y cesio; los cloruros de litio, sodio, potasio, cesio y magnesio; los fluoruros de sodio y potasio; los nitratos de sodio, potasio y calcio; los fosfatos de sodio y potasio; y los sulfatos de calcio y magnesio. En una realización específica, el modificador iónico es una sal de haluro de un metal alcalino o metal alcalinotérreo. En una realización específica, el modificador iónico es cloruro de sodio.

En un aspecto, una proteína de unión que comprende un Fc, en la que el Fc comprende un primer dominio CH3 que está modificado tal como se describe en el presente documento y un segundo CH3 que no está modificado para formar un Fc heterodimérico, en la que la modificación diferencial da como resultado la proteína de unión que eluye a partir de un material de afinidad por la proteína A a 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,2, 1,3 ó 1,4 unidades de pH mayores que una proteína de unión correspondiente que carece de la modificación diferencial.

En una realización, la proteína de unión diferencialmente modificada eluye a un pH de aproximadamente 4,2, mientras que la proteína de unión no modificada eluye a un pH de aproximadamente 3. En una realización, la proteína de unión diferencialmente modificada eluye a un pH de aproximadamente 4,5, mientras que la proteína de unión no modificada eluye a un pH de aproximadamente 3,5. En una realización, la proteína de unión diferencialmente modificada eluye a un pH de aproximadamente 4, mientras que la proteína de unión no modificada eluye a un pH de aproximadamente 2,8-3,5, 2,8-3,2 ó 2,8-3. En una realización, la proteína de unión diferencialmente modificada eluye a un pH de aproximadamente 4,2, mientras que la proteína de unión no modificada eluye a un pH de aproximadamente 2,8. En una realización, la proteína de unión diferencialmente modificada eluye a un pH de aproximadamente 4,4, mientras que la proteína de unión no modificada eluye a un pH de aproximadamente 3,6. En estas realizaciones, "no modificada" se refiere a que carece de una modificación en 435 (numeración EU), o que carece de una modificación en 435 y 436 (numeración EU), en ambos de los dominios CH3.

Cualquiera de las realizaciones y los aspectos descritos en el presente documento pueden usarse entre sí, a menos que se indique lo contrario o resulte evidente a partir del contexto. Otras realizaciones resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de una revisión de la siguiente descripción.

Descripción detallada

Esta invención no se limita a métodos particulares ni a las condiciones experimentales descritas, ya que tales métodos y condiciones pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento es con el único propósito de describir realizaciones particulares y no se pretende que sea limitativa, puesto que el alcance de la presente invención se define por las reivindicaciones.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende habitualmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque pueden usarse cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o prueba de la presente invención, a continuación se describen métodos y materiales particulares.

El término "anticuerpo", tal como se usa en el presente documento, incluye moléculas de inmunoglobulina compuestas por cuatro cadenas de polipéptido, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas mediante enlaces disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera comprende un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), entremezcladas con regiones que son más conservadas, denominadas regiones de entramado (FR). Cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino-terminal hasta el extremo carboxilo-terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (las CDR de cadena pesada pueden abreviarse como HCDR1, HCDR2 y HCDR3; las CDR de cadena ligera pueden abreviarse como LCDR1, LCDR2 y LCDR3). El término anticuerpo de "alta afinidad" se refiere a los anticuerpos que tienen una afinidad de unión por su diana de al menos 10^{-9} M, al menos 10^{-10} M; al menos 10^{-11} M; o al menos 10^{-12} M, tal como se mide mediante resonancia de plasmón

superficial, por ejemplo, BIACORE™ o ELISA de afinidad en disolución.

La expresión “proteína de unión a antígeno” incluye una proteína que tiene al menos una CDR y que es capaz de reconocer selectivamente un antígeno, es decir, es capaz de unirse a un antígeno con una K_D que está al menos en el intervalo micromolar. Las proteínas de unión a antígeno terapéuticas (por ejemplo, anticuerpos terapéuticos) requieren con frecuencia una K_D que está en el intervalo nanomolar o picomolar. “Proteína de unión a antígeno” también incluye una proteína que comprende un primer y un segundo dominio CH3, tal como se describe en el presente documento, y un primer dominio de reconocimiento de proteína o ligando y un segundo dominio de reconocimiento de proteína o ligando, en la que el primer dominio de reconocimiento de proteína o ligando y el segundo dominio de reconocimiento de proteína o ligando reconocen cada uno independientemente la misma proteína o el mismo ligando, o juntos reconocen la misma proteína o el mismo ligando, o reconocen cada uno independientemente una proteína o un ligando diferentes. Un ejemplo de tal proteína es una inmuno adhesina, que comprende un (hetero u homo)dímero de proteína de fusión en el que los polipéptidos del dímero son polipéptidos de fusión que comprenden un componente de receptor o un componente de ligando, en la que el componente de ligando comprende una secuencia de aminoácidos que se une a un receptor.

La expresión “anticuerpo biespecífico” incluye un anticuerpo capaz de unirse selectivamente a dos o más epítomos. Los anticuerpos biespecíficos comprenden generalmente dos cadenas pesadas diferentes, uniéndose cada cadena pesada específicamente a un epítipo diferente, o bien en dos moléculas (por ejemplo, antígenos) diferentes o bien en la misma molécula (por ejemplo, en el mismo antígeno). Si un anticuerpo biespecífico es capaz de unirse selectivamente a dos epítomos diferentes (un primer epítipo y un segundo epítipo), la afinidad de la primera cadena pesada por el primer epítipo será generalmente de al menos uno a dos o tres o cuatro órdenes de magnitud inferior a la afinidad de la primera cadena pesada por el segundo epítipo, y viceversa. Los epítomos reconocidos por el anticuerpo biespecífico pueden estar o bien en la misma diana o bien en una diana diferente (por ejemplo, en la misma proteína o en una proteína diferente). Los anticuerpos biespecíficos puede elaborarse, por ejemplo, combinando cadenas pesadas que reconocen epítomos diferentes del mismo antígeno. Por ejemplo, pueden fusionarse secuencias de ácido nucleico que codifican para secuencias variables de cadena pesada que reconocen epítomos diferentes del mismo antígeno con secuencias de ácido nucleico que codifican para regiones constantes de cadena pesada diferentes, y tales secuencias pueden expresarse en una célula que expresa una cadena ligera de inmunoglobulina. Un anticuerpo biespecífico típico tiene dos cadenas pesadas, teniendo cada una tres CDR de cadenas pesada, seguido por (del extremo N-terminal al extremo C-terminal) un dominio CH1, una bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3, y una cadena ligera de inmunoglobulina que o bien no otorga especificidad de unión a antígeno pero que puede asociarse con cada cadena pesada, o bien que puede asociarse con cada cadena pesada y que puede unirse a uno o más de los epítomos unidos por las regiones de unión a antígeno de cadena pesada, o bien que puede asociarse con cada cadena pesada y permite la unión de una o ambas de las cadenas pesadas a uno o ambos epítomos.

El término “célula” incluye cualquier célula que sea adecuada para expresar una secuencia de ácido nucleico recombinante. Las células incluyen las de procariotas y eucariotas (unicelulares o multicelulares), células bacterianas (por ejemplo, cepas de *E. coli*, *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., etc.), células de micobacterias, células de hongo, células de levadura (por ejemplo, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *P. pastoris*, *P. metanolica*, etc.), células vegetales, células de insecto (por ejemplo, SF-9, SF-21, células de insecto infectadas por baculovirus, *Trichoplusia ni*, etc.), células de animal no humano, células humanas o fusiones de célula tales como, por ejemplo, hibridomas o cuadromas. En algunas realizaciones, la célula es una célula humana, de mono, de simio, de hámster, de rata o de ratón. En algunas realizaciones, la célula es eucariota y se selecciona de las siguientes células: CHO (por ejemplo, CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS (por ejemplo, COS-7), célula retiniana, Vero, CV1, de riñón (por ejemplo, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK), Hela, HepG2, WI38, MRC 5, Colo205, HB 8065, HL-60 (por ejemplo, BHK21), Jurkat, Daudi, A431 (epidérmica), CV-1, U937, 3T3, célula L, célula C127, SP2/0, NS-0, MMT 060562, célula de Sertoli, célula BRL 3A, célula HT1080, célula de mieloma, célula tumoral y una línea celular derivada de una célula mencionada anteriormente. En algunas realizaciones, la célula comprende uno o más genes virales, por ejemplo, una célula retiniana que expresa un gen viral (por ejemplo, una célula PER.C6™).

La expresión “región determinante de complementariedad” o el término “CDR” incluye una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico de genes de inmunoglobulina de un organismo que normalmente (es decir, en un animal de tipo natural) aparece entre dos regiones de entramado en una región variable de una cadena ligera o pesada de una molécula de inmunoglobulina (por ejemplo, un anticuerpo o un receptor de células T). Una CDR puede estar codificada por, por ejemplo, una secuencia de la línea germinal o una secuencia reordenada o no reordenada y, por ejemplo, por una célula T o una célula B indiferenciada o madura. En algunas circunstancias (por ejemplo, para un CDR3), las CDR pueden estar codificadas por dos o más secuencias (por ejemplo, secuencias de la línea germinal) que no son contiguas (por ejemplo, en una secuencia de ácido nucleico no reordenada) pero que son contiguas en una secuencia de ácido nucleico de células B, por ejemplo, como resultado del corte y empalme o la conexión de las secuencias (por ejemplo, recombinación V-D-J para formar una CDR3 de cadena pesada).

La expresión “cadena pesada” o “cadena pesada de inmunoglobulina” incluye una secuencia de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina de cualquier organismo y, a menos que se especifique lo contrario, incluye un dominio variable de cadena pesada. Los dominios variables de cadena pesada incluyen tres CDR de cadena pesada y cuatro regiones FR, a menos que se especifique lo contrario. Los fragmentos de cadenas pesadas incluyen CDR,

CDR y FR, y combinaciones de las mismas. Una cadena pesada tiene, tras el dominio variable (desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal), un dominio CH1, una bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. Un fragmento funcional de una cadena pesada incluye un fragmento que es capaz de reconocer específicamente un antígeno (por ejemplo, reconocer el antígeno con una K_D en el intervalo micromolar, nanomolar o picomolar), que es capaz de expresar y secretarse a partir de una célula y que comprende al menos una CDR.

La expresión “proteína que contiene Fc” incluye anticuerpos, anticuerpos biespecíficos, inmunoadhesinas y otras proteínas de unión que comprenden al menos una porción funcional de una región CH2 y CH3 de inmunoglobulina. Una “porción funcional” se refiere a una región CH2 y CH3 que puede unirse a un receptor de Fc (por ejemplo, un $Fc\gamma R$; o un $FcRn$, es decir, un receptor de Fc neonatal) y/o que puede participar en la activación del complemento. Si la región CH2 y CH3 contiene delecciones, sustituciones y/o inserciones u otras modificaciones que la hacen incapaz de unirse a ningún receptor de Fc y también incapaz de activar el complemento, la región CH2 y CH3 no es funcional.

Las proteínas que contienen Fc pueden comprender modificaciones en los dominios de inmunoglobulina, incluyendo donde las modificaciones afectan a una o más funciones efectoras de la proteína de unión (por ejemplo, modificaciones que afectan a la unión de $Fc\gamma R$, a la unión de $FcRn$ y, por tanto, a la semivida, y/o a la de actividad de CDC). Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a, las siguientes modificaciones y combinaciones de las mismas, con referencia a la numeración EU de una región constante de inmunoglobulina: 238, 239, 248, 249, 250, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 301, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 315, 318, 320, 322, 324, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 337, 338, 339, 340, 342, 344, 356, 358, 359, 360, 361, 362, 373, 375, 376, 378, 380, 382, 383, 384, 386, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 428, 430, 433, 434, 435, 437, 438 y 439.

Por ejemplo, y no a modo de limitación, la proteína de unión es una proteína que contiene Fc y muestra semivida sérica potenciada (en comparación con la misma proteína que contiene Fc sin la(s) modificación/modificaciones enumerada(s)) y tiene una modificación en la posición 250 (por ejemplo, E o Q); 250 y 428 (por ejemplo, L o F); 252 (por ejemplo, L/Y/F/W o T), 254 (por ejemplo, S o T) y 256 (por ejemplo, S/R/Q/E/D o T); o una modificación en 428 y/o 433 (por ejemplo, L/R/SI/P/Q o K) y/o 434 (por ejemplo, H/F o Y); o una modificación en 250 y/o 428; o una modificación en 307 o 308 (por ejemplo, 308F, V308F) y 434. En otro ejemplo, la modificación puede comprender una modificación 428L (por ejemplo, M428L) y 434S (por ejemplo, N434S); una modificación 428L, 259I (por ejemplo, V259I) y 308F (por ejemplo, V308F); una modificación 433K (por ejemplo, H433K) y 434 (por ejemplo, 434Y); una modificación 252, 254 y 256 (por ejemplo, 252Y, 254T y 256E); una modificación 250Q y 428L (por ejemplo, T250Q y M428L); una modificación 307 y/o 308 (por ejemplo, 308F o 308P).

La expresión “modificador iónico” incluye restos que reducen el efecto de, o alteran, las interacciones iónicas inespecíficas (es decir, sin afinidad) entre proteínas. Los “modificadores iónicos” incluyen, por ejemplo, sales, combinaciones iónicas de metales del grupo I y del grupo II con acetato, bicarbonato, carbonato, un halógeno (por ejemplo, cloruro o fluoruro), nitrato, fosfato o sulfato. Una lista ilustrativa no limitativa de “modificadores iónicos” incluye sales de acetato de berilio, litio, sodio y potasio; bicarbonatos de sodio y potasio; carbonatos de litio, sodio, potasio y cesio; cloruros de litio, sodio, potasio, cesio y magnesio; fluoruros de sodio y potasio; nitratos de sodio, potasio y calcio; fosfatos de sodio y potasio y sulfatos de calcio y magnesio. Los “modificadores iónicos” incluyen los restos que afectan a las interacciones iónicas que, tras la adición a un gradiente o una etapa de pH, o tras el equilibrio de un soporte de proteína A en un “modificador iónico” y la aplicación de una etapa de pH o un gradiente, da como resultado una ampliación de la distancia entre unidades de pH entre la elución de una IgG homodimérica y una IgG heterodimérica (por ejemplo, una IgG humana de tipo natural y la misma IgG pero que porta una o más modificaciones de su dominio CH3, tal como se describe en el presente documento). Una concentración adecuada de un “modificador iónico” puede determinarse por su concentración empleando la misma columna, gradiente o etapa de pH, con concentración creciente de “modificador iónico” hasta que se alcance la distancia de pH máxima a una etapa de pH o un gradiente de pH dados.

La expresión “cadena ligera” incluye una secuencia de región constante de cadena ligera de inmunoglobulina de cualquier organismo y, a menos que se especifique lo contrario, incluye cadenas ligeras kappa y lambda humanas. Los dominios variables de cadena ligera (VL) incluyen normalmente tres CDR de cadena ligera y cuatro regiones de entramado (FR), a menos que se especifique lo contrario. Generalmente, una cadena ligera de longitud completa incluye, desde el extremo amino-terminal hasta el extremo carboxilo-terminal, un dominio VL que incluye FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 y un dominio constante de cadena ligera. Las cadenas ligeras que pueden usarse con esta invención incluyen las que, por ejemplo, no se unen selectivamente ni al primer ni al segundo antígeno unido selectivamente por la proteína de unión a antígeno. Las cadenas ligeras adecuadas incluyen las que pueden identificarse mediante cribado para determinar las cadenas ligeras empleadas con mayor frecuencia en bibliotecas de anticuerpos existentes (bibliotecas en húmedo o *in silico*), en las que las cadenas ligeras no interfieren sustancialmente con la afinidad y/o selectividad de los dominios de unión a antígeno de las proteínas de unión a antígeno. Las cadenas ligeras adecuadas incluyen las que pueden unirse a uno o ambos epítomos que están unidos por las regiones de unión a antígeno de la proteína de unión a antígeno.

Se pretende que la expresión “intervalo micromolar” signifique 1-999 micromolar; se pretende que la expresión “intervalo nanomolar” signifique 1-999 nanomolar; se pretende que la expresión “intervalo picomolar” signifique 1-999

picomolar.

La expresión "somáticamente mutada" incluye la referencia a una secuencia de ácido nucleico de una célula B que ha experimentado cambio de clase, en la que la secuencia de ácido nucleico de una región variable de inmunoglobulina (por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada o incluyendo una secuencia de CDR o FR de cadena pesada) en la célula B con cambio de clase no es idéntica a la secuencia de ácido nucleico en la célula B antes del cambio de clase, tal como, por ejemplo, una diferencia en una secuencia de ácido nucleico de CDR o entramado entre una célula B que no ha experimentado cambio de clase y una célula B que ha experimentado cambio de clase. "Somáticamente mutada" incluye la referencia a secuencias de ácido nucleico de células B maduras por afinidad que no son idénticas a las secuencias correspondientes en células B que han madurado por afinidad (es decir, secuencias en el genoma de células de la línea germinal). La expresión "somáticamente mutada" también incluye la referencia a una secuencia de ácido nucleico de una célula B después de la exposición de la célula B a un antígeno de interés, en la que la secuencia de ácido nucleico difiere del ácido nucleico correspondiente antes de la exposición de la célula B al antígeno de interés. La expresión "somáticamente mutada" se refiere a secuencias de anticuerpos que se han generado en un animal, por ejemplo, un ratón que tiene secuencias de ácido nucleico de región variable de inmunoglobulina humana, en respuesta a una exposición al antígeno, y que resultan de los procesos de selección operativos de manera inherente en un animal de este tipo.

La expresión "dominio variable" incluye una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera o pesada de inmunoglobulina (modificada según se desee) que comprende las siguientes regiones de aminoácidos, en secuencia desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal (a menos que se indique lo contrario): FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Un "dominio variable" incluye una secuencia de aminoácidos capaz de plegarse para dar un dominio (VH o VL) canónico que tiene una estructura de lámina beta doble en la que las láminas beta están conectadas por un enlace disulfuro entre un residuo de una primera lámina beta y una segunda lámina beta.

Anticuerpos biespecíficos con regiones CH3 de IgG modificadas

Los inventores han desarrollado un nuevo formato que combina una estrategia de cadena ligera habitual con una implementación de un esquema de purificación selectiva con proteína A que puede usarse con componentes de anticuerpo humano.

Previamente (Lindhofer, H. *et al.* (1995) J. Immunol. 155:219-225)) se ha observado que, ya que la IgG3 humana no se une a la proteína A, potencialmente puede usarse junto con cualquiera de las otras tres subclases de IgG humana en una estrategia de purificación similar a la usada para híbridos de ratón-rata. Sin embargo, aunque las secuencias de las cuatro subclases de IgG humana son altamente homólogas, se desconoce la facilidad con la que las porciones Fc de IgG1, IgG2 y IgG4 forman heterodímeros con IgG3; incluso la formación simplemente preferencial de homodímeros tendría un impacto negativo sobre los rendimientos totales de los heterodímeros deseados en determinadas circunstancias (por ejemplo, aislamiento a partir de cuadromas). También pueden ser necesarias modificaciones adicionales para compensar la diferencia entre la región bisagra de IgG3 y las de las otras subclases. También sería preferible, en algunas circunstancias, no requerir la presencia del Fc de IgG3 completo, debido a su potencial impacto sobre las funciones efectoras.

Por tanto, los inventores han ideado un formato "mínimo" que aprovecha un determinante fortuitamente sencillo de la unión a la proteína A. Se ha notificado (Jendeborg, L. *et al.* (1997) J. Immunological Met. 201:25-34)) que la incapacidad de IgG3 para unirse a la proteína A está determinada por un único residuo de aminoácido, Arg435 (numeración EU; Arg95 mediante IMGT), cuya posición correspondiente en las otras subclases de IgG está ocupada por un residuo de histidina. Por tanto, es posible usar, en lugar de IgG3, una secuencia de IgG1 en la que His435 se muta para dar Arg. Por tanto, una única mutación puntual en IgG1 debe ser suficiente para crear las diferentes afinidades de unión susceptibles de un nuevo esquema de purificación. Esta modificación se denominará IgG1ΔA, para indicar su incapacidad para unirse a la proteína A (y, de manera similar, IgG2ΔA y IgG4ΔA, o más generalmente, FcΔA).

Sin embargo, la mutación puntual especificada introduce una nueva secuencia peptídica a lo largo de la mutación, que podría ser potencialmente inmunogénica. La mutación puntual podría cargarse, en teoría, en una molécula de CMH de clase II y presentarse a células T y, en consecuencia, provocar una respuesta inmunitaria. Para evitar este riesgo, puede usarse una mutación dipeptídica, H435R/Y436F (numeración EU; H95R/Y96F mediante IMGT). La secuencia resultante en la vecindad de la alteración es idéntica a la de IgG3 (véase la figura 2A) y, por tanto, se esperaría que fuese inmunológicamente "invisible", ya que no habría ningún péptido corto no nativo disponible para la presentación a células T. Se ha notificado que esta doble mutante aún no se une a la proteína A (Jendeborg, L. *et al.* (1997) J. Immunological Met. 201:25-34). Finalmente, la mutación dipeptídica no incluye ninguno de los residuos que forman la superficie de contacto del dímero de Fc, por lo que es improbable que interfiera con la formación de heterodímeros. Esta mutación dipeptídica se denomina "IgG1ΔAdp" (y, de manera similar, IgG2ΔAdp, IgG4ΔAdp y FcΔAdp). La ubicación de la modificación dipeptídica en IgG1, IgG2 e IgG4 se indica en la figura 3 en las secuencias de IgG1ΔAdp, IgG2ΔAdp e IgG4ΔAdp indicadas, mostradas con secuencias de dominio CH3 de IgG humana de tipo natural, así como hIgG3, mostrando la numeración de exones IMGT y la numeración EU.

La modificación Fc Δ Adp no incluye ninguno de los residuos que se cree que forman la superficie de contacto del dímero de Fc, de modo que es improbable que la modificación Fc Δ Adp interfiera con la formación de heterodímeros. Dado que Fc Δ Adp es tan mínima, probablemente también puede incorporarse en otras formas de Fc modificadas por ingeniería. IgG2 Δ Adp e IgG4 Δ Adp pueden ser ventajosas en situaciones en las que se desean funciones efectoras (o se carece de las mismas) asociadas con cada una de éstas últimas.

En resumen, el formato de anticuerpo biespecífico descrito anteriormente incluye dos anticuerpos de especificidad diferente que usan la misma cadena ligera, en el que la región Fc de uno de ellos está modificada para tener el formato Fc Δ Adp (véase la figura 2B). Su configuración es la de un anticuerpo humano natural y, por tanto, debe compartir sus propiedades favorables, incluyendo una baja propensión a la agregación, estabilidad *in vivo*, inmunogenicidad mínima, propiedades de biodistribución similares a las de los anticuerpos, buena farmacocinética y, opcionalmente, funciones efectoras. Se proporcionan métodos para aislar tales anticuerpos biespecíficos que son relativamente rápidos y sencillos de ejecutar.

Proteínas de unión biespecíficas con regiones CH de IgG de ratón modificadas

Los inventores han ideado un método para aislar fácilmente una proteína de unión que comprende una cadena pesada de inmunoglobulina (o fragmento funcional que contiene CH2 y CH3 de la misma) que es heterodimérico con respecto a uno o más aminoácidos en el dominio CH3. Una cuidadosa selección de las modificaciones de un dominio CH de IgG de ratón y aplicación de una tecnología de separación particular otorgan la capacidad para aislar fácilmente una proteína de unión que comprende dos regiones CH de ratón diferencialmente modificadas a partir de homodímeros y heterodímeros que no contienen las modificaciones.

La IgG1 de ratón, que contiene una prolina en 247, una treonina en 252, 254 y 256 y una lisina en 258, sólo se une débilmente a la proteína A. La IgG2a y la IgG2b de ratón, sin embargo, contienen diferentes residuos en esas posiciones (con la excepción de las posiciones 256 y 258 en IgG2b), y la IgG2a y la IgG2b de ratón se unen bien a la proteína A. La modificación diferencial de las regiones CH de dos IgG de ratón en un método para elaborar un anticuerpo que sea heterodimérico para las cadenas pesadas otorgaría una característica de unión a la proteína A diferencial con respecto a un anticuerpo de este tipo. De esta manera, un esquema de aislamiento con proteína A diferencial se diseña para permitir la fácil separación de un heterodímero modificado a partir de cualquier homodímero de IgG de ratón, ya sea un homodímero de IgG1 (que sólo se uniría muy débilmente, si acaso, a la proteína A), o un homodímero de IgG2a de ratón, un homodímero de IgG2b de ratón o un heterodímero de IgG2a/IgG2b. Por ejemplo, puede expresarse un anticuerpo biespecífico que tiene dos dominios variables de cadena pesada diferentes pero el mismo isotipo, por ejemplo, IgG2a, en un sistema de expresión adecuado que emplea las secuencias de cadena pesada, en el que sólo una de las regiones CH de IgG2a está modificada para reducir o eliminar un determinante de unión a la proteína A. De esta manera, sólo una de las regiones CH de IgG2a mostrará una afinidad sustancial por la proteína A, y cualquier anticuerpo formado a partir de un dímero de una IgG2a no modificada y una IgG2a modificada se aislará fácilmente a partir del heterodímero modificado.

En diversas realizaciones, un anticuerpo en el que una única región CH de un dímero de Fc comprende la región CH modificada, mientras que la otra región CH del dímero de Fc carece de ellas. La región CH de IgG de ratón está modificada para comprender aminoácidos particulares en posiciones particulares (numeración EU) seleccionadas del grupo que consiste en: 252T, 254T y 256T; 252T, 254T, 256T y 258K; 247P, 252T, 254T, 256T y 258K; 435R y 436F; 252T, 254T, 256T, 435R y 436F; 252T, 254T, 256T, 258K, 435R y 436F; 247P, 252T, 254T, 256T, 258K, 435R y 436F; y 435R. En una realización específica, se elabora un grupo particular de modificaciones, seleccionadas del grupo que consiste en: M252T, S254T, S256T; M252T, S254T, S256T, I258K; I247P, M252T, S254T, S256T, I258K; H435R, H436F; M252T, S254T, S256T, H435R, H436F; M252T, S254T, S256T, I258K, H435R, H436F; I247P, M252T, S254T, S256T, I258K, H435R, H436F; y H435R.

Las proteínas de unión basadas en IgG de ratón heterodiméricas pueden usarse para una variedad de aplicaciones. Por ejemplo, permiten un método para aislar anticuerpos biespecíficos con dominios constantes de ratón, en el que las modificaciones no interfieren o no interfieren sustancialmente con la unión del anticuerpo a uno o más receptores de Fc de ratón, de tal manera que el anticuerpo puede participar, por ejemplo, en ADCC o CDC y también unirse a dos o más epítomos en la misma diana o en una diana diferente.

En un aspecto, un método para aislar una proteína de unión que comprende una primera región CH de IgG de ratón y una segunda región CH de IgG de ratón, en el que la primera región CH de IgG está modificada (pero no la segunda región CH de IgG) para reducir o eliminar la afinidad de unión por la proteína A de la primera región CH de IgG de ratón pero no la segunda región CH de IgG de ratón, y en el que la proteína de unión comprende un primer resto de unión que se une a un primer epítipo y un segundo resto de unión que se une a un segundo epítipo.

En una realización, la modificación no altera o no altera sustancialmente la afinidad de unión de la proteína de unión por un receptor de Fc. En una realización, la proteína de unión comprende una modificación que aumenta o disminuye la afinidad de la proteína de unión por un receptor de Fc.

En una realización, la modificación no altera o no altera sustancialmente la semivida sérica de la proteína de unión en un ratón que comprende receptores Fc γ R nativos de ratón y/o un FcRn nativo de ratón, en comparación con una proteína de unión correspondiente que carece de la modificación.

5 En una realización, la modificación no altera o no altera sustancialmente la semivida sérica de la proteína de unión en un ratón que comprende una sustitución de receptores Fc γ R nativos de ratón de alta y baja afinidad y/o un receptor FcRn, en comparación con una proteína de unión correspondiente que carece de la modificación.

10 En una realización, el primer y el segundo epítipo son diferentes y están en células diferentes o en proteínas diferentes. En una realización, el primer y el segundo epítipo son diferentes y están en la misma célula o la misma proteína.

15 En una realización, el receptor de Fc se selecciona de un receptor de Fc de alta afinidad, un receptor de Fc de baja afinidad y un FcRn. En una realización específica, el receptor de Fc se selecciona de uno o más de un FcRn de ratón, un Fc γ R de ratón, un Fc γ RIIB de ratón, un Fc γ RIII de ratón, un Fc γ RIV de ratón y una combinación de los mismos. En una realización específica, el receptor de Fc se selecciona de uno o más de un FcRn humano, un Fc γ R humano, un Fc γ RIIB humano, un Fc γ RIIC humano, un Fc γ RIIIB humano, un Fc γ RIIIA humano, un Fc γ RIIA humano y una combinación de los mismos.

20 Inmunogenicidad

Una ventaja de muchas realizaciones de la invención es la capacidad de emplear la(s) modificación/modificaciones para elaborar un anticuerpo biespecífico que sea tanto fácilmente aislable basándose en la unión diferencial a la proteína A como también no inmunogénico o sustancialmente no inmunogénico en un humano. Esta característica hace que tales realizaciones sean particularmente útiles en la elaboración de anticuerpos biespecíficos para su uso terapéutico en humanos y en la elaboración de inmunoconjugados, por ejemplo, que no sean inmunogénicos o sean sustancialmente no inmunogénicos (empleando restos de unión humanos, es decir, componentes de receptores humanos y/o ligandos humanos). Esta característica está asociada con anticuerpos biespecíficos que tienen dominios CH3 con las modificaciones H95R/Y96F (numeración IMGT) de IgG1, IgG2 e IgG3, y esos dominios CH3 que contienen modificaciones adicionales que dan como resultado en la posición que está modificándose el reflejo de una secuencia de tipo natural de un isotipo de IgG diferente. Por tanto, aunque la modificación no se halla en la naturaleza asociada con el isotipo de IgG particular, la secuencia modificada es localmente idéntica a una secuencia de tipo natural de un isotipo de IgG diferente, y no se espera que la modificación sea inmunogénica o sustancialmente inmunogénica. También es posible que una modificación no sea inmunogénica ni siquiera si su secuencia no es localmente idéntica a ninguna secuencia nativa; tales modificaciones serían igualmente útiles. Por tanto, la mutación puntual mínima H95R (numeración IMGT), si no fuera inmunogénica, sería una realización adecuada de la invención.

Por tanto, se proporcionan anticuerpos biespecíficos que no son inmunogénicos o son sustancialmente no inmunogénicos en un humano, con respecto a sus dominios constantes de cadena pesada, sin embargo portan una o más modificaciones diferenciales del dominio constante de cadena pesada, incluyendo una modificación que da como resultado una afinidad diferencial de los dominios constantes de cadena pesada con respecto a un reactivo de afinidad (por ejemplo, proteína A). Las modificaciones comprenden las divulgadas en el presente documento. En una realización específica, el anticuerpo biespecífico que no es inmunogénico o es sustancialmente no inmunogénico en un humano con respecto a su dominio CH3, aun teniendo cadenas pesadas diferencialmente modificadas, es una IgG1, IgG2 o IgG4 humana que comprende un dominio CH3 que comprende una de las siguientes modificaciones (o, en otra realización, consiste esencialmente en una de las siguientes modificaciones): H95R, o H95R e Y96F (numeración IMGT).

50 Se espera que los anticuerpos biespecíficos no sean inmunogénicos, o sean sustancialmente no inmunogénicos, con respecto a humanos cuya tolerancia a las isoformas IgG1, IgG2 e IgG4 humanas se haya interrumpido en cualquier grado significativo.

En particular, se espera que la modificación Fc Δ Adp sea inmunológicamente "invisible" debido a que el surco de unión de moléculas de CMH de clase II acomoda a un nonámero que comprende el principal determinante reconocido por los bucles variables del receptor de células T, de modo que parecería improbable que los péptidos que carecen de cualquier subsecuencia nonamérica nativa provocaran una respuesta inmunitaria. Sin embargo, los péptidos más largos que los nonámeros (habitualmente de aproximadamente tridecámeros a heptadecámeros) se unen por el CMH de clase II, y es posible que los segmentos prominentes potencialmente puedan influir en la unión. Por tanto, las modificaciones adicionales (a lo largo de la modificación Fc Δ Adp) que eliminan secuencias no nativas más largas pueden reducir adicionalmente el potencial para la inmunogenicidad. Un ejemplo específico es la modificación V422I (EU; V82I mediante la numeración IMGT), que aumenta la longitud del péptido no nativo mínimo desde 14 hasta 39 residuos en IgG1 Δ Adp y hasta 43 residuos en el IgG2 Δ Adp definido de manera análoga. Otro ejemplo es la modificación L445P (EU; L105P mediante la numeración IMGT) en IgG4 Δ Adp, que aumenta la longitud desde 10 hasta 14 residuos.

Farmacocinética

El sitio de unión para la proteína A se superpone con el sitio de unión para el receptor de Fc neonatal, FcRn, que se cree que es el responsable de otorgar una semivida sérica prolongada a las inmunoglobulinas. Por tanto, modificaciones en la vecindad del sitio de unión de la proteína A aumentan la posibilidad de que el formato propuesto en el presente documento pueda tener una semivida sérica más corta que las de IgG1, IgG2 e IgG4, dado que la IgG3 humana tiene una semivida sérica más corta (aproximadamente 7 días) que las otras subclases de IgG (aproximadamente 21 días). Se ha demostrado que algunos mutantes de Fc que afectan a His435 no se unen a FcRn y tienen una semivida más corta en ratones. Sin embargo, el análisis farmacocinético ha demostrado que la semivida sérica del heterodímero IgG1ΔA/IgG1 no es diferente de manera apreciable de la del homodímero de IgG1 (véase el ejemplo 2). Por tanto, la mutación IgG1ΔAdp tiene la ventaja de que impide la unión de la proteína A a la vez que conserva la semivida más larga de IgG1.

Por consiguiente, en una realización, se proporciona una proteína de unión a antígeno biespecífica que comprende una modificación de un dominio CH3, tal como se describe en el presente documento, en la que la proteína de unión a antígeno muestra un perfil farmacocinético equivalente a la misma proteína de unión a antígeno biespecífica que carece de la modificación en el dominio CH3. En una realización, se proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende un Fc heterodimérico IgG1ΔA/IgG1, en el que el anticuerpo biespecífico tiene una semivida sérica que es aproximadamente 1,5 veces, aproximadamente 2 veces, aproximadamente 2,5 veces o aproximadamente 3 veces superior a la de un anticuerpo biespecífico que es por lo demás idéntico pero que comprende un dominio CH3 de IgG3, o que es por lo demás idéntico pero que comprende al menos una cadena de IgG3. En una realización, se proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende un Fc heterodimérico IgG1ΔA/IgG1, en el que el anticuerpo biespecífico muestra una semivida sérica que es aproximadamente la misma que la del anticuerpo biespecífico sin la modificación IgG1ΔA (es decir, un anticuerpo biespecífico homodimérico IgG1).

Cadenas pesadas de inmunoglobulina

Las regiones variables de cadena pesada de inmunoglobulina que pueden usarse para generar anticuerpos biespecíficos con características deseadas (por ejemplo, especificidades deseadas, afinidades deseadas, funcionalidades deseadas, por ejemplo, bloqueante, no bloqueante, inhibidora, activante, etc.) pueden generarse usando cualquier método conocido en la técnica. Por tanto, las cadenas pesadas deseadas pueden construirse clonando secuencias de ácido nucleico que contienen las regiones variables en constructos que tienen las regiones constantes de cadena pesada deseadas descritas en el presente documento.

En una realización, la primera cadena pesada comprende una región variable que está codificada por un ácido nucleico que deriva del genoma de una célula B madura de un primer animal que se ha inmunizado con un primer antígeno, y la primera cadena pesada reconoce específicamente el primer antígeno. En una realización específica, la segunda cadena pesada comprende una región variable que está codificada por un ácido nucleico que deriva del genoma de una célula B madura de un segundo animal que se ha inmunizado con un segundo antígeno, y la segunda cadena pesada reconoce específicamente el segundo antígeno.

En una realización, el primer animal y/o el segundo animal es un animal modificado por ingeniería genética que comprende una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana no reordenada. En una realización, el primer animal y/o el segundo animal es un animal modificado por ingeniería genética que comprende una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana no reordenada y una región constante de inmunoglobulina humana. En una realización, el primer animal y/o el segundo animal es un ratón modificado por ingeniería genética que comprende una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina humana no reordenada.

Las secuencias de la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina pueden obtenerse mediante cualquier otro método conocido en la técnica, por ejemplo, mediante visualización de fagos, y las secuencias obtenidas de ese modo pueden emplearse para elaborar constructos de ácido nucleico que van a unirse a ácidos nucleicos que codifican para cualquier cadena pesada adecuada, por ejemplo, cadenas pesadas con dominios CH3 modificados, tal como se describe en el presente documento, y ubicados en un constructo de expresión y transferidos a una célula que es capaz de formar la cadena pesada, por ejemplo, en presencia de una cadena ligera adecuada.

Cadenas ligeras de inmunoglobulina

Los anticuerpos biespecíficos que comprenden dos cadenas pesadas que reconocen dos epítomos diferentes (o dos antígenos diferentes) se aíslan más fácilmente cuando pueden emparejarse con la misma cadena ligera (es decir, cadenas ligeras que tienen dominios variables y constantes idénticos). En la técnica se conocen una variedad de métodos para generar cadenas ligeras que pueden emparejarse con dos cadenas pesadas de especificidad diferente, a la vez que no interfieren o no interfieren sustancialmente con la selectividad y/o afinidad del dominio variable de cadena pesada con su antígeno diana.

En un enfoque, una cadena ligera puede seleccionarse examinando parámetros estadísticos de uso para todos los dominios variables de cadena ligera, identificando la cadena ligera empleada con mayor frecuencia en anticuerpos humanos y emparejando esa cadena ligera con las dos cadenas pesadas de especificidad diferente.

5 En otro enfoque, una cadena ligera puede seleccionarse observando secuencias de cadena ligera en una biblioteca de visualización de fagos (por ejemplo, una biblioteca de visualización de fagos que comprende secuencias de regiones variables de cadena ligera humanas, por ejemplo, una biblioteca de scFv humanos) y seleccionando la región variable de cadena ligera usada más habitualmente de la biblioteca.

10 En otro enfoque, una cadena ligera puede seleccionarse sometiendo a ensayo una biblioteca de visualización de fagos de secuencias variables de cadena ligera usando las secuencias variables de cadena pesada de ambas cadenas pesadas como sondas. Una cadena ligera que se asocia con ambas secuencias variables de cadena pesada se selecciona como cadena ligera para las cadenas pesadas y permite la unión y/o activación con respecto a ambos epítomos.

15 En otro enfoque, una cadena ligera puede seleccionarse combinando cadenas ligeras conocidas con cadenas pesadas deseadas y sometiendo a ensayo el anticuerpo biespecífico resultante para determinar la especificidad de unión, la afinidad y/o la capacidad de activación.

20 En la medida en que se encuentre una dificultad en cualquiera de los enfoques para seleccionar una cadena ligera (por ejemplo, la cadena ligera interfiere con la unión de una o ambas de las cadenas pesadas con su antígeno, o la cadena ligera no logra asociarse de manera satisfactoria con una o ambas de las cadenas pesadas), la cadena ligera puede alinearse con las cadenas ligeras relacionadas con las cadenas pesadas, y se realizan modificaciones en la cadena ligera para hacer coincidir más estrechamente las características de secuencia comunes a las cadenas ligeras relacionadas de ambas cadenas pesadas. Si es necesario minimizar las posibilidades de inmunogenicidad, las modificaciones dan como resultado preferiblemente secuencias que están presente en secuencias de cadena ligera humana conocidas, de tal manera que es improbable que el procesamiento proteolítico genera un epítipo de células T basándose en parámetros y métodos conocidos en la técnica para evaluar la probabilidad de inmunogenicidad (es decir, ensayos *in silico* así como en húmedo).

30 Anticuerpos y proteínas de unión

Las composiciones y los métodos son particularmente útiles en la elaboración de anticuerpos biespecíficos humanos, es decir, anticuerpos biespecíficos que comprenden dominios constantes y variables humanos. En algunas realizaciones, los anticuerpos humanos incluyen los que tienen dominios variables de cadena pesada y constantes de cadena pesada derivados de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana, en algunas realizaciones, derivados de secuencias de inmunoglobulina humana somáticamente mutada (generadas, por ejemplo, en un animal que comprende secuencias génicas de inmunoglobulina humana). En algunas realizaciones, las regiones variable y/o constante humana pueden incluir residuos de aminoácido no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana o codificados como resultado de recombinación y/o corte y empalme, por ejemplo, en las CDR y, en particular, la CDR3. No se pretende que los anticuerpos humanos incluyan anticuerpos en los que las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se hayan injertado en secuencias de entramado humanas. Esos anticuerpos se denominan anticuerpos humanizados o quiméricos. Los anticuerpos humanos sí incluyen los que comprenden mutaciones, por ejemplo, introducidas *in vitro* mediante mutagénesis al azar o específica del sitio, pero las mutaciones son preferiblemente no inmunogénicas en un humano.

Los métodos y las composiciones pueden usarse para elaborar anticuerpos quiméricos, preferiblemente no inmunogénicos en un humano o de baja inmunogenicidad. Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos en los que una de una región variable de cadena pesada o una región de entramado o una CDR o un dominio o una región constante de cadena pesada son de especies diferentes (por ejemplo, humano y ratón, o humano y primate). En algunas realizaciones, los anticuerpos quiméricos incluyen anticuerpos que tienen una región variable de cadena pesada de origen no humano (por ejemplo, de ratón) y una región constante de cadena pesada de origen humano. En algunas realizaciones, los anticuerpos quiméricos incluyen anticuerpos que tienen una región variable de cadena pesada de origen humano y una región constante de cadena pesada de origen no humano (por ejemplo, de ratón). En diversas realizaciones, las regiones de origen murino son idénticas o sustancialmente idénticas a una secuencia de la línea germinal de inmunoglobulina de ratón con o sin hipermutaciones somáticas. Los anticuerpos quiméricos también incluyen anticuerpos que tienen una región constante de cadena ligera que es idéntica o sustancialmente idéntica a una secuencia de la línea germinal de inmunoglobulina humana y a una cadena pesada no humana (por ejemplo, de ratón) o a una cadena pesada humana/no humana quimérica. Los anticuerpos quiméricos incluyen anticuerpos que tienen un dominio constante de cadena ligera que es idéntico o sustancialmente idéntico a una secuencia de la línea germinal de inmunoglobulina no humana (por ejemplo, de ratón) y a una cadena pesada humana o no humana/humana quimérica.

En algunas realizaciones, las composiciones y los métodos son para elaborar un anticuerpo madurado por afinidad. En algunas realizaciones, un anticuerpo madurado por afinidad comprende una o más alteraciones en una o más CDR que dan como resultado una mayor afinidad (por ejemplo, K_D en el intervalo nanomolar o picomolar) del anticuerpo

por su antígeno diana en comparación con un anticuerpo sustancialmente idéntico que carece de la(s) alteración/alteraciones. Los anticuerpos madurados por afinidad pueden elaborarse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica, por ejemplo, mediante mutagénesis al azar o dirigida al sitio de las CDR y/o regiones de entramado seguido por cribado por afinidad, intercambio del dominio VH, etc.

En algunas realizaciones, los anticuerpos son anticuerpos neutralizantes. Los anticuerpos neutralizantes incluyen anticuerpos capaces de neutralizar, inhibir o impedir la actividad biológica de un antígeno. Los anticuerpos neutralizantes incluyen los que, tras la unión a un antígeno, impiden o reducen la capacidad del antígeno para actuar en una diana natural del antígeno *in vivo* e *in vitro*. Los ejemplos de anticuerpos neutralizantes incluyen un anticuerpo para un ligando proteico de un receptor biológico que impide la unión del ligando al receptor, o un anticuerpo para un receptor biológico que impide la unión del receptor a su ligando, en los que la unión al ligando en ausencia del anticuerpo provoca que el receptor efectúe un cambio en el interior de una célula. La determinación de si un anticuerpo es un anticuerpo neutralizante conlleva generalmente llevar a cabo un ensayo funcional en el que se mide el efecto del anticuerpo sobre la actividad biológica del antígeno.

Los métodos y las composiciones de la memoria descriptiva también son útiles en una variedad de aplicaciones para anticuerpos y otras proteínas de unión. A continuación se proporciona una breve descripción de algunas aplicaciones útiles.

Pueden elaborarse proteínas de unión biespecíficas, que comprenden especificidad de unión hacia un antígeno tumoral y un antígeno de células T, que seleccionan como diana un antígeno en una célula, por ejemplo, CD20, y también seleccionan como diana un antígeno en una célula T, por ejemplo, CD3. De esta manera, el anticuerpo biespecífico selecciona como diana tanto una célula de interés en un paciente (por ejemplo, célula B en un paciente con linfoma, a través de la unión de CD20) así como una célula T del paciente. El anticuerpo biespecífico, en diversas realizaciones, se diseña para activar la célula T tras la unión de CD3, acoplando de ese modo la activación de células T a una célula tumoral seleccionada específica.

También pueden elaborarse proteínas de unión biespecíficas que comprenden dos restos de unión que se dirigen cada uno a una pareja de unión (es decir, cada uno se dirige a una diana diferente) en la superficie de la misma célula. Este diseño es particularmente adecuado para seleccionar como diana células o tipos de células específicas que expresan ambas dianas en la superficie de la misma célula. Aunque las dianas pueden aparecer individualmente en otras células, los restos de unión de estas proteínas de unión se seleccionan de tal manera que cada resto de unión se une a su diana con una afinidad relativamente baja (por ejemplo, micromolar bajo o nanomolar alto, por ejemplo, una K_D superior a cien nanomolar, por ejemplo, 500, 600, 700, 800 nanomolar). De esta manera, la unión prolongada a la diana sólo se favorece en situaciones en las que las dos dianas están próximas en la misma célula.

Pueden elaborarse proteínas de unión biespecíficas que comprenden dos restos de unión que se unen a la misma diana, cada uno a un epítipo diferente de la misma diana. Este diseño es particularmente adecuado para maximizar la probabilidad de bloquear con éxito una diana con proteína de unión. Pueden seleccionarse como diana múltiples bucles extracelulares, por ejemplo, de un canal transmembrana o un receptor de superficie celular, por la misma molécula de unión biespecífica.

Pueden elaborarse proteínas de unión biespecíficas que comprenden dos restos de unión que agrupan y activan reguladores negativos de la señalización inmunitaria para dar como resultado la supresión inmunitaria. La represión en *cis* puede lograrse cuando las diana están en la misma célula; represión en *trans* puede lograrse cuando las dianas están en células diferentes. La represión en *cis*, por ejemplo, puede lograrse con una proteína de unión biespecífica que tiene un resto de unión anti-IgGRIIb y un resto de unión anti-Fc ϵ D1, de tal manera que el IgGRIIb se agrupa sólo en presencia de Fc ϵ D1, con el fin de regular por disminución una respuesta inmunitaria a Fc ϵ D1. La represión en *trans*, por ejemplo, puede lograrse con una proteína de unión biespecífica que tiene un resto de unión anti-BTLA y un resto de unión que se une específicamente a un antígeno específico de tejido de interés, de tal manera que la agrupación de la molécula de BTLA inhibidora sólo se produce en el tejido diana seleccionado, que potencialmente aborda enfermedades autoinmunitarias.

Pueden elaborarse proteínas de unión biespecíficas que activan receptores multicomponentes. En este diseño, se unen dos restos de unión dirigidos a dos componentes de un receptor, reticulan el receptor y activan la señalización a partir del receptor. Esto puede realizarse usando una proteína de unión biespecífica con un resto de unión que se une a IFNAR1 y un resto de unión que se une a IFNAR2, en la que la unión reticula el receptor. Una proteína de unión biespecífica de este tipo puede proporcionar una alternativa al tratamiento con interferón.

Pueden elaborarse proteínas de unión biespecíficas que transportan restos de unión a través de una barrera semipermeable, por ejemplo, la barrera hematoencefálica. En este diseño, un resto de unión se une a una diana que pueden atravesar una barrera selectiva particular; el otro resto de unión selecciona como diana una molécula con una actividad terapéutica, en el que la molécula diana con actividad terapéutica normalmente no puede atravesar la barrera. Este tipo de proteína de unión biespecífica es útil para llevar productos terapéuticos a tejidos que, de otro modo, el producto terapéutico no alcanzaría. Algunos ejemplos incluyen seleccionar como diana el receptor pIGR para transportar un producto terapéutico al intestino o al pulmón, o seleccionar como diana el receptor de transferrina para

transportar un producto terapéutico a través de la barrera hematoencefálica.

Pueden elaborarse proteínas de unión biespecíficas que transportan restos de unión a células o tipos de células específicas. En este diseño, un resto de unión selecciona como diana una proteína de superficie celular (por ejemplo, un receptor) que se internaliza fácilmente en la célula. El otro resto de unión selecciona como diana una proteína intracelular, en el que la unión de la proteína intracelular da como resultado un efecto terapéutico.

Pueden elaborarse proteínas de unión biespecíficas que se unen a un receptor de superficie de una célula inmunitaria fagocítica y una molécula de superficie de un patógeno infeccioso (por ejemplo, una levadura o una bacteria), para llevar el patógeno infeccioso a la proximidad de una célula inmunitaria fagocítica para facilitar la fagocitosis del patógeno. Un ejemplo de un diseño de este tipo sería un anticuerpo biespecífico que selecciona como diana una molécula de CD64 o CD89 y también un patógeno.

Pueden elaborarse proteínas de unión biespecíficas que tienen una región variable de anticuerpo como un resto de unión y un resto distinto de Ig como segundo resto de unión. La región variable de anticuerpo logra la selección como diana, mientras que el resto distinto de Ig es un efector o una toxina unida a un Fc. De esta manera, el ligando (por ejemplo, un efector o una toxina) se administra a la diana unida por la región variable de anticuerpo.

Pueden elaborarse proteínas de unión biespecíficas que tienen dos restos, cada uno unido a una región de Ig (por ejemplo, una secuencia de Ig que contiene una región CH2 y CH3), de tal manera que cualquiera de los dos restos de proteína puede llevarse a la proximidad del otro en el contexto del Fc. Los ejemplos de este diseño incluyen trampas, por ejemplo, moléculas trampa homodiméricas o heterodiméricas.

Ácidos nucleicos

Pueden obtenerse secuencias de ácido nucleico que codifican para anticuerpos monoclonales mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Los ejemplos de métodos adecuados para obtener anticuerpos monoclonales (y sus secuencias de ácido nucleico) incluyen, por ejemplo, mediante un método de hibridoma (véase, por ejemplo, Kohler *et al.* (1975) Nature 256:495-497) o una biblioteca de fagos de anticuerpos (véase, por ejemplo, Clackson *et al.* (1991) Nature 352:624-628).

En diversas realizaciones, los dominios variables de cadena pesada de inmunoglobulina derivan de secuencias de ácido nucleico de un animal modificado por ingeniería genética o un animal transgénico. En algunas realizaciones, las regiones derivan de un animal que comprende un minilocus de inmunoglobulina humana. En algunas realizaciones, las regiones derivan de ratones que comprenden uno o más ácidos nucleicos extracromosómicos que comprenden uno o más ácidos nucleicos que codifican para secuencias de inmunoglobulina humana no reordenadas. En algunas realizaciones, el animal comprende secuencias de ácido nucleico de región variable de cadena ligera humanas, en algunas realizaciones, secuencias variables de cadena pesada humanas, en algunas realizaciones, secuencias variables tanto de cadena pesada como ligera y, en algunas realizaciones, comprenden además secuencias de región constante humanas. En una realización específica, las secuencias de ácido nucleico derivan de un ratón, en las que los segmentos génicos variables de cadena pesada y los segmentos génicos variables de cadena ligera de ratón endógenos se han sustituido por segmentos génicos variables de cadena pesada y segmentos génicos variables de cadena ligera humanos.

En algunas realizaciones, las secuencias de ácido nucleico derivan de células B o T indiferenciadas de un animal de este tipo. En otras realizaciones, las secuencias de ácido nucleico derivan de células B o T de un animal que se ha inmunizado con un antígeno de interés.

En diversas realizaciones, las secuencias de ácido nucleico derivan de células amplificándolas con cebadores, incluyendo, por ejemplo, conjuntos de cebadores degenerados que comprenden una o más FR, que se unen, o secuencias constantes.

En diversas realizaciones, los dominios variables de cadena pesada de inmunoglobulina derivan de ácidos nucleicos de un animal que se ha inmunizado con un antígeno de interés. Por ejemplo, un animal no humano transgénico o modificado por ingeniería genética se inmuniza con el antígeno de interés (por ejemplo, exponiendo al animal al antígeno o a una célula que porta el antígeno o a un ácido nucleico que codifica para una forma expresable del antígeno), lo que permite que el animal experimente una respuesta inmunitaria, aislando células inmunitarias (por ejemplo, células B) a partir del animal, opcionalmente inmortalizando las células y cribando las células para identificar la reactividad con el antígeno y/o identificar y/o aislar las secuencias de ácido nucleico que codifican para una región variable de inmunoglobulina que es capaz de reconocer el antígeno cuando se ubica en el contexto de un anticuerpo. En algunas realizaciones, la célula es una célula B. En algunas realizaciones, se usa una célula B del animal inmunizado para elaborar un hibridoma, y se identifica una célula B que expresa un anticuerpo que reconoce específicamente un epítipo del antígeno y se identifican y/o aíslan secuencias de ácido nucleico que codifican para una secuencia de aminoácidos de la región variable que reconoce el epítipo.

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos derivan de humanos, primates no humanos (por ejemplo, simios tales como chimpancés), monos (por ejemplo, macaco cangrejero o macaco de la India), roedores (por ejemplo, ratones, ratas, hámsteres), burros, cabras, ovejas, etc.

5 En algunas realizaciones, las cadenas pesadas comprenden secuencias que derivan de células humanas. Por ejemplo, células fetales humanas expuestas *in vitro* a un antígeno y ubicadas en un animal huésped adecuado (por ejemplo, un ratón SCID),

10 En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos se introducen en un célula usando un vector. Los vectores incluyen, por ejemplo, plásmidos, cósmidos, retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, virus vegetales, YAC, BAC, episomas derivado del VEB.

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos están presentes en un vector de expresión o constructo de expresión. En algunas realizaciones, el vector o constructo de expresión es un vector que contiene un promotor unido operativamente a la secuencia de ácido nucleico de interés, de tal manera que la secuencia de ácido nucleico de interés es capaz de expresarse en condiciones adecuadas en una célula adecuada. Los vectores o constructos de expresión puede incluir secuencias líder, potenciadores, elementos promotores que potencian la transcripción o traducción, secuencias de terminación de la transcripción, secuencias de corte y empalme, intrones potenciadores de la transcripción, elementos IRES, genes marcadores, secuencias de selección, sitio de reconocimiento de recombinasa, brazos de homología, secuencias virales, operadores (por ejemplo, operadores procariontes), etc. En algunas realizaciones, los vectores de expresión comprenden elementos que permiten la expresión inducible, por ejemplo, un operador procarionte unido operativamente a un promotor eucariota. En algunas realizaciones, la expresión se induce tras la adición de un inductor de la expresión. En otras realizaciones, la expresión se induce tras la retirada de un inhibidor de la expresión. En algunas realizaciones, la expresión se induce mediante un cambio de temperatura.

25 En algunas realizaciones, una o más secuencias de nucleótidos de cadena pesada están en el mismo vector. En algunas realizaciones, una secuencia de ácido nucleico de cadena pesada y una secuencia de ácido nucleico de cadena ligera en el presente documento están en el mismo vector. En una realización, dos secuencias de ácido nucleico de cadena pesada y una secuencia de ácido nucleico de cadena ligera están en el mismo vector.

30 En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos se expresan en una célula que comprende uno o más ácidos nucleicos de un virus. En realizaciones específicas, el virus se selecciona de adenovirus, virus adenoasociado, SV-40, virus de Epstein-Barr, un retrovirus, un lentivirus, baculovirus, coronavirus, virus del herpes simple, virus de la poliomielitis, virus del bosque Semliki, virus Sindbis y virus vaccinia.

35 Las células huésped son células que pueden transformarse para expresar un ácido nucleico de interés. En diversas realizaciones, la transformación incluye cambiar el contenido de ácido nucleico de una célula de tal manera que contenga ácidos nucleicos exógenos (por ejemplo, un ácido nucleico no hallado en la célula en la naturaleza, o una o más copias adicionales de un ácido nucleico correspondientes a una secuencia de ácido nucleico hallada en la célula en la naturaleza). El contenido de ácido nucleico de una célula puede cambiarse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica, por ejemplo, integrando el ácido nucleico en el genoma de la célula o ubicándolo en la célula en una forma extracromosómica o extragenómica. En algunas realizaciones, el contenido de ácido nucleico de la puede cambiarse de tal manera que la célula expresa de manera transitoria el ácido nucleico de interés, o el contenido de ácido nucleico puede cambiarse de tal manera que la célula expresa de manera estable el ácido nucleico de interés.

45 En algunas realizaciones, el cambio en el contenido genético de la célula se hereda cuando se divide la célula.

Aislamiento de la proteína de unión a antígeno biespecífica

50 Una vez se seleccionó un conjunto adecuado de modificaciones basándose en la información en el presente documento, se realizaron intentos de aislar la proteína de unión a antígeno biespecífica usando métodos conocidos en la técnica. Simplemente aplicando el método publicado, en cada circunstancia, no proporcionó una separación satisfactoria.

55 Lindhofer *et al.* elaboraron un anticuerpo biespecífico con una cadena pesada heterodimérica que tenía una cadena pesada que se unía a la proteína A (IgG de ratón) y una cadena pesada que no (IgG de rata), y separaron con éxito el anticuerpo biespecífico heterodimérico de rata/ratón a partir de una mezcla de cuádrimas de dímeros de ratón/ratón y de rata/rata con un gradiente por etapas de pH desde pH neutro hasta pH 5,8 para eluir el heterodímero y luego una etapa de pH desde 5,8 hasta 3, para eluir el homodímero de ratón/ratón. (Véase Lindhofer *et al.* (1995) Preferential species-restricted heavy/light chain pairing in rat/mouse quadromas: Implications for a single-step purification of bispecific antibodies. J. Immunol. 155(1):219-225.)

60 El enfoque de Lindhofer fracasó cuando se aplicó en la separación de un homodímero de IgG1 a partir de un heterodímero de IgG1 que tenía dos cadenas pesadas de IgG1 que eran idénticas salvo por el hecho de que uno de los dominios CH3 de IgG1 contenía una modificación dipeptídica H435R/Y436F. Los inventores hallaron que, en un gradiente de pH lineal, la IgG1 con modificación dipeptídica eluía a aproximadamente pH 3,9, mientras que el homodímero de IgG1 eluía a aproximadamente pH 3,7. Esta diferencia de pH se consideró insuficiente para lograr una

separación satisfactoria del heterodímero a partir del homodímero usando el método de Lindhofer. La diferencia no era reproducible de manera predecible.

La variación en el comportamiento cromatográfico se observó en series cromatográficas que emplearon una fuerza iónica relativamente sustancial a la que contribuía la concentración de tampón necesaria para mantener el gradiente o la etapa de pH particular. Sin embargo, no se logró una separación satisfactoria al añadir un modificador orgánico (1-propanol). En cambio, de manera algo sorprendente, para algunos desarrollos cromatográficos, la adición de 0,5 molar a 1,0 molar de modificador iónico (por ejemplo, NaCl) mejoró drásticamente e inesperadamente la separación de la IgG1 homodimérica y la IgG1 heterodimérica. La adición del modificador iónico amplió el intervalo de pH para la elución (1,2 unidades de pH con modificador iónico, pero 0,2 unidades de pH sin modificador iónico), de tal manera que un gradiente por etapas de pH pudo separar con éxito las dos especies. En otros desarrollos, sin embargo, se logró una separación satisfactoria con una concentración de NaCl de tan sólo aproximadamente 150 mM (véase el ejemplo 4). Con el fin de garantizar que puede lograrse una separación satisfactoria, en una realización, el aislamiento de la proteína de unión a antígeno inespecífica se realiza en presencia de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,0 molar de modificador iónico

Por consiguiente, en una realización, un método para separar una proteína de unión a antígeno inespecífica que comprende una IgG heterodimérica con una cadena que comprende una modificación, tal como se describe en el presente documento, comprende una etapa de emplear un gradiente de pH en presencia de un modificador iónico. En una realización, el modificador iónico está presente a una concentración suficiente para maximizar la diferencia de pH entre la elución a partir de un soporte de proteína A de un homodímero de IgG y un heterodímero de IgG, tal como se describe en el presente documento (es decir, con una(s) modificación/modificaciones de CH3). En una realización específica, el modificador iónico está presente a una concentración de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,0 molar. En otra realización específica, el modificador iónico está presente a una concentración de aproximadamente 0,15 a aproximadamente 0,5 molar.

En una realización, el modificador iónico es una sal. En una realización, el modificador alcalino iónico es una sal de un metal alcalino o un metal alcalinotérreo y un halógeno. En una realización específica, la sal es una sal de cloruro de un metal alcalino o un metal alcalinotérreo, por ejemplo, NaCl, KCl, LiCl, CaCl₂, MgCl₂. En una realización específica, la sal está presente a una molaridad de aproximadamente 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 ó 1,0.

En una realización, el gradiente de pH es de desde aproximadamente pH 3,9 hasta aproximadamente pH 4,5, en otra realización, desde aproximadamente pH 4,0 hasta aproximadamente pH 4,4 y, en otra realización, de aproximadamente pH 4,1 a aproximadamente pH 4,3. En una realización específica, el gradiente es un gradiente lineal.

En una realización, el gradiente de pH es un gradiente por etapas. En una realización, el método comprende aplicar a una columna de proteína A equilibrada (equilibrada, por ejemplo, en PBS u otro tampón o líquido adecuado) una etapa de aproximadamente pH 3,9, aproximadamente pH 4,0, aproximadamente pH 4,1, aproximadamente pH 4,2, aproximadamente pH 4,3 o aproximadamente pH 4,4. En una realización específica, la etapa es de aproximadamente pH 4,2.

En una realización, el anticuerpo inespecífico que comprende el dominio CH3 de IgG heterodimérica eluye a partir del soporte de proteína A en una o más fracciones sustancialmente libres de IgG no heterodimérica. En una realización específica, la(s) fracción/fracciones de anticuerpo inespecífico eluida(s) comprende(n) menos de aproximadamente el 1%, el 0,5% o el 0,1% de proteína total en peso que no es anticuerpo heterodimérico.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para describir a los expertos habituales en la técnica cómo realizar y usar los métodos y las composiciones de la memoria descriptiva, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran su invención. Se han realizado esfuerzos para garantizar exactitud con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), sin embargo deben justificarse algunos errores experimentales y desviaciones. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es peso molecular promedio, la temperatura es en grados centígrados y la presión es o está cerca de la atmosférica.

Ejemplo 1: proteína de unión a antígeno IL-4Ra/IL-6Ra inespecífica

Se descubrió que dos anticuerpos conocidos de isotipo IgG1 humana, uno contra IL-4Ra y uno contra IL-6Ra, tenían cadenas ligeras que diferían en tan sólo cuatro aminoácidos. Los experimentos de expresión conjunta revelaron que la cadena ligera del anticuerpo anti-IL-4Ra podía reemplazarse por la cadena ligera de IL-6Ra y aun así mantener una unión de alta afinidad a IL-4Ra, posibilitando de ese modo producir un anticuerpo inespecífico usando la cadena pesada del anticuerpo anti-IL-4Ra y la cadena pesada del anticuerpo anti-IL-6Ra y la misma cadena ligera. Por consiguiente, la cadena pesada del anticuerpo contra IL-6Ra se modificó para dar la forma FcΔAdp (es decir, modificación dipeptídica H95R/Y96F en CH3, mediante la numeración de exones IMGT).

A continuación se expresó conjuntamente la cadena ligera del anticuerpo anti-IL-6Ra con las cadenas pesadas del anticuerpo anti-L4Ra/Fc y del anticuerpo anti-IL6Ra/FcΔAdp en células CHO, y el medio acondicionado de estas células se sometió a cromatografía con proteína A. Después de cargar la columna de proteína A con los sobrenadantes celulares que contenían una mezcla de homodímeros y heterodímeros, se realizó la elución con un gradiente por etapas de pH producido mediante combinaciones variables de dos tampones (A: citrato de Na 100 mM, NaCl 150 mM, pH 6,0 y B: citrato de Na 100 mM, NaCl 150 mM, pH 3,0; véase la figura 4) para producir tres fases a pH 6,0, pH 4,2 y pH 3,0, respectivamente. En la figura 4, IL-4R indica el anticuerpo anti-IL-4Ra e IL-6Ra indica el anticuerpo anti-IL-6Ra(IgG1ΔAdp). Se sometieron a ensayo las fracciones de columna indicadas para determinar la unión a las proteínas IL-6Ra y IL-4Ra (véase la figura 5). Se realizó una elución por etapas, dando lugar a un pico que eluía a pH 4,2 y un segundo pico a pH 3,0 (figura 4). El análisis mediante BIACORETM mostró que el material de flujo continuo pudo unirse a IL-6Ra soluble pero no a IL-4Ra, tal como se esperaba (figura 5). Las fracciones correspondientes al pico a pH 4,2 pudieron unirse a cantidades aproximadamente iguales de IL-6Ra e IL-4Ra, coherente con el heterodímero. El pico que eluía a pH 3,0 sólo puede unirse a IL-4Ra y no a IL-6Ra, correspondiente al homodímero anti-IL-4Ra esperado. Esto establece que pudo aislarse eficazmente un anticuerpo biespecífico heterodimérico usando cromatografía con proteína A, con un sencillo gradiente por etapas de pH.

Ejemplo 2: farmacocinética de proteínas FcΔAdp

Para someter a prueba si la modificación FcΔAdp afectaba a la farmacocinética de una molécula heterodimérica que contenía Fc/FcΔAdp, se inyectaron ratones con la especie heterodimérica purificada de anticuerpo anti-IL-4Ra/anti-IL-6Ra descrita anteriormente y se midieron las concentraciones de inmunoglobulina humana en suero a lo largo de un periodo de 28 días (figura 6; tabla 1). La semivida sérica del heterodímero fue de aproximadamente 10 días, similar a la del tipo natural. Esto establece que las modificaciones FcΔAdp no tuvieron ningún efecto detectable sobre la semivida sérica.

Tabla 1. Farmacocinética (n = 5)	
Fármaco	Semivida sometida a prueba (días) (prom. ± d.e.)
IL-6RΔ/IL-4R	11,2 ± 1,8
IL-6RΔ/IL-6RΔ	10,8 ± 1,9
IL-4R/IL-4R	10,8 ± 1,9
Control	11,2 ± 1,9

Ejemplo 3: proteína de unión a antígeno CD20/CD3 biespecífica

Se descubrió que la cadena pesada de un anticuerpo anti-CD20 humano, cuando se expresa conjuntamente con la cadena ligera de un anticuerpo anti-CD3 humano (activante) conocido, todavía puede unirse a CD20. A continuación, se expresó conjuntamente la cadena ligera del anticuerpo anti-CD3 o bien con la cadena pesada del anticuerpo anti-CD20/Fc, la cadena pesada del anticuerpo anti-CD3/FcΔAdp o bien ambas cadenas pesadas. A continuación, se usó la población mixta resultante de homodímeros y heterodímeros en un ensayo biológico para determinar la capacidad de destruir células diana que expresan CD20 (figura 7). En resumen, se activaron 2×10^7 células PBMC humanas con 6×10^7 perlas CD3xCD28 (Invitrogen) durante 72 horas. A continuación, se añadieron treinta unidades de IL-2 (R&D Systems) y se incubaron las células durante 24 horas adicionales. A continuación, se dividieron las células hasta una concentración de $0,5 \times 10^6$ /ml y se añadieron 30 U adicionales de IL-2. A continuación, se incubaron las células durante 48 horas adicionales y se usaron en el ensayo biológico. El día del ensayo biológico, se marcaron 2×10^6 /ml células diana que expresan CD20 (Raji) durante 30 minutos con calceína-AM 8 μm (Invitrogen). Se añadieron las células diana lavadas a las células hPBMC activadas a una razón de 1:10 de células diana:efectoras (220.000 células en total por pocillos) en un volumen total de 200 microlitros con la cantidad indicada de sobrenadante que contenía anticuerpo. Se incubaron las células durante 2 horas y se recogió el sobrenadante y se cuantificó la fluorescencia. Se midió la citotoxicidad calculando la razón de la fluorescencia específica con respecto a la fluorescencia máxima. Ni el anticuerpo contra CD20 solo (usando la cadena ligera del anticuerpo anti-CD3) ni el anticuerpo anti-CD3 pudieron destruir las células diana; incluso la mezcla de los dos reactivos no tuvo ningún efecto. Sin embargo, cuando se expresaron conjuntamente los tres componentes, se observó una destrucción significativa, lo que indica que el efecto se debía a la especie biespecífica heterodimérica. Basándose en la cantidad estimada de anticuerpo biespecífico en el sobrenadante de células CHO transfectadas de manera transitoria, se estimó que la CE₅₀ para este efecto era de aproximadamente 15 pM.

Ejemplo 4: especificidad de la destrucción celular con proteína de unión a antígeno CD20/CD3 biespecífica purificada

Se sometieron los sobrenadantes de células CHO de las transfecciones, tal como se describe en el ejemplo 3, a cromatografía de afinidad con proteína A, utilizando un gradiente por etapas para la elución. El gradiente por etapas se produjo mediante combinaciones variables de dos tampones (A: citrato de Na 20 mM, NaCl 1 M, pH 5,2; B: citrato de Na 20 mM, NaCl 1 M, pH 2,7) para producir tres fases a pH 5,2, pH 4,2 y pH 2,8, respectivamente. A continuación,

se usó proteína del pico que eluía a pH 4,2 en un ensayo de destrucción de células, tal como describe en el ejemplo 3. Se observó la destrucción de células diana a una CE_{50} de 3 pM (figura 8). Se realizó un ensayo de citotoxicidad adicional que examinó la especificidad por la diana de la destrucción observada. En este experimento, se incubaron células diana marcadas que expresan CD20 (Raji) o sin CD20 (293) con PBMC humanas activadas. Cada tipo de células diana se añadió al ensayo o bien solo o bien en combinación con células diana sin marcar del otro tipo. En todos los casos, las células diana que expresan CD20 se destruyeron específicamente con una CE_{50} de 3 pM mientras que la línea celular negativa para CD20 no se destruyó.

Ejemplo 5: separación con proteína A de un Fc de hIgG2 diferencialmente modificado

En primer lugar se enriquecieron un Fc de IgG2 humana/ Δ AdpFc heterodimérico diferencialmente modificado y un Fc de IgG2 humana/Fc homodimérico no modificado mediante un proceso de unión y lavado a través de una columna de proteína A (rProtein A FF, GE). Para separar adicionalmente Fc de hIgG2/ Δ AdpFc de Fc de hIgG2/Fc, se realizó una elución mediante gradiente por etapas usando un sistema SMART™ (GE) de la siguiente manera. El sistema de disolventes consistía en el disolvente A (PBS, 1X), el disolvente B (citrato de sodio 20 mM y NaCl 1 M, pH 5,5) y el disolvente C (citrato de sodio 20 mM y NaCl 1 M, pH 2,5). La elución comenzó con una elución isocrática con el 100% de A en los primeros 20 min, seguido por un cambio rápido al 100% de B a los 20 min. A continuación, se inició un gradiente lineal para el 33,5% de C y el 66,5% de B durante los próximos 10 min; la concentración del 33,5% de C se mantuvo durante 20 min hasta la completa elución del primer pico (Fc/ Δ AdpFc). Esto se siguió por un gradiente lineal desde el 33,5% de C hasta el 100% de C durante 30 min. La velocidad de flujo se mantuvo en 250 microlitros/min y los cromatogramas se detectaron a 280 nm mediante un detector de UV. Fc de hIgG2/ Δ AdpFc eluyó a pH 4,5, mientras que hIgG2 eluyó a pH 3,5.

Ejemplo 6: separación con proteína A de un Fc de hIgG4 diferencialmente modificado

En primer lugar se enriquecieron IgG4 humana heterodimérica diferencialmente modificada (Fc/ Δ AdpFc) y una IgG4 homodimérica no modificada (Fc/Fc) mediante un proceso de unión y lavado a través de una columna de proteína A (rProtein A FF, GE). Para separar adicionalmente Fc de hIgG4/ Δ AdpFc de Fc de hIgG4/Fc, se realizó una elución mediante gradiente por etapas usando un sistema SMART™ (GE) de la siguiente manera. El sistema de disolventes consistía en el disolvente A (PBS, 1X), el disolvente B (citrato de sodio 20 mM y NaCl 1 M, pH 5,1) y el disolvente C (citrato de sodio 20 mM y NaCl 1 M, pH 2,8). La elución comenzó con una elución isocrática con el 100% de A en los primeros 20 min, seguido por un cambio rápido al 100% de B a los 20 min. A continuación, se inició un gradiente lineal para el 50% de C y el 50% de B durante los próximos 10 min; la concentración del 50% de C se mantuvo durante 20 min hasta la completa elución del primer pico (Fc/ Δ AdpFc). Esto se siguió por un gradiente lineal desde el 50% de C hasta el 100% de C durante 30 min. La velocidad de flujo se mantuvo en 250 microlitros/min y los cromatogramas se detectaron a 280 nm mediante un detector de UV. Fc de hIgG4/ Δ AdpFc eluyó a aproximadamente pH 4 mientras que el homodímero eluyó durante un gradiente de desde aproximadamente pH 4 hasta pH 2,8.

Ejemplo 7: separación con proteína A de un CD3xCD20 de hIgG1 diferencialmente modificado

Se separaron un anticuerpo anti-IgG1 de hCD3xCD20 heterodimérico diferencialmente modificado (Fc/ Δ AdpFc) y un anticuerpo anti-hCD20 homodimérico no modificado en una columna de rProtein A FF de 1 ml (GE Biosciences) de la siguiente manera. El sistema de disolventes era tampón A1 (PBS 1X), tampón A2 (citrato de sodio 20 mM y NaCl 1 M pH 5,1), tampón B (citrato de sodio 20 mM y NaCl 1 M pH 2,8). Se unió la muestra mixta y se lavó en PBS y tampón A2. Se usó una etapa para lograr un pH de 4,2, que eluyó IgG1 de CD3*xCD20 biespecífica (Fc/ Δ AdpFc), luego un gradiente lineal desde pH 4,2 hasta pH 2,8 eluyó la IgG1 anti-hCD20 homodimérica.

Ejemplo 8: afinidad de unión de CH3 modificados por receptores de Fc

Se sometió a prueba la afinidad de unión de un anticuerpo biespecífico de isotipo IgG1 humana que tenía la modificación Δ Adp (H435R y Y436F, numeración EU) por una variedad de receptores de Fc humanos en un ensayo de unión en equilibrio en estado estacionario Biacore™.

En resumen, se usó un chip de dextrano carboximetilado (CM5) que tenía un AcM anti-penta-His acoplado con amina (Qiagen) para capturar diversos constructos de receptores de Fc humanos. Se unieron los siguientes ectodominios de receptores de Fc etiquetados con His a las superficies de diferentes chips de CM5 recubiertos de anticuerpo anti-penta-His: Fc γ RI, Fc γ RIIA (polimorfo R131), Fc γ RIIB y Fc γ RIIIB (cada uno obtenido de R&D Systems); y Rc γ RIIA (polimorfo H131), Rc γ RIIIB (polimorfo V176) y Rc γ RIIIB (polimorfo F176) (cada uno elaborado en Regeneron). Se hicieron pasar los anticuerpos a lo largo de la superficie a tres concentraciones para el ectodominio del receptor Fc γ RI de alta afinidad (25 nM, 50 nM y 100 nM) y a entre 5 micromolar y 39 nanomolar para los ectodominios del receptor Fc γ R de baja afinidad, y se determinaron los valores de las constantes de velocidad de asociación y disociación (k_a y k_d) y se usaron para calcular las constantes de disociación en equilibrio (K_D) para los anticuerpos. Se realizaron estudios de unión a temperatura ambiente usando tampón HBS-T a pH 7,2. Se determinaron las K_D para un anticuerpo de control (hAcM), un anticuerpo anti-CD20 y un anticuerpo anti-CD3 con modificación Δ dp y un anticuerpo biespecífico CD20xCD3 Δ dp. Los valores de K_D para el anticuerpo anti-CD3 Δ dp no revelaron diferencias significativas en la unión

a ninguno de los receptores de Fc sometidos a prueba en comparación con anticuerpos de isotipo hIgG1 no modificados (tabla 2).

Tabla 2. K_D (nM) para la unión de Ac hIgG a ectodominios de hFc γ R				
hFcR	Homodímero de IgG1 humana		IgG1 humana con Δ Adp	
	hmAc	CD20-hFc	Homodímero de CD3-hFc con Δ Adp	Heterodímero de CD20xCD3 biespecífico con Δ Adp
Fc γ R1	5,00	4,27	3,17	3,61
Fc γ RIIA(R131)	1.460	739	588	328
Fc γ RIIA(H131)	915	458	451	222
Fc γ RIIB	3.400	1.850	1.360	794
Fc γ RIIA(V176)	810	430	218	248
Fc γ RIIA(F176)	2.500	533	407	267
Fc γ RIIB	3.700	1.170	906	520

5 Ejemplo 9: farmacocinética de una hIgG1 Δ Adp biespecífica en ratones hFcRn

Se determinaron la tasa de aclaramiento farmacocinético de un anticuerpo anti-IgG1 Δ Adp de hCD3/hCD20 biespecífico y sus controles relacionados con el anticuerpo (homodímero anti-IgG de hCD3 y anti-IgG Δ Adp de CD3) en ratones de tipo natural (WT) y ratones homocigóticos para un reemplazo de FcRn de ratón por un gen de hFcRn (ratones hFcRn). Los ratones de tipo natural y hFcRn eran de razas de camadas cruzadas con un progenitor que contenía C57BL6 (75%) y 129Sv (25%). Las cohortes contenían cada una 4 ratones o bien WT o bien hFcRn, excepto en el caso de una cohorte de ratones WT que recibieron un anticuerpo de control con coincidencia de isotipo IgG1 en la que la cohorte contenía 3 ratones. Los ratones recibieron 1 mg/kg de un control con coincidencia de isotipo (hIgG1), anticuerpo anti-IgG1 Δ Adp de hCD3xCD20 biespecífico, anticuerpo anti-IgG1 de hCD3 u homodímero anti-IgG1 Δ Adp de hCD3. Los tres artículos se administraron por vía subcutánea. Se extrajeron muestras de sangre a las 0 h, 6 h, 1 d, 2 d, 3 d, 4 d, 7 d, 10 d, 14 d, 21 d y 30 d.

Se determinaron los niveles en suero de anticuerpos humanos mediante un ELISA en sándwich. En resumen, se recubrió un anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG humana (específico de Fc) (Jackson ImmunoResearch) en placas de 96 pocillos a una concentración de un microgramo/ml y se incubó durante la noche a 4°C. Después se bloquearon las placas con BSA, se añadieron a la placa muestras de suero en diluciones en serie de seis dosis y patrones de referencia de los anticuerpos respectivos en diluciones en serie de 12 dosis y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. Después de lavar para retirar el anticuerpo no unido, se detectaron los anticuerpos humanos capturados usando el mismo anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG humana (específico de Fc) conjugado con peroxidasa del rábano (HRP) (Jackson ImmunoResearch) y se desarrollaron mediante sustrato colorimétrico convencional de tetrametilbencidina (TMB) según la recomendación del fabricante. Se registró la absorbancia a 450 nm en un lector de placas y se calculó la concentración de hIgG en muestras de suero usando la curva de patrón de referencia generada en la placa de las muestras.

No se observó ninguna diferencia significativa en la semivida sérica de los cuatro anticuerpos IgG1 a lo largo del periodo de pruebas de 30 días. En particular, no se observó ninguna diferencia significativa entre anticuerpos IgG1 que tenían la modificación Δ Adp y anticuerpos IgG1 de tipo natural. No se observó ninguna diferencia entre los anticuerpos o bien con ratones de tipo natural (mFcRn) o bien con ratones que tenían un FcRn humanizado (hFcRn). Tal como se esperaba, los ratones hFcRn mostraron un aclaramiento ligeramente más rápido que los ratones de tipo natural. Los resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Estimaciones medias de parámetros farmacocinéticos después de la inyección subcutánea en ratones				
Genotipo de ratón	Anticuerpo	n	C_{max} (mcg/ml)	AUC ((h)(mcg/ml))
mFcRn	CD3xCD20	4	$9,0 \pm 2,3$	$114,3 \pm 30,6$
	CD3	4	$11,1 \pm 1,7$	$175,4 \pm 56,4$
	CD3 Δ Adp Δ Adp	4	$11,7 \pm 1,8$	$155,3 \pm 34,02$
	hIgG de control	3	$15,1 \pm 3,01$	$162,5 \pm 27,02$
hFcRn	CD3xCD20	4	$12,3 \pm 0,98$	$83,2 \pm 18,6$
	CD3	4	$7,7 \pm 2,2$	$65,2 \pm 16,5$
	CD3 Δ Adp Δ Adp	4	$9,9 \pm 1,34$	$70,4 \pm 15,4$
	hIgG de control	4	$16,1 \pm 2,7$	$131,3 \pm 20,4$

Ejemplo 10: aislamiento a gran escala en tampón con bajo contenido en sales

Se aisló un anticuerpo CD3xCD20 Δ Adp biespecífico según la invención a partir de un cultivo a gran escala. En

resumen, se cultivó una línea de células CHO-K1 que expresa un anticuerpo anti-hCD3xCD20ΔAdp biespecífico (modificación en la cadena pesada CD3) en un biorreactor de 11 litros. Las células que portan el anticuerpo biespecífico se hicieron crecer hasta una densidad de aproximadamente $8,25 \times 10^6$ células/ml, produciendo aproximadamente 250-350 mg de anticuerpo/l. En cambio, un anticuerpo anti-hCD3 de control produjo

Se aisló el anticuerpo en una resina MabSelect SuRe™ (GE) (altura de lecho de 20 cm, DI de 1 cm) equilibrada con fosfato de sodio 10 mM, NaCl 0,5 M, pH 7,2, cultivo de células clarificadas cargado hasta 19 g/l y se lavó la columna con 3 volúmenes de columna de fosfato de sodio 10 mM, NaCl 0,5 M, pH 7,2, seguido por un lavado de 2 volúmenes de columna de fosfato de sodio 20 mM, pH 7,2 (sin NaCl). Se eluyó el anticuerpo con acetato 40 mM, pH 3,0.

El anticuerpo anti-CD30 monoespecífico eluyó a pH 3,6, mientras que el anticuerpo anti-hCD3xCD20ΔAdp biespecífico eluyó a pH 4,4

Ejemplo 11: elución selectiva con proteína A de heterodímeros de ratón con pH suave

Se transfectaron de manera transitoria células CHO-K1 con constructos de expresión para el dominio extracelular de IFNAR1 humano (hIFNAR1) e IFNAR2 humano (hIFNAR2) fusionado con un Fc de mlgG2a de tipo natural o mutante (TTTK o PTTK). La razón entre hIFNAR1-mFc y hIFNAR2-mFc se mantuvo a 1:1 transfectando las células con cantidades iguales de los dos plásmidos de expresión. Se recogió el medio de cultivo 4 días después de la transfección y se sometió a purificación con proteína A usando columnas de centrifugación NAb Protein A Plus™ de 0,2 ml (Thermo Scientific/Pierce). En resumen, se equilibraron las columnas con 1x PBS, pH 7,2. Se incubó un ml de medio de cultivo de CHO-K1 con la resina de proteína A durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron las columnas tres veces con 1x PBS, pH 7,2. Se eluyeron las proteínas unidas con tampón citrato de sodio 20 mM que contenía NaCl 1 M. Se llevaron a cabo tres eluciones usando 0,4 ml de tampón de elución con pH decreciente. Se detectaron las proteínas en las diferentes fracciones mediante análisis por inmunotransferencia de tipo Western.

Los resultados muestran que con una elución por gradiente de pH, es posible separar heterodímeros de mlgG2a de tipo natural y mutante de estrella a partir de homodímeros de mlgG2a de tipo natural (véase la fracción E1 en ambos geles de la figura 9).

Ejemplo 12: formación preferencial de heterodímeros de mutantes de mlgG2a con respecto a heterodímeros de isotipo

Se construyeron plásmidos de ADN para la expresión en mamíferos de los dominios extracelulares de receptores de interferón de tipo I humano (hIFNAR1 y hIFNAR2) con Fc de ratón en el extremo C-terminal (mlgG2a o mlgG1). Se introdujeron mutaciones en la secuencia de mlgG2a usando mutagénesis dirigida al sitio. Los mutantes son TTT = M252T, S254T, S256T; TTTK = M252T, S254T, S256T, I258K; PTTTK = I247P, M252T, S254T, S256T, I258K; RF = H435R, H436F. Se transfectaron de manera transitoria células CHO-K1 con los constructos de expresión. La razón entre IFNAR1-mFc e IFNAR2-mFc se mantuvo a 4:1 transfectando las células con 4 veces más de plásmido de expresión hIFNAR1-mFc (hIFNAR1-mlgG2a) que de hIFNAR2-mFc (mlgG1 o mlgG2a mutante). Se recogió el medio de cultivo 4 días después de la transfección y se detectaron las proteínas mFc mediante análisis por inmunotransferencia de tipo Western.

El resultado muestra que la formación de heterodímeros entre mlgG2a y mlgG1 es mucho menos eficiente que entre mlgG2a de tipo natural y mutantes de mlgG2a (compárense el carril 1 con los carriles 2 a 5 de la figura 10). Se usó una razón de constructo IFNAR1:constructo IFNAR2 de 4:1 para mantener un exceso de constructo de IgG2a de tipo natural en el experimento.

Lista de secuencias

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

<120> Anticuerpos biespecíficos fácilmente aislados con formato de inmunoglobulina nativa

<130> 0890A-WO

<140> A asignar

<141> Presentada con el mismo

<150> documento 61/220.687

<151> 26-06-2009

<160> 7

<170> FastSEQ para Windows versión 4.0

<210> 1
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 1

Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp
1				5					10					15	
Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe
			20					25					30		
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu
		35					40					45			
Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	
	50					55				60					
Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly
65					70					75					80
Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr
				85					90					95	
Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys					
			100						105						

10

<210> 2
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 2

Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp
1				5					10					15	
Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe
			20					25					30		
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu
		35					40					45			
Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	
	50					55				60					
Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly
65					70					75					80
Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	Arg	Phe
				85					90					95	
Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys					
			100						105						

20

<210> 3
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25

<400> 3

Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu
1				5					10					15	
Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe
			20					25					30		
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu
		35					40					45			
Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	
	50					55				60					
Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly
65					70					75					80
Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr
				85					90					95	
Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys					
			100						105						

ES 2 865 648 T3

<210> 4
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 4

Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu
1				5				10					15		
Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe
			20					25					30		
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu
		35					40					45			
Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe
	50					55					60				
Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly
65					70					75					80
Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	Arg	Phe
				85					90					95	
Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys					
			100					105							

10

<210> 5
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 5

Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu
1				5				10					15		
Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe
			20					25					30		
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu
		35					40					45			
Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe
	50					55					60				
Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly
65					70					75					80
Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr
				85					90					95	
Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys					
			100					105							

20

<210> 6
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25

<400> 6

ES 2 865 648 T3

Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu
1				5					10					15	
Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe
			20					25					30		
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu
		35					40					45			
Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	
	50					55				60					
Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly
65					70				75					80	
Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	Arg	Phe
				85					90					95	
Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys					
			100					105							

<210> 7

<211> 107

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 7

Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu
1				5					10					15	
Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe
			20					25					30		
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Ser	Gly	Gln	Pro	Glu
		35					40					45			
Asn	Asn	Tyr	Asn	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe
	50					55				60					
Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly
65					70				75					80	
Asn	Ile	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	Arg	Phe
				85					90					95	
Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys					
			100					105							

10

REIVINDICACIONES

1. Método para aislar un anticuerpo biespecífico, comprendiendo el método aislar el anticuerpo biespecífico usando un soporte de afinidad de proteína A y empleando un gradiente de pH en presencia de un modificador iónico a una concentración de 0,15 M - 1,0 M; en el que el modificador iónico es una sal de cloruro de un metal alcalino o un metal alcalinotérreo; en el que el anticuerpo biespecífico comprende dos cadenas pesadas que reconocen dos epítomos diferentes o dos antígenos diferentes y dos cadenas ligeras que tienen dominios variables y constantes idénticos; en el que el dominio CH3 de una de las cadenas pesadas se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 5 y el dominio CH3 de la segunda cadena pesada se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 6.
2. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el modificador iónico es NaCl, KCl, LiCl, CaCl₂ o MgCl₂.
3. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el modificador iónico está presente a una concentración de 0,15 M a 0,5 M o a una concentración de 0,5 M a 1 M.
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el gradiente de pH es de desde pH 3,9 hasta pH 4,5, o desde pH 4,0 hasta pH 4,4, o desde pH 4,1 hasta pH 4,3, opcionalmente en el que el gradiente es un gradiente lineal.

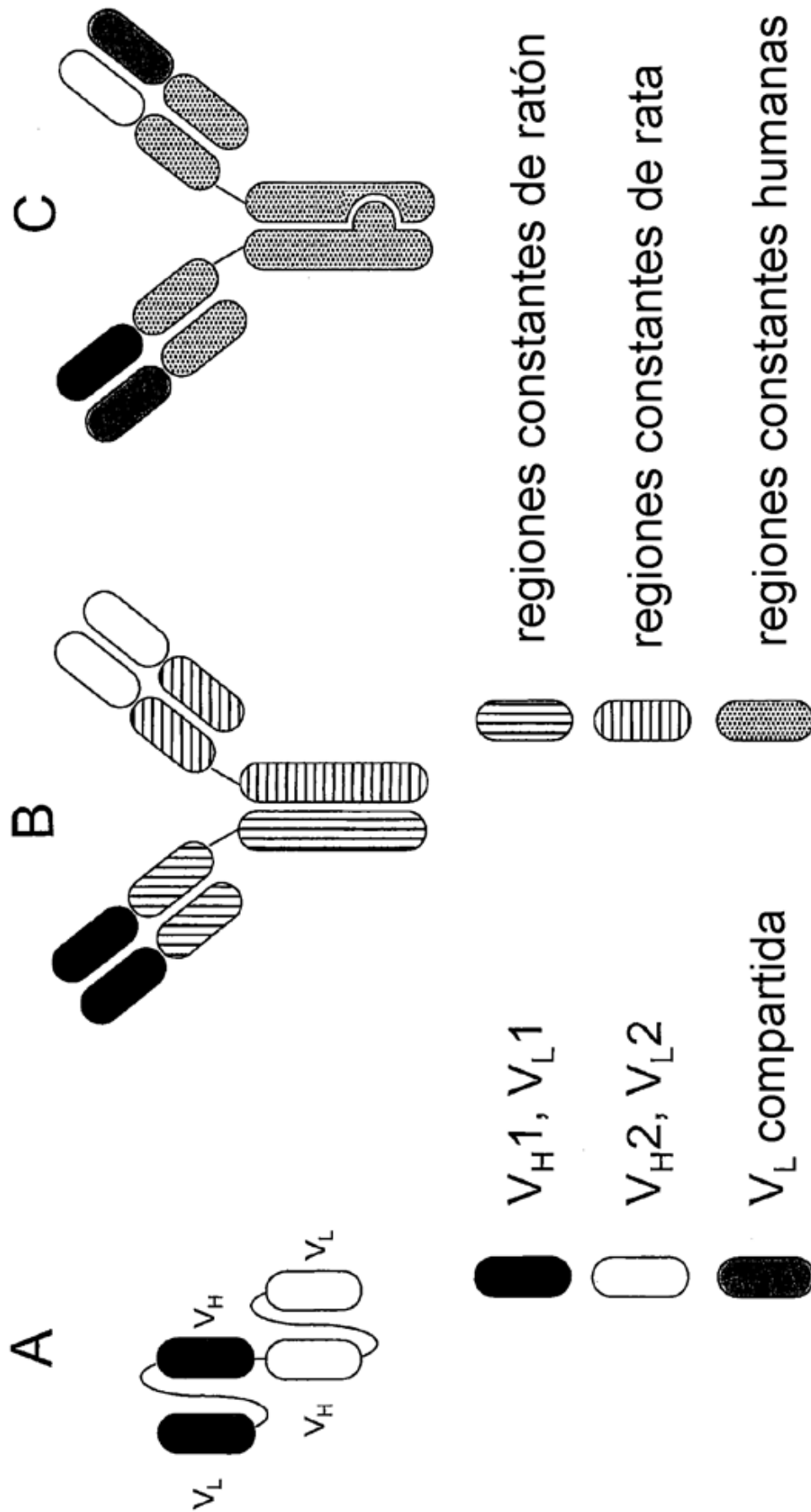


FIG. 1

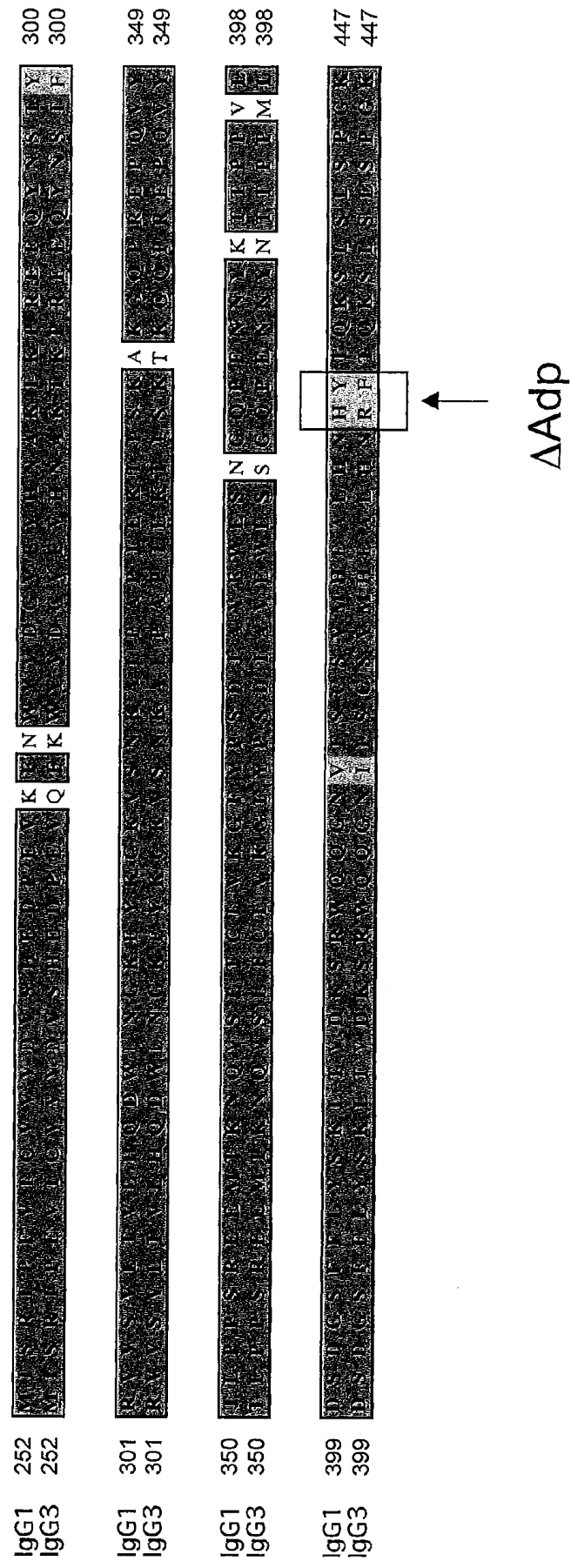


FIG. 2

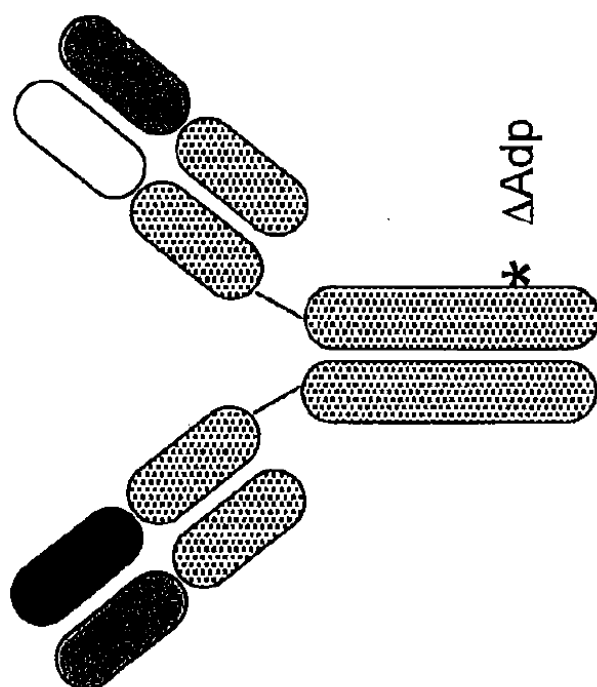


FIG. 2B

IMGT	1	10	20	30	40	50	60
EU	341	350	360	370	380	390	400
hIgG1	GQPREPQVYT	LPPSRDELTK	NQVSLTCLVK	GFYPSDIAVE	WESNGQPENN	YKTTTPPVLD	YKTTTPPVLD
hIgG1AAdp	GQPREPQVYT	LPPSRDELTK	NQVSLTCLVK	GFYPSDIAVE	WESNGQPENN	YKTTTPPVLD	YKTTTPPVLD
hIgG2	GQPREPQVYT	LPPSRREEMTK	NQVSLTCLVK	GFYPSDIAVE	WESNGQPENN	YKTTTPPVLD	YKTTTPPVLD
hIgG2AAdp	GQPREPQVYT	LPPSRREEMTK	NQVSLTCLVK	GFYPSDIAVE	WESNGQPENN	YKTTTPPVLD	YKTTTPPVLD
hIgG4	GQPREPQVYT	LPPSQEEMTK	NQVSLTCLVK	GFYPSDIAVE	WESNGQPENN	YKTTTPPVLD	YKTTTPPVLD
hIgG4AAdp	GQPREPQVYT	LPPSQEEMTK	NQVSLTCLVK	GFYPSDIAVE	WESNGQPENN	YKTTTPPVLD	YKTTTPPVLD
hIgG3	GQPREPQVYT	LPPSRREEMTK	NQVSLTCLVK	GFYPSDIAVE	WESSGQPENN	YNTTPPVLD	YNTTPPVLD

IMGT	61	70	80	90	100	107	
EU	401	410	420	430	440	447	
hIgG1	DGSFFLYSKL	TVDKSRWQOG	NVFSCSVMHE	ALHNHYTQKS	LSLSPGK	(SEQ ID NO:1)	
hIgG1AAdp	DGSFFLYSKL	TVDKSRWQOG	NVFSCSVMHE	ALHNRF FT QKS	LSLSPGK	(SEQ ID NO:2)	
hIgG2	DGSFFLYSKL	TVDKSRWQOG	NVFSCSVMHE	ALHNHYTQKS	LSLSPGK	(SEQ ID NO:3)	
hIgG2AAdp	DGSFFLYSKL	TVDKSRWQOG	NVFSCSVMHE	ALHNRF FT QKS	LSLSPGK	(SEQ ID NO:4)	
hIgG4	DGSFFLYSRL	TVDKSRWQEG	NVFSCSVMHE	ALHNHYTQKS	LSLSLCK	(SEQ ID NO:5)	
hIgG4AAdp	DGSFFLYSRL	TVDKSRWQEG	NVFSCSVMHE	ALHNRF FT QKS	LSLSLCK	(SEQ ID NO:6)	
hIgG3	DGSFFLYSKL	TVDKSRWQOG	NIFSCSVMHE	ALHNRF FT QKS	LSLSPGK	(SEQ ID NO:7)	

FIG. 3

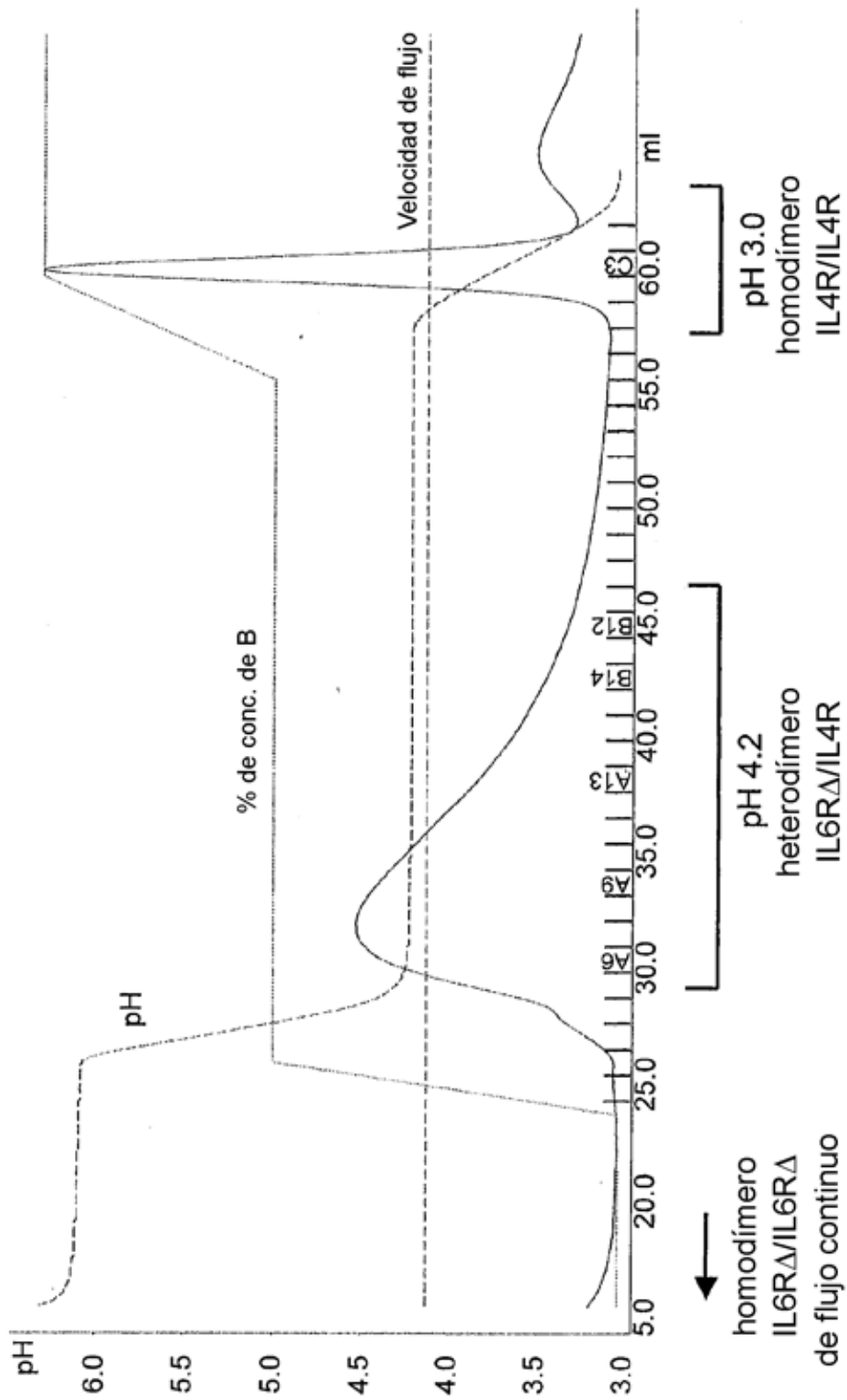


FIG. 4

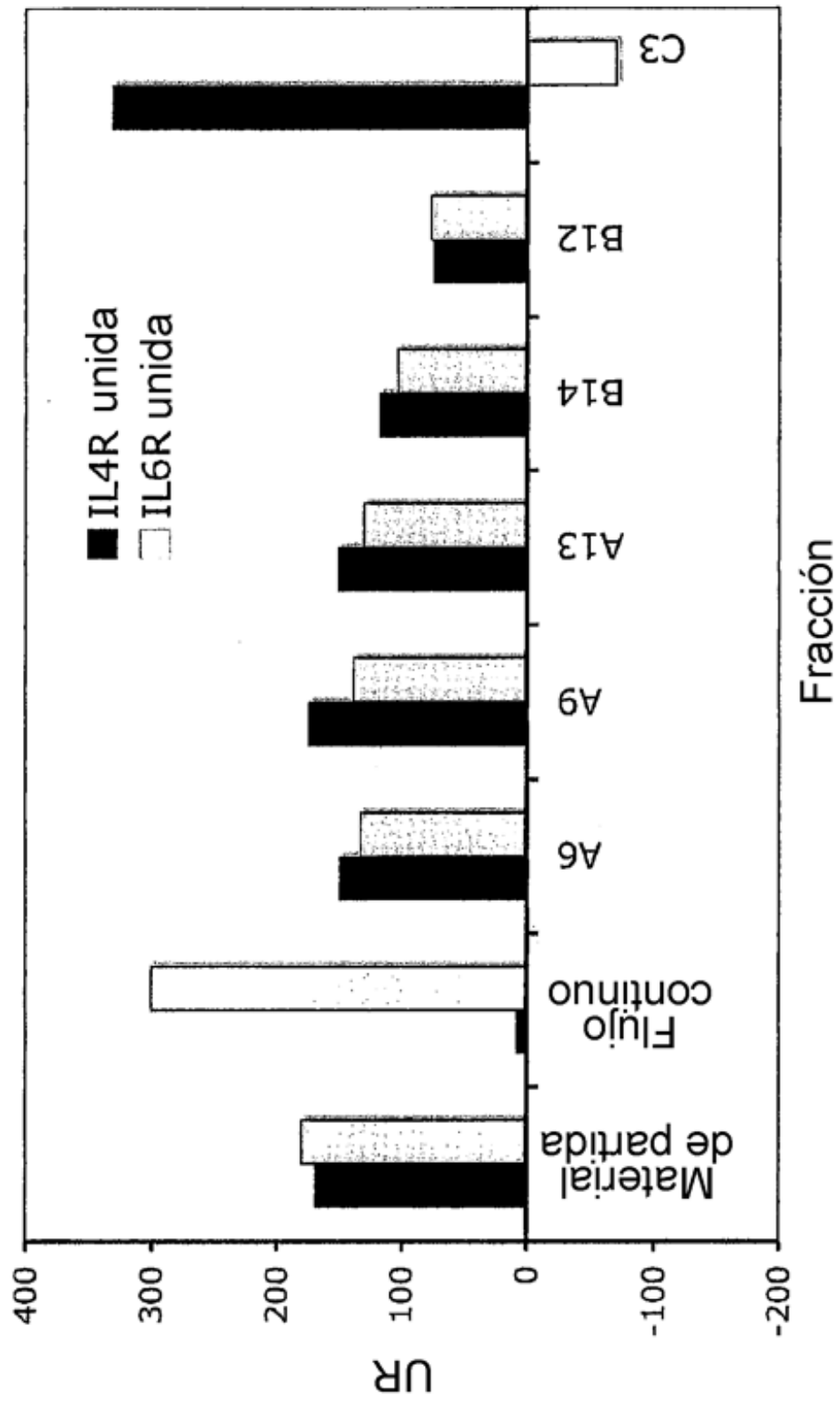


FIG. 5

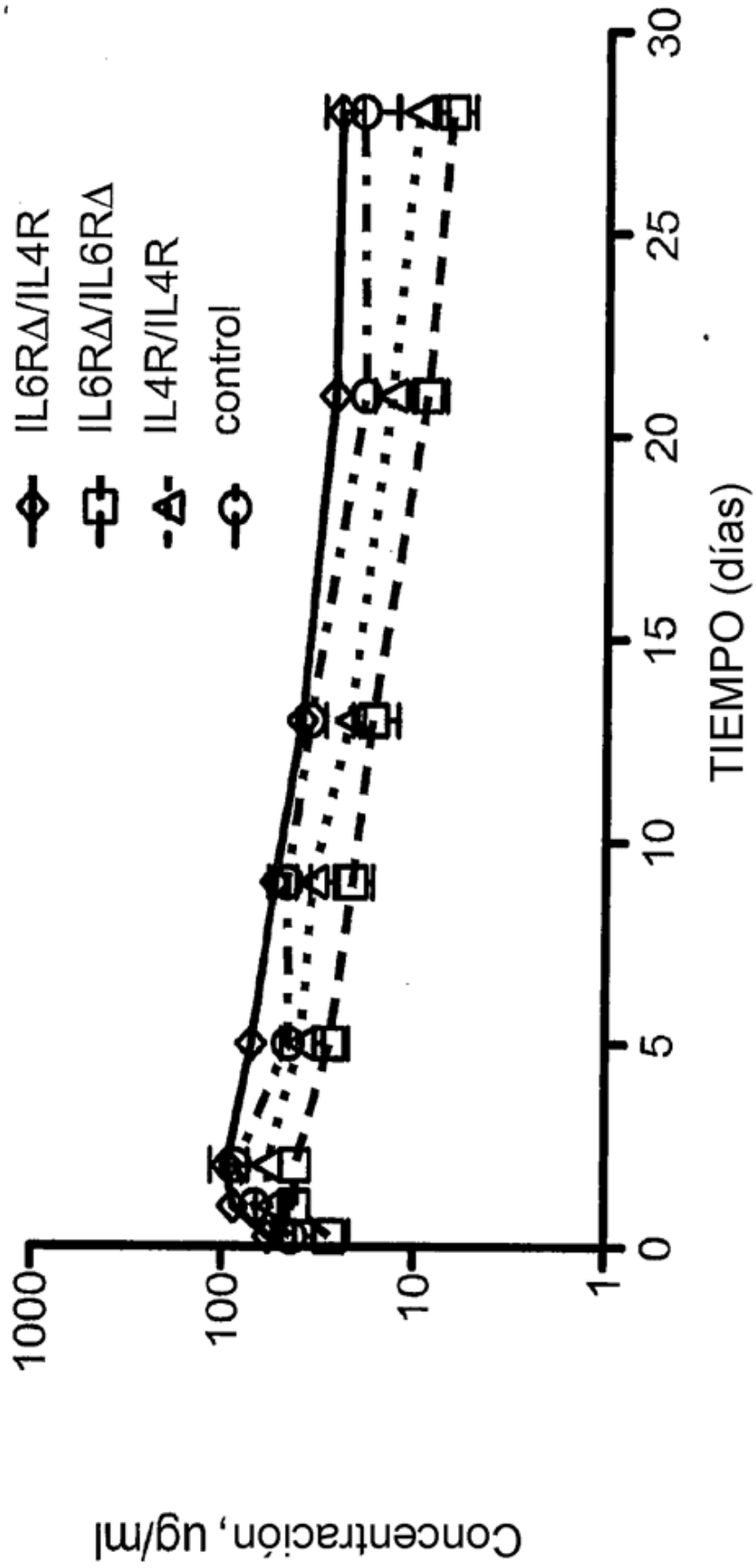


FIG. 6

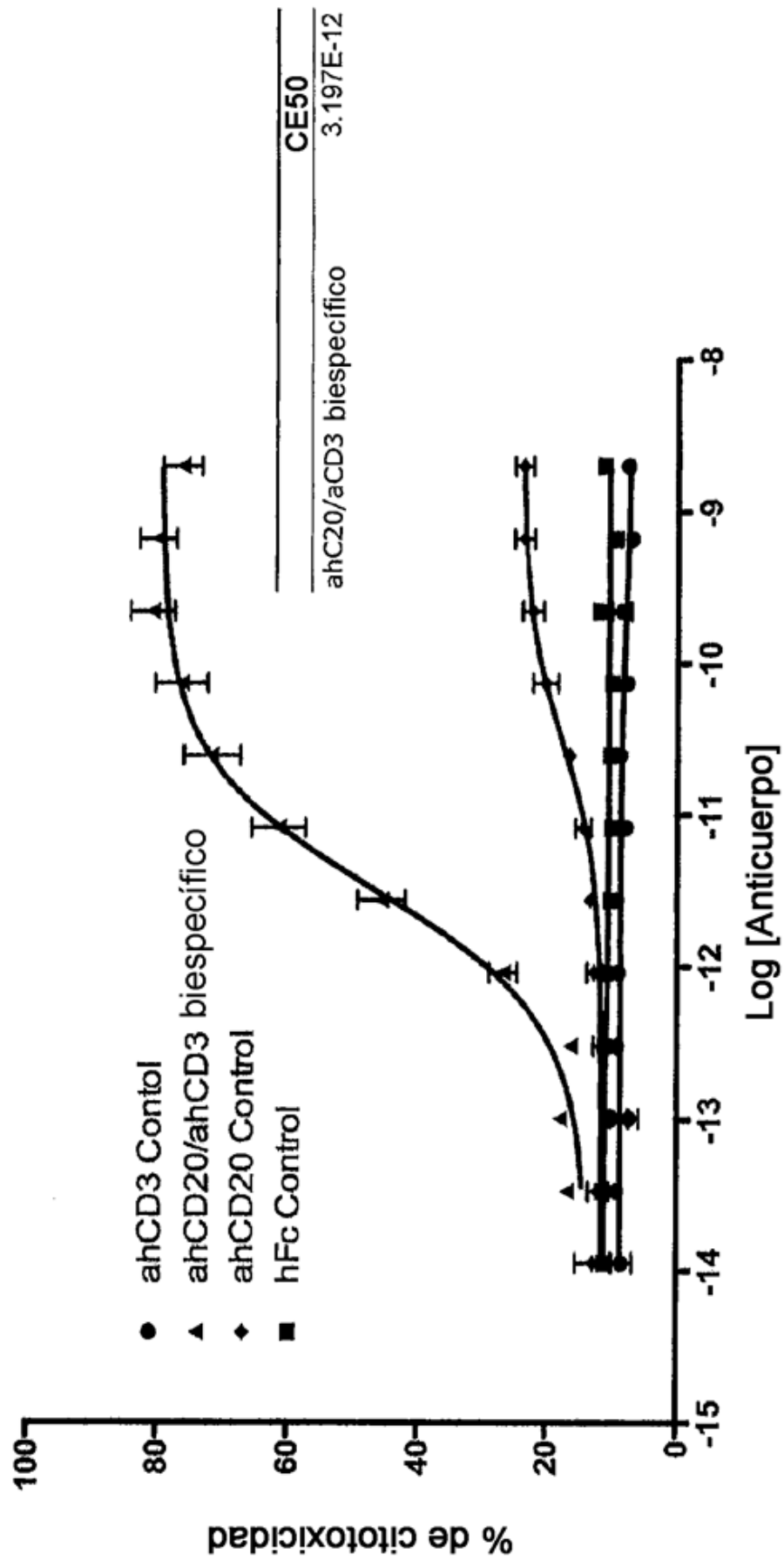


FIG. 7

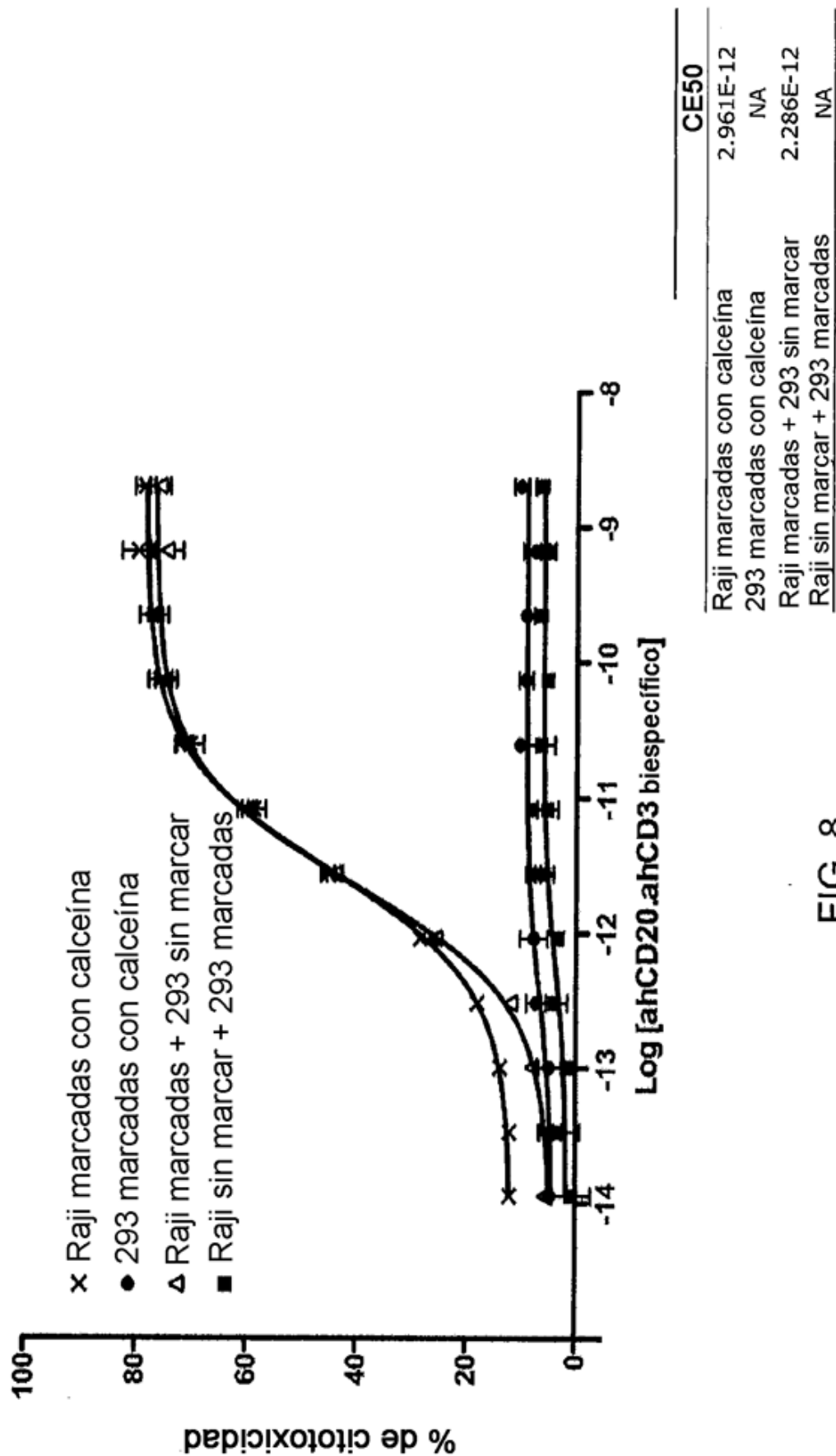


FIG. 8

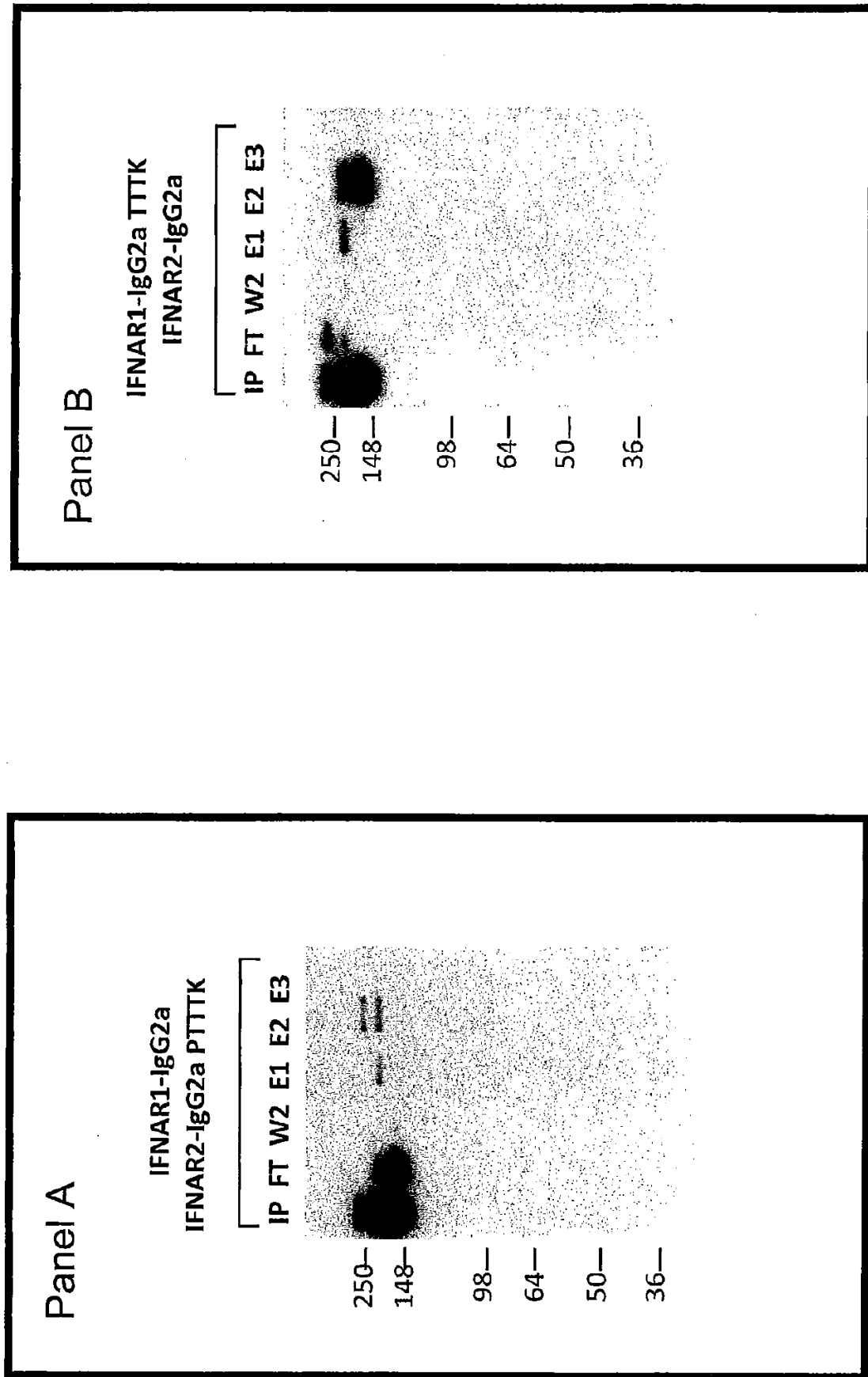


FIG. 9

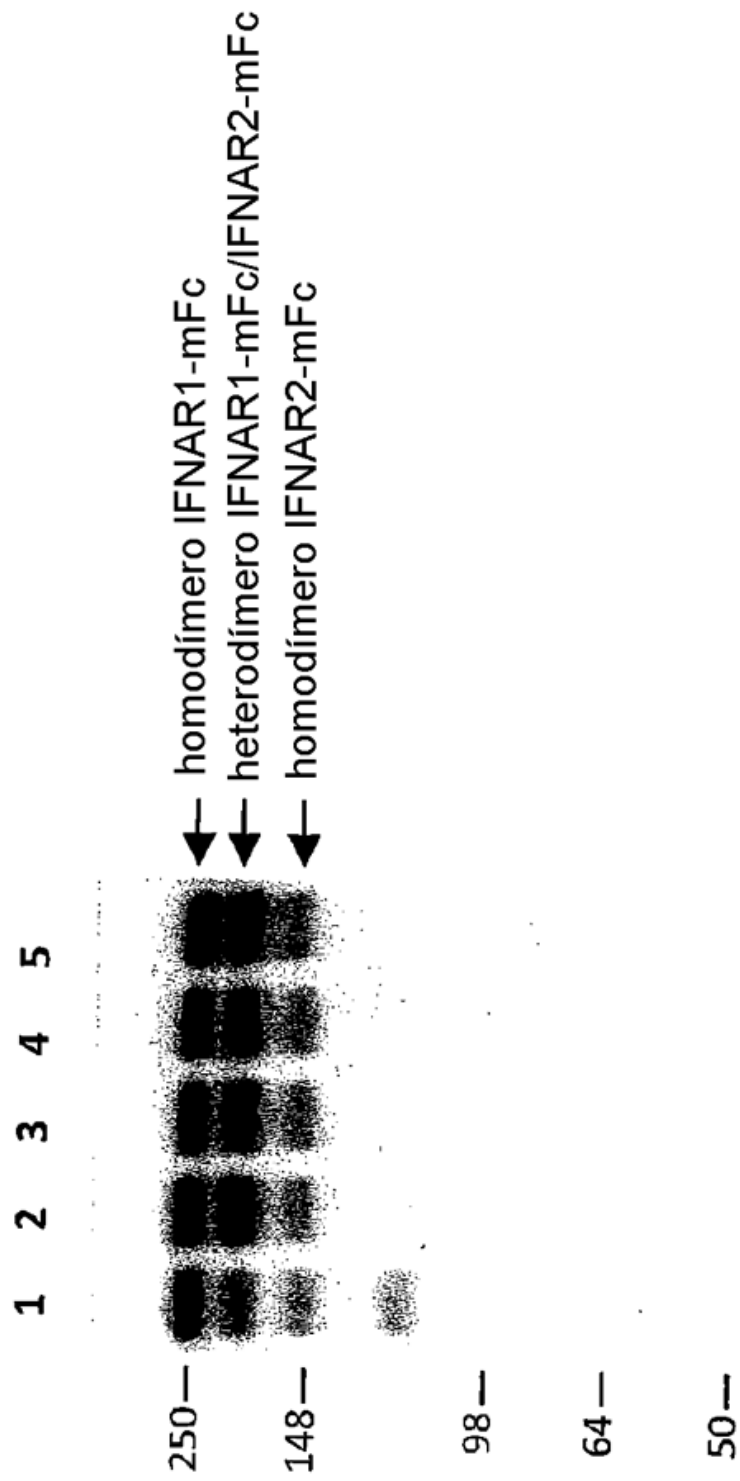


FIG. 10