

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 207**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.08.2011 E 11788226 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015 EP 2606064**

54 Título: **Métodos para la generación de anticuerpos multiespecíficos y multivalentes**

30 Prioridad:

15.02.2011 US 201161443008 P

19.07.2011 US 201161509260 P

16.08.2010 US 374159 P

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

03.06.2015

73 Titular/es:

**NOVIMMUNE S.A. (100.0%)
14 ch. Des Aulx Plan-Les-Quates
1228 Geneva, CH**

72 Inventor/es:

**FISCHER, NICOLAS;
MAGISTRELLI, GIOVANNI;
GUENEAU, FRANCK;
RAVN, ULLA y
ELSON, GREG**

74 Agente/Representante:

SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro

ES 2 537 207 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

Métodos para la generación de anticuerpos multiespecíficos y multivalentes

5 Campo de la invención

La invención se refiere a la generación de nuevos anticuerpos monoclonales biespecíficos que portan una especificidad diferente para cada sitio de unión de la molécula de inmunoglobulina. Los anticuerpos de la invención están compuestos de una única cadena pesada y dos cadenas ligeras diferentes, una que contiene un dominio constante Kappa y la otra un dominio constante Lambda. La presente invención en particular se refiere al aislamiento de anticuerpos de diferentes especificidades pero que comparten una cadena pesada común. La invención se refiere además a la co-expresión controlada de dos cadenas ligeras y una única cadena pesada que conducen al ensamblaje de anticuerpos mono-específicos y biespecíficos. La invención proporciona un medio de producir un anticuerpo biespecífico y bivalente completamente humano que no está alterado en su secuencia y no implica el uso de enlazadores de otras secuencias no humanas, así como mezclas de anticuerpos de dos anticuerpos mono-específicos y un anticuerpo biespecífico. La invención también proporciona los medios para purificar eficazmente el anticuerpo biespecífico.

20 Antecedentes de la invención

Un anticuerpo está compuesto de cuatro polipéptidos: dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. La parte de unión a antígeno de un anticuerpo se forma por el dominio variable de cadena ligera (VL) y el dominio variable de cadena pesada (VH). En una extremidad de estos dominios seis bucles forman el sitio de unión a antígeno y también se denominan las regiones determinantes de complementariedad (CDR). Tres CDR están localizadas en el dominio VH (H1, H2 y H3) y las otras tres están en el dominio VL (L1, L2 y L3). Durante el desarrollo de linfocitos B se forma una región de inmunoglobulina única por recombinación somática conocida como recombinación V(D)J. La región variable de la cadena pesada o ligera de inmunoglobulina está codificada por diferentes segmentos génicos. La cadena pesada está codificada por tres segmentos denominados segmentos variables (V), de diversidad (D) y de unión (J) mientras que la variable de cadena ligera está formada por la recombinación de solamente dos segmentos V y J. Puede generarse un gran número de paratopos de anticuerpos por recombinación entre una de las múltiples copias de los segmentos V, D y J que están presentes en el genoma. El segmento V codifica la CDR1 y CDR2 mientras que la CDR3 se genera por los acontecimientos de recombinación. Durante el transcurso de la respuesta inmunitaria se introduce más diversidad en el sitio de unión a antígeno por un proceso denominado hipermutación somática (SHM). Durante este proceso se introducen mutaciones puntuales en los genes variables de las cadenas pesada y ligera y en particular en las regiones que codifican las CDR. Esta variabilidad adicional permite la selección y expansión de linfocitos B que expresan variantes de anticuerpo con afinidad mejorada por su antígeno afín.

La amplia mayoría de inmunoglobulinas son moléculas bivalentes y mono-específicas que portan la misma especificidad en ambas ramas ya que están compuestas de dos polipéptidos de cadena pesada idénticos y dos polipéptidos de cadena ligera idénticos. Sin embargo, se ha reconocido muy pronto durante el desarrollo de la tecnología de hibridomas que pueden crearse hibridomas híbridos por un acontecimiento de fusión entre dos hibridomas (Suresh MR *et al.*, *Methods Enzymol* 1986; 121: 210-228). Estos "cuadromas" expresan dos cadenas pesadas diferentes y dos ligeras diferentes y de este modo producen una diversidad de especies de anticuerpos diferentes que resultan del emparejamiento aleatorio de las cadenas pesada y ligera. Entre estas especies diferentes, se generan anticuerpos biespecíficos (bsAb), que portan una especificidad diferente en cada rama. Otra excepción de origen natural es la inmunoglobulina del isotipo IgG4 que es capaz de experimentar intercambio de cadena pesada debido a una dimerización menos estable mediada por la región bisagra de ese isotipo (van der Neut Kofschoten M *et al.*, *Science*. 2007 317(5844):1554-7). Aunque este intercambio parece suceder *in vivo*, su importancia biológica aún no está clara.

Han surgido anticuerpos monoclonales como una clase exitosa y atractiva de moléculas para intervención terapéutica en varias áreas de la enfermedad humana. Sin embargo, la dirección a o neutralización de una única proteína no siempre es suficiente para conseguir eficacia en ciertas enfermedades lo que limita el uso terapéutico de anticuerpos monoclonales. Cada vez está más claro que en varias indicaciones la neutralización de un componente de un sistema biológico no es suficiente para conseguir eficacia. Una solución a este problema es la co-administración de varios anticuerpos monoclonales. Este enfoque se complica sin embargo por aspectos reguladores si los anticuerpos para combinar no se han aprobado previamente de forma individual. Además, los enfoques de combinación también son costosos desde una perspectiva de fabricación. En consecuencia, existe la necesidad de anticuerpos y productos terapéuticos que permitan la dirección a múltiples antígenos con una única molécula.

Sumario de la invención

La invención posibilita la identificación, producción y purificación de anticuerpos biespecíficos que son indistinguibles en su secuencia de anticuerpos convencionales. La invención también posibilita la producción y purificación de una mezcla de anticuerpos sencilla de tres o más anticuerpos que portan todos la misma cadena pesada. La naturaleza

no modificada de los anticuerpos de la invención les proporciona características de fabricación favorables similares a los anticuerpos monoclonales convencionales.

Los anticuerpos biespecíficos de la invención se generan usando las siguientes etapas:

- Se aíslan dos anticuerpos que tienen especificidades diferentes y que comparten el mismo dominio variable de cadena pesada pero diferentes dominios variables de cadena ligera. Esta etapa se facilita mediante el uso de bibliotecas de anticuerpos que tienen una cadena pesada fija o animales transgénicos que contienen un único gen VH.
- El dominio variable de cadena pesada se fusiona con la región constante de una cadena pesada, un dominio variable de cadena ligera se fusiona a un dominio constante Kappa y el otro dominio variable de cadena ligera se fusiona con un dominio constante Lambda. Preferentemente, el dominio variable de cadena ligera fusionado con el dominio constante Kappa es del tipo Kappa y el dominio variable de cadena ligera fusionado con el dominio constante Lambda es del tipo Lambda. Sin embargo la invención también permite la generación de cadenas ligeras híbridas de modo que dos dominios variables de cadena ligera del mismo tipo puedan usarse para generar anticuerpos biespecíficos de la invención.
- Las tres cadenas se co-expresan en células de mamífero lo que conduce al ensamblaje y la secreción en el sobrenadante de una mezcla de tres anticuerpos: dos anticuerpos monoespecíficos y un anticuerpo biespecífico que porta dos cadenas ligeras diferentes. La relación de los diferentes anticuerpos depende de la expresión relativa de las cadenas y su ensamblaje en una IgG. La invención proporciona métodos para ajustar estas relaciones y maximizar la producción de anticuerpo biespecífico.
- La mezcla de anticuerpos se purifica usando técnicas de cromatografía convencionales usadas para purificación de anticuerpos. La mezcla de anticuerpos puede caracterizarse y usarse como un agente multi-dirección.
- El anticuerpo biespecífico se purifica usando en una cromatografía de afinidad de manera consecutiva medios que se unen específicamente con regiones constantes Kappa humana y Lambda humana. Este proceso de purificación es independiente de la secuencia de los dominios variables de cadena ligera y es por lo tanto genérico para todos los anticuerpos biespecíficos de la invención.
- El anticuerpo biespecífico aislado que porta una cadena ligera que contiene un dominio constante Kappa y una cadena ligera que contiene un dominio constante Lambda se caracteriza usando métodos bioquímicos e inmunológicos diferentes.
- El anticuerpo biespecífico de la invención puede usarse para la intervención terapéutica o como un reactivo de investigación o diagnóstico.

La invención proporciona anticuerpos monoclonales que portan una especificidad diferente en cada sitio de combinación e incluyendo dos copias de un único polipéptido de cadena pesada y una primera cadena ligera y una segunda cadena ligera, en los que las primera y segunda cadenas ligeras son diferentes.

En algunos anticuerpos, al menos una primera parte de la primera cadena ligera es del tipo Kappa y al menos una parte de la segunda cadena ligera es del tipo Lambda. En algunos anticuerpos, la primera cadena ligera incluye al menos una región constante Kappa. En algunos anticuerpos, la primera cadena ligera incluye además una región variable Kappa. En algunos anticuerpos, la primera cadena ligera incluye además una región variable Lambda. En algunos anticuerpos, la segunda cadena ligera incluye al menos una región constante Lambda. En algunos anticuerpos, la segunda cadena ligera incluye además una región variable Lambda. En algunos anticuerpos, la segunda cadena ligera incluye además una región variable Kappa. En algunos anticuerpos, la primera cadena ligera incluye una región constante Kappa y una región variable Kappa, y la segunda cadena ligera incluye una región constante Lambda y una región variable Lambda.

En algunas realizaciones, las secuencias de región marco conservada constante y variable son humanas.

La invención también proporciona métodos para producir y generar un anticuerpo biespecífico a) aislando una región de anticuerpo o fragmento de anticuerpo que tiene una especificidad determinada por un dominio variable de cadena pesada combinado con un primer dominio variable de cadena ligera; b) aislando una región de anticuerpo o fragmento de anticuerpo que tiene una especificidad diferente determinada por el mismo dominio variable de cadena pesada que el anticuerpo de la etapa a) combinado con un segundo dominio variable de cadena ligera; c) co-expresando en una célula: (i) el dominio variable de cadena pesada común fusionado con una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina; (ii) el dominio variable de cadena ligera fusionado con un dominio constante de cadena ligera del tipo Kappa o fusionado con un dominio constante de cadena ligera del tipo Lambda; y (iii) el segundo dominio variable de cadena ligera fusionado con un dominio constante de cadena ligera de un tipo diferente que el primer dominio constante variable.

Algunos métodos también incluyen la etapa adicional de d) aislar los anticuerpos biespecíficos producidos a partir de los anticuerpos monoespecíficos producidos. Por ejemplo, en algunos métodos, el aislamiento se consigue usando una etapa de purificación de cromatografía de afinidad. En algunos métodos, la etapa de purificación se realiza usando medios de cromatografía de afinidad específicos de dominio constante Kappa, dominio constante Lambda o tanto específico de dominio constante Kappa como específico de dominio constante Lambda.

En algunos métodos, un dominio variable de cadena ligera Kappa se fusiona con una región constante del tipo Kappa. En algunos métodos, un dominio variable de cadena ligera Kappa se fusiona con una región constante del tipo Lambda. En algunos métodos, un dominio variable de cadena ligera Lambda se fusiona con una región constante del tipo Kappa. En algunos métodos, un dominio variable de cadena ligera Lambda se fusiona con una

En algunos métodos, las etapas a) y b) se facilitan mediante el uso de bibliotecas de anticuerpos que tienen una cadena pesada común y diversidad restringida al dominio variable de cadena ligera. El dominio variable de cadena pesada que se fija en una de dichas bibliotecas puede basarse en diferentes genes de línea germinal variables diferentes y tiene secuencias diferentes tanto en las regiones CDR como en las marco conservadas. En algunos métodos, dichas bibliotecas se han diseñado usando diferentes tipos de dominios variables de cadena pesada y se podrían usarse para generar anticuerpos de la invención.

En algunos métodos, la biblioteca de anticuerpos se presenta en bacteriófagos filamentosos, en la superficie de células de levadura, bacterias o mamíferos o se usan para ribosoma u otro tipo de presentación *in vitro*.

La invención también proporciona métodos para preparar un anticuerpo biespecífico que se une específicamente con un primer antígeno y un segundo antígeno, en los que el primer y segundo antígenos son diferentes, a) proporcionando una primera molécula de ácido nucleico que codifica un primer polipéptido que comprende una región de cadena variable pesada de un polipéptido de inmunoglobulina o fragmento del mismo que se une con el primer antígeno acoplado con una región constante de inmunoglobulina; b) proporcionando una segunda molécula de ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido que comprende una región variable de cadena ligera del polipéptido de inmunoglobulina o fragmento del mismo que se une con el primer antígeno acoplado con una primera región constante de cadena ligera de tipo Kappa o tipo Lambda; c) proporcionando una tercera molécula de ácido nucleico que codifica un tercer polipéptido que comprende una región variable de cadena ligera de un polipéptido de inmunoglobulina o fragmento del mismo que se une con el segundo antígeno acoplado con una segunda región constante de cadena ligera de tipo Kappa o de tipo Lambda, en el que los primer y segundo dominios constantes de cadena ligera son tipos diferentes; y d) cultivando una célula hospedadora que comprende las primera, segunda y tercera moléculas de ácido nucleico en condiciones que permiten la expresión de los primer, segundo y tercer polipéptidos.

Algunos métodos también incluyen la etapa adicional de e) recuperar el anticuerpo biespecífico. Por ejemplo, en algunos métodos, el anticuerpo biespecífico se recupera en la etapa e) usando una etapa de purificación de cromatografía de afinidad. En algunos métodos, la etapa de purificación se realiza usando medios de cromatografía de afinidad específicos de dominio constante Kappa, de dominio constante Lambda o tanto específicos de dominio constante Kappa como específicos de dominio específico Lambda.

En algunos métodos, el segundo ácido nucleico codifica un dominio variable de cadena ligera de tipo Kappa. En algunos métodos, el segundo ácido nucleico codifica una región constante de tipo Kappa. En algunos métodos, el segundo ácido nucleico codifica una región constante de tipo Lambda. En algunos métodos, el segundo ácido nucleico codifica un dominio variable de cadena ligera de tipo Lambda. En algunos métodos, el segundo ácido nucleico codifica una región constante de tipo Kappa. En algunos métodos, el segundo ácido nucleico codifica una región constante de tipo Lambda. En algunos métodos, el tercer ácido nucleico codifica un dominio variable de cadena ligera de tipo Kappa. En algunos métodos, el tercer ácido nucleico codifica una región constante de tipo Kappa. En algunos métodos, el tercer ácido nucleico codifica una región constante de tipo Lambda. En algunos métodos, el tercer ácido nucleico codifica un dominio variable de cadena ligera de tipo Lambda. En algunos métodos, el tercer ácido nucleico codifica una región constante de tipo Kappa. En algunos métodos, el tercer ácido nucleico codifica una región constante de tipo Lambda.

La invención también proporciona una mezcla de anticuerpos que incluye dos anticuerpos mono-específicos y un anticuerpo biespecífico, que tienen todos una cadena pesada común. Por ejemplo, el anticuerpo biespecífico es cualquiera de los anticuerpos biespecíficos descritos en el presente documento o preparado usando métodos descritos en el presente documento. La invención también proporciona métodos para generar dicha mezcla de anticuerpos a) aislando una región de anticuerpo o fragmento de anticuerpo que tiene una especificidad determinada por un dominio variable de cadena pesada combinado con un primer dominio variable de cadena ligera; b) aislando una región de anticuerpo o fragmento de anticuerpo que tiene una especificidad diferente determinada por el mismo dominio variable de cadena pesada que el anticuerpo de la etapa a) combinado con un segundo dominio variable de cadena ligera; c) co-expresando en una célula: (i) el dominio variable de cadena pesada común fusionado con una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina; (ii) el primer dominio variable de cadena ligera fusionado con un dominio constante de cadena ligera del tipo Kappa o fusionado con un dominio constante de cadena ligera del tipo Lambda; y (iii) el segundo dominio variable de cadena ligera fusionado con un dominio constante de cadena ligera del tipo Kappa o fusionado con un dominio constante de cadena ligera del tipo Lambda. En algunos métodos también incluyen la etapa adicional de d) aislar la mezcla de anticuerpos producida en la etapa c) del sobrenadante de cultivo celular.

La invención también proporciona métodos para dos o más, por ejemplo, tres o más anticuerpos no idénticos en una única célula hospedadora recombinante a) expresando en la única célula hospedadora recombinante una o más secuencias de ácido nucleico que codifican una cadena pesada de inmunoglobulina común y al menos dos, por ejemplo, al menos tres, cadenas ligeras de inmunoglobulina diferentes que son capaces de emparejarse con la cadena pesada de inmunoglobulina común para formar dominios de unión a antígeno funcionales para producir dos o más, por ejemplo, tres o más, anticuerpos no idénticos que comprenden la cadena pesada común. Algunos métodos también incluyen la etapa de recoger o purificar de otro modo los dos o más, por ejemplo, tres o más, anticuerpos no idénticos de la célula hospedadora recombinante o de un cultivo de la célula hospedadora. La célula hospedadora es, por ejemplo, una célula de mamífero. En algunos métodos, los anticuerpos no idénticos incluyen anticuerpos monoespecíficos y biespecíficos.

En algunos métodos, los anticuerpos no idénticos se dirigen a diferentes epítopos del mismo antígeno diana. En algunos métodos, los anticuerpos no idénticos tienen diferentes afinidades para el mismo epítipo diana. En algunos métodos, los anticuerpos no idénticos se unen con diferentes antígenos.

En algunos métodos, los dos o más, por ejemplo, tres o más, anticuerpos no idénticos se seleccionan de forma independiente del grupo que consiste en: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE e IgM.

En algunos métodos, los dos o más, por ejemplo, tres o más, anticuerpos no idénticos contienen una región Fc modificada que modifica las funciones efectoras de los anticuerpos tales como citotoxicidad mediada por células dependiente de antígeno (ADCC), citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), fagocitosis celular dependiente de antígeno (ADCP) o sus propiedades farmacocinéticas alterando su unión con los receptores de Fc neonatales.

En algunos métodos, las dos o más, por ejemplo tres o más inmunoglobulinas diferentes están en el formato F(ab')₂.

En algunos métodos, la o las secuencias de ácido nucleico se expresan de forma estable en la célula hospedadora.

En algunos métodos, los dos o más, por ejemplo tres o más, anticuerpos no idénticos se producen por la célula hospedadora *in vitro*.

Algunos métodos también incluyen las etapas adicionales de seleccionar al menos una célula hospedadora ensayando los dos o más, por ejemplo, tres o más, anticuerpos no idénticos producidos por la célula hospedadora recombinante por su capacidad para unirse con un antígeno diana; cultivando la célula hospedadora recombinante; y aislando los tres o más anticuerpos no idénticos. Los anticuerpos pueden aislarse usando cualquiera de las técnicas descritas en el presente documento o cualquier otro método reconocido en la técnica adecuado.

En algunos métodos, las diferentes cadenas ligeras de inmunoglobulina tienen regiones constantes idénticas. En algunos métodos, las cadenas ligeras de inmunoglobulina diferentes tienen regiones constantes diferentes.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una representación esquemática de diferentes formatos de anticuerpos biespecíficos. A. Formatos basados en fragmentos de anticuerpos: Fab con enlace X, fragmentos Fab reticulados; tascFv/BI TE, participante de linfocitos T biespecíficos/scFv en tándem; Db, diacuerpo; taDb, diacuerpo en tándem. B. Formatos basados en fusiones de Fc: Db-Fc, fusión de diacuerpo-Fc; fusión taDb-Fc, fusión de diacuerpo en tándem-Fc; taDb-CH₃, fusión de diacuerpo en tándem-CH₃; (scFv)₄-Fc, fusión de tetra scFv-Fc; DVD-Ig, inmunoglobulina de dominio variable doble. C. Formatos IgG: botón-oyal y SEED, dominio modificado técnicamente con intercambio de cadena; CrossMab, botón-oyal combinado con intercambio de dominio de cadena pesada y ligera; bsAb, anticuerpo biespecífico derivado de cuadroma; sdAb, anticuerpo basado en dominio individual.

La Figura 2 es una representación esquemática de posibles modos de acción permitidos por anticuerpos biespecíficos. 2A. Dirección de dos antígenos. 2B. Redirección de un resto tóxico o actividad para una célula diana. 2C. Aumento de la selectividad mediada por afeidez.

Las Figuras 3A-3C son una representación esquemática de la estructura de diferentes anticuerpos biespecíficos de la invención compuestos por dos copias de un único polipéptido de cadena pesada y dos polipéptidos de cadena ligera diferentes. No se pretende que las localizaciones y/o disposiciones de la cadena ligera Kappa y la cadena ligera Lambda (o partes de las mismas) mostradas en estas figuras sean limitantes. Los expertos habituales en la materia apreciarán que la cadena ligera Kappa y la cadena ligera Lambda (o partes de las mismas) también pueden disponerse para producir la imagen especular de los anticuerpos biespecíficos mostrados en las Figuras 3A-3C. Los expertos habituales en la materia también apreciarán que los anticuerpos biespecíficos que se representan en un formato de IgG completo en las Figuras 3A-3C también pueden generarse usando otros isotipos de inmunoglobulina o en otros formatos de inmunoglobulina tales como F(ab')₂. 3A. Dominio variable Kappa fusionado con un dominio constante Kappa y dominio variable Lambda fusionado con un dominio constante Lambda. 3B. Dominios variables Kappa fusionados con un dominio constante Kappa y un dominio constante Lambda. 3C. Dominios variables Lambda fusionados con un dominio constante Kappa y un dominio constante Lambda.

La Figura 4 es una ilustración de un ensayo de ELISA que ensaya clones específicos para hCXCL10-NusA o

hIL6RC y que portan el mismo dominio variable de cadena pesada. Cada clon se ensayó frente a ambas dianas para demostrar su especificidad.

Las Figuras 5A-C son una serie de ilustraciones que representan los tres tipos de bibliotecas usadas en los ejemplos, para cada tipo de biblioteca, se mantuvieron por separado las bibliotecas de V_{κ} y V_{λ} . Figuras 5A y C: Dos conjuntos de bibliotecas que contienen un dominio variable VH3-23 fijo que difiere solamente en su secuencia de CDR H3 que se indica debajo de la H3 (definición de CDR de acuerdo con IMGT). El repertorio de cadena ligera se diversificó bien insertando secuencias aleatorias en la CDRL3 de genes variables de cadena ligera seleccionados (Figuras 5A y 5C) o capturando dominios variables de cadena ligera reordenados de forma natural aislados de donantes humanos que pueden incluir todos los genes variables humanos y contienen diversidad en las 3 CDR (Figura 5B). Las diferentes estrategias de diversificación se ilustran por líneas horizontales debajo de la región diversificada de los repertorios de cadena ligera.

Las Figuras 6A-6B son gráficas que representan los resultados de ELISA usando IgG λ e IgG κ monoespecíficos seleccionados frente a hIFN γ e IL6RC, respectivamente y que portan una cadena pesada común. Los formatos de ELISA se representan esquemáticamente junto a cada gráfica. En la Figura 6A, se inmovilizó INF γ en la placa, se incubó con el IgG λ anti-INF γ o el IgG κ anti-IL6RC (es decir, receptor IL-6R/complejo soluble de IL-6) y ambos se detectaron con anticuerpos C κ anti-humano o C λ anti-humano acoplados con peroxidasa de rábano rusticano. La señal se reveló por colorimetría y se cuantificó usando un lector de placas de microtitulación.

La Figura 7 es una representación esquemática de vectores usados para la co-expresión de una cadena pesada y dos cadenas ligeras en células de mamífero. Ambos vectores contienen tres promotores para conducir la expresión génica, un gen de glutamina sintetasa para la selección de la línea celular estable. En el segundo vector, pNovl κ H λ , la expresión de una ligera Kappa adicional está conducida por un sitio de entrada ribosómica interno (IRES). Se indican los diferentes genes y elementos de control genéticos. hCMV, promotor de citomegalovirus humano; SV40, promotor de V40; señal de poliadenilación pA; VH, dominio variable de cadena pesada; VK, dominio Kappa variable de cadena ligera; CK dominio Kappa constante de cadena ligera; VL, dominio Lambda variable de cadena ligera; CL2, dominio Lambda constante de cadena ligera 2; ADNc de GS, ADNc de Glutamina Sintetasa; AmpR; marcador seleccionable para resistencia a ampicilina. Se indica un número seleccionado de sitios de restricción.

La Figura 8A es una representación esquemática del proceso de purificación para anticuerpos biespecíficos de la invención. La Figura 8B es una ilustración que representa la co-expresión, purificación y análisis de SDS-PAGE de anticuerpos biespecíficos de la invención. El gel se tiñó usando simply blue. PA: Proteína A; K: Kappaselect; λ : Lambda select; FT: flujo continuo de columna; E: fracción de elución.

La Figura 9 es una ilustración de un análisis de SDS-PAGE de IgG total purificado de células de mamífero transfectadas con vectores que permiten diferentes niveles de expresión de cadena ligera Kappa usando diferentes elementos de IRES dentro del vector pNovl κ H λ (carriles 1-5) y en comparación con el vector pNovl κ H λ . Las intensidades relativas de la cadena ligera Kappa y Lambda indican que los niveles de expresión pueden modularse.

La figura 10A es una ilustración que representa el análisis en gel de IEF de IgG monoespecífico purificado ($\kappa\kappa$ y $\lambda\lambda$) e IgG biespecífico ($\kappa\lambda$). La Figura 10B es una ilustración del análisis por IEX-HPLC de anticuerpos monoespecíficos y biespecíficos. Los tres anticuerpos se inyectaron independientemente y su perfil de elución se superpone en la gráfica. Se muestra el gradiente usado en el experimento.

La Figura 11 representa los ensayos de ELISA usados para determinar la capacidad del anticuerpo biespecífico para unirse con ambas dianas y la presencia de una cadena ligera Kappa y una Lambda en la molécula. La Figura 11A es una representación esquemática del formato de ELISA. La Figura 11B es una gráfica que representa los resultados del ELISA con INF γ inmovilizado en la placa. La Figura 11C es una gráfica que representa los resultados del ELISA con IL-6RC inmovilizado en la placa. IgG κ , anticuerpo monoespecífico anti-IL6RC; IgG λ , anticuerpo monoespecífico anti-INF γ ; IgG $\kappa\lambda$, anticuerpo biespecífico anti-IL6RC/anti-INF γ . Se indican los anticuerpos de detección secundarios HRP anti-Lambda humano y HRP anti-Kappa humano.

La Figura 12 es una ilustración del análisis de SPR de anticuerpos biespecíficos IgG $\kappa\lambda$. En la Figura 12A, se inmovilizó INF γ en la superficie de la microplaca de Biacore y se inyectaron anticuerpo monoespecífico anti-IL6RC (IgG κ), anticuerpo monoespecífico anti-INF γ (IgG λ) y anticuerpo biespecífico anti-IL6RC/anti-INF γ (IgG $\kappa\lambda$) en el superficie seguido de inyección de IL6RC. En la Figura 12B, el anticuerpo biespecífico anti-IL6RC/anti-INF γ (IgG $\kappa\lambda$) se inmovilizó en la superficie de microplacas y se inyectaron anticuerpos anti-Kappa humano y anti-Lambda humano en la misma concentración. El experimento se repitió invirtiendo el orden de inyección de los anticuerpos con resultados idénticos.

La Figura 13 es una representación esquemática de una visión de conjunto de un método para generar los anticuerpos biespecíficos y multi-específicos descritos en el presente documento en células CHO.

La Figura 14A es una gráfica que representa el crecimiento y los perfiles de producción de anticuerpos de grupos de células CHO a un nivel de producción de escala pequeña en un matraz de Erlenmeyer. Los niveles de producción de anticuerpo se determinaron por análisis de HPLC-proteína A. VCC significa concentración de células viables y Ab significa anticuerpo. La Figura 14B es una gráfica que representa la comparación del crecimiento y el perfil de producción de anticuerpos entre fermentación a pequeña escala y a escala media. Los niveles de producción de anticuerpo se determinaron por análisis de HPLC-proteína A. VCC significa concentración de células viables y Ab significa anticuerpo.

Las Figuras 15A y 15B son una serie de gráficas que representan la productividad de anticuerpos en una placa

de 96 pocillos (96wpl) de líneas celulares que expresan anticuerpo mono Kappa (KK), mono Lambda (LL) y biespecífico Kappa Lambda (KL) cinco semanas después de la transfección en dos experimentos independientes. Los niveles de producción de anticuerpo se determinaron por ELISA. mAb significa anticuerpo monoclonal. Las Figuras 15C y 15D son una serie de gráficas que representan la productividad de anticuerpos en cultivos discontinuos con crecimiento excesivo en placas de 24 pocillos (24wpl) con agitación de mono Kappa (KK), mono Lambda (LL) y Kappa biespecífico.

La Figura 16A es una ilustración que representa los resultados del análisis SDS-PAGE reducido de moléculas de IgG κ mono específicas (es decir, moléculas mono específicas que tienen cadenas ligeras Kappa, también denominadas en el presente documento moléculas "Mono κ "), moléculas de IgG λ mono específicas (es decir, moléculas mono específicas que tienen cadenas ligeras Lambda, también denominadas en el presente documento moléculas "mono λ "), y anticuerpos $\kappa\lambda$ (es decir, anticuerpos que tienen cadenas ligeras tanto Kappa como Lambda) mediante las etapas de purificación descritas anteriormente. La Figura 16B es una ilustración que representa los resultados del análisis SDS-PAGE reducido de anticuerpos mono κ , mono λ y $\kappa\lambda$ obtenidos siguiendo las etapas de elución descritas anteriormente. En las Figuras 16A y 16B, el gel se tiñó usando simply blue, y E significa fracción de elución, FT significa flujo continuo de columna y MM significa marcador de peso molecular. La Figura 16C es una ilustración que representa el análisis en gel de isoelectroenfoque (IEF) de moléculas de IgG mono específicas purificadas IgG ($\kappa\kappa$ y $\lambda\lambda$) y la molécula de IgG biespecífica ($\kappa\lambda$).

Las Figuras 17A-D son una serie de gráficas e ilustraciones que representan que los métodos para generar anticuerpos biespecíficos de la invención producen anticuerpos que incluyen tanto una cadena ligera Kappa como una cadena ligera Lambda y que los anticuerpos purificados muestran biespecificidad. Las gráficas representan los resultados de ELISA usando cuerpo $\kappa\lambda$ purificado contra hIFN γ e IL6RC. El ELISA se realizó usando anticuerpos de detección anti-Kappa o anti-Lambda como se indica. Las Figuras 17A-D ilustran que la cadena ligera Lambda se une con hIFN γ , mientras que la cadena ligera Kappa se une con IL6RC. NI-0501 es un anticuerpo de cadena ligera Lambda anti-hIFN γ de control, y NI-1201 es un anticuerpo de cadena ligera Kappa anti-IL6RC de control.

La Figura 18 es una ilustración de un gel de IEF de anticuerpos mono específicos y biespecíficos diferentes, que indica que la diferencia en pI puede variar dependiendo de la secuencia variable ligera de anticuerpo. Carril 1, IgG κ anti-NusA; Carril 2, IgG $\kappa\lambda$ anti-NusA/anti-INF γ ; Carril 3, IgG λ anti-INF γ ; Carril 4, IgG κ anti-IL6RC; Carril 5, IgG $\kappa\lambda$ anti-IL6RC/anti-IL6RC; Carril 6, IgG λ anti-IL6RC.

La Figura 19 es una representación esquemática de tres proteínas híbridas diferentes obtenidas combinando un gen Lambda variable y un gen constante Kappa. Los puntos de fusión difieren entre los diferentes híbridos: en 19A, VLambda fusionado con CKappa; en 19B, VLambda hasta CDR3 fusionado con VKappa FR4 y CKappa; y en 19C, VLambda y los primeros cuatro aminoácidos de CLambda y CKappa excluyendo los primeros cuatro aminoácidos. CDR, Región Determinante de Complementariedad; FR, región marco conservada.

La Figura 20 es una ilustración del análisis de dos construcciones de cadena ligera híbridas en un sistema Bionalyzer 2100 usando una microplaca de Proteína 80 (Agilent Technologies). Se indica el electroferograma correspondiente a la imagen en gel.

La Figura 21 es una serie de gráficas que representan los resultados del ELISA de respuesta a dosis usando scFv específico para INF γ (A) o IL6RC (B) en el que el dominio VH fue el VH común originalmente seleccionado (curvas superiores) u otros dominios VH que permiten la expresión y purificación de scFv (curvas inferiores).

La Figura 22 es una gráfica que representa los resultados obtenidos para la cuantificación de anticuerpo biespecífico IgG $\kappa\lambda$ usando un formato de ELISA de tipo sándwich. La respuesta a dosis se realizó usando anticuerpo biespecífico purificado solo o mezclado con anticuerpos Kappa o Lambda mono específicos a diferentes relaciones según se indica, para evaluar la interferencia de estas moléculas en el ensayo.

Descripción detallada

Para superar las limitaciones de los productos terapéuticos de anticuerpo monoclonal y monovalente que solamente pueden dirigirse a un único antígeno o para superar las limitaciones de las combinaciones de productos terapéuticos de anticuerpos monovalentes, se han dirigido intensos esfuerzos a dirección de múltiples antígenos usando formatos de anticuerpos biespecíficos. Dichos anticuerpos que portan más de una especificidad son de interés en biotecnología y tienen gran potencial como agentes terapéuticos que permiten nuevos enfoques terapéuticos (Fischer y Léger, Pathobiology 2007; 74:3-14; Morrison SL Nature Biotechnol 2007; 25:1233-1234). Los anticuerpos biespecíficos son ventajosos ya que permiten dirección múltiple, aumentan el potencial terapéutico, abordan la redundancia de los sistemas biológicos, y proporcionan nuevos mecanismos de acción mediante capacidades tales como redirección y/o especificidad aumentada. A medida que las dianas terapéuticas individuales validadas se agotan más, las combinaciones permitidas por anticuerpos biespecíficos proporcionan un nuevo universo expansivo de dianas para agentes terapéuticos y aplicaciones.

Se han usado varias estrategias para generar dichas moléculas biespecíficas tales como reticulación química de fragmentos de anticuerpo, heterodimerización forzada, tecnología de cuadroma, fusión de fragmentos de anticuerpo mediante enlazadores polipeptídicos y uso de anticuerpos de un único dominio. La disponibilidad de tecnologías de ADN recombinante ha conducido a la generación de una multitud de formatos de anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Ridgway JB *et al.* (1996) Protein Eng 9: 617-621). Se han introducido frecuentemente enlazadores y mutaciones en diferentes regiones del anticuerpo para forzar la formación de heterodímeros o para conectar

diferentes restos de unión en una única molécula. Sin embargo, estas moléculas modificadas técnicamente tienen con frecuencia malas características de fabricación, así como un riesgo aumentado de inmunogenicidad, que limitan o evitan su progresión hacia el uso clínico. Además, los intentos previos para desarrollar formatos biespecíficos se han limitado debido a factores tales como la escasa estabilidad y/o expresión. Estos enfoques se describen adicionalmente posteriormente y los formatos analizados se ilustran en la Figura 1.

Reticulación química. El uso de reactivos de reticulación química para unir covalentemente dos anticuerpos es un enfoque conceptualmente directo. Se conjugan fragmentos de anticuerpo generados a partir de sus anticuerpos precursores respectivos mediante digestión enzimática o generados mediante tecnologías recombinantes usando reactivos bifuncionales (Glennie MJ *et al.*, J Exp Med 1992; 175:217-225). La homogeneidad del producto es la principal limitación de este enfoque ya que las especies biespecíficas tienen que purificarse a partir de homodímeros y las etapas de modificación puede alterar la integridad y estabilidad de las proteínas. Las múltiples etapas implicadas hacen a este enfoque difícil con respecto a fabricación y homogeneidad de productos.

Cuadromas. Pueden generarse cuadromas y triomas fusionando dos hibridomas o un hibridoma con un linfocito B, respectivamente (Suresh MR *et al.*, Methods Enzymol 1986; 121: 210-228). En este caso la expresión simultánea de dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras conduce al ensamblaje aleatorio de 10 combinaciones de anticuerpo y el bsAb deseado representa solamente una pequeña fracción de los anticuerpos secretados. El bsAb tiene que purificarse usando una combinación de técnicas cromatográficas, y reduce drásticamente los rendimientos de producción. Una limitación importante es que los cuadromas producen bsAb de origen de roedor que limitan su potencial terapéutico debido a problemas de inmunogenicidad.

Anticuerpos biespecíficos recombinantes. La mayoría de los formatos de anticuerpos biespecíficos se han generado por técnicas de ingeniería genética usando fragmentos de anticuerpo tales como fragmentos scFv o Fab como componentes básicos conectados mediante enlazadores polipeptídicos. Los formatos basados en fragmentos de anticuerpos unidos incluyen scFv en tándem (BiTE), diacuerpos y diacuerpos en tándem (Kipriyanov SM. Methods Mol Biol 2003; 207:323-333; Korn T *et al.*, Int J Cancer 2002; 100:690-697). Estos componentes básicos pueden unirse además con una región Fc de inmunoglobulina dando lugar a moléculas "de tipo IgG". Estos formatos incluyen diacuerpo-Fc, diacuerpo en tándem-Fc, diacuerpo en tándem-CH3, (scFv)₄-Fc y DVD-Ig (Lu D *et al.*, J Immunol Methods 2003; 279: 219-232 ; Lu D *et al.*, J Biol Chem 2005; 280: 19665-19672 ; Lu D *et al.*, J Biol Chem 2004; 279: 2856-2865; Wu C *et al.*, Nat Biotechnol 2007 25:1290-7). Una limitación potencial del uso de los enlazadores es que la naturaleza flexible de estos péptidos los hace más propensos a escisión proteolítica, lo que conduce potencialmente a escasa estabilidad de anticuerpos, agregación y aumento de la inmunogenicidad. Además, estos péptidos ajenos podrían inducir una respuesta inmunitaria contra la unión entre la proteína y el enlazador o el enlazador en sí mismo. En general los bsAb basados en componentes básicos unidos son moléculas difíciles con respecto a su fabricación lo que limita su potencial terapéutico.

Una molécula biespecífica ideal para la terapia humana debería ser indistinguible de una IgG normal. Se han explorado estrategias basadas en forzar la heterodimerización de dos cadenas pesadas. Un primer enfoque usó "botón en ojal" dirigido a forzar el emparejamiento de dos cadenas pesadas de IgG diferentes introduciendo mutaciones en los dominios CH3 para modificar la interfaz de contacto (Ridgway JB *et al.*, Protein Eng 1996; 9: 617-621). En una cadena se introdujeron aminoácidos con cadenas laterales grandes, para crear un "botón". Por el contrario, los aminoácidos voluminosos se reemplazaron por aminoácidos con cadenas laterales cortas para crear un "ojal" en el otro dominio CH3. Co-expresando estas dos cadenas pesadas, se observó más del 90 % de formación de heterodímeros ("botón-ojal") frente a formación de homodímeros ("ojal-ojal" o "botón-botón"). Se desarrolló un concepto similar usando dominios CH3 humanos de dominio modificado técnicamente por intercambio de cadena (SEED) basados en secuencias de IgG humana e IgA humana (Davis JH *et al.*, 2010, PEDS 23:195-202). Estos dominios modificados técnicamente conducen a la formación de moléculas heterodiméricas que pueden portar dos especificidades diferentes. Estos dos enfoques son atractivos ya que favorecen la producción del heterodímero de interés (hasta 95 %) pero no evitan completamente la formación de homodímeros. Por tanto aún se requieren procedimientos de purificación cadena abajo capaces de retirar los homodímeros de los heterodímeros. Otro problema potencial de estos enfoques es que los dominios mutados no son completamente humanos y pueden conducir a inmunogenicidad y también podrían afectar a la estabilidad de los dominios y la propensión a agregación de la molécula. Como estas estrategias permiten el emparejamiento forzado de las cadenas pesadas, las cadenas ligeras diferentes pueden emparejarse aleatoriamente con cualquiera de las dos cadenas pesadas y conducir a la generación de diferentes anticuerpos que necesitan purificarse entre sí. Recientemente se ha descrito una mejora sobre el enfoque de "botón en ojal" para resolver el problema del emparejamiento de cadenas ligeras (documento WO 2009/080253 A1). Este método implica el intercambio de algunos de los dominios de cadena ligera y cadena pesada además de las mutaciones de "botón en ojal". La principal ventaja de este método es que puede generarse un anticuerpo bivalente biespecífico que tiene dos dominios de cadena pesada variable diferentes y dos dominios variables de cadena ligera diferentes y se ha denominado "CrossMab." Sin embargo, las secuencias de este anticuerpo biespecífico no son completamente humanas ya que contienen tanto mutaciones en el Fc para forzar la heterodimerización como puntos de unión no naturales entre los diferentes dominios de inmunoglobulina. Además, estas modificaciones conducen a niveles de expresión reducidos del formato biespecífico en comparación con un anticuerpo monoclonal convencional (Schaefer *et al.*, PNAS 2011; 108:11187-11192).

Anticuerpos basados en dominio individual. Los sistema inmunitarios de camélidos (llamas y camellos) y peces cartilaginosos (tiburones nodriza) usan dominios V individuales fusionados con un Fc lo que demuestra que un dominio individual puede conferir unión de alta afinidad con un antígeno. Los dominios V de camélidos, tiburones e incluso humanos representan alternativas a los anticuerpos pero también pueden usarse para la generación de bsAb. Pueden cambiarse de formato a un IgG clásico en la que cada rama tiene el potencial de unirse con dos dianas mediante su dominio VH o VL. Este IgG de dominio individual tendría propiedades bioquímicas similares a un IgG y resolvería potencialmente problemas encontrados con otros formatos de bsAb con respecto a producción y heterogeneidad. Es sin embargo probable que el impedimento estérico evite con frecuencia la unión simultánea de ambos antígenos en ambas ramas de anticuerpos.

Se muestra una representación de los formatos de anticuerpos biespecíficos descritos anteriormente en la Figura 1. Algunas de estas representaciones de formato derivan de Fischer y Léger, *Pathobiology* 2007; 74:3-14; y Morrison *SL Nature Biotechnol* 2007; 25:1233-1234.

A diferencia de estos formatos anteriores, los anticuerpos biespecíficos, anticuerpos multi-específicos, composiciones y métodos proporcionados en el presente documento superan dichos obstáculos de desarrollo. Los anticuerpos biespecíficos proporcionados en el presente documento tienen una cadena pesada común, dos cadenas ligeras, una Kappa (κ), una Lambda (λ), que tienen cada una una especificidad diferente (es decir, dos cadenas ligeras, dos especificidades). Preferentemente, los anticuerpos biespecíficos no contienen ningún enlazador u otras modificaciones, incluyendo mutaciones de aminoácidos. Los métodos proporcionados en el presente documento producen moléculas que tienen unión específica en las que la diversidad se limita a la región VL. Estos métodos producen los anticuerpos biespecíficos mediante co-expresión controlada de las tres cadenas (una cadena VH, dos cadenas VL), y purificación del anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos y/o multi-específicos descritos en el presente documento muestran afinidades similares para una diana dada en comparación con las afinidades de anticuerpos monoespecíficos para la misma diana. Preferentemente, los anticuerpos biespecíficos y/o multi-específicos descritos en el presente documento son prácticamente indistinguibles de las moléculas de IgG convencionales.

Los métodos proporcionados en el presente documento también proporcionan los medios para generar mezclas de anticuerpos sencillos de dos anticuerpos monoespecíficos y un anticuerpo biespecífico que son útiles, por ejemplo, para dirección múltiple sin purificación del anticuerpo biespecífico de la mezcla.

Posibles modos de acción de anticuerpos biespecíficos

Inhibición simultánea de dos dianas. Por definición los anticuerpos biespecíficos portan dos especificidades y pueden por lo tanto inhibir más de una diana. Estas dianas pueden ser factores solubles o localizarse en la superficie de una célula. Se han generado con éxito varios formatos que se dirigen a múltiples citocinas (Wu C *et al.*, *Nat Biotechnol* 2007 25:1290-7).

Redirección. Como una mayoría de los formatos de anticuerpos biespecíficos son capaces de unir dos moléculas simultáneamente, pueden por lo tanto usarse como moléculas de enlace para redirigir a las células efectoras citotóxicas o agentes citotóxicos a células implicadas en un proceso de enfermedad. Esta aplicación se ha explorado en la oncología. En algunos casos, una especificidad de un anticuerpo se dirigió contra marcadores de células tumorales tales como CD 19, CD20, HER2, antígeno carcinoembrionario (CEA). La segunda rama del anticuerpo biespecífico aproxima estrechamente un resto tóxico o actividad tal como fármacos, toxinas, citoquinas o una célula efectora del sistema inmunitario (linfocitos T, linfocitos NK, monocitos y neutrófilos, dirigiéndose a CD3, CD16, CD64 y CD89, respectivamente) (Thielemans K, *Blood* 1996; 87: 4390-4398; Goldstein J *et al.*, *J Immunol* 1997; 158: 872-879).

Especificidad aumentada mediante avidéz. En un formato de IgG clásico, la unión de anticuerpo se dirige tanto por la afinidad de cada sitio de combinación por su antígeno como en los efectos de avidéz proporcionados por la unión bivalente. El efecto de avidéz aumenta drásticamente la afinidad aparente del anticuerpo por marcadores de superficie celular ya que tienen que producirse dos acontecimientos de disociación para que se libere el anticuerpo. Algunos de los formatos biespecíficos descritos anteriormente son bivalentes (es decir, un sitio de unión para cada diana) mientras que otros son tetravalentes. Estos últimos tienen cuatro sitios de unión o más y tienen el potencial de unirse con cada diana de una manera bivalente. Los biespecíficos bivalentes como agentes terapéuticos se dirigen selectivamente a poblaciones celulares que expresan una combinación de marcadores de superficie celular. Este modo único de acción está en principio limitado a moléculas que pueden beneficiarse de un componente de avidéz para diferenciar entre células que expresan ambos antígenos y las que expresan solamente un marcador.

Se muestra una representación de posibles modos de acción mediados por anticuerpos biespecíficos en la Figura 2. Esta representación deriva de Fischer y Léger, *Pathobiology* 2007; 74:3-14.

Características y limitaciones de los formatos de anticuerpos biespecíficos

Las características clave de los formatos de anticuerpos biespecíficos actuales se resumen en la Tabla I. Todos los formatos excepto los basados en los dominios humanos contienen secuencias que no son de origen humano o contienen secuencias proteicas no humanas generadas por la fusión de diferentes dominios proteicos. La mayoría de los formatos que usan enlazadores conducen a problemas de fabricación potenciales debido a la agregación de dominios. La presencia de secuencias ajenas y características de estabilidad desfavorables pueden aumentar significativamente potencialmente el riesgo de inmunogenicidad. Una diferencia clave entre los formatos es la valencia de sus sitios de unión que está directamente ligada a su capacidad para mediar en la redirección o unión selectiva mediadas por afeidez. Por lo tanto todos los formatos no pueden permitir todos los modos de acción. En particular, el único formato que es indistinguible de una inmunoglobulina completamente humana no puede mediar en la redirección o actividades de selectividad aumentadas. Por lo tanto existe la necesidad de generar nuevos anticuerpos biespecíficos con propiedades favorables para el desarrollo de productos terapéuticos, es decir, que sean indistinguibles de una molécula de inmunoglobulina completamente humana, buenas propiedades de fabricación y permitir el espectro completo de posibles modos de acción.

Tabla I. Características de diferentes formatos de anticuerpos biespecíficos.

	Fragmentos reticulados	Cuadromas	Formatos recombinantes – fragmentos de anticuerpos unidos	Formatos recombinantes – heterodímeros forzados	Formatos recombinantes – basados en dominios individuales
Modo de unión	Bivalente	Bivalente	Tetravalente (o más)	Bivalente	Tetravalente
Modo de acción	DI, R, IS	DI, R, IS	DI, IS	DI, R, IS	DI
Fabricación	Compleja, proceso multietapa	Purificación a partir de una mezcla compleja de anticuerpos	Puede ser difícil debido a la inestabilidad y agregación de los fragmentos de anticuerpos	Mezcla sencilla (la mayor parte del producto es biespecífico)	Sencilla
Origen de secuencias	Humano, sitios modificados por el proceso de reticulación	Secuencia de roedores	Humano, presencia de enlazadores y uniones proteicas no humanas	Humano, presencia de mutaciones para forzar la heterodimerización	Humano
Modos de acción: DI, Inhibición Doble; R, Redirección; IS, Selectividad Aumentada					

Métodos mejorados para generar anticuerpos biespecíficos y bivalentes.

La presente invención proporciona métodos para generar anticuerpos biespecíficos que tienen una estructura idéntica a una inmunoglobulina humana. Este tipo de molécula está compuesta de dos copias de un único polipéptido de cadena pesada, una primera región variable de cadena ligera fusionada con un dominio constante Kappa y una segunda región variable de cadena ligera fusionada con un dominio constante Lambda. Cada sitio de combinación presenta una especificidad de antígeno diferente a la que contribuyen la cadena tanto pesada como ligera. Las regiones variables de cadena ligera pueden ser de la familia Lambda o Kappa y se fusionan preferentemente con dominios constantes Lambda y Kappa, respectivamente. Esto se prefiere para evitar la generación de uniones polipeptídicas no naturales. Sin embargo también es posible obtener anticuerpos biespecíficos de la invención fusionando un dominio variable de cadena ligera Kappa con un dominio constante Lambda para una primera especificidad y fusionando un dominio variable de cadena ligera Lambda con un dominio constante Kappa para la segunda especificidad (Figura 3). Los anticuerpos biespecíficos descritos en el presente documento también se denominan anticuerpos IgGκλ o "cuerpos κλ", un nuevo formato de IgG biespecífico completamente humano. Este formato de cuerpo κλ permite la purificación de afinidad de un anticuerpo biespecífico que es indistinguible de una molécula de IgG convencional con características que son indistinguibles de un anticuerpo monoclonal convencional y, por lo tanto, favorables en comparación con formatos previos.

Una etapa esencial del método es la identificación de dos regiones Fv de anticuerpo (cada una compuesta por un dominio variable de cadena ligera y variable de cadena pesada) que tienen diferentes especificidades de antígenos que comparten el mismo dominio variable de cadena pesada. Se han descrito numerosos métodos para la generación de anticuerpos monoclonales y fragmentos de los mismos. (Véase, por ejemplo, Antibodies: A

Laboratory Manual, Harlow E, y Lane D, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, incorporada en el presente documento por referencia). Los anticuerpos completamente humanos son moléculas de anticuerpo en los que la secuencia tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada, incluyendo las CDR 1 y 2, surgen de genes humanos. La región CDR3 puede ser de origen humano o diseñarse por medios sintéticos. Dichos anticuerpos se denominan "anticuerpos humanos" o "anticuerpos completamente humanos" en el presente documento. Los anticuerpos monoclonales humanos pueden prepararse usando la técnica del trioma; la técnica del hibridoma de linfocitos B humanos (véase Kozbor, *et al.*, 1983 Immunol Today 4: 72); y la técnica de hibridoma de VEB para producir anticuerpos monoclonales humanos (véase Cole, *et al.*, 1985 In: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Pueden utilizarse anticuerpos monoclonales humanos y pueden producirse usando hibridomas humanos (véase Cote, *et al.*, 1983. Proc Natl Acad Sci USA 80: 2026-2030) o transformando linfocitos B humanos con virus de Epstein Barr *in vitro* (véase Cole, *et al.*, 1985 en: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96).

Se generan anticuerpos monoclonales, por ejemplo, inmunizando un animal con un antígeno diana o un fragmento inmunogénico, derivado o variante del mismo. Como alternativa, el animal se inmuniza con células transfectadas con un vector que contiene una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno diana, de modo que se expresa el antígeno diana y se asocia con la superficie de las células transfectadas. Se conoce bien en este campo una diversidad de técnicas para producir animales no humanos xenogénicos. Por ejemplo, véase la Patente de Estados Unidos N° 6.075.181 y N° 6.150.584, que se incorpora por la presente por referencia en su totalidad.

Como alternativa, los anticuerpos se obtienen explorando una biblioteca que contiene secuencias de anticuerpo o dominios de unión a antígeno para unión con el antígeno diana. Esta biblioteca se prepara, por ejemplo, en un bacteriófago como fusiones proteicas o peptídicas con una proteína de cubierta del bacteriófago que se expresa en la superficie de partículas de fagos ensambladas y las secuencias de ADN codificantes contenidas dentro de las partículas de fago (es decir, "biblioteca presentada en fagos").

Los hibridomas resultantes de las fusiones de mieloma/linfocitos B se exploran después con respecto a reactividad con el antígeno diana. Se preparan anticuerpos monoclonales, por ejemplo, usando métodos de hibridoma, tales como los descritos en Kohler y Milstein, Nature, 256:495 (1975). En un método de hibridoma, típicamente se inmuniza un ratón, hámster u otro animal hospedador apropiado con un agente de inmunización para inducir linfocitos que produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unan específicamente con el agente inmunizador. Como alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*.

Aunque no es estrictamente imposible, la identificación azarosa de diferentes anticuerpos que tienen el mismo dominio variable de cadena pesada pero dirigidos contra antígenos diferentes es altamente improbable. De hecho, en la mayoría de los casos la cadena pesada contribuye en gran medida a la superficie de unión a antígeno y es también la de secuencia más variable. En particular, la CDR3 en la cadena pesada es la CDR más diversa en su secuencia, longitud y estructura. Por lo tanto, dos anticuerpos específicos para antígenos diferentes casi invariablemente portarán diferentes dominios variables de cadena pesada.

El método de la invención supera esta limitación y facilita en gran medida el aislamiento de anticuerpos que tienen el mismo dominio variable de cadena pesada mediante el uso de bibliotecas de anticuerpos en las que el dominio variable de cadena pesada es el mismo para todos los miembros de la biblioteca y por lo tanto la diversidad se restringe al dominio variable de cadena ligera. Dichas bibliotecas se describen, por ejemplo, en la solicitud relacionada PCT/US2010/035619, presentada el 20 de mayo 2010 y publicada el 25 de noviembre de 2010 como la publicación de PCT N° WO 2010/135558 y la solicitud relacionada PCT/US2010/057780, presentada el 23 de noviembre de 2010 como la publicación de PCT N° WO 2011/084255. Sin embargo, como el dominio variable de cadena ligera se expresa junto con el dominio variable de cadena pesada, ambos dominios pueden contribuir a la unión al antígeno. Para facilitar adicionalmente el proceso, pueden usarse bibliotecas de anticuerpos que contienen el mismo dominio variable de cadena pesada y una diversidad de cadenas ligeras variables Lambda o cadenas ligeras variables Kappa en paralelo para selección *in vitro* de anticuerpos contra diferentes antígenos. Este enfoque permite la identificación de dos anticuerpos que tengan una cadena pesada común pero en los que uno porte un dominio variable de cadena ligera Lambda y el otro un dominio variable de cadena ligera Kappa que pueden usarse como componentes básicos para la generación de un anticuerpo biespecífico en el formato de inmunoglobulina completa de la invención. Los anticuerpos biespecíficos de la invención pueden ser de isotipos diferentes y su parte Fc pueden modificarse para alterar las propiedades de unión para diferentes receptores de Fc y de esta manera modificar las funciones efectoras del anticuerpo así como sus propiedades farmacocinéticas. Se han descrito numerosos métodos para la modificación de la parte Fc y son aplicables para anticuerpos de la invención. (Véase por ejemplo Strohl, WR Curr Opin Biotechnol 2009 (6):685-91; patente de Estados Unidos N° 6.528.624; documento US2009/0191199 presentado el 9 de enero de 2009). Los métodos de la invención también pueden usarse para generar anticuerpos biespecíficos y mezclas de anticuerpos en un formato F(ab')₂ que carece de la parte Fc.

Otra etapa clave de la invención es la optimización de la co-expresión de la cadena pesada común y dos cadenas ligeras diferentes en una única célula para permitir el ensamblaje de un anticuerpo biespecífico de la invención. Si todos los polipéptidos se expresan al mismo nivel y se ensamblan igualmente bien para formar una molécula de inmunoglobulina entonces la relación de mono-específico (mismas cadenas ligeras) y biespecífico (dos cadenas

ligeras diferentes) debería ser del 50 %. Sin embargo, es probable que diferentes cadenas ligeras se expresen a diferentes niveles y/o no se ensamblen con la misma eficacia. Por lo tanto los métodos de la invención también proporcionan medios para modular la expresión relativa de los diferentes polipéptidos para compensar sus características de expresión intrínsecas o diferentes propensiones a ensamblarse con la cadena pesada común.

Esta modulación puede conseguirse mediante fuerza del promotor, el uso de sitios de entrada ribosómica internos (IRES) que presentan diferentes eficacias u otros tipos de elementos reguladores que pueden actuar a los niveles transcripcional o traduccional así como que actúan en la estabilidad del ARNm. Diferentes promotores de diferente fuerza podrían incluir CMV (promotor del citomegalovirus inmediato-temprano); EF1-1 α (promotor de la subunidad 1 α del factor de elongación humano); Ubc (promotor de la ubiquitina C humana); SV40 (promotor del virus de simios 40). También se han descrito diferentes IRES de origen mamífero y viral. (Véase, por ejemplo, Hellen CU y Sarnow P. *Genes Dev* 2001 15: 1593-612). Estos IRES pueden diferir en gran medida en su longitud y eficacia de reclutamiento de ribosomas. Además, es posible ajustar adicionalmente la actividad introduciendo múltiples copias de un IRES (Stephen *et al.* 2000 *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 1536-1541). La modulación de la expresión también puede conseguirse por transfecciones secuenciales múltiples de células para aumentar el número de copias de genes individuales que expresan una o la otra cadena ligera y de este modo modificar sus expresiones relativas. Los ejemplos proporcionados en el presente documento demuestran que el control de la expresión relativa de las diferentes cadenas es crítico para maximizar el ensamblaje y rendimiento general del anticuerpo biespecífico.

La co-expresión de la cadena pesada y dos cadenas ligeras genera una mezcla de tres anticuerpos diferentes en el sobrenadante de cultivo celular: dos anticuerpos bivalentes monoespecíficos y un anticuerpo bivalente biespecífico. Este último tiene que purificarse a partir de la mezcla para obtener la molécula de interés. El método descrito en el presente documento facilita en gran medida este procedimiento de purificación mediante el uso de medios de cromatografía de afinidad que interaccionan específicamente con los dominios constantes de cadena ligera Kappa o Lambda tales como las matrices de afinidad de Fab Kappa CaptureSelect y de Fab Lambda CaptureSelect (BAC BV, Holanda). Este enfoque de purificación de cromatografía de afinidad multi-etapa es eficaz y en general aplicable a anticuerpos de la invención. Esto contrasta claramente con los métodos de purificación específicos que tienen que desarrollarse y optimizarse para cada anticuerpo biespecífico derivado de cuadromas u otras líneas celulares que expresan mezclas de anticuerpos. De hecho, si las características bioquímicas de los diferentes anticuerpos en las mezclas son similares, su separación usando técnica de cromatografía convencional, tal como cromatografía de intercambio iónico puede ser difícil o completamente imposible.

La invención también proporciona un nuevo medio de producir mezclas de anticuerpos sencillas de dos o más anticuerpos monoespecíficos y uno o más anticuerpos biespecíficos que comparten la misma cadena pesada y pueden purificarse usando técnicas de cromatografía convencionales usadas para purificación de anticuerpos monoclonales. (Véase, por ejemplo, Lowy, I *et al.* *N Engl J Med* 2010; 362:197-205; Goudsmit, J. *et al.* *J Infect Dis.* 2006. 193, 796-801). Dichas mezclas sencillas pueden usarse como agentes multi-dirección para su uso terapéutico.

Se muestran en los Ejemplos co-expresión exitosa, purificación y caracterización de la cadena pesada y las dos cadenas ligeras y purificación de los anticuerpos biespecíficos. Los genes que codifican la cadena pesada común y las dos cadenas ligeras se clonaron en un vector que contenía tres promotores. Después de la transfección transitoria, se recogió el sobrenadante de células PEAK.

La co-expresión de las tres cadenas condujo al ensamblaje de tres anticuerpos diferentes: dos anticuerpos monoespecíficos y uno biespecífico. Sus relaciones relativas teóricas deberían ser de 1:1:2 siempre que los niveles de expresión y las tasas de ensamblaje sean similares para ambas cadenas ligeras. Los anticuerpos biespecíficos se purificaron usando un procedimiento de cromatografía de afinidad de tres etapas: (1) Proteína A: IgG de captura (mono- y bi-), (2) Kappa select: IgG de captura que contiene una cadena o cadenas ligeras Kappa, y (3) Lambda select: IgG de captura que contiene una cadena ligera Lambda. Kappaselect y Lambdaselect son medios de cromatografía de afinidad desarrollados por BAC, BV y GE Healthcare.

Los anticuerpos biespecíficos purificados se caracterizaron de la siguiente manera. Se realizó el flujo continuo y la elución de cada etapa de purificación de afinidad por SDS-PAGE. Los resultados indican que, en cada etapa, los anticuerpos biespecíficos se enriquecen (Figura 8). El cuerpo $\kappa\lambda$ contenía cantidades equivalentes de cadenas ligeras Kappa y Lambda. El cuerpo $\kappa\lambda$ mostró un patrón de migración intermedio en un gel de isoelectroenfoque y cromatografía de intercambio iónico en comparación con los dos anticuerpos monoespecíficos (Figura 10). La especificidad y la afinidad de los cuerpos $\kappa\lambda$ se determinaron por ELISA y resonancia de plasmón superficial. Los métodos de la invención posibilitan la identificación de anticuerpos con afinidades en el intervalo sub-nanomolar a nanomolar sin optimización. Esto no resulta obvio ya que la diversidad en las bibliotecas de anticuerpo descritas en el presente documento se limita a la cadena ligera que contribuye menos a la energía de unión en anticuerpos convencionales.

Para evitar el requisito de tener acceso a dos anticuerpos que tengan dominios variables de cadena ligera del tipo Kappa y Lambda que se percibe como una limitación para la presente invención, los métodos descritos en el presente documento permiten la generación de una cadena ligera híbrida en la que un dominio variable Lambda puede fusionarse con un dominio constante Kappa y por el contrario un dominio variable Kappa puede fusionarse con un dominio constante Lambda como se representa en la Figura 3. Esto amplía las aplicaciones de la invención a

pares de anticuerpos que comparten una cadena ligera del mismo tipo. Como se describe en los Ejemplos proporcionados en el presente documento, el punto de fusión entre los dominios variable y constante es importante y puede afectar al proceso de purificación de anticuerpos biespecíficos.

- 5 Una visión de conjunto de un método para producir los anticuerpos biespecíficos y/o multi-específicos de la invención se muestra en la Figura 13. En algunas realizaciones, los métodos para generar anticuerpos biespecíficos y/o multi-específicos usan un proceso químicamente definido sin suero completo. Estos métodos incorporan la línea celular de mamífero más ampliamente usada en la industria farmacéutica, la línea celular de ovario de hámster chino (CHO). Los métodos descritos en el presente documento se usan para generar líneas celulares tanto semi-estables como estables. Los métodos pueden usarse para fabricar los anticuerpos biespecíficos y/o multi-específicos de la invención a pequeña escala (por ejemplo, en un matraz de Erlenmeyer) y a escala mediana (por ejemplo, en una bolsa Wave de 25 l). Los métodos también son fácilmente adaptables para producción a mayor escala de los anticuerpos biespecíficos y/o multi-específicos, así como mezclas de anticuerpos de la invención.
- 10 Los métodos para generar los anticuerpos biespecíficos y/o anticuerpos multi-específicos de la invención son ventajosos porque emplean procesos de purificación genéricos como se muestra en la Figura 8A. La Figura 16 demuestra el ensayo de purificación e integridad de productos de anticuerpos biespecíficos purificados a partir de una línea celular semi-estable. Los anticuerpos biespecíficos se purificaron usando el siguiente procedimiento de cromatografía de afinidad de tres etapas: (i) purificación de Proteína A para capturar moléculas de IgG, incluyendo tanto monoespecíficas como biespecíficas; (ii) purificación de KappaSelect para capturar IgG que contiene una cadena o cadenas ligeras Kappa; (iii) purificación de LambdaSelect para capturar IgG que contiene cadena ligera Lambda. El flujo continuo y la elución de cada etapa de purificación de afinidad se analizaron por SDS-PAGE. Los resultados demostraron la retirada de cada forma monoespecífica (es decir, moléculas de IgG monoespecíficas que tienen cadenas ligeras Kappa y moléculas de IgG monoespecíficas que tienen cadenas ligeras Lambda) durante el proceso de purificación (Figura 16A). Los anticuerpos que contienen κ l purificados (es decir, anticuerpos que tienen cadenas ligeras tanto Kappa como Lambda) contenían una cantidad equivalente de cadenas ligeras Kappa y Lambda (Figura 16B). Los anticuerpos que contenían κ l purificados presentaron un patrón de migración intermedio en un gel de isoelectroenfoque en comparación con los dos anticuerpos monoespecíficos (Figura 16C).
- 20 Los procesos químicamente definidos para fabricar los anticuerpos biespecíficos y/o multi-específicos de la invención pueden usarse con grupos de células CHO o con líneas celulares establecidas. Los resultados obtenidos con el proceso químicamente definido usando bien grupos o bien líneas celulares establecidas demuestran productividades y características de crecimiento comparables con los que expresan los anticuerpos monoespecíficos Kappa o Lambda correspondientes. Por lo tanto, el cuerpo κ l conserva tanto la estructura como las características de fabricación de un IgG humano clásico.

Los enfoques previos para producir formatos de anticuerpos biespecíficos dirigidos a forzar la producción de una molécula biespecífica homogénea usando los diferentes enfoques de modificación técnica de anticuerpos descritos anteriormente se realizaron a costa de productividad, capacidad de cambio de escala y estabilidad del producto. La presente invención es un enfoque diferente que permite la producción de una mezcla sencilla de anticuerpos que tienen las características convencionales de productividad y capacidad de cambio de escala de los anticuerpos monoclonales y proporciona medios eficaces y genéricos para purificar el anticuerpo biespecífico de la mezcla o para purificar la mezcla de anticuerpos.

45 Ejemplos

EJEMPLO 1: Generación de bibliotecas de anticuerpos que tienen cadenas pesadas fijas.

- Se generaron bibliotecas de anticuerpos en las que el dominio variable pesado es idéntico para todos los miembros de bibliotecas de la siguiente manera. En primer lugar, el dominio variable de cadena pesada VH3-23 que contenía una CDR3 definida AKSYGAFDY (SEC ID N°: 1) (nomenclatura de CDR de acuerdo con IMGT) y una secuencia FR4 definida se clonó en el vector pNDS usando los sitios de restricción SfiI y XhoI para obtener el vector fagémico pNDS_VHfixed. La secuencia de aminoácidos de FR4 VK corresponde a la región FR4 codificada por los genes J de línea germinal JK1. La secuencia de aminoácidos de FR4 VL corresponde a la región FR4 codificada por los genes de línea germinal J JL2 y JL3. Se generaron dos variantes de la secuencia de FR4 VK con una única sustitución de aminoácido en la posición 106 (arginina o glicina). Se clonó un total de 6 genes de dominio variable Kappa (VK1-33, VK1-39, VK3-11, VK3-15, VK3-20, VK4-1) y 5 Lambda (VL1-44, VL1-51, VL6-57, VL2-14, VL1-40) que contenían un fragmento de relleno en lugar de una secuencia codificante de CDR3 en el pNDS_VHfixed para generar 17 vectores aceptores en los que la diversidad de origen sintético o natural puede clonarse y pueden generarse bibliotecas de alta diversidad de acuerdo con los métodos descritos en la solicitud relacionada PCT/US2010/035619, presentada el 20 de mayo de 2010, publicada como el documento WO2010/135558, y los métodos descritos en Ravn *et al.* (2010) Nucl Acid Res 38(21):e193, cada uno de los cuales se incorpora por la presente por referencia en su totalidad. Este proceso dio como resultado la generación de 17 bibliotecas que tenían todas un dominio VH3-23 común y dominios VKappa o VLambda diversificados en la región determinante de complementariedad 3 de cadena ligera variable (región CDRL3) que contenía un total de $6,9 \times 10^9$ variantes (Figura 5A). La secuenciación de 180 transformantes

seleccionados aleatoriamente indicó que > 90 % de los clones tenían integrada una secuencia de CDRL3 que estaba en fase y era por lo tanto potencialmente funcional.

EJEMPLO 2: Rescate de fagos de las Bibliotecas

Cada biblioteca se rescató independientemente de acuerdo con procedimientos de presentación de fagos convencionales brevemente resumidos a continuación. Se añadió un volumen de células de las alícuotas de biblioteca congeladas suficientes para abarcar al menos 10 veces la diversidad teórica de la biblioteca a 500 ml de TYAG2x (ampicilina 100 µg/ml; glucosa al 2 %) y se dejó crecer a 37 °C con agitación (240 rpm) hasta que se alcanzó una DO600 de 0,3 a 0,5. El cultivo se superinfectó después con fago auxiliar MK13KO7 y se incubó durante una hora a 37 °C (150 rpm). El medio se cambió después centrifugando las células a 2000 rpm durante 10 minutos, retirando el medio y resuspendiendo el sedimento en 500 ml de TY-AK2x (ampicilina 100 µg/ml; kanamicina 50 µg/ml). El cultivo se dejó crecer después durante una noche a 30 °C (240 rpm). El cultivo se centrifugó a 4000 rpm durante 20 minutos para sedimentar las células. El sobrenadante se recogió y se añadió 30 % (v/v) de PEG 8000 (20 %)/NaCl 2,5 M para precipitar las partículas de fago incubando la mezcla 1 hora en hielo. Las partículas de fagos se recogieron por centrifugación a 10.000 rpm durante 30 minutos y se resuspendieron en 10 ml de tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM). La solución resuspendida se centrifugó a 10.000 rpm para eliminar los residuos bacterianos y se repitió el procedimiento de precipitación. Después de la resuspensión final, el fago se valoró por infección de *E. coli* y absorción a 260 nm. El nivel de presentación de scFv en la superficie del fago también se evaluó por análisis de transferencia de Western usando un anticuerpo monoclonal anti-c-myc. Se almacenó el fago purificado de diferentes bibliotecas congelado a -80 °C después de la adición de glicerol hasta una concentración final de 15 % (p/v).

EJEMPLO 3: Secciones de presentación de fagos usando bibliotecas de cadena pesada fijas

Selecciones en fase líquida frente a proteína de fusión hCXCL10-NusA biotinilada (hCXCL10-NusA) y complejo de receptor de hIL6 biotinilado (hIL6RC): se mantuvieron separadas alícuotas de las bibliotecas de fagos VH-V_K y VH-V_λ (10¹¹-10¹² Ufp) y se bloquearon con PBS que contenía leche desnatada al 3 % (p/v) durante una hora a temperatura ambiente en un mezclador rotatorio. El fago bloqueado se deseleccionó después en perlas magnéticas de estreptavidina (Dynal M-280) durante una hora a temperatura ambiente en un mezclador rotatorio. El fago deseleccionado se incubó después con hCXCL10-NusA o hIL6RC biotinilado *in vivo* (100 nM) durante dos horas a temperatura ambiente en un mezclador rotatorio. Se añadieron perlas a la diana y se capturaron usando un soporte magnético seguido de cuatro lavados con PBS/Tween 20 0,1 % y 3 lavados con PBS. Se añadieron directamente después perlas a 10 ml de células TG1 con crecimiento exponencial y se incubaron durante una hora a 37 °C con agitación lenta (100 rpm). Se diluyó en serie una alícuota de las TG1 infectadas para titular el resultado de selección. Las TG1 infectadas restantes se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos y se resuspendieron en 0,5 ml de TYAG2x (medio TY2x que contenía ampicilina 100 µg/ml y glucosa al 2 %) y se extendieron en placas de bioensayo de agar TYAG2x. Después de incubación durante una noche a 30 °C, se añadieron 10 ml de TYAG2x a las placas y las células se rasparon de la superficie y se transfirieron a un tubo de polipropileno de 50 ml. Se añadió TYAG2x que contenía glicerol al 50 % a la suspensión celular para obtener una concentración final de glicerol del 17 %. Las alícuotas del ciclo de selección se mantuvieron a -80 °C.

Rescate de fagos: se añadieron 100 µl de suspensión celular obtenida de ciclos de selección previos a 20 ml de TYAG2x y se cultivaron a 37 °C con agitación (240 rpm) hasta que se alcanzó una DO600 de 0,3 a 0,5. El cultivo se superinfectó después con 3,3x10¹⁰ fagos auxiliares MK13KO7 y se incubaron durante una hora a 37 °C (150 rpm). El medio se cambió después centrifugando las células a 3800 rpm durante 10 minutos, retirando el medio y resuspendiendo el sedimento en 20 ml de TY-AK2x (ampicilina 100 µg/ml; kanamicina 50 µg/ml). El cultivo se dejó crecer después durante una noche a 30 °C (240 rpm). Al día siguiente se usó una alícuota del sobrenadante centrifugado como un aporte para el siguiente ciclo de selección.

Rescate de fagos monoclonales para ELISA: Se seleccionaron clones individuales en una placa de microtitulación que contenía 150 µl de medio TYAG2x (glucosa 2 %) por pocillo y se cultivaron a 37 °C (100-120 rpm) durante 5-6 h. Se añadió fago auxiliar M13KO7 a cada pocillo para obtener una multiplicidad de infección (MOI) de 10 (es decir, 10 fagos por cada célula en el cultivo) y se incubó a 37 °C (100 rpm) durante 1 h. Después del cultivo, las placas se centrifugaron a 3.200 rpm durante 10 min. El sobrenadante se retiró cuidadosamente, las células se resuspendieron en 150 µl de medio TYAK2x y se cultivaron durante una noche a 30 °C (120 rpm). Para el ELISA, el fago se bloqueó añadiendo 150 µl de PBS de concentración 2x que contenía leche en polvo desnatada 5 % seguido de una hora de incubación a temperatura ambiente. Las placas se centrifugaron después 10 minutos a 3000 rpm y el sobrenadante que contenía fagos se usó para el ELISA.

ELISA de fagos: Se recubrieron durante una noche placas de ELISA (Maxisorp, NUNC) con hCXCL10-NusA 2 µg/ml en PBS o hIL6RC 2 µg/ml en PBS. Las placas se bloquearon después con leche desnatada al 3 %/PBS a temperatura ambiente durante 1 h. Las placas se lavaron 3 veces con PBS 0,05 % Tween 20 antes de transferir los sobrenadantes de fagos pre-bloqueados e incubación durante una hora a temperatura ambiente. Cada clon se ensayó frente a ambas dianas para ensayar su especificidad. Las placas se lavaron después 3 veces con PBS 0,05 % Tween 20. 50 µl de leche desnatada al 3 %/PBS que contenía anticuerpo anti-M13 conjugado con (HRP)

(Amersham, diluido 1:10.000) a cada pocillo. Después de la incubación a temperatura ambiente durante 1 h, las placas se lavaron 5 veces con PBS 0,05 % Tween 20. El ELISA se reveló después añadiendo 50 µl de TMB (Sigma) y 50 µl de H₂SO₄ 2N para detener la reacción. La intensidad de absorción se leyó a 450 nm. Pudieron identificarse clones específicos para hCXCL10-NusA o hIL6RC que portaban el mismo dominio variable de cadena pesada (Figura 4).

Secuenciación de clones de fago: Se cultivaron clones individuales en 5 ml de medio TYAG2x (glucosa al 2 %) por pocillo y se cultivaron a 37 °C (120 rpm) durante una noche. Al día siguiente se purificó ADN de fagémido y se usó para la secuenciación del ADN usando un cebador específico para pNDS1: mycseq, 5'-CTCTTCTGAGATGAGTTTTTG. (SEC ID N°: 2).

Purificación de scFv a gran escala: Se inoculó un cultivo de partida de 1 ml de TYAG2x con una única colonia de una placa de agar de TYAG2x recién sembrada en estrías y se incubó con agitación (240 rpm) a 37 °C durante 5 horas. Se usaron 0,9 ml de este cultivo para inocular un cultivo de 400 ml del mismo medio y se dejó crecer durante una noche a 30 °C con agitación vigorosa (300 rpm). Al día siguiente el cultivo se indujo añadiendo 400 µl de IPTG 1 M y se continuó la incubación durante 3 horas adicionales. Las células se recogieron por centrifugación a 5.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Las células sedimentadas se resuspendieron en 10 ml de tampón TES helado complementado con inhibidores de proteasa como se ha descrito anteriormente. Se consiguió choque osmótico añadiendo 15 ml de tampón TES diluido 1:5 e incubación durante 1 hora en hielo. Las células se centrifugaron a 10.000 rpm durante 20 minutos a 4 °C para sedimentar los residuos celulares. El sobrenadante se transfirió cuidadosamente a un tubo nuevo. Se añadió imidazol al sobrenadante hasta una concentración final de 10 mM. Se añadió 1 ml de resina Ni-NTA (Qiagen), equilibrada en PBS a cada tubo y se incubó en un mezclador rotatorio a 4 °C (20 rpm) durante 1 hora. Los tubos se centrifugaron a 2.000 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante se retiró cuidadosamente. La resina sedimentada se resuspendió en 10 ml de tampón de lavado 1 frío (4 °C) (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, pH hasta 8,0). La suspensión se añadió a una columna de polyprep (Biorad). Se usaron 8 ml de tampón de lavado 2 frío (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM, pH hasta 8,0) para lavar la columna por flujo de gravedad. Los scFv se eluyeron de la columna con 2 ml de tampón de elución (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 250 mM, pH hasta 8,0). Las fracciones se analizaron por absorción a 280 nm y se agruparon las fracciones que contenían proteínas antes del intercambio de tampones en una columna de desalación NAP5 (Amersham) equilibrada con PBS. Los scFv en PBS se analizaron por SDS-PAGE y se cuantificaron por absorción a 280 nm. Los scFv purificados se separaron en alícuotas y se almacenaron a -20 °C y a 4 °C. Los scFv purificados se usaron en ELISA para confirmar la unión específica con la diana contra la que se habían seleccionado.

EJEMPLO 4: Selecciones adicionales usando diferentes bibliotecas de VH fijo

También se generaron bibliotecas de anticuerpos capturando repertorios de cadena ligera reordenados de forma natural y clonándolos en el contexto de un único dominio VH descrito en el Ejemplo 1. En este caso la región de gen variable de cadena ligera completa se amplificó a partir de ADNc humano usando cebadores que corresponden a la región 5' y 3' de regiones variables reordenadas humanas y se clonó en el vector pNDS_VHfixed descrito en el Ejemplo 1. Se generó otro conjunto de bibliotecas como se ha descrito en el Ejemplo 1 pero usando un dominio VH3-23 fijo que contenía una secuencia CDRH3 diferente ARGDDVS (SEC ID N°: 3). Las bibliotecas descritas anteriormente se representan esquemáticamente en la Figura 5. Estas bibliotecas de VH fijo se usaron frente a un panel de proteínas diana usando la metodología de selección y exploración descrita en el Ejemplo 2 y 3. Se han realizado selecciones usando las siguientes dianas: hCXCL10-NusA, IL -6RC, CD47, CD16, CD8 y hIFN γ . Se enumeran en la Tabla II los candidatos que se han identificado y se ha mostrado que son específicos para sus dianas. Estos resultados demuestran que pueden generarse anticuerpos que se unen con diferentes dianas y que tiene una cadena pesada común y que la diversidad restringida a la cadena ligera es suficiente para conferir especificidad de antígenos. Podrían generarse candidatos a partir de bibliotecas que contienen un dominio VH3-23 con diferentes secuencias de CDRH3 o que tienen repertorios de VL diversificados usando diferentes estrategias. Por lo tanto, los resultados demuestran que el enfoque no se limita a una secuencia de VH en particular o a una estrategia de diversificación de dominio variable de cadena ligera en particular.

Tabla II. Número de clones independientes identificados frente a un panel de dianas usando bibliotecas con una secuencia VH fija que contiene dos secuencias de CDRH3 diferentes. NA: selección no realizada.

Dianas:	Total		CDRH3 fija SEC ID:1		CDRH3 fija SEQ ID:3	
	κ	λ	κ	λ	κ	λ
hCD16	5	1	4	-	-	1
hCD8	5	12	2	10	3	2
hCD47	21	9	16	4	5	5
IL6RC	17	14	8	7	9	7

Dianas:	Total		CDRH3 fija SEC ID:1		CDRH3 fija SEQ ID:3	
IFN γ	-	5	-	5	-	-
NusA-CXCL10	2	4	2	4	NA	NA

EJEMPLO 5: Candidatos de VH fijo que se cambian de formato a IgG y expresión transitoria en células de mamífero

- 5 Después de explorar, los candidatos a scFv se cambiaron de formato a IgG y se expresaron por transfección transitoria en células PEAK. Se generaron varios IgG λ (n=5) e IgG κ (n=9) que tienen una cadena pesada común y específica para IFN γ e IL6RC, respectivamente, y que tienen diferentes secuencias de cadena ligera de la siguiente manera. Las secuencias VH y VL de scFv seleccionados se amplificaron con oligonucleótidos específicos y se clonaron en un vector de expresión que contenía las regiones constantes de cadena pesada y ligera y las construcciones se verificaron por secuenciación. Los vectores de expresión se transfectaron a células de mamífero usando el reactivo de transfección Eugene 6 (Roche, Basilea, Suiza). Brevemente, las células PEAK se cultivaron en placas de 6 pocillos a una concentración de 6×10^5 células por pocillo en 2 ml de medio de cultivo que contenía suero bovino fetal. Los vectores de expresión que codificaban las secuencias de VH y VL candidatas se co-transfectaron a las células usando el reactivo de transfección Eugene 6 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Un día después de la transfección, se aspiró el medio de cultivo, y se añadieron 3 ml de medio sin suero nuevo a células y se cultivaron durante tres días a 37 °C. Después de tres días de periodo de cultivo, el sobrenadante se recogió con respecto a IgG purificada en columnas de flujo rápido de proteína G-Sepharose 4B (Sigma, St. Louis, MO) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, se incubaron sobrenadantes de células transfectadas durante una noche a 4 °C con tampón de unión IgG ImmunoPure (G) (Pierce, Rockford IL). Las muestras se pasaron después sobre columnas de flujo rápido de proteína G-Sepharose 4B y la IgG se purificó en consecuencia usando tampón de elución. La fracción de IgG eluida se dializó frente a PBS y el contenido de IgG se cuantificó por absorción a 280 nm. Se verificó la pureza y la integridad de IgG mediante SDS-PAGE. Las IgG se ensayaron después con respecto a unión con IFN γ y el complejo de IL-6/receptor IL-6R, denominado en el presente documento IL6RC, por ELISA. Se inmovilizaron IFN γ e IL6RC biotinilados en microplacas recubiertas con estreptavidina (Streptawell, Roche) y las placas se bloquearon después con PBS complementado con BSA al 2 % a temperatura ambiente durante 1 h. Las placas se lavaron 3 veces con PBS 0,05 % Tween 20 antes de añadir el IgG λ anti-IFN γ o IgG κ anti-IL6RC purificados en pocillos recubiertos con una de las dianas. Después de una hora de incubación a temperatura ambiente y lavado de las placas los anticuerpos unidos se detectaron con anticuerpos C κ anti-humano o C λ anti-humano acoplados con peroxidasa de rábano rusticano. El ELISA se reveló después añadiendo 50 μ l de TMB (Sigma) y 50 μ l de H₂SO₄ 2N para detener la reacción. La intensidad de absorción se leyó a 450 nm. Los resultados indican que la especificidad de unión de los scFv aislados de las bibliotecas de VH fijo se mantuvo en el formato de IgG y demostró que dos IgG que tenían la misma cadena pesada pero diferentes cadenas ligeras pueden ser específicos para distintas dianas (Figura 6).
- 35 Las secuencias de aminoácidos de cadena pesada y ligera del IgG λ anti-IFN γ o el IgG κ anti-IL6RC se indican a continuación:

Cadena ligera VKappa anti-IL6RC

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSG
SGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQLPTTPATFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKV
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEC ID N°: 4)

Cadena ligera VLambda anti-IFN γ

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRPFGSSPTTVIYEDNQRPSGVPDRFS
GSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSQSWDGNHIVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSS
EELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWK
SHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEC ID N°: 5)

Cadena pesada común

```

EVQLLES GGGGLVQP GGSRLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSV
KGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKSYGAFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLA
PSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTF
EVTCTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEC ID N°: 6) .

```

5 EJEMPLO 6: Co-expresión de una única cadena pesada y dos cadenas ligeras en células de mamífero

La expresión simultánea de una cadena pesada y dos cadenas ligeras en la misma célula puede conducir al ensamblaje de tres anticuerpos diferentes (Figura 8A). Puede conseguirse expresión simultánea de diferentes maneras tal como la transfección de múltiples vectores que expresan una de las cadenas para co-expresar o usando

10 vectores que conducen expresión de múltiples genes. Se diseñó un vector pNovi κHλ para permitir la co-expresión de una cadena pesada, una cadena ligera Kappa y una cadena ligera Lambda (Figura 7A). La expresión de los tres genes está conducida por promotores de citomegalovirus humano (HCMV) y el vector también contiene un gen de glutamina sintetasa (GS), que permite la selección y establecimiento de líneas celulares estables. También se construyó otro vector, pNovi κHλκ, en el que se insertó una segunda copia de una cadena ligera Kappa después de

15 la cadena ligera Lambda y su expresión está conducida por un sitio de entrada ribosómica interno (IRES). Usando este diseño bicistrónico, se puede aumentar la expresión relativa de la cadena ligera Kappa. Los dos vectores se representan esquemáticamente en la Figura 7.

20 EJEMPLO 7: Co-expresión transitoria de una única cadena pesada y dos cadenas ligeras en células de mamífero y purificación de IgG total.

Los genes de VH y VL del IgGλ anti-IFNγ o el IgGκ anti-IL6RC se clonaron en el vector pNovi κHλ descrito en el Ejemplo 5, para expresión transitoria en células de mamífero. Se cultivaron células PEAK en placas de 6 pocillos a una concentración de 6×10^5 células por pocillo en 2 ml de medio de cultivo que contenía suero bovino fetal. Se

25 transfectoron 2 μg de ADN plasmídico a las células usando reactivo de transfección TransIT-LT1 (Mirus) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Un día después de la transfección, el medio de cultivo se aspiró, y se añadieron 3 ml de medio sin suero nuevo a células y se cultivaron durante cinco días a 37 °C. Después de un periodo de cultivo de cinco días, el sobrenadante se recogió, se centrifugó a 4000 rpm y se aplicó en resina MabSelect Sure PA (GE Healthcare) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se eluyeron IgG totales en condiciones ácidas

30 seguido de neutralización e intercambio del tampón a PBS. El contenido de IgG se cuantificó por absorción a 280 nm y se analizó por SDS-PAGE. La presencia de dos bandas correspondientes a las dos cadenas ligeras y una banda correspondiente a la cadena pesada indicó que las tres cadenas podrían expresarse simultáneamente en la misma célula (Figura 8B).

35 EJEMPLO 8: Purificación de anticuerpos biespecíficos que portan una cadena ligera Lambda y una Kappa

La co-expresión de una cadena pesada y dos cadenas ligeras en las mismas células puede conducir al ensamblaje de tres anticuerpos diferentes: dos anticuerpos mono-específicos que portan la misma cadena ligera en ambas ramas y un anticuerpo biespecífico que porta una cadena ligera diferente asociada con la cadena pesada en cada rama.

40 Este último puede aislarse de los anticuerpos mono-específicos por técnicas de cromatografía que aprovechan las diferentes propiedades bioquímicas de los anticuerpos mono-específicos y biespecíficos. Para desarrollar un enfoque de purificación genérico que sea aplicable a la generación de todos los anticuerpos biespecíficos, se usó un enfoque de cromatografía de afinidad representado esquemáticamente en la Figura 8A. Se aplicaron sobrenadantes de cultivo de células transfectadas a columna de resina MabSelect Sure PA (GE Healthcare) e IgG total purificado como

45 se ha descrito en el Ejemplo 7. El IgG total se aplicó después a una columna que contenía matriz de afinidad por Fab Kappa CaptureSelect (BAC BV, Holanda) equilibrada con diez volúmenes de PBS. La columna se lavó después con 5-10 volúmenes de columna de PBS. Las moléculas de inmunoglobulina que portan una cadena ligera Kappa se eluyeron de la columna aplicando 5 volúmenes de columna de glicina 0,1 M pH 2,0 y se recogieron y neutralizaron las fracciones. Las fracciones que contienen el anticuerpo se agruparon antes del intercambio de tampón en una

50 columna de desalación de PD10 (Amersham) equilibrada con PBS. El anticuerpo se aplicó después en una segunda columna que contenía matriz de afinidad por Fab Lambda CaptureSelect equilibrada con diez volúmenes de PBS. La columna se lavó después con 5-10 volúmenes de columna de PBS. Las moléculas de inmunoglobulina que portaban solamente cadena ligera Kappa no se unen con la columna y se encontraron en el flujo continuo. Se eluyeron anticuerpos que portaban una cadena ligera Lambda de la columna aplicando 5 volúmenes de columna de glicina

55 0,1 M pH 3,0 y se recogieron las fracciones. Las fracciones que contenían el anticuerpo biespecífico se agruparon antes del intercambio de tampón en una columna de desalación PD10 (Amersham) equilibrada con PBS. Las moléculas de inmunoglobulinas que portan una cadena ligera Kappa se eluyeron de la columna aplicando 5

volúmenes de columna de glicina 0,1 M pH 2,0 y se recogieron y neutralizaron las fracciones. Las fracciones que contenían el anticuerpo se agruparon antes del intercambio de tampón en una columna de desalación PD10 (Amersham) equilibrada con PBS. El anticuerpo se aplicó después en una segunda columna que contenía matriz de afinidad por Fab Lambda CaptureSelect equilibrada con diez volúmenes de PBS. La columna se lavó después con 5-10 volúmenes de columna de PBS. Las moléculas de inmunoglobulina que portaban solamente cadena ligera Kappa se unen con la columna y se encontraron en el flujo continuo. Se eluyeron anticuerpos que portaban una cadena ligera Lambda de la columna aplicando 5 volúmenes de columna de glicina 0,1 M pH 3,0 y se recogieron las fracciones. Las fracciones que contenían el anticuerpo biespecífico se agruparon antes del intercambio de tampón en una columna de desalación PD10 (Amersham) equilibrada con PBS. El flujo continuo y la fracción de elución de cada etapa de purificación se analizó por SDS-PAGE y se indicó que los anticuerpos que portaban cadenas ligeras Lambda se encontraron en el flujo continuo de la matriz de afinidad de Fab Kappa CaptureSelect y, por el contrario, que los anticuerpos que portaban cadenas ligeras Kappa se encontraron en el flujo continuo de la matriz de afinidad de Fab Lambda CaptureSelect (Figura 8B). Como se esperaba, en la fracción de elución final, la intensidad de las bandas correspondientes a las dos cadenas ligeras es equivalente. Por lo tanto este enfoque de tres etapas permite la purificación de anticuerpos biespecíficos que porten una cadena ligera tanto Kappa como Lambda. La recuperación final de anticuerpo biespecífico que porta una cadena ligera Kappa y Lambda fue de aproximadamente 10-21 % en experimentos diferentes. La fracción de elución de Proteína A también indicó que se ensambla más cadena ligera Lambda que cadena ligera Kappa en el IgG purificado lo que sugiere que la expresión aumentada de cadena ligera Kappa podría aumentar el ensamblaje y recuperación de anticuerpos biespecíficos.

EJEMPLO 9: Modulación de la expresión de cadena ligera para optimizar el ensamblaje de anticuerpos biespecíficos

Para aumentar la expresión de la cadena ligera Kappa, el gen de VH común, el gen de VLambda del anticuerpo anti-INF γ y dos copias de VKappa del anti-IL6RC se clonaron en el vector pNovi κ H λ κ descrito en el Ejemplo 6. La expresión de la segunda copia de la cadena ligera VKappa está conducida por un IRES. Se ensayaron diferentes elementos de IRES para conseguir diferentes niveles de expresión de la cadena ligera VKappa. Esto dio como resultado la construcción de cinco vectores independientes: pNovi κ H λ κ 1 a 5. Estos vectores se usaron para transfecciones transitorias en células de mamífero como se ha descrito en el Ejemplo 7 y se purificaron IgG totales del sobrenadante usando purificación de afinidad de Proteína A. El análisis SDS-PAGE indica que los diferentes vectores pNovi κ H λ κ aumentaron la expresión y el ensamblaje de la cadena ligera Kappa en el IgG en comparación con la expresión usando el vector pNovi κ H λ (Figura 9). Las fracciones de IgG totales obtenidas después de la purificación de Proteína A para cada una de estas construcciones se purificó adicionalmente en dos etapas consecutivas usando Fab Kappa CaptureSelect y Fab Lambda CaptureSelect como se ha descrito en el Ejemplo 8. El rendimiento en anticuerpos biespecíficos fue del 20 % para el pNovi κ H λ y varió entre el 33 y el 41 % para construcciones pNovi κ H λ κ, lo que indica que el aumento de la expresión de cadena ligera Kappa conduce a aumento del ensamblaje de anticuerpos biespecíficos. Para confirmar adicionalmente estos hallazgos, se realizaron co-transfecciones usando pNovi κ H λ y el vector que expresa el IgGκ anti-IL6RC monoespecífico. De esta manera, también aumentaron los niveles relativos de cadena ligera Kappa así como los rendimientos de anticuerpo biespecífico lo que indica que pueden usarse varios enfoques para ajustar la expresión de cadena ligera relativa.

EJEMPLO 10: Caracterización del anticuerpo biespecífico purificado

Los anticuerpos biespecíficos purificados aislados como se ha descrito en los ejemplos anteriores se caracterizaron usando técnicas diferentes.

Gel de isoelectroenfoque (IEF). Los anticuerpos biespecíficos purificados aislados como se ha descrito en el Ejemplo 9 se analizaron usando placas de IEF de agarosa IsoGel con un intervalo de pH 3-10 (Lonza) y se compararon con los anticuerpos monoespecíficos IgG λ anti-INF γ e IgGκ anti-IL6RC. Después del enfoque, el gel se desplazó en solución de fijación durante 30 minutos, se lavó con agua durante 5 min y después se secó a TA. El gel se tiñó con tinción de Coomassie durante 15 minutos, se aclaró brevemente con agua y con solución decolorante durante 2x15 min. Finalmente el gel se secó a TA antes de la captura de imágenes. Los resultados mostrados en la Figura 10A indican que el anticuerpo biespecífico IgGκ λ tiene un pI diferente e intermedio en comparación con el pI de los dos anticuerpos monoespecíficos como se ha predicho a partir del formato de anticuerpo y cálculos teóricos. La tinción también demostró que el anticuerpo biespecífico es altamente puro después del proceso de purificación de tres etapas descrito en el Ejemplo 8.

Cromatografía de intercambio iónico (IEX). Se analizaron 50 μ g de anticuerpos monoespecíficos y biespecíficos purificados por cromatografía líquida de alto rendimiento-intercambio iónico (IEX-HPLC) (HPLC Waters e2695 / detector 2489) usando una columna Agilent Bio Mab, NP5, (Agilent): las fases móviles fueron: A: Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 10mM, pH 6,5; B: Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 10mM, NaCl 100 mM, pH 6,5; usando un flujo de 0,8 ml/min y gradiente de 20 %-60 % durante 133 minutos. Los tres anticuerpos tienen diferentes tiempos de retención con el pico correspondiente del anticuerpo biespecífico que tiene un perfil intermedio en comparación con los anticuerpos monoespecíficos (Figura 10B).

ELISA. Los anticuerpos mono-específicos IgG λ anti-IFN γ e IgG κ anti-IL6RC y el bio-específico IgG $\kappa\lambda$ se ensayaron por ELISA con respecto a unión con IFN γ e IL6RC. Los resultados mostrados en la Figura 11 indican que el IgG $\kappa\lambda$ bio-específico es capaz de unirse con ambas dianas y puede detectarse con anticuerpos secundarios tanto C κ anti-humano como C λ anti-humano.

Resonancia de plasmón superficial (SPR). La afinidad y cinética de unión de los anticuerpos mono-específicos IgG λ anti-IFN γ , IgG κ anti-IL6RC y el bio-específico IgG $\kappa\lambda$ se caracterizaron en un instrumento Biacore 2000 (Biacore AB, Uppsala, Suecia). Se inmovilizaron 200UR de un IgG policlonal de cabra anti-humano (aIgG; Biacore) por química de EDC/NHS en una microplaca de Biacore CM5. Esta superficie se usó para capturar IgG humano mono-específico o bio-específico. La superficie se regeneró después de cada ciclo por inyección de glicina 10 mM pH=1,5 a 30 μ l/min, durante 30 segundos, seguido de 1 minuto de tiempo de estabilización en tampón de HBS-EP. Los datos se ajustaron de acuerdo con un modelo de Langmuir 1:1 y se determinaron los valores de K_{on} , K_{off} y K_D (Tabla III). Se obtuvieron valores de afinidad similares para los anticuerpos mono-específicos y los anticuerpos IgG $\kappa\lambda$ bio-específicos. Los datos indican que los dos sitios de combinación de anticuerpos se unen con hIFN γ e IL6RC de forma similar en un formato mono-específico y bio-específico.

La capacidad del IgG $\kappa\lambda$ bio-específico para interactuar con ambas dianas simultáneamente se ensayó por SPR. Se inmovilizó IFN γ biotinilado en una microplaca de Biacore CM5 recubierta con estreptavidina. Los anticuerpos mono-específicos y bio-específicos se inyectaron en esta superficie seguidos de inyección de IL6RC. El sensograma mostrado en la Figura 11A muestra que el anticuerpo IgG $\kappa\lambda$ bio-específico era capaz de unirse con IFN γ inmovilizado y era capaz de capturar IL6RC simultáneamente. También se usó SPR para evaluar las cantidades relativas de cadenas ligeras Kappa y Lambda en el anticuerpo bio-específico purificado. Se inmovilizó IgG $\kappa\lambda$ directamente mediante acoplamiento de amina en la superficie de una microplaca de Biacore CM5 y se inyectó un anticuerpo C κ anti-humano seguido de un anticuerpo C λ anti-humano a la misma concentración. Se obtuvieron respuestas equivalentes con ambos anticuerpos anti-cadena ligera lo que indica que, como se predecía por el formato, están presentes cantidades equivalentes de cadenas ligeras Kappa y Lambda en el anticuerpo de IgG $\kappa\lambda$ bio-específico (Figura 12B).

Tabla III. Análisis de cinético de unión para anticuerpos mono-específicos y bio-específicos IgG $\kappa\lambda$ para IFN γ e IL6RC medido en un sistema Biacore 2000.

Analito	Ligando	KD (M)	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)
IFN γ	IgG $\kappa\lambda$	1,84E-10	9,19E+05	1,69E-04
	IgG $\lambda\lambda$	1,96E-10	6,08E+05	1,19E-04
IL6RC	IgG $\kappa\lambda$	2,72E-07	7,44E+03	2,02E-03
	IgG $\kappa\kappa$	2,66E-07	8,08E+03	2,15E-03

EJEMPLO 11: Fabricación de anticuerpos IgG $\kappa\lambda$ bio-específicos

La expresión de anticuerpo bio-específico IgG $\kappa\lambda$ también se realizó en células de ovario de hámster chino (CHO), que se usan ampliamente para la fabricación de anticuerpos monoclonales. En el ejemplo presentado en el presente documento ambos grupos semi-estables de células CHO transfectadas así como líneas de CHO de células estables se generaron para la producción de anticuerpos bio-específicos IgG $\kappa\lambda$. En los estudios presentados en el presente documento, se generaron líneas CHO estables y se cultivaron usando un proceso de fabricación sin componentes animales, químicamente definido (CDACF). El proceso general se representa en la Figura 13.

Grupos de CHO. Se sometieron a electroporación células CHO con el vector linealizado pNovi κ H λ κ que codifica el anticuerpo bio-específico IgG $\kappa\lambda$ anti-IFN γ /anti-IL6RC descrito en los ejemplos anteriores así como con plásmidos que conducen la expresión de los mono-específicos IgG λ anti-IFN γ e IgG κ anti-IL6RC. Después de la electroporación, se cultivaron grupos de células transfectadas en condiciones de sobrecrecimiento de 10 días sin alimentación. Las células transfectadas con construcción bio-específica presentaron perfiles de crecimiento similares en comparación con las células transfectadas con vectores de expresión mono-específicos. Además, las productividades también eran comparables y alcanzaron un intervalo típico de productividad de anticuerpos: entre 100 y 200 mg/l para cultivos de grupo con sobrecrecimiento sin alimentación (Figura 14A). Se consiguió con éxito aumento de escala entre la producción a pequeña escala en un matraz de Erlenmeyer (100 ml) y la producción a escala mediana en una Bolsa Wave de 25 l (Figura 14B). Estos resultados indican que se obtienen curvas de crecimiento y productividades similares durante la expresión del anticuerpo IgG $\kappa\lambda$ bio-específico en líneas celulares CHO y los anticuerpos mono-específicos correspondientes.

Líneas celulares CHO estables. Se generaron líneas celulares recombinantes que producían anticuerpo bio-específico mediante electroporación de células CHO con el vector pNovi κ H λ κ . Después de la transfección, las líneas celulares recombinantes se seleccionaron diluyendo el cultivo celular en presencia de una concentración final de metionina

sulfoximina (MSX) 50 μ M. Después de 6 semanas de incubación, se exploraron las colonias de líneas celulares recombinantes con respecto a productividad de IgG total por FastELISA® (R&D Biotech) (Figura 15A-B). Las líneas celulares seleccionadas se expandieron en medio de cultivo celular que contenía MSX 25 μ M, se transfirieron a placas de microtitulación de 24 pocillos y se exploraron con respecto a productividad y características de crecimiento en cultivo en suspensión (Figura 15C-D). Los resultados revelaron que el anticuerpo biespecífico IgG κ l puede producirse en condiciones de sobrecrecimiento discontinuas con agitación a un nivel comparable a las líneas celulares que expresan anticuerpos monoespecíficos convencionales. Se seleccionaron líneas celulares productoras superiores y se manejaron en cultivos de sobrecrecimiento discontinuo de 50 ml en matraces de agitación durante un máximo de 10 días. Se usó HPLC de Proteína A para cuantificación de IgG total en el sobrenadante. Se purificó IgG total de los sobrenadantes de las 10 líneas celulares de máxima producción por cromatografía de MabSelect SuRE usando 1 ml de columnas pre-empaquetadas HiTrap (GE Healthcare). Las cantidades relativas de anticuerpos monoespecíficos y biespecíficos en el IgG purificado total se evaluaron mediante IEX-HPLC como se ha descrito en el Ejemplo 10. Para la mayoría de las líneas celulares, la fracción de anticuerpo biespecífico IgG κ l varió entre el 37 y el 42 % del IgG total y dos líneas celulares tenían cantidades menores expresadas de IgG κ l (22 y 25 %). Los resultados para las 10 líneas celulares CHO se resumen en la Tabla IV.

Tabla IV

	Título de anticuerpos total (mg/ml)	Purificación de anticuerpos totales post MabSelect SuRr (mg)	Cantidad relativa de anticuerpos biespecíficos de IEX-HPLC (%)	Cantidad de anticuerpos biespecíficos totales (mg)
Línea celular 1	0,35	10,73	37	3,97
Línea celular 2	0,32	9,54	25	2,37
Línea celular 3	0,31	10,02	37	3,72
Línea celular 4	0,42	10,01	40	4,00
Línea celular 5	0,38	11,59	38	4,39
Línea celular 6	0,43	11,10	43	4,75
Línea celular 7	0,49	12,67	42	5,32
Línea celular 8	0,33	8,96	22	2,01
Línea celular 9	0,38	9,94	42	4,18
Línea celular 10	0,39	10,98	42	4,61

Purificación y caracterización de anticuerpo biespecífico IgG κ l expresado en CHO. El sobrenadante de grupos de células CHO transfectados con construcciones biespecíficas y monoespecíficas se usó para purificación. Los IgG λ anti-INF γ e IgG κ anti-IL6RC monoespecíficos se purificaron usando cromatografía de afinidad de Proteína A y se desalaron en PBS, mientras que los anticuerpos biespecíficos IgG κ l se purificaron usando el proceso de cromatografía de afinidad de tres etapas descrito en el Ejemplo 8. Las fracciones de elución y flujo continuo de las diferentes etapas así como las muestras purificadas finales se analizaron por SDS-PAGE e IEF (Figura 16). La especificidad del IgG κ l se controló después de cada etapa de purificación por ELISA (Figura 17). Los resultados demuestran que el proceso de purificación fue robusto y compatible con la expresión de CHO y produce anticuerpo biespecífico IgG κ l altamente puro.

EJEMPLO 12: Ejemplos adicionales de anticuerpos IgG κ l biespecíficos

Otros ejemplos de anticuerpos biespecíficos IgGκλ se aislaron, expresaron y purificaron como se ha descrito en los ejemplos anteriores. Estos incluyen un anticuerpo biespecífico IgGκλ anti-NusA/anti-INFγ y un anticuerpo biespecífico IgGκλ anti-IL6RC/anti-IL6RC en los que ambos sitios de combinación se unen con IL6RC pero portan un cadena ligera Kappa y una Lambda. Estos anticuerpos biespecíficos purificados se analizaron por IEF, junto con sus homólogos mono-específicos respectivos (Figura 18). Los resultados muestran que el pI del anticuerpo biespecífico siempre es intermedio entre el pI de los anticuerpos mono-específicos, pero que las diferencias pueden variar significativamente dependiendo de la secuencia del dominio variable de cadena ligera. Esto ilustra que la purificación del anticuerpo biespecífico basándose en las diferencias de carga podría ser difícil si las dos cadenas ligeras tienen propiedades bioquímicas similares y destaca la ventaja del enfoque de la purificación de afinidad de la invención.

EJEMPLO 13: Generación de anticuerpos biespecíficos IgGκλ usando dos dominios variables Kappa o dos Lambda

También pueden generarse anticuerpos biespecíficos usando dos dominios variables del mismo tipo (Lambda o Kappa). Como las etapas de purificación de afinidad requieren la presencia de los dominios constante Kappa y constante Lambda de las cadenas ligeras, cualquier dominio variable de cadena ligera puede en principio fusionarse con estos dominios constantes para generar cadenas ligeras híbridas como se ilustra en la Figura 3. Esto se demostró usando dos anticuerpos dirigidos contra INFγ e IL6RC aislados de bibliotecas de anticuerpos de VH fijo descritas en el Ejemplo 1. En este caso ambos anticuerpos comparten el mismo VH y tienen un dominio variable de cadena ligera Lambda. El dominio VLambda del anticuerpo anti-INFγ se combinó con el dominio constante Lambda mientras que el dominio VLambda del anticuerpo anti-IL6RC se combinó con el dominio constante Kappa. Para esto último, se generaron tres construcciones diferentes incluyendo puntos de fusión diferentes entre los dominios VLambda y el dominio CKappa. En una construcción (Híbrido 1) el punto de fusión estaba al final de la región marco conservada 4 (FR4) del dominio VLambda e incluye el dominio constante Kappa completo (Figura 19A). En otra construcción (Híbrido 2), la región FR4 Lambda se reemplazó por una región FR4 Kappa (Figura 19B). En la tercera construcción (Híbrido 3), los primeros 4 aminoácidos del dominio constante Kappa se sustituyeron por los 4 aminoácidos del dominio constante Lambda (Figura 19C). Estas diferentes cadenas ligeras Lambda-Kappa híbridas se clonaron junto con la cadena pesada común y la cadena ligera Lambda en el vector pNovi κHλ. Se realizaron transfección de células de mamífero, expresión de proteínas y purificación de afinidad en tres etapas del IgGκλ como se ha descrito en los ejemplos anteriores. El análisis de las fracciones de elución indicó que la cadena ligera Híbrida 3 no se unía con la resina Kappaselect y por lo tanto no permitía una purificación de anticuerpos biespecíficos eficaz. El Híbrido 1 y el Híbrido 2 permitieron una purificación biespecífica de IgGκλ eficaz. Se mostró que estos IgGκλ purificados que portaban una cadena ligera híbrida analizada en un Agilent Bionalyzer 2100 usando una microplaca de Proteína 80 (Agilent Technologies) y los picos en el electroferograma correspondientes a las cadenas ligeras eran equivalentes (Figura 20). Los resultados muestran que los anticuerpos biespecíficos de la invención pueden generarse usando dos anticuerpos que tienen una cadena pesada común y dos cadenas ligeras que tienen dominios variables del mismo tipo (Kappa o Lambda).

EJEMPLO 14: Tanto VH como VL de los anticuerpos descritos están implicados en la unión a antígeno

Para ensayar la contribución del VH común a la unión a antígeno, se combinaron diferentes cadenas ligeras de scFv que portaban un VH común seleccionado en el Ejemplo 1 y 4, con dos VH diferentes que son diferentes para el VH común original. Los diferentes scFv pudieron expresarse y purificarse como se ha descrito en el Ejemplo 3 y se ensayaron con respecto a la unión frente a la diana contra la que se habían seleccionado. Los ejemplos mostrados en la Figura 21 muestran que un scFv específico para INFγ y un scFv específico contra IL6RC pueden unirse solamente con sus dianas respectivas cuando se combinan con el dominio VH con el que se han seleccionado originalmente y no se observa unión cuando se combinan con otros dos dominios VH que posibilitan su expresión y purificación. Los resultados indican que a pesar del hecho de que la diversidad se limita al dominio VL, tanto el VH como el VL comunes contribuyen a la unión a antígeno.

EJEMPLO 15: Desarrollo de ELISA para cuantificación de anticuerpos biespecíficos IgGκλ

Se desarrolló un ELISA de tipo sándwich para cuantificar anticuerpos biespecíficos IgGκλ. Se recubrieron placas Maxisorp de 96 pocillos (Nunc) con anticuerpo Lambda anti-humano de ratón 10 µg/ml (Southern Biotech) y se incubaron a 4 °C durante una noche. Después de lavar (PBS Tween 20 al 0,05 %, 3 lavados), la placa se bloqueó con PBS-BSA al 3 % (Sigma) durante 2 horas a temperatura ambiente. El patrón de IgGκλ purificado se diluyó en serie en PBS-BSA al 1 % entre 500 ng/ml y 1 ng/ml para obtener un buen intervalo de linealidad para cuantificación de muestras. Dependiendo de su origen las muestras se diluyeron para entrar en el intervalo de cuantificación de la siguiente manera: Sobrenadante de CHO en bruto 1/1500; Proteína A purificada 1/15000. Las muestras se diluyeron en serie 1:2. Después de lavar las placas, se añadieron 50 µl de cada dilución preparada por duplicado y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron de nuevo y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con 50 µl de anticuerpo Kappa anti-humano 1:2000 (Southern Biotech). Después del último lavado (PBST 0,05 %, 5 lavados), la reacción se reveló con 50 µl de sustrato TMB (Sigma) y se detuvo después de 15 minutos añadiendo 50 µl de H2SO4 (hidróxido sódico 2N). La absorbancia a 450 nm se registró usando un lector

de microplacas de precisión (Epoch, Witec). Como los anticuerpos monoespecíficos podrían afectar al ensayo uniéndose con anticuerpo de captura en recubrimiento, se realizaron experimentos de adición añadiendo cantidades crecientes de anticuerpos IgGκ monoespecífico e IgGλ monoespecífico al patrón biespecífico IgGκλ. Se ensayaron diferentes relaciones: (biespecífico IgGκλ 50 %, monoespecífico IgGκ 25 %, monoespecífico IgGλ 25 %); (biespecífico IgGκλ 67 %; monoespecífico IgGλ 33 %); (biespecífico IgGκλ 50 %, monoespecífico IgGλ 50 %); (biespecífico IgGκλ 25 %, monoespecífico IgGλ 75 %); (biespecífico IgGκλ 50 %, monoespecífico IgGκ 50 %).

Los resultados mostrados en la Figura 22 indican que el ensayo no se ve afectado significativamente por anticuerpos monoespecíficos y que por lo tanto se puede usar para cuantificación de anticuerpos biespecíficos IgGκλ en muestras complejas tales como sobrenadantes de cultivo celular. El ELISA se usó para cuantificar un anticuerpo biespecífico IgGκλ en sobrenadante a partir de líneas celulares CHO estables y después de IgG total purificado a partir de los mismos sobrenadantes por cromatografía de afinidad de Proteína A. Los resultados de cuantificación de ELISA se compararon con el contenido de IgG total determinado por HPLC de Proteína A o por absorción a 280 nm y se resumen en la Tabla V. Las concentraciones obtenidas por ELISA correspondían al 30-40 % de IgG total, una proporción de biespecífico que se espera. Los datos muestran que este ensayo puede usarse para determinar la cantidad de anticuerpo biespecífico IgGκλ en un sobrenadante de cultivo celular y facilita la exploración de líneas celulares estables para su productividad en anticuerpo biespecífico IgGκλ.

Tabla V. Cuantificación de anticuerpo biespecífico IgGκλ para diferentes líneas celulares de CHO estables usando sobrenadantes en bruto o IgG total por ELISA y en comparación con HPLC de Proteína A y los resultados de cuantificación A280 de IgG total.

Línea celular	Sobrenadantes de CHO		IgG total purificado de Proteína A	
	HPLC ProtA	ELISA	A280nm	ELISA
Nº 11	0,3 mg/ml	0,18 mg/ml	4,38 mg/ml	2,3 mg/ml
Nº 14	0,42 mg/ml	0,234 mg/ml	4,13 mg/ml	3,3 mg/ml
Nº 20	0,38 mg/ml	0,18 mg/ml	4,48 mg/ml	1,7 mg/ml
10E4	0,39 mg/ml	0,19 mg/ml	4,81 mg/ml	3 mg/ml

Otras realizaciones

Aunque la invención se ha descrito junto con la descripción detallada de la misma, se pretende que la descripción anterior ilustre y no limite el alcance de la invención, que se define por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal aislado que porta una especificidad diferente en cada sitio de combinación y que consiste en dos copias de un único polipéptido de cadena pesada y una primera cadena ligera y una segunda cadena ligera, en el que las primera y segunda cadenas ligeras son diferentes.
2. El anticuerpo monoclonal aislado de la reivindicación 1 en el que al menos una parte de la primera cadena ligera es del tipo Kappa y al menos una parte de la segunda cadena ligera es del tipo Lambda.
3. El anticuerpo monoclonal aislado de la reivindicación 2, en el que la primera cadena ligera comprende al menos una región constante Kappa.
4. El anticuerpo monoclonal aislado de la reivindicación 3, en el que la primera cadena ligera comprende además una región variable Kappa o una región variable Lambda.
5. El anticuerpo monoclonal aislado de la reivindicación 2, en el que la segunda cadena ligera comprende al menos una región constante Lambda.
6. El anticuerpo monoclonal aislado de la reivindicación 5, en el que la segunda cadena ligera comprende además una región variable Lambda o una región variable Kappa.
7. El anticuerpo monoclonal aislado de la reivindicación 2, en el que la primera cadena ligera comprende una región constante Kappa y una región variable Kappa, y en el que la segunda cadena ligera comprende una región constante Lambda y una región variable Lambda.
8. El anticuerpo monoclonal aislado de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que las secuencias de la región marco conservada constante y variable son humanas.
9. Un método para generar un anticuerpo biespecífico de la reivindicación 1 que comprende:
 - a. Aislar una región de anticuerpo o fragmento de anticuerpo que tiene una especificidad determinada por un dominio variable de cadena pesada combinado con un primer dominio variable de cadena ligera;
 - b. Aislar una región de anticuerpo o fragmento de anticuerpo que tiene una especificidad diferente determinada por el mismo dominio variable de cadena pesada que el anticuerpo de la etapa a) combinado con un segundo dominio variable de cadena ligera;
 - c. Co-expresar en una célula:
 - i. el dominio variable de cadena pesada común fusionado con una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina;
 - ii. el primer dominio variable de cadena ligera fusionado con un dominio constante de cadena ligera del tipo Kappa o fusionado con un dominio constante de cadena ligera del tipo Lambda; y
 - iii. el segundo dominio variable de cadena ligera fusionado con un dominio constante de cadena ligera de un tipo diferente que el dominio constante de la primera cadena ligera.
10. El método de la reivindicación 9 en el que
 - a. un dominio variable de cadena ligera Kappa está fusionado con una región constante del tipo Kappa,
 - b. un dominio variable de cadena ligera Kappa está fusionado con una región constante del tipo Lambda,
 - c. un dominio variable de cadena ligera Lambda está fusionado con una región constante del tipo Kappa, o
 - d. un dominio variable de cadena ligera Lambda está fusionado con una región constante del tipo Lambda.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10, que comprende además la etapa de (d) purificar los anticuerpos biespecíficos producidos en la etapa c) de los anticuerpos monoespecíficos producidos en la etapa c), en el que la etapa d) es opcionalmente una etapa de purificación por cromatografía de afinidad.
12. El método de la reivindicación 11 en el que la etapa de purificación es una etapa de purificación por cromatografía de afinidad realizada usando medios de cromatografía de afinidad específico de dominio constante Kappa, específico de dominio constante Lambda o tanto específico de dominio constante Kappa como específico de dominio constante Lambda.
13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 en el que la etapa a) y b) se facilitan mediante el uso de bibliotecas de anticuerpos que tienen una cadena pesada común y diversidad limitada al dominio variable de cadena ligera, en el que la biblioteca de anticuerpos se presenta opcionalmente en bacteriófagos filamentosos, en la superficie de células de levadura, bacterias o mamíferos o se usa para ribosomas u otro tipo de presentación *in vitro*.

14. Un método para preparar un anticuerpo biespecífico que se une específicamente con un primer antígeno y un segundo antígeno, en el que los primer y segundo antígenos son diferentes, comprendiendo el método:

- a. proporcionar una primera molécula de ácido nucleico que codifica un primer polipéptido que comprende una región variable de cadena pesada de un polipéptido de inmunoglobulina o fragmento del mismo que se une con el primer antígeno, acoplado con una región constante de inmunoglobulina;
- b. proporcionar una segunda molécula de ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido que comprende una región variable de cadena ligera del polipéptido de inmunoglobulina o fragmento del mismo que se une con el primer antígeno acoplado con una primera región constante de cadena ligera de tipo Kappa o de tipo Lambda;
- c. proporcionar una tercera molécula de ácido nucleico que codifica un tercer polipéptido que comprende una región variable de cadena ligera de un polipéptido de inmunoglobulina o fragmento del mismo que comparte la misma región de cadena variable pesada del polipéptido de inmunoglobulina o fragmento del mismo de la etapa (a) y se une con el segundo antígeno, acoplado a una segunda región constante de cadena ligera de tipo Kappa o tipo Lambda, en el que los primer y segundo dominios constantes de cadena ligera son de tipos diferentes; y
- d. cultivar una célula hospedadora que comprende las primera, segunda y tercera moléculas de ácido nucleico en condiciones que permiten la expresión de los primer, segundo y tercer polipéptidos.

15. El método de la reivindicación 14, que comprende además la etapa de (e) recuperar el anticuerpo biespecífico.

16. El método de la reivindicación 14, en el que el segundo ácido nucleico codifica un dominio variable de cadena ligera de tipo Kappa.

17. El método de la reivindicación 16, en el que el segundo ácido nucleico codifica una región constante de tipo Kappa o una región constante de tipo Lambda o un dominio variable de cadena ligera de tipo Lambda.

18. El método de la reivindicación 17, en el que el segundo ácido nucleico codifica un dominio variable de cadena ligera de tipo Lambda, en el que el segundo ácido nucleico codifica una región constante de tipo Kappa o una región constante de tipo Lambda.

19. El método de la reivindicación 14, en el que el tercer ácido nucleico codifica un dominio variable de cadena ligera de tipo Kappa.

20. El método de la reivindicación 19, en el que el tercer ácido nucleico codifica una región constante de tipo Kappa o una región constante de tipo Lambda.

21. El método de la reivindicación 14, en el que el tercer ácido nucleico codifica un dominio variable de cadena ligera de tipo Lambda.

22. El método de la reivindicación 21, en el que el tercer ácido nucleico codifica una región constante de tipo Kappa o una región constante de tipo Lambda.

23. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 22, en el que el anticuerpo biespecífico se recupera en una etapa (e) usando una etapa de purificación por cromatografía de afinidad, en el que la etapa de purificación se realiza opcionalmente usando medios de cromatografía de afinidad específico de dominio constante Kappa, específico de dominio constante Lambda o tanto específico de dominio constante Kappa como específico de dominio constante Lambda.

24. Una mezcla de anticuerpos que comprende dos anticuerpos monoespecíficos y un anticuerpo biespecífico, que tienen todos una cadena pesada común.

25. Un método para generar una mezcla de anticuerpos de la reivindicación 24 que comprende:

- a. Aislar una región de anticuerpo o fragmento de anticuerpo que tiene una especificidad determinada por un dominio variable de cadena pesada combinado con un primer dominio variable de cadena ligera;
- b. Aislar una región de anticuerpo o fragmento de anticuerpo que tiene una especificidad diferente determinada por el mismo dominio variable de cadena pesada que el anticuerpo de la etapa a) combinado con un segundo dominio variable de cadena ligera;
- c. Co-expresar en una célula:
 - i. el dominio variable de cadena pesada común fusionado con una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina;
 - ii. el primer dominio variable de cadena ligera fusionado con un dominio constante de cadena ligera del tipo Kappa o fusionado con un dominio constante de cadena ligera del tipo Lambda; y
 - iii. el segundo dominio variable de cadena ligera fusionado con un dominio constante de cadena ligera del tipo Kappa o fusionado con un dominio constante de cadena ligera del tipo Lambda; y opcionalmente

d. Purificar la mezcla de anticuerpos producida en la etapa c) del sobrenadante de cultivo celular.

26. Una mezcla de anticuerpos que comprende tres o más anticuerpos monoespecíficos y tres o más anticuerpos biespecíficos, que tienen todos una cadena pesada común.

5

27. Un método para generar una mezcla de anticuerpos de la reivindicación 26 que comprende:

a. Aislar una región de anticuerpo o fragmento de anticuerpo que tiene una especificidad determinada por un dominio variable de cadena pesada combinado con un primer dominio variable de cadena ligera;

10

b. Aislar varias regiones de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que tienen una especificidad diferente determinada por el mismo dominio variable de cadena pesada que el anticuerpo de la etapa a) combinado con diferentes dominios variables de cadena ligera;

c. Co-expresar en una célula:

15

i. el dominio variable de cadena pesada común fusionado con una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina;

ii. todas las cadenas ligeras de los anticuerpos aislados en la etapa a) y b) fusionados con un dominio constante de cadena ligera del tipo Kappa o fusionado con un dominio constante de cadena ligera del tipo Lambda; y opcionalmente

20

d. Purificar la mezcla de anticuerpos producida en la etapa c) del sobrenadante de cultivo celular.

FIGURA 1

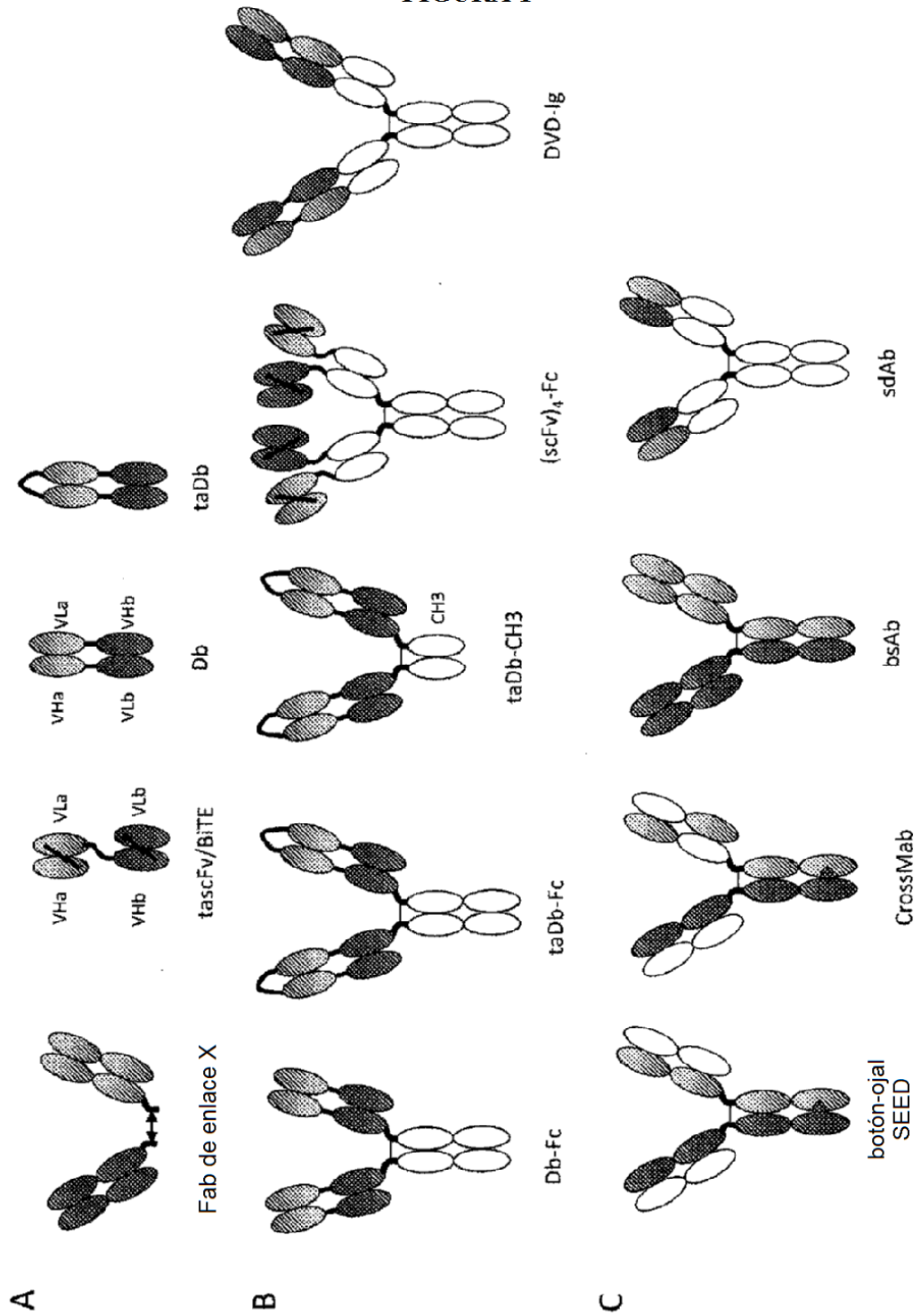


FIGURA 2

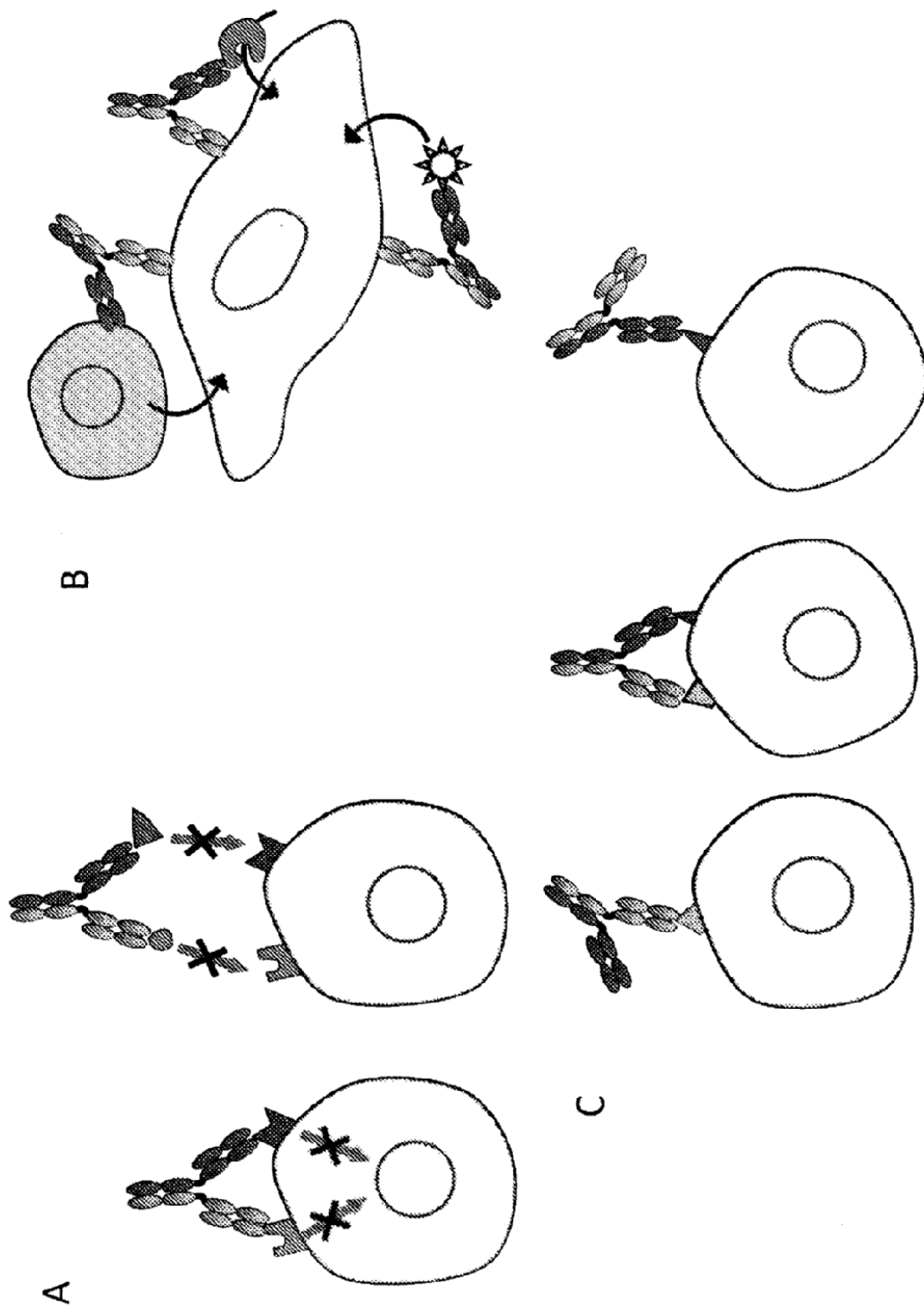


FIGURA 3

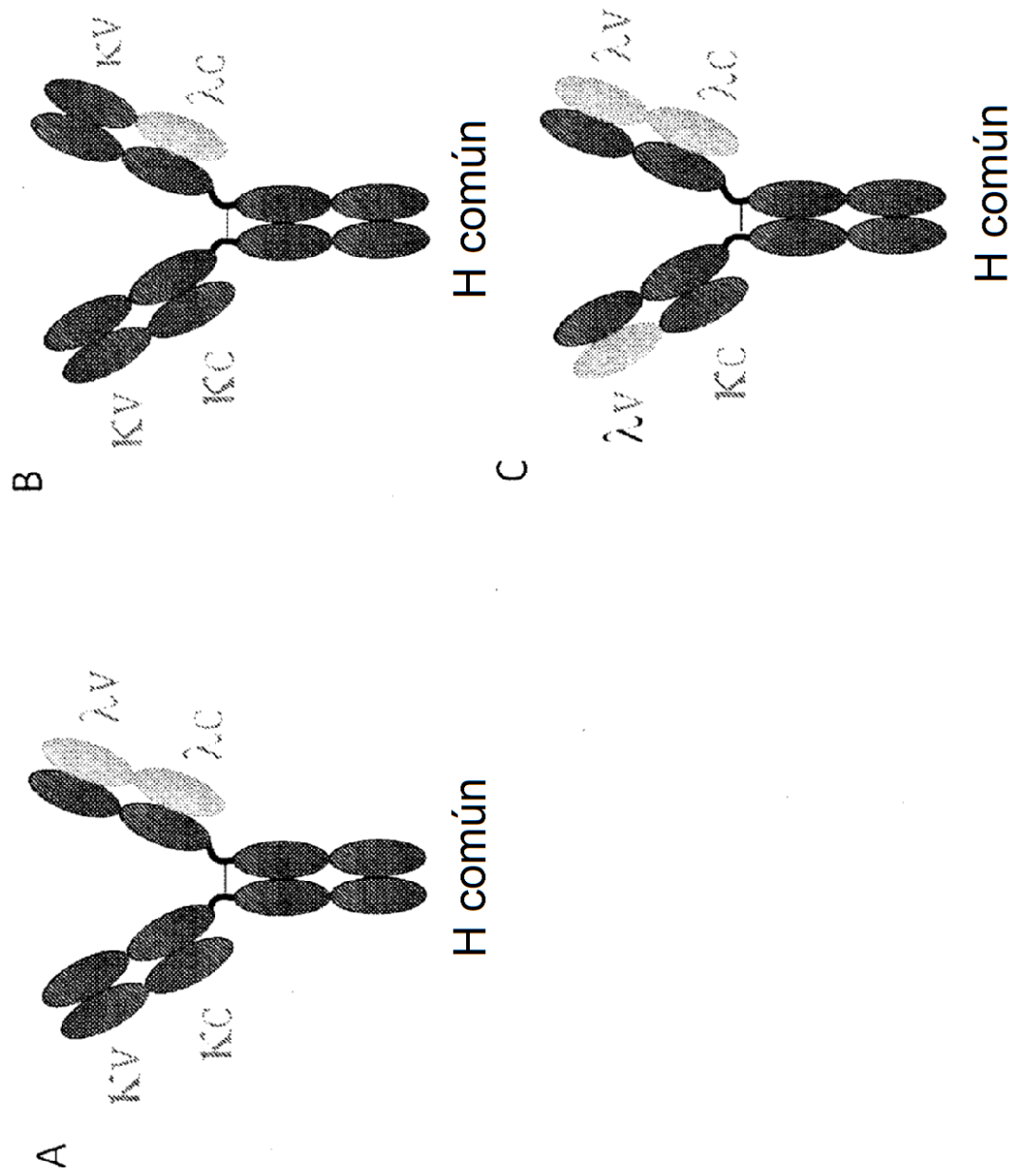


FIGURA 4

Clones seleccionados
contra hIL6Rc

	1	2	3	4	5	6
A	0,055	0,052	0,053	0,054	0,052	0,042
B	0,041	0,043	0,043	0,051	0,04	0,051
C	0,043	0,044	0,039	0,04	0,041	0,048
D	0,04	0,041	0,04	0,042	0,04	0,043
E	0,044	0,041	0,045	0,041	0,044	0,048
F	0,041	0,044	0,039	0,04	0,038	0,041
G	0,07	0,052	0,054	0,06	0,044	0,053
H	0,054	0,053	0,055	0,053	0,052	0,058

	1	2	3	4	5	6
A	0,195	0,438	0,533	0,223	0,355	0,121
B	0,097	0,252	0,077	0,316	0,061	0,175
C	0,127	0,081	0,091	0,065	0,234	0,124
D	0,332	0,123	0,301	0,333	0,268	0,533
E	0,202	0,08	0,214	0,061	0,108	0,115
F	0,119	0,372	0,357	0,061	0,069	0,103
G	0,183	0,082	0,08	0,069	0,059	0,061
H	0,166	0,078	0,305	0,331	0,078	0,064

Clones seleccionados
contra hCXCL10-NuSA

	1	2	3	4	5	6
A	0,178	0,056	0,083	0,056	1,133	0,262
B	0,325	0,381	0,052	0,052	0,15	0,249
C	0,077	1,123	0,442	0,126	0,395	0,148
D	0,343	0,05	0,051	0,061	0,051	1,122
E	0,053	0,1	0,052	0,048	0,049	0,05
F	0,052	0,16	0,05	1,223	0,044	0,055
G	0,075	0,13	0,226	0,065	0,046	0,047
H	0,102	0,046	0,048	0,089	0,732	0,048

	1	2	3	4	5	6
A	0,09	0,066	0,066	0,07	0,056	0,041
B	0,067	0,059	0,075	0,071	0,053	0,055
C	0,063	0,068	0,067	0,07	0,055	0,059
D	0,061	0,058	0,056	0,052	0,056	0,055
E	0,063	0,065	0,054	0,057	0,057	0,058
F	0,06	0,057	0,063	0,058	0,059	0,058
G	0,05	0,055	0,06	0,058	0,055	0,06
H	0,053	0,056	0,057	0,074	0,065	0,06

Recubrimiento de
hCXCL10-NuSA

Recubrimiento de
hIL6Rc

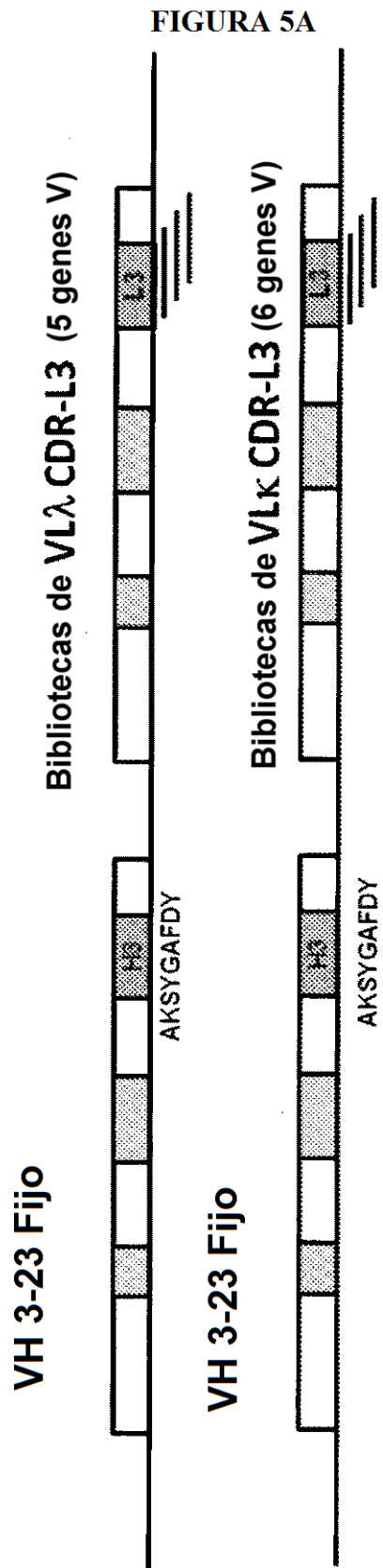


FIGURA 5B

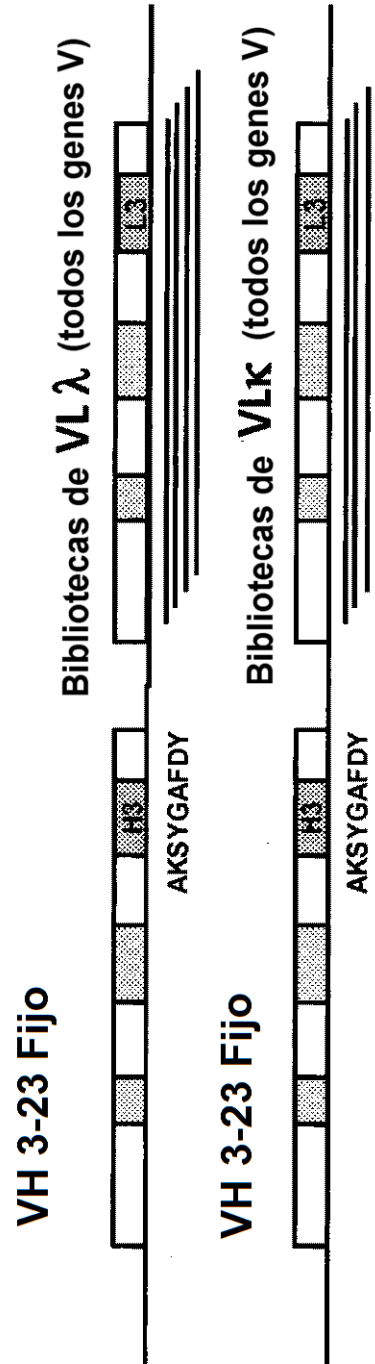


FIGURA 5C

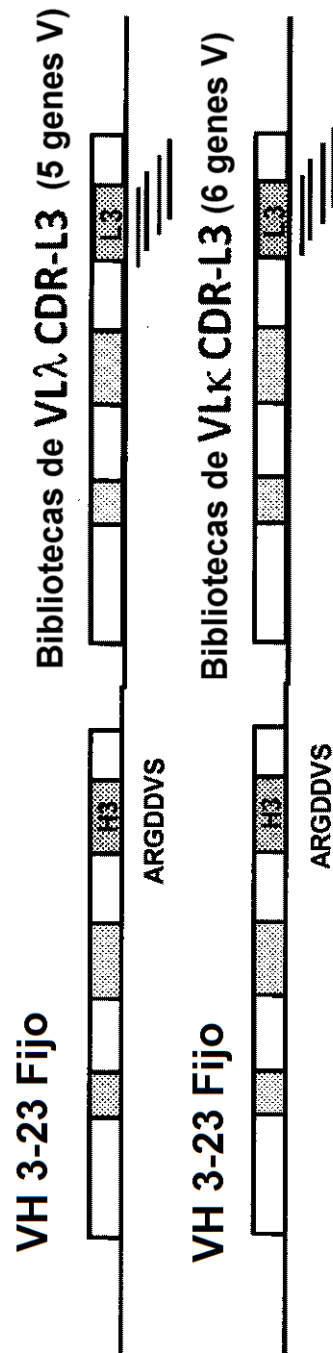


FIGURA 6

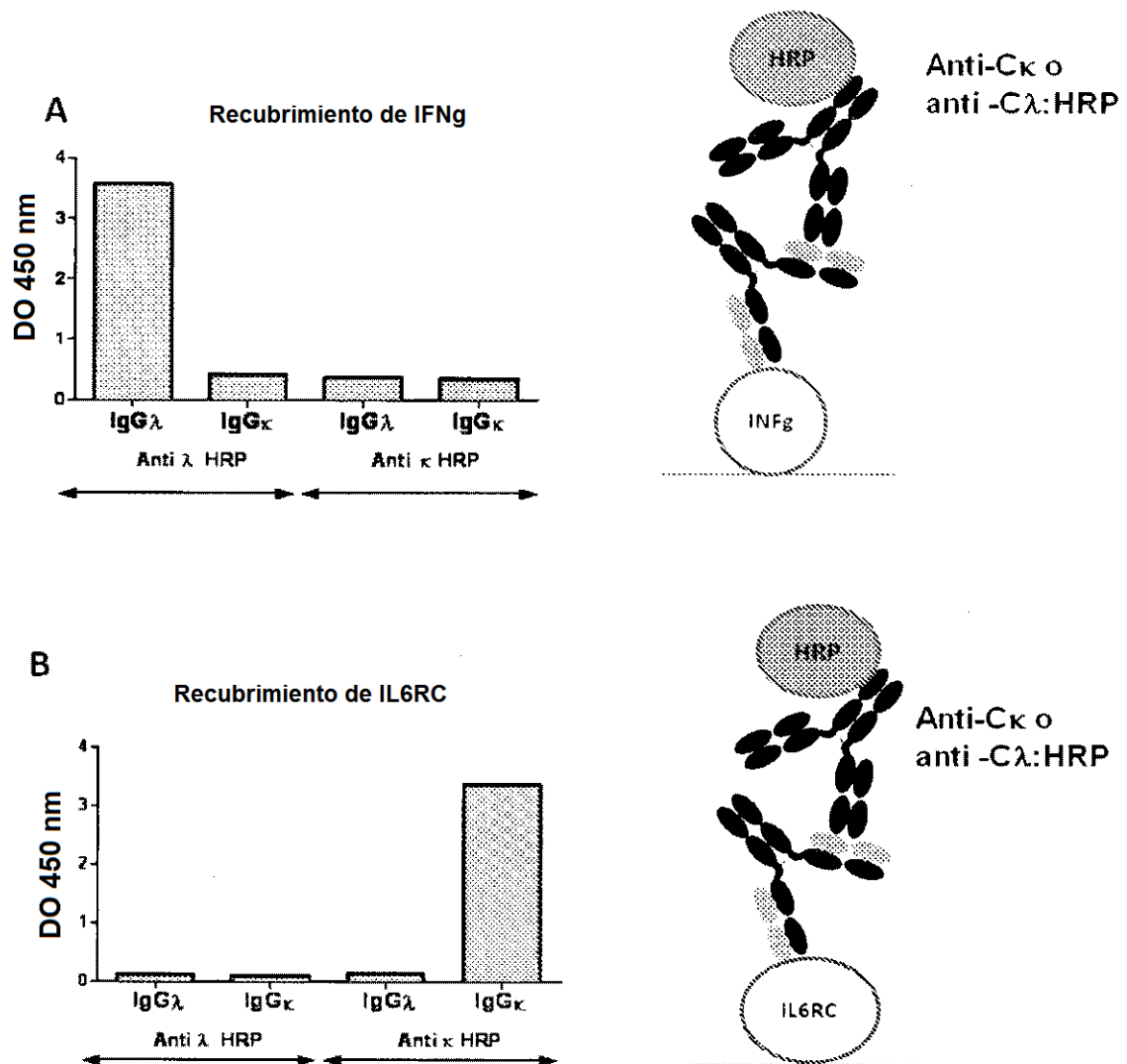


FIGURA 7A

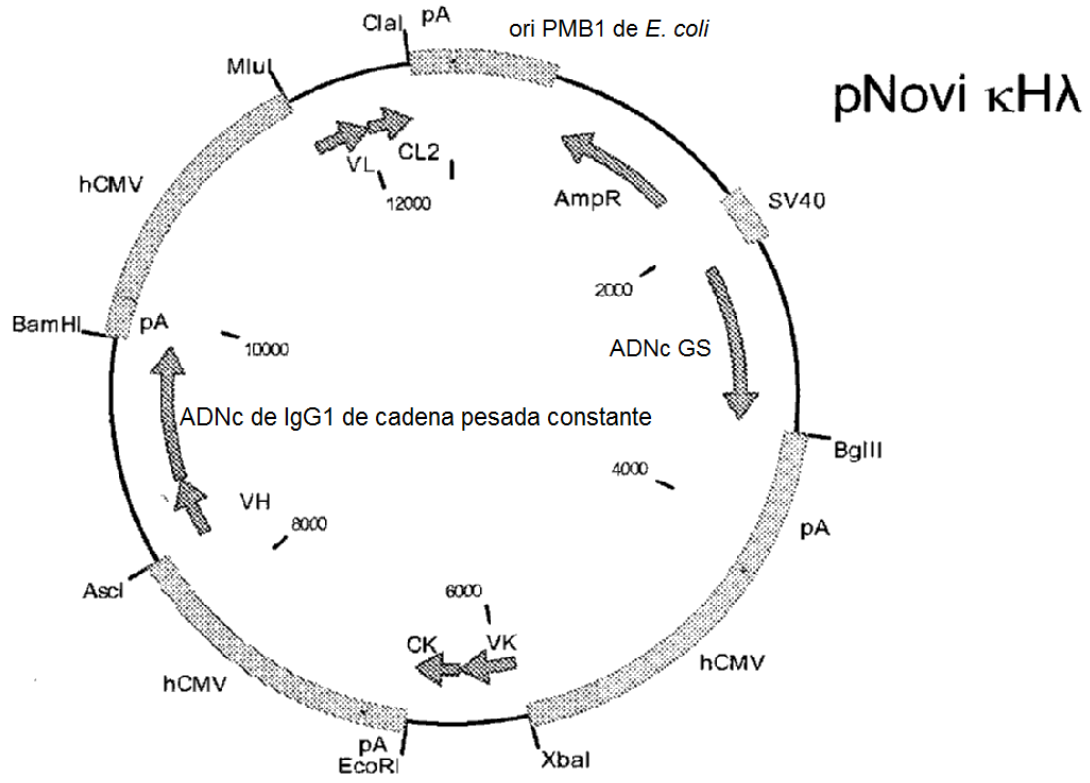


FIGURA 7B

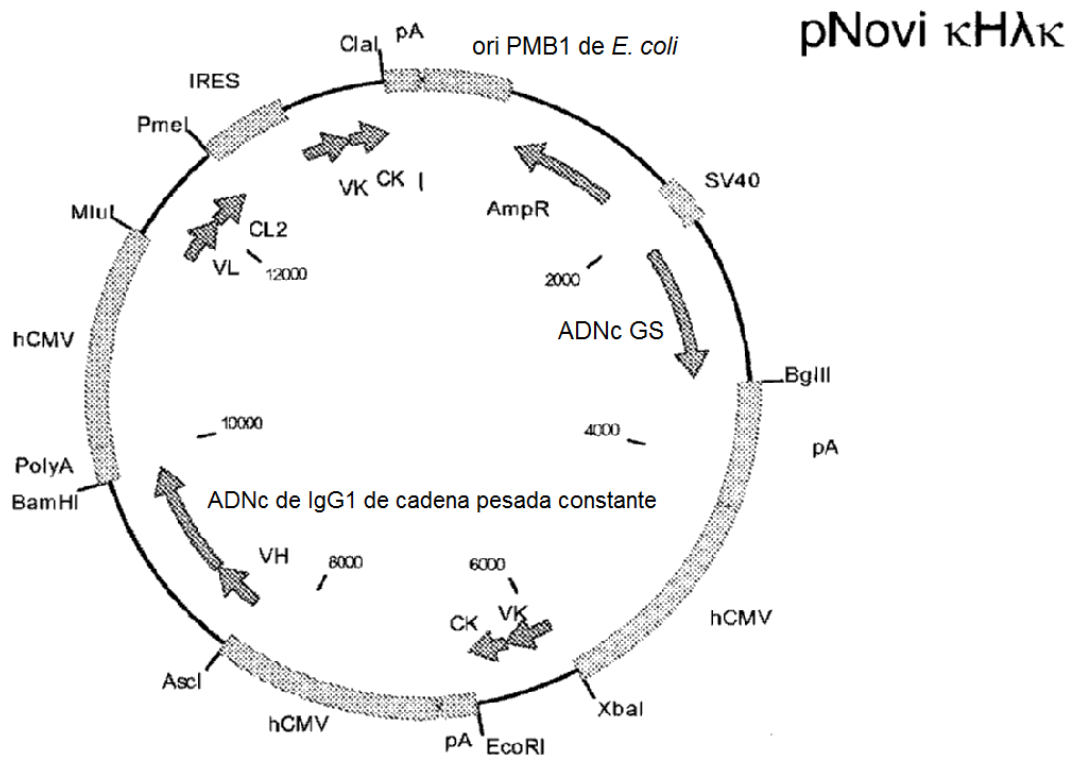


FIGURA 8A

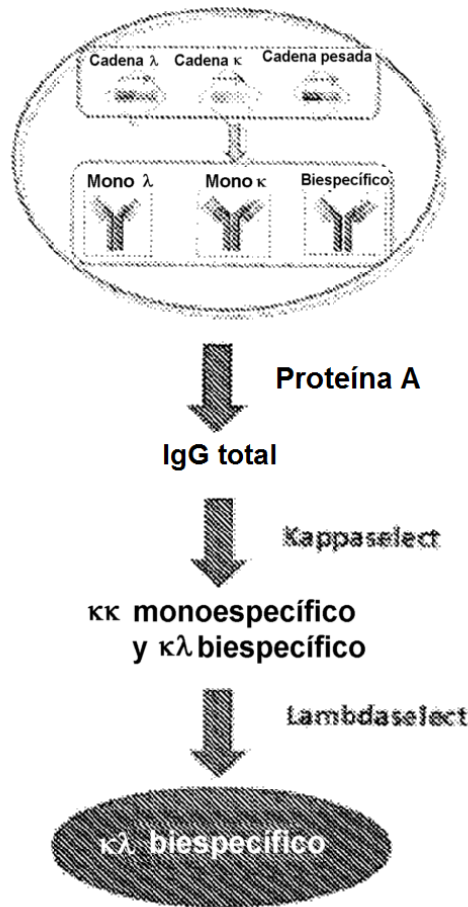


FIGURA 8B

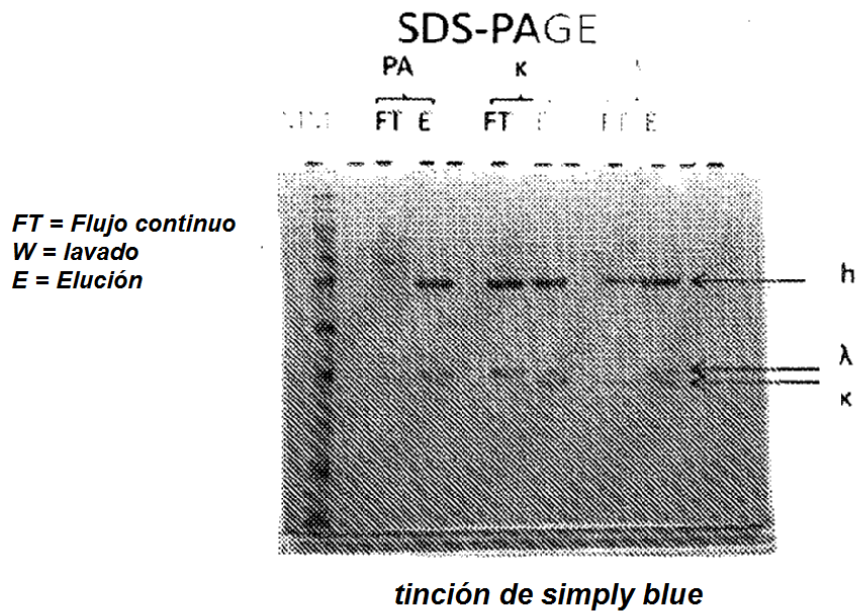


FIGURA 9

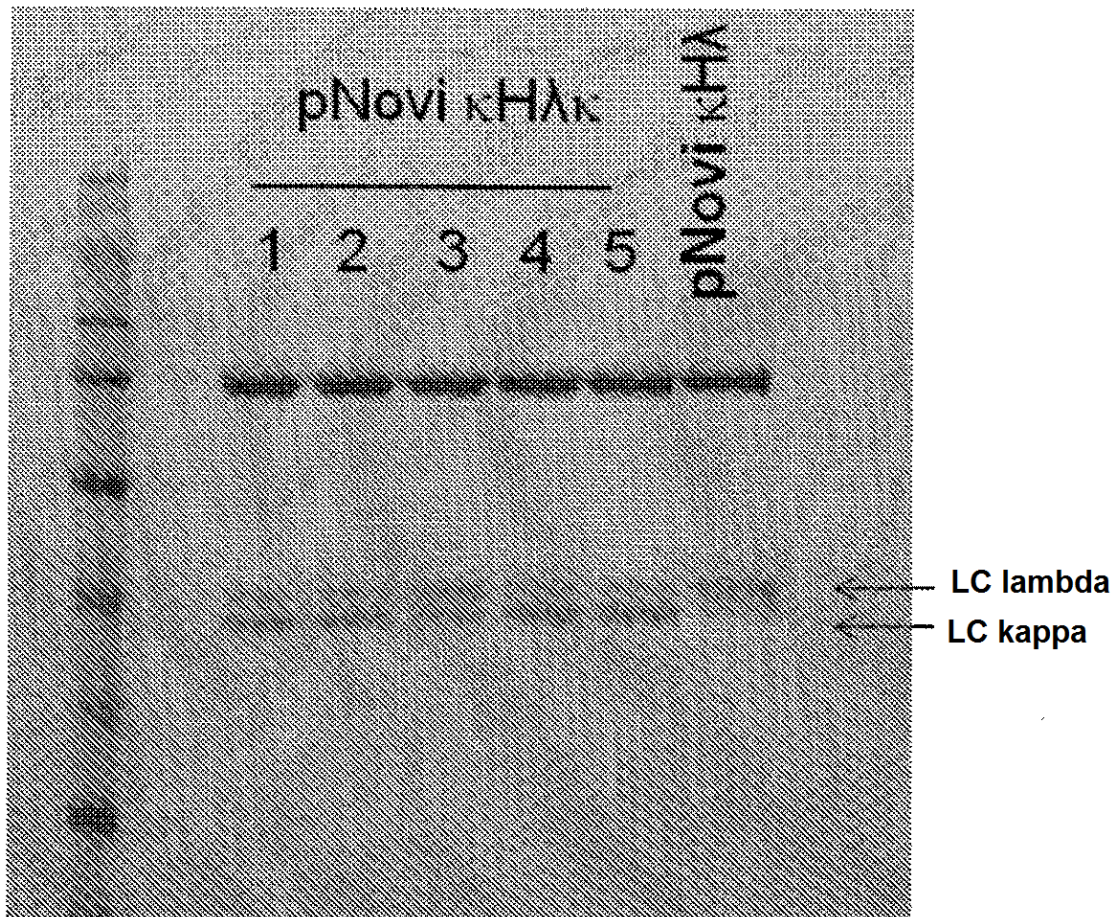


FIGURA 10A

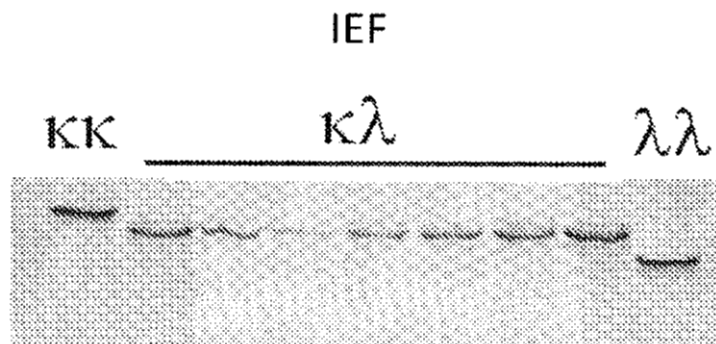


FIGURA 10B

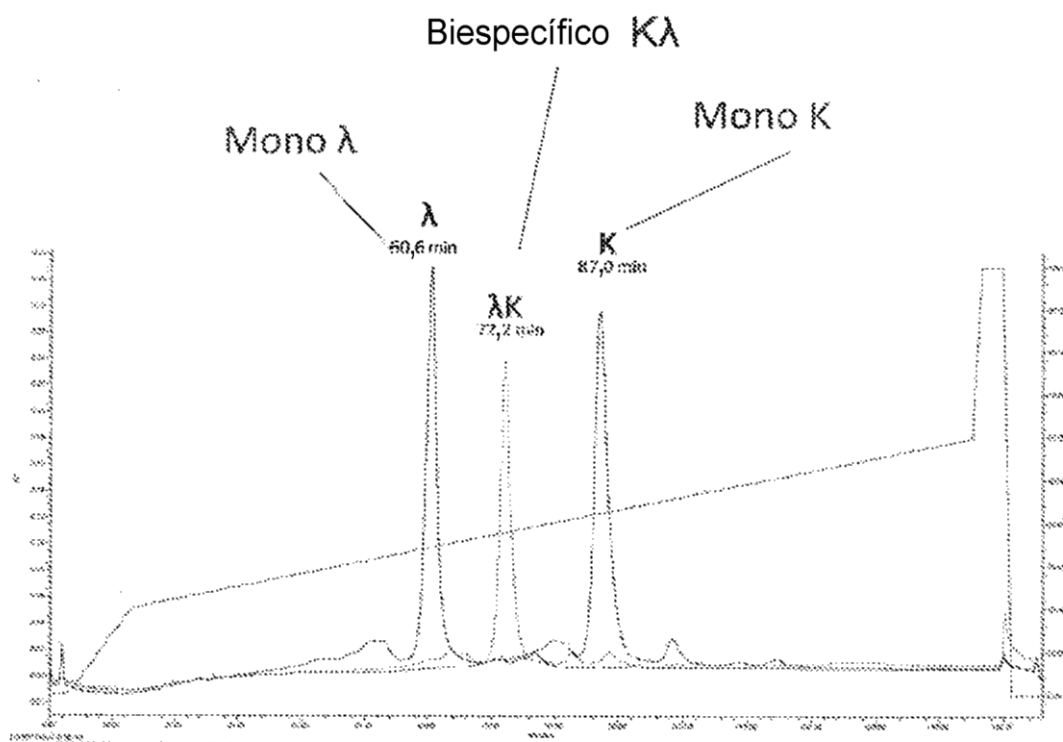


FIGURA 11A

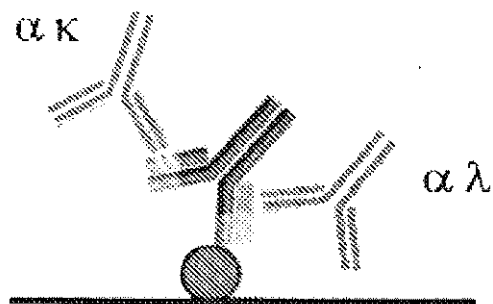


FIGURA 11B

Recubrimiento de IFNg

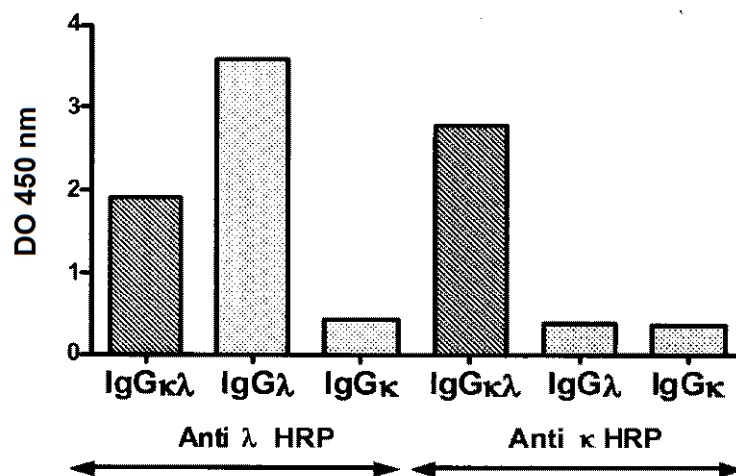


FIGURA 11C

Recubrimiento de IL6RC

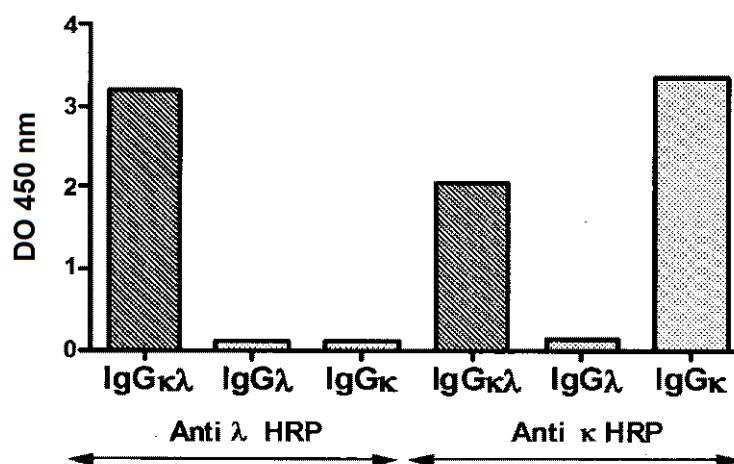


FIGURA 12A

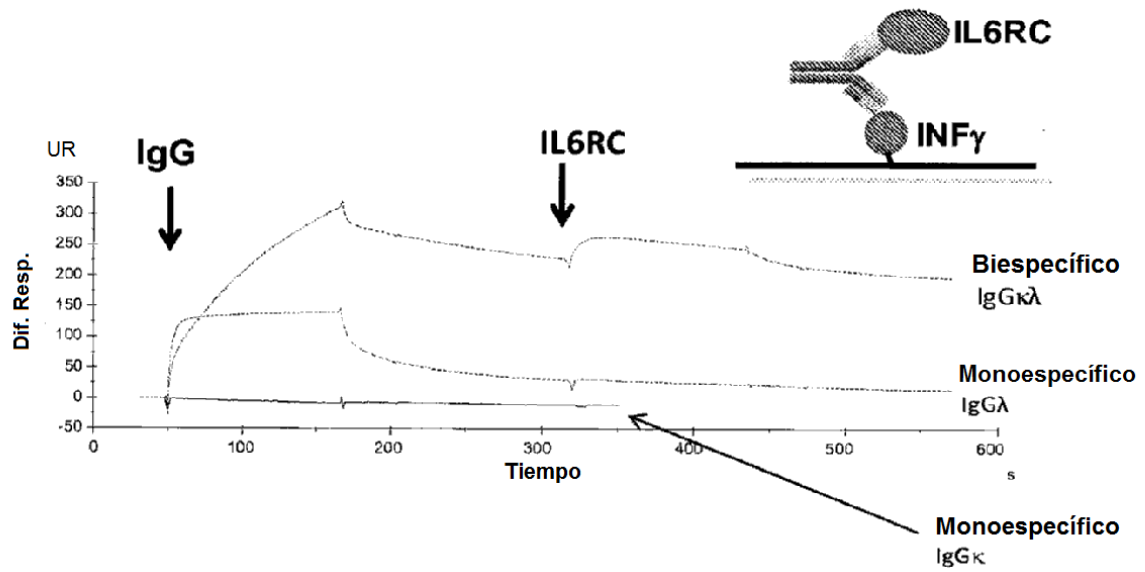


FIGURA 12B

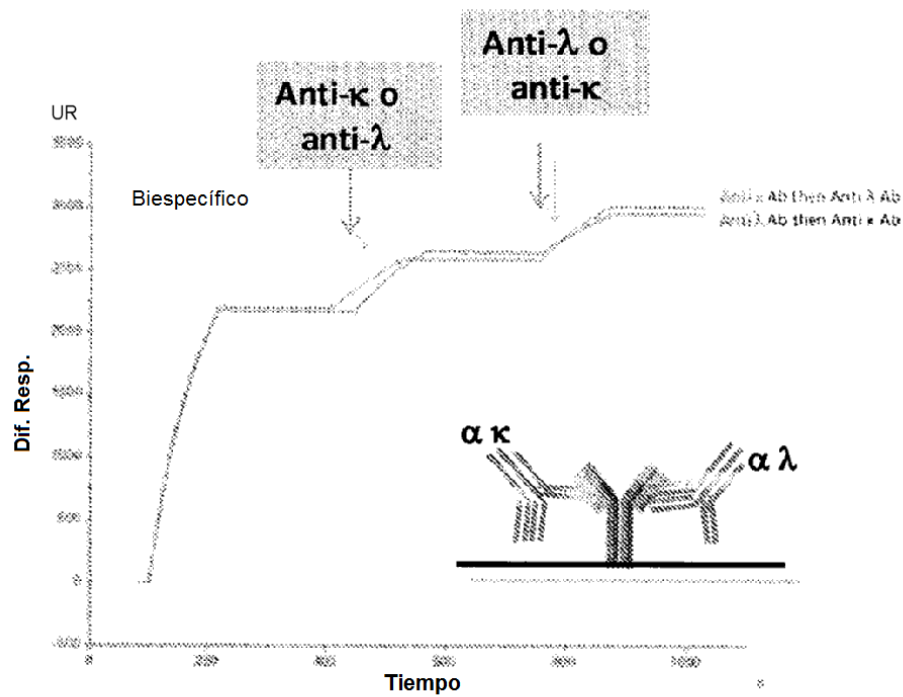


FIGURA 13

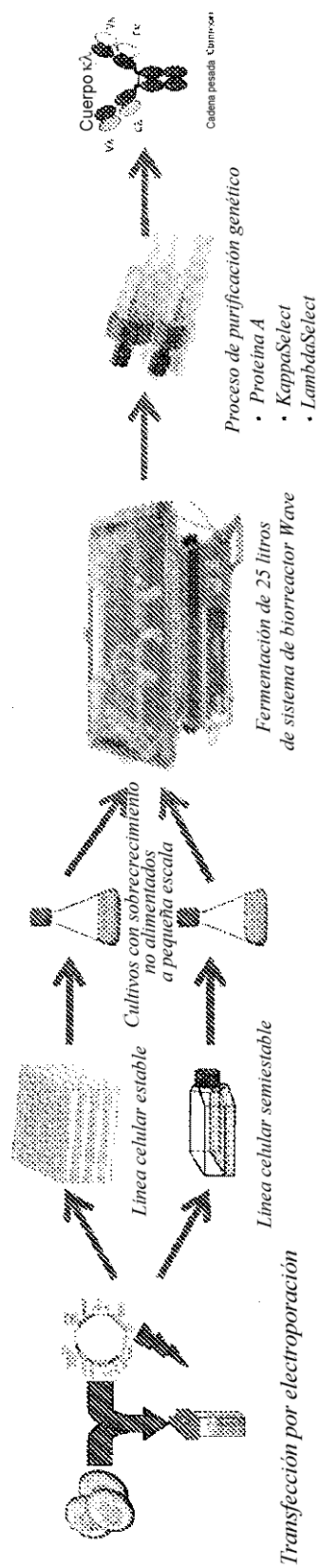


FIGURA 14A

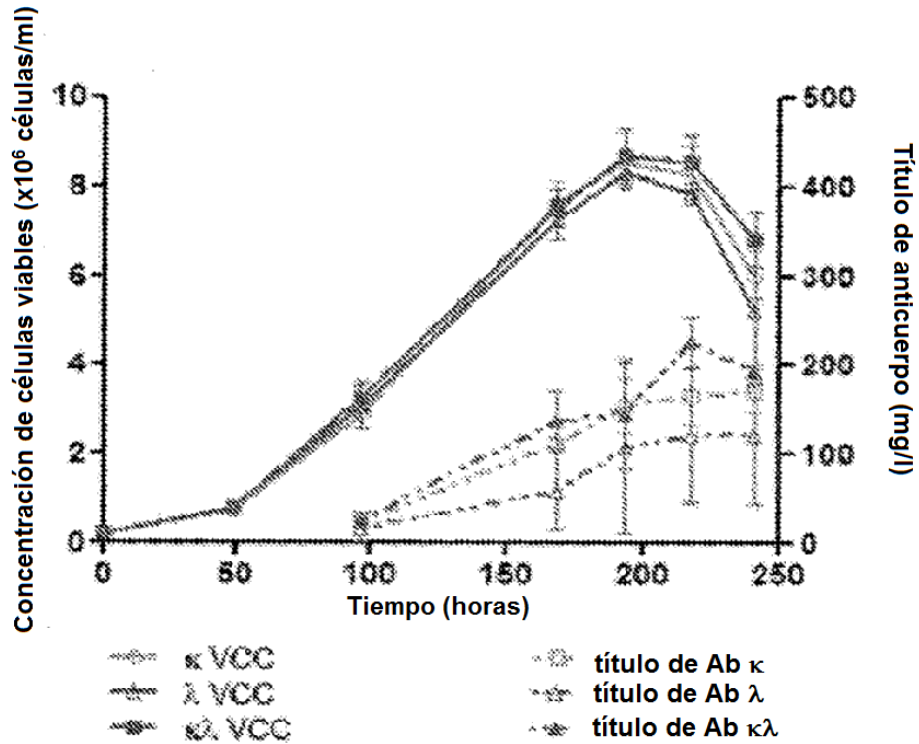


FIGURA 14B

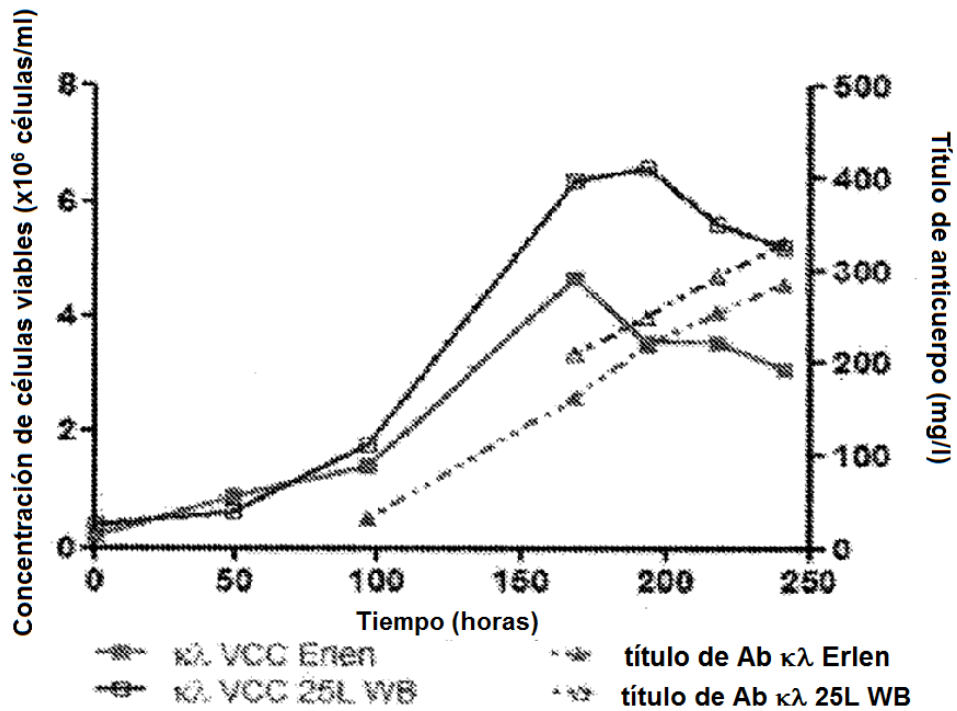


FIGURA 15A

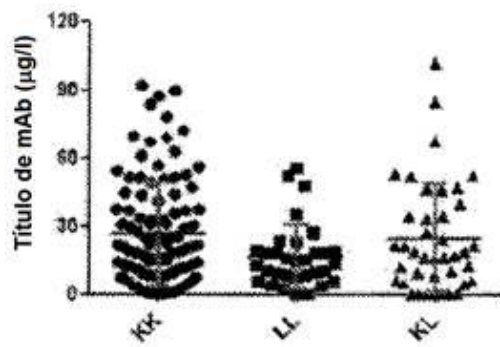


FIGURA 15B

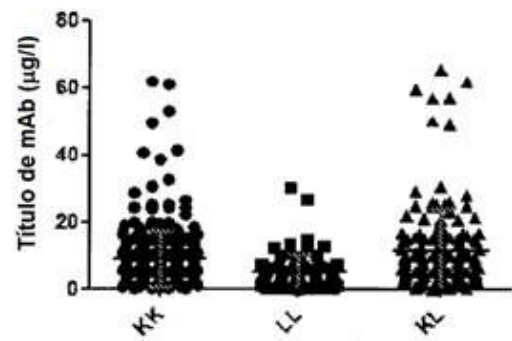


FIGURA 15C

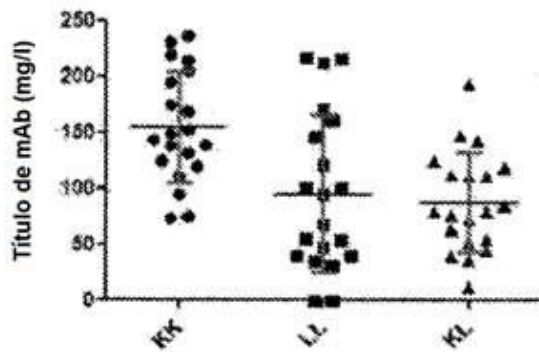


FIGURA 15D

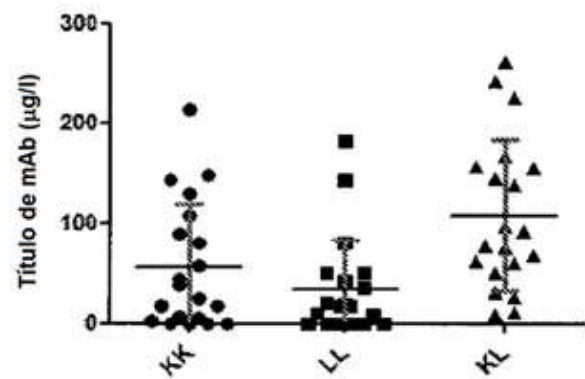


FIGURA 16

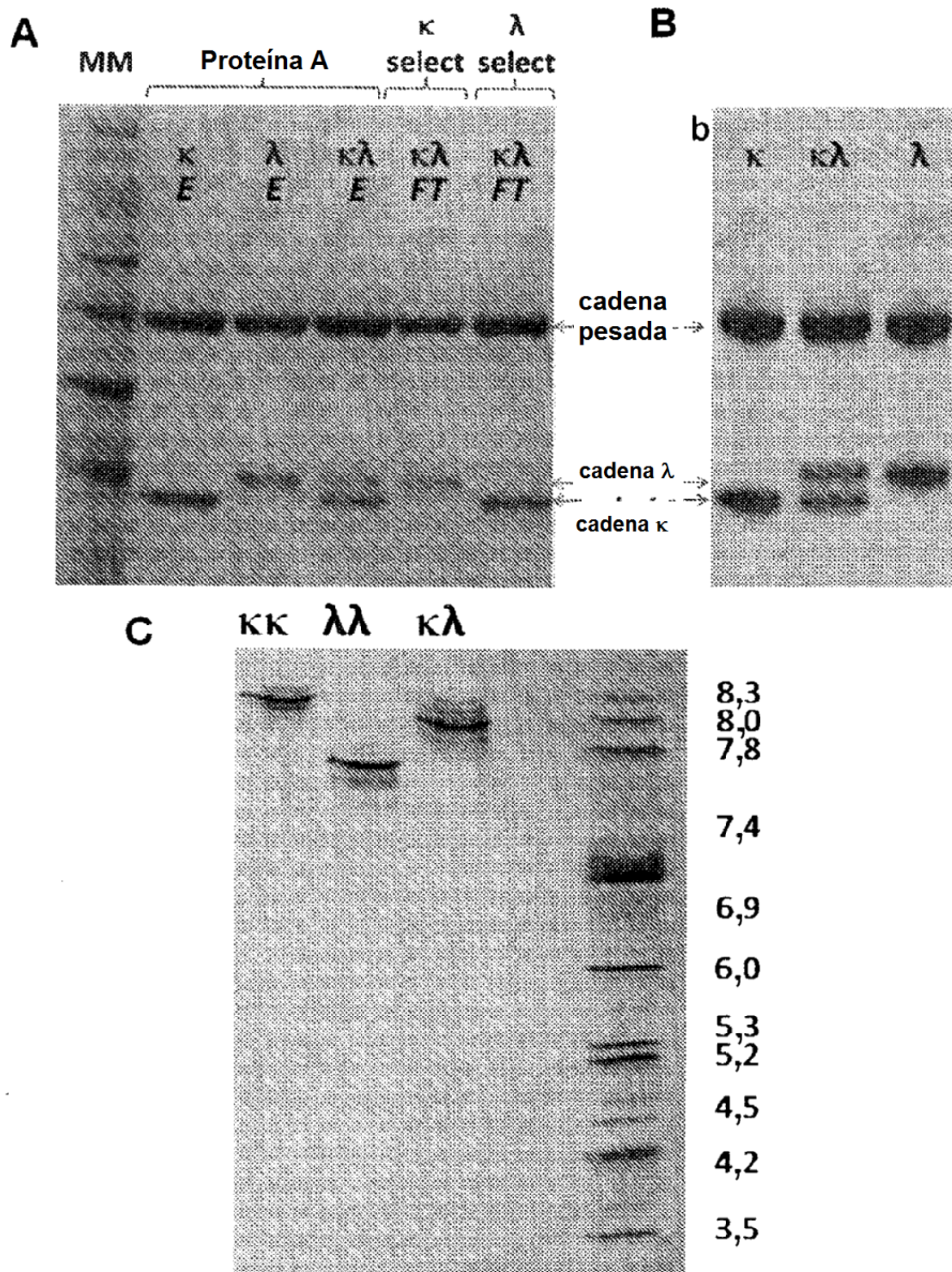


FIGURA 17

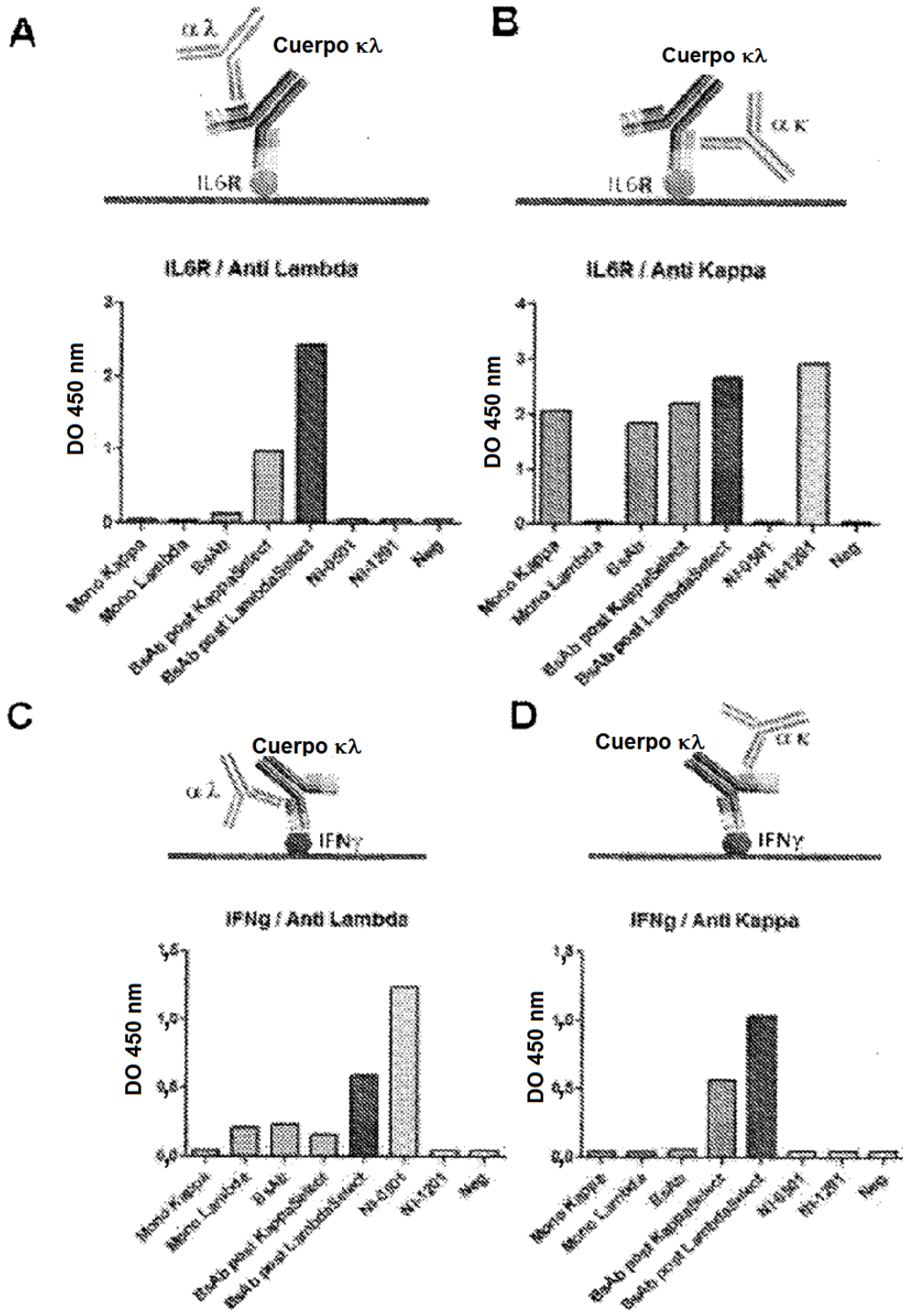


FIGURA 18

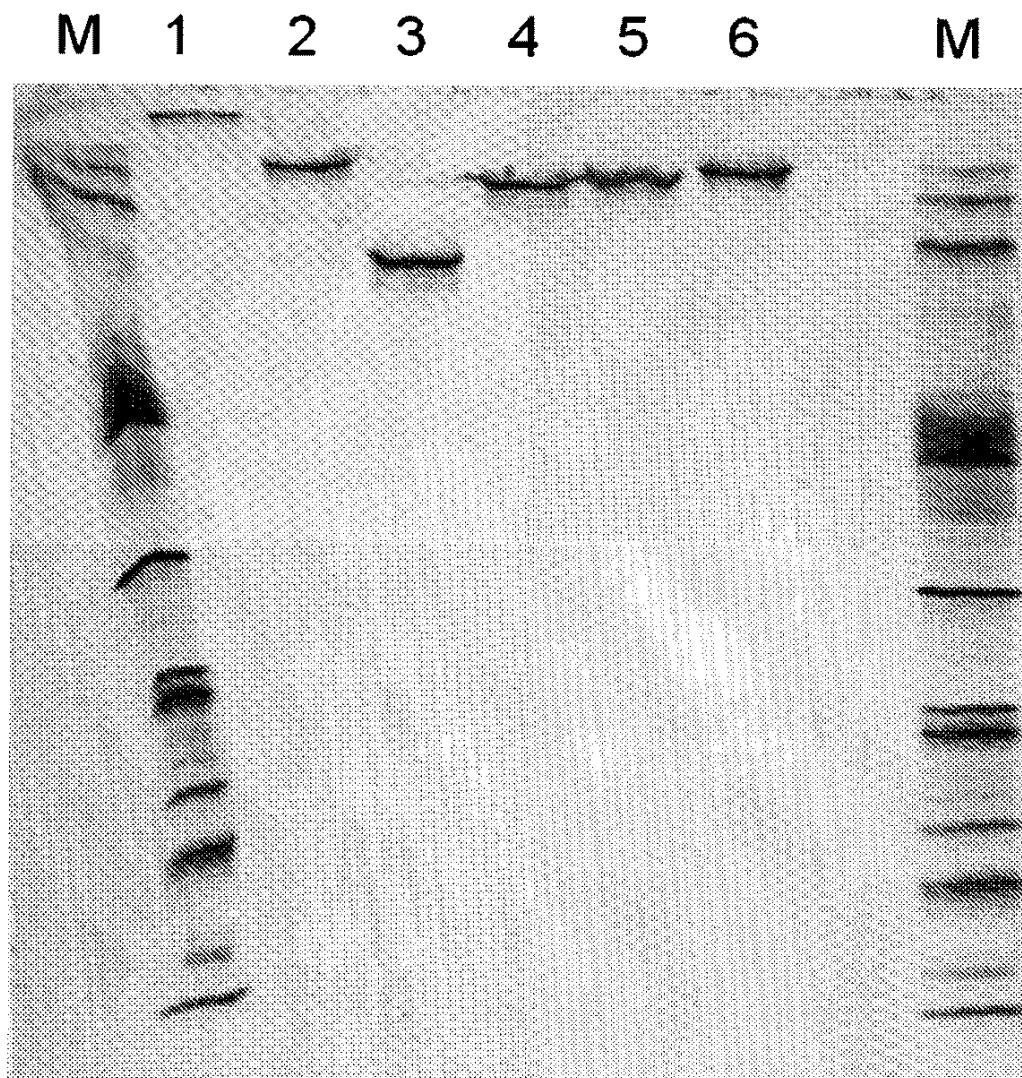


FIGURA 19A

Híbrido 1



FIGURA 19B

Híbrido 2

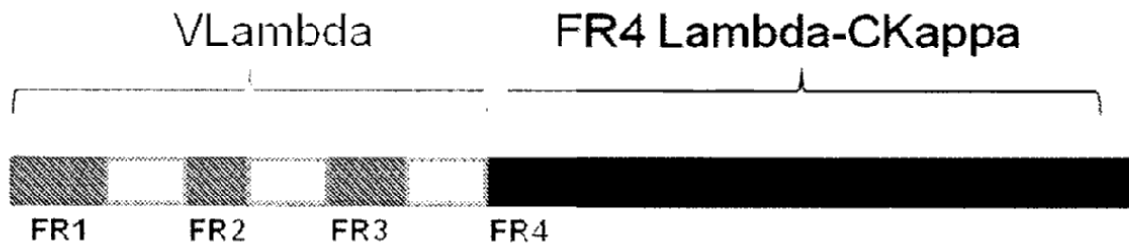


FIGURA 19C

Híbrido 3

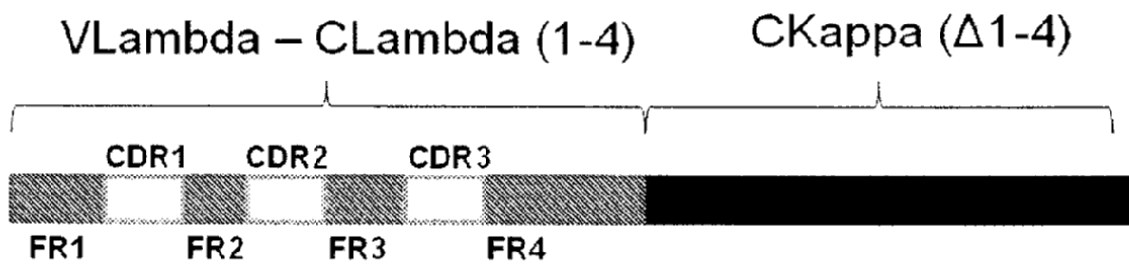


FIGURA 20

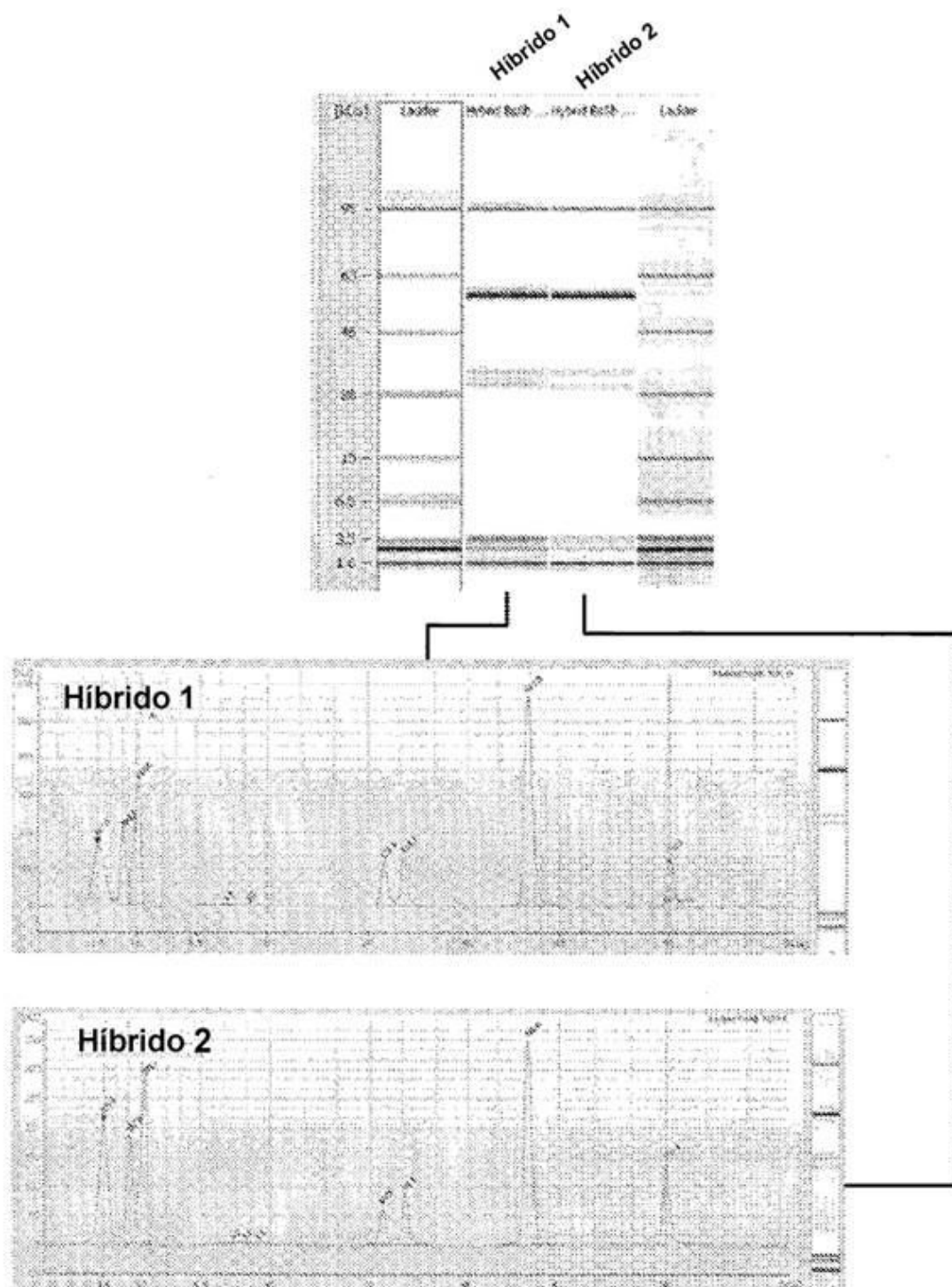


FIGURA 21A

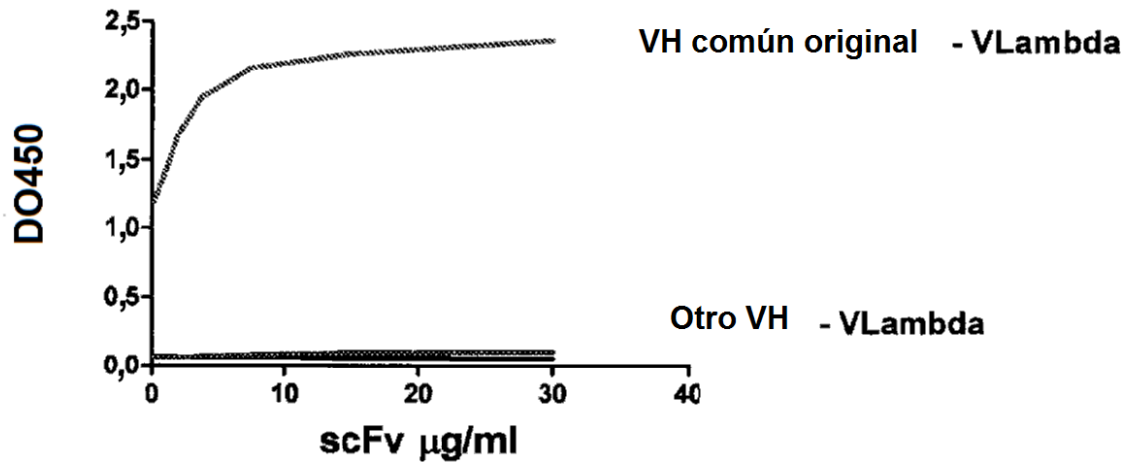


FIGURA 21B

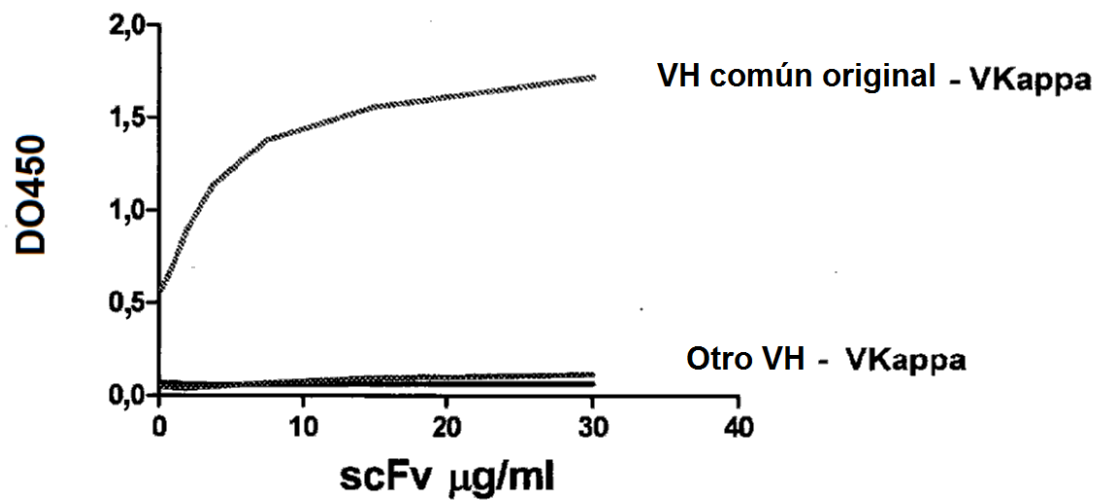


FIGURA 22

