

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 593 484**

51 Int. Cl.:

C07K 16/46 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.03.2008 PCT/DK2008/000124**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.10.2008 WO08119353**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2008 E 08715601 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.07.2016 EP 2139924**

54 Título: **Anticuerpos biespecíficos y métodos de producción de los mismos**

30 Prioridad:

29.03.2007 US 920840 P
29.03.2007 DK 200700491

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.12.2016

73 Titular/es:

GENMAB A/S (100.0%)
Bredgade 34 E
1260 Copenhagen K, DK

72 Inventor/es:

SCHURMAN, JANINE;
VINK, TOM;
WINKEL, JAN VAN DE;
LABRIJN, ARAN, FRANK;
AALBERSE, ROB;
KOLFSCHOTEN, MARIJN VAN DER NEUT y
PARREN, PAUL

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 593 484 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos biespecíficos y métodos de producción de los mismos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a nuevos métodos para la producción de anticuerpos biespecíficos y a los anticuerpos biespecíficos que se pueden obtener por estos métodos.

10 **Antecedentes de la invención**

Los anticuerpos inmunoglobulinas G humanas (IgG) existen en cuatro subclases con distintas propiedades estructurales y funcionales. Las IgG están compuestas por dos parejas cadena pesada-cadena ligera (semi-molécula), que están conectadas por medio de enlaces disulfuro entre las cadenas pesadas que se sitúan en la región bisagra. Las moléculas de IgG4 humana existen en varias formas moleculares que se diferencian por la ausencia o presencia de enlaces disulfuro entre las cadenas pesadas en la región bisagra. Las moléculas de IgG4 existen en formas en las que se han formado ambos o ninguno de los enlaces disulfuro entre las cadenas pesadas (6, 7). Sin embargo sin tener en cuenta la presencia o ausencia de estos enlaces disulfuro intercatenarios (6, 8), las IgG4 humanas existen como tetrámeros en solución que consisten en dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras de IgG, como es común en las moléculas de inmunoglobulina G, debido a interacciones no covalentes relativamente fuertes entre los dominios CH3 y entre los dominios CH1 y CH2 (4). Solo por desnaturalización en condiciones reductoras, las dos semi-moléculas asociadas no covalentemente se disocian como se demuestra por un análisis de determinación de tamaño tal como SDS-PAGE (6, 9).

Se ha sabido durante varios años que los anticuerpos IgG4 humanos, a diferencia de otras subclases de IgG, se comportan como moléculas monovalentes en las interacciones con el antígeno. Se descubrió que la IgG4 humana derivada del suero no puede precipitar el antígeno purificado, debido a que no puede entrecruzarse. Aunque dicha IgG4 derivada del suero es funcionalmente monovalente (1, 2), la IgG4 producida recombinantemente, por el contrario, se comporta bivalentemente en las interacciones con los antígenos (3). Basándose en estas observaciones, se ha propuesto que las moléculas de IgG4 del suero pueden intercambiar semi-moléculas (es decir, una molécula que consiste en una cadena pesada y una cadena ligera) que da como resultado la generación de moléculas biespecíficas, que no se pueden entrecruzar con antígenos idénticos (3-5). Este proceso de intercambio de semi-moléculas también se denomina en el presente documento "intercambio del brazo Fab".

Los anticuerpos biespecíficos tienen un potencial interesante como fármacos terapéuticos, ya que se pueden utilizar, por ejemplo, como mediadores en mecanismos de redirección del efector a los sitios asociados a la enfermedad. Sin embargo, uno de los principales obstáculos en el desarrollo de anticuerpos biespecíficos ha sido la dificultad para producir los materiales con una calidad y en cantidad suficientes por tecnologías tradicionales, tales como los métodos de hibridoma híbrido y conjugación química (10).

El documento WO 2005/062916 describe métodos para la formación de moléculas multiméricas basándose en IgG4 en ratones *in vivo*. Además, el documento WO 2005/062916 describe que la co-incubación de dos anticuerpos IgG4 que tienen diferentes especificidades de unión al antígeno *in vitro* en un tampón salino, da lugar a la formación de productos que son capaces de reaccionar con ambos antígenos. Sin embargo, no se ha demostrado en el documento WO 2005/062916 si estos productos son agregados o anticuerpos biespecíficos, y el rendimiento de la reacción era bajo en las condiciones que se utilizaban.

Sumario de la invención

Sorprendentemente se ha descubierto ahora que en condiciones reductoras, dos anticuerpos IgG4 o tipo IgG4 que tienen distintas especificidades de unión al antígeno pueden llevar a cabo un intercambio de semi-moléculas altamente eficaz y formar de esta manera anticuerpos biespecíficos sin la formación concomitante de agregados.

En consecuencia, en un primer aspecto, la invención se refiere a un método *ex vivo* para la generación de un anticuerpo biespecífico, comprendiendo dicho método las etapas de:

a) proporcionar un primer anticuerpo que tiene una primera especificidad de unión, donde dicho anticuerpo comprende una secuencia CPPC en la región central de la bisagra y una región CH3 tipo IgG4 que es la región CH3 de SEQ ID NO: 19, pero donde se ha modificado la región CH3 de manera que la Lys (K) en la posición 292 se ha sustituido por Arg (R),

b) proporcionar un segundo anticuerpo que tiene una segunda especificidad de unión que se diferencia de la dicha primera especificidad de unión, donde dicho segundo anticuerpo comprende una secuencia CPPC en la región central de la bisagra y una región CH3 tipo IgG4 que es la región CH3 de SEQ ID NO: 19, pero donde la región CH3 se ha modificado de manera que la Lys (K) en la posición 292 se ha sustituido por Arg (R),

c) incubar juntos dichos primer y segundo anticuerpos en condiciones reductoras que permitan que las cisteínas de la región central de la bisagra se sometan a una isomerización de enlaces disulfuro,

- d) poner la composición obtenida en la etapa c) en condiciones no reductoras con el fin de detener intercambios adicionales de semi-moléculas, y
- e) obtener un anticuerpo biespecífico.

5 Sin quedar ligados por teoría específica, se cree que dos regiones de un anticuerpo tienen un impacto importante sobre su capacidad para someterse a un intercambio de semi-moléculas.

10 En primer lugar, la capacidad de intercambio de semi-moléculas puede estar influenciada por diferencias de secuencia en la región central de la bisagra de la molécula, ya que los anticuerpos que tienen una secuencia CPSC en la región central de la bisagra, tales como IgG4, se intercambian más fácilmente que los anticuerpos que tienen una secuencia central de la bisagra CPPC, tales como IgG1. Sin quedar unidos por teoría alguna, se ha hecho la hipótesis de que la secuencia CPSC da como resultado un centro de bisagra más flexible y la posibilidad para formar enlaces disulfuro intracatenarios. Extraordinariamente, la estructura central de la bisagra es similar al dominio activo de la proteína-disulfuro-isomerasa (PDI), CXXC. Estos motivos CXXC de diferentes isoformas de PDI catalizan la formación, reducción, y reordenación de enlaces disulfuro en las proteínas. Por lo tanto, sin quedar unidos por teoría específica alguna, se cree que los anticuerpos que tienen una secuencia central de la bisagra tipo IgG4 pueden tener una actividad intrínseca para la reordenación de enlaces disulfuro, que se estimula por las condiciones utilizadas en los métodos de la invención.

20 En segundo lugar, de nuevo sin quedar ligados por teoría alguna, los resultados muestran que para permitir que tenga lugar la reacción de intercambio, la secuencia de la región CH3 debería ser tipo IgG4, es decir, tal que no se formen interacciones fuertes entre semi-moléculas.

25 En otro aspecto principal, la invención se refiere a un anticuerpo biespecífico aislado que se obtiene o se puede obtener por el método de la invención. También se desvelan en el presente documento composiciones farmacéuticas que comprenden dicho anticuerpo.

30 También se desvelan en el presente documento anticuerpos biespecíficos aislados que comprenden dos regiones CH3 tipo IgG4 y composiciones farmacéuticas que comprenden dichos anticuerpos.

También se desvela en el presente documento un método para la selección de un anticuerpo biespecífico que tenga una propiedad deseada, comprendiendo dicho método las etapas de:

- 35 a) proporcionar un grupo de anticuerpos, donde cada anticuerpo tiene una especificidad por una diana diferente y donde cada anticuerpo comprende una región CH3 tipo IgG4.
- b) incubar cada anticuerpo de dicho grupo de anticuerpos con otro anticuerpo de dicho grupo en condiciones reductoras, generando de esta manera un grupo de mezclas de anticuerpos, donde cada mezcla contiene un anticuerpo biespecífico diferente,
- 40 c) ensayar el grupo de mezclas de anticuerpo resultante en cuanto a una determinada propiedad que se desee, y
- d) seleccionar una mezcla de anticuerpos biespecíficos que tenga la propiedad deseada.

Breve descripción de las figuras

45 **Figura 1. Análisis SDS-PAGE de IgG1 e IgG4 recombinantes purificadas.** Tras la purificación, se analizaron los anticuerpos IgG1 e IgG4, contra Bet v 1 y Fel d 1, con SDS-PAGE no reductora.

Figura 2. Niveles de IgG biespecífica en ratones nu/BALB/c en diferentes puntos de tiempo. La cantidad de IgG biespecífica determinada en el ensayo de entrecruzamiento heterólogo se representó frente a la cantidad de IgG específica de Bet v 1 que se determinó en el ensayo de unión con Bet v 1. Los datos de muestras de plasma que contenían IgG1 e IgG4 se representan por símbolos abiertos y símbolos cerrados respectivamente. La línea discontinua representa la cantidad calculada de IgG biespecífica, en el caso de que el intercambio de semi-moléculas de IgG fuera aleatorio y completo.

50 **Figura 3. Se generan *in vivo* moléculas de IgG4 biespecífica humana.** (A) Se inyectaron grupos (n = 5) de ratones SCID con mezclas de anticuerpos quiméricos: 100 µg de IgG1-Bet v 1/100 µg IgG1-Fel d 1 (cuadrados), 100 µg IgG4-Bet v 1/100 µg de IgG4-Fel d 1 (círculos), o 3) 100 µg de IgG4-Bet v 1/100 µg IgG4-Fel d 1 + 2.000 µg de IgG4 recombinante irrelevante (IgG4-EGFR; triángulos) La generación de los anticuerpos biespecíficos siguió a continuación con la evaluación de la actividad biespecífica contra Bet v 1 y Fel d 1 en el plasma. La fracción de IgG biespecífica con respecto a la concentración total de IgG-Bet v 1 se expresó como un porcentaje. La flecha con asterisco indica el nivel de reactividad biespecífica esperada en ratones que recibían IgG4-Bet v 1/IgG4-Fel d 1 en presencia de un exceso de IgG4 irrelevante (4 %), la flecha sin asterisco, el de los ratones que recibían la mezcla IgG4-Bet v 1/IgG-Fel d 1 (50 %). Las barras de error representan el SEM. (B) Se ensayó la actividad de entrecruzamiento mono-específico evaluando el entrecruzamiento de Fel d 1 radiomarcado respecto a Fel d 1 acoplada o Sepharose en plasma de ratón. La reactividad mono-específica se expresaba como la relación entre la cantidad de Fel d 1 radiomarcado unido por entrecruzamiento y la IgG-Fel d 1 total con el fin de corregir el aclaramiento de IgG. Las barras de error representan el SEM.

65 **Figura 4. Análisis SEC de la actividad biespecífica en plasma murino.** El plasma (10 ml) extraído a t=24 h de un ratón dosificado con una mezcla de IgG4 se fraccionó en una columna

Superdex200. El ratón se dosificó con una mezcla que contenía 300 µg de IgG4 de unión a Bet v 1 y 300 µg de IgG4 de unión a Fel d 1. En las fracciones se midió la concentración de IgG específica Fel d 1 (■) con el ensayo de unión al antígeno y la concentración de IgG biespecífica para Bet v 1-Fel d 1 (•) se determinó en el ensayo de entrecruzamiento Bet v 1-Fel d 1. La calibración de esta columna utilizando IVIg ha revelado IgG monoméricas, diméricas y agregadas que se eluían a 12,9, 11,0, y 8,4 ml, respectivamente (datos no mostrados).

5 **Figura 5. Intercambio de IgG en componentes de sangre completa.**

Se evaluó el intercambio de IgG4 e IgG1 incubando mezclas de IgG quiméricas en sangre completa, células sanguíneas, plasma y suero durante 24 h a 37 °C, tras lo cual se midió la actividad biespecífica con el ensayo de entrecruzamiento heterólogo (Fel d 1-Bet v 1). Se obtuvo la sangre de dos donantes: A (barras negras) y B (barras grises). Las actividades biespecíficas se determinaron en mezclas suplementadas con IgG4 quimérica (panel A), IgG1 quimérica (panel B) o sin adición de IgG (panel C). Todos los datos presentados se midieron tras 24 h de incubación a 37 °C.

10 **Figura 6. Intercambio de IgG por las células sanguíneas humanas**

Se evaluó el intercambio de IgG4 (barras negras) e IgG1 (barras grises) incubando mezclas de IgG quimérica con células mononucleares (MNC), trombocitos (Thr) y eritrocitos (Ery) durante 48 h a 37 °C, tras lo cual se midió la actividad biespecífica en el ensayo de entrecruzamiento heterólogo (Fel d 1-Bet v 1). Como control las mezclas de anticuerpo se incubaron también en medio de cultivo libre de suero (SFC). La especificidad se expresó como el porcentaje de ¹²⁵I-Bet v 1 unido con respecto a la cantidad añadida.

15 **Figura 7. Intercambio de IgG4 por líneas celulares HEK y murinas**

El intercambio de semi-moléculas de IgG4 se evaluó incubando una mezcla de IgG4 quimérica con células HEK, células B murinas (J558) o células de hibridoma a 37 °C. La actividad en el ensayo de entrecruzamiento heterólogo (Fel d 1- Bet v 1) se midió en muestras de 1 µl extraídas en un t = 0 h (barras grises) y un t = 24 h (barras negras). La biespecificidad se expresa como el porcentaje de ¹²⁵I-Bet v 1 unido con respecto a la cantidad añadida.

20 **Figura 8. Intercambio de IgG4 mediado por eritrocitos**

La incubación de mezclas de IgG4-Bet v 1/IgG4-Fel d 1 con eritrocitos recientemente purificados (Ery, símbolos cerrados) daba como resultado la generación de anticuerpos biespecíficos, mientras que no se observaba biespecificidad con la mezcla de isotipos de IgG1. Como control, se cultivaron mezclas de anticuerpos en PBS sin eritrocitos (símbolos abiertos). La flecha indica el porcentaje máximo esperado de IgG biespecífica (50 %). Las barras de error representan la variación de mediciones por duplicado.

25 **Figura 9. Intercambio de IgG4 en PBS**

Se evaluó el intercambio en PBS de IgG1 (barras blancas), IgG4 (barras grises) e IgG4 en presencia de exceso de IgG4 irrelevante (barras negras) midiendo la actividad biespecífica (panel A), bivalencia y unión al antígeno. El intercambio de semi-moléculas de IgG del panel A se calculó a partir de la concentración de IgG biespecífica (como se determina en el ensayo de entrecruzamiento heterólogo) y la concentración máxima esperada de IgG biespecífica si el intercambio de semi-moléculas de IgG fuera aleatorio y completo. El intercambio se expresó como el porcentaje del intercambio máximo, siendo este el 100 %. En el panel B se representa la bivalencia de Fel d 1 con el tiempo, que se midió en el ensayo de entrecruzamiento homólogo. La concentración de IgG bivalente se normalizó ajustando la concentración de IgG bivalente en un t = 0 como el 100 %.

30 **Figura 10. Intercambio de IgG4 por lisado eritrocítico**

El intercambio de semi-moléculas de IgG4 se evaluó incubando una mezcla de IgG4 quiméricas en un lisado de eritrocitos a 37 °C. La IgG4 se incubó con diluciones crecientes de lisado. Se midió la actividad biespecífica en el ensayo de entrecruzamiento heterólogo (Bet v 1-Fel d 1) en las muestras extraídas en los puntos de tiempo indicados. La biespecificidad se expresó como el porcentaje de ¹²⁵I-Bet v 1 unido con respecto a la cantidad añadida.

35 **Figura 11. Análisis SEC de la actividad biespecífica inducida por un lisado de eritrocitos**

La IgG4 se incubó con un lisado de eritrocitos recién preparado a 37 °C durante 24 h y posteriormente se fraccionó en una columna Superdex200, que se ejecutó a 0,5 ml/min en una unidad AKTA HPLC (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia). En las fracciones se midió la concentración de IgG específica de Bet v 1 (■) en el ensayo de unión al antígeno y se determinó la concentración de IgG específica de Fel d1-Bet v 1 (•) en el ensayo de entrecruzamiento de Bet v 1-Fel d 1. La calibración de la columna reveló IgG monoméricas, diméricas y agregadas que se eluían a 12,1, 10,3 y 8,3 ml, respectivamente (datos no mostrados).

40 **Figura 12. Intercambio de IgG4 mediado por GSH**

Se evaluó el intercambio mediado por GSH de semi-moléculas de IgG4 incubando IgG4 en presencia de concentraciones crecientes de GSH en PBS/Azida. En los tiempos indicados se extrajeron las muestras en las que se midió la unión al antígeno y la actividad biespecífica. El intercambio de semi-moléculas de IgG4 se calculó a partir de la concentración medida de IgG biespecífica (como se determina en el ensayo de entrecruzamiento heterólogo) y la concentración máxima esperada de IgG4 biespecífica si el intercambio de semi-moléculas de IgG4 fuera aleatoria y completa. El intercambio se expresaba como el porcentaje del intercambio máximo, fijado en el 100 %.

45 **Figura 13. SEC del intercambio de semi-moléculas de IgG4 mediado por GSH**

La IgG4 se incubó con GSH (0,5 mM) y se fraccionó posteriormente en una columna Superdex200, que se ejecutó a 0,5 ml/min en una unidad AKTA HPLC (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia). En las fracciones, la concentración de IgG específica de Bet v 1 (■) se midió en el ensayo de unión al antígeno y se determinó la concentración de IgG biespecífica Fel d 1-Bet v 1(•) en el ensayo de entrecruzamiento Bet v 1-Fel d 1. La

calibración de esta columna ha revelado IgG monoméricas, diméricas y agregadas que se eluían a 12,1, 10,3 y 8,3 ml, respectivamente (datos no mostrados).

Figura 14. **Dependencia de la temperatura en el intercambio de IgG4 mediado por GSH.** Las mezclas de IgG4-Bet v 1 e IgG4-Fel d 1 se incubaron en PBS con GSH a las temperaturas indicadas. Se evaluaron en un t = 0 h (barras grises) y t = 24 h (barras negras) las concentraciones de IgG4 biespecífica. A partir de estos datos se calculó la fracción de IgG biespecífica con respecto a la concentración de IgG4 Bet v 1 y se expresó como un porcentaje. Las barras de error representan variaciones de mediciones por duplicado.

Figura 15. **Intercambio de IgG4 mediado por un panel de agentes reductores.** Se incubaron IgG4-Bet v 1 e IgG4-Fel d 1 en PBS en presencia de diferentes agentes (todos reductores, excepto GSSG) durante 24 h a 37 °C. La concentración de IgG específica de Bet v 1 se midió en el ensayo de unión a Bet v 1 y se midió la concentración de IgG biespecífica en el ensayo de entrecruzamiento heterólogo (Fel d 1- Bet v 1). Se calculó el porcentaje de IgG biespecífica con respecto a la concentración de IgG-Bet v 1. Las barras de error estándar representaban el SEM calculado de tres mediciones.

Figura 16. **Intercambio de anticuerpos IgG4 completamente humanos utilizando GSH.**

(A) Se incubaron mezclas IgG4-CD20/IgG4-EGFr o IgG1-CD20/IgG1-EGFr a 37 °C con o sin 0,5 M de GSH. Se tomaron las muestras en los puntos de tiempo indicados. Se midió la formación de anticuerpos biespecíficos en un ELISA sándwich. El eje X indica la densidad óptica a 405 nm según se mide por la formación de anticuerpos CD20/EGFR biespecíficos.

(B) Intercambio de IgG4 dependiente de la dosis de GSH. Una mezcla de IgG4-CD20 e IgG4-EGFr se incubó durante 24 h a 37 °C con las concentraciones de GSH que se indican. La formación de anticuerpos biespecíficos se midió en un ELISA sándwich. Se representó la densidad óptica a 405 nm en el eje Y según se midió por la formación de anticuerpos CD20/EGFR biespecíficos.

(C) El intercambio de semi-moléculas de IgG4 mediado por GSH está influenciado por los componentes utilizados en la reacción, y se produce en un medio de cultivo (Freestyle 293) con concentraciones bajas de GSH.

(D) El intercambio de semi-moléculas de IgG4 mediado por GSH es mayor con 0,5 mM de GSH que con 5 mM de GSH.

(E/F) Detección de intercambio del brazo Fab entre IgG4-EGFR e IgG4-CD20 por cromatografía de masas ESI-TOF. Una mezcla de IgG4 se incubó durante 24 horas en ausencia (E) o presencia (F) de 0,5 mM de GSH, tras lo cual los anticuerpos se desglicosilaron con PNGasa F y se determinaron los pesos moleculares de los anticuerpos resultantes por espectrometría ESI-TOF. Se muestran los espectros ESI-TOF desenrollados. Los datos son representativos de dos experimentos.

Figura 17. **La IVIg de mono Rhesus participa en el intercambio de brazo Fab de anticuerpos IgG4 recombinantes humanos.**

(A) Se incubaron mezclas de dos anticuerpos IgG4 recombinantes humanos (IgG4-CD20 e IgG4-EGFr) con GSH durante 24 h a 37 °C, en presencia o ausencia de inmunoglobulinas de mono Rhesus purificadas o IVIg humana. Se midió la formación de anticuerpos biespecíficos por medio del intercambio del brazo Fab en un ELISA sándwich.

(B) Se incubaron mezclas de dos anticuerpos IgG4 recombinantes humanos (IgG4-CD20 e IgG4-EGFr) con GSH durante 24 h a 37 °C, en presencia o ausencia de un exceso (indicado entre paréntesis) de inmunoglobulinas de mono Rhesus de varios animales (la fuente también se indica entre paréntesis) o IVIg humana. Se midió la formación de anticuerpos biespecíficos por medio de intercambio de brazo Fab en un ELISA sándwich.

(C) Se incubaron mezclas de dos anticuerpos IgG4 recombinantes humanos (IgG4-CD20 e IgG4-EGFr) con GSH durante 24 h a 37 °C, en presencia o ausencia de un exceso (indicado entre paréntesis) de inmunoglobulinas purificadas de chimpancé, babuino, mono cynomolgus, caballo y cerdo (fuente también indicada entre paréntesis) o IVIg humana. La formación de anticuerpos biespecíficos por medio del intercambio de brazo Fab se midió en un ELISA sándwich.

Figura 18. **Secuencias de región constante.** Las secuencias subrayadas representan la región CH3.

Figura 19. **Intercambio de semi-moléculas de IgG1 mutantes mediado por GSH**

(A) Se ensayó el efecto de la concentración de GSH en el intercambio de semi-moléculas de diferentes IgG1 mutantes utilizando 0, 0,1, 1 y 10 mM de GSH. El intercambio se ensayó utilizando las siguientes mezclas:

- IgG4 a-Fel d 1 ts con IgG4 a-Bet v 1 ts (indicada como IgG4 ts en la figura)
- IgG1 a-Fel d 1 ts con IgG4 a-Bet v 1 ts (indicada como IgG1 ts)
- IgG1 a-Fel d 1 CPSC con IgG1 a-Bet v 1 CPSC (indicada como IgG1-CPSC)
- IgG1 a-Fel d 1 CH3(IgG4) con IgG1 a-Bet v 1 CH3(IgG4) (indicada como IgG1-CH3 (IgG4))
- IgG1 a-Fel d 1 CPSC-CH3 (IgG4) con a-Bet v 1 IgG1 CPSC-CH3 (IgG4) (indicada como IgG1-CPSC-CH3 (IgG4))

(B) El efecto de la concentración de GSH en el intercambio de semi-moléculas de diferentes IgG1 mutantes

con moléculas de IgG4 ts se ensayó utilizando 0,5 y 5 mM de GSH. El intercambio se ensayó utilizando las siguientes mezclas:

- 5
- IgG1 a-Fel d 1 ts con IgG4 a-Bet v 1 ts (indicada como IgG1)
 - IgG1 a-Fel d 1 CPSC con IgG4 a-Bet v 1 ts (indicada como IgG1-CPSC)
 - IgG1 a-Fel d 1 CH3 (IgG4) con IgG4 a-Bet v 1 ts (indicada como IgG1-CH3 (IgG4))
 - IgG1 a-Fel d 1 CPSC-CH3 (IgG4) con IgG4 a-Bet v 1 ts (indicada como IgG1-CPSC-CH3(IgG4))
 - IgG1 a-Fel d 1 R238Q con IgG4 a-Bet v 1 ts (indicada como IgG1-R238Q)
 - IgG1 a-Fel d 1 K292R con IgG4 a-Bet v 1 ts (indicada como IgG1-K292R)
- 10
- IgG1 a-Fel d 1 Q302E con IgG4 a-Bet v 1 ts (indicada como IgG1-Q302E)
 - IgG1 a-Fel d 1 P328L con IgG4 a-Bet v 1 ts (indicada como IgG1-P328L)
 - IgG1 a-Fel d 1 CPSC-K292R con IgG4 a-Bet v 1 ts (indicada como IgG1-CPSC-K292R)
 - IgG4 a-Fel d 1 ts con IgG4 a-Bet v 1 ts (indicada como IgG4)
- 15
- (C) El efecto de la concentración de GSH sobre el intercambio de semi-moléculas de diferentes IgG1 mutantes se ensayó utilizando 0,5 y 5 mM de GSH. El intercambio se ensayó en las siguientes mezclas:
- 20
- IgG1 a-Fel d 1 ts con IgG1 a-Bet v 1 ts (indicada como IgG1)
 - IgG1 a-Fel d 1 CPSC con IgG1 a-Bet v 1 CPSC (indicada como IgG1-CPSC)
 - IgG1 a-Fel d 1 CH3 (IgG4) con IgG1 a-Bet v 1 CH3 (IgG4) (indicada como IgG1-CH3 (IgG4))
 - IgG1 a-Fel d 1 CPSC-CH3 (IgG4) con IgG1 a-Bet v 1 CPSC-CH3 (IgG4) (indicada como IgG1-CPSC-CH3 (IgG4))
 - IgG1 a-Fel d 1 R238Q con IgG1 a-Bet v 1 R238Q (indicada como IgG1-R238Q)
 - IgG1 a-Fel d 1 K292R con IgG1 a-Bet v 1 K292R (indicada como IgG1-K292R)
- 25
- IgG1 a-Fel d 1 Q302E con IgG1 a-Bet v 1 Q302E (indicada como IgG1-Q302E)
 - IgG1 a-Fel d 1 P328L con IgG1 a-Bet v 1 P328L (indicada como IgG1-P328L)
 - IgG1 a-Fel d 1 CPSC-K292R con IgG1 a-Bet v 1 CPSC-K292R (indicada como IgG1-CPSC-K292R)
 - IgG4 a-Fel d 1 ts con IgG4 a-Bet v 1 ts (indicada como IgG4)

30 **Figura 20. Con 0,5 mM de GSH, las moléculas de IgG4 con centro de bisagra de tipo silvestre (IgG4) participan en el intercambio del brazo Fab de anticuerpos IgG4 recombinantes humanos, mientras que las moléculas con centro de bisagra IgG1 no.** (A) Se incubaron mezclas de dos anticuerpos IgG4 recombinantes humanos (IgG4-CD20 e IgG4-EGFr, como se ha descrito anteriormente) con 0,5 mM de GSH durante 24 h a 37 °C, en presencia o ausencia de un exceso (50 y 100 microgramos/ml) de Tysabri. La formación de anticuerpos biespecíficos por medio de intercambio de brazo Fab se midió en un ELISA sándwich. (B) Las mezclas de dos anticuerpos IgG4 recombinantes humanos (IgG4-CD20 e IgG4-EGFr, como se ha descrito anteriormente) se incubaron con 0,5 mM de GSH durante 24 h a 37 °C, en presencia o ausencia de cantidades equimolares (10 microgramos/ml) de Tysabri o Mylotarg. La formación de anticuerpos biespecíficos por medio de intercambio de brazo Fab se midió en un ELISA sándwich.

40 **Figura 21. Intercambio de semi-moléculas de construcciones IgG1-CPSC con mutaciones adicionales en la posición 292.** Se ensayó el intercambio de semi-moléculas de diferentes mutantes de IgG1 utilizando 0,5 mM de GSH. El intercambio se ensayó utilizando las siguientes mezclas:

- 45
- IgG1-2F8 ts con IgG1-7D8 ts (indicada como IgG1)
 - IgG1-2F8-CPSC con IgG1-7D8-CPSC (indicada como IgG1-CPSC)
 - IgG1-2F8-CH3 (IgG4) con IgG1-7D8-CH3 (IgG4) (indicada como IgG1-CH3 (IgG4))
 - IgG1-2F8-CPSC-CH3 (IgG4) con IgG1-7D8-CPSC-CH3(IgG4) (indicada como IgG1-CPSC-CH3 (IgG4))
 - IgG1-2F8-CPSC-R238Q con IgG1-7D8-CPSC-R238Q (indicada como IgG1-CPSC-R238Q)
 - IgG1-2F8-CPSC-K292R con IgG1-7D8-CPSC-K292R (indicada como IgG1-CPSC-K292R)
- 50
- IgG1-2F8-CPSC-K292Y con IgG1-7D8-CPSC-K292Y (indicada como IgG1-CPSC-K292Y)
 - IgG1-2F8-CPSC-K292F con IgG1-7D8-CPSC-K292F (indicada como IgG1-CPSC-K292F)
 - IgG1-2F8-CPSC-K292W con IgG1-7D8-CPSC-K292W (indicada como IgG1-CPSC-K292W)
 - IgG1-2F8-CPSC-Q302E con IgG1-7D8-CPSC-Q302E (indicada como IgG1-CPSC-Q302E)
 - IgG1-2F8-CPSC-P328L con IgG1-7D8-CPSC-P328L (indicada como IgG1-CPSC-P328L)
- 55
- IgG4-2F8 ts con IgG4-7D8 ts (indicada como IgG4)
- La formación de anticuerpos biespecíficos por medio de intercambio del brazo Fab se midió en un ELISA sándwich.

60 **Figura 22. La estabilización del centro de la bisagra protege los agentes terapéuticos de anticuerpo IgG4 del intercambio del brazo Fab *in vivo*.** (A) Detección de intercambio de brazo Fab entre IgG4-EGFR-CPPC e IgG4-CD20 por espectrometría ESI-TOF. Una mezcla de IgG4-EGFR-CPPC e IgG4-CD20 se incubó durante 24 h en presencia (F) de 5 mM de GSH, tras lo cual los anticuerpos se desglucosilaron con PNGasa F y se determinó el peso molecular por espectrometría de masas ESI-TOF. Se muestra el espectro ESI-TOF desenrollado. Los anticuerpos biespecíficos EGFR/CD20 se podían detectar cuando se utilizaban 5 mM de GSH (la incubación sin GSH o en presencia de 0,5 mM de GSH no daba como resultado anticuerpos biespecíficos (datos no mostrados)). (B) Se inyectaron grupos (n = 4) de ratones SCID con mezclas de anticuerpos (300 µg de

65

cada) de IgG4-CD20/IgG4-EGFR (círculos abiertos), IgG4-CD20/IgG1-EGFR e IgG4-CD20/IgG4-EGFR-CPPC. La generación de anticuerpos específicos continuó en el tiempo y se cuantificó por ELISA. Los anticuerpos biespecíficos se cuantificaron utilizando una mezcla de anticuerpos intercambiados *in vitro* como referencia. Los puntos de datos representan los valores de la media \pm SEM de cuatro ratones, medidos al menos dos veces en experimentos por separado. Los anticuerpos no biespecíficos se podían detectar en las mezclas IgG4-CD20/IgG1-EGFR e IgG4-CD20/IgG4-EGFR-CPPC. Se indica el límite de detección de los ensayos (línea discontinua) y representa los niveles séricos de 2000 ng/ml.

Figura 23. Intercambio de brazo Fab de mutantes CXXC con el tiempo.

Se incubaron mezclas de anticuerpos mutantes CXXC a 37 °C con 0,5 mM de GSH. Se tomaron las muestras en los puntos de tiempo indicados. Se midió la formación de anticuerpos biespecíficos. Se ensayó el intercambio utilizando las siguientes mezclas:

- IgG1 a-Fel d 1 ts con IgG1 a-Bet v 1 ts (indicado como IgG1)
- IgG4 a-Fel d 1 ts con IgG4 a-Bet v 1 ts (indicado como IgG4)
- IgG4 a-Fel d 1 CGHC con IgG4 a-Bet v 1 CGHC (indicado como CGHC)
- IgG4 a-Fel d 1 CGC con IgG4 a-Bet v 1 CGC (indicado como CGC)
- IgG4 a-Fel d 1 CPRC con IgG4 a-Bet v 1 CPRC (indicado como CPRC)
- IgG4 a-Fel d 1 CPHC con IgG4 a-Bet v 1 CPHC (indicado como CPHC)

Figura 24: Intercambio de brazo Fab mediado por GSH

El efecto de la concentración de GSH sobre el intercambio de brazo Fab se ensayó utilizando 1 a 20.000 mM de GSH. El intercambio se ensayó utilizando las siguientes mezclas:

- IgG1 a-Fel d 1 ts con IgG1 a-Bet v 1 ts (indicado como IgG1)
- IgG4 a-Fel d 1 ts con IgG4 a-Bet v 1 ts (indicado como IgG4)
- IgG4 a-Fel d 1 CGHC con IgG4 a-Bet v 1 CGHC (indicado como CGHC)
- IgG4 a-Fel d 1 CGC con IgG4 a-Bet v 1 CGC (indicado como CGC)
- IgG4 a-Fel d 1 CPRC con IgG4 a-Bet v 1 CPRC (indicado como CPRC)
- IgG4 a-Fel d 1 CPHC con IgG4 a-Bet v 1 CPHC (indicado como CPHC)

Descripción detallada de la invención

Definiciones

El término “inmunoglobulina” se refiere a una clase de glucoproteínas relacionadas estructuralmente que consisten en dos parejas de cadenas polipeptídicas, un par de cadenas ligeras de bajo peso molecular (L) y un par de cadenas pesadas (H), interconectadas las cuatro por enlaces disulfuro. La estructura de las inmunoglobulinas se ha caracterizado bien. Véase, por ejemplo, *Fundamental Immunology* Ch. 7 (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N.Y. (1989)) (11). En resumen, cada cadena pesada está compuesta típicamente por una región variable de cadena pesada (que se abrevia en el presente documento como V_H o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada típicamente está compuesta por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta típicamente por una región variable de cadena ligera (que se abrevia en el presente documento como V_L o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta típicamente por un dominio, C_L . Las regiones V_H y V_L se pueden subdividir además en las regiones de hipervariabilidad (o regiones hipervariables que pueden ser hipervariables en la secuencia y/o formar bucles definidos estructuralmente), también se denominan regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas llamadas regiones marco conservadas (FR). Cada V_H y V_L está compuesta típicamente por tres CDR y cuatro FR, ordenadas desde el extremo amino al extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (véase también (12)). Típicamente la numeración de restos de aminoácidos en esta región se lleva a cabo por el método descrito en Kabat (13). Utilizando este sistema de numeración, la actual secuencia de aminoácidos lineal de un péptido puede contener menos o aminoácidos adicionales que corresponden con el acortamiento, o la inserción de, una FR o CDR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir una inserción de un único aminoácido (resto 52a según Kabat) tras el resto 52 de la CDR2 de V_H y los restos insertados (por ejemplo los restos 82a, 82b, y 82c, etc., según Kabat) tras el resto 82 de la FR de cadena pesada. La numeración Kabat de restos se puede determinar para un anticuerpo determinado alineando las regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia de Kabat numerada de “referencia”.

El término “anticuerpo” (Ab) en el contexto de la presente invención se refiere a una molécula de inmunoglobulina, un fragmento de una molécula de inmunoglobulina, o un derivado de cualquiera de los mismos, que tiene la capacidad para unirse específicamente a un antígeno en condiciones fisiológicas típicas con una semi vida de periodos significativos de tiempo, tales como al menos aproximadamente 30 minutos, al menos aproximadamente 45 minutos, al menos aproximadamente una hora, al menos aproximadamente dos horas, al menos cuatro horas, al menos aproximadamente 8 horas, al menos aproximadamente 12 horas, aproximadamente 24 horas o más, aproximadamente 48 horas o más, aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7 o más días, etc., o cualquier otro periodo definido funcionalmente relevante (tal como un tiempo suficiente para inducir, promover, aumentar, y/o modular una

respuesta fisiológica asociada con la unión del anticuerpo al antígeno y/o el tiempo suficiente para que el anticuerpo reclute una actividad efectora mediada por Fc). Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de la molécula de inmunoglobulina contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos (Ab) pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores que incluyen distintas células del sistema inmunitario (tales como las células efectoras) y componentes del sistema del complemento tales como C1q, el primer componente en la ruta clásica de la activación del complemento. Como se ha indicado anteriormente, el término anticuerpo del presente documento, a menos de que se establezca otra cosa o se contradiga claramente por el contexto, incluye fragmentos de un anticuerpo que comprenden una región central de la bisagra mutada o de tipo silvestre y mantiene la capacidad para unirse específicamente al antígeno.

Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo se puede llevar a cabo por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Ejemplos de fragmentos de unión englobados en el término "anticuerpo" incluyen, por ejemplo, fragmentos F(ab')₂, que son fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra. Aunque tales fragmentos se incluyen en general en el significado de anticuerpo, colectivamente y cada uno independientemente son características de la presente invención, que presentan diferentes propiedades biológicas y utilidades. También se debería entender que el término anticuerpo, a menos de que se especifique otra cosa, incluye también anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (mAb), polipéptidos tipo anticuerpo, tales como anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados, y fragmentos de anticuerpo que mantienen la capacidad para unirse específicamente al antígeno (fragmentos de unión al antígeno) proporcionados por cualquier técnica conocida, tal como escisión enzimática, síntesis peptídica, y técnicas recombinantes. Un anticuerpo generado puede poseer cualquier isotipo.

La expresión "anticuerpo humano", como se utiliza en el presente documento, se pretende que incluya anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o dirigida al sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", como se utiliza en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que se hayan insertado secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie mamífera, tales como un ratón, entre secuencias marco conservadas humanas.

Un "anticuerpo aislado" como se utiliza en el presente documento, pretende referirse a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a un epítipo, isoforma o variante de un antígeno diana humano particular, sin embargo, tiene reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, por ejemplo, de otras especies (tales como especies homólogas). Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o químico. En una realización de la presente invención, se combina una combinación de anticuerpos monoclonales "aislados" que tienen diferentes especificidades en una composición bien definida.

Las expresiones "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" como se utiliza en el presente documento se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo o una composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal presenta una única especificidad de unión y afinidad por un epítipo particular. En consecuencia, la expresión "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que presentan una única especificidad de unión que tiene regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos monoclonales humanos pueden generarse en un hibridoma que incluye una célula B que se obtiene a partir de un animal no humano transgénico o transcromosómico, tal como un ratón transgénico que tenga un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera, fusionada con una célula inmortalizada.

Como se utiliza en el presente documento, el término "unión" en el contexto de unión de un anticuerpo a un antígeno predeterminado típicamente es una unión con una afinidad que corresponde a una K_D de aproximadamente 10⁻⁷ M o menos, tal como aproximadamente 10⁻⁸ M o menos, tal como aproximadamente 10⁻⁹ M o menos, aproximadamente 10⁻¹⁰ M o menos, o aproximadamente 10⁻¹¹ M o incluso menos cuando se determina por ejemplo, por tecnologías de resonancia de plasmones superficiales (SPR) en un instrumento BIAcore 3000 utilizando el antígeno como ligando y el anticuerpo como analito, y se une al antígeno predeterminado con una afinidad que corresponde a una K_D que es al menos diez veces menor, tal como al menos 100 veces menor, por ejemplo al menos 1000 veces menor, tal como al menos 10.000 veces menor, por ejemplo al menos 100.000 veces menor que su afinidad de unión a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) distinto del antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado. La cantidad con la que la afinidad es menor depende de la K_D del anticuerpo de manera que cuando la K_D del anticuerpo es muy baja (es decir, el anticuerpo es altamente específico), entonces la cantidad con la que la afinidad por el antígeno es menor que la afinidad por un antígeno no específico puede ser al menos de 10.000 veces.

El término "k_d" (s⁻¹), como se utiliza en el presente documento, se refiere a la constante de la tasa de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. También se hace referencia a dicho valor como valor k_{off}.

El término “ k_a ” ($M^{-1} \times s^{-1}$), como se utiliza en el presente documento, se refiere a la constante de la tasa de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular.

5 El término “ K_D ” (M) como se utiliza en el presente documento se refiere a la constante de equilibrio de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular.

El término “ K_A ” (M^{-1}), como se utiliza en el presente documento, se refiere a la constante de equilibrio de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular y se obtiene dividiendo la k_a por la k_d .

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

15 El término “epítipo” significa un determinante proteico capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. Los epítopos consisten habitualmente en agrupamientos de moléculas en la superficie tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcares y habitualmente tienen características tridimensionales específicas, así como características específicas de carga. Los epítopos conformacionales o no conformacionales se distinguen porque la unión del primero se pierde en presencia de disolventes desnaturizantes pero no la del segundo. El epítipo puede comprender restos de aminoácido implicados directamente en la unión (también llamados componente inmunodominante del epítipo) y otros restos de aminoácidos, que no están directamente implicados en la unión, tal como restos de aminoácidos que se bloquean eficazmente por el péptido de unión al antígeno específicamente (en otras palabras, el resto de aminoácido está en la planta del péptido que se une al antígeno específicamente).

20 Como se utiliza en el presente documento un anticuerpo humano se “deriva de” una secuencia de línea germinal particular si el anticuerpo se obtiene de un sistema que utiliza secuencias de inmunoglobulina humana, por ejemplo, inmunizando un ratón transgénico que alberga genes de inmunoglobulina humana o explorando una biblioteca genética de inmunoglobulinas humanas, y donde el anticuerpo humano seleccionado es al menos un 90 %, tal como al menos un 95 %, por ejemplo al menos un 96 %, tal como al menos un 97 %, por ejemplo al menos un 98 %, o tal como al menos un 99 % idéntico en su secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal. Típicamente, aparte de la CDR3 de cadena pesada, un anticuerpo humano derivado de una secuencia de la línea germinal humana particular presentará no más de 20 aminoácidos de diferencia, por ejemplo, no más de 10 aminoácidos de diferencia, tal como no más de 5, por ejemplo no más de 4, 3, 2, o 1 aminoácido de diferencia respecto a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal.

35 La expresión “anticuerpo biespecífico” pretende que incluya cualquier anticuerpo, que tiene dos especificidades de unión diferentes, es decir, el anticuerpo se une a dos epítopos diferentes, que se pueden localizar en el mismo antígeno diana o, más comúnmente, en diferentes antígenos diana.

40 Como se utiliza en el presente documento, la expresión “célula efectora” se refiere a una célula inmunitaria que está implicada en la fase efectora de una respuesta inmunitaria, en oposición a las fases cognitiva y de activación de una respuesta inmunitaria. Las células inmunitarias ejemplares incluyen una célula de origen mieloide o linfoide, por ejemplo linfocitos (tales como células B y células T que incluyen las células T citolíticas (CTL), células citolíticas, células citolíticas naturales, macrófagos, monocitos, eosinófilos, células polimorfonucleares, tales como neutrófilos, granulocitos, mastocitos, y basófilos. Algunas células efectoras expresan receptores Fc específicos y llevan a cabo funciones inmunitarias específicas. En algunas realizaciones, una célula efectora es capaz de inducir una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), tal como una célula citolítica natural, capaz de inducir ADCC. Por ejemplo, los monocitos, macrófagos, que expresan FcR están implicados en la destrucción específica de células diana y presentan antígenos a otros componentes del sistema inmunitario, o se unen a células que presentan antígenos. En algunas realizaciones, una célula efectora puede fagocitar un antígeno diana o una célula diana. La expresión de un FcR particular en una célula efectora se puede regular por factores humorales tales como citocinas. Por ejemplo, se ha descubierto que la expresión de FcγRI está regulada positivamente por el interferón γ (IFN- γ) y/o G-CSF. Este aumento de la expresión aumenta la actividad citotóxica de las células que albergan FcγRI contra las dianas. Una célula efectora puede fagocitar o lisar un antígeno diana o célula diana.

55 “Tratamiento” se refiere a la administración de una cantidad eficaz de un compuesto terapéuticamente activo de la presente invención con el fin de aliviar, mejorar, detener o erradicar (curar) los síntomas o estados de enfermedad.

60 Una “cantidad eficaz” se refiere a una cantidad eficaz, a las dosificaciones y por periodos de tiempo necesarios, para conseguir un resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéutica eficaz de un anticuerpo puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de enfermedad, edad, sexo, y peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo para desencadenar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una donde los efectos perjudiciales del anticuerpo o la parte de anticuerpo son superados por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

65 La expresión “región central de la bisagra tipo IgG4” se refiere a una región central de la bisagra donde los restos de cisteína son significativamente más susceptibles a la reducción y/o la isomerización de enlaces disulfuro que otras

cisteínas/puentes disulfuro de la molécula de anticuerpo. Por lo tanto, se pueden encontrar condiciones reductoras para los anticuerpos que tienen una región central de la bisagra tipo IgG4, en las que los restos de cisteína/puentes disulfuro en la región central se pueden reducir y posteriormente formar un puente disulfuro con las cisteínas centrales de la bisagra de otra semi-molécula, mientras que se mantienen intactos otros puentes disulfuro del anticuerpo y la estructura general del anticuerpo. Por ejemplo, una región central de la bisagra tipo IgG4 puede ser una región central de la bisagra IgG4 o una secuencia central de la bisagra de un anticuerpo de otro isotipo donde una de las prolinas de la secuencia CPPC de la región central se ha mutado, por ejemplo con una serina, tal como una mutación de CPPC en CPSC.

La expresión “región CH3 tipo IgG4” en el contexto de la presente solicitud se refiere a una región CH3 que es idéntica a la CH3 de IgG4, por ejemplo una IgG4 humana, o una región CH3 que es funcionalmente equivalente a la región CH3 de IgG4. Funcionalmente equivalente en este contexto, significa que la región CH3, al igual que la región CH3 de IgG4, no forma interacciones estables entre las semi-moléculas. La formación de inter-semi-moléculas estables por una región CH3 determinada se puede ensayar, por ejemplo, sustituyendo la CH3 de una IgG4 con esta región CH3 y se ensaya el intercambio en las condiciones que se exponen en los Ejemplos 31 o 32. Si se observa el intercambio, entonces se formaron interacciones no estables entre las semi-moléculas. Por ejemplo, una región CH3 tipo IgG4 puede ser una región CH3 que es igualmente eficaz en permitir el intercambio de semi-moléculas como una región CH3 de IgG4. En consecuencia, una región CH3 tipo IgG4 puede ser similar estructuralmente a la región CH3 de IgG4, por ejemplo, más del 75 %, tal como más del 90 % idéntica a la secuencia de la región CH3 de IgG4. Sin embargo, una región CH3 tipo IgG4 en el presente contexto puede además o alternativamente ser una región CH3 que estructuralmente no se parece a la región CH3 de IgG4, pero tiene características funcionales similares, como que no comprende restos de aminoácido que participan en la formación de enlaces disulfuro o enlaces covalentes o no covalentes estables entre las cadenas pesadas, tal como los puentes salinos, con otros péptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos idéntica de la región CH3. Por ejemplo, una región CH3 tipo IgG4 puede ser una región CH3 de IgG1 mutada donde se han cambiado o eliminado uno o más restos de aminoácidos que están implicados en las interacciones CH3-CH3 entre las semi-moléculas.

La expresión “condiciones reductoras” o “entorno reductor” se refiere a una condición o un entorno donde un sustrato, aquí un resto de cisteína de la región central de un anticuerpo, es más probable que se reduzca a que se oxide.

La expresión “agente reductor” se refiere a un compuesto que reduce moléculas en su entorno, es decir, que cambia moléculas en su entorno para que se reduzcan cada vez más. Un agente reductor actúa donando electrones, llegando de esta manera a oxidarse él mismo tras haber reducido un sustrato. Por lo tanto, un agente reductor es un agente que dona electrones. Ejemplos de agentes reductores incluyen el ditioneitol (DTT), mercaptoetanol, cisteína, tioglicolato, cisteamina, glutatión, y borohidruro de sodio. En una realización, el agente reductor no comprende una enzima.

“Formación de enlaces disulfuro” se refiere al proceso de formación de un enlace covalente entre dos cisteínas presentes en uno o dos polipéptidos, que se esquematiza como “-S-S-”.

“Reducción de enlace disulfuro” se refiere al proceso de escisión de un enlace disulfuro, dando como resultado de esta manera dos grupo tiol (grupos -SH).

La expresión “isomerización del enlace disulfuro” se refiere a un intercambio de enlaces disulfuro entre diferentes cisteínas, es decir se entremezclan los enlaces disulfuro.

“Isomerasas de enlace disulfuro proteico” se refiere a proteínas que catalizan la isomerización de enlaces disulfuro en proteínas.

“Reducción no significativa” cuando ese utiliza en el contexto de la reducción de puentes disulfuro significa que en general menos del 10 %, tal como menos del 5 %, por ejemplo menos del 2 % o menos del 1 % de los puentes disulfuro especificados en la solución han sufrido una reducción.

55 Aspectos y realizaciones de la invención

Como se ha descrito anteriormente, en un primer aspecto principal, la invención se refiere a un método *ex vivo* para la generación de un anticuerpo biespecífico, dicho método comprende las etapas de:

- a) proporcionar un primer anticuerpo que tiene una primera especificidad de unión, donde dicho primer anticuerpo comprende una secuencia CPPC en la región central de la bisagra y una región CH3 tipo IgG4 que es la región CH3 de SEQ ID NO: 19, pero donde la región CH3 se ha modificado de forma que la Lys (K) de la posición 292 se ha sustituido por Arg (R),
- b) proporcionar un segundo anticuerpo que tiene una segunda especificidad de unión se diferencia de dicha primera especificidad de unión, donde dicho segundo anticuerpo comprende una secuencia CPPC en la región central de la bisagra y una región CH3 tipo IgG4 que es la región CH3 de SEQ ID NO: 19, pero donde la región

CH3 se ha modificado de forma que la Lys (K) en la posición 292 se ha sustituido por Arg (R),

c) incubar juntos dichos primer y segundo anticuerpos en condiciones reductoras que permitan que las cisteínas de la región central de la bisagra se sometan a isomerización de puentes disulfuro,

5 d) poner la composición obtenida en la etapa c) en condiciones no reductoras con el fin de detener más intercambios de semi-moléculas, y

e) obtener un anticuerpo biespecífico.

10 En una realización preferida, el primer y segundo anticuerpos que se utilizan en los métodos de la invención son anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se pueden producir, por ejemplo, por el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al. (14), o se puede producir por métodos de ADN recombinante. Los anticuerpos monoclonales se pueden aislar también a partir de bibliotecas de anticuerpos fagos utilizando las técnicas descritas, por ejemplo en Clackson et al. (15) y Marks et al. (16). Los anticuerpos monoclonales se pueden obtener a partir de cualquier fuente adecuada. Por lo tanto, por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden obtener a partir de hibridomas preparados a partir de células B esplénicas murinas que se obtienen de ratones

15 inmunizados con un antígeno de interés por ejemplo en forma de células que expresan un antígeno en la superficie, o un ácido nucleico que codifica un antígeno de interés. Los anticuerpos monoclonales se pueden obtener también de hibridomas derivados de células que expresan anticuerpos de seres humanos inmunizados o mamíferos no humanos tales como ratas, perros, primates, etc.

20 En una realización, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo humano. Los anticuerpos monoclonales humanos dirigidos pueden generarse utilizando ratones transgénicos o transcromosómicos que albergan más partes del sistema inmunitario humano que del sistema del ratón. Dichos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen los ratones a los que se hace referencia en el presente documento como ratones HuMAb y ratones KM, respectivamente, y a los que se hace referencia colectivamente en el presente documento como "ratones transgénicos".

25

30 El ratón HuMAb contiene miniloci del gen de inmunoglobulina humana que codifica secuencias no reordenadas de cadena pesada humana (μ y γ) y ligera κ de inmunoglobulina, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los loci de cadenas μ y κ endógenas (17). En consecuencia, los ratones presentan una reducción de la expresión de IgM o κ y en respuesta a la inmunización, los transgenes de cadena pesada y ligera humanos que se introducen, se someten a cambio de clase y mutación somática para generar anticuerpos monoclonales IgG, κ humanos de alta afinidad (17-20). La preparación de ratones HuMAb se describe en detalle en las ref. 21-25. Véase también los documentos US 5.545.806, US 5.569.825, US 5.625.126, US 5.633.425, US 5.789.650, US 5.877.397, US 5.661.016, US 5.814.318, US 5.874.299, US 5.770.429, US 5.545.807, WO 98/24884, WO 94/25585, WO 93/1227, WO 92/22645, WO

35 92/03918 y WO 01/09187.

40 Los ratones HCo7 tienen una alteración JKD en sus genes de cadena ligera (κ) (como se describe en Chen et al. (26)), una alteración de CMD en sus genes endógenos de cadena pesada (como se describe en el Ejemplo 1 del documento WO 01/14424), un transgén KCo5 de cadena ligera κ humana (como se describe en Fishwild et al. (25)), y un transgén HCo7 humano de cadena pesada (como se describe en el documento US 5.770.429).

45 El ratón HCo12 tiene una alteración JKD en sus genes endógenos de cadena ligera (κ) (como se describe en Chen et al. (26)), una alteración de CMD en sus genes endógenos de cadena pesada (como se describe en el Ejemplo 1 del documento WO 01/14424), un transgén KCo5 de cadena ligera κ humana (como se describe en Fishwild et al. (25)), y un transgén HCo12 humano de cadena pesada (como se describe en el Ejemplo 2 del documento WO 01/14424).

50 En la estirpe de ratón KM, el gen endógeno de cadena ligera κ del ratón se ha alterado homocigóticamente como se describe en Chen et al. (26) y el gen endógeno de cadena pesada del ratón se ha alterado homocigóticamente como se describe en el Ejemplo 1 del documento WO 01/09187. Esta estirpe de ratón alberga un transgén de cadena ligera κ humana, KCo5, como se describe en Fishwild et al. (25). Esta estirpe de ratón también alberga un transcromosoma de cadena pesada humana compuesto por el fragmento del cromosoma 14 hCF (SC20) como se describe en el documento WO 02/43478.

55 Los esplenocitos de estos ratones transgénicos se pueden utilizar para generar hibridomas que segreguen anticuerpos monoclonales humanos de acuerdo con técnicas bien conocidas. Dichos animales transgénicos no humanos, animales que comprenden una secuencia de ácido nucleico operativa que codifica la expresión del anticuerpo utilizando en la invención, animales no humanos transfectados establemente con una o más secuencias de ácido nucleico que codifican dianas, y similares, son características adicionales de la presente invención.

60

65 Los anticuerpos humanos monoclonales o policlonales que se van a utilizar en la presente invención, o los anticuerpos utilizados en la presente invención que se originan de otras especies también se pueden generar transgénicamente por medio de la generación de otros mamíferos no humanos o plantas que sean transgénicos para las secuencias de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina de interés y la producción del anticuerpo en una forma recuperable de los mismos. En conexión con la producción transgénica en mamíferos, los anticuerpos se

pueden producir y recuperar de, la leche de cabras, vacas u otros animales. Véase por ejemplo los documentos US 5.827.690, US 5.756.687, US 5.750.172 y US 5.741.957.

5 Además, los anticuerpos humanos u otros que se van a usar en la presente invención se pueden generar por medio de tecnologías de tipo presentación, que incluyen sin limitación, fago de presentación, presentación retroviral, presentación ribosómica, y otras técnicas, utilizando técnicas bien conocidas en la técnica y las moléculas resultantes se pueden someter a una maduración adicional, tal como maduración por afinidad, ya que dichas técnicas son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, las ref. 27, 28, y 30 (fago de presentación), 29 (presentación ribosómica), 31-35 y el documento US 5.733.743). Si se utilizan tecnologías de presentación para producir anticuerpos que no son humanos, dichos anticuerpos pueden estar humanizados.

15 También se desvelan en el presente documento métodos en los que el primer y/o el segundo anticuerpo es un anticuerpo IgG4. Sin embargo, el anticuerpo puede en principio ser de cualquier isotipo, siempre que las secuencias de la región CH3 permitan el intercambio de semi-moléculas. Por ejemplo, los anticuerpos que se utilizan o se obtienen en el método de la invención pueden comprender cualquiera de las secuencias de la región constante que se muestran en SEQ ID NO: 19-22 (aparte de cualquiera de las posiciones mutadas).

20 Por lo tanto, en una realización del método de la invención, el primer y/o segundo anticuerpo comprende una secuencia CPPC en la región central de la bisagra. También se desvelan en el presente documento métodos en los que el primer y/o el segundo anticuerpo comprende una región central de la bisagra tipo IgG4. Por ejemplo, también se desvelan en el presente documento métodos en los que el primer y/o el segundo anticuerpo es un anticuerpo que comprende una secuencia CX₁X₂C en la región central de la bisagra, donde X₁ y X₂ puede ser cualquier aminoácido siempre que X₁ y X₂ no sean ambos prolina. También se desvelan en el presente documento métodos en los que el primer y/o segundo anticuerpo es un anticuerpo que comprende una secuencia CX₃PC o CPX₃C en la región central de la bisagra, donde X₃ puede ser cualquier aminoácido excepto prolina. También se desvelan en el presente documento métodos en los que el primer y/o segundo anticuerpo es un anticuerpo que comprende una secuencia CSPC, CPSC, CRPC, CPRC, CGHC o CPHC en la región central de la bisagra. Las mutaciones descritas anteriormente pueden introducirse, por ejemplo, por mutagénesis dirigida al sitio bien conocida en la técnica.

30 La elección del isotipo estará guiada típicamente por las funciones efectoras deseadas, tales como inducción de CDC, o la actividad en cuanto a ADCC. Los isotipos ejemplares son IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4 (véase por ejemplo, SEQ ID NO: 19-22). Se pueden utilizar regiones constantes de cadena ligera humanas, kappa o lambda. Si se desea, la clase de un anticuerpo para su uso en la presente invención se puede cambiar por métodos conocidos. Por ejemplo, un anticuerpo que se va a utilizar en la presente invención que era originalmente una IgM, IgG1 o IgG2 se puede cambiar de clase en un anticuerpo IgG4 de la presente invención. Por lo tanto, la función efectora de los anticuerpos de la presente invención se puede cambiar mediante un cambio de isotipo en, por ejemplo, un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE, o IgM para distintos usos terapéuticos.

40 En una realización, el primer y/o segundo anticuerpo que se utiliza en la invención es un anticuerpo de longitud completa. En otra realización, el primer y/o segundo anticuerpo que se utiliza es un fragmento de anticuerpo.

También se desvelan en el presente documento métodos en los que el primer y/o el segundo anticuerpo comprende una región CH3 de IgG4, tal como la región CH3 de IgG4 que tiene la secuencia que se muestra en la Figura 18 (SEQ ID NO: 22).

45 También se desvelan en el presente documento métodos en los que el primer y/o segundo anticuerpo comprende una región CH3 de un isotipo no IgG4, donde la secuencia CH3 es tal, o se ha modificado de tal manera, que no comprende ningún resto de aminoácido que participe en la formación de enlaces disulfuro o enlaces estables covalentes o no covalentes entre las cadenas pesadas con otros péptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos idéntica a la región CH3.

50 También se desvelan en el presente documento métodos en los que el primer y/o segundo anticuerpo comprende una región CH3 que tiene la secuencia que se muestra en la Figura 18 (SEQ ID NO: 19), donde la región CH3 se ha modificado de manera que se han hecho una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: la Arg (R) en la posición 238 se ha sustituido por Gln (Q); Asp (D) en la posición 239 se ha sustituido por Glu (E); Lys (K) en la posición 292 se ha sustituido por Arg (R); Gln (Q) en la posición 302 se ha sustituido por Glu (E); y Pro (P) en la posición 328 se ha sustituido por Leu (L).

60 De acuerdo con el método de la presente invención, el primer y/o segundo anticuerpo comprende una región CH3 que tiene la secuencia que se muestra en la Figura 18 (SEQ ID NO: 19), donde la Lys (K) de la posición 292 se ha sustituido por Arg (R).

65 También se desvelan en el presente documento métodos en los que el primer y/o segundo anticuerpo comprende una región CH3 que tiene la secuencia que se muestra en la Figura 18 (SEQ ID NO: 19), pero donde la Lys (K) de la posición 292 se ha sustituido por Tyr (W) o Phe (F).

También se desvelan en el presente documento métodos en los que el primer y/o segundo anticuerpo comprende una región CH3 que tiene la secuencia que se muestra en la Figura 18 (SEQ ID NO: 20), donde la región CH3 se ha modificado de manera que se han hecho una o más, o las cinco sustituciones de aminoácidos siguientes: Arg (R) en la posición 234 se ha sustituido por Gln (Q); Met (M) en la posición 276 se ha sustituido por Val (V); Lys (K) en la posición 288 se ha sustituido por Arg (R); Gln (Q) en la posición 298 se ha sustituido por Glu (E); y Pro (P) en la posición 324 se ha sustituido por Leu (L).

También se desvelan en el presente documento métodos en los que el primer y/o el segundo anticuerpo comprende una región CH3 que tiene la secuencia que se muestra en la Figura 18 (SEQ ID NO: 20), donde la Arg (R) en la posición 234 se ha sustituido por Gln (Q).

También se desvelan en el presente documento métodos en los que el primer y/o el segundo anticuerpo comprende una región CH3 que tiene la secuencia que se muestra en la Figura 18 (SEQ ID NO: 20), donde la Arg (R) en la posición 234 se ha sustituido por Gln (Q), y la Pro (P) de la posición 324 se ha sustituido por Leu (L).

También se desvelan en el presente documento métodos en los que el primer y/o el segundo anticuerpo comprende una región CH3 que tiene la secuencia que se muestra en la Figura 18 (SEQ ID NO: 21), donde la región CH3 se ha modificado de manera que se han hecho una o más o las 10 sustituciones de aminoácidos siguientes: Arg (R) en la posición 285 se ha sustituido por Gln (Q); Ser (S) en la posición 314 se ha sustituido por Asn (N); Asn (N) en la posición 322 se ha sustituido por Lys (K); Met (M) en la posición 327 se ha sustituido por Val (V); Lys (K) en la posición 339 se ha sustituido por Arg (R); Gln (Q) en la posición 349 se ha sustituido por Glu (E); Ile (I) en la posición 352 se ha sustituido por Val (V); Arg (R) en la posición 365 se ha sustituido por His (H); Phe (F) en la posición 366 se ha sustituido por Tyr (Y); y Pro (P) en la posición 375 se ha sustituido por Leu (L).

También se desvelan en el presente documento métodos en los que el primer y/o segundo anticuerpo comprende la región CH3 que tiene la secuencia que se muestra en la Figura 18 (SEQ ID NO: 21), donde la Arg (R) de la posición 285 se ha sustituido por Gln (Q).

También se desvela en el presente documento métodos en los que el primer y/o el segundo anticuerpo comprende una región CH3 que tiene la secuencia que se muestra en la Figura 18 (SEQ ID NO: 21), donde la Arg (R) en la posición 285 se ha sustituido por Gln (Q), y la Pro (P) de la posición 375 se ha sustituido por Leu (L).

En una realización más del método de la invención, dicho primer anticuerpo comprende una CPPC en la región central de la bisagra y comprende una región CH3 tipo IgG4 y donde dicho segundo anticuerpo comprende una CPPC en la región central de la bisagra y comprende una región CH3 tipo IgG4.

También se desvela en el presente documento un método *ex vivo* para la generación de un anticuerpo biespecífico, comprendiendo dicho método las etapas de :

- a) proporcionar un primer anticuerpo que tiene una primera especificidad de unión, donde dicho anticuerpo comprende una región CH3 tipo IgG4,
- b) proporcionar un segundo anticuerpo que tiene una segunda especificidad de unión que se diferencia de la primera especificidad de unión, donde dicho segundo anticuerpo comprende una región CH3 tipo IgG4,
- c) incubar juntos dichos primer y segundo anticuerpos en condiciones reductoras que permitan que las cisteínas en la región central de la bisagra se sometan a isomerización de enlaces disulfuro, y
- d) obtener un anticuerpo biespecífico.

También se desvelan en el presente documento métodos en los que las condiciones de la etapa c) se escogen de manera que no se produzca una reducción significativa ni isomerización de puentes disulfuro fuera de la región central de la bisagra.

También se desvelan en el presente documento métodos en los que las condiciones reductoras de la etapa c) son condiciones que estimulan la actividad intrínseca de la región central de la bisagra para llevar a cabo el intercambio de enlaces disulfuro.

En una realización de la invención, la etapa c) comprende la adición de un agente reductor. En una realización adicional la etapa c) comprende la adición de un agente que se selecciona de entre el grupo que consiste en: glutatión, L-cisteína, ditiotreitól, beta-mercapto-etanol y cisteamina.

En una realización del método de la invención, la concentración de dicho agente reductor es tal que el potencial redox de la solución generada en la etapa c) es igual, o más reductora que el potencial redox generado por 1 microM de glutatión en las condiciones descritas en el Ejemplo 31, tal como igual o más reductor que el potencial redox generado por 10 microM de glutatión, por ejemplo, igual o más reductor que el potencial redox generado por 40 microM de glutatión, tal como igual o más reductor que el potencial redox generado por 0,1 mM de glutatión, en las condiciones descritas en el Ejemplo 31.

En una realización adicional, la concentración de dicho agente reductor es tal que el potencial redox de la solución generado en la etapa c) es

- 5 - igual o más reductor que el potencial redox generado por 1 microM de glutatión en las condiciones descritas en el Ejemplo 31, tal como igual o más reductora que el potencial redox generado por 10 microM de glutatión, por ejemplo igual o más reductor que el potencial redox generado por 50 microM de glutatión, tal como igual o más reductor que el potencial redox generado por 0,1 mM de glutatión, en las condiciones descritas en el Ejemplo 31, y
- 10 - es igual a o menos reductor que el potencial redox generado por 1 M de glutatión en las condiciones descritas en el Ejemplo 31, tal como igual o menos reductor que el potencial redox generado por 100 mM de glutatión, igual o menos reductor que el potencial redox generado por 15 mM de glutatión.

15 En una realización, donde el primer anticuerpo tiene una secuencia CPPC en la región central de la bisagra y/o el segundo anticuerpo tiene una secuencia CPPC en la región central de la bisagra, se prefiere que el potencial redox de la solución generada en la etapa c) sea igual o más reductor que el potencial redox generado por 1 mM de glutatión, por ejemplo igual o más reductor que el potencial redox generado por 2 mM de glutatión, tal como igual o más reductor que el potencial redox generado por 4 mM de glutatión, por ejemplo igual o más reductor que el potencial redox generado por 6 mM de glutatión, tal como igual o más reductor que el potencial redox generado por 8 mM de glutatión, por ejemplo igual o más reductor que el potencial reductor generado por 10 mM de glutatión, en las condiciones descritas en el Ejemplo 35.

En una realización adicional, la concentración de dicho agente reductor es tal que el potencial redox de la solución generado en la etapa c) es

- 25 - igual o más reductor que el potencial redox generado por 1 mM de glutatión, por ejemplo igual o más reductor que el potencial redox generado por 2 mM de glutatión, tal como igual o más reductor que el potencial redox generado por 4 mM de glutatión, por ejemplo igual o más reductor que el potencial redox generado por 6 mM de glutatión, tal como igual o más reductor que el potencial redox generado por 8 mM de glutatión, por ejemplo igual o más reductor que el potencial redox generado por 10 mM de glutatión, en las condiciones descritas en el Ejemplo 35, y
- 30 - es igual a o menos reductor que el potencial redox generado por 1 M de glutatión, tal como igual o menos reductor que el potencial redox generado por 100 mM de glutatión, igual o menos reductor que el potencial redox generado por 15 mM de glutatión.

35 En una realización del método de la invención, la etapa c) comprende la incubación de dichos anticuerpos en presencia de glutatión reducido durante al menos 1 hora, tal como durante al menos 2 horas, por ejemplo, durante al menos 5 horas, tal como al menos 10 horas a una temperatura de 20 °C o más, tal como 37 °C.

40 En una realización adicional del método de la invención, las condiciones escogidas en la etapa c) son tales que menos del 10 %, tal como menos del 5 %, por ejemplo, menos del 2 %, tal como menos del 1 % de moléculas de anticuerpo en la composición resultante están en estado agregado, como se determina por cromatografía de exclusión por tamaño como se describe en el presente documento (donde un pico que se eluye antes de los anticuerpos del material de partida es indicativo de la formación de agregados).

45 en una realización del método *ex vivo* de la invención, el método comprende la adición de una proteína que tenga actividad proteína disulfuro isomerasa, tal como PDI. En otra realización del método *ex vivo* de la invención el método no comprende la adición de una proteína que tenga actividad proteína disulfuro isomerasa, tal como PDI.

50 En una realización del método *ex vivo* de la invención, el método no comprende la adición de células vivas o extractos celulares.

Como se ha explicado anteriormente, el primer y segundo anticuerpos que se utilizan en el método de la invención se diferencian en la especificidad de unión, es decir, se unen a diferentes epítomos. En principio, se puede utilizar cualquier combinación de especificidades como material de partida en el método de la invención. El método de la invención tampoco se limita a que tenga dos diferentes anticuerpos como material de partida. Por lo tanto, el método de la invención se puede llevar a cabo también con tres o más anticuerpos como material de partida. En dicha realización, la composición que se obtiene en la etapa d) del método de la invención contendrá una pluralidad de anticuerpos biespecíficos.

60 En una realización del método de la invención, el primer anticuerpo tiene una especificidad por una célula tumoral o proteína celular tumoral, tal como erbB1, erbB2, erbB3, erbB4, MUC-1, CD19, CD20, CD4, CD38 o CXCR5, y el segundo anticuerpo tiene una especificidad de unión para una proteína celular tumoral, tal como erbB1, erbB2, erbB3, erbB4, MUC-1, CD19, CD20, CD4 o CXCR5.

65 En una realización adicional, el primer anticuerpo tiene una especificidad de unión para erbB1 y el segundo anticuerpo tiene una especificidad de unión para erbB2.

En otra realización, el primer anticuerpo tiene una especificidad de unión para CD19 y el segundo anticuerpo tiene una especificidad de unión para CD20.

5 En una realización adicional, el primer anticuerpo tiene una especificidad de unión para CD38 y el segundo anticuerpo tiene una especificidad de unión para CD34.

En una realización adicional más, el primer anticuerpo tiene una especificidad de unión para CD4 y el segundo anticuerpo tiene una especificidad de unión para CXCR5.

10 En otra realización del método de la invención, el primer anticuerpo tiene una especificidad de unión para un microorganismo patógeno. En una realización adicional, el primer anticuerpo tiene una especificidad de unión para un microorganismo patógeno y el segundo anticuerpo tiene una especificidad de unión para una proteína celular efectora, tal como CD3, CD25, CD28, CD16, CD89, CD32 o CD1.

15 Un anticuerpo biespecífico también se puede utilizar para dirigir un agente quimioterápico más específicamente a las células sobre las que debería actuar el agente quimioterápico. Por lo tanto, en una realización adicional del método de la invención, el primer anticuerpo tiene una especificidad de unión para una célula tumoral o proteína celular tumoral, tal como erbB1, erbB2, erbB3, erbB4, MUC-1, CD19, CD20, CD4 o CXCR5 y el segundo anticuerpo tiene una especificidad de unión para un agente quimioterápico.

20 Además, la semivida sérica de un anticuerpo se puede alterar incluyendo en un anticuerpo biespecífico una especificidad de unión por una proteína sérica. Por ejemplo, se puede prolongar la semivida sérica incluyendo en un anticuerpo biespecífico una especificidad de unión a la seroalbúmina. Por lo tanto, en una realización adicional del método de la invención, el primer anticuerpo tiene una especificidad de unión para una célula tumoral o una proteína celular tumoral, tal como erbB1, erbB2, erbB3, erbB4, MUC-1, CD19, CD20, CD4 o CXCR5 y el segundo anticuerpo tiene una especificidad de unión por una proteína sanguínea, tal como la seroalbúmina.

25 Se puede utilizar también una segunda especificidad de unión para dirigir un anticuerpo a un tejido específico, tal como el cerebro o el hígado. Por lo tanto, en una realización adicional del método de la invención, el primer anticuerpo tiene una especificidad de unión para una célula tumoral o proteína celular tumoral, tal como erbB1, erbB2, erbB3, erbB4, MUC-1, CD19, CD20, CD4 o CXCR5 y el segundo anticuerpo tiene una especificidad por una proteína cerebral, tal como transferrina o una proteína hepática.

30 Además, se puede utilizar una segunda especificidad de unión para dirigir factores de coagulación sanguínea a un sitio de acción en particular que se desee. Por ejemplo, un anticuerpo biespecífico que tiene una primera especificidad de unión por una célula tumoral y una segunda especificidad de unión por un factor sanguíneo de coagulación podría dirigir la coagulación sanguínea a un tumor, y de esta manera detener el crecimiento tumoral. Por lo tanto, en una realización adicional del método de la invención, el primer anticuerpo tiene una especificidad de unión por una célula tumoral o proteína celular tumoral tal como erbB1, erbB2, erbB3, erbB4, MUC-1, CD19, CD20, CD4 o CXCR5 y el segundo anticuerpo tiene una especificidad por una proteína implicada en la coagulación sanguínea, tal como un factor tisular.

35 En realizaciones adicionales de la invención, el primer y/o segundo anticuerpo está unido a un compuesto que se selecciona de entre el grupo que consiste en: un agente citotóxico; un radioisótopo; un profármaco o fármaco, tal como el taxano; una citocina; una quimiocina y un complemento, tal como C1q. Dicho compuesto puede producir que la destrucción de las células diana sea más eficaz, por ejemplo en terapia del cáncer. El compuesto puede acoplarse alternativamente al anticuerpo biespecífico resultante, es decir, después de que tenga lugar el intercambio de semi-moléculas.

45 En una realización adicional del método de la invención, el método comprende una etapa adicional de poner la composición que se obtiene en la etapa c) en condiciones no reductoras o menos reductoras, con el fin de detener intercambios adicionales de semi-moléculas. Esto se puede hacer por distintos métodos que se conocen en la técnica, por ejemplo, diálisis de la composición resultante o cromatografía basada en el tamaño para retirar un agente reductor de molécula pequeña.

50 En una realización adicional más del método de la invención, los anticuerpos biespecíficos resultantes se estabilizan llevando a cabo un entrecruzamiento químico de las dos semi-moléculas, previniendo de esta manera cualquier intercambio adicional, incluso cuando posteriormente se utiliza el anticuerpo biespecífico en condiciones, tales como las condiciones *in vivo*, en las que el anticuerpo podría de otra manera someterse a entrecruzamiento de las semi-moléculas. Por lo tanto, en una realización, el método de la invención comprende la etapa adicional de:

- 55
- a) entrecruzar químicamente las cisteínas de la región bisagra, por ejemplo, utilizando compuestos que contienen maleimida, tales como bis-maleimidohexano,
 - b) entrecruzar químicamente las cadenas laterales de carbohidrato de las semi-moléculas, por ejemplo, mediante oxidación con peróxido seguida por una reacción de los grupos aldehído con entrecruzadores adecuados, tales como adipina dihidrazida,
- 60

o

c) entrecruzar cisteínas introducidas asimétricamente en la región CH3, por ejemplo como se describe en Merchant et al. (36), por ejemplo utilizando una o más de las siguientes combinaciones (referencia a SEQ ID NO: 19):

- 5
- D282C en el primer anticuerpo con K275C en el segundo anticuerpo,
 - D282S en el primer anticuerpo con K275S en el segundo anticuerpo,
 - Y232C en el primer anticuerpo con S237C en el segundo anticuerpo,
 - Y232C en el primer anticuerpo con D239C en el segundo anticuerpo,
 - 10 - Y232C en el primer anticuerpo con E240C en el segundo anticuerpo,
 - L234C en el primer anticuerpo con S237C en el segundo anticuerpo,
 - T277C en el primer anticuerpo con V280C en el segundo anticuerpo,
 - V280C en el primer anticuerpo con K275C en el segundo anticuerpo.

- 15 En un aspecto adicional, la invención se refiere a anticuerpos biespecíficos adicionales estabilizados que se obtienen o se pueden obtener por métodos de entrecruzamiento, por ejemplo, por cualquiera de los tres métodos de entrecruzamiento descritos anteriormente.

20 Independiente de si se ha estabilizado el anticuerpo biespecífico o no por entrecruzamiento, el método de la invención puede, en algunas realizaciones, comprender una etapa adicional de purificación del anticuerpo biespecífico. Las mezclas que contienen anticuerpos biespecíficos se pueden purificar utilizando técnicas de cromatografía convencionales tales como (pero sin limitarse a) cromatografía de proteína A, Proteína G, Proteína L convencionales, cromatografía de intercambio catiónico/aniónico, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía tiofílica o utilizando ligandos diseñados para capturar moléculas de IgG (miméticos de Proteína A, ligandos VHH de llama y similares). De manera alternativa, las mezclas de IgG se pueden precipitar utilizando técnicas convencionales tales como precipitación inducida por la sal (sulfato amónico), adición de disolventes orgánicos (DMSO, etanol), cambio del pH o polímeros no iónicos (polietilenglicol). En otra configuración, las mezclas se pueden aplicar a técnicas de filtración utilizando membranas que permitan a concentración de las moléculas de IgG. Pueden ser necesarias combinaciones de todas estas técnicas para purificar un anticuerpo biespecífico hasta la homogeneidad completa, ya que ciertas mezclas pueden contener aún las moléculas de IgG parentales cerca del anticuerpo biespecífico. Pueden necesitarse etapas de purificación adicionales para separar el anticuerpo biespecífico de las moléculas de IgG parentales mono-específicas. Esto se podría hacer, por ejemplo, mediante purificación por unión y elución utilizando una columna de afinidad para la primera especificidad de unión seguida por la unión y elución utilizando una columna de afinidad para la segunda especificidad de unión. En una realización preferida, en particular cuando no se ha llevado a cabo un entrecruzamiento químico, la purificación se hace en condiciones que eviten el intercambio adicional de semi-moléculas, tal como en condiciones no reductoras.

40 La cantidad, calidad y pureza de anticuerpos biespecíficos (purificados) se puede analizar utilizando técnicas bioquímicas de rutina tales como las mediciones de absorbancia, HP-SEC, SDS-PAGE, PAGE nativa y RP-HPLC. Son de particular interés las técnicas que pueden discriminar los anticuerpos biespecíficos de las moléculas de IgG parentales. Ejemplos de tales técnicas son (pero no se limitan a) IEF, cIEF, CIEX y espectrometría de masas (ESI, MALDI) que permiten una separación altamente precisa y la detección de moléculas basándose en la carga y/o la masa. La especificidad de unión dual del anticuerpo biespecífico se puede evaluar utilizando una variedad de diferentes formatos de ensayos de unión utilizando por ejemplo, ELISA, RIA, resonancia de plasmones superficiales (SPR) interferometría de biocapa, DELFIA, FRET, ECL Gyros y AlfaScreen.

50 En una realización, el intercambio de semi-moléculas se puede llevar a cabo en condiciones que favorezcan la formación de anticuerpos biespecíficos dirigidos contra uno de los dos antígenos de interés, por ejemplo, al considerar los anticuerpos contra los antígenos X e Y. Si se lleva a cabo el intercambio utilizando un exceso de anticuerpo contra el antígeno X, tal como un exceso de 5 veces o un exceso de 10 veces, la mayoría de todos los anticuerpos contra el antígeno Y se vuelven biespecíficos (es decir reconocen los antígenos X e Y).

55 Este procedimiento puede continuar con la purificación de anticuerpos biespecíficos en una matriz con un antígeno Y inmovilizado y cromatografía en columna de afinidad. Los anticuerpos que se unen están altamente enriquecidos en el anticuerpo biespecífico deseado. Los anticuerpos no unidos contra el antígeno X se pueden utilizar para repetir el ciclo anterior.

60 En el caso de que se necesite la estabilización para evitar el intercambio *in vivo*, los anticuerpos biespecíficos se pueden entrecruzar como se ha descrito anteriormente. A continuación del entrecruzamiento químico, los anticuerpos no estabilizados se pueden purificar de los anticuerpos estabilizados llevando a cabo una reacción adicional de intercambio con un exceso de anticuerpo contra un antígeno Z seguido por la absorción de anticuerpo que contiene anti-Z contra una matriz con antígeno Z inmovilizado (tal como una cromatografía en columnas de afinidad). La fracción no unida contiene entonces el anticuerpo estabilizado deseado.

65

En una realización adicional más del método de la invención, el método comprende la etapa adicional de formular los anticuerpos biespecíficos resultantes para su uso terapéutico. Esto comprende la formulación de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo biespecífico en una solución acuosa que sea adecuada para uso humano, en particular adecuada para la administración parenteral, tal como la intravenosa.

5 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método *ex vivo* para la generación de un anticuerpo biespecífico, comprendiendo dicho método las etapas de:

- 10 a) proporcionar un primer anticuerpo que tiene una primera especificidad de unión, donde dicho primer anticuerpo comprende la secuencia CPPC en la región central de la bisagra y una región CH3 de IgG4,
 b) proporcionar un segundo anticuerpo que tiene una segunda especificidad de unión, donde dicho segundo anticuerpo comprende una secuencia CPPC en la región central de la bisagra y una región CH3 de IgG4, e
 c) incubar juntos dichos primer y segundo anticuerpos en condiciones reductoras que permitan que las cisteínas de la región central de la bisagra se sometan a isomerización de los enlaces disulfuro, y
 15 d) obtener un anticuerpo biespecífico.

Preferentemente, en la etapa c) se ha añadido un agente reductor donde la concentración de dicho agente es tal que el potencial redox de la solución generada en la etapa c) es igual, o más reductora que el potencial redox generado por 1 mM de glutatión, por ejemplo igual o más reductor que el potencial redox generado por 2 mM de glutatión, tal como igual o más reductor que el potencial redox generado por 4 mM de glutatión, por ejemplo igual o más reductor que el potencial redox generado por 6 mM de glutatión, tal como igual o más reductor que el potencial redox generado por 8 mM de glutatión, por ejemplo igual o más reductor que el potencial redox generado por 10 mM de glutatión, en las condiciones descritas en el Ejemplo 35.

25 En un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición que comprende anticuerpos biespecíficos que se obtienen o se pueden obtener por cualquiera de los métodos de la invención como se describe en el presente documento.

30 En un aspecto principal adicional, la invención se refiere a un anticuerpo biespecífico aislado comprende dos regiones CH3 tipo IgG4.

En una realización, dicho anticuerpo comprende una o dos secuencias CPPC en la región central de la bisagra.

35 También se desvelan en el presente documento anticuerpos que comprenden una o dos secuencias CX_1X_2C en la región central de la bisagra, donde X_1 y X_2 puede ser cualquier aminoácido, siempre que X_1 y X_2 no son ambos prolina.

También se desvelan en el presente documento anticuerpos que comprenden una o dos secuencias CX_3PC o CPX_3C en la región central de la bisagra, donde X_3 puede ser cualquier aminoácido excepto prolina.

40 También se desvelan en el presente documento anticuerpos que comprenden una o dos secuencias CSPC, CPSC, CRPC o CPRC en la región central de la bisagra.

45 En algunas realizaciones del anticuerpo biespecífico aislado, la primera o segunda región CH3 es de un isotipo no IgG4, donde la secuencia de CH3 es tal, o se ha modificado de tal manera, que no comprende ningún resto de aminoácidos que participe en la formación de enlaces disulfuro o enlaces estables covalentes o no covalentes entre las cadenas pesadas con otros péptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos idéntica a la región CH3.

50 En una realización de la misma, la primera y/o segunda región CH3 tiene la secuencia que se muestra en la Figura 18 (SEQ ID NO: 19), donde la región CH3 se ha modificado de forma que la Lys (K) en la posición 292 se ha sustituido por Arg (R).

55 También se desvelan en el presente documento anticuerpos en los que dicha primera y/o segunda región CH3 tiene la secuencia que se muestra en la Figura 18 (SEQ ID NO: 19), donde la región CH3 se ha modificado de forma que se han hecho una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: Arg (R) de la posición 238 se ha sustituido por Gln (Q); Asp (D) de la posición 239 se ha sustituido por Glu (E); Lys (K) de la posición 292 se ha sustituido por Arg (R); Gln (Q) de la posición 302 se ha sustituido por Glu (E); y Pro (P) de la posición 328 se ha sustituido por Leu (L).

60 También se desvelan en el presente documento anticuerpos en los que la primera y/o segunda región CH3 tiene la secuencia que se muestra en la Figura 18 (SEQ ID NO: 20), donde la región CH3 se ha modificado de manera que se han hecho una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: Arg (R) de la posición 234 se ha sustituido por Gln (Q); Met (M) de la posición 276 se ha sustituido por Val (V); Lys (K) de la posición 288 se ha sustituido por Arg (R); Gln (Q) de la posición 298 se ha sustituido por Glu (E); y Pro (P) de la posición 324 se ha sustituido por Leu (L).

65

También se desvelan en el presente documento anticuerpos en los que la primera y/o segunda región CH3 tiene la secuencia que se muestra en la Figura 18 (SEQ ID NO: 21), donde la región CH3 se ha modificado de manera que se han hecho una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: Arg (R) de la posición 285 se ha sustituido por Gln (Q); Ser (S) de la posición 314 se ha sustituido por Asn (N); Asn (N) de la posición 322 se ha sustituido por Lys (K); Met (M) de la posición 327 se ha sustituido por Val (V); Lys (K) de la posición 339 se ha sustituido por Arg (R); Gln (Q) de la posición 349 se ha sustituido por Glu (E); Ile (I) de la posición 352 se ha sustituido por Val (V); Arg (R) de la posición 365 se ha sustituido por His (H); Phe (F) de la posición 366 se ha sustituido por Tyr (Y); y Pro (P) de la posición 375 se ha sustituido por Leu (L).

10 También se desvelan en el presente documento anticuerpos en los que la primera y/o segunda región CH3 del anticuerpo de la invención es una región CH3 de IgG4.

15 En un aspecto adicional más, la invención se refiere a una composición tal como una composición farmacéutica que comprende anticuerpos bispecíficos de la invención o anticuerpos bispecíficos que se obtienen o se pueden obtener por cualquiera de los métodos de la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer o enfermedades infecciosas.

20 En un aspecto adicional más, la invención se refiere al uso de una composición que comprende anticuerpos bispecíficos de la invención o anticuerpos bispecíficos que se obtienen o se pueden obtener por cualquiera de los métodos de la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer o enfermedades infecciosas.

25 El método de la invención también se puede utilizar para seleccionar combinaciones particularmente interesantes o eficaces de especificidades de unión a una diana. Por ejemplo, utilizando el método de la invención, se puede hacer un grupo o "matriz" de diferentes anticuerpos bispecíficos a partir de un grupo de anticuerpos que tengan distintas especificidades de unión. El grupo o matriz de anticuerpos bispecíficos resultante se puede ensayar entonces en cuanto a una propiedad biológica deseada para seleccionar la mejor combinación.

30 Por lo tanto, en un aspecto adicional más, la invención se refiere a un método para la selección de un anticuerpo bispecífico que tiene una propiedad deseada, comprendiendo dicho método las etapas de:

- a) proporcionar un grupo de anticuerpos, donde cada anticuerpo tiene una especificidad diferente por una diana y donde cada anticuerpo comprende una región CH3 tipo IgG4,
- 35 b) incubar cada anticuerpo de dicho grupo de anticuerpos con otro anticuerpo de dicho grupo en condiciones reductoras, generando de esta manera un grupo de mezclas de anticuerpos, donde cada mezcla contiene un anticuerpo bispecífico diferente,
- c) ensayar el grupo resultante de mezclas de anticuerpos en cuanto a una determinada propiedad que se desee y
- 40 d) seleccionar una mezcla de anticuerpos bispecíficos que tenga la propiedad deseada.

La etapa b) en el método anterior puede llevarse a cabo como se ha descrito previamente para la etapa c).

En una realización, la propiedad deseada que se va a ensayar es la destrucción de un tumor.

45 Referencias

1. Aalberse, R. C., R. van der Gaag, y J. van Leeuwen. 1983. Serologic aspects of IgG4 antibodies. I. Prolonged immunization results in an IgG4-restricted response. *J Immunol* 130: 722.
2. van der Zee, J. S., P. van Swieten, y R. C. Aalberse. 1986. Serologic aspects of IgG4 antibodies. II. IgG4 antibodies form small, nonprecipitating immune complexes due to functional monovalency. *J Immunol* 137:3566.
- 50 3. Schuurman, J., R. Van Ree, G. J. Perdok, H. R. Van Doorn, K. Y. Tan, y R. C. Aalberse. 1999. Normal human immunoglobulin G4 is bispecific: it has two different antigen-combining sites. *Immunology* 97:693.
4. Aalberse, R. C., y J. Schuurman. 2002. IgG4 breaking the rules. *Immunology* 105:9.
5. Aalberse, R. C., J. Schuurman, y R. van Ree. 1999. The apparent monovalency of human IgG4 is due to bispecificity. *Int Arch Allergy Immunol* 118: 187.
- 55 6. Schuurman, J., G. J. Perdok, A. D. Gorter, y R. C. Aalberse. 2001. The inter-heavy chain disulfide bonds of IgG4 are in equilibrium with intra-chain disulfide bonds. *Mol Immunol* 38:1.
7. Bloom, J. W., M. S. Madanat, D. Marriott, T. Wong, y S. Y. Chan. 1997. Intrachain disulfide bond in the core hinge region of human IgG4. *Protein Sci* 6:407.
- 60 8. Gregory, L., K. G. Davis, B. Sheth, J. Boyd, R. Jefferis, C. Nave, y D. R. Burton. 1987. The solution conformations of the subclasses of human IgG deduced from sedimentation and small angle X-ray scattering studies. *Mol Immunol* 24:821.
9. Deng, L., D. Wylie, Y. S. Tsao, B. Larkin, M. Voloch, y W. L. Ling. 2004. Detection and quantification of the human IgG4 half-molecule, HL, from unpurified cell-culture supernatants. *Biotechnol Appl Biochem* 40:261.
- 65 10. Marcin y Zhu (2005) *Acta Pharmacol Sin.* 26:649
11. *Fundamental Immunology* Ch. 7 (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N.Y. (1989))

12. Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196, 901-917 (1987)
 13. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)
 14. Kohler et al., Nature 256, 495 (1975)
 5 15. Clackson et al., Nature 352, 624-628 (1991)
 16. Marks et al., J. Mol. Biol. 222, 581-597 (1991)
 17. Lonberg, N. et al., Nature 368, 856-859 (1994)
 18. Lonberg, N. Handbook of Experimental Pharmacology 113, 49-101 (1994)
 19. Lonberg, N. y Huszar, D., Intern. Rev. Immunol. Vol. 13 65-93 (1995)
 10 20. Harding, F. y Lonberg, N. Ann. N.Y. Acad. Sci 764 536-546 (1995)).
 21. Taylor, L. et al., Nucleic Acids Research 20, 6287-6295 (1992)
 22. Chen, J. et al., International Immunology 5, 647-656 (1993)
 23. Tuailon et al., J. Immunol. 152, 2912-2920 (1994)
 24. Taylor, L. et al., International Immunology 6, 579-591 (1994)
 15 25. Fishwild, D. et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996)
 26. Chen et al., EMBO J. 12, 821-830 (1993)
 27. Hoogenboom et al., J. Mol. Biol. 227, 381 (1991)
 28. Vaughan et al., Nature Biotech 14, 309 (1996)
 29. Hanes y Plutchau, PNAS USA 94, 4937-4942 (1997)
 20 30. Parmley y Smith, Gene 73, 305-318 (1988)
 31. Scott TIBS 17, 241-245 (1992)
 32. Cwirla et al., PNAS USA 87, 6378-6382 (1990)
 33. Russel et al., Nucl. Acids Research 21, 1081-1085 (1993),
 34. Hoogenboom et al., Immunol. Reviews 130, 43-68 (1992)
 25 35. Chiswell y McCafferty TIBTECH 10, 80-84 (1992)
 36. Merchant et al. (1998) Nature Biotech 16:677-681
 37. Sambrook, Russell et al. 2000 Molecular cloning. A laboratory manual (tercera edición), Cold Spring Harbor Laboratory Press
 38. Akkerdaas, van Ree et al. 1995 Allergy 50(3), 215-220
 30 39. de Groot et al. 1988 J. Allergy Clin. Immunol. 82, 778

La presente invención se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos que no se deberían considerar como limitantes.

35 Ejemplos

Ejemplo 1: Cebadores oligonucleótidos y amplificación por PCR

Los cebadores oligonucleótidos se sintetizaron y cuantificaron por Isogen Bioscience (Maarsen, Holanda). Se disolvieron los cebadores en H₂O hasta 100 pmol/ml y se almacenaron a -20 °C. Se hace un resumen de toda la PCR y secuenciación de los cebadores posteriormente. Para la PCR se utilizó ADN polimerasa PfuTurbo® Hotstart (Stratagene, Amsterdam, Holanda) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cada mezcla de reacción contenía 200 µM de dNTPs mezclados (Roche Diagnostics, Almere, Holanda), 6,7 pmol de ambos cebadores directo e inverso, 100 ng de ADN genómico o 1 ng de plásmido ADN y una unidad de ADN polimerasa PfuTurbo® Hotstart en tampón de reacción PCR (suministrado con polimerasa) en un volumen total de 20 µl. Las reacciones PCR se llevaron a cabo con un TGradient Thermocycler 96 (Whatman Biometra, Goettingen, Alemania) utilizando un programa de 32 ciclos: desnaturalización a 95 °C durante 2 min; 30 ciclos de 95 °C durante 30 s, un gradiente de 60-70 °C (u otra temperatura de hibridación específica) durante 30 s, y 72 °C durante 3 min; extensión final a 72 °C durante 10 min. Si fuera apropiado, las mezclas de PCR se almacenaban a 4 °C hasta su análisis o procesamiento posterior.

Ejemplo 2: Electroforesis en gel de agarosa

Se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa de acuerdo con Sambrook (37) utilizando geles de 50 ml, en 1 x tampón de Acetato Tris EDTA. Se visualizó el ADN por inclusión de bromuro de etidio en el gel y la observación bajo luz UV. Las imágenes del gel se registraron con una cámara CCD y un sistema de análisis de imagen (GeneGnome; Syngene, via Westburg B.V., Leusden, Holanda).

Ejemplo 3: Análisis y purificación de los productos PCR y digestión enzimática

Se llevó a cabo la purificación de los fragmentos PCR deseados utilizando el kit de purificación MinElute PCR (Qiagen, via Westburg, Leusden, Holanda; producto nº 28006), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN aislado se cuantificó por espectroscopia UV y se evaluó la calidad por electroforesis en gel de agarosa.

65 De manera alternativa, los productos de la PCR o la digestión se separaron por electroforesis en gel de agarosa (por ejemplo, cuando había presentes múltiples fragmentos) utilizando gel de agarosa con un 1 % de Acetato Tris EDTA.

El fragmento deseado se escindió del gel y se recuperó utilizando el kit de extracción de gel QIAEX II (Qiagen; producto n° 20051), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 4: Cuantificación de ADN por espectroscopia UV

La densidad óptica de los ácidos nucleicos se determinó utilizando un Espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Isogen Life Science, Maarssen, Holanda) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración de ADN se midió por análisis de la densidad óptica (DO) a 260 nm (una unidad $DO_{260\text{ nm}} = 50\text{ mg/ml}$). Para todas las muestras, el tampón donde se disolvieron los ácidos nucleicos se utilizó como referencia.

Ejemplo 5: Digestiones con enzimas de restricción

Se obtuvieron las enzimas de restricción y los suplementos en New England Biolabs (Beverly, MA, USA) o Fermentas (Vilnius, Lituania) y se utilizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se digirió el ADN (100 ng) con 5 unidades de enzima(s) en el tampón apropiado en un volumen final de 10 μl (los volúmenes de reacción se escalaron según era apropiado). Las digestiones se incubaron a la temperatura recomendada durante un mínimo de 60 min. Para los fragmentos que necesitaban digestiones dobles con enzimas de restricción que implicaban tampones o necesidades de temperatura incompatibles, las digestiones se llevaron a cabo secuencialmente. Si era necesario, los productos de la digestión se purificaron por electroforesis en gel de agarosa y extracción en gel.

Ejemplo 6: Ligadura de fragmentos de ADN

Se llevaron a cabo las ligaduras de fragmentos de ADN con el kit de ligadura Quick (New England Biolabs) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para cada ligadura, se mezcló el vector de ADN con aproximadamente un exceso molar de tres veces la inserción de ADN.

Ejemplo 7: Transformación de *E. coli*

El plásmido de ADN (1-5 μl de solución de ADN, típicamente 2 μl de mezcla de ligadura de ADN) se transformó en células de *E. coli* competentes One Shot DH5 α -T1R o MACH-1 T1R (Invitrogen, Breda, Holanda; producto n° 12297-016) utilizando el método de choque térmico, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Luego se colocaron en placas las células en placas de agar Luria-Bertani (LB) que contenían 50 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina. Se incubaron las placas durante 16-18 h a 37 °C hasta que las colonias bacterianas se volvieron evidentes.

Ejemplo 8: Exploración de las colonias bacterianas por PCR

Las colonias bacterianas se exploraron en cuanto a la presencia de vectores que contenían las secuencias deseadas por medio de PCR de colonias utilizando el kit HotStarTaq Master Mix (Qiagen; producto n° 203445) y los cebadores directo e inverso apropiados (Apéndice 1). Las colonias seleccionadas se rozaron con una punta de pipeta de 20 μl y se tocaron brevemente en 2 ml de LB para cultivarlas a pequeña escala, y luego se resuspendieron en la mezcla PCR. Se llevó a cabo la PCR con un TGradient Thermocycler 96 utilizando un programa de 35 ciclos: desnaturalización a 95 °C durante 15 min; 35 ciclos de 94 °C durante 20 s, 55 °C durante 30 s y 72 °C durante 2 min; seguido por una etapa final de extensión de 10 min a 72 °C. Si era apropiado, las mezclas de PCR se almacenaron a 4 °C hasta el análisis de electroforesis en gel de agarosa.

Ejemplo 9: Aislamiento del plásmido de ADN del cultivo de *E. coli*

Se aisló el plásmido de ADN de los cultivos de *E. coli* utilizando los siguientes kits de Qiagen (via Westburg, Leusden, Holanda), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la preparación en masa de plásmidos (50-150 ml de cultivo), se utilizó un Kit HiSpeed Plasmid Maxi (producto n° 12663) o un Kit HiSpeed Plasmid Midi (producto n° 12643). Para la preparación de plásmido a pequeña escala ($\pm 2\text{ ml}$ de cultivo) se utilizó un Kit Qiaprep Spin Miniprep (producto n° 27106) y el ADN se eluyó en 50 μl de tampón de elución (suministrado con el kit).

Ejemplo 10: Secuenciación de ADN

Se secuenció el plásmido de ADN utilizando procedimientos convencionales conocidos en la técnica. Las secuencias se analizaron utilizando el software Vector NTI (Informax, Oxford, RU).

Ejemplo 11: Expresión transitoria en células HEK-293F

Se obtuvieron células Freestyle™ 293-F (un subclon de HEK-293 adaptado al cultivo en un medio Freestyle en suspensión y químicamente definido, por ejemplo, HEK-293F) en Invitrogen y se transfectaron de acuerdo con el protocolo del fabricante utilizando 293fectina (Invitrogen).

Ejemplo 12: Construcción de un pTomG4; Un vector para la expresión de regiones variables de cadena pesada con la región constante IgG4 humana

Se aisló el ADN genómico de una muestra de sangre de un voluntario y se utilizó como matriz en una PCR con los cebadores IGG4gene2f e IGG4gene2r (véase la tabla posteriormente), amplificando la región constante de la cadena pesada de IgG4 genómica completa e introduciendo los sitios de restricción adecuados para la clonación en el vector de expresión mamífero pEE6.4 (Lonza Biologics). El fragmento de PCR se purificó y se clonó en pEE6.4. Para esto, el producto de PCR se digirió con HindIII y EcoRI, seguido por inactivación por calor de las enzimas de restricción y desfosforilación del fragmento del vector con fosfatasa alcalina de camarón, seguido por inactivación por calor de la fosfatasa. El fragmento de IgG4 y el vector pEE6.4HindIII/EcoRI desfosforilado se ligaron y se transformaron en células MACH1-T1^R competentes (Invitrogen). Se cultivaron tres clones en LB y se aisló el plásmido de ADN a partir de un cultivo pequeño (1,5 ml). La digestión de restricción revelaba un patrón consistente con la clonación del fragmento de IgG4 en el vector pEE6.4. El plásmido de ADN de dos clones se transformó en *E. coli* DH5 α -T1^R y el plásmido de ADN se aisló y se comprobaron las construcciones por análisis de secuencia de la inserción y se descubrió que un clon era idéntico al clon de IgG4 genómico de la base de datos Genbank, aparte de algunas diferencias menores de intrones. Estas diferencias son presumiblemente por polimorfismos o fallos de secuencia en la secuencia de Genbank. El plásmido se llamó pTomG4.

Tabla 1: secuencias de cebadores

Nombre	Secuencia de Oligos
VLexBetv1rev	AGCCACCGTACGTTTGATTTCCAGCTTGGTGCCTCC (SEQ ID NO: 1)
VLexBetv1for	GATGCAAGCTTGCCGCCACCATGGAGTCACAGATTCAGGCATTT (SEQ ID NO: 2)
VHexBetv1rev	CGATGGGCCCTTGCTGGCTGAGGAGACGGTGACTGAGGT (SEQ ID NO: 3)
VHexBetv1for	GATGCAAGCTTGCCGCCACCATGAAATGCAGCTGGGTTATCTTC (SEQ ID NO: 4)
VLexFeld1rev	AGCCACCGTACGTTTTATTTCCAACCTTTGTCCCCGA (SEQ ID NO: 5)
VLexFeld1for	GATGCAAGCTTGCCGCCACCATGGAATCACAGACTCAGGTCTC (SEQ ID NO: 6)
VHexFeld1rev	CGATGGGCCCTTGCTGGCTGCAGAGAAAGTGACCAGAGT (SEQ ID NO: 7)
VHexFeld1for	GATGCAAGCTTGCCGCCACCATGGGATGGAGCTATATCATCTC (SEQ ID NO: 8)
IGG4gene2r	TGAGAATTCGGTGGGTGCTTTATTTCCATGCT (SEQ ID NO: 9)
IGG4gene2f	GTAGAAGCTTACCATCGCGGATAGACAAGAACC (SEQ ID NO: 10)
RACEKmm1	TGTTAACTGCTCACTGGATGGTGGGA (SEQ ID NO: 11)
RACEG1mm1	TCCCTGGGCACAATTTCTTGTCACC (SEQ ID NO: 12)
ShortUPMH3	TGAAAGCTTCTAATACGACTCACTATAGGGC (SEQ ID NO: 13)
LongUPMH3	TGAAAGCTTCTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGATCAACG CAGAGT (SEQ ID NO: 14)

Ejemplo 13: Clonación de regiones variables de los anticuerpos anti-Betv1 y anti-Feld1 de ratón

Se preparó el ARN total a partir de $0,3 \times 10^5$ (Betv1) o $0,9 \times 10^5$ (Feld1) células de hibridoma de ratón (Para el Bet v 1: clon 2H8 de ref. 38 y para Fel d 1: clon 4F7 de ref. 39 con el kit RNeasy (Qiagen, Westburg, Leusden, Holanda) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Se preparó el ADN complementario de 5'-RACE (ADNc) del ARN a partir de aproximadamente 100 ng de ARN total, utilizando el kit de amplificación de ADNc SMART RACE (BD Biosciences Clontech, Mountain View, CA, USA), siguiendo el protocolo del fabricante.

Las regiones VH y VL del anticuerpo contra Betv1 y Feld1 se amplificaron por PCR. Para esto se utilizó la ADN polimerasa PfuTurbo® Hotstart (Stratagene) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cada mezcla de reacción contenía 200 μ M de dNTPs mezclados (Roche Diagnostics), 12 pmol del cebador inverso (RACEG1mm1 para la región VH y RACEKmm1 para la región VL), 7.2 pmol de mezcla UPM (Mezcla UPM: 2 μ M de polinucleótido shortUPMH3 y 0,4 μ M de polinucleótido longUPMH3), 0,6 μ l de matriz ADNc 5'RACE como se ha descrito anteriormente, y 1,5 unidades de ADN polimerasa PfuTurbo® Hotstart en tampón de reacción de PCR (suministrado con polimerasa) en un volumen total de 30 μ l.

Se llevaron a cabo las reacciones de PCR con un TGradient Thermocycler 96 (Whatman Biometra) utilizando un programa de 35 ciclos: desnaturalización a 95 °C durante 2 min; 35 ciclos de 95 °C durante 30 s, uno de 55 °C durante 30 s, y 72 °C durante 1,5 min; extensión final a 72 °C durante 10 min. Los productos de la reacción se separaron por electroforesis en gel de agarosa sobre un 1 % de gel de agarosa TAE y se tiñó con bromuro de etidio. Las bandas de tamaño correcto se cortaron de los geles y se aisló el ADN de la agarosa utilizando el kit de extracción de gel QiaexII (Qiagen).

Los fragmentos de PCR aislados del gel se sometieron a encolado A por incubación durante 10 min a 72 °C con 200 μ M de dATP y 2,5 unidades de Amplitaq (Perkin Elmer) y se purificaron utilizando columnas de minielución (Qiagen). Los fragmentos de PCR con cola A se clonaron en el vector pGEMTeasy (Promega) utilizando el kit pGEMT easy vector system (Promega), siguiendo el protocolo del fabricante. Se transformaron 2 μ l de la mezcla de ligadura en *E.*

coli OneShot DH5 α T1R competentes y se colocaron en placas con LB/Amp/IPTG/Xgal. Cuatro colonias blancas, que contenían la inserción de cada secuencia de la VH y VL se recolectaron y las inserciones se secuenciaron. Las secuencias de aminoácido deducidas de la VH y VL de Betv1 se dan en SEQ ID NO: 15 y 16 y las secuencias de aminoácidos deducidas de Feld1 se presentan en SEQ ID NO: 17 y 18.

5

Secuencia de VH Bet v 1 de (SEQ ID NO: 15):

m k c s w v i f f l m a v v t g v n s e v q l q q s g a e l v k p g a s v k l s c t a s g f n i k d t y i h w v k q r p e q g l e w v g r i d p a t g n t r
y d p k f q g k a t i t a d t s s n t a y l q l s s l t s e d t a v y y c a s f r p g y a l d y w g q g t s v t v s s

10

Secuencia de VL de Betv1 (SEQ ID NO: 16):

m e s q i q a f v f v l w l s g v d g d i v m t q s h k f m s t s v g d r v s f t c k a s q d v f t a v a w y q q k p g q s p k l i y w a s t r t g v p
d r f t g s g s g t d y l t i s s v q a e d l a i y c q q h f s t p p t f g g g t k l e i k

15

Secuencia de VH de Feld1 (SEQ ID NO: 17) :

m g w s y i i l f v a t a t d v h s q v q l q q p g a e l v k p g a s v k l s c k a s g y s f t s y w m h w k q r p g q g l e w i g e i n p n n g r t y
y n e k f k t k a t l t v d k s s t a y m q l n s l t s e d s a v y y c a r r l t m v e s f a y w g q g t l v t f s a

Secuencia de VL de Feld1 (SEQ ID NO: 18):

m e s q t q v l m s l l f w v s g t c g d i v m t q s p s s l t v t a g e k v t m s c k s s q l l n s g n q k n y l t w y q q k p g q p p k l i y w a s
t r e s g v p d r f t g s g s g t d f s l t i s s v q a e d l a i y c q n d y s y p f t f g s g t k l e i k

20

Ejemplo 14: Construcción de pConG1fBetv1: Un vector para la producción de la cadena pesada de IgG1-Betv1

25 La región codificante de V_H del anticuerpo anti-Betv1 de ratón se amplificó por PCR a partir de un plásmido que contenía esta región (ejemplo 13) utilizando los cebadores VHexBetv1for y VHexBetv1rev, introduciendo los sitios de restricción adecuados para clonarlo en pConG1f0.4 y una secuencia Kozak ideal. El fragmento V_H se purificó en gel y se clonó en pConG1f0.4. Para esto, el producto de la PCR y el vector pConG1f0.4 se digirieron con HindIII y Apal y se purificaron. El fragmento VH se purificó en gel y se clonó en pConG1f0.4. Para esto el producto de la PCR y el
30 vector pConKappa0.4 se digirieron con HindIII y Apal y se purificaron. El fragmento de V_H y el vector digerido pConG1f0.4HindIII-Apal se ligaron y transformaron en células DH5 α -T1^R competentes. Se seleccionó un clon que contenía la inserción de tamaño correcto y se confirmó la secuencia correcta. Este plásmido se llamó pConG1fBetv1.

35 **Ejemplo 15: Construcción de pConKBet v 1: Un vector para la producción de la cadena ligera de Bet v 1**

[00142] La región codificante de VL del anticuerpo anti-Betv1 de ratón se amplificó a partir de un plásmido que contenía esta región (ejemplo 13) utilizando los cebadores VLexBetv1for y VLexBetv1rev, introduciendo los sitios de restricción adecuados para clonarlo en pConK0.4 y una secuencia Kozak ideal. El producto de la PCR y el vector
40 pConKappa0.4 se digirieron con HindIII y BsiWI y se purificó. El fragmento de VH y el vector digerido pConKappa0.4HindIII-BsiWI se ligaron y transformaron en células de *E. coli* DH5 α -T1R competentes. Se seleccionó un clon que contenía la inserción de tamaño correcto y se confirmó la secuencia. Este plásmido se llamó pConKfBetv1.

45 **Ejemplo 16: Construcción de pTomG4Betv1: Un vector para la producción de la cadena pesada de IgG4-Betv1**

Para construir un vector para la expresión de IgG4-Betv1, la región VH de Betv1 se clonó en pTomG4. Para esto, el pTomG4 y el pConG1fBetv1 se digirieron con HindIII y Apal y se aislaron los fragmentos relevantes. El fragmento V_H
50 Betv1 y el vector pTomG4HindIII-Apal digeridos se ligaron y transformaron en células DH5 α -T1^R. Se seleccionó un clon que contenía la inserción de tamaño correcto y se confirmó la secuencia. Este plásmido se llamó pTomG4Betv1.

55 **Ejemplo 17. Construcción de pConG1fFeld1: Un vector para la producción de la cadena pesada de IgG1Feld 1**

La región codificante V_H del anticuerpo anti-Feld1 de ratón se amplificó por PCR a partir de un plásmido que contenía esta región (ejemplo 13) utilizando los cebadores VHexFeld1for y VHexFeld1rev, introduciendo los sitios de

restricción adecuados para clonación en pConG1f0.4 y una secuencia Kozak ideal. El fragmento VH se purificó en gel y se clonó en pConG1F0.4. Para esto el producto PCR y el vector pConKappa0.4 se digirieron con HindIII y Apal y se purificó. El fragmento V_H y el vector pConG1f0.4HindIII-Apal digeridos se ligaron y transformaron en células DH5α-T1^R competentes. Se seleccionó un clon que contenía la inserción de tamaño correcto y se confirmó la secuencia correcta. Este plásmido se llamó pConG1fFeld1.

Ejemplo 18: Construcción de pConKFeld1: Un vector para la producción de la cadena ligera de Feld1

La región codificante de V_L del anticuerpo anti-Feld1 de ratón se amplificó de un plásmido que contenía esta región (ejemplo 13) utilizando los cebadores VLexFeld1for y VLexFeld1rev, introduciendo sitios de restricción adecuados para la clonación en pConK0.4 y una secuencia Kozak ideal. El producto de la PCR y el vector pConKappa0.4 se digirieron con HindIII y BsiWI y se purificaron. El fragmento V_L y el vector digerido pConKappa0.4HindIII-BsiWI se ligaron y se transformaron en *E. coli* DH5α-T1^R competentes. Se seleccionó un clon que contenía la inserción de tamaño correcto y se confirmó la secuencia correcta. Este plásmido se llamó pConKFeld1.

Ejemplo 19: Construcción de pTomG4Feld1: Un vector para la producción de la cadena pesada de IgG4-Feld1

Para construir un vector para la expresión de IgG4-Feld1, la región de VH se clonó en pTomG4. Para esto, el pTomG4 y pConG1fFeld1 se digirieron con HindIII y Apal y se aislaron los fragmentos relevantes. El fragmento V_H de Feld1 y el vector digerido pTomG4HindIII-Apal se ligaron y se transformaron en células DH5α-T1^R competentes. Se seleccionó un clon que contenía la inserción de tamaño correcto y se confirmó la secuencia. Este plásmido se llamó pTomG4Feld1.

Ejemplo 20: Construcción de vectores de expresión de anticuerpos para la expresión de IgG4-2F8 e IgG4-7D8

Se construyeron los vectores de expresión para la expresión de HuMab 2F8 (IgG1-EFGR) y HuMab 7D8 (IgG1-CD20). Las regiones codificantes de VH y VL de HuMab 2F8 (documento WO 02/100348) y HuMab 7D8 (documento WO 04/035607) se clonaron en el vector de expresión pConG1f (Lonza Biologics) para la producción de la cadena pesada de IgG1 y pConKappa para la producción de la cadena ligera kappa, dando lugar a los vectores pConG1f2F8, pConG1f7D8, pConKappa2F8 y pConKappa7D8. Las regiones VH de pConG1f2F8 y pConG1f7D8 se retiraron de estos vectores por digestión con HindIII/Apal y se insertaron en un vector pTomG4 digerido con HindIII/Apal, dando como resultado pTomG42F8 y pTomG47D8, respectivamente.

Ejemplo 21: Producción de IgG1-Betv1, IgG4-Betv1, IgG1-Feld1 e IgG4-Feld1 por expresión transitoria en células HEK-293F

Se produjeron anticuerpos de todas las construcciones co-transfectando los vectores de cadena pesada y cadena ligera relevantes en células HEK-293 utilizando 293fectina de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la IgG1-Betv1 se co-expresaron, pConG1Betv1 y pConKBetv1. Para la IgG4-Betv1 se co-expresaron pTomG4Betv1 y pConKBetv1. Para la IgG1-Feld1 se co-expresaron pConG1Feld1 y pConKFeld1. Para IgG4-Feld1 se co-expresaron pTomG4Feld1 y pConKFeld1. Para IgG4-EGFR se co-expresaron pTomG42F8 y pConKappa2F8. Para IgG1-CD20 se co-expresaron, pConG1f7D8 y pConKappa7D8. Para IgG4-CD20 se co-expresaron pTomG47D8 y pConKappa7D8.

Ejemplo 22: Purificación de anticuerpos IgG1 e IgG4

Los anticuerpos IgG1 e IgG4 se purificaron por cromatografía de afinidad Proteína A. Los sobrenadantes del cultivo celular se filtraron en un filtro sin salida de 0,20 μM, seguido por la carga en una columna de 5 ml Proteína A (rProtein A FF, GE Healthcare) y la elución de la IgG con 0,1 M de ácido cítrico-NaOH, pH 3. El eluido se neutralizó inmediatamente con 2 M de Tris-HCl, pH 9 y se dializó durante una noche a 12,6 mM de fosfato sódico, 140 mM de NaCl, pH 7,4 (B. Braun, Oss, Holanda). Tras la diálisis, las muestras se esterilizaron por filtración en un filtro sin salida de 0,20 μM. La concentración de las IgG purificadas se determinó por nefelometría y absorbancia a 280 nm. Las proteínas purificadas se analizaron por SDS-PAGE, IEF, espectrometría de masas y gliconálisis.

Ejemplo 23: Análisis SDS-PAGE de IgG purificadas

Tras la purificación, los anticuerpos Betv1 y Feld1, de IgG1 e IgG4 se analizaron en SDS-PAGE no reductora. El método de electroforesis Bis-Tris que se utilizó es una modificación del método de Laemmli (Laemmli 1970 Nature 227(5259): 680-5), ya que las muestras se procesaron a pH neutro. Los geles de la SDS-PAGE se tiñeron con Coomassie y se sacaron las imágenes digitales utilizando el GeneGenius (Synoptics, Cambridge, UK).

Como se puede ver en la Figura 1, la IgG1 contra Betv1 y Feld1 mostraba 1 banda principal que representaba las moléculas tetraméricas de longitud completa (2 cadenas pesadas y dos cadenas ligeras) de IgG1 contra Feld1 y Betv1. Las IgG4 contra Betv1 y Feld1 demostraban tener, además de la banda principal que representaba la

molécula tetramérica de IgG4, cantidades sustanciales de semi-moléculas (es decir, una banda de cadena pesada, una de cadena ligera).

Ejemplo 24: Evaluación del intercambio de semi-moléculas de IgG4 en ratones

Se utilizaron cinco ratones nu/nu Balb/c de 6-8 semanas de edad para seguir el intercambio de las semi-moléculas de IgG4. Los ratones se albergaron en una unidad cerrada de las instalaciones del Central Laboratory Animal (Utrecht, Holanda) y se mantuvieron en jaulas con filtro superior con suministro de agua y comida *ad libitum*. Todos los experimentos fueron aprobados por el comité de ética animal de la Universidad de Utrecht.

Se administraron anticuerpos quiméricos por vía intraperitoneal. Se recogieron muestras de sangre (75-100 µl) a las 4,25 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas tras la administración. Se recolectó la sangre en viales que contenían heparina y se centrifugaron durante 5 minutos a 10.000 g para separar el plasma de las células. El plasma se almacenó a -20 °C para la determinación de los niveles de anticuerpo específico de antígeno y de anticuerpos biespecíficos.

En este experimento se comparó el intercambio de semi-moléculas de IgG4 quimérica con el intercambio de semi-moléculas de IgG1 (n = 3). Se administraron mezclas de anticuerpos específicos para Bet v 1 y Fel d 1 (IgG1 o IgG4) a los ratones a una dosis de 600 µg (300 mg de cada anticuerpo específico de antígeno) en 200 µl por ratón.

Las concentraciones de anticuerpos de unión a Bet v 1 o Fel d 1 se midieron en el ensayo de unión al antígeno. En este punto, se incubaron las muestras de plasma con 0,75 mg de Sepharose Proteína G (Amersham Bioscience, Uppsala, Suecia) en 750 µl de PBS-IAT (PBS suplementado con 1 µg/ml de IVIg, un 0,3 % de seroalbúmina bovina, un 0,1 % de Tween-20 y un 0,05 % (p/v) de NaN₃) en presencia de Bet v 1 marcado con ¹²⁵I o Fel d 1 marcado con ¹²⁵I durante 24 h. Luego se lavó la Sepharose con PBS-T (PBS suplementado con un 0,1 % de Tween-20 y un 0,05 % (p/v) de NaN₃) y se midió la cantidad de radioactividad de unión respecto a la cantidad de radioactividad añadida. La concentración de IgG específicas de Bet v 1 o Fel d 1 se calculó utilizando anticuerpos específicos Bet v 1 o anticuerpos específicos Fel d 1 purificados como referencia (intervalo de 0-200 ng por ensayo como se determinó por el nefelómetro). La concentración de IgG biespecífica se midió en dos variantes del ensayo de entrecruzamiento heterólogo. En el primer ensayo, se incubó el plasma durante 24 h con Bet v 1 acoplado a Sepharose (0,5 mg) en un volumen total de 300 µl de PBS-IAT. Posteriormente, la Sepharose se lavó con PBS-T y se incubó durante 24 h con Fel d 1 marcado con ¹²⁵I, tras lo cual la Sepharose se lavó con PBS-T y se midió la cantidad de radioactividad unida con respecto a la cantidad de radioactividad añadida. La concentración de IgG biespecífica (Bet v 1-Fel d 1) se calculó utilizando la curva de calibración del ensayo de unión a Fel d 1, que se obtuvo de la unión de Fel d 1 a rIgG. En el segundo ensayo, se midió la actividad de entrecruzamiento Fel d 1-Bet v 1 con un procedimiento similar utilizando rFel d 1 acoplado a Sepharose (0,5 mg) y Bet v 1 marcado con ¹²⁵I. La concentración de IgG biespecífica (Fel d 1-Bet v 1) se calculó utilizando rIgG específica de Bet v 1 como referencia (la misma curva que en el ensayo de unión de Bet v 1).

En la Figura 2 la concentración de IgG biespecífica (Fel d 1-Bet v 1) se representa frente a la concentración de IgG de unión a Bet v 1 en diferentes puntos de tiempo. No se observó IgG biespecífica en los ratones a los que se dosificó con mezclas de IgG1 al contrario que en los ratones que se dosificaron con IgG4. Tras 24 h la generación de IgG4 biespecífica era máxima y se correspondía con un intercambio del 100 %.

En la Figura 3A la formación de IgG4 biespecífica humana se siguió en el tiempo. Los anticuerpos biespecíficos aparecían con el tiempo en el plasma de los ratones inyectados con mezclas de IgG4, pero no con IgG1, con una reactividad biespecífica que alcanzaba un máximo de casi el 50 % tras 1-2 días de incubación (nota: si se intercambian cantidades iguales de IgG4-Betv1 e IgG4-Feld1, un máximo del 50 % de los semi-anticuerpos IgG4-Betv se incorporarán en la fracción biespecífica tras el intercambio aleatorio y completo de semi-anticuerpos). Un intercambio de brazo Fc entre cantidades iguales e IgG4-Betv1 e IgG4-Feld1, debería ser consistente con que aproximadamente la mitad de las moléculas de IgG4 adquieran la biespecificidad. Como control se inyectó en ratones un exceso de 20 veces de una IgG4 adicional dirigida contra un antígeno irrelevante (IgG4 generada por el anticuerpo 2F8 anti-EGFR) junto con IgG4-Betv1 e IgG4-Feld1. El exceso de IgG4 irrelevante competía con la generación de IgG4 biespecífica contra Betv1-Feld1.

En otro experimento (Figura 3B) se ensayaron las mismas muestras de plasma murino en cuanto a su capacidad para entrecruzar el Fel d 1 soluble radiomarcado con el Fel d 1 inmovilizado en Sepharose. Se descubrió que la actividad de entrecruzamiento monoespecífico había disminuido en ratones que se dosificaban con una mezcla igual de IgG4 pero no con IgG1, indicando una pérdida de la actividad de entrecruzamiento monoespecífico. Se alcanzó una reducción máxima de ~ 50 % tras aproximadamente un día. En los ratones dosificados con un exceso adicional de IgG4 irrelevante, la actividad de entrecruzamiento monoespecífico casi desaparecía completamente con una cinética similar.

Se llevó a cabo una cromatografía de exclusión por tamaño para excluir la posibilidad de que la actividad biespecífica que se observa en los ratones dosificados con IgG4 era el resultado de agregación de IgG (véase la

Figura 4). Con este fin, se fraccionó una muestra de plasma (extraída en un $t = 24$ h) en una columna Superdex200, tras lo cual se midió la IgG de unión a Fel d 1 y la IgG de entrecruzamiento Bet v 1-Fel d 1 en las fracciones. Los anticuerpos de unión a Fel d 1 se eluyeron en un pico con un volumen de retención de $\sim 12,9$ ml, que se correspondía con el volumen de retención de la IgG monomérica. La actividad de entrecruzamiento Bet v 1-Fel d 1 se detectaba en las mismas fracciones indicando que la actividad biespecífica estaba asociada con la IgG monomérica. En el plasma que contenía rIgG1 no estaba presente entrecruzamiento Bet v 1-Fel d 1 antes del fraccionamiento. También en las fracciones eluidas no se pudo medir una actividad de entrecruzamiento heterólogo (datos no mostrados).

10 **Ejemplo 25: Evaluación de la actividad de intercambio en sangre completa (componentes)**

Se mezclaron anticuerpos quiméricos y posteriormente se incubaron con sangre entera, células sanguíneas, plasma o suero para investigar la actividad de intercambio de la sangre completa (componentes).

15 En este experimento se evaluó el intercambio de semi-moléculas de IgG4 en sangre completa de dos donantes de sangre sanos, A y B, en los que se determinó el nivel de IgG4 endógena en el plasma por nefelometría (siendo de 346 y 554 mg/ml, respectivamente). Se obtuvo la sangre completa en tubos Vacutainer suplementados con TFPI (Inhibidor de la ruta del factor tisular de Chiron Corporation, Emeryville, California) con una concentración final de 40 $\mu\text{g/ml}$. Las células sanguíneas y el plasma se obtuvieron por centrifugación de la sangre completa. La fracción celular se lavó 3 veces con Optitem (Invitrogen, Breda, Holanda) y posteriormente se resuspendió en Optitem. Se obtuvo el suero incubando la sangre completa en un tubo Vacutainer de cristal con un activador del coágulo durante 20 30 min a 37 °C, tras lo cual la sangre coagulada se centrifugó. El intercambio de las semi-moléculas de IgG4 se evaluó y se comparó con el intercambio de semi-moléculas de IgG1. Como control, se incubaron también las muestras de sangre en ausencia de anticuerpos quiméricos. Se prepararon las siguientes mezclas de anticuerpos en 25 PBS:

1. IgG4 específica de Bet v 1 (10 μg) e IgG4 específica de Fel d 1 (10 μg)
2. IgG1 específica de Bet v 1 (10 μg) e IgG1 Fel d 1 específica (10 μg)

30 Estas mezclas de anticuerpos se incubaron con sangre, células sanguíneas, plasma o suero en un volumen total de 100 μl (la concentración final de cada anticuerpo era de 0,1 $\mu\text{g/ml}$) en un agitador orbital horizontal (125 rpm) a 37 °C. El hematocrito final en las mezclas de incubación con sangre completa y células sanguíneas era alrededor de ~ 40 %. Tras 24 h las mezclas de incubación se centrifugaron durante 1 min a 2800 rpm en una centrífuga Eppendorf, tras lo cual se extrajo una muestra de 10 μl en 500 μl de PBS-AT (PBS suplementado con un 0,3 % de seroalbúmina bovina, un 0,1 % de Tween-20 y un 0,05 % (p/v) de NaN_3). Se almacenaron las muestras si era necesario, a 4 °C.

La actividad biespecífica (es decir, la actividad de entrecruzamiento Fel d 1-Bet v 1) se midió en el ensayo de entrecruzamiento heterólogo. En este ensayo, se incubó una muestra durante 24 h con Fel d 1 recombinante acoplado a 0,5 mg de Sepharose en un volumen total de 300 μl en PBS-IAT (PBS suplementado con 1 $\mu\text{g/ml}$ de IVIg). Posteriormente, se lavó la Sepharose con PBS-T y se incubó durante 24 h con Bet v 1 marcado con ^{125}I tras lo cual se lavó la Sepharose con PBS-T y se midió la cantidad de radioactividad unida con respecto a la cantidad de radioactividad añadida.

En la Figura 5 se representa la actividad biespecífica como el porcentaje de unión a Bet v 1 marcado con ^{125}I , el cual se determinó por el ensayo de entrecruzamiento heterólogo. La actividad biespecífica es una medida del intercambio de semi-moléculas de IgG4, lo cual se observaba primariamente en sangre entera y en la fracción celular de sangre entera (Fig. 5a). Los niveles biespecíficos en la fracción celular eran incluso más altos que en sangre entera. Esto se explica más probablemente por el hecho de que en la fracción celular no está presente la IgG4 endógena, que también se intercambiaría con los anticuerpos IgG4 quiméricos añadidos. Se observó algo de actividad biespecífica también en el plasma y el suero, pero esta actividad era mucho menor que la que se observaba en la sangre completa y solo ligeramente más alta que el nivel de fondo, siendo del 1,7 %, lo cual se obtenía incubando la mezcla de IgG4 en Optitem. No se observó ninguna actividad biespecífica en ninguna de las incubaciones que contenían IgG1 (Fig. 5b). Tampoco se observó actividad biespecífica en las incubaciones de control sin anticuerpos quiméricos (Fig. 5c). Se llevó a cabo una cromatografía de exclusión por tamaño para excluir la posibilidad de que se observara actividad biespecífica en la mezcla de IgG4 como resultado de agregación de IgG. Para este fin, se fraccionó una muestra (extraída a un $t = 24$ h) en una columna Superdex200, tras lo cual se midieron en las fracciones la IgG de unión a Fel d 1 y el entrecruzamiento IgG Bet v 1-Fel d 1. Los anticuerpos de unión a Fel d 1 eluidos en un pico con un volumen de retención de $\sim 12,9$ ml, se correspondía con el volumen de retención de la IgG monomérica. La actividad de entrecruzamiento heterólogo Bet v 1-Fel d 1 se detectó en las mismas fracciones indicando que la actividad biespecífica se asociaba con la IgG monomérica (datos no mostrados).

65 **Ejemplo 26: Evaluación de la actividad de intercambio de IgG4 mediado por células sanguíneas**

Se mezclaron anticuerpos quiméricos y posteriormente se incubaron con tres tipos diferentes de células sanguíneas humanas (es decir, células mononucleares (MNC), eritrocitos y plaquetas) para investigar la actividad de intercambio de IgG4.

Se extrajo sangre completa de donantes anónimos en un tubo Vacutainer que contenía heparina y posteriormente se centrifugó en Percoll (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia) para aislar las MNC. Las MNC aisladas se resuspendieron en medio de cultivo Optimem libre de suero (Invitrogen, Breda, Holanda) antes de su uso. Se obtuvieron eritrocitos y plaquetas recién purificados de dos donantes anónimos (proporcionados por el Blood Cell Research Department of Sanquin). Estas células se suspendieron también en Optimem antes de lavarlos 3 veces. Además, las plaquetas se suplementaron con 10 mM de glucosa.

El intercambio de semi-moléculas de IgG4 se evaluó y comparó con el intercambio de las semi-moléculas de IgG1. Se prepararon las siguientes mezclas de anticuerpos en PBS:

- IgG4 específica de Bet v 1 (10 µg) e IgG4 específica de Fel d 1 (10 µg)
- IgG1 específica de Bet v 1 (10 µg) e IgG1 Fel d 1 específica (10 µg)

Estas mezclas de anticuerpo se incubaron con $1,8 \times 10^4$ MNC, $4,0 \times 10^8$ eritrocitos o $3,5 \times 10^4$ plaquetas en un volumen total de 100 µl (la concentración final para cada anticuerpo era 0,1 µg/ml) en un agitador orbital horizontal (125 rpm) a 37 °C. Después de 48 h de incubación las mezclas se centrifugaron durante 1 min a 2800 rpm en una centrífuga Eppendorf, tras lo cual se extrajo una muestra de 10 µl en 500 µl de PBS-AT (PBS suplementado con 0,3 % de seroalbúmina bovina, un 0,1 % de Tween-20 y un 0,05 % (p/v) de NaN₃). Se almacenaron las muestras, si era necesario, a 4 °C.

Se midió la actividad biespecífica (es decir la actividad de entrecruzamiento Fel d 1-Bet v 1) en el ensayo de entrecruzamiento heterólogo. En este ensayo se incubó una muestra incubada durante 24 h de Fel d 1 recombinante acoplado a 0,5 mg de Sepharose en un volumen total de 300 µl en PBS-IAT (PBS-AT suplementado con 1 µg/ml de IVIg). Posteriormente, se lavó la Sepharose con PBS-T y se incubó durante 24 h con Bet v 1 marcado con ¹²⁵I, tras lo cual la Sepharose se lavó con PBS-T y se midió la cantidad de radioactividad unida con respecto a la radioactividad añadida.

En la Figura 6 se muestra la actividad biespecífica como un porcentaje de Bet v 1 marcado con ¹²⁵I unido, que se determinó en el ensayo de entrecruzamiento heterólogo. Los tres tipos celulares eran capaces de inducir actividad biespecífica. También se observó actividad biespecífica en medio Optimem libre de suero, pero esta actividad era mucho menor que la observada en presencia de células sanguíneas. Ninguna de las células ensayadas era capaz de intercambiar semi-moléculas de IgG1.

Ejemplo 27: Evaluación del intercambio de IgG4 por líneas celulares humanas y murinas

Se mezclaron anticuerpos IgG4 quiméricos y posteriormente se incubaron con tres líneas celulares diferentes (es decir, células renales embrionarias humanas (HEK), células B murinas o hibridomas) para investigar la actividad de intercambio IgG4.

Se escogió la línea celular J588 (proporcionada por el Antigen Presentation Research Group of Sanquin) como fuente de células B murinas. Los hibridomas que producen un inhibidor anti-esterasa C1, se obtuvieron en el Autoimmune Research Group of Sanquin. Las células HEK (293F) en suspensión eran de Invitrogen, Breda, Holanda. Todas las células se lavaron tres veces con PBS, tras lo cual se resuspendieron las células en PBS.

Se evaluó el intercambio de semi-moléculas de IgG4 incubando una mezcla de anticuerpos IgG4 que consistía en IgG4 específica de Bet v 1 (2 µg) e IgG4 específica de Fel d 1 (2 µg) con las células mencionadas anteriormente. La mezcla de anticuerpos se incubó con 24×10^5 de células HEK, 25×10^5 de células B murinas o 21×10^5 de hibridomas en un volumen total de 50 µl (la concentración final para cada anticuerpo era de 80 µg/ml) en un agitador orbital horizontal (125 rpm) a 37 °C. Después de 0 h y 24 h las mezclas de incubación se centrifugaron durante 1 min a 2800 rpm en una centrífuga Eppendorf, tras lo cual se extrajo una muestra en PBS-AT (PBS suplementado con un 0,3 % de seroalbúmina bovina, un 0,1 % de Tween-20 y un 0,05 % (p/v) de NaN₃). Las muestras se almacenaron, si era necesario, a 4 °C.

Se midió la actividad biespecífica (es decir la actividad de entrecruzamiento Fel d 1-Bet v 1) en el ensayo de entrecruzamiento heterólogo. En este ensayo, las diluciones de la muestra se incubaron durante 24 h con Fel d 1 recombinante acoplado a 0,5 mg de Sepharose en un volumen total de 300 µl en PBS-IAT (PBS-AT suplementado con 1 µg/ml de IVIg). Posteriormente, se lavó la Sepharose con PBS-T y se incubó durante 24 h con Bet v 1 marcado con ¹²⁵I, tras lo cual la Sepharose se lavó con PBS-T y se midió la cantidad de radioactividad unida con respecto a la radioactividad añadida.

En la Figura 7 se muestra la actividad biespecífica como el porcentaje de unión de Bet v 1 marcado con ¹²⁵I, que se determinó en el ensayo de entrecruzamiento heterólogo. Los tres tipos celulares eran capaces de intercambiar semi-moléculas de IgG4.

Ejemplo 28: Evaluación de intercambio de semi-moléculas de IgG4 por eritrocitos

Se mezclaron anticuerpos quiméricos y posteriormente se incubaron con eritrocitos humanos para investigar el intercambio de semi-moléculas de IgG4. Se purificaron los eritrocitos de un único donante y se almacenaron a 4 °C en tampón SAGM (Solución salina de Adenina Glucosa Manitol). Antes de utilizar las células se lavaron tres veces con PBS.

En este experimento se comparó el intercambio de semi-moléculas de IgG4 con el intercambio de IgG1. También, se evaluó el intercambio de IgG4 en presencia de un exceso de IgG4 irrelevante. Se prepararon las siguientes mezclas de anticuerpos en PBS:

- IgG4 específica de Bet v 1 (4 µg) e IgG4 específica de Fel d 1 (4 µg)
- IgG1 específica de Bet v 1 (4 µg) e IgG1 específica de Fel d 1 (4 µg)
- IgG4 específica de Bet v 1 (4 µg), IgG4 específica de Fel d 1 (4 µg) e IgG4 irrelevante específica para un antígeno X (80 µg)

Estas mezclas se incubaron con eritrocitos en PBS suplementado con un 0,05 % (p/v) de NaN₃ en un volumen total de 100 µl (el hematocrito final estaba alrededor de ~40 %) y posteriormente se incubaron en un agitador orbital horizontal (125 rpm) a 37 °C. En los puntos de tiempo indicados los eritrocitos se centrifugaron durante 1 min a 2800 rpm en una centrifuga Eppendorf, tras lo cual se extrajo una muestra de 10 µl en 500 µl de PBS-AT (PBS suplementado con un 0,3 % de seroalbúmina bovina, un 0,1 % de Tween-20 y un 0,05 % (p/v) de NaN₃). Las muestras se almacenaron a 4 °C antes de medir la actividad biespecífica, la bivalencia y la unión al antígeno. Como control se incubaron también las mismas mezclas en PBS sin eritrocitos.

Se midieron los niveles de anticuerpos de unión a Bet v 1 en el ensayo de unión al antígeno. En este punto, se incubaron las muestras con 0,75 mg de Sepharose Proteína G (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) en 750 µl de PBS-IAT (PBS-AT suplementado con 1 µg/ml de IVIg) en presencia de Bet v 1 marcado con ¹²⁵I durante 24 h. Luego se lavó la Sepharose con PBS-T (PBS suplementado con un 0,1 % de Tween-20 y un 0,05 % (p/v) de NaN₃) y se midió la cantidad de radioactividad unida con respecto a la radioactividad añadida. La concentración de IgG específica de Bet v 1 se calculó utilizando anticuerpos específicos de Bet v 1 purificados como referencia (intervalo 0-200 ng por ensayo como se determinó por un nefelómetro). Se midió la actividad biespecífica en los experimentos que utilizan anticuerpos específicos Bet v 1 en el ensayo de entrecruzamiento Fel d 1-Bet v 1. En este ensayo, la muestra que contenía la IgG se incubó durante 24 h con extracto de gato acoplado a Sepharose (0,5 mg) en un volumen total de 300 µl en PBS-AT. Posteriormente, la Sepharose se lavó con PBS-T y se incubó durante 24 h con Bet v 1 marcado con ¹²⁵I, tras lo cual se lavó la Sepharose con PBS-T y se midió la cantidad de radioactividad unida con respecto a radioactividad añadida. La concentración de IgG biespecífica (Feld1-Betv1) se calculó utilizando IgG1-Betv1 purificada como referencia (que se obtiene en el ensayo de unión Bet v 1 utilizando Sepharose Prot G).

En la Figura 8 se presentan los datos obtenidos del intercambio mediado por eritrocitos. No se observó intercambio de semi-moléculas de IgG1 en presencia de eritrocitos, mientras que se observaba aproximadamente el máximo intercambio de semi-moléculas de IgG4 después de 72 h (panel A) (nota: si se intercambian cantidades iguales de semi-moléculas de IgG4-Bet v 1 e IgG4-Fel d 1, como mucho el 50 % de los semi-anticuerpos IgG4-Bet v 1 se incorporarán en la fracción biespecífica después del intercambio aleatorio y completo de los semi-anticuerpos). En presencia de un exceso de IgG4 irrelevante casi no se midió intercambio de semi-moléculas de IgG4, lo que está en línea con el intercambio esperado de IgG4 específica de Bet v 1 y Fel d 1 con la IgG4 irrelevante. Se llevó a cabo una cromatografía de exclusión por tamaño para excluir la posibilidad de que la actividad biespecífica que se observó en la mezcla de IgG4 era el resultado de agregación de IgG. Con este fin se fraccionó una muestra (extraída en un t = 72 h) en una columna Superdex200, después de lo cual se midió la IgG de unión a Fel d 1 e IgG de entrecruzamiento Bet v 1-Fel d 1 en las fracciones. Los anticuerpos de unión a Fel d 1 eluidos en un pico con un volumen de retención de ~ 12,9, se corresponde con el volumen de retención de la IgG monomérica. Se detectó la actividad del entrecruzamiento Bet v 1-Fel d 1 heterólogo en las mismas fracciones indicando que la actividad biespecífica se asociaba con la IgG monomérica (datos no mostrados).

En teoría, el intercambio de las semi-moléculas de IgG4 también se asociaba con una disminución de la bivalencia. Para ensayar esto, se midió la bivalencia de las mezclas de incubación. Casi no se observaba una reducción de la bivalencia de Fel d 1 en la mezcla de IgG1, mientras se observaba una reducción de ~ 50 % en la mezcla de IgG4. Esta reducción está de acuerdo con el intercambio máximo de dos moléculas de IgG4 diferentes que se mezclan en una relación 1 a 1. Como se esperaba, la reducción de bivalencia en la mezcla de IgG4 con exceso de IgG4 irrelevante era mayor (~80 %), lo que es debido a la baja probabilidad de rehibridación de dos semi-moléculas homólogas (específicas de Bet v 1 o Fel d 1) en presencia de un exceso de semi-moléculas de IgG4 irrelevante. La fuerte reducción de la bivalencia no era el resultado de la pérdida de la unión al antígeno durante la incubación ya que la unión al antígeno solo disminuía ligeramente (~10 %) tras 72 h de incubación (datos no mostrados).

Se evaluó también el intercambio de IgG en PBS (suplementado con un 0,05 % (p/v) de NaN₃) para investigar si las semi-moléculas de IgG4 podían intercambiarse espontáneamente. La ejecución de este experimento era similar al intercambio en presencia de eritrocitos con la excepción de que no se añadían eritrocitos. No se observó intercambio

espontaneo de semi-moléculas de IgG1 o IgG4 durante la incubación en PBS a 37 °C como se demuestra en la Fig. 9A. Sin embargo, se observó algo de fondo en la mezcla de IgG4, que también estaba presente durante la incubación con eritrocitos. No se observó bivalencia durante la incubación en PBS (Figura 9B).

5 Ejemplo 29: Evaluación del intercambio de IgG4 por lisado de eritrocitos

Los anticuerpos IgG4 quiméricos se mezclaron y posteriormente se incubaron con diluciones crecientes de lisado de eritrocitos. Los eritrocitos se aislaron de un donante sano y se almacenaron a 4 °C en tampón SAGM (Solución salina de Adenina Glucosa Manitol) con un hematocrito del 60,7 %. Para obtener el lisado las células se lavaron tres veces con PBS-Azida (PBS suplementado con un 0,05 % (p/v) de NaN_3) y se resuspendieron en agua con un volumen que era dos veces mayor que el volumen del tampón de almacenamiento. Como resultado, el lisado de eritrocitos sin diluir era equivalente a un hematocrito del 30 %.

El intercambio de semi-moléculas de IgG4 se evaluó incubando una mezcla de anticuerpos IgG4 que consistía en IgG4 específica de Bet v 1 (1 μg) e IgG4 específica de Fel d 1 (1 μg) con 50 μl de lisado recién preparado (suplementado con PBS/Azida hasta un volumen total de 100 μl) a 37 °C. La concentración final de cada anticuerpo era de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. En los puntos de tiempo indicados se extrajo una muestra de la mezcla de incubación en PBS-AT (PBS suplementado con un 0,3 % de seroalbúmina bovina, un 0,1 % de Tween-20 y un 0,05 % (p/v) de NaN_3) para medir la actividad biespecífica. Las muestras se almacenaron, si era necesario, a 4 °C.

Se midió la actividad biespecífica (es decir actividad de entrecruzamiento de Bet v 1-Fel d 1 en el ensayo de entrecruzamiento heterólogo. En este ensayo, las diluciones de muestra se incubaron durante 24 h con extracto de abedul acoplado a 0,5 mg de Sepharose en un volumen total de 300 μl en PBS-IAT (PBS-AT suplementado con 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de IVIg). Posteriormente la Sepharose se lavó con PBS-T y se incubó durante 24 h con Fel d 1 marcado con ^{125}I , tras lo cual se lavó la Sepharose con PBS-T y se midió la cantidad de radioactividad unida respecto a la cantidad de radioactividad añadida. La concentración de IgG biespecífica (Bet v 1-Fel d 1) se calculó utilizando la curva de calibración del ensayo de unión Fel d 1, que se obtuvo de la rIgG contra Fel d 1 purificada.

En la Figura 10 se muestra la generación de actividad biespecífica en el tiempo como el porcentaje de Fel d 1 marcado con ^{125}I , que se determinó en el ensayo de entrecruzamiento heterólogo. Con estos datos es evidente que el lisado de eritrocitos contiene actividad de intercambio. La tasa de intercambio más alta se observó en el lisado sin diluir, mientras que diluciones mayores daban como resultado en tasas de intercambio menores. Prácticamente no se observó actividad biespecífica en la incubación de control en PBS.

Se llevó a cabo una cromatografía de exclusión por tamaño para excluir la posibilidad de que la actividad biespecífica inducida por el lisado de eritrocitos fuera el resultado de la agregación de IgG (Figura 11). Con este fin, se preparó una mezcla de incubación que consistía en 10 μg de IgG4 de unión Bet v 1, 10 μg de IgG4 de unión Fel d 1 y 50 μl de lisado de eritrocitos, que se suplementó con PBS/Azida hasta un volumen final de 100 μl . Esta mezcla se incubó a 37 °C durante 24 h, tras lo cual se fraccionaron 70 μl en una columna Superdex200. En las fracciones se midieron la IgG de unión a Bet v 1 e IgG de entrecruzamiento Bet v 1-Fel d 1. Se midieron los niveles de anticuerpos de unión a Bet v 1 en el ensayo de unión al antígeno. Las muestras se incubaron con 0,75 mg de Sepharose Proteína G (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) en 750 μl de PBS-IAT (PBS suplementado con 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de IVIg, un 0,3 % de seroalbúmina bovina, un 0,1 % de Tween-20 y un 0,05 % (p/v) de NaN_3) en presencia de Bet v 1 marcado con ^{125}I durante 24 h. Luego, se lavó la Sepharose con PBS-T (PBS suplementado con un 0,1 % de Tween-20 y un 0,05 % (p/v) de NaN_3) y se midió la cantidad de radioactividad unida con respecto a la radioactividad añadida. La concentración de IgG específica de Bet v 1 se calculó utilizando anticuerpos específicos de Bet v 1 purificados como referencia (intervalo de 0-200 ng por ensayo como se determinó con un nefelómetro). La concentración de IgG biespecífica (es decir, la actividad de entrecruzamiento Fel d 1-Bet v 1) se midió en el ensayo de entrecruzamiento heterólogo. En este ensayo, se incubó una muestra durante 24 h con extracto de gato acoplado a 0,5 mg de Sepharose, donde estaba presente el antígeno Fel d 1, con un volumen de 300 μl en PBS-IAT. Posteriormente, la Sepharose se lavó con PBS-T y se incubó durante 24 h con Bet v 1 marcado con ^{125}I , tras lo cual se lavó la Sepharose con PBS-T y se midió la cantidad de radioactividad unida con respecto a la radioactividad añadida. La concentración de IgG biespecífica (Fel d 1-Bet v 1) se calculó utilizando la misma curva de calibración que se utilizó en el ensayo de unión de Bet v 1, que se obtuvo de la rIgG de unión a Bet v 1.

Los anticuerpos de unión a Bet v 1 se eluyeron en un pico con un volumen de retención de ~12,6 ml, que corresponde con el volumen de retención de la IgG monomérica (Fig. 11). Se detectó la actividad de entrecruzamiento Fel d 1-Bet v 1 heterólogo en las mismas fracciones indicando que la actividad biespecífica estaba asociada con la IgG monomérica.

60 Ejemplo 30: Evaluación de la actividad de intercambio de IgG4 en lisado de eritrocitos dializado

Se aislaron los eritrocitos de un donante sano y se almacenaron a 4 °C en tampón SAGM (Solución salina Adenina Glucosa Manitol) con un hematocrito del 60,7 %. Para obtener el lisado las células se lavaron tres veces con PBS-Azida (PBS suplementado con un 0,05 % (p/v) de NaN_3) y se resuspendieron en agua con un volumen que era dos veces mayor que el volumen del tampón de almacenamiento. Por lo tanto, el lisado de eritrocitos no diluido era

equivalente a un hematocrito del 30 %. Parte del lisado se dializó contra PBS-Azida utilizando un casete de membrana de diálisis de Pierce (corte de 3,5 kD). Se obtuvo el ultrafiltrado por centrifugación del lisado no dializado en un filtro Amicon (corte de 3,5 kD).

- 5 El intercambio de semi-moléculas de IgG4 se evaluó incubando una mezcla de anticuerpos IgG4 (IgG4 específica de Bet v 1 (0,5 µg) e IgG4 específica de Fel d 1 (0,5 µg)) con un lisado de eritrocitos recién preparado (25 µl) o lisado dializado (25 µl) a 37 °C. El volumen total de cada incubación era de 50 µl lo que resultaba en una concentración final de 10 µg/ml para cada anticuerpo. Se utilizaron los siguientes suplementos: glutatión reducido (GSH) de Sigma, Glucosa-6-fosfato (G-6-P) y NADPH (ambos de Roche). Estos compuestos se disolvieron en agua antes de su uso.
- 10 Tras 24 h de incubación se extrajo una muestra de la mezcla de incubación en PBS-AT (PBS suplementado con un 0,3 % de seroalbúmina bovina, un 0,1 % de Tween-20 y un 0,05 % (p/v) de NaN₃) para medir la actividad biespecífica. Se almacenaron las muestras, si era necesario, a 4 °C.

15 Se midió la actividad biespecífica (es decir, la actividad de entrecruzamiento Fel d 1-Bet v 1) por el ensayo de entrecruzamiento heterólogo. En este ensayo, se incubaron diluciones de la muestra durante 24 h con extracto de gato acoplado con 0,5 mg de Sepharose en un volumen total de 300 µl en PBS-IAT (PBS suplementado con 1 µg/ml de IVIg). Posteriormente, se lavó la Sepharose con PBS-T y se incubó durante 24 h con Bet v 1 marcado con ¹²⁵I, tras lo cual la Sepharose se lavó con PBS-T y se midió la cantidad de radioactividad unida con respecto a la radioactividad añadida.

20 Los niveles de intercambio se compararon con la actividad biespecífica generada por un lisado recién preparado (Tabla 2).

Tabla 2. Resumen de los factores que restauran la actividad biespecífica en lisados de eritrocitos dializados

25

Fuente de intercambio	Suplemento	Actividad de intercambio
Lisado	-	++
Lisado dializado	-	-
Lisado dializado	Ultrafiltrado	+
Lisado dializado	G-6-P, NADPH, GSH	++
Lisado dializado	G-6-P	-
Lisado dializado	NADPH	-
Lisado dializado	GSH	++

30 La actividad de intercambio del lisado de eritrocitos dializado se comparó con el lisado recién preparado. El lisado dializado se suplementó con 5 de ultrafiltrado. Las concentraciones finales de G-6-P, NADPH y GSH eran 5 mM, 0,1 mM y 0,5 mM, respectivamente.

35 A partir de estos datos es evidente que se perdía la actividad del lisado de eritrocitos tras la diálisis. La adición del ultrafiltrado restauraba el intercambio en gran parte. Este resultado sugiere que durante la diálisis se perdió un componente (<3,5 kD), que es esencial para la reacción de intercambio. Dicho componente es probable que esté implicado en el ciclo redox, debido a que la reducción de puentes disulfuro y la oxidación son necesarias para el intercambio de semi-moléculas de IgG4. Por lo tanto, se añadieron tres "co-factores" (G-6-P, NADPH y GSH) del ciclo redox al lisado dializado para investigar si estos compuestos podían restaurar la actividad de intercambio. La actividad de intercambio podía restaurarse si se suplementaban G-6-P, NADPH y GSH juntos. La incubación de lisado dializado en presencia de los factores por separado revelaba que la actividad de intercambio era restaurada por GSH, pero no por G-6-P ni NADPH.

40

Ejemplo 31: Evaluación del intercambio de semi-moléculas de IgG4 por glutatión reducido

45 Se mezclaron anticuerpos quiméricos y posteriormente se incubaron con glutatión reducido (GSH) para investigar el intercambio de semi-moléculas de IgG4. El GSH (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) se disolvió en agua antes de su uso.

50 En este experimento se evaluó el intercambio de semi-moléculas de IgG4 incubando una mezcla de anticuerpos IgG4 que consistía en IgG4 de Bet v 1 (1 µg) e IgG4 de Fel d 1 (1 µg) en PBS/Azida que contenía GSH a 37 °C. El volumen de incubación total era de 100 µl que daba un resultado de la concentración final de cada anticuerpo de 10 µg/ml. En los tiempos indicados se extrajo una muestra de la mezcla de incubación en PBS-AT (PBS suplementado con un 0,3 % de seroalbúmina bovina, un 0,1 % de Tween-20 y un 0,05 % (p/v) de NaN₃). Las muestras se almacenaron a 4 °C para medir la unión al antígeno y la actividad biespecífica.

55 Se midieron los niveles de anticuerpo de unión a Bet v 1 en el ensayo de unión al antígeno. Las muestras se incubaron con 0,75 mg de Sepharose Proteína G (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) en 750 µl de PBS-IAT (PBS suplementado con 1 µg/ml de IVIg) en presencia de Bet v 1 marcado con ¹²⁵I durante 24 h. Después, se lavó la

Sepharose con PBS-T (PBS suplementado con un 0,1 % de Tween-20 y un 0,05 % (p/v) de NaN_3) y se midió la cantidad de radioactividad unida con respecto a la radioactividad añadida. La concentración de IgG específica de Bet v 1 se calculó utilizando anticuerpos específicos de Bet v 1 como referencia (0-200 ng por ensayo según se determina con un nefelómetro). La concentración de IgG biespecífica (es decir, actividad de entrecruzamiento de Fel d 1-Bet v 1) se midió en el ensayo de entrecruzamiento heterólogo. En este ensayo, se incubó una muestra durante 24 h con extracto de gato acoplado a 0,5 mg de Sepharose, donde estaba presente el antígeno Fel d 1, con un volumen total de 300 μl en PBS-IAT. Posteriormente, la Sepharose se lavó con PBS-T y se incubó durante 24 h con Bet v 1 marcado con ^{125}I , tras lo cual la Sepharose se lavó con PBS-T y se midió la cantidad de radioactividad unida con respecto a la radioactividad añadida. La concentración de IgG biespecífica (Fel d 1-Bet v 1) se calculó utilizando la misma curva de calibración que se utiliza en el ensayo de unión a Bet v 1, que se obtuvo de la IgG de unión a Bet v 1.

En la Figura 12 se muestra el transcurso del intercambio mediado por GSH. A partir de estos datos está claro que las semi-moléculas de IgG4 se intercambian en presencia de GSH. En este experimento el intercambio óptimo se observaba entre 0,1 y 1 mM de GSH y el intercambio más alto (~90 %) se consiguió tras 24 h utilizando 0,5 mM de GSH.

Se llevó a cabo la cromatografía de exclusión por tamaño para excluir la posibilidad de que la actividad biespecífica que se observa tras el intercambio de IgG4 mediada por GSH fuera el resultado de agregación de IgG (Fig. 13). Para este fin, se incubó una mezcla de IgG4 de unión a Bet v 1 e IgG4 de unión a Fel d 1 (10 μg de cada anticuerpo) con 0,5 mM de GSH en PBS/Azida. Esta mezcla (con un volumen final de 100 μl) se incubó a 37 °C durante 24 h, tras lo cual se fraccionaron 70 μl en una columna Superdex200. En las fracciones se midieron la IgG4 de unión a Bet v 1 y el entrecruzamiento de Fel d 1-Bet v 1. Los anticuerpos de unión a Bet v 1 se eluían de un pico con un volumen de retención de ~12,6 ml, que corresponde con un volumen de retención de la IgG monomérica. La actividad de entrecruzamiento heterólogo Fel d 1-Bet v 1 se detectó en las mismas fracciones indicando que la actividad biespecífica se asociaba con la IgG monomérica. Se descubrió que la generación de moléculas de IgG4 biespecíficas en presencia de GSH que era dependiente de la temperatura, ya que el intercambio se producía más eficazmente a 37 °C que a 4 °C (Fig. 14).

30 **Ejemplo 32: Generación de una IgG biespecífica en presencia de otros agentes**

Se mezclaron IgG1-Bet v 1 e IgG1-Fel d 1 o IgG4-Bet v 1 e IgG4-Fel d 1 con una concentración final de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ por anticuerpo y se incubaron con agentes reductores en un volumen total de 50 μl . Aparte del GSH se ensayaron los siguientes agentes (concentración final en la mezcla de incubación): la L-cisteína era de Sigma (100 μM), ditioneitol (DTT) era de Biorad (50 μM), β -mercapto-etanol (BME) era de Biorad (100 μM) y glutatión oxidado (GSSG, nótese que en el panel de agentes este agente no es reductor, mientras que los otros sí) era de Sigma (100 μM). Las mezclas se incubaron a 37 °C durante 24 h y se extrajeron muestras en PBS/AT, en las que se midieron las concentraciones de IgG (bi)específicas. La Figura 15 muestra que la adición de GSH u otros agentes reductores (pero no GSSG) a una mezcla de IgG4-Bet v 1 e IgG4-Fel d 1 purificados era suficiente para inducir el intercambio de brazo Fab y la generación de IgG4 biespecífica. Por el contrario, se inducía una reactividad no biespecífica en la mezcla de IgG1 de control.

Ejemplo 33: Intercambio de anticuerpo IgG4 humanos completos utilizando GSH

45 Se mezclaron IgG1-CD20, IgG4-CD20, IgG1-EGFr e IgG4-EGFr y se incubaron con GSH en un volumen total de 1 ml. La concentración final de cada anticuerpo era de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$; la concentración final de GSH era 0,5 mM. La mezcla se incubó a 37 °C durante 24 h y se extrajeron muestras en PBS-AT, en las que se midieron las concentraciones de IgG (bi)específica.

50 Se determinó la actividad biespecífica utilizando un ELISA sándwich. Para este ensayo se revistió durante una noche una placa de ELISA (Greiner bio-one, Frickenhausen, Alemania) con 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (100 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$) de dominio extracelular recombinante de EFGR en PBS a 4 °C. La placa se lavó 3 veces con PBS/0,05 % Tween-20 (PBT). Las muestras se diluyeron en PBT/0,2 % de BSA (PBTB) y se transfirieron a la placa de ELISA (100 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$). Tras la incubación en un agitador de placas (300 rpm) durante 90 minutos a temperatura ambiente (TA), se desecharon las muestras y se lavó la placa 3 veces con PBT. Luego, se añadieron 100 μl del anticuerpo monoclonal anti-idiotípico de ratón 2F2 SAB1.1 (dirigido contra el anticuerpo 7D8 anti-CD20, Genmab) a 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en PBTB y se incubó a TA durante 90 minutos en un agitador de placas (300 rpm). Se desechó el anticuerpo anti-idiotípico y se lavó la placa 3 veces con PBT, seguido por la adición de 100 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$ de una IgG anti ratón de cabra conjugada con HRP (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Westgrove, PA, USA) con una dilución 1000x en PBTB y la incubación a TA durante 90 minutos en un agitador de placas (300 rpm). El anticuerpo de detección se desechó y se lavó la placa 3 veces con PBT. Se disolvió un comprimido de 50 mg de ABTS (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) en tampón ABTS (Roche) y se añadió a la placa de ELISA (100 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$). La placa de ELISA se incubó durante 30 min (o más tiempo si se desea) a TA en un agitador de placas (300 rpm) cubierta con una hoja de aluminio y se detuvo la reacción con 100 μl de ácido oxálico (Riedel de Haen Seelze, Alemania) por pocillo. La placa de ELISA se dejó a TA durante 10 minutos antes de leer la absorbancia a 405 nm en un lector de placas ELISA.

La Figura 16A muestra que los anticuerpos anti-EGFR/CD20 biespecíficos que se forman en el tiempo de incubación de la mezcla de IgG4-EGFr e IgG4-CD20 en presencia de GSH, pero no en su ausencia. El intercambio de brazo Fab no se producía en una mezcla de anticuerpos IgG1, ni en presencia ni en ausencia de GSH.

5 Para explorar el rango dinámico del intercambio de semi-moléculas de IgG4 mediado por GSH, se utilizó una curva de GSH de concentración completa (0,5-1.000 μ M) para analizar el intercambio. Se mezclaron IgG4-CD20 e IgG4-EGFr y se incubaron con GSH en un volumen total de 1 ml. La concentración final de cada anticuerpo era 50 μ g/ml; la concentración final de GSH era como se indica en la Figura 16B. Las mezclas se incubaron a 37 °C durante 24 h y se extrajeron muestras en PBS-AT, en las que se midieron las concentraciones de IgG (bi)específica.

10 La Figura 16B muestra una clara dependencia del intercambio de semi-moléculas de IgG4 a la dosis de GSH. Para explorar cómo influían los componentes de la reacción en el intercambio de semi-moléculas de IgG4 mediado por GSH, se ensayó el intercambio en PBS y en un medio definido químicamente, libre de suero y proteínas (medio de expresión FreeStyle 293, GIBCO/Invitrogen Corporation). Se descubrió que en este medio tisular, se produce el intercambio mediado por GSH a concentraciones bajas de GSH (Figura 16C). También se descubrió que hay un intercambio de semi-moléculas de IgG4 mediado por GSH óptimo, ya que la incubación con 5 mM de GSH daba como resultado claramente un menor intercambio que con 0,5 mM (Figura 16D).

20 Se incubó una mezcla de IgG4-EGFr e IgG4-CD20 durante 24 h en ausencia o presencia de GSH y se evaluó por espectrometría de masas (ESI-TOF MS). Se desglucosilaron muestras de cincuenta μ l que contenían 200 μ g/ml de cada anticuerpo durante una noche con 1 μ l de N-glicosidasa F (Roche Diagnostics NL BV, Amere, Holanda). Las muestras se desalaron en un Acquity UPLC™ (Waters, Milford, USA) con una columna BEHC8, 1,7 μ m, 2,1 x 50 mm a 60 °C. Se inyectaron cinco μ l y se eluyó con un gradiente del 5 % al 95 % de eluyente B. El eluyente A era agua MilliQ (aparato Millipore Synthesis A10) y el eluyente B era acetonitrilo de calidad para LC-MS (Biosolve, Valkenswaard, Holanda). Ambos diluyentes contenían un 0,05 % de ácido fórmico como modificador orgánico (Fluka Riedel-de Haën, Buchs, Alemania). Los espectros de ionización por electropulverizador con tiempo de vuelo se registraron en línea en un espectrofotómetro de masas micrOTOF™ (Bruker, Bremen, Alemania) operando en modo de ion positivo. En cada análisis, se calibró internamente una escala de 500-5000 m/z con una mezcla de sintonización ES (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). El espectro de masas se desenrolló utilizando el algoritmo de Entropía Máxima, que se proporciona con el software DataAnalysis™ v. 3.3 (Bruker).

35 La Figura 16E muestra que los pesos moleculares de IgG4-CD20 (145,5 kD) e IgG4-EGFR (145,9 kD) se mantenían sin cambios en ausencia de GSH. En presencia de GSH (Fig. 16F), sin embargo, aparecía un nuevo pico con una masa correspondiente a una molécula de intercambio de brazo Fab (145,7 kD). La nueva masa correspondía con la masa esperada del anticuerpo anti-EGFR/CD20 biespecífico. Además, a partir de las alturas de los picos del espectro de la MS se podía estimar que el anticuerpo biespecífico representaba el 50 % del total de masas de anticuerpos en la mezcla indicando un intercambio aleatorio que alcanzaba su equilibrio en 24 horas.

40 **Ejemplo 34. Inmunoglobulinas policlonales de mono Rhesus (y otras especies) que participan en el intercambio del brazo Fab de anticuerpos IgG4 recombinantes humanos**

Se incubaron mezclas de dos anticuerpos IgG4 recombinantes humanos (IgG4-CD20 e IgG4-EGFr, como se ha descrito anteriormente) con GSH durante 24 h a 37 °C, en presencia o ausencia de inmunoglobulinas purificadas de monos Rhesus (6x), chimpancés (2x), monos cynomolgus, babuinos, caballos y cerdos o IVIg humana. Se midió la formación de anticuerpos biespecíficos por medio de intercambio del brazo Fab en un ELISA sándwich como se ha descrito anteriormente. Adicionalmente, se ensayaron inmunoglobulinas de cabra, conejo y oveja en este ensayo.

50 La Figura 17a muestra una comparación de las inmunoglobulinas policlonales de mono Rhesus con las inmunoglobulinas policlonales humanas (IVIg) en cuanto a su capacidad para inhibir el intercambio de los brazos Fab de los anticuerpos recombinantes *in vitro* en presencia de glutatión reducido. Esto significa que un componente de la inmunoglobulina de Rhesus, participa en el intercambio de brazo Fab. La inmunoglobulina de Rhesus, presumiblemente la IgG4 de Rhesus, puede intercambiar el brazo Fab con la IgG4 recombinante humana.

55 La Figura 17b muestra que las inmunoglobulinas policlonales de varios otros monos Rhesus inhiben el intercambio de los brazos Fab de los anticuerpos recombinantes *in vitro* en presencia de glutatión reducido con diferentes potencias. Esto significa que el componente de la inmunoglobulina de Rhesus que participa en el intercambio del brazo Fab, está presente con diferentes concentraciones o que el componente no está presente en todos los monos Rhesus.

60 La Figura 17c muestra que las inmunoglobulinas de otras especies de monos (babuino, chimpancé, cynomolgus) así como las inmunoglobulinas de caballo y cerdo inhiben el intercambio de los brazos Fab de los anticuerpos recombinantes *in vitro* en presencia de glutatión reducido con diferentes potencias. Esto significa que el componente que participa en el intercambio del brazo Fab está presente en estas especies a diferentes concentraciones. Las inmunoglobulinas de cabra, conejo y oveja no tienen efecto en el intercambio de los brazos Fab de los anticuerpos recombinantes *in vitro* en presencia de glutatión reducido (datos no mostrados).

65

Ejemplo 35. Intercambio de semi-moléculas de mutantes en la región bisagra o dominio CH3

Se produjeron tres IgG1 mutantes: una IgG1 con un centro de bisagra de IgG4 (IgG1-CPSC) y dos mutantes con un intercambio del dominio CH3 (IgG1-CH3 (IgG4) e IgG1-CPSC-CH3 (IgG4).

Se utilizó la mutagénesis dirigida al sitio para introducir una mutación P228S en la bisagra de IgG1 utilizando pEE-G1-wt a Bet v 1 como matriz (228 se refiere a la numeración EU de los restos de aminoácidos de anticuerpos. La misma posición tiene el número 241 en la numeración de Kabat, y el número 111 en SEQ ID NO: 19 (tercera posición en la secuencia central de la bisagra CPPC)). Los cebadores mutagénicos, directos e inversos, se diseñaron con el Vector NTI Advance 10:

P228S Cebador mut-F: SEQ ID NO: 22

P228S Cebador mut-R: SEQ ID NO: 23

P228S Cebador mut-F 5'-CTTgTgACAAAACCTCACACCTgCCCATCgTgCCCAggTAAgCCAg-3'

P228S Cebador mut-R 5'-CTggCTTACCTgggCACgATgggCAggTgTgAgTTTTgTCACAAg-3'

Se utilizó el kit de mutagénesis dirigida al sitio Quickchange (Stratagene) para crear el pEE-G1-CPSC mutante. La mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) consistía en 5 µl de matriz de ADN pEE-G1 a Bet v 1 (~35 ng), 1,5 µl de cebador directo mutagénico (~150 ng), 1 µl de mezcla dNTP, 5 µl de tampón de reacción (10x), 36 µl de H₂O y finalmente un µl de ADN polimerasa Pfu Turbo. Entonces la mezcla se aplicó a la PCR: 30" a 95 °C, 30" a 95 °C (desnaturalización), 1' a 55 °C (hibridación) y 17 minutos a 68 °C (elongación). Este ciclo se repitió 20 veces.

Se utilizó digestión de ADN y ligadura para crear las construcciones mutantes de intercambio del dominio CH3 IgG1-CH3 (IgG4) e IgG1-CPSC-CH3 (IgG4). Las reacciones de digestión para obtener dominios CH3 y vectores sin dominios CH3 eran las siguientes: ~ 1500 ng de ADN (pEE-G1-Bet v 1, pEE-G1-CPSC y pEE-G4-Bet v 1), 2 µl de BSA, 2 µl de tampón Neb3, 1 µl Sall y H₂O añadidos a un volumen de 20 µl. Se incubó a 37 °C durante 30'. Se sometieron los fragmentos a electroforesis en gel sobre geles de un 1 % de agarosa con bromuro de etidio. SE cortaron los fragmentos del gel bajo luz ultravioleta y se disolvieron utilizando el kit de purificación de ADN (Amersham). El fragmento pEE-G4-wt Sall/SanDI (que contenía el dominio IgG4) se ligó en pEE-G1-wt y pEE-G1-CPSC utilizando el siguiente procedimiento: 1 µl de matriz ADN (pEE-G1-wt y pEE-G1-CPSC digeridos con Sall/SanDI), 5 µl de inserción Sall/SanDI, 4 µl de tampón Ligate-it, 9 µl de H₂O y 1 µl de ligasa en un volumen total de 20 µl. La ligadura se detuvo tras 5'.

La digestión de ADN (utilizando Apal e HindIII) y la ligadura se utilizó para sustituir el dominio VH de los anticuerpos mutantes Bet v 1 con los del pEE-G4-a-Fel d 1 wt, siguiendo el procedimiento anterior.

También se produjo un mutante IgG4: IgG4-S228Pnew. En este mutante se estabilizó la bisagra sustituyendo la serina en la posición 228 (posición 111 en SEQ ID NO: 19) por una prolina (centro de la bisagra de IgG1). Se llevó a cabo la mutagénesis dirigida al sitio utilizando el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuickChange II XL (Stratagene, Amsterdam, Holanda) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este método incluye la introducción de un sitio *Xma*I extra para seleccionar la mutagénesis satisfactoria. En resumen, 5 µl de 10x tampón de reacción, 1 µl de oligonucleótido S228Pcorrect (100 pmol/µl), 1 µl de oligonucleótido S228Prorrect (100 pmol/µl), 1 µl de mezcla dNTP, 3 ml de Quicksolution, 1 µl de plásmido pTomG42F8HG (50 ng/µl) (descrito en la solución PCT titulada "Recombinant monovalent antibodies and methods for production thereof", presentada el 28 de Nov de 2006 (RO/DK (Genmab)) y 1 µl de ADN polimerasa PfuUltra HF se mezclaron en un volumen total de 50 µl y se amplificó con un TGradient Thermocycler 96 (Whatman Biometra, Goettingen, Alemania; producto n° 050-801) utilizando un programa de 18 ciclos: desnaturalización a 95 °C durante 1 min; 18 ciclos de 95 °C durante 40 s, 60 °C durante 50 s, y 68 °C durante 10 min. Las mezclas de la PCR se almacenaron a 4 °C hasta su procesamiento posterior. Después, se incubaron las mezclas de la PCR con 1 µl de *Dpn*I durante 60 min a 37 °C para digerir el vector pTomG42F8HG y se almacenó a 4 °C hasta su procesamiento posterior. La mezcla de reacción se precipitó con 5 µl de NaAc 3 N y 125 µl de etanol, se incubó durante 20 minutos a -20 °C y se centrifugó durante 20 minutos a 4 °C a 14000 x g. El aglomerado de ADN se lavó con un 70 % de etanol, se secó y se disolvió en 4 µl de agua. El volumen total de reacción de 4 µl se transformó en células de *E. coli* One Shot DNH5α T1^R competentes (Invitrogen, Breda, Holanda) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Luego se colocaron las células en placas sobre agar Luria-Bertani (LB) que contenían 50 µg/ml de ampicilina. Las placas se incubaron durante 16-18 horas a 37 °C hasta que las colonias bacterianas se volvieron evidentes.

Tras la exploración por PCR de colonia y la digestión con *Xma*I (la mutagénesis resultará en la pérdida de un sitio *Xma*I), se aisló el plásmido de la bacteria y se confirmó la mutación por secuenciación de ADN. Para comprobar si no se habían introducido mutaciones extra no deseadas, se secuenció la región codificante HC completa y no contenía mutaciones adicionales. La construcción final se llamó pTomG42F8S228PNew.

Nombre	Secuencia de oligos
S228Pfcorrect (SEQ ID NO: 24)	CCCCCATGCCACCATGCCAGGTAAGCCAACCCAGGCCTCGC
S228Prcorrect (SEQ ID NO: 25)	GCGAGGCCTGGGTTGGCTTACCTGGGCATGGTGGGCATGGGGG

Los anticuerpos recombinantes de estas construcciones se expresaron transitoriamente en células HEK 293 en placas de 6 pocillos, en 3 ml (NUNC) o en matraces de Erlenmeyer de 125 ml (Corning) con 293fectina (Invitrogen) como reactivo de transfección.

5 Se incubaron las siguientes mezclas de anticuerpos no purificados (medio de expresión Freestyle 293, GIBCO/Invitrogen Corporation) con 0,1 M de GSH a 37 °C durante 24 h y se extrajeron muestras en PBS-AT, en las que se midieron las concentraciones de IgG (bi)específicas como se ha descrito en los ejemplos anteriores:

- 10 - IgG4 a-Fel d 1 ts con IgG4 a-Bet v 1 ts
 - IgG1 a-Fel d 1 ts con IgG4 a-Bet v 1 ts
 - IgG1 a-Fel d 1 CPSC con IgG1 a-Bet v 1 CPSC (indicado como IgG1 CPSC - IgG1 CPSC posteriormente)
 - IgG1 a-Fel d 1 CPSC con IgG1 a-Bet v 1 CH3 (IgG4) (IgG1 CPSC - IgG1 CH3 (IgG4))
 - IgG1 a-Fel d 1 CPSC con IgG1 a-Bet v 1 CPSC/CH3 (IgG4) (IgG1 CPSC - IgG1 CPSC/CH3 (IgG4))
 15 - IgG1 a-Fel d 1 CH3 (IgG4) con IgG1 a-Bet v 1 CH3 (IgG4) (IgG1 CH3 (IgG4) - IgG1 CH3 (IgG4))
 - IgG1 a-Fel d 1 CH3 (IgG4) con IgG1 a-Bet v 1 CPSC/CH3 (IgG4) (IgG1 CH3(IgG4) - IgG1 CPSC/CH3 (IgG4))
 - IgG1 a-Fel d 1 CPSC/CH3(IgG4) con a-Bet v 1 IgG1 CPSC/CH3(IgG4) (IgG1 CPSC/CH3(IgG4) - IgG1 CP-SC/CH3 (IgG4))
 - IgG1 a-Fel d 1 CPSC/CH3(IgG4) con IgG4 a-Bet v 1 ts (IgG1 CPSC/CH3(IgG4) - IgG4 ts)
 20 - IgG4 a-bet1 S228Pnew con IgG4 ts

Los resultados mostraban que en estas condiciones *in vitro* (0,1 mM de GSH), se produce el intercambio de semi-moléculas cuando uno de los anticuerpos contiene la bisagra CPSC y ambos anticuerpos contienen un CH3 tipo IgG4. También se produce el intercambio de semi-moléculas entre una molécula de IgG4 que contiene una bisagra
 25 de IgG1 y las moléculas IgG4 ts:

	IgG1 ts	IgG4 ts	IgG1 CH3(IgG4)	IgG1 CPSC	IgG1 CPSC/CH3(IgG4)
IgG1 ts	-	-			
IgG4 ts	-	+	+	-	+
IgG1 CH3 (IgG4)		+	-	-	±
IgG1 CPSC		-	-	-	-
IgG1 CPSC/CH3(IgG4)		+	±	-	+
IgG4 S228Pnew	-	+			
- = sin intercambio + = se produce intercambio ± = intercambio limitado (~ 5 %) Cuadrado negro = no ensayado					

Se ensayó el efecto de la concentración de GSH sobre el intercambio de semi-moléculas de diferentes mutantes utilizando 0, 0,1, 1 y 10 mM de GSH. Se ensayó el intercambio utilizando las siguientes mezclas:

- 30 - IgG4 a-Fel d 1 ts con IgG4 a-Bet v 1 ts
 - IgG1 a-Fel d 1 ts con IgG4 a-Bet v 1 ts
 - IgG1 a-Fel d 1 CPSC con IgG1 a-Bet v 1 CPSC
 - IgG1 a-Fel d 1 CH3(IgG4) con IgG1 a-Bet v 1 CH3(IgG4)
 35 - IgG1 a-Fel d 1 CPSC/CH3(IgG4) con a-Bet v 1 IgG1 CPSC/CH3(IgG4))

Para las concentraciones de GSH hasta 1 mM, los resultados (Figura 19A) confirmaban lo que se ha descrito anteriormente. A 10 mM de GSH, el intercambio de semi-moléculas se vio también en la reacción que contenía IgG1
 40 a-Fel d 1 CH3(IgG4) e IgG1 a-Bet v 1 CH3(IgG4).

Se llevó a cabo una cromatografía de exclusión por tamaño para excluir la posibilidad de que la actividad biespecífica observada tras el intercambio mediado por GSH de los mutantes de IgG1 apropiados fuera el resultado de agregación de IgG como se ha descrito en los ejemplos anteriores. La actividad de entrecruzamiento Fel d 1-Bet
 45 v 1 se detectó en las fracciones correspondientes con el volumen de retención de la IgG monomérica.

Para identificar los restos de aminoácidos del dominio CH3 responsables de la capacidad de intercambiar semi-moléculas, los restos tipo IgG4 se introdujeron en el CH3 de IgG1 en las posiciones que eran diferentes entre IgG1 e IgG4. Por lo tanto, se introdujeron las mutaciones R238Q, K292R, Q302E o P328L (con referencia a los números de SEQ ID NO: 19) en el dominio CH3 de IgG1 utilizando pEE-G1-wt a Bet v 1 o pEE-G1-wt a Fel d 1 como matriz,

básicamente como se ha descrito anteriormente. Además, se introdujo también una mutación K292R en el dominio CH3 de IgG1 CPSC utilizando el pEE-G1-CPSC Bet v 1 o pEE-G1-CPSC Fel d 1 como matriz. En resumen, se diseñaron los cebadores, directo e inverso, con el Vector NTI Advance 10. Se utilizó el kit de mutagénesis dirigida al sitio Quickchange (Stratagene) para crear las construcciones. Los anticuerpos recombinantes de estas

5 construcciones se expresaron transitoriamente en células HEK 293 en placas de 6 pocillos, de 3 ml (NUNC) o en matraces de Erlenmeyer de 125 ml (Corning) con 293fectina (Invitrogen) como reactivo de transfección. Se incubaron las siguientes mezclas de anticuerpos no purificados (medio de expresión FreeStyle 293, GIBCO/Invitrogen Corporation) con 0,5 o 5 mM de GSH a 37 °C durante 24 h y se extrajeron muestras en PBS-AT, en las que se midieron las concentraciones de IgG (bi)específicas como se ha descrito en los ejemplos anteriores:

- 10
- IgG1 a-Fel d 1 ts con IgG4 a-Bet v 1 ts (indicado como IgG1 en la Fig. 19B)
 - IgG1 a-Fel d 1 CPSC con IgG4 a-Bet v 1 ts (indicado como IgG1-CPSC en la Fig. 19B)
 - IgG1 a-Fel d 1 CH3(IgG4) con IgG4 a-Bet v 1 ts (indicado como IgG1-CH3(G4) en la Fig. 19B)
 - IgG1 a-Fel d 1 CPSC/CH3(IgG4) con IgG4 a-Bet v 1 ts (indicado como IgG1-CPSC/CH3(G4) en la Fig. 19B)
 - 15 - IgG1 a-Fel d 1 R238Q con IgG4 a-Bet v 1 ts (indicado como IgG1-R238Q en la Fig. 19B)
 - IgG1 a-Fel d 1 K292R con IgG4 a-Bet v 1 ts (indicado como IgG1-K292R en la Fig. 19B)
 - IgG1 a-Fel d 1 Q302E con IgG4 a-Bet v 1 ts (indicado como IgG1-Q302E en la Fig. 19B)
 - IgG1 a-Fel d 1 P328L con IgG4 a-Bet v 1 ts (indicado como IgG1-P328L en la Fig. 19B)
 - IgG1 a-Fel d 1 CPSC/K292R con IgG4 a-Bet v 1 ts (indicado como IgG1-CPSC/K292R en la Fig. 19B)
 - 20 - IgG4 a-Fel d 1 ts con IgG4 a-Bet v 1 ts (indicado como IgG4 en la Fig. 19B)

 - IgG1 a-Fel d 1 ts con IgG1 a-Bet v 1 ts (indicado como IgG1 en la Fig. 19C)
 - IgG1 a-Fel d 1 CPSC con IgG1 a-Bet v 1 CPSC (indicado como IgG1-CPSC en la Fig. 19C)
 - IgG1 a-Fel d 1 CH3(IgG4) con IgG1 a-Bet v 1 CH3(IgG4) (indicado como IgG1-CH3(G4) en la Fig. 19C)
 - 25 - IgG1 a-Fel d 1 CPSC/CH3(IgG4) con IgG1 a-Bet v 1 CPSC/CH3(IgG4) (indicado como IgG1-CPSC/CH3(G4) en la Fig. 19C)
 - IgG1 a-Fel d 1 R238Q con IgG1 a-Bet v 1 R238Q (indicado como IgG1-R238Q en la Fig. 19C)
 - IgG1 a-Fel d 1 K292R con IgG1 a-Bet v 1 K292R (indicado como IgG1-K292R en la Fig. 19C)
 - IgG1 a-Fel d 1 Q302E con IgG1 a-Bet v 1 Q302E (indicado como IgG1-Q302E en la Fig. 19C)
 - 30 - IgG1 a-Fel d 1 P328L con IgG1 a-Bet v 1 P328L (indicado como IgG1-P328L en la Fig. 19C)
 - IgG1 a-Fel d 1 CPSC/K292R con IgG1 a-Bet v 1 CPSC/K292R (indicado como IgG1-CPSC/K292R en la Fig. 19C)
 - IgG4 a-Fel d 1 ts con IgG4 a-Bet v 1 ts (indicado como IgG4 en la Fig. 19C)

35 Los resultados mostraban que en las condiciones *in vitro* ensayadas (0,5 mM y 5 mM de GSH), se produce el intercambio de semi-moléculas cuando ambos anticuerpos contiene una R en la posición 292 (Fig. 19B+C). Una R o Q en la posición 238, una Q o E en la posición 302 y una P o L en la posición 328 no tienen influencia en la incapacidad de una IgG1 para intercambiar semi-moléculas en esta preparación experimental.

40 **Ejemplo 36. Con 0,5 mM de GSH, las moléculas con el centro de bisagra tipo IgG1 estabilizado no participan en la reacción del intercambio del brazo Fab de anticuerpos IgG4 recombinantes humanos**

Se incubaron mezclas de dos anticuerpos IgG4 recombinantes humanos (IgG4-CD20 e IgG4-EGFr, como se ha descrito anteriormente) con 0,5 mM de GSH durante 24 h a 37 °C, en presencia o ausencia de un exceso (10, 50 y

45 100 microgramos/ml) de Tysabri o (10 microgramos/ml) de Mylotarg. El Tysabri es un anticuerpo IgG4 humanizado disponible en el mercado que contiene un centro de bisagra IgG4 de tipo silvestre, mientras que Mylotarg es un anticuerpo IgG4 humanizado disponible en el mercado que contiene un centro de bisagra tipo IgG1 estabilizada. La formación de anticuerpos biespecíficos por medio del intercambio del brazo Fab se midió en un ELISA sándwich como se ha descrito anteriormente.

50 La Figura 20A muestra que en presencia de un exceso de Tysabri, se inhibía el intercambio de brazos Fab de los anticuerpos recombinantes CD20 y EGFr.

La Figura 20B muestra que en presencia de un exceso de Tysabri, pero no de Mylotarg, se inhibía el intercambio de

55 brazos Fab de los anticuerpos CD20 y EGFr.

Esto indica que Tysabri, pero no Mylotarg, participa en la reacción de intercambio de brazo Fab y que un centro de bisagra tipo IgG1 no participa en el intercambio de brazo Fab en condiciones *in vitro* cuando se utilizan 0,5 mM de GSH.

60 **Ejemplo 37. Intercambio de semi-moléculas de construcciones IgG1-CPSC con mutaciones adicionales en la posición 292**

Al igual que en el Ejemplo 35, se produjeron tres mutantes de IgG1 tanto en pConG1f2F8 (específico para EGFR) y pConG1f7D8 (específico para CD20): una IgG1 con un centro de bisagra de IgG4 (IgG1-CPSC) y dos mutantes de intercambio de CH3 (IgG1-CH3(IgG4) e IgG1-CPSC-CH3 (IgG4) (es decir, construcciones en las que la región CH3

65

e IgG1 se sustituyó o la región CH3 de IgG4). Esto daba como resultado las siguientes construcciones pG1f-2F8CPSC, pG1f-7D8CPSC, pG1f-2F8-CH3(G4), pG1f-7D8-CH3(G4), pG1f-2F8CPSC-CH3(G4) y pG1f-7D8CPSC-CH3(G4).

- 5 Posteriormente, se introdujeron las mutaciones R238Q, K292R, K292Y, K292F, K292W, Q302E o P328L en el dominio CH3 de las construcciones pG1f-2F8CPSC y pG1f-7D8CPSC, básicamente como se ha descrito anteriormente. En resumen, los cebadores mutagénicos, directos e inversos, se diseñaron con el Vector NTI Advance 10. Se utilizó el kit de mutagénesis dirigida al sitio Quickchange (Stratagene) para crear las construcciones.
- 10 Se expresaron transitoriamente los anticuerpos recombinantes de estas construcciones en células HEK293 en placas de 6 pocillos, de 3 ml (NUNC) o en matraces de Erlenmeyer de 125 ml (Corning) con 293fectina (Invitrogen) como reactivo de transfección. Los sobrenadantes de los cultivos se dializaron posteriormente contra PBS y se midió la concentración por nefelometría (véase anteriormente). Se incubaron las siguientes mezclas de tampones de anticuerpos intercambiados no purificados con 0,5 mM de GSH a 37 °C durante 24 h y se extrajeron muestras de
- 15 PBS-AT, en las que se midieron las concentraciones de IgG (b)específicas como se ha descrito en los ejemplos anteriores:
- IgG1-2F8 ts con IgG1-7D8 ts (indicado como IgG1)
 - IgG1-2F8-CPSC con IgG1-7D8-CPSC (indicado como IgG1-CPSC)
 - 20 - IgG1-2F8-CH3(IgG4) con IgG1-7D8-CH3(IgG4) (indicado como IgG1-CH3(IgG4))
 - IgG1-2F8-CPSC-CH3(IgG4) con IgG1-7D8-CPSC-CH3(IgG4) (indicado como IgG1-CPSC-CH3(IgG4))
 - IgG1-2F8-CPSC-R238Q con IgG1-7D8-CPSC-R238Q (indicado como IgG1-CPSC-R238Q)
 - IgG1-2F8-CPSC-K292R con IgG1-7D8-CPSC-K292R (indicado como IgG1-CPSC-K292R)
 - IgG1-2F8-CPSC-K292Y con IgG1-7D8-CPSC-K292Y (indicado como IgG1-CPSC-K292Y)
 - 25 - IgG1-2F8-CPSC-K292F con IgG1-7D8-CPSC-K292F (indicado como IgG1-CPSC-K292F)
 - IgG1-2F8-CPSC-K292W con IgG1-7D8-CPSC-K292W (indicado como IgG1-CPSC-K292W)
 - IgG1-2F8-CPSC-Q302E con IgG1-7D8-CPSC-Q302E (indicado como IgG1-CPSC-Q302E)
 - IgG1-2F8-CPSC-P328L con IgG1-7D8-CPSC-P328L (indicado como IgG1-CPSC-P328L)
 - IgG4-2F8 ts con IgG4-7D8 ts (indicado como IgG4)
- 30

La Fig. 21 muestra que en las condiciones *in vitro* ensayadas (0,5 mM), se produce el intercambio de semi-moléculas cuando está presente una bisagra CPSC y una R en la posición 292. Adicionalmente, los resultados muestran que una Y o F en la posición 292, pero no una W, también facilita el intercambio de semi-moléculas aunque en una menor extensión. Una R o Q en la posición 238, una Q o E en la posición 302 y una P o L en la

35 posición 328 no tienen influencia en la incapacidad de una CPSC para intercambiar semi-moléculas.

Ejemplo 38. Las moléculas de IgG4 con bisagra CPPC estabilizada pueden intercambiar brazos Fab *in vitro* (con 5 mM de GSH), pero no *in vivo*

- 40 Se incubó una mezcla de IgG4-EGFR-CPPC e IgG4-CD20 durante 24 h en presencia de 5 mM de GSH y se evaluó por espectrometría de masas (ESI-TOF MS). Cincuenta µl de muestras que contenían 200 µg/ml de cada anticuerpo se desglucosilaron durante una noche con 1 µl de N-glicosidasa F (Roche Diagnostics NL BV, Almere, Holanda). Las muestras se desalaron con Acquity UPLC™ (Waters, Milford, USA) con una columna BEH C8, 1,7 µm, 2,1 x 50 mm a 60 °C. Se inyectaron cinco µl y se eluyeron con un gradiente desde el 5 % al 95 % de eluyente B. El eluyente A era
- 45 agua MilliQ (aparato Millipore Sythesis A10) y el eluyente B era acetonitrilo de calidad para LC-MS (Biosolve, Valkenswaard, Holanda). Ambos eluyentes contenían un 0,05 % de ácido fórmico como modificador orgánico (Fluka Riedel-de Haën, Buchs, Alemania). El espectro de masas de ionización por electropulverizador con tiempo de vuelo se registró en línea en un espectrómetro de masas microOTOF™ (Bruker, Bremen, Alemania) funcionando en el modo de ion positivo. En cada análisis, se calibró internamente una escala de 500-5000 m/z con la mezcla de
- 50 sintonización ES (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Los espectros de masa se desarrollaron utilizando el algoritmo de máxima entropía que se proporciona con el software DataAnalysis™ v. 3.3 (Bruker).

La Figura 22A muestra que con la presencia de 5 mM de GSH un aparecía nuevo pico con una masa intermedia que se correspondía con una molécula de intercambio del brazo Fab (145,7 KDa). La nueva masa se correspondía con

55 la masa esperada para el anticuerpo anti-EFGR/CD20 biespecífico. No apareció ningún pico biespecífico cuando no se utilizaba GSH o 0,5 mM de GSH (datos no mostrados). Esto indica que puede hacerse un mutante que contenga una bisagra CPPC tipo IgG1 y una región CH3 TIPO IgG4 para intercambiar semi-moléculas *in vitro* a concentraciones más altas de GSH (como se ha indicado también en los Ejemplos 35, 36, 37).

- 60 Para estudiar si el intercambio de un brazo Fab de un mutante con la bisagra estabilizada que contenía una bisagra CPPC tipo IgG1 y un CH3 tipo IgG4 *in vivo*, los inventores inyectaron mezclas iguales de IgG4-CD20 con IgG1-EGFR, IgG4-EGFR, IgG4-EGFR-CPPC en ratones inmunodeficientes. Se extrajeron muestras de sangre en diferentes puntos de tiempo y se cuantificaron los anticuerpos biespecíficos en ELISA (como se ha descrito anteriormente) utilizando mezclas intercambiadas *in vitro* (IgG4-EGFR/IgG4-CD20) como referencias
- 65 convencionales.

La Fig. 22B muestra que los anticuerpos biespecíficos aparecían en la sangre de ratones inyectados con mezclas que contenían moléculas IgG4 de tipo silvestre (IgG4-EGFR). Los anticuerpos biespecíficos eran indetectables en mezclas que contenían bisagra IgG4 estabilizada ((IgG4-EGFR-CPPC) o moléculas de IgG1 (IgG1-EGFR) ((no se muestran los símbolos en la figura)). Esto indica que la estabilización de la bisagra evita el intercambio del brazo Fab *in vivo*, pero no es capaz de intercambiar semi-moléculas *in vivo* (aunque los inventores no descartan que se produzca un intercambio a bajo nivel por debajo del nivel de detección (<8 % en 72 h) de IgG4 con la bisagra estabilizada).

Esto sugiere que los anticuerpos biespecíficos que contienen bisagras CPPC estabilizadas pueden obtenerse por intercambio de brazo Fab *in vitro*. Tras la purificación específica posterior, estos anticuerpos permanecerán estables (es decir, no tendrán intercambio de brazo Fab) en la inyección *in vivo*.

Ejemplo 39. Intercambio de brazo Fab en mutantes CXXC

Se ensayó la capacidad de intercambio de los brazos Fab de anticuerpos que contienen varios motivos CXXC en el centro de la bisagra. Se introdujeron los siguientes motivos CXXC en IgG4 Bet v 1 e IgG4 Fel d 1, utilizando técnicas de mutagénesis dirigida al sitio como se ha descrito anteriormente

- CGHC (secuencia de sitio activo descrito para la proteína-disulfuro-isomerasa, PDI)
- CGC (péptido descrito que tiene potencial de reducción de disulfuro)
- CPRC (secuencia del centro de la bisagra de IgG4 de gorila)
- CPHC (secuencia de sitio activo descrito para la tiorredoxina humana)

Las siguientes mezclas de anticuerpos purificados se incubaron con 0,5 mM de GSH a 37 °C y se extrajeron muestras en PBS-AT en diferentes puntos de tiempo entre 0 y 24 h, en las que se midieron las concentraciones de IgG (bi)específica como se ha descrito en los ejemplos anteriores:

- IgG1 a-Fel d 1 ts con IgG1 a-Bet v 1 ts (indicado como IgG1 en la Fig. 23 y 24)
- IgG4 a-Fel d 1 ts con IgG4 a-Bet v 1 ts (indicado como IgG4 en la Fig. 23 y 24)
- IgG4 a-Fel d 1 CGHC con IgG4 a-Bet v 1 CGHC (indicado como CGHC en la Fig. 23 y 24)
- IgG4 a-Fel d 1 CGC con IgG4 a-Bet v 1 CGC (indicado como CGC en la Fig. 23 y 24)
- IgG4 a-Fel d 1 CPRC con IgG4 a-Bet v 1 CPRC (indicado como CPRC en la Fig. 23 y 24)
- IgG4 a-Fel d 1 CPHC con IgG4 a-Bet v 1 CPHC (indicado como CPHC en la Fig. 23 y 24)

Los resultados (figura 23) demostraban que con el tiempo, no se producía intercambio de brazo Fab de anticuerpos que contenían un motivo CGC o un centro de bisagra de IgG1. El intercambio de anticuerpos que contenían el motivo CGHC era tan eficaz como los anticuerpos IgG4 ts. El intercambio de brazo Fab también se producía en antibióticos que contenían el motivo CPRC, aunque algo más lento, y en menor extensión también en los anticuerpos que contenían un motivo CPHC.

También se ensayó el efecto de la concentración de GSH (1 a 20.000 µM) sobre la capacidad de estas mezclas para someterse a intercambio de brazo Fab tras 24 h de incubación a 37 °C. El intercambio del brazo Fab de los anticuerpos que contenían los motivos CPHC, CPRC y CGHC así como los anticuerpos IgG4 ts se descubrió que era dependiente de la concentración de GSH (Figura 24), con un óptimo entre 100 y 1.000 µM de GSH.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Genmab A/S

<120> ANTICUERPOS BIESPECÍFICOS Y MÉTODOS DE PRODUCCIÓN DE LOS MISMOS

<130> P/31.WO

<160> 22

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 36

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 1

ES 2 593 484 T3

agccaccgta cgtttgatt ccagcttgg gcctcc 36

5 <210>2
<211> 44
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> cebador

<400> 2
gatgcaagct tgccgccacc atggagtcac agattcaggc attt 44

15 <210>3
<211> 42
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> cebador

<400> 3
cgatgggccc ttggtgctgg ctgaggagac ggtgactgag gt 42

25 <210>4
<211> 44
<212> ADN
<213> Artificial

30 <220>
<223> cebador

<400> 4
gatgcaagct tgccgccacc atgaaatgca gctgggttat cttc 44

35 <210>5
<211> 36
<212> ADN
<213> Artificial

40 <220>
<223> cebador

45 <400> 5
agccaccgta cgttttattt ccaacttgt ccccg 36

50 <210>6
<211> 44
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador

55 <400> 6
gatgcaagct tgccgccacc atggaatcac agactcaggc cctc 44

60 <210>7
<211> 42
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador

65 <400> 7

ES 2 593 484 T3

cgatgggcc ttggtgctgg ctgcagagaa agtgaccaga gt 42

<210>8
<211> 44
5 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador

10 <400> 8
gatgcaagct tgccgccacc atgggatgga gctatatcat cctc 44

<210>9
15 <211> 32
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
20 <223> cebador

<400>9
tgagaattcg gtgggtgctt tatttccatg ct 32

25 <210> 10
<211> 33
<212> ADN
<213> Artificial

30 <220>
<223> cebador

<400> 10
35 gtagaagctt accatcgagg atagacaaga acc 33

<210> 11
<211> 26
<212> ADN
<213> Artificial

40 <220>
<223> cebador

<400> 11
45 tgtaactgc tactggatg gtggga 26

<210> 12
<211> 27
50 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador

55 <400> 12
tccctgggca caatttctt gtccacc 27

<210> 13
<211>31
60 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador

65 <400> 13

tgaaagcttc taatagcact cactataggg c 31

<210> 14
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> cebador

10

<400> 14
 tgaaagcttc taatagcact cactataggg caagcagtggt tatcaacgca gagt 54

<210> 15
 <211> 137
 <212> PRT
 <213> Artificial

15

<220>
 <223> región variable del anticuerpo

20

<400> 15

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
 1 5 10 15

Val Asn Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile
 35 40 45

Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Gly Arg Ile Asp Pro Ala Thr Gly Asn Thr Arg Tyr Asp
 65 70 75 80

Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn
 85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Ser Phe Arg Pro Gly Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 130 135

25

<210> 16
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> región variable del anticuerpo

<400> 16

Met Glu Ser Gln Ile Gln Ala Phe Val Phe Val Phe Leu Trp Leu Ser
 1 5 10 15
 Gly Val Asp Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser
 20 25 30
 Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Phe Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
 35 40 45
 Val Phe Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
 50 55 60
 Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Arg Thr Gly Val Pro Asp
 65 70 75 80
 Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95
 Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Phe
 100 105 110
 Ser Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 115 120 125

5

<210> 17
 <211> 138
 <212> PRT
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> región variable del anticuerpo

15

<400> 17

ES 2 593 484 T3

Met Gly Trp Ser Tyr Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Asp
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
 35 40 45
 Thr Ser Tyr Trp Met His Trp Leu Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Asn Asn Gly Arg Thr Tyr Tyr Asn
 65 70 75 80
 Glu Lys Phe Lys Thr Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Leu Thr Met Val Glu Ser Phe Ala Tyr Trp
 115 120 125
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Phe Ser Ala
 130 135

<210> 18
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> región variable del anticuerpo

10

<400> 18

Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Leu Met Ser Leu Leu Phe Trp Val Ser
 1 5 10
 Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr
 20 25 30
 Val Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
 35 40 45
 Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln
 50 55 60

ES 2 593 484 T3

Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
65 70 75 80

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
85 90 95

Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Ile Tyr
100 105 110

Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr
115 120 125

Lys Leu Glu Ile Lys
130

- 5 <210> 19
- <211> 330
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*

- 10 <220>
- <221> CONFLICTO
- <222> (239)..(239)
- <223> X en la posición 239 es D o E

- 15 <220>
- <221> CONFLICTO
- <222> (241)..(241)
- <223> X en la posición 241 es L o M

- <400> 19

ES 2 593 484 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

ES 2 593 484 T3

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Xaa Glu
 225 230 235 240

Xaa Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 20
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 20

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

10

ES 2 593 484 T3

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 115 120 125
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160 165
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 165 170 175
 Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 180 185 190
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 195 200 205
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270
 Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300

ES 2 593 484 T3

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

5 <210> 21
 <211> 377
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 21

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
 100 105 110

Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
 115 120 125

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
 130 135 140

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
 145 150 155 160

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 165 170 175

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 180 185 190

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
 195 200 205

10

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 210 215 220
 Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 225 230 235
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 245 250 255
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
 260 265 270
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 275 280 285
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 290 295 300
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 305 310 315 320
 Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 325 330 335
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
 340 345 350
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
 355 360 365
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 370 375

<210> 22
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 22

5

ES 2 593 484 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr

ES 2 593 484 T3

65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Genmab A/S
<120> ANTICUERPOS BIESPECÍFICOS Y MÉTODOS DE PRODUCCIÓN DE LOS MISMOS
5 <130> P/31.WO
<160> 22
<170> PatentIn versión 3.3
10 <210> 1
<211> 36
<212> ADN
<213> Artificial
15 <220>
<223> cebador
<400> 1
20 agccaccgta cgtttgattt ccagcttggg gcctcc 36
<210>2
<211> 44
<212> ADN
25 <213> Artificial
<220>
<223> cebador
30 <400> 2
gatgcaagct tgccgccacc atggagtcac agattcaggc attt 44
<210>3
<211> 42
35 <212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> cebador
40 <400> 3
cgatgggccc ttggtgctgg ctgaggagac ggtgactgag gt 42
<210>4
<211> 44
45 <212> ADN
<213> Artificial
<220>
50 <223> cebador
<400> 4
gatgcaagct tgccgccacc atgaaatgca gctgggttat cttc 44
55 <210>5
<211> 36
<212> ADN
<213> Artificial
60 <220>
<223> cebador
<400>5
65 agccaccgta cgttttattt ccaacttgt ccccgga 36
<210>6

ES 2 593 484 T3

<211> 44
<212> ADN
<213> Artificial

5 <220>
<223> cebador

<400> 6
gatgcaagct tgccgccacc atggaatcac agactcaggt cctc 44

10 <210>7
<211> 42
<212> ADN
<213> Artificial

15 <220>
<223> cebador

<400> 7
cgatgggccc ttggtgctgg ctgcagagaa agtgaccaga gt 42

<210>8
<211> 44
<212> ADN
25 <213> Artificial

<220>
<223> cebador

30 <400> 8
gatgcaagct tgccgccacc atgggatgga gctatatcat cctc 44

<210>9
<211> 32
35 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador

40 <400> 9
tgagaattcg gtgggtgctt tattccatg ct 32

<210> 10
45 <211> 33
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
50 <223> cebador

<400> 10
gtagaagctt accatcgagg atagacaaga acc 33

55 <210> 11
<211> 26
<212> ADN
<213> Artificial

60 <220>
<223> cebador

<400> 11
65 tgtaactgc tactggatg gtggga 26

<210> 12

ES 2 593 484 T3

<211> 27
<212> ADN
<213> Artificial

5 <220>
<223> cebador

<400> 12
tcctgggca caatttctt gtccacc 27

10 <210> 13
<211>31
<212> ADN
<213> Artificial

15 <220>
<223> cebador

<400> 13
tgaaagcttc taatagcact cactataggg c 31

20 <210> 14
<211> 54
<212> ADN
<213> Artificial

25 <220>
<223> cebador

30 <400> 14
tgaaagcttc taatagcact cactataggg caagcagtg tatcaacgca gagt 54

35 <210> 15
<211> 137
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> región variable del anticuerpo

40 <400> 15

ES 2 593 484 T3

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
 1 5 10 15
 Val Asn Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile
 35 40 45
 Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Gly Arg Ile Asp Pro Ala Thr Gly Asn Thr Arg Tyr Asp
 65 70 75 80
 Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Ser Phe Arg Pro Gly Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125
 Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 16
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> región variable del anticuerpo

10

<400> 16

ES 2 593 484 T3

Met Glu Ser Gln Ile Gln Ala Phe Val Phe Val Phe Leu Trp Leu Ser
 1 5 10 15
 Gly Val Asp Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser
 20 25 30
 Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Phe Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
 35 40 45
 Val Phe Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
 50 55 60
 Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Arg Thr Gly Val Pro Asp
 65 70 75 80
 Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95
 Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Phe
 100 105 110
 Ser Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 115 120 125

<210> 17
 <211> 138
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> región variable del anticuerpo

10

<400> 17

ES 2 593 484 T3

Met Gly Trp Ser Tyr Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Asp
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
 35 40 45
 Thr Ser Tyr Trp Met His Trp Leu Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Asn Asn Gly Arg Thr Tyr Tyr Asn
 65 70 75 80
 Glu Lys Phe Lys Thr Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Leu Thr Met Val Glu Ser Phe Ala Tyr Trp
 115 120 125
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Phe Ser Ala
 130 135

<210> 18
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> región variable del anticuerpo

10

<400> 18

Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Leu Met Ser Leu Leu Phe Trp Val Ser
 1 5 10 15
 Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr
 20 25 30
 Val Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
 35 40 45
 Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln
 50 55 60

ES 2 593 484 T3

Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
65 70 75 80

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
85 90 95

Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Ile Tyr
100 105 110

Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr
115 120 125

Lys Leu Glu Ile Lys
130

5 <210> 19
<211> 330
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <220>
<221> CONFLICTO
<222> (239)..(239)
<223> x en la posición 239 es D o E

15 <220>
<221> CONFLICTO
<222> (241)..(241)
<223> X en la posición 241 es L o M

<400> 19

ES 2 593 484 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

ES 2 593 484 T3

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Xaa Glu
 225 230 235 240
 Xaa Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 20
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 20

5

ES 2 593 484 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

ES 2 593 484 T3

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 115 120 125
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 165 170 175
 Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 180 185 190
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 195 200 205
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270
 Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300

ES 2 593 484 T3

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

5

<210> 21
<211> 377
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 21

ES 2 593 484 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
100 105 110

Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
115 120 125

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
130 135 140

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
145 150 155 160

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
165 170 175

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
180 185 190

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
195 200 205

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 210 215 220
 Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 225 230 235 240
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 245 250 255
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
 260 265 270
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 275 280 285
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 290 295 300
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 305 310 315 320
 Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 325 330 335
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
 340 345 350
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
 355 360 365
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 370 375

<210> 22
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 22

5

ES 2 593 484 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser val val Thr val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr

ES 2 593 484 T3

65			70			75		80							
Tyr	Thr	Cys	Asn	Val ₈₅	Asp	His	Lys	Pro	Ser ₉₀	Asn	Thr	Lys	Val	Asp ₉₅	Lys
Arg	Val	Glu	Ser ₁₀₀	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro ₁₀₅	Cys	Pro	Ser	Cys	Pro ₁₁₀	Ala	Pro
Glu	Phe	Leu ₁₁₅	Gly	Gly	Pro	Ser	Val ₁₂₀	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro ₁₂₅	Lys	Pro	Lys
Asp	Thr ₁₃₀	Leu	Met	Ile	Ser	Arg ₁₃₅	Thr	Pro	Glu	Val	Thr ₁₄₀	Cys	Val	Val	Val
Asp	Val ₁₄₅	Ser	Gln	Glu	Asp ₁₅₀	Pro	Glu	Val	Gln	Phe ₁₅₅	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp ₁₆₀
Gly	Val	Glu	Val	His ₁₆₅	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys ₁₇₀	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln ₁₇₅	Phe
Asn	Ser	Thr	Tyr ₁₈₀	Arg	Val	Val	Ser	Val ₁₈₅	Leu	Thr	Val	Leu	His ₁₉₀	Gln	Asp
Trp	Leu	Asn ₁₉₅	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys ₂₀₀	Cys	Lys	Val	Ser	Asn ₂₀₅	Lys	Gly	Leu
Pro	Ser ₂₁₀	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr ₂₁₅	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys ₂₂₀	Gly	Gln	Pro	Arg
Glu	Pro ₂₂₅	Gln	Val	Tyr	Thr ₂₃₀	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln ₂₃₅	Glu	Glu	Met	Thr	Lys ₂₄₀
Asn	Gln	Val	Ser	Leu ₂₄₅	Thr	Cys	Leu	Val	Lys ₂₅₀	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser ₂₅₅	Asp
Ile	Ala	Val	Glu ₂₆₀	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly ₂₆₅	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn ₂₇₀	Tyr	Lys
Thr	Thr	Pro ₂₇₅	Pro	Val	Leu	Asp	Ser ₂₈₀	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe ₂₈₅	Leu	Tyr	Ser
Arg	Leu ₂₉₀	Thr	Val	Asp	Lys	Ser ₂₉₅	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly ₃₀₀	Asn	Val	Phe	Ser
Cys	Ser ₃₀₅	Val	Met	His	Glu ₃₁₀	Ala	Leu	His	Asn	His ₃₁₅	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser ₃₂₀
Leu	Ser	Leu	Ser	Leu ₃₂₅	Gly	Lys									

REIVINDICACIONES

1. Un método *ex vivo* para la generación de un anticuerpo biespecífico, comprendiendo dicho método las etapas de:
 - 5 a) proporcionar un primer anticuerpo que tiene una primera especificidad, donde dicho primer anticuerpo comprende una secuencia CPPC en la región del centro de la bisagra y una región CH3 tipo IgG4 que es la región CH3 de SEQ ID NO: 19, pero donde la región CH3 se ha modificado de manera que la Lys (K) de la posición 292 se ha sustituido por Arg (R)
 - 10 b) proporcionar un segundo anticuerpo que tiene una segunda especificidad que es diferente de la primera especificidad de unión, donde dicho segundo anticuerpo comprende una secuencia CPPC en la región del centro de la bisagra y una región CH3 tipo IgG4 que es la región CH3 de SEQ ID NO: 19, pero donde la región CH3 se ha modificado de manera que la Lys (K) de la posición 292 se ha sustituido por Arg (R)
 - 15 c) incubar juntos dichos primer y segundo anticuerpos en condiciones reductoras que permitan que las cisteínas del centro de la región bisagra se sometan a isomerización de enlaces disulfuro,
 - d) poner la composición obtenida en la etapa c) en condiciones no reductoras con el fin de detener el intercambio de semi-moléculas, y
 - e) obtener un anticuerpo biespecífico.
- 20 2. El método *ex vivo* de la reivindicación precedente, donde la etapa c) comprende la adición de un agente reductor.
3. El método *ex vivo* de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho primer anticuerpo y/o dicho segundo anticuerpo es un anticuerpo humano.
- 25 4. El método *ex vivo* de cualquiera de las reivindicaciones 2-3, donde la concentración de dicho agente reductor es tal que el potencial redox de la solución generada en la etapa c) es igual a, o más reductor que, el potencial redox generado por 1 microM de glutatión, tal como igual a, o más reductor que, el potencial redox generado por 10 microM de glutatión, por ejemplo igual a, o más reductor que, el potencial redox generado por 50 microM de glutatión, tal como igual a, o más reductor que, el potencial redox generado por 0,1 mM de glutatión, en las condiciones descritas en el Ejemplo 31.
- 30 5. El método *ex vivo* de cualquiera de las reivindicaciones 2-4, donde la concentración de dicho agente reductor es tal que el potencial redox de la solución generada en la etapa c) es igual a, o más reductor que, el potencial redox generado por 1 mM de glutatión, por ejemplo, igual a, o más reductor que, el potencial redox generado por 2 mM de glutatión, tal como igual a, o más que, el potencial redox generado por 4 mM de glutatión, por ejemplo, igual a, o más que, el potencial redox generado por 6 mM de glutatión, tal como igual a, o más que, el potencial redox generado por 8 mM de glutatión, por ejemplo, igual a, o más que, el potencial redox generado por 10 mM de glutatión, en las condiciones descritas en el Ejemplo 35.
- 35 6. El método *ex vivo* de la reivindicación 4 o 5, donde la concentración de dicho agente reductor es tal que el potencial redox de la solución generada en la etapa c) es igual a, o menos reductor que, el potencial redox generado por 1 M de glutatión, tal como igual a, o menos reductor que, el potencial redox generado por 100 mM de glutatión, igual a, o menos reductor que, el potencial redox generado por 15 mM de glutatión.
- 40 7. El método *ex vivo* de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la etapa c) comprende la incubación de dichos anticuerpos en presencia de glutatión reducido durante al menos 1 hora, tal como durante al menos 2 horas, por ejemplo, durante al menos 5 horas, tal como al menos durante 10 horas a una temperatura de 20 °C o más, tal como de 37 °C.
- 45 8. Un anticuerpo biespecífico aislado que se obtiene o se puede obtener por el método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
- 50

FIGURA 1

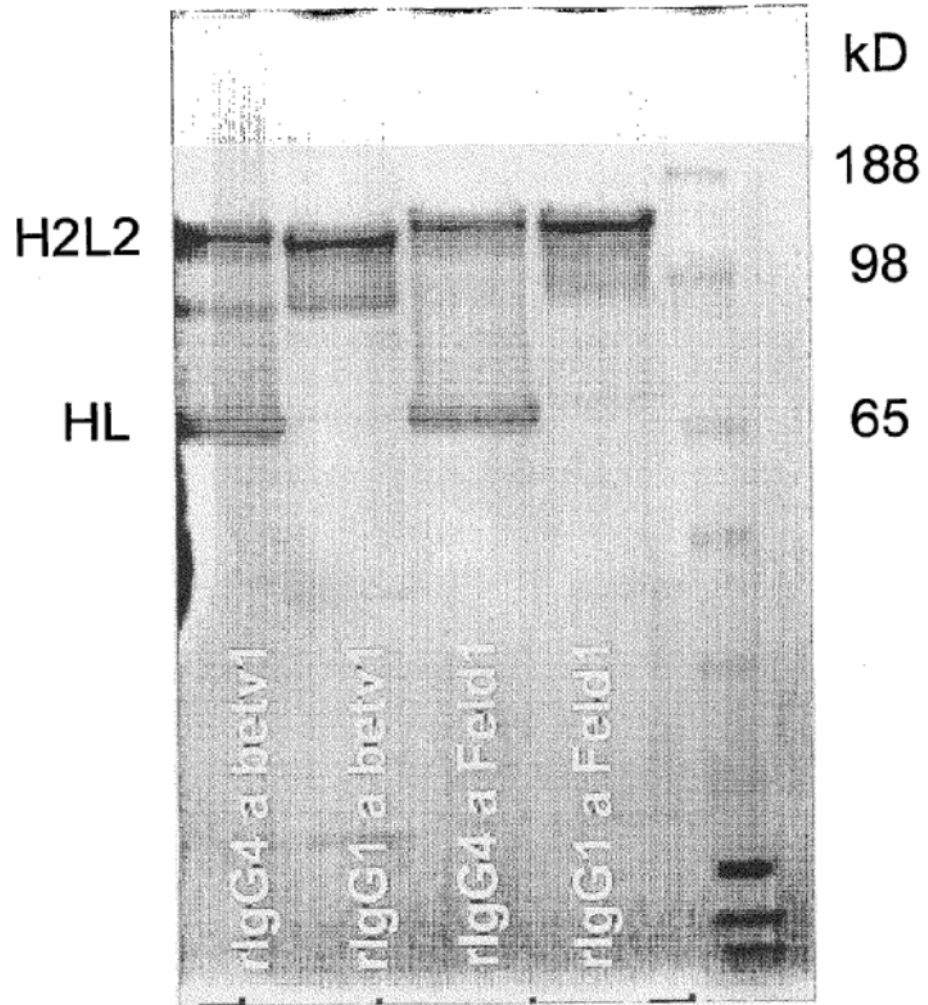


FIGURA 2

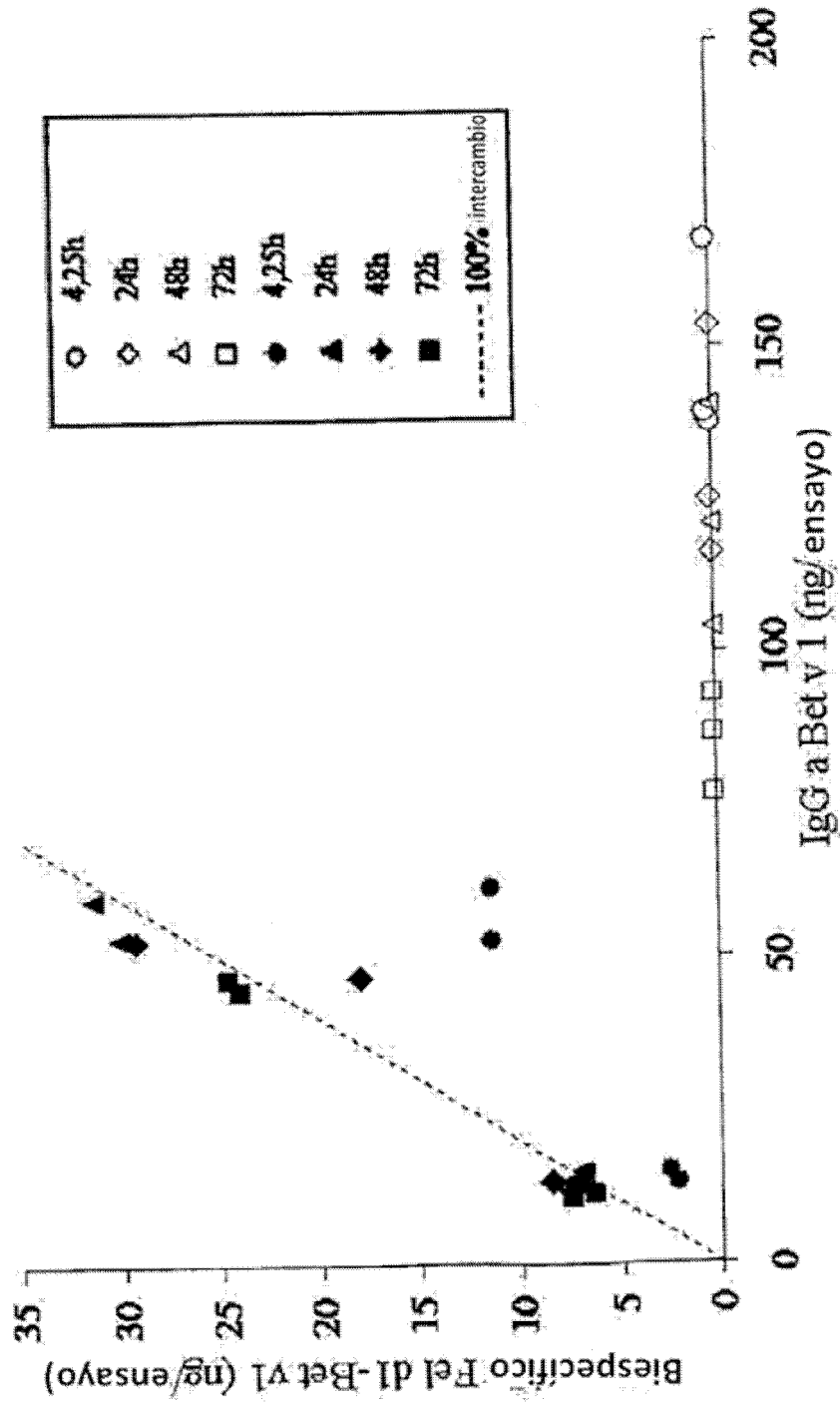


FIGURA 3A

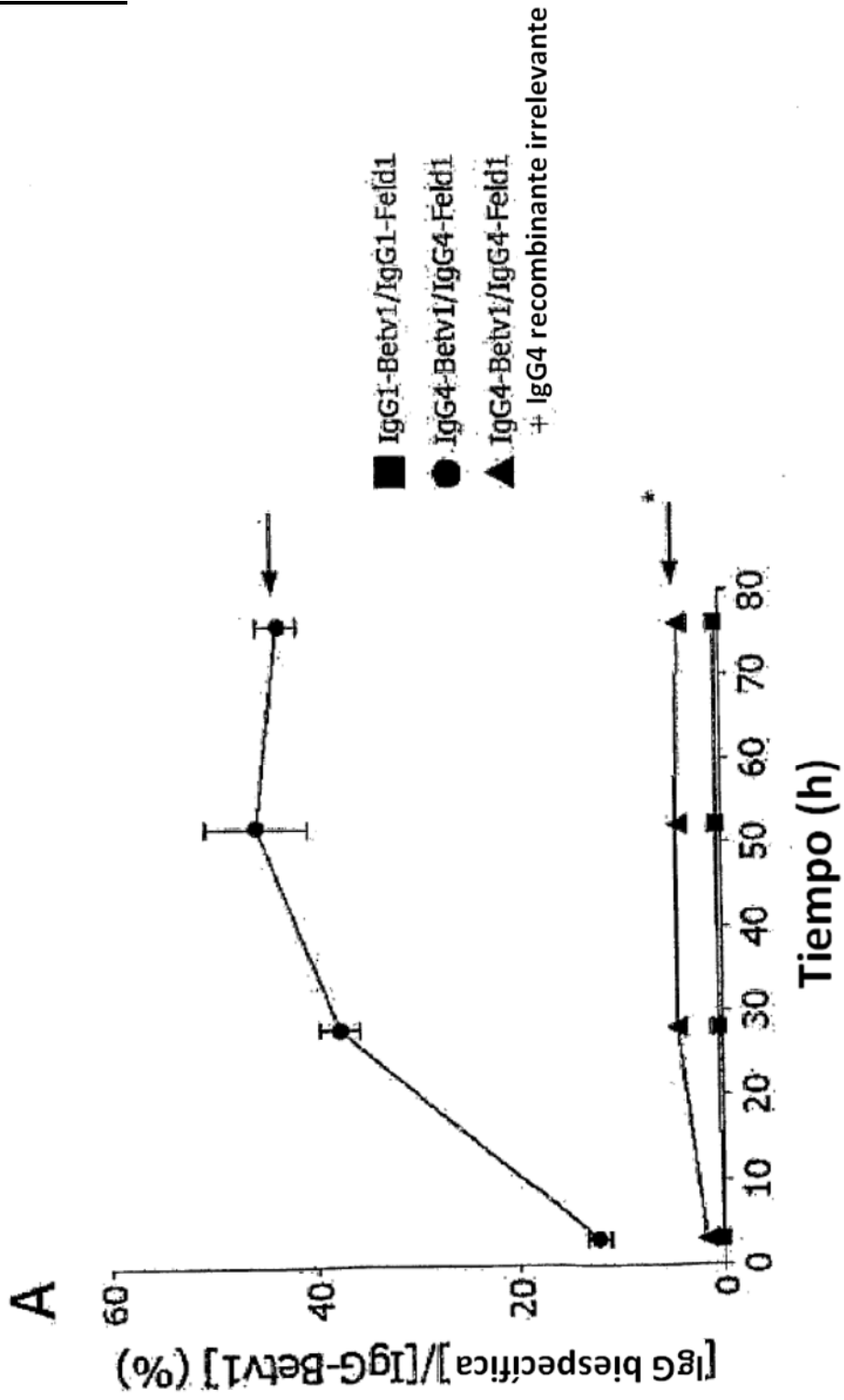


FIGURA 3B

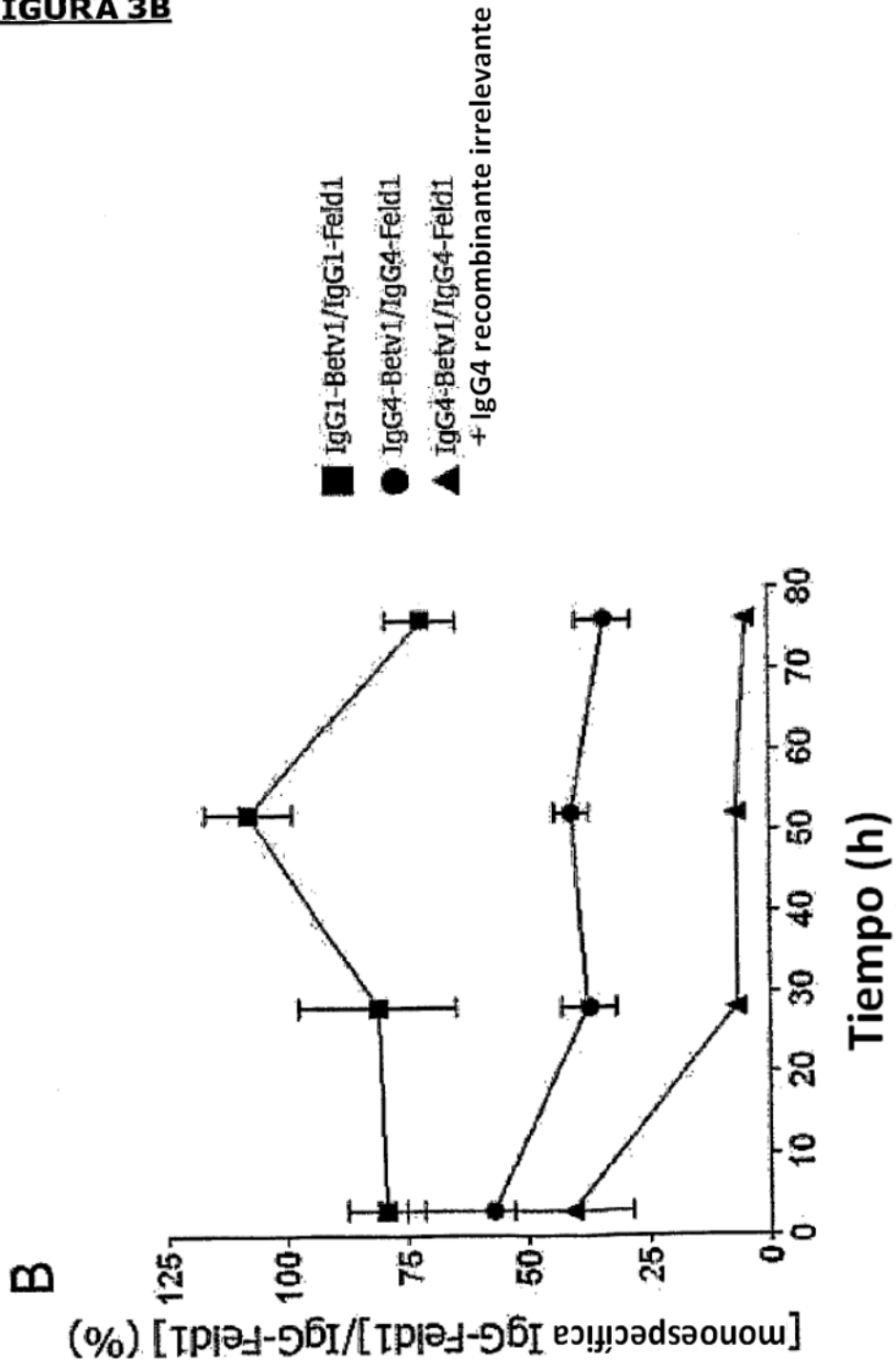


FIGURA 4

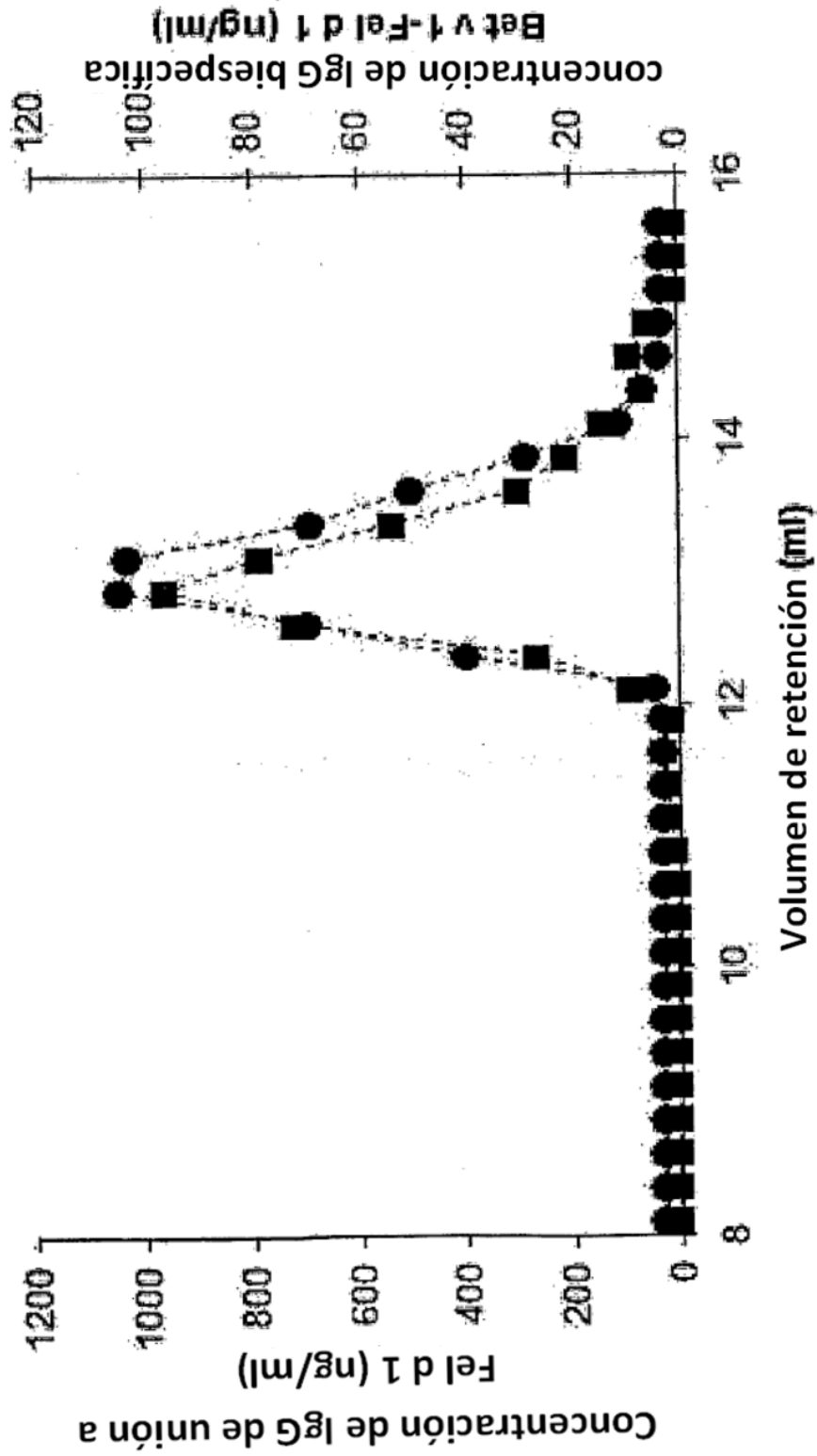


FIGURA 5A

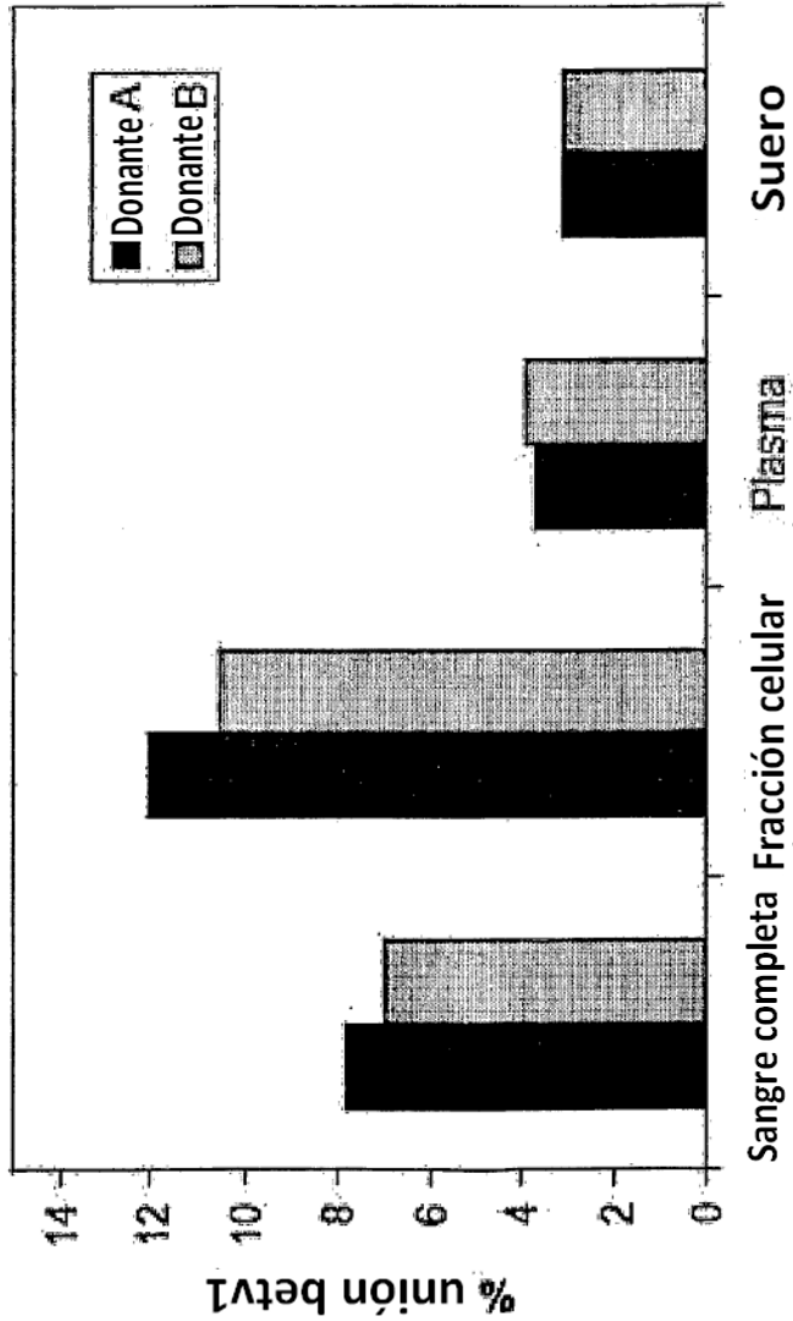


FIGURA 5B

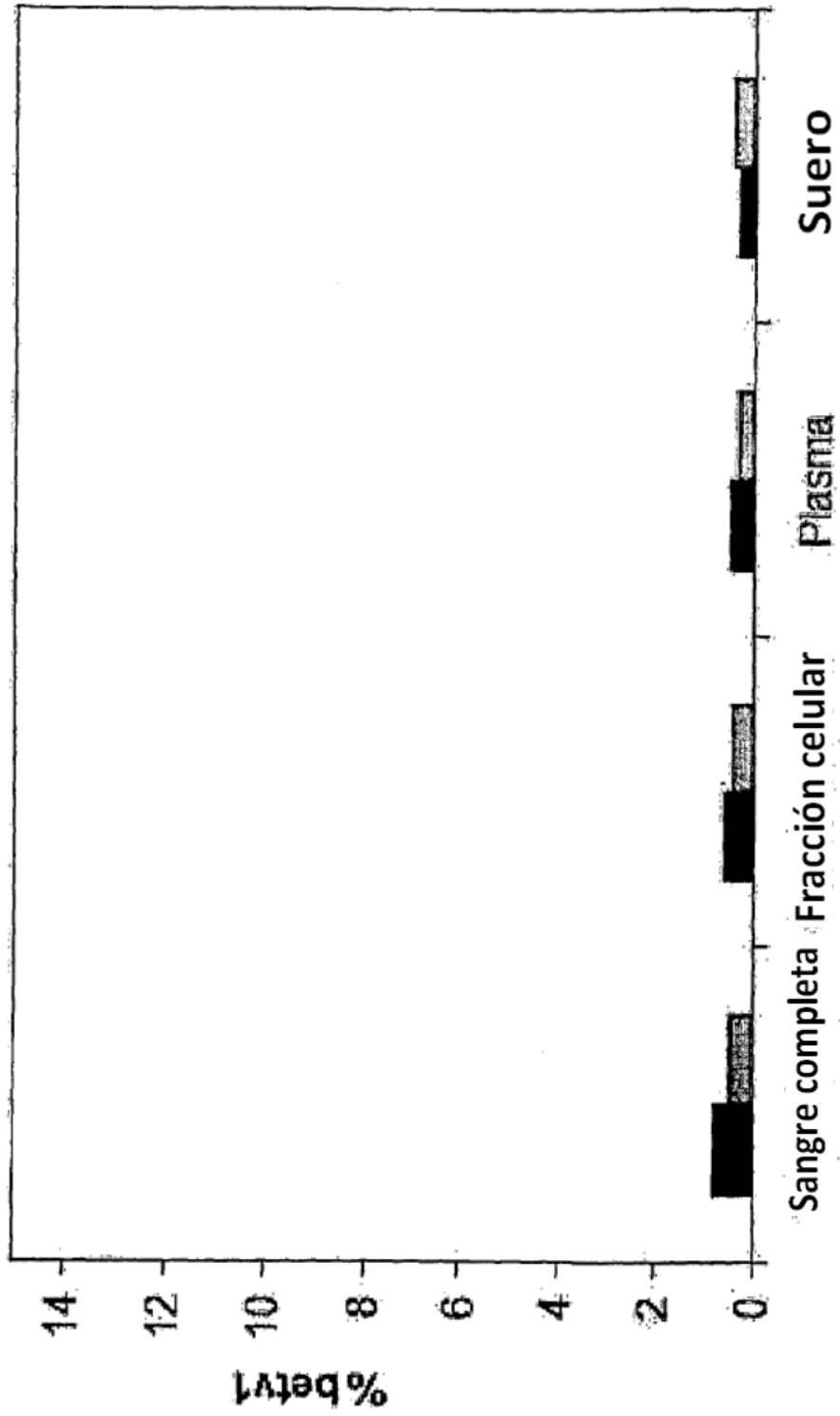


FIGURA 5C

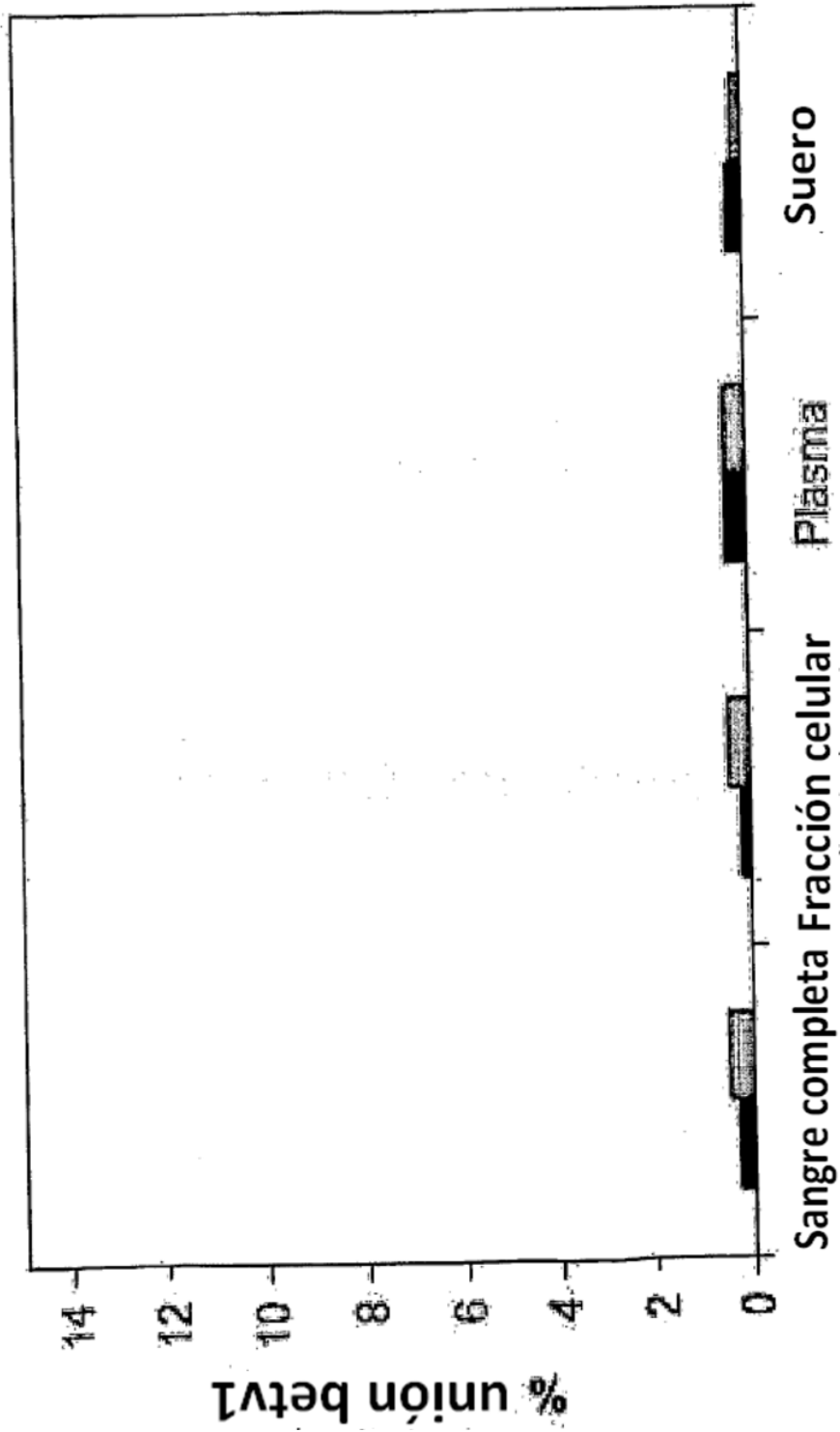


FIGURA 6

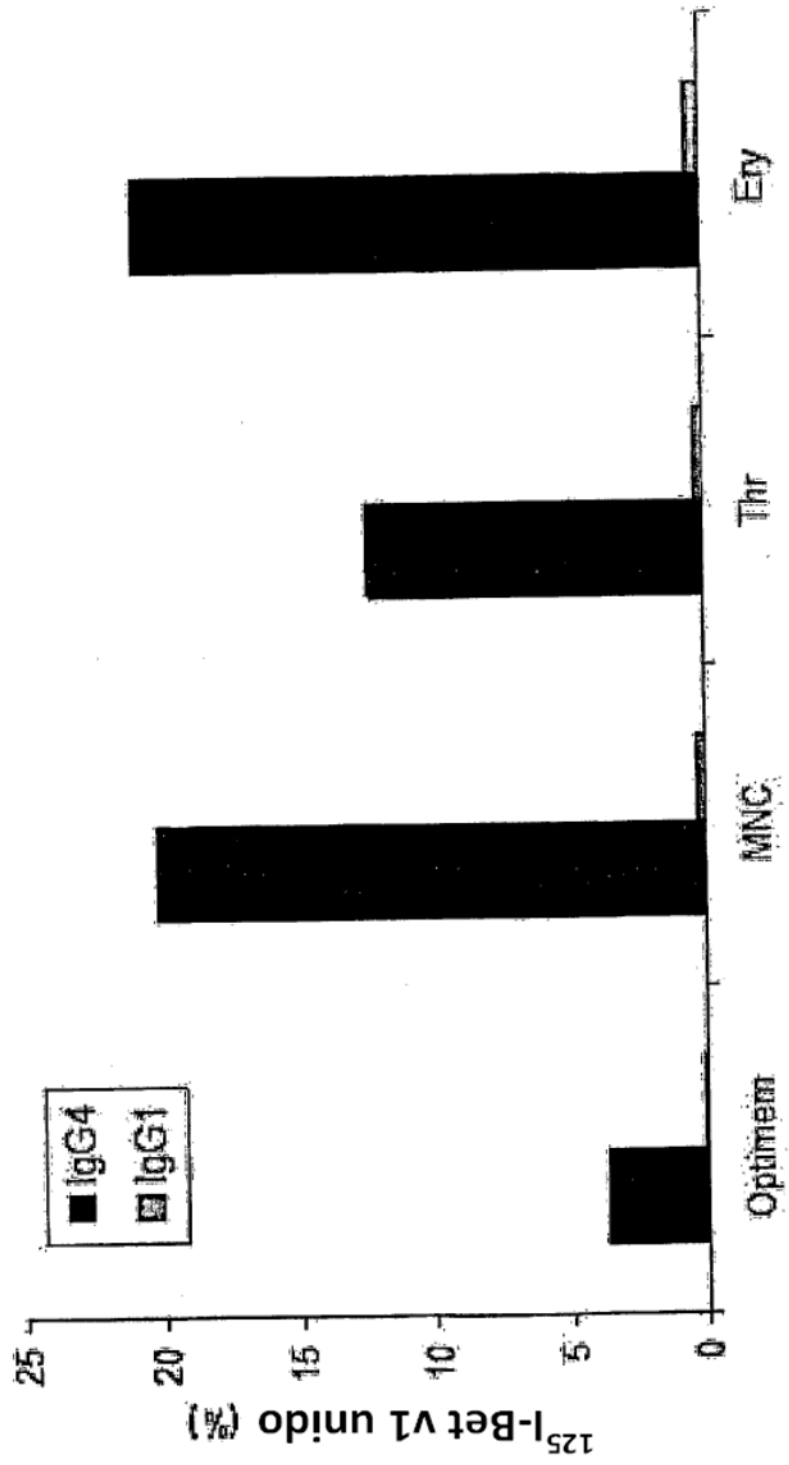


FIGURA 7

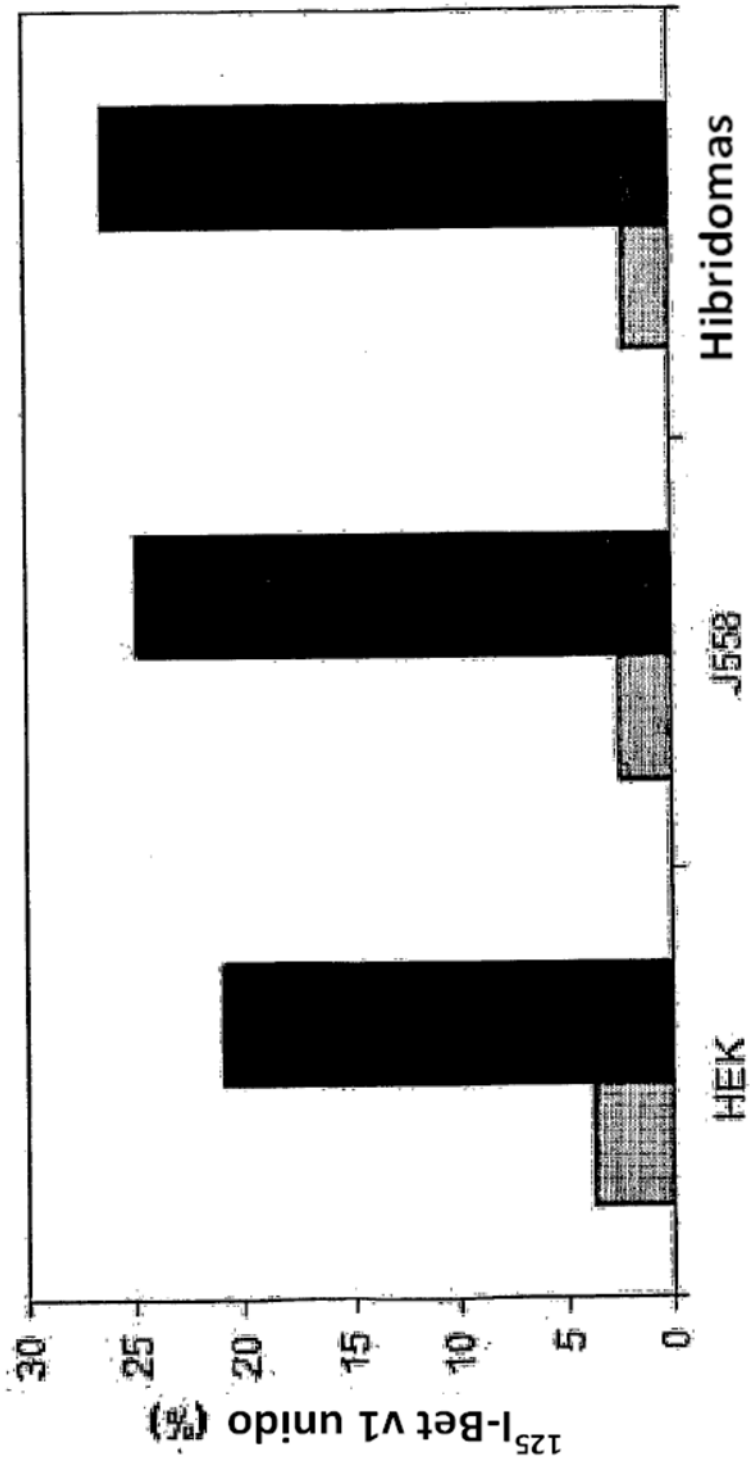


FIGURA 8

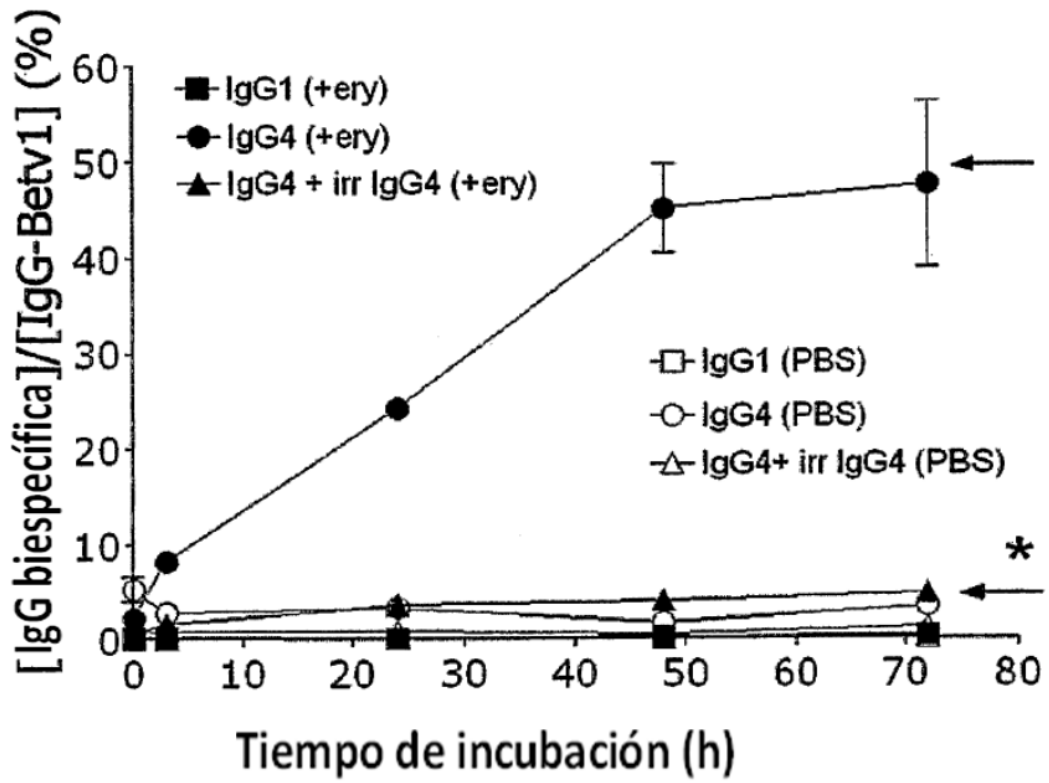


FIGURA 9A

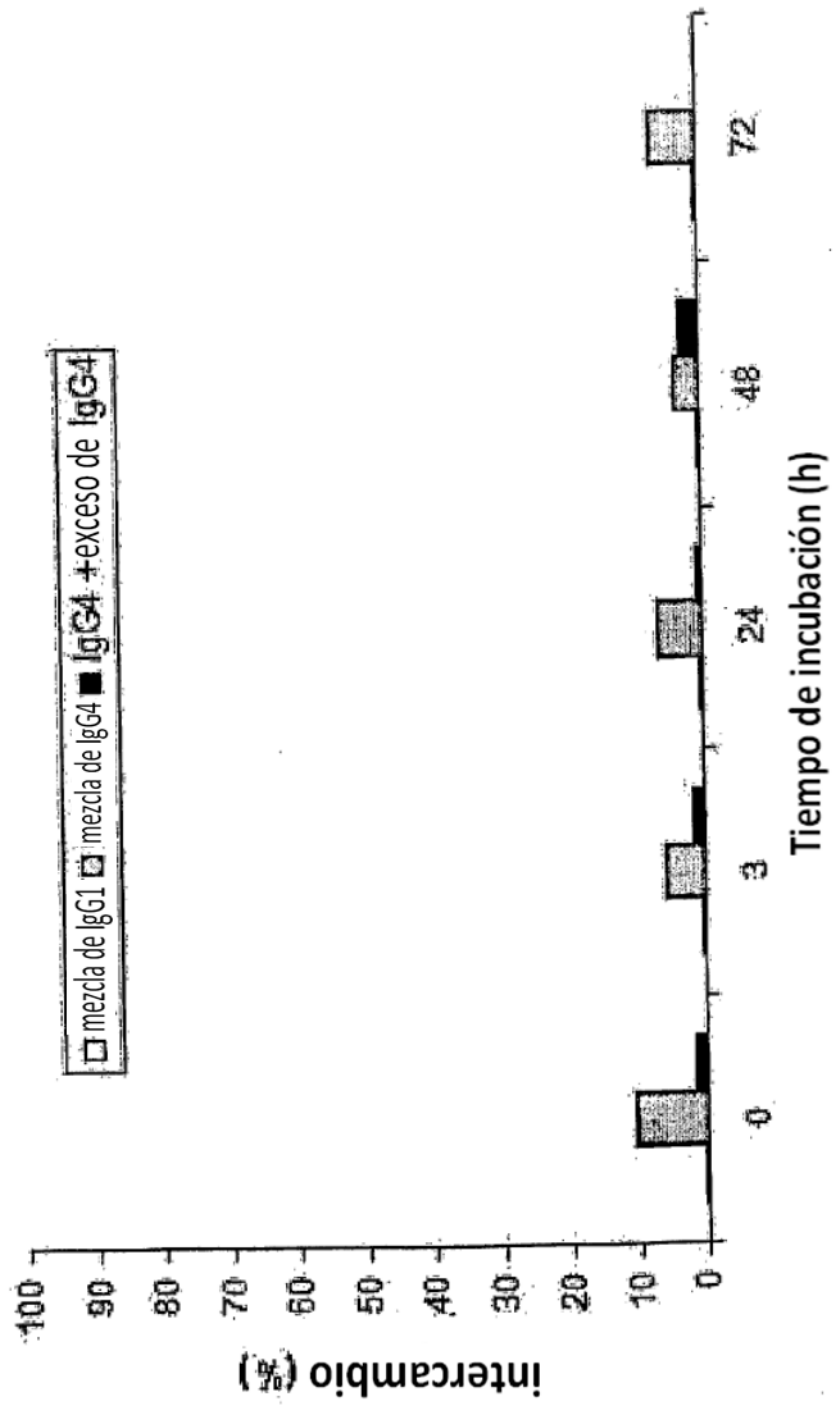


FIGURA 9B

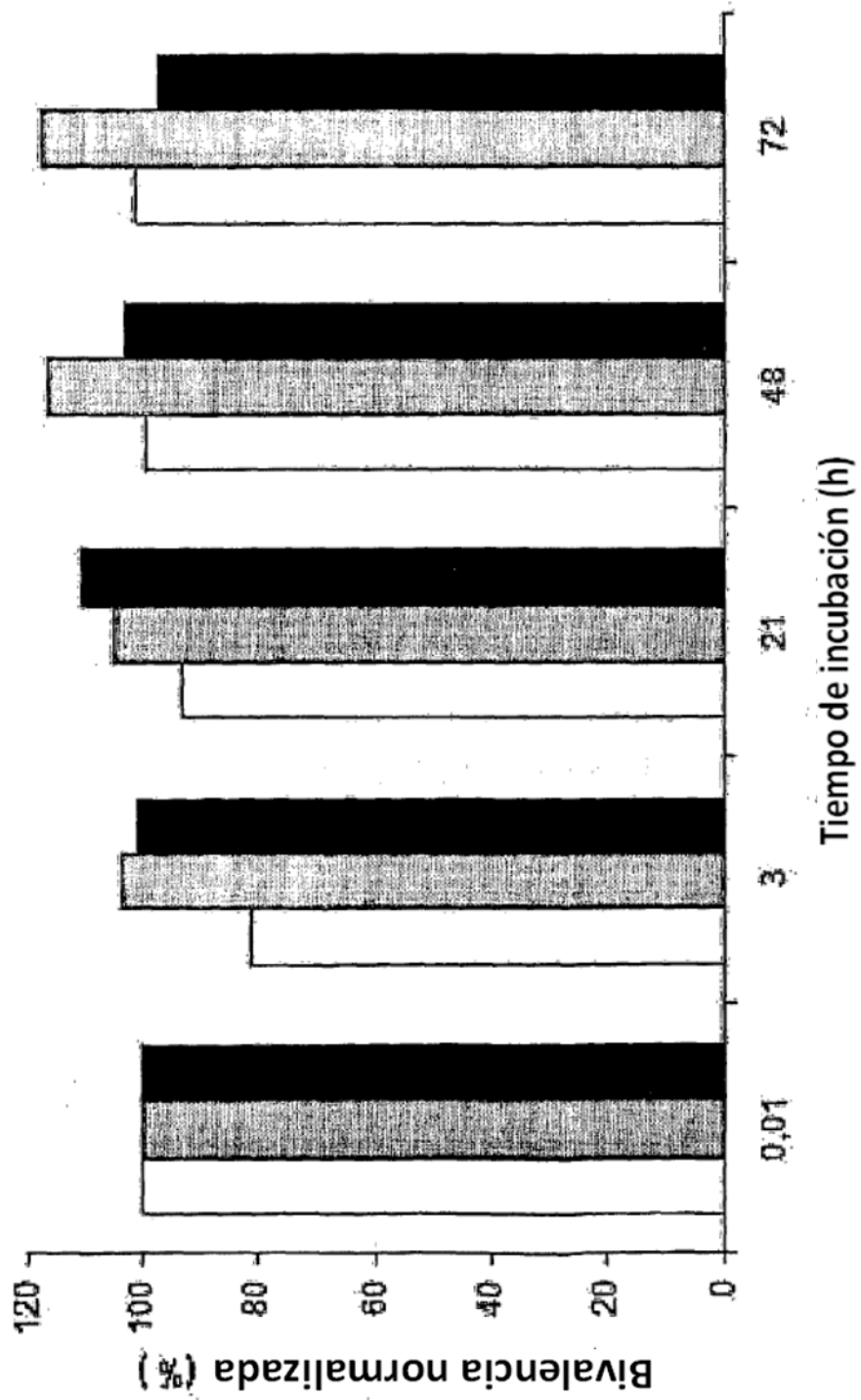


FIGURA 10

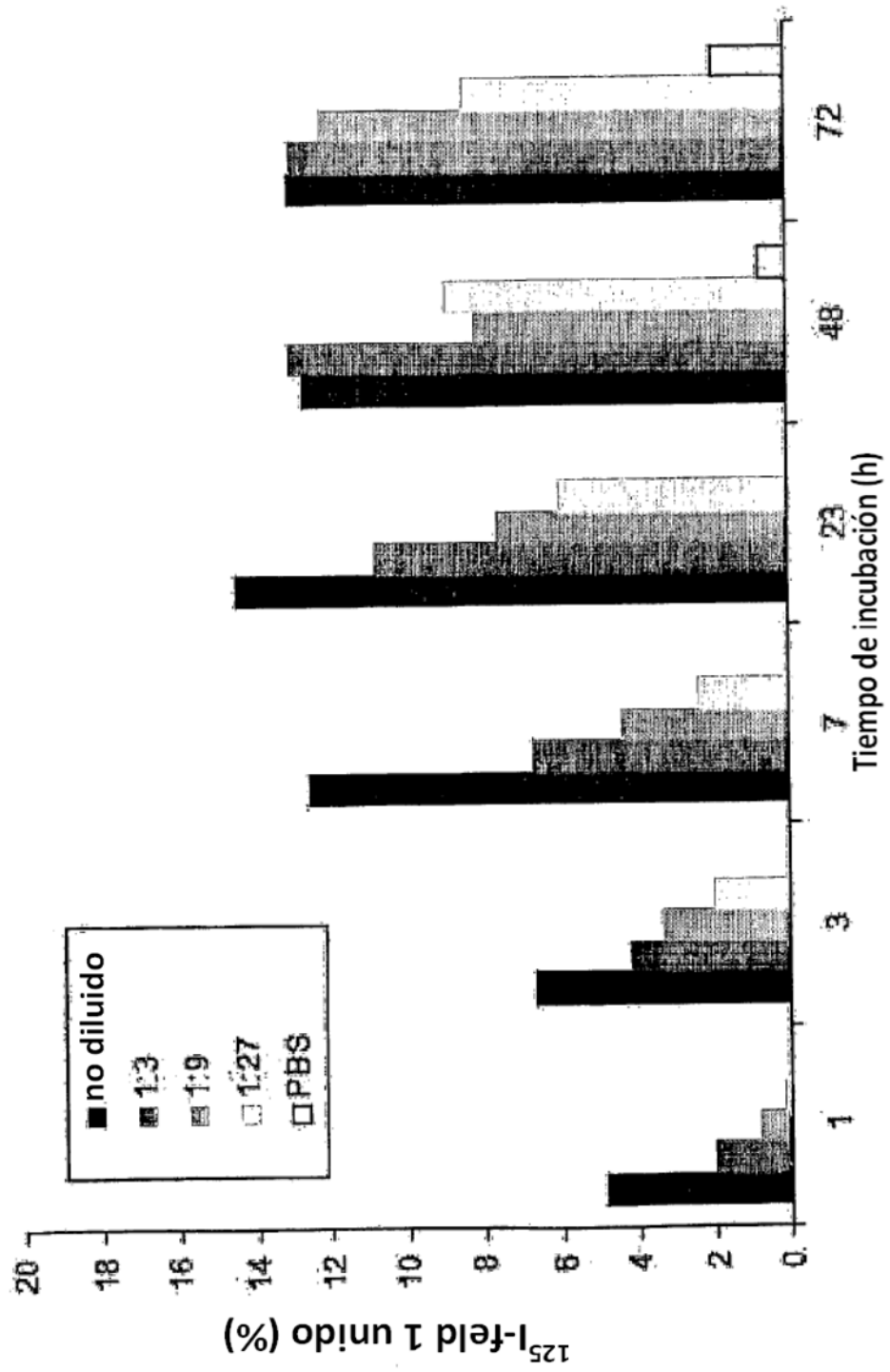


FIGURA 11

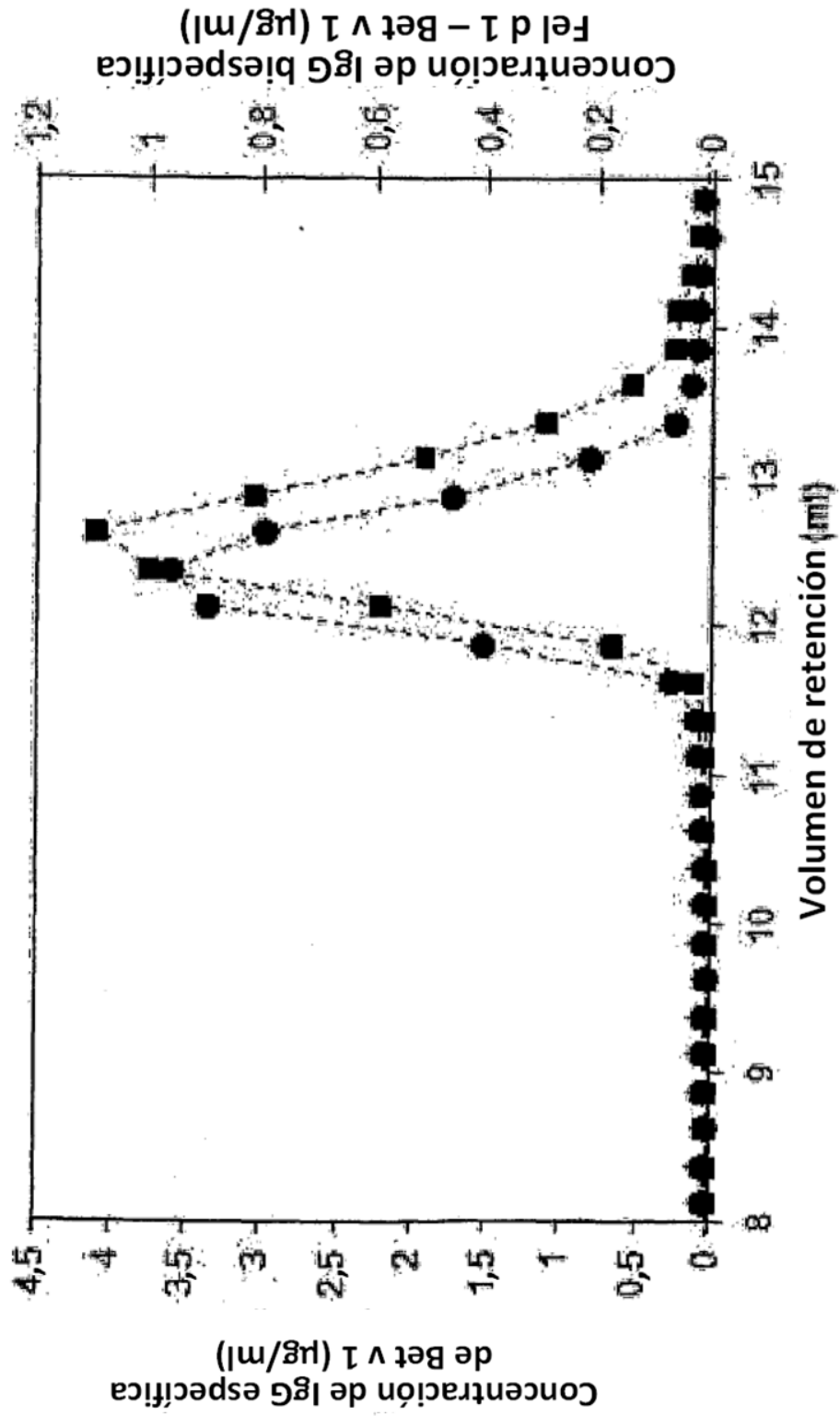


FIGURA 12

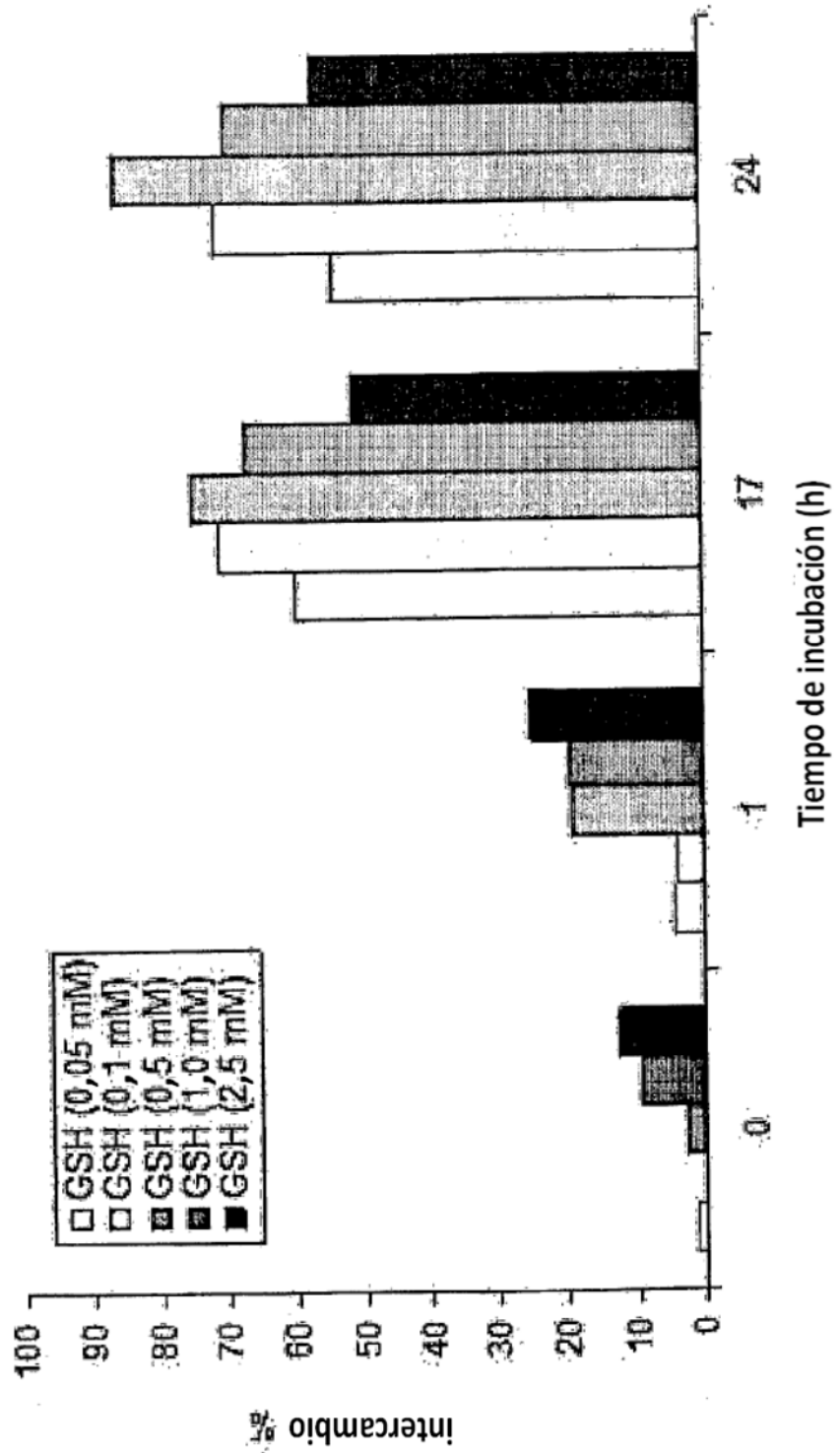


FIGURA 13

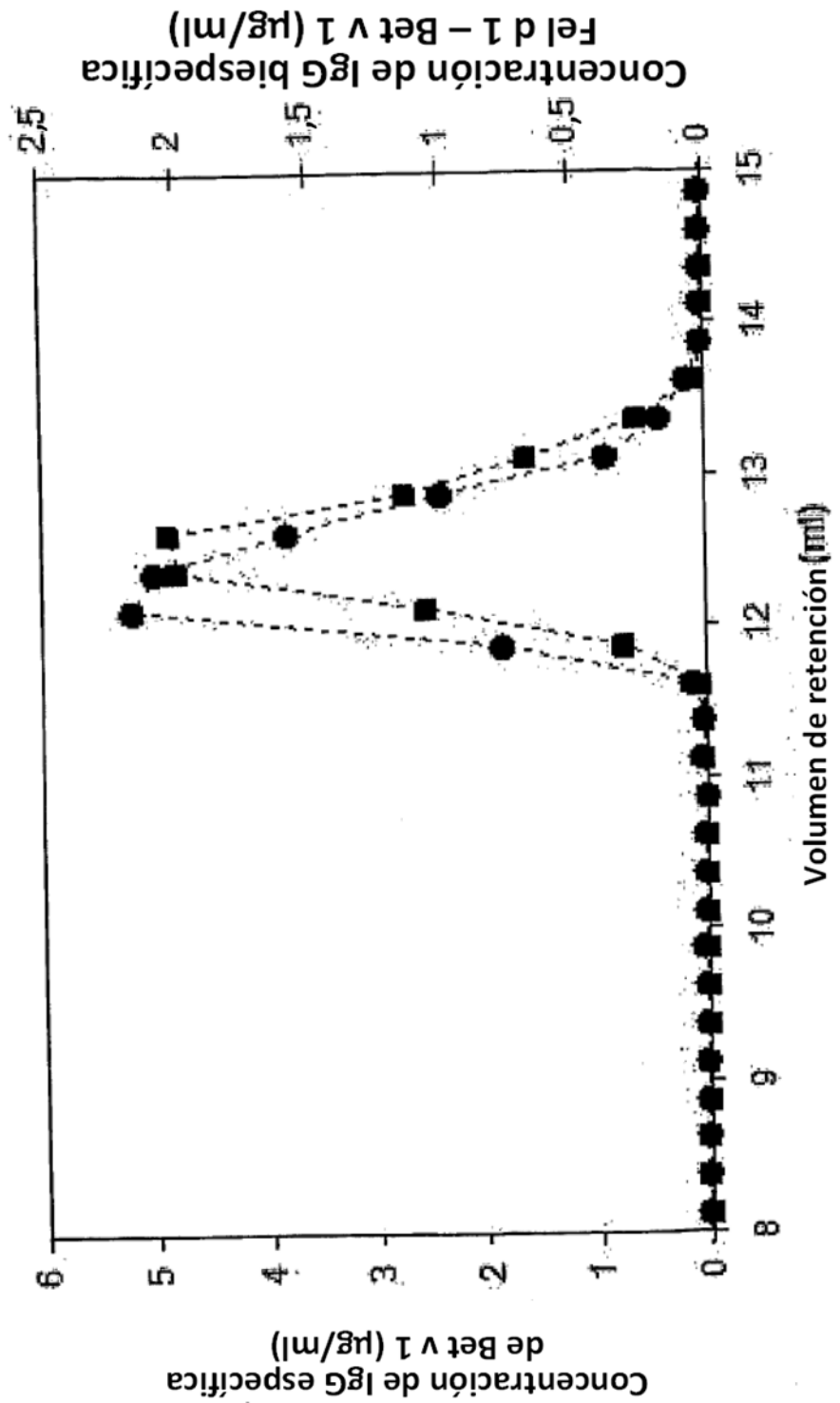


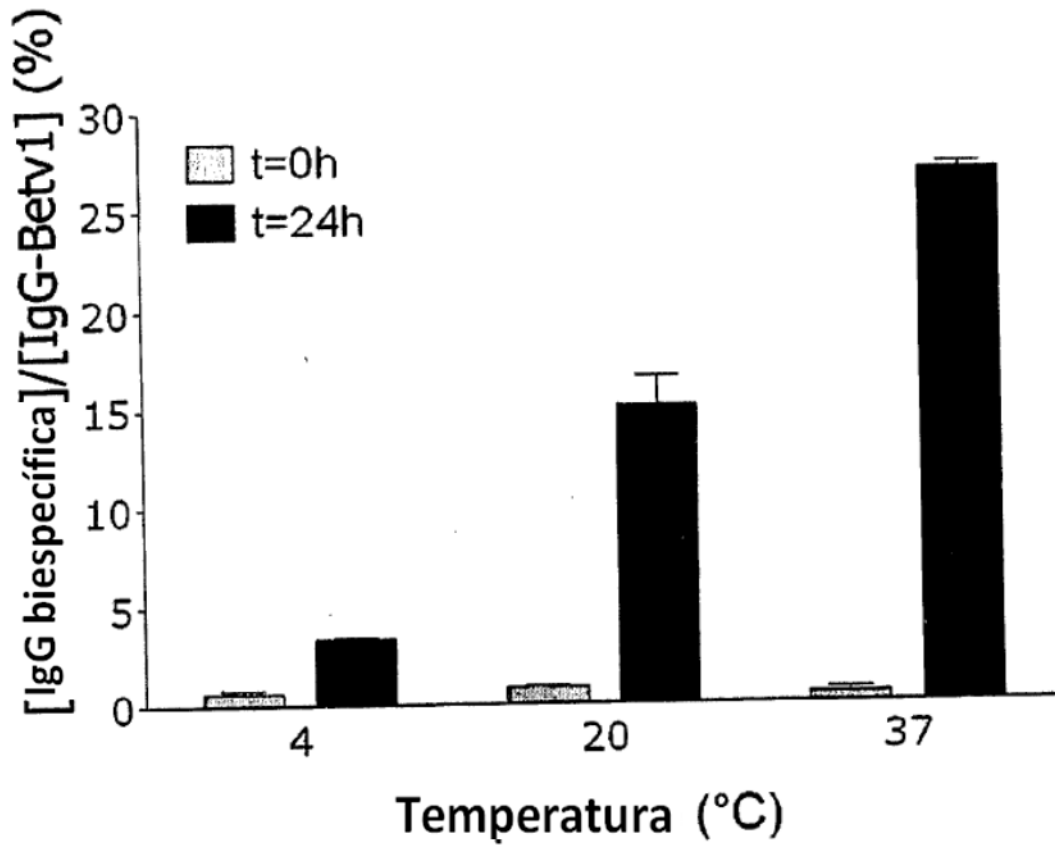
FIGURA 14

FIGURA 15

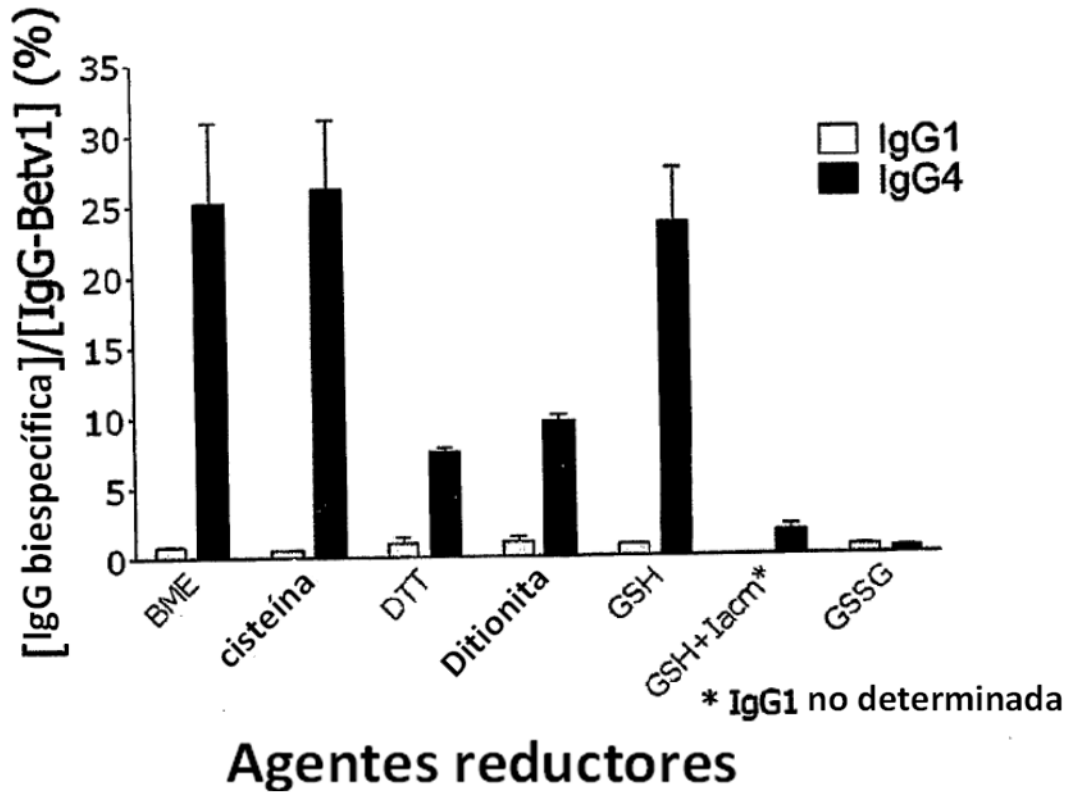


FIGURA 16A

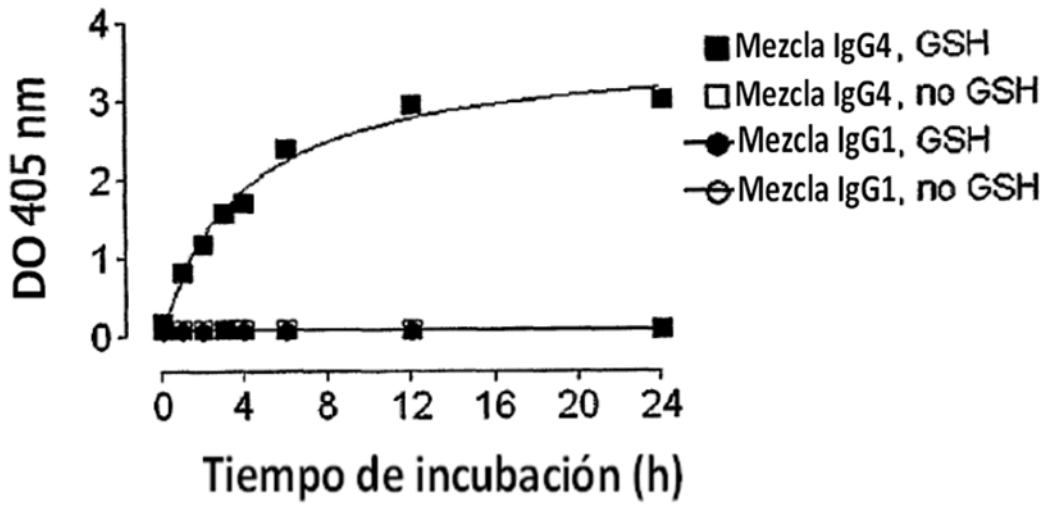


FIGURA 16B

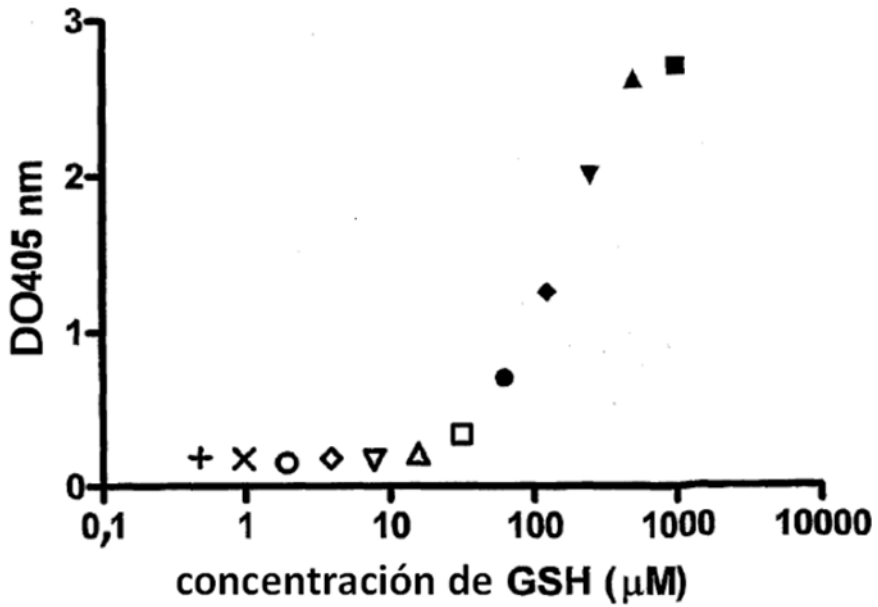


FIGURA 16C

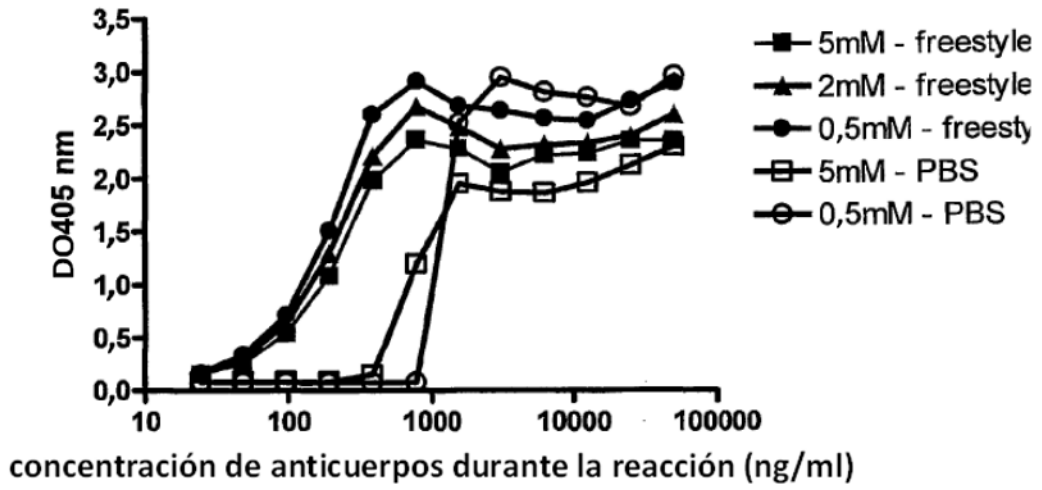


FIGURA 16D

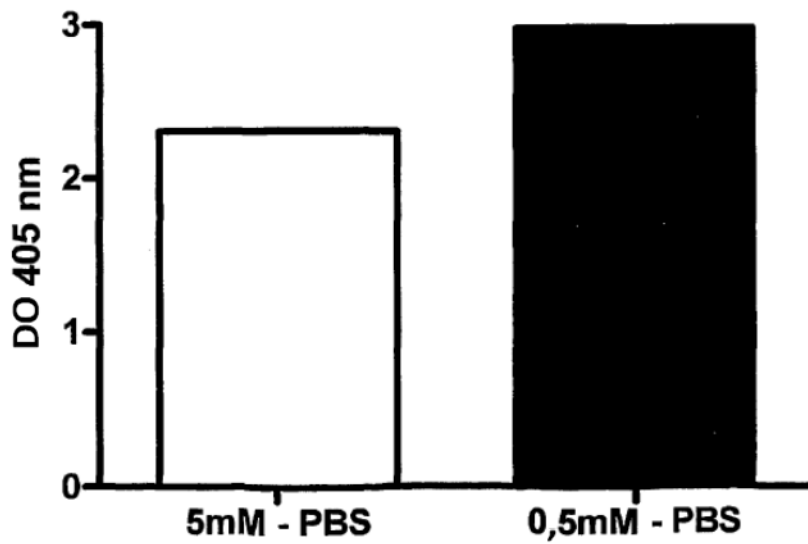


FIGURA 16E

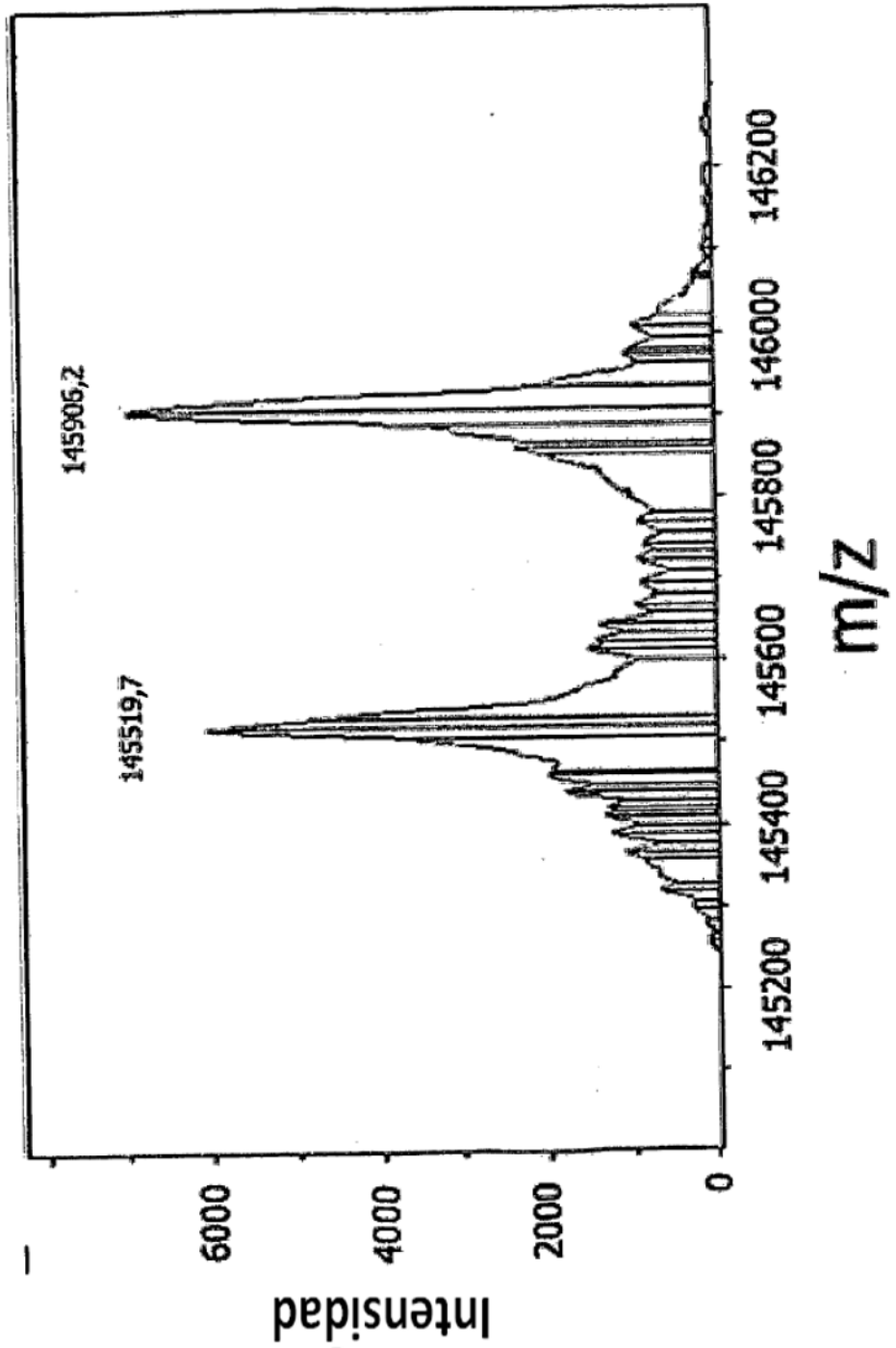


FIGURA 16F

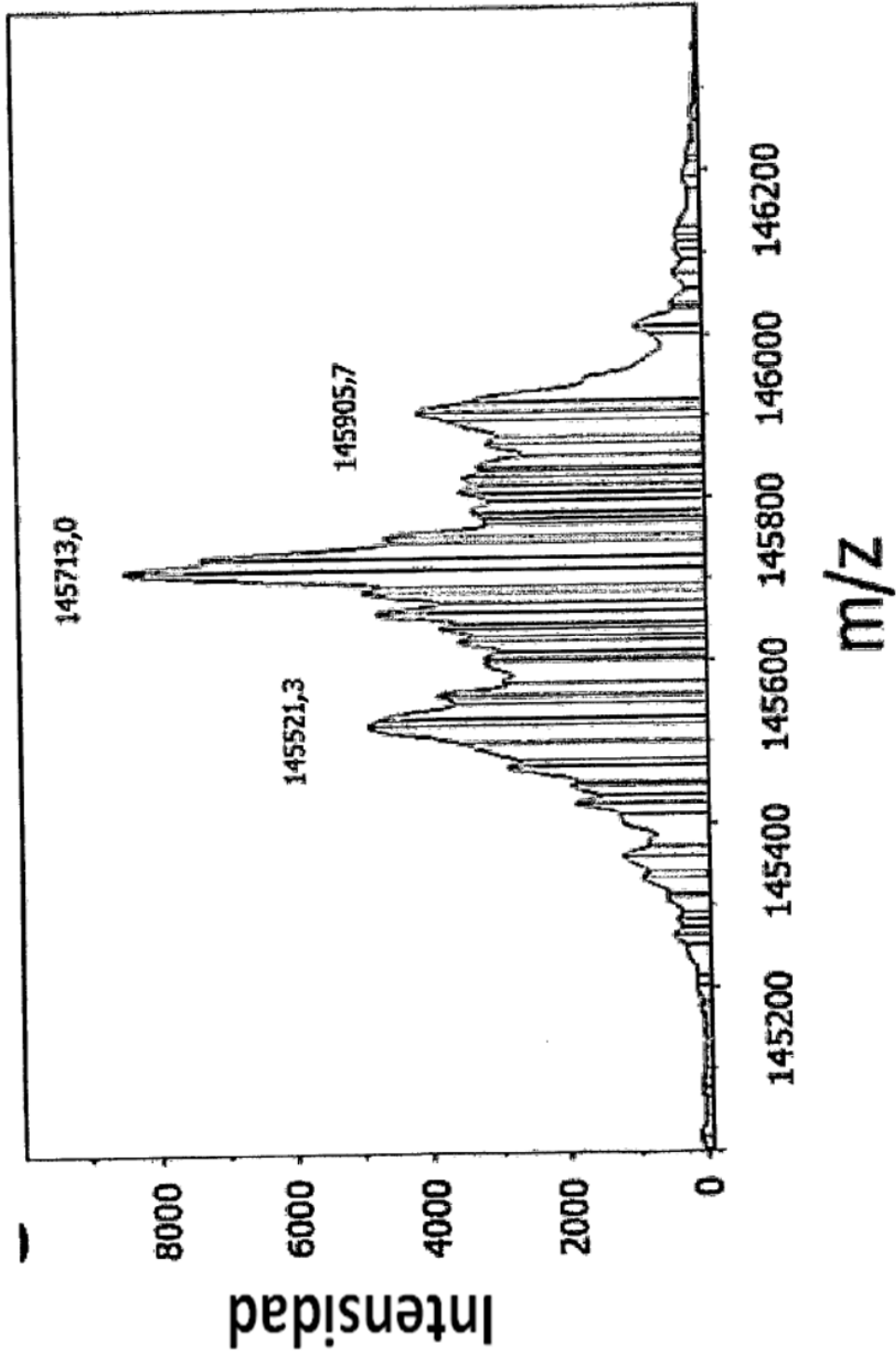


FIGURA 17A

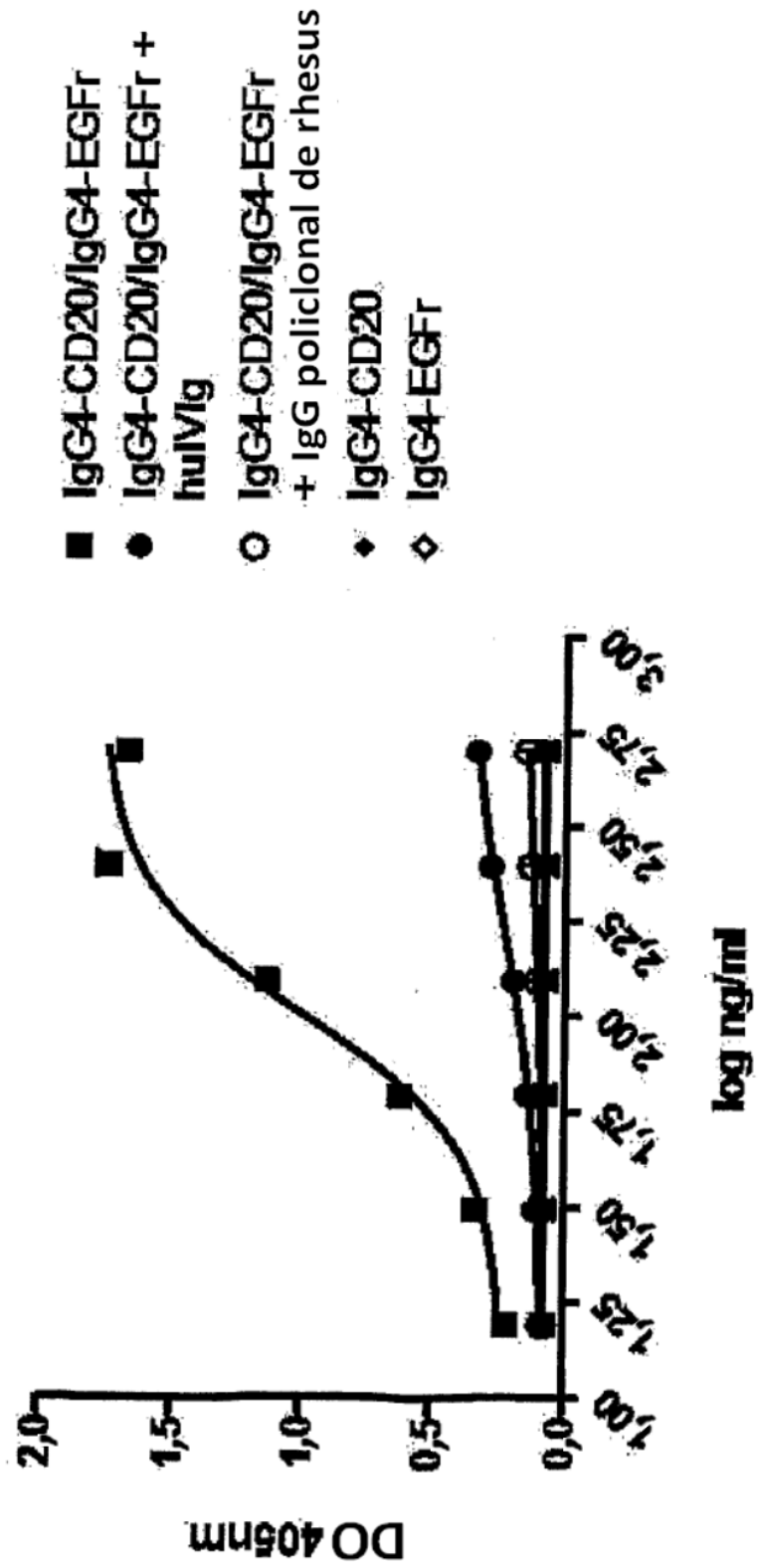


FIGURA 17B

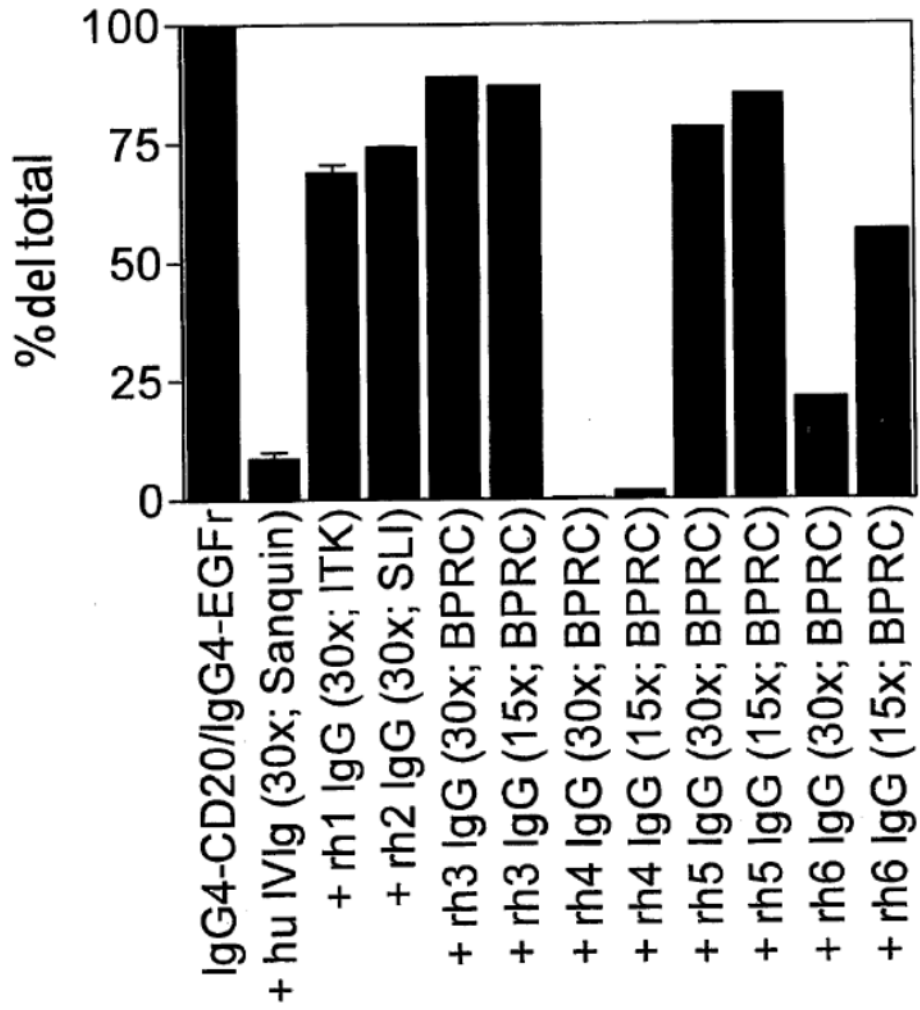


FIGURA 17C

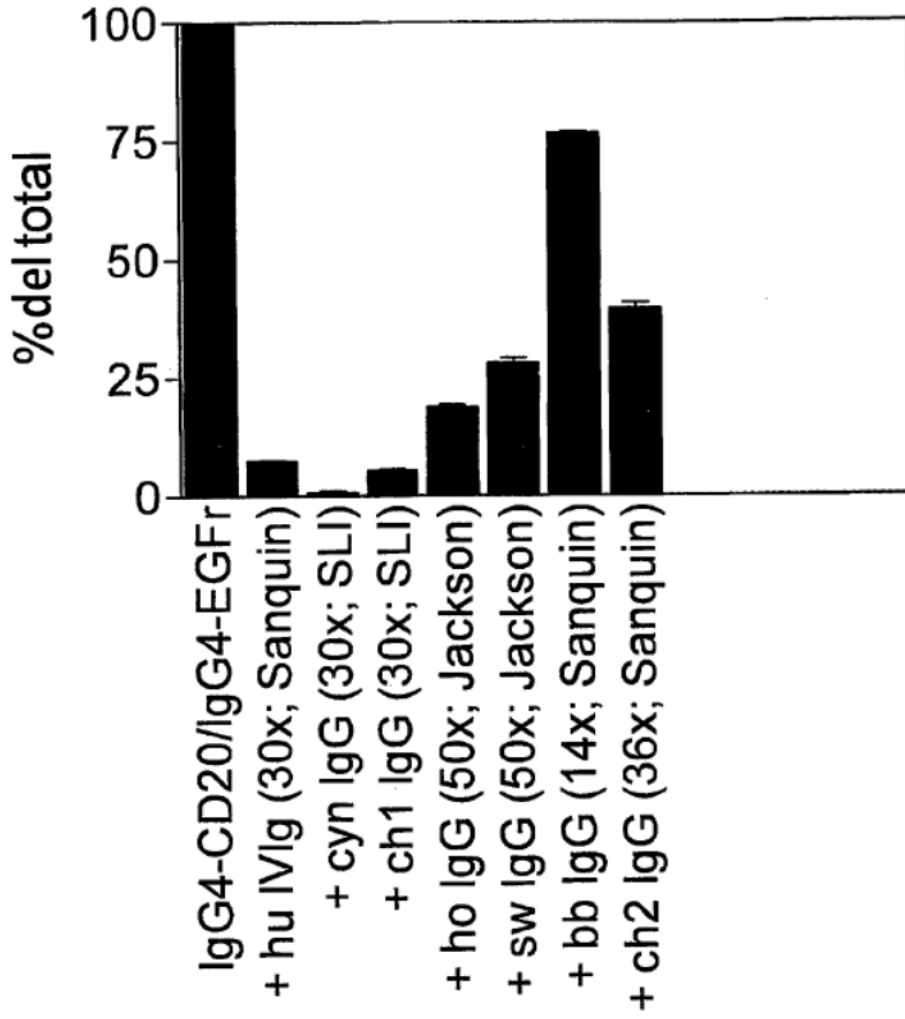


FIGURA 18

SEQ ID NO: 19: secuencia de aa la región constante de IgG1(registro n° P01857)

1 astkgpsvfp lapSskstsg gtaalgclvk dyfpepvtvs wnsгалtsgv
 51 htfpavlqss glyslssvvt vpssslgtqt yicnvnhkps ntkvdkkvep
 101 kscdkthtctcp pcpapellgg psvflfppkp kdtlmisrtp evtcvvvdvs
 151 hedpevkfnw yvdgvevhna ktkpreeqyn styrvsvlt vlhqdwlngk
 201 eykckvsnka lpapiektis kakgqprepq vytlppsRX₄e X₅tknqvsltc
 251 lvkgfyfypsdi avewesngqp ennykttppv ldsdgsffly sKltvdksrw
 301 qQgnvfscsv mhealthnhyt qkslslsPgk

donde X₄ es D o E y X₅ es L o M

SEQ ID NO: 20: secuencia de aa la región constante de IgG2 (registro n° P01859)

1 astkgpsvfp lapcsrstse staalgclvk dyfpepvtvs wnsгалtsgv
 51 htfpavlqss glyslssvvt vpssnfgtqt ytcnvdhkps ntkvdktkver
 101 kccvecppcp appvagpsvf lfppkpkdtl misrtpevtc vvvvdvshedp
 151 evqfnwyvdg vevhnaktkp reeqfnstfr vsvltvvhq dwlngkeykc
 201 kvsnkglpap iektisktk gprepqvytl ppsReemtkn qvsltclvkq
 251 fyfypsdiave esngqpenny ktppMldsd qsflyysKlt vdksrwqQgn
 301 vfscsvmhea lhnhytqksl slsPgk

SEQ ID NO: 21: secuencia de aa de la región constante de IgG3 (registro n° A23511)

1 astkgpsvfp lapcsrstsg gtaalgclvk dyfpepvtvs wnsгалtsgv
 51 htfpavlqss glyslssvvt vpssslgtqt ytcnvnhkps ntkvdkrvel
 101 ktplgdtht cprcpepksc dtpppcprcp epkscdtppp cprcpepksc
 151 dtpppcprcp apellggpsv flfppkpkdt lmisrtpevt cvvvdvshed
 201 pevqfkwyvd gvevhnaktk preeqfnstf rvsvltvlh qdwlngkeyk
 251 ckvsnkcalpa piektisktk gprepqvytl lppsReemtkn qvsltclvk
 301 gfypsdiave wesSgqpenn yNtppMlds dgsfflyysKl tvdksrwqQg
 351 nIfscsvmhe alhnRftqks lslsPgk

SEQ ID NO: 22: secuencia de aa de la región constante de IgG4

1 ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSKV
 51 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES
 101 KYGPPCPSCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSDQED
 151 PEVQFNWYVD GVEVHNÁKTK PREEQFNSTY RVSVLTVLH QDWLNGKEYK
 201 CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GOPREPOVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK
 251 GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG
 301 NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK

FIGURA 19A

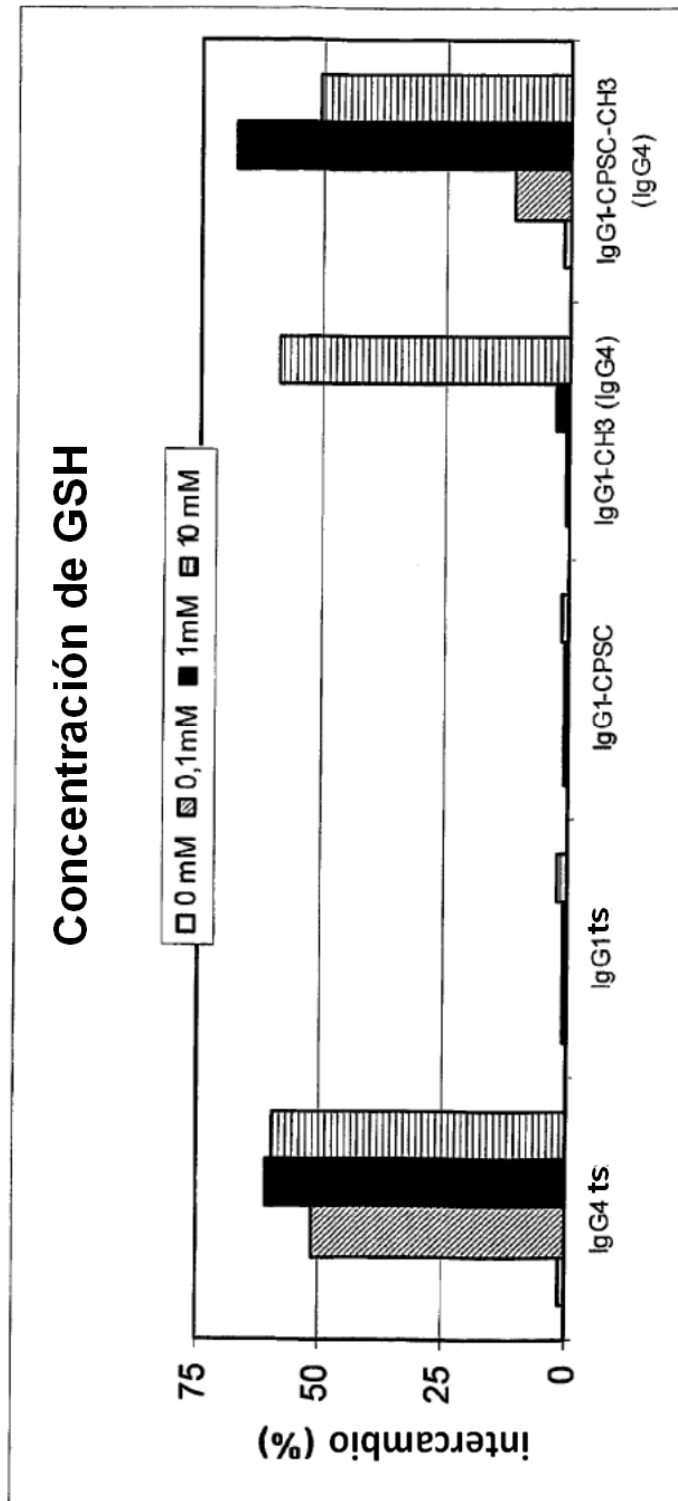


FIGURA 19B

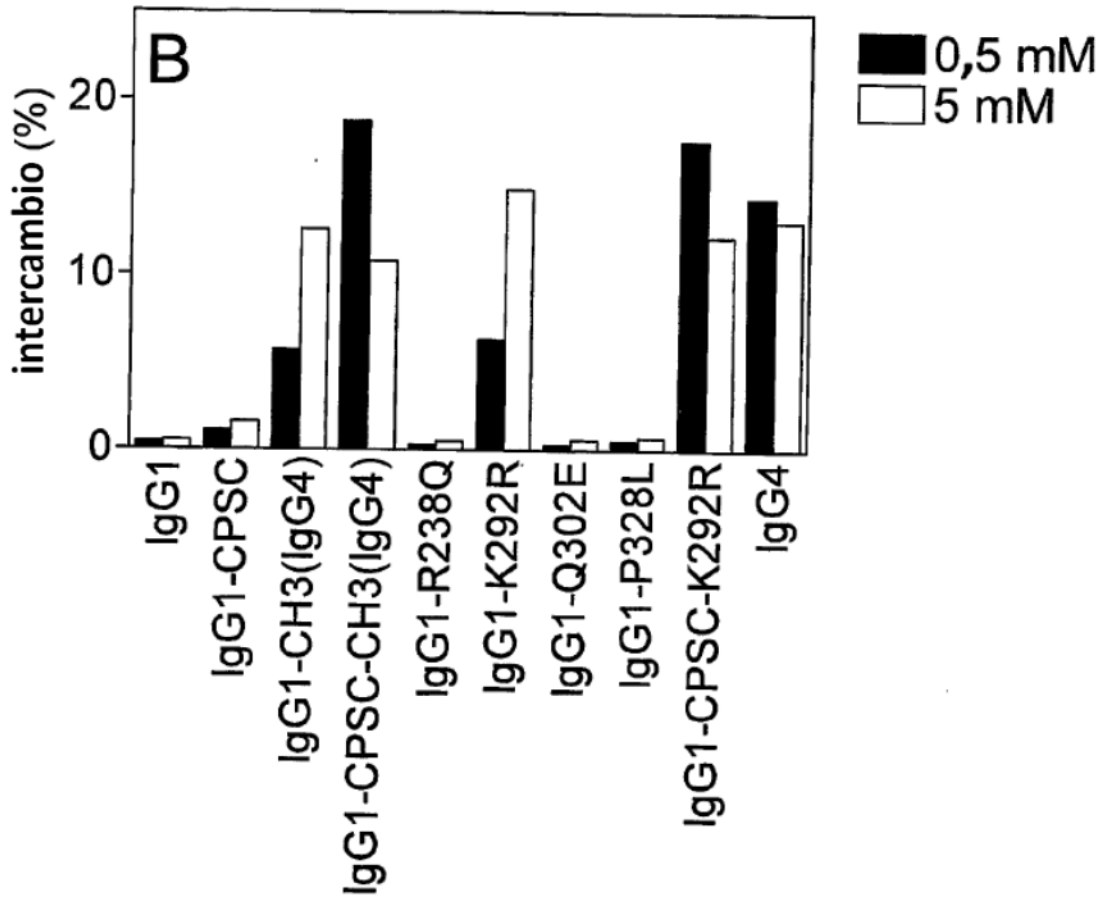


FIGURA 19C

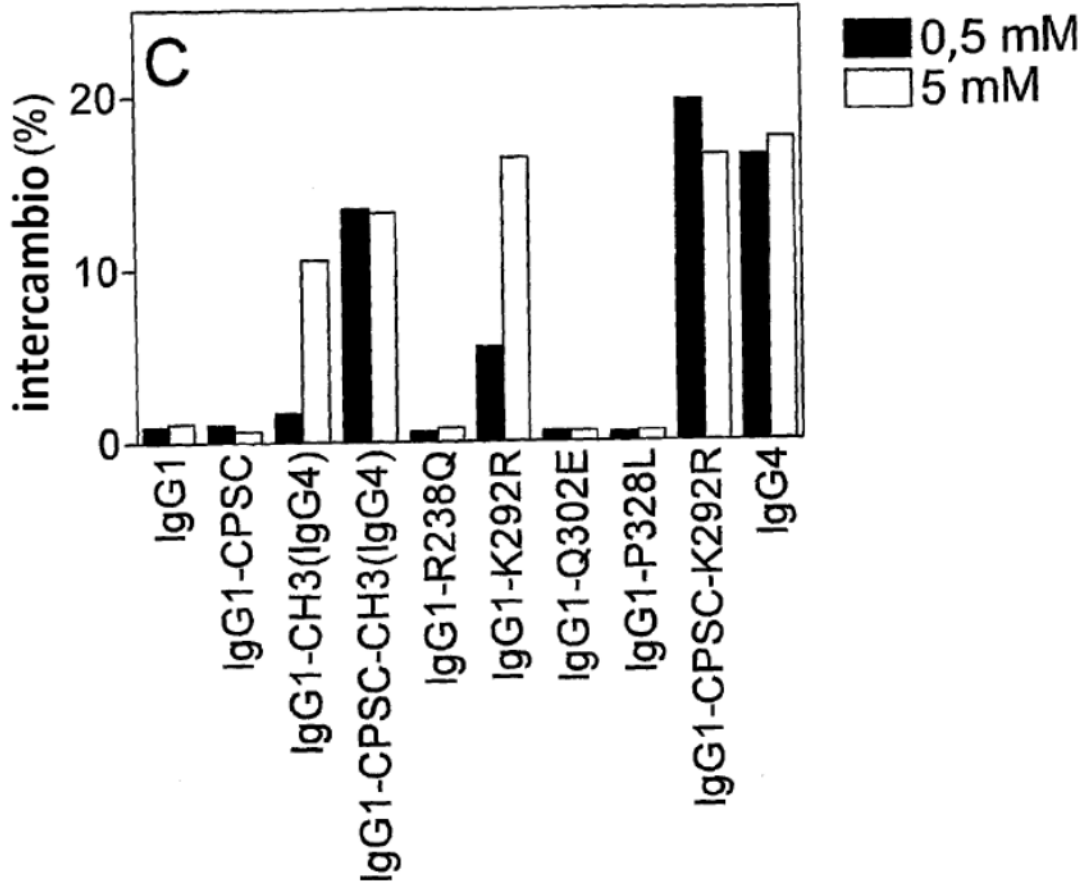


FIGURA 20A

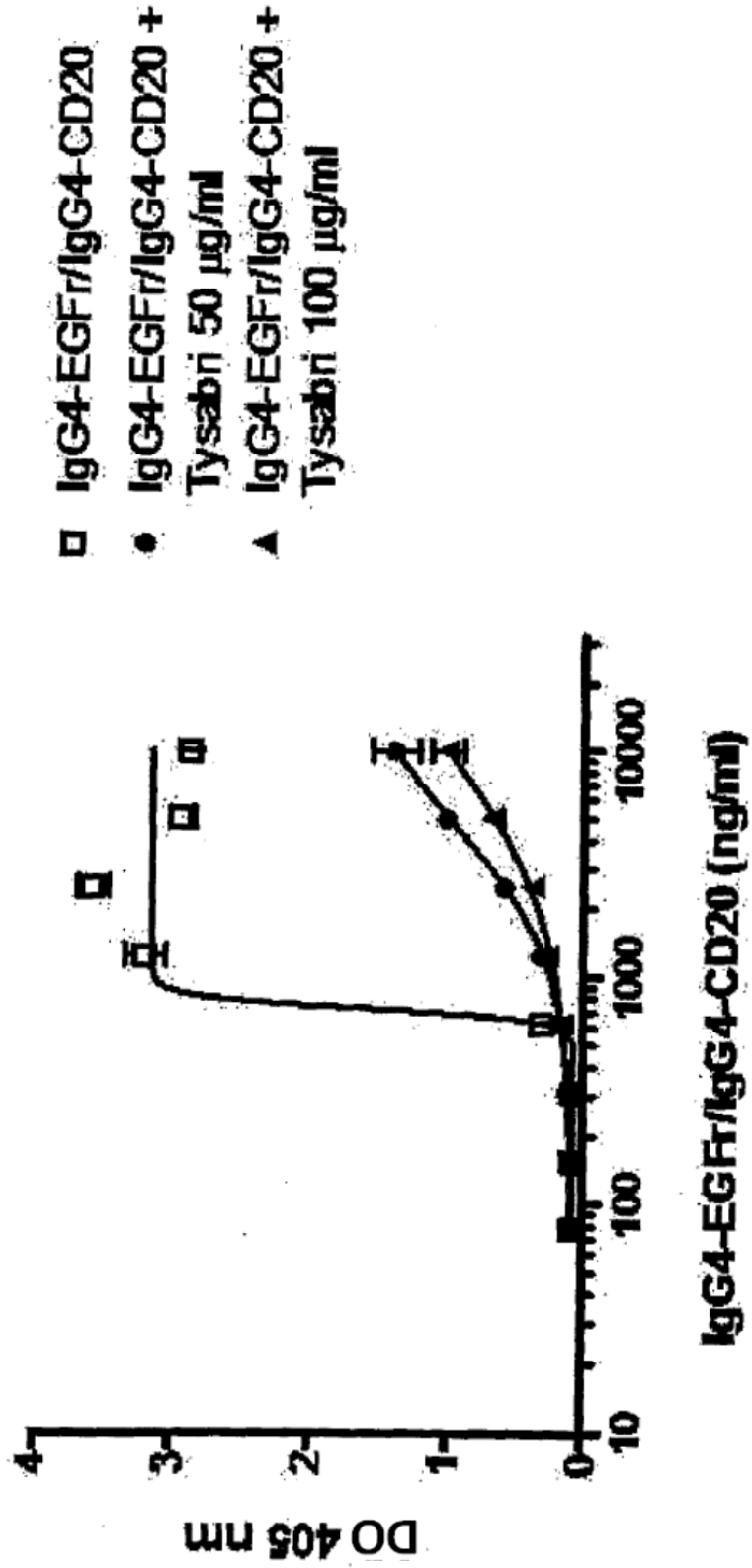


FIGURA 20B

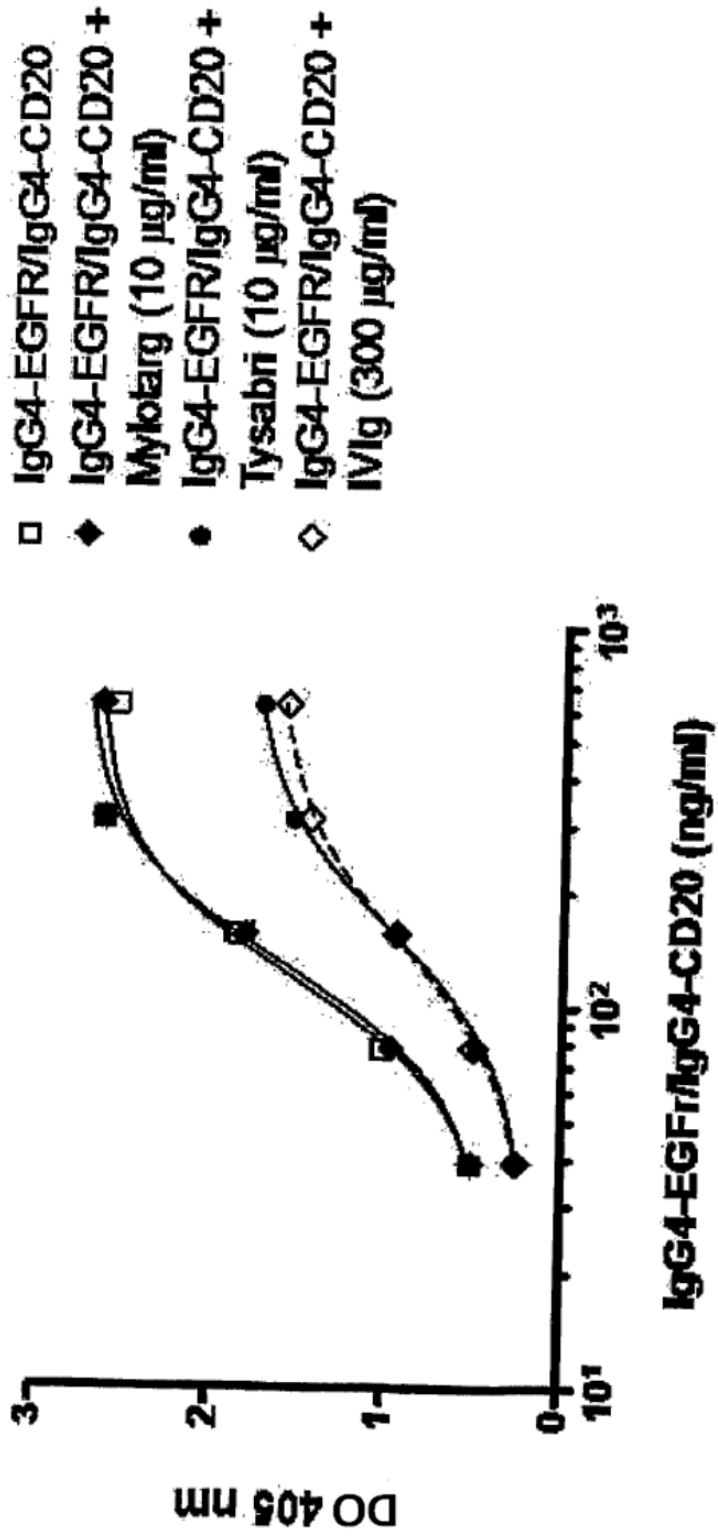


FIGURA 21

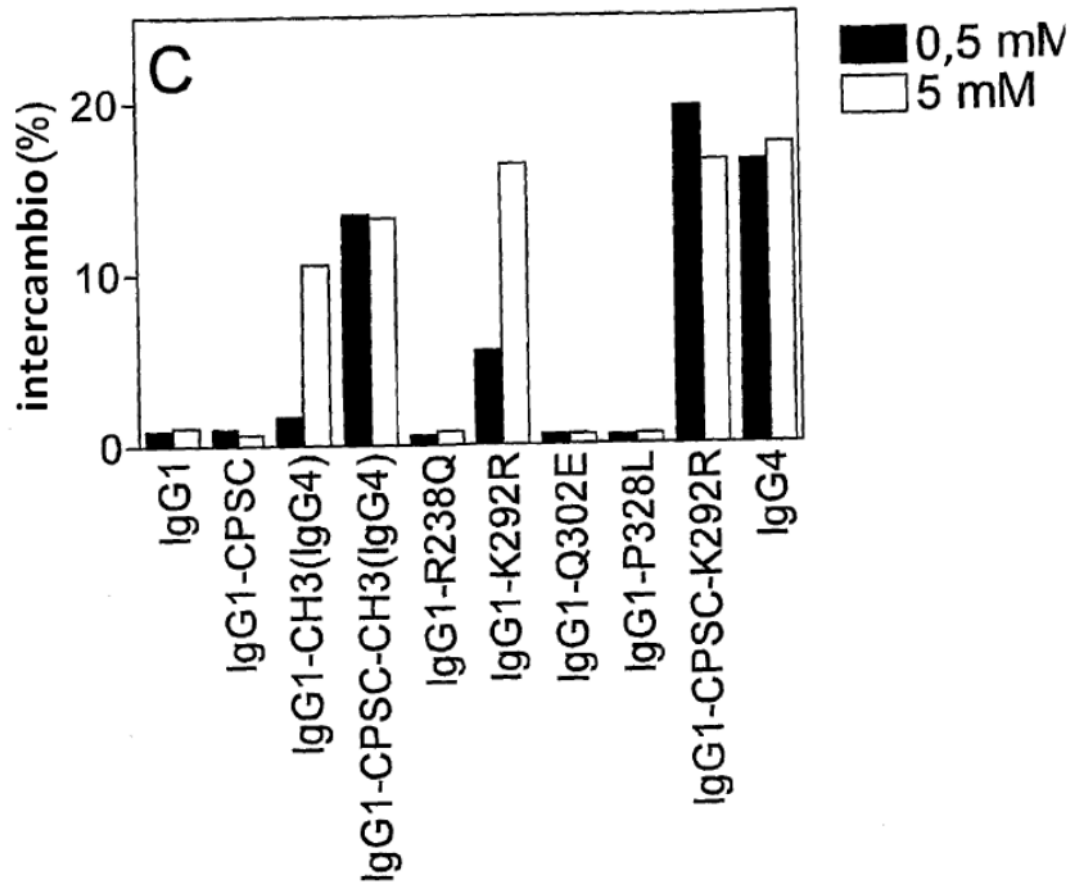


FIGURA 22A

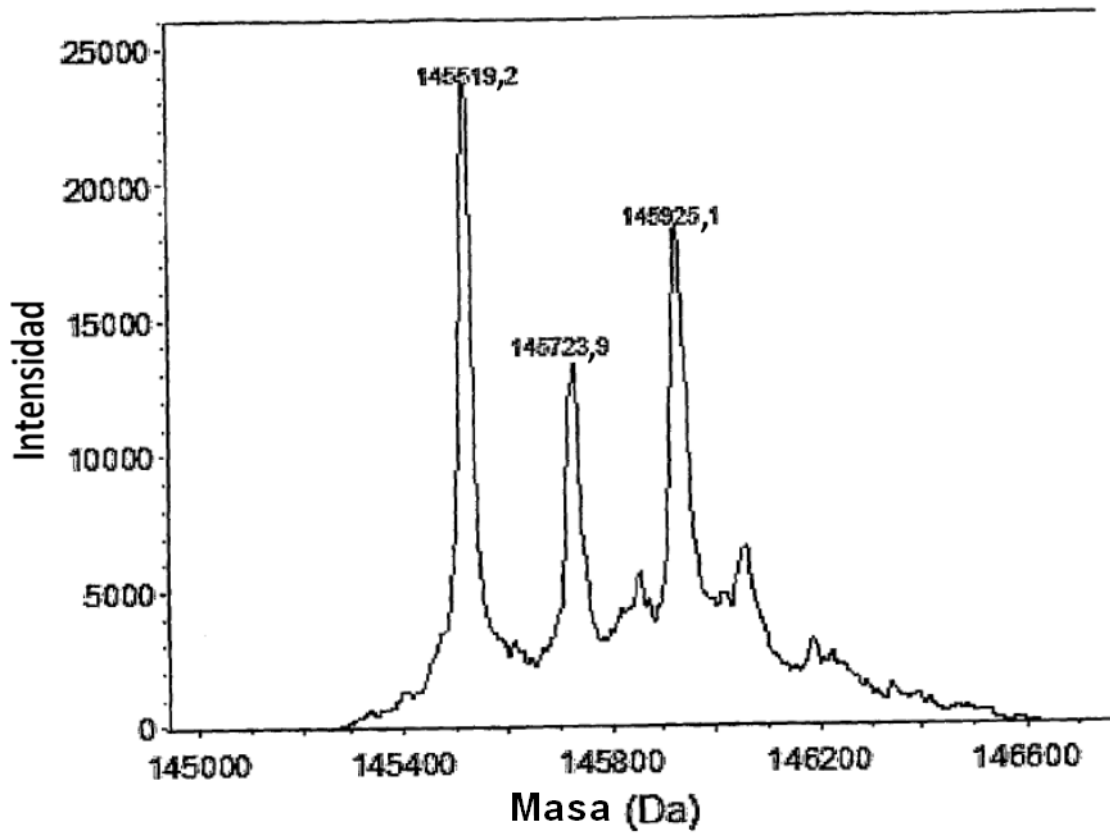


FIGURA 22B

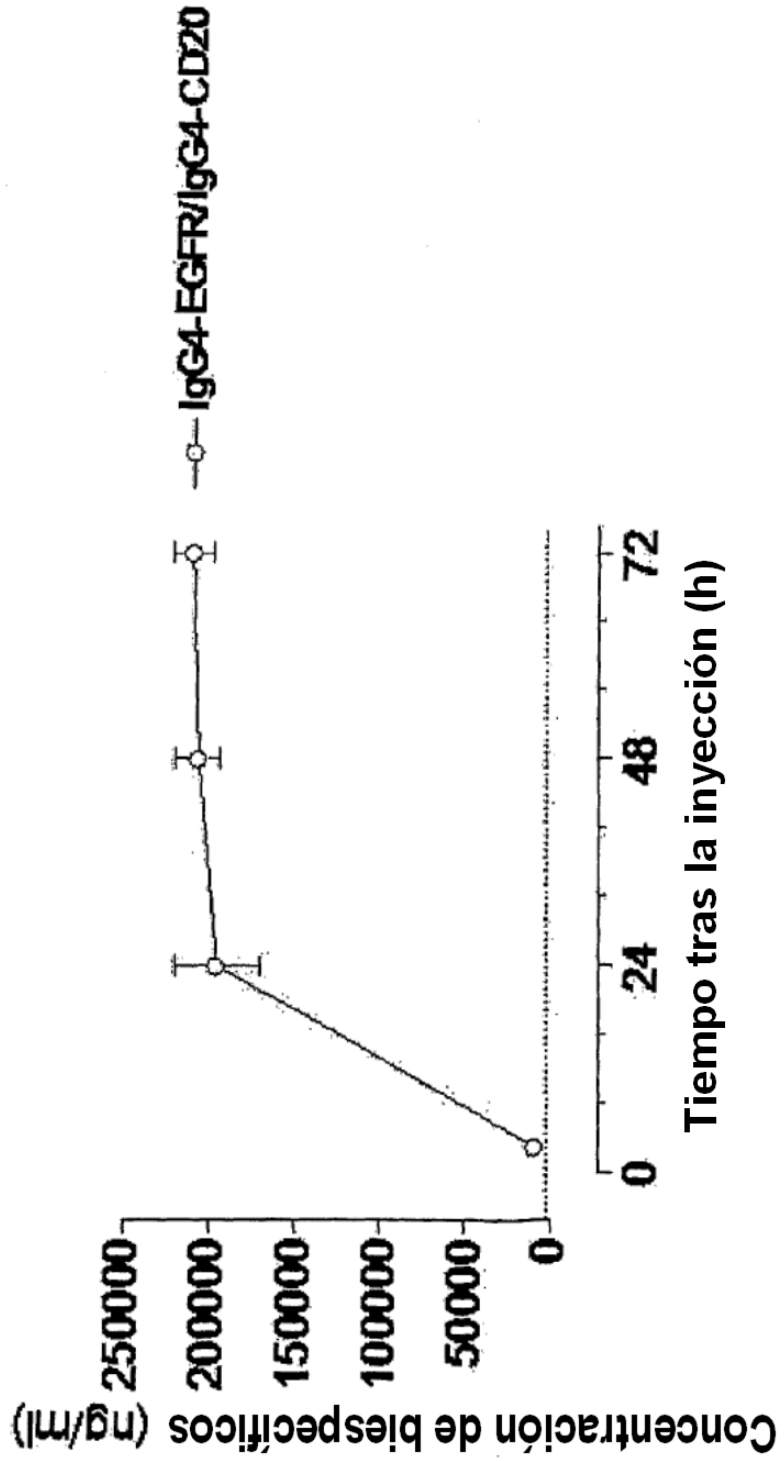


FIGURA 23

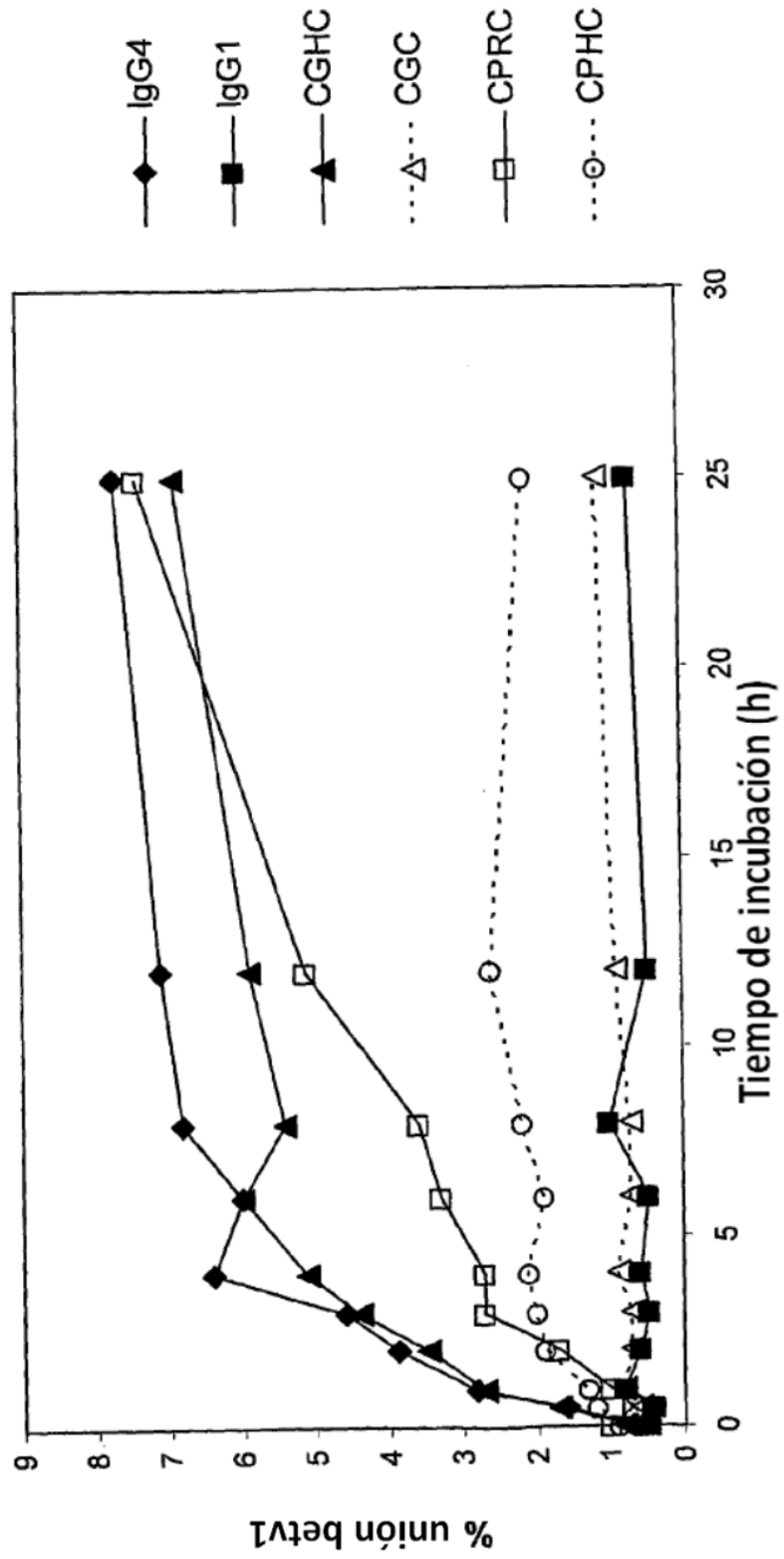


FIGURA 24

