

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 599 503**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.02.2013 PCT/EP2013/053614**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.08.2013 WO13124450**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.02.2013 E 13705504 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.07.2016 EP 2817332**

54 Título: **Anticuerpos biespecíficos IgG4 de secuencia simétrica modificada**

30 Prioridad:

22.02.2012 GB 201203051

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

02.02.2017

73 Titular/es:

**UCB BIOPHARMA SPRL (100.0%)
Allée de la Recherche 60
1070 Brussels , BE**

72 Inventor/es:

**HUMPHREYS, DAVID, PAUL y
PETERS, SHIRLEY, JANE**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 599 503 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 IgG4 de secuencia simétrica modificada

5 La presente invención se refiere a un anticuerpo IgG4 biespecífico que tiene una disposición alterada de los enlaces disulfuro en comparación con un anticuerpo de tipo salvaje y a un método para producir el anticuerpo mejorado. En un aspecto adicional la presente descripción proporciona un método eficaz para preparar anticuerpos biespecíficos.

10 La industria biofarmacéutica que incluye proteínas recombinantes, anticuerpos monoclonales (mAb) y fármacos basados en ácidos nucleicos está creciendo rápidamente. La modificación genética de anticuerpos ha dado como resultado el diseño y la producción de fragmentos de anticuerpos o formatos alternativos. El formato molecular preferido junto con otros aspectos tales como el rendimiento de producción, la calidad de la proteína y la estabilidad de almacenamiento se tienen en cuenta cuando se selecciona una proteína basada en anticuerpos como agente terapéutico.

15 La estructura básica de todas las moléculas de inmunoglobulina (Ig) comprende dos cadenas pesadas idénticas (HC) y dos cadenas ligeras idénticas (LC) que están acopladas por medio de enlaces disulfuro. Cada LC consiste en un dominio variable (V_L) y uno constante (C_L). Basándose en la HC, se reconocen cinco clases de Ig principales: IgG, IgA, IgD, IgE e IgM. Para la IgG, la HC consiste en un dominio variable (V_H) y tres dominios constantes (C_{H1-3}). Los dominios C_{H2} y C_{H3} forman la porción Fc de la molécula que es responsable de la estimulación de la función efectora y está conectada al fragmento Fab (V_HV_L y $C_{H1}C_L$) por medio de una región bisagra que confiere flexibilidad a la molécula de IgG. Dos sitios de reconocimiento de antígeno se encuentran localizados en los extremos de los dominios V_L y V_H . La IgG está subdividida adicionalmente en 4 isotipos diferentes: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

20 Las funciones efectoras mediadas por Fc, es decir, la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC) o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) son dependientes del isotipo. Cada isotipo ha evolucionado para realizar una función específica en el organismo. El isotipo IgG1 es actualmente el más ampliamente utilizado como agente terapéutico debido a su prolongada vida media, a su mayor activación de la ADCC y activación del complemento. Otros isotipos se emplean como agentes terapéuticos según sea apropiado para la diana y el efecto deseado. Por ejemplo, cuando los antígenos diana simplemente van a ser neutralizados y las funciones efectoras son menos importantes, se pueden utilizar isotipos alternativos tales como IgG2 e IgG4. Alternativamente, se puede considerar la IgG con un Fc/función efectora re-modificado genéticamente.

La IgG2 también tiene una función efectora asociada mínima pero es propensa a la dimerización, que no se comprende completamente.

30 La IgG4 sigue siendo un isotipo útil debido a su relativa carencia de inducción de la función efectora. Sin embargo, la IgG4 también tiene algunas dificultades prácticas inherentes, a saber su corta vida media en suero y su capacidad para experimentar un "intercambio del brazo Fab" (también referido como intercambio dinámico de cadena pesada o intercambio de cadena pesada), en donde la cadena pesada y su cadena ligera anclada de un anticuerpo se intercambian por la cadena pesada y su cadena ligera anclada de otro anticuerpo para formar otro anticuerpo completo compuesto por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras ancladas (van der Neut Kofschoten et al., 2007 Science 317, 1554-1557).

40 El intercambio del brazo Fab *in vivo*, da como resultado anticuerpos biespecíficos que, debido a sus diferentes dominios variables, pueden interactuar simultáneamente con distintos antígenos diana. Esto produce un gran porcentaje de IgG4 circulante que se ha observado que es biespecífica, pero funcionalmente monovalente. (Schuurman, J., Van Ree, R., Perdok, G.J., Van Doorn, H.R., Tan, K.Y., Aalberse, R.C., 1999. La inmunoglobulina G4 humana normal puede ser biespecífica: tiene dos sitios de combinación con el antígeno diferentes. Immunology 97, 693-698).

45 *In vitro*, cuando se analizan los anticuerpos IgG4 por medio de SDS-PAGE no reductora, se ha observado que forman las denominadas 'hemimoléculas' que comprenden cada una un único par de cadenas pesada-ligera asociadas covalentemente ocasionadas por la ausencia de enlaces disulfuro entre cadenas pesadas debido típicamente a la formación de enlaces disulfuro entre cadenas pesadas dentro de la región bisagra. La cadena pesada de una "hemimolécula" puede asociarse no covalentemente con su cadena pesada emparejada compañera, manteniéndose la asociación por interacciones de dominio CH3:CH3. En solución, tales "hemimoléculas" se observan realmente utilizando métodos tales como la cromatografía de exclusión por tamaños a tamaño real, que es de aproximadamente 150 kDa, pero en una SDS-PAGE no reductora están formadas por emparejamientos LH:CH de 75 kDa (denominados "hemimoléculas").

55 Una mutación de Ser a Pro en la posición 241 (numerada de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat) en la bisagra reduce la aparición de estas "hemimoléculas" por una SDS-PAGE no reductora (Angal, S. et al., 1993. Una única sustitución de aminoácido anula la heterogeneidad del anticuerpo (IgG4) ratón/humano quimérico observada durante el análisis de SDS-PAGE Mol Immunol 30, 105-108). Además, esta mutación puntual no influye en la estructura compacta de IgG4 permitiendo de ese modo que IgG4 conserve su capacidad para activar el complemento.

Después del descubrimiento de la mutación S241P, se han investigado otras mutaciones en IgG4 con el fin de comprender la interacción entre cadenas pesadas en los anticuerpos IgG4, reducir la función efectora de IgG4 y potenciar la estabilidad estructural. En Schuurman et al. (Schuurman, J et al., 2001. The inter-heavy chain disulphide bonds of IgG4 are in equilibrium with intra-heavy chain disulphide bonds. *Molecular Immunology* 38, 1-8), se investigó la inestabilidad observada de los enlaces disulfuro entre cadenas pesadas de IgG4 utilizando mutantes de IgG4. En el mutante M1, la Cys 131 (numerado de acuerdo con el sistema de numeración de EU o Cys 127 de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat), que está implicada en el enlace disulfuro entre cadena pesada-ligera (C_L-C_{H1}), se reemplazó por serina y se encontró que este mutante daba como resultado la formación de dímeros de cadenas ligeras y dímeros de cadenas pesadas. En el mutante M2, la cisteína 226 (226 numerada de acuerdo con el sistema de numeración EU o 239 de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat), que está implicada en el enlace disulfuro entre cadenas pesadas en la bisagra, se reemplazó por serina y se encontró que este mutante tenía una conexión entre cadenas pesadas más estable en comparación con IgG4 y evitaba la formación de un enlace disulfuro entre cadenas pesadas.

Las mutaciones en los dominios C_{H2} y C_{H3} de los anticuerpos IgG4 también han sido investigadas con el fin de reducir la formación de productos agregados de anticuerpos IgG4. En el documento US 2008/0063635 Takahashi et al. han investigado un mutante de IgG4 en el que la arginina de la posición 409 (numerada como 409 de acuerdo con el sistema de numeración EU o numerada como 440 de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat) en el dominio CH3 es sustituida por lisina, treonina, metionina o leucina con el fin de inhibir la formación de productos agregados a pH bajo. También se ilustran otras mutaciones en L235, D265, D270, K322, P329 y P331 (L235, D265, D270, K322, P329 y P331 numeradas de acuerdo con el sistema de numeración EU o L248, D278, D283, K341, P348 y P350 numeradas de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat) con el fin de atenuar la actividad CDC. En el documento WO2008/145142 Van de Winkel et al. describen anticuerpos IgG4 estables que tienen una capacidad reducida para experimentar el intercambio de brazo Fab por sustitución del residuo de arginina en la posición 409, el residuo de Phe en la posición 405 o la Lys en la posición 370 (R409, F405 y K370 numerados de acuerdo con el sistema de numeración EU o R440, F436 y K393 numerado de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat) incluso en ausencia de la mutación S228P (S228 numerado de acuerdo con el sistema de numeración EU o S241 de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat) en la región bisagra.

La presente invención proporciona nuevos anticuerpos mutantes que tienen propiedades ventajosas incluyendo mejores propiedades físicas en comparación con los anticuerpos de tipo salvaje, en particular anticuerpos IgG4 de tipo salvaje y fragmentos. En particular se ha descubierto sorprendentemente que un cambio de localización del residuo de cisteína de la cadena pesada de un anticuerpo IgG4 que forma un enlace disulfuro con una cisteína de la cadena ligera proporciona un anticuerpo IgG4 que tiene una estabilidad mejorada en comparación con un anticuerpo IgG4 de tipo salvaje. También se ha descubierto que los anticuerpos IgG4 mutantes son capaces de formar anticuerpos biespecíficos con propiedades de intercambio del brazo Fab ventajosas.

El intercambio de los brazos Fab *in vitro* puede ser promovido empleando concentraciones elevadas de anticuerpos y/o empleando estimulantes químicos tales como glutatión para generar un formato biespecífico que sea estable y adecuado para su uso como agente terapéutico. Esto tiene aplicación en el campo de los productos biológicos farmacéuticos debido a que las entidades biespecíficas pueden ser difíciles de expresar como un único constructo.

Compendio de la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo biespecífico de la clase IgG4 que comprende dos cadenas pesadas que comprenden cada una una región variable, un dominio C_{H1} y una región bisagra, en donde en cada cadena pesada:

a. la cisteína de la posición 127 del dominio C_{H1} , numerada de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat, forma un enlace disulfuro inter-catenario con

una cisteína de la cadena ligera es sustituida por un aminoácido que no contiene tiol; y

b. uno o más aminoácidos situados en la región bisagra superior es sustituido por cisteína,

en donde la secuencia de la región constante de cada cadena pesada es similar o idéntica y la región variable de cada cadena pesada es diferente.

Los uno o más aminoácidos situados en la región bisagra superior que son sustituidos por cisteína se pueden seleccionar entre 226, 227, 228, 229, 230, 237 y 238, numerados de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat, como se muestra en la Figura 1b (aminoácidos subrayados en la región bisagra superior). En una realización, los uno o más aminoácidos situados en la región bisagra superior que son sustituidos por cisteína son uno o más de los aminoácidos de las posiciones seleccionadas entre 227, 228, 229 y 230, numerados de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat, como se muestra en las Figuras 1b y 2a.

En una realización, una mutación a cisteína en la posición 229 reduce el intercambio del brazo Fab.

En una realización, se emplea una mutación a cisteína en la posición 230 combinada con una mutación en la

posición 241 a un aminoácido no polar, por ejemplo seleccionado entre prolina, alanina, glicina, isoleucina, fenilalanina, triptófano y valina.

En una realización, el brazo Fab se puede incrementar empleando una mutación a un residuo polar, por ejemplo seleccionado entre arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, histidina, lisina, treonina y tirosina, tal como treonina.

- 5 En una realización, se proporciona una mutación en la posición 241 a un aminoácido no polar, por ejemplo seleccionado entre prolina, alanina, glicina, isoleucina, fenilalanina, triptófano y valina.

En un aspecto adicional, la presente descripción también proporciona un anticuerpo biespecífico simétrico de la clase IgG4 que comprende dos cadenas pesadas que comprenden cada una una región variable, un dominio C_H1 y una región bisagra, en donde en cada cadena pesada::

- 10 a. la cisteína de la posición 127, numerada de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat, es sustituida por otro aminoácido; y
b. la cisteína de la posición 239 o la cisteína de la posición 242, numerada de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat, son sustituidas por otro aminoácido,

- 15 en donde la secuencia de la región constante de cada cadena pesada es similar o idéntica y la región variable de cada cadena pesada es diferente.

Los anticuerpos proporcionados por la presente invención no tienen función efectora y pueden mostrar propiedades ventajosas en comparación con un anticuerpo IgG4 de tipo salvaje, por ejemplo mejor estabilidad, tal como mejor estabilidad térmica.

- 20 Si bien no se desea estar limitado por la teoría, se teoriza que la bisagra modificada en los anticuerpos de acuerdo con la presente descripción alivia la constricción interna inherente a la molécula de IgG4 y de ese modo promueve una mayor estabilidad.

- 25 Los procedimientos naturales de intercambio de la cadena pesada pueden ser promovidos en anticuerpos IgG4 para facilitar la preparación de anticuerpos IgG4 biespecíficos de acuerdo con la presente descripción, por ejemplo *in vitro* empleando elevadas concentraciones de anticuerpos y/o empleando un estimulante químico del intercambio tal como glutatión.

- 30 Los anticuerpos de la presente descripción pueden resultar beneficiosos ya que tienen una mayor estabilidad que las moléculas de IgG4 de tipo salvaje y/o un mejor intercambio de la cadena pesada. Los anticuerpos de la presente invención pueden demostrar un intercambio de cadena pesada reducido en comparación con la IgG4 de tipo salvaje, que proporciona un anticuerpo biespecífico que demuestra poco o ningún intercambio con la IgG4 de tipo salvaje *in vivo* debido a su reducida propensión al intercambio en comparación con IgG4 y también debido a la concentración relativamente baja de un anticuerpo biespecífico *in vivo* en comparación con los anticuerpos IgG4 circulantes naturales.

- 35 Si bien no se desea estar limitado por la teoría, se piensa que el intercambio entre constructos de tipos similares a los descritos de acuerdo con la presente invención es más favorable que el intercambio entre un constructo de la presente descripción y una IgG4 de tipo salvaje.

- 40 Los anticuerpos biespecíficos de la presente invención pueden demostrar un intercambio de cadena pesada reducido a concentraciones mayores que las concentraciones *in vivo*, por ejemplo concentraciones 0,5 mM o menos en comparación con la IgG4 de tipo salvaje. Si bien los anticuerpos biespecíficos de la descripción demuestran un intercambio reducido de cadena pesada en comparación con la IgG4 de tipo salvaje, demuestran un grado de intercambio de cadena pesada, en comparación con IgG1 wt e IgG4 S241P, que es suficiente para crear el anticuerpo biespecífico a partir de dos anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas *in vitro*. La simetría de la región constante de los constructos de la presente memoria minimizan ventajosamente la tensión interna del anticuerpo y por lo tanto ayuda a la estabilidad.

- 45 Por consiguiente, la presente descripción también proporciona un método para generar un anticuerpo biespecífico simétrico

que comprende la etapa de mezclar un primer anticuerpo IgG4 con un segundo anticuerpo IgG4 *ex vivo*, en condiciones que conducen a un intercambio de cadena pesada, en donde las especificidades antigénicas de las regiones variables en el primer anticuerpo son diferentes de las especificidades antigénicas de las regiones variables en el segundo anticuerpo.

- 50 El método de la presente descripción permite la preparación eficaz de anticuerpos simétricos biespecíficos que emplean solamente técnicas rutinarias y estimulación de los procedimientos de origen natural.

Breve descripción de las Figuras

La **Figura 1a** muestra las secuencias de C_{H1} humano y de la bisagra de IgG1 de tipo salvaje e IgG4 de tipo salvaje, en donde los residuos de la bisagra están subrayados, y la secuencia constante de la cadena ligera kappa.

La **Figura 1b** muestra:

5 la secuencia constante de la cadena ligera kappa humana que indica la cisteína (subrayada) que forma el enlace disulfuro C_L-C_{H1} inter-catenario;

los residuos de C_{H1} N-terminales de las cadenas pesadas de IgG 1, 2, 3 y 4 humanas y las secuencias de la región bisagra en donde se indica la posición de la cisteína (en la bisagra superior para IgG1 y el C_{H1} N-terminal para la IgG 2, 3 y 4) (subrayada) que forma el enlace disulfuro C_L-C_{H1} intercatenario;

10 los residuos de C_{H1} N-terminales de la cadena pesada de IgD humana y parte de las secuencias de la región bisagra en donde se indica la posición de la cisteína en la secuencia de C_{H1} N-terminal (subrayada) que forma el enlace disulfuro C_L-C_{H1} intercatenario;

los residuos de C_{H1} N-terminal, C_{H1} C-terminal de la cadena pesada de IgM humana, y los residuos de C_{H2} N-terminal seleccionados en donde se indica la posición en el C_{H1} terminal (subrayado) que forma el enlace disulfuro C_L-C_{H1} inter-catenario; y

15 los residuos de la bisagra superior de IgG3 e IgG4, la bisagra de IgD y el C_{H1} y el C_{H2} C-terminales de IgM donde los residuos subrayados indican posiciones en las que uno o más residuos pueden ser sustituidos por cisteína en los anticuerpos de la presente invención.

20 La **Figura 2a** muestra el residuo de cisteína (C127) de C_{H1} que forma el enlace disulfuro intercatenario con una cisteína de la cadena ligera y los residuos de la bisagra superior y central de IgG1 de tipo salvaje, IgG4 de tipo salvaje y las posiciones en las que se han introducido mutaciones en los anticuerpos IgG4 de la presente invención.

La **Figura 2b** muestra el residuo de cisteína (C127) de C_{H1} que forma el enlace disulfuro inter-catenario con una cisteína en la cadena ligera y los residuos de la bisagra de IgG3 de tipo salvaje y las posiciones en las que uno o más residuos son sustituidos por cisteína en los anticuerpos IgG3 de la presente invención.

25 La **Figura 2c** muestra el residuo de cisteína (C127) de C_{H1} que forma el enlace disulfuro inter-catenario con una cisteína en la cadena ligera y residuos de C_{H1} y C_{H2} seleccionados de IgM de tipo salvaje y las posiciones en las que uno o más residuos son sustituidos por cisteína en los anticuerpos IgM de la presente invención.

La **Figura 2d** muestra el residuo de cisteína (C128) de C_{H1} que forma el enlace disulfuro inter-catenario con una cisteína en la cadena ligera y los residuos de la bisagra de IgD de tipo salvaje y las posiciones en las que uno o más residuos son sustituidos por cisteína en los anticuerpos IgD de la presente invención.

30 La **Figura 3a** muestra las mutaciones introducidas en los anticuerpos IgG4 de acuerdo con la presente invención.

La **Figura 3b** muestra las posiciones de los residuos en la cadena pesada mutada de los anticuerpos IgG4 mostrados en la Figura 3a y el enlace disulfuro pronosticado que puede formar con una cisteína en la cadena ligera (LC) o con otra cadena pesada mutada (HC). Cuando la cisteína puede unirse a una cisteína de LC o HC, la cadena subrayada es la disposición del enlace disulfuro predominante pronosticado.

La **Figura 4a** muestra las mutaciones introducidas en los anticuerpos IgG4 de acuerdo con la presente invención.

La **Figura 4b** muestra las posiciones de los residuos de cisteína en los anticuerpos IgG4 mostrados en la Figura 4a y el enlace disulfuro pronosticado que puede formar con una cisteína de la cadena ligera (LC) o la cadena pesada (HC). Cuando la cisteína se puede unir con una cisteína de LC o HC, la cadena subrayada es la disposición del enlace disulfuro predominante pronosticado.

La **Figura 5** muestra las secuencias de C_{H1} y la región bisagra de los anticuerpos IgG4 de acuerdo con la presente invención.

La **Figura 6** muestra las secuencias de C_{H1}, la región bisagra, C_{H2} y C_{H3} de los anticuerpos IgG4 de acuerdo con la presente invención.

45 La **Figura 7** muestra el análisis de Transferencia Western de los anticuerpos de acuerdo con la presente invención mostrando el gel superior los resultados utilizando un Anticuerpo Anti-Fc humano y mostrando el gel inferior los resultados utilizando un Anticuerpo Anti-Kappa.

La **Figura 8** muestra el análisis de Transferencia Western de anticuerpos de acuerdo con la presente invención mostrando el gel superior los resultados utilizando un Anticuerpo Anti-Fc humano y mostrando el gel inferior los resultados utilizando un Anticuerpo Anti-Kappa humano.

50

La **Figura 9** muestra el análisis de Transferencia Western de anticuerpos de acuerdo con la presente invención mostrando el gel superior los resultados utilizando un Anticuerpo Anti-Fc humano y mostrando el gel inferior los resultados utilizando un Anticuerpo Anti-Kappa humano.

5 La **Figura 10** muestra el análisis de Transferencia Western de un anticuerpo de acuerdo con la presente invención mostrando el gel superior los resultados utilizando un Anticuerpo Anti-Fc humano y mostrando el gel inferior los resultados utilizando un Anticuerpo Anti-Kappa humano.

La **Figura 11** muestra los resultados de un análisis Thermofluor de anticuerpos de la presente invención que muestra las termoestabilidades de Fab y el dominio C_H2.

10 La **Figura 12** muestra los resultados de un análisis Thermofluor de anticuerpos de la presente invención que muestra las termoestabilidades de Fab y el dominio C_H2.

La **Figura 13** muestra los resultados de un análisis Thermofluor de anticuerpos de la presente invención que muestra las termoestabilidades de Fab y el dominio C_H2.

La **Figura 14** muestra los resultados de un análisis Thermofluor de anticuerpos de la presente invención que muestra las termoestabilidades de Fab y el dominio C_H2.

15 La **Figura 15** muestra la clasificación de las Termoestabilidades de anticuerpos seleccionados de la presente invención.

La **Figura 16** muestra el intercambio de cadena pesada para IgG1 de tipo salvaje, IgG4 de tipo salvaje y diversos mutantes a dos concentraciones de GSH y en diversos puntos temporales.

20 La **Figura 17** muestra el intercambio de cadena pesada para IgG4 de tipo salvaje y diversos mutantes a dos concentraciones de GSH en diversos puntos temporales.

La **Figura 18** muestra el intercambio de cadena pesada para IgG4 de tipo salvaje y diversos mutantes a dos concentraciones de GSH en diversos puntos temporales.

La **Figura 19** muestra el cambio porcentual del intercambio de cadena pesada para diversos mutantes en GSH 0,5 mM en comparación con IgG4 de tipo salvaje.

25 La **Figura 20** muestra el cambio porcentual del intercambio de cadena pesada para diversos mutantes en GSH 5 mM en comparación con IgG4 de tipo salvaje.

30 La **Figura 21** muestra el análisis del intercambio de brazo simétrico de mutantes de IgG4 con residuos alternativos en la posición 241. IgG4 WT se intercambiaba más que IgG4 P. Las actividades de intercambio de S241G y S241A fueron similares entre sí y significativamente menores y aproximadamente la mitad de la de IgG4 WT. S241T se intercambió a niveles similares a los de IgG4 WT.

Breve descripción de las secuencias

Los SEQ ID NO: **1-223** muestran diversas bisagras.

El SEQ ID NO: **224** muestra una bisagra de IgG1 natural.

El SEQ ID NO: **225** muestra una bisagra de IgG4 natural.

35 El SEQ ID NO: **226** muestra la secuencia de CH1 y la región bisagra de un anticuerpo IgG1 de tipo salvaje.

El SEQ ID NO: **227** muestra la secuencia de CH1 y la región bisagra de un anticuerpo IgG4 de tipo salvaje.

El SEQ ID NO: **228** muestra una parte de la región constante de una cadena ligera kappa de tipo salvaje humana.

El SEQ ID NO: **229** muestra una secuencia de la bisagra inferior de IgG4 (descripción página 22)

El SEQ ID NO: **230** muestra una parte de la secuencia N-terminal del dominio C_H1 de un anticuerpo IgG1 humano.

40 El SEQ ID NO: **231** muestra la región bisagra de un anticuerpo IgG1 humano.

El SEQ ID NO: **232** muestra una parte de la secuencia N-terminal del dominio C_H1 de un anticuerpo IgG2 humano.

El SEQ ID NO: **233** muestra la región bisagra de un anticuerpo IgG2 humano.

El SEQ ID NO: **234** muestra una parte de la secuencia N-terminal del dominio C_H1 de un anticuerpo IgG3 humano.

El SEQ ID NO: **235** muestra la región bisagra de un anticuerpo IgG3 humano.

El SEQ ID NO: **236** muestra una parte de la secuencia N-terminal del dominio C_H1 de un anticuerpo IgG4 humano.

El SEQ ID NO: **237** muestra la región bisagra de un anticuerpo IgG4 humano.

El SEQ ID NO: **238** muestra una parte de la secuencia N-terminal del dominio C_H1 de un anticuerpo IgGD humano.

El SEQ ID NO: **239** muestra una parte de la región bisagra de un anticuerpo IgGD humano.

5 El SEQ ID NO: **240** muestra una parte de la secuencia N-terminal del dominio C_H1 de un anticuerpo IgGM humano.

El SEQ ID NO: **241** muestra una parte de la secuencia C-terminal del dominio C_H1 de un anticuerpo IgGM humano.

El SEQ ID NO: **242** muestra una parte del dominio C_H2 de un anticuerpo IgGM humano.

10 Los SEQ ID NO: **243** a **278** muestran las secuencias del dominio C_H1 y la región bisagra de los anticuerpos 6, 7, 8, 15, 16, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 44, 45, 46, 47, 2, 3, 48, 28P, 44P, 1, 4, 5, 5P, 9, 10, 11, 12, 13 y 14 respectivamente.

El SEQ ID NO: **279** muestra las secuencias de los dominios C_H2 y C_H3 de IgG4 de tipo salvaje.

El SEQ ID NO: **280** muestra las secuencias del dominio C_H2 de IgG4 de tipo salvaje y del dominio C_H3 de IgG1 de tipo salvaje.

15 Los SEQ ID NO: **281** a **306** muestran las secuencias del dominio C_H1, la región bisagra, el dominio C_H2 y el dominio CH3 de los anticuerpos 6, 7, 8, 15, 16, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 44, 45, 46, 47, 2, 3, 48, 28P y 44P respectivamente.

Los SEQ ID NO: **306** a **316** muestran las secuencias del dominio C_H1, la región bisagra, el dominio C_H2 y el dominio C_H3 de los anticuerpos 1, 4, 5, 5P, 9, 10, 11, 12, 13 y 14 respectivamente.

Los SEQ ID NO: **317**, **318**, **320** y **321** muestran diversas secuencias de bisagras.

20 El SEQ ID NO: **319** es una localización en la secuencia del anticuerpo.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención

A continuación se describirá la presente invención con más detalle.

Un anticuerpo simétrico utilizado en la presente memoria es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo en donde las cadenas pesadas tienen una secuencia similar o idéntica en la región externa de las regiones variables.

25 Similar según se emplea en la presente memoria consiste en una secuencia de aminoácidos que es idéntica en 95% o más a lo largo de toda la secuencia analizada, por ejemplo idéntica en 96, 97, 98 o 99%. El porcentaje de identidad se puede evaluar utilizando un soporte lógico conocido por los expertos en la técnica.

Idéntico según se emplea en la presente memoria hace referencia a la existencia de una identidad de secuencia de 100% a lo largo de la secuencia analizada, por ejemplo a lo largo de toda la secuencia.

30 En una realización, las secuencias de la cadena pesada de los anticuerpos de la presente descripción están conectadas covalentemente, por ejemplo a través de un enlace disulfuro intercatenario, por ejemplo un enlace que está presente naturalmente en el correspondiente fragmento de tipo salvaje o un enlace que ha sido modificado genéticamente para que esté presente en la localización deseada en las cadenas.

35 En un aspecto, los anticuerpos de la presente descripción se caracterizan porque ambas secuencias de las cadenas pesadas o fragmentos tienen una bisagra de tipo IgG1.

La bisagra superior y central de IgG1 de tipo salvaje tiene la secuencia EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: **224**).

La bisagra superior y central de IgG4 de tipo salvaje tiene la secuencia EPKYGPPCPSCP (SEQ ID NO: **225**).

40 Se pretende que la bisagra de tipo IgG1 empleada en la presente memoria haga referencia al caso en el que uno o más, por ejemplo de 1 a 5, tal como 1, 2 o 3 aminoácidos se insertan en la bisagra de IgG4, en particular entre EPKYGPP (SEQ ID NO: **319**) y CPSC y/o uno o más de los aminoácidos YGPP de la bisagra de IgG4 se remplazan, por ejemplo para que correspondan a un aminoácido de la bisagra de IgG1, en particular se reemplaza G (de YGPP en la bisagra de IgG4) por C o se reemplaza Y (de YGPP en la bisagra de IgG4) por C o S.

De este modo la presente descripción también proporciona un anticuerpo inespecífico simétrico que comprende

45 cadenas pesadas de IgG4 con una bisagra superior, central y bisagra inferior, en donde dicha bisagra superior y central en la cadena pesada o cada cadena pesada en ella tiene una longitud de 13 a 17, tal como 15 aminoácidos.

ES 2 599 503 T3

En una realización el anticuerpo biespecífico simétrico con una primera cadena pesada de IgG4 tiene una bisagra superior y central de 15 aminoácidos de longitud.

5 En una realización la bisagra superior y central de las cadenas pesadas comprenden los 12 aminoácidos naturales encontrados en una bisagra de IgG4 y tres aminoácidos adicionales, por ejemplo 3 residuos de alanina, o 3 residuos de glicina o una combinación de los mismos.

En una realización la bisagra tiene una de las siguientes secuencias:

ESKYGPPAAACPSCP	SEQ ID NO: 1 ;	ESKYGPPGGGCPSCP	SEQ ID NO: 2 ;
ESKYGPPTHTCPSCP	SEQ ID NO: 3 ;	ESKYGDKTHTCPSCP	SEQ ID NO: 4 ;
EPSKYGPPAAACPSCP	SEQ ID NO: 5 ;	EPSKYGPPGGGCPSCP	SEQ ID NO: 6 ;
EPSKYGPPTHTCPSCP	SEQ ID NO: 7 ;	EPSKYGDKTHTCPSCP	SEQ ID NO: 8 ;
ESKSYGPPAAACPSCP	SEQ ID NO: 9 ;	ESKSYGPPGGGCPSCP	SEQ ID NO: 10 ;
ESKSYGPPTHTCPSCP	SEQ ID NO: 11 ;	ESKSYGDKTHTCPSCP	SEQ ID NO: 12 ;
ESKYGPPAAACPPCP	SEQ ID NO: 13 ;	ESKYGPPGGGCPPCP	SEQ ID NO: 14 ;
ESKYGPPTHTCPPCP	SEQ ID NO: 15 ;	ESKYGDKTHTCPPCP	SEQ ID NO: 16 ;
EPSKYGPPAAACPPCP	SEQ ID NO: 17 ;	EPSKYGPPGGGCPPCP	SEQ ID NO: 18 ;
EPSKYGPPTHTCPPCP	SEQ ID NO: 19 ;	EPSKYGDKTHTCPPCP	SEQ ID NO: 20 ;
ESKSYGPPAAACPPCP	SEQ ID NO: 21 ;	ESKSYGPPGGGCPPCP	SEQ ID NO: 22 ;
ESKSYGPPTHTCPPCP	SEQ ID NO: 23 ;	ESKSYGDKTHTCPPCP	SEQ ID NO: 24

En una realización la bisagra superior y central de una cadena pesada de IgG4 de la descripción consiste en una bisagra de tipo IgG1, es decir, EPKSCDKTHTCPPC SEQ ID NO: **25** o un derivado de la misma tal como:

EPKSCDKAAACPPCP	SEQ ID NO: 26 ;	EPKSCDKGGGCPPCP	SEQ ID NO: 27 ;
EPKSCDKTHTSPPCP	SEQ ID NO: 28 ;	EPKSCDKTHTCPPSP	SEQ ID NO: 29 ;
EPKSCDKTHTSPPSP	SEQ ID NO: 30 ;	EPKSCDKAAASPPCP	SEQ ID NO: 31 ;
EPKSCDKAAACPPSP	SEQ ID NO: 32 ;	EPKSCDKAAASPPSP	SEQ ID NO: 33 ;
EPKSCDKGGGSPPCP	SEQ ID NO: 34 ;	EPKSCDKGGGCPPSP	SEQ ID NO: 35 ;
EPKSCDKGGGSPPSP	SEQ ID NO: 36		

10

En una realización el anticuerpo de acuerdo con la presente descripción comprende una bisagra superior y central.

ES 2 599 503 T3

En una realización la bisagra superior y la región central se selecciona entre una de las siguientes secuencias:

ESKYGPPCPSCP	SEQ ID NO: 37 ;	ESKYGDKCPSCP	SEQ ID NO: 38 ;
EPSKYGPPCPSCP	SEQ ID NO: 39 ;	EPSKYGDKCPSCP	SEQ ID NO: 40 ;
ESKSYGPPCPSCP	SEQ ID NO: 41 ;	ESKSYGDKCPSCP	SEQ ID NO: 42 ;
ESKYGPPAACPSCP	SEQ ID NO: 43 ;	ESKYGPPGGCPSCP	SEQ ID NO: 44 ;
ESKYGPPHTCPSCP	SEQ ID NO: 45 ;	ESKYGDKHTCPSCP	SEQ ID NO: 46 ;
EPSKYGPPAACPSCP	SEQ ID NO: 47 ;	EPSKYGPPGGCPSCP	SEQ ID NO: 48 ;
EPSKYGPPHTCPSCP	SEQ ID NO: 49 ;	EPSKYGDKHTCPSCP	SEQ ID NO: 50 ;
ESKSYGPPAACPSCP	SEQ ID NO: 51 ;	ESKSYGPPGGCPSCP	SEQ ID NO: 52 ;
ESKSYGPPHTCPSCP	SEQ ID NO: 53 ;	ESKSYGDKHTCPSCP	SEQ ID NO: 54 ;
ESKYGPPACPSCP	SEQ ID NO: 55 ;	ESKYGPPGCPSCP	SEQ ID NO: 56 ;
ESKYGPPTTCPSCP	SEQ ID NO: 57 ;	ESKYGDKTTCPSCP	SEQ ID NO: 58 ;
EPSKYGPPACPSCP	SEQ ID NO: 59 ;	EPSKYGPPGCPSCP	SEQ ID NO: 60 ;
EPSKYGPPTTCPSCP	SEQ ID NO: 61 ;	EPSKYGDKTTCPSCP	SEQ ID NO: 62 ;
ESKSYGPPACPSCP	SEQ ID NO: 63 ;	ESKSYGPPGCPSCP	SEQ ID NO: 64 ;
ESKSYGPPTTCPSCP	SEQ ID NO: 65 ;	ESKSYGDKTTCPSCP	SEQ ID NO: 66 ;
ESKYGPPTHCPSCP	SEQ ID NO: 67 ;	ESKYGDKTHCPSCP	SEQ ID NO: 68 ;
EPSKYGPPTHCPSCP	SEQ ID NO: 69 ;	EPSKYGDKTHCPSCP	SEQ ID NO: 70 ;
ESKSYGPPTHCPSCP	SEQ ID NO: 71 ;	ESKSYGDKTHCPSCP	SEQ ID NO: 72 ;
ESKYGPPHTCPSCP	SEQ ID NO: 73 ;	ESKYGDKHTCPSCP	SEQ ID NO: 74 ;
EPSKYGPPHTCPSCP	SEQ ID NO: 75 ;	EPSKYGDKHTCPSCP	SEQ ID NO: 76 ;
ESKSYGPPHTCPSCP	SEQ ID NO: 77 ;	ESKSYGDKHTCPSCP	SEQ ID NO: 78 ;
ESKYGPPTCPSCP	SEQ ID NO: 79 ;	ESKYGDKTCPSCP	SEQ ID NO: 80 ;
EPSKYGPPTCPSCP	SEQ ID NO: 81 ;	EPSKYGDKTCPSCP	SEQ ID NO: 82 ;
ESKSYGPPTCPSCP	SEQ ID NO: 83 ;	ESKSYGDKTCPSCP	SEQ ID NO: 84 ;
ESKYGPPHCPSCP	SEQ ID NO: 85 ;	ESKYGDKHCPSCP	SEQ ID NO: 86 ;
EPSKYGPPHCPSCP	SEQ ID NO: 87 ;	EPSKYGDKHCPSCP	SEQ ID NO: 88 ;

ES 2 599 503 T3

ESKSYGPPHCPSCP	SEQ ID NO: 89 ;	ESKSYGDKHCPSCP	SEQ ID NO: 90 ;
EPKSCDKAACPPCP	SEQ ID NO: 91 ;	EPKSCDKGGCPPCP	SEQ ID NO: 92 ;
EPKSCDKHTSPPCP	SEQ ID NO: 93 ;	EPKSCDKHTCPPSP	SEQ ID NO: 94 ;
EPKSCDKHTSPPSP	SEQ ID NO: 95 ;	EPKSCDKAASPPCP	SEQ ID NO: 96 ;
EPKSCDKAACPPSP	SEQ ID NO: 97 ;	EPKSCDKAASPPSP	SEQ ID NO: 98 ;
EPKSCDKGGSPPCP	SEQ ID NO: 99 ;	EPKSCDKGGCPPSP	SEQ ID NO: 100 ;
EPKSCDKGGSPSP	SEQ ID NO: 101 ;	EPKSCDKACPPCP	SEQ ID NO: 102 ;
EPKSCDKGCPPCP	SEQ ID NO: 103 ;	EPKSCDKTSPPCP	SEQ ID NO: 104 ;
EPKSCDKTCPPSP	SEQ ID NO: 105 ;	EPKSCDKTSPPSP	SEQ ID NO: 106 ;
EPKSCDKASPPCP	SEQ ID NO: 107 ;	EPKSCDKACPPSP	SEQ ID NO: 108 ;
EPKSCDKASPPSP	SEQ ID NO: 109 ;	EPKSCDKGSPPCP	SEQ ID NO: 110 ;
EPKSCDKGCPPSP	SEQ ID NO: 111 ;	EPKSCDKGSPPSP	SEQ ID NO: 112 ;
EPKSCDKCPPCP	SEQ ID NO: 113 ;	EPKSCDKCPPCP	SEQ ID NO: 114 ;
EPKSCDKSPPCP	SEQ ID NO: 115 ;	EPKSCDKSPPSP	SEQ ID NO: 116 ;
EPKSCDKSPPCP	SEQ ID NO: 117 ;	EPKSCDKGPPSP	SEQ ID NO: 118 ;
EPKSCDKSPPSP	SEQ ID NO: 119 ;	EPKSCDKSPPCP	SEQ ID NO: 120 ;
EPKSCDKCPPSP	SEQ ID NO: 121 ;	EPKSCDKSPPSP	SEQ ID NO: 122 ;
EPKSCDKTTSPPCP	SEQ ID NO: 123 ;	EPKSCDKTTCPPSP	SEQ ID NO: 124 ;
EPKSCDKTTSPSP	SEQ ID NO: 125 ;	EPKSCDKTHSPPCP	SEQ ID NO: 126 ;
EPKSCDKTHCPPSP	SEQ ID NO: 127 ;	EPKSCDKTHSPPSP	SEQ ID NO: 128 ;
ESKYGPPCPPCP	SEQ ID NO: 129 ;	ESKYGPPCPPCP	SEQ ID NO: 130 ;
ESKYGPPCPPCP	SEQ ID NO: 131 ;	ESKYGDKCPPCP	SEQ ID NO: 132 ;
EPSKYGPPCPPCP	SEQ ID NO: 133 ;	EPSKYGPPCPPCP	SEQ ID NO: 134 ;
EPSKYGPPCPPCP	SEQ ID NO: 135 ;	EPSKYGDKCPPCP	SEQ ID NO: 136 ;
ESKSYGPPCPPCP	SEQ ID NO: 137 ;	ESKSYGPPCPPCP	SEQ ID NO: 138 ;
ESKSYGPPCPPCP	SEQ ID NO: 139 ;	ESKSYGDKCPPCP	SEQ ID NO: 140 ;
ESKYGPPAACPPCP	SEQ ID NO: 141 ;	ESKYGPPGGCPPCP	SEQ ID NO: 142 ;

ES 2 599 503 T3

ESKYGPPHTCPPCP	SEQ ID NO: 143;	ESKYGDKHTCPPCP	SEQ ID NO: 144;
EPSKYGPPAACPPCP	SEQ ID NO: 145;	EPSKYGPPGGCPPCP	SEQ ID NO: 146
EPSKYGPPHTCPPCP	SEQ ID NO: 147;	EPSKYGDKHTCPPCP	SEQ ID NO: 148;
ESKSYGPPAACPPCP	SEQ ID NO: 149;	ESKSYGPPGGCPPCP	SEQ ID NO: 150;
ESKSYGPPHTCPPCP	SEQ ID NO: 151;	ESKSYGDKHTCPPCP	SEQ ID NO: 152;
ESKYGPPACPPCP	SEQ ID NO: 153;	ESKYGPPGCPPCP	SEQ ID NO: 154;
ESKYGPPTTCP	SEQ ID NO: 155;	ESKYGDKTTCP	SEQ ID NO: 156;
EPSKYGPPACPPCP	SEQ ID NO: 157;	EPSKYGPPGCPPCP	SEQ ID NO: 158;
EPSKYGPPTTCP	SEQ ID NO: 159;	EPSKYGDKTTCP	SEQ ID NO: 160;
ESKSYGPPACPPCP	SEQ ID NO: 161;	ESKSYGPPGCPPCP	SEQ ID NO: 162;
ESKSYGPPTTCP	SEQ ID NO: 163;	ESKSYGDKTTCP	SEQ ID NO: 164;
ESKYGPPTHCPPCP	SEQ ID NO: 165;	ESKYGDKTHCPPCP	SEQ ID NO: 166;
EPSKYGPPTHCPPCP	SEQ ID NO: 167;	EPSKYGDKTHCPPCP	SEQ ID NO: 168;
ESKSYGPPTHCPPCP	SEQ ID NO: 169;	ESKSYGDKTHCPPCP	SEQ ID NO: 170;
ESKYGPPHTCPPCP	SEQ ID NO: 171;	ESKYGDKHTCPPCP	SEQ ID NO: 172;
EPSKYGPPHTCPPCP	SEQ ID NO: 173;	EPSKYGDKHTCPPCP	SEQ ID NO: 174;
ESKSYGPPHTCPPCP	SEQ ID NO: 175;	ESKSYGDKHTCPPCP	SEQ ID NO: 176;
ESKYGPPTCPPCP	SEQ ID NO: 177;	ESKYGDKTCP	SEQ ID NO: 178;
EPSKYGPPTCPPCP	SEQ ID NO: 179;	EPSKYGDKTCP	SEQ ID NO: 180;
ESKSYGPPTCPPCP	SEQ ID NO: 181;	ESKSYGDKTCP	SEQ ID NO: 182;
ESKYGPPHCPPCP	SEQ ID NO: 183;	ESKYGDKHCPPCP	SEQ ID NO: 184;
EPSKYGPPHCPPCP	SEQ ID NO: 185;	EPSKYGDKHCPPCP	SEQ ID NO: 186;
ESKSYGPPHCPPCP	SEQ ID NO: 187;	ESKSYGDKHCPPCP	SEQ ID NO: 188;
EPKSCDKTHTCPPCP	SEQ ID NO: 189;	EPKSCDKTHTCP	SEQ ID NO: 190;
ESKYCPPACPSCP	SEQ ID NO: 191;	ESKYCPPAACPSCP	SEQ ID NO: 192;
ESKYCPPAAACPSCP	SEQ ID NO: 193;	ESKYCPPAAASP	SEQ ID NO: 194;
ESKYCPPAAACPSSP	SEQ ID NO: 195;	ESKCGPPAAACP	SEQ ID NO: 196;

ESKYCPPAAAACPSCP	SEQ ID NO: 197 ;	ESKYCPPAAAACPSCP	SEQ ID NO: 198 ;
ESKYCPPGGGCPSCP	SEQ ID NO: 199 ;	ESKYCPPSSSCPSCP	SEQ ID NO: 200 ;
ESKYCPPTCPSCP	SEQ ID NO: 201 ;	ESKYCPPTHCPSCP	SEQ ID NO: 202 ;
ESKYCPPTHCPSCP	SEQ ID NO: 203 ;	ESKYCPKTHCPSCP	SEQ ID NO: 204 ;
ESKYCDKTHCPSCP	SEQ ID NO: 205 ;	ESKYCDKTHCPSCP	SEQ ID NO: 206 ;
ESKYCDKCPSCP	SEQ ID NO: 207 ;	ESKYCDKAAACPSCP	SEQ ID NO: 208 ;
ESKYCDKCPSCP	SEQ ID NO: 209 ;	ESKSCDKTHCPSCP	SEQ ID NO: 210 ;
EPKYCDKTHCPSCP	SEQ ID NO: 211 ;	EPKSCPPCPSCP	SEQ ID NO: 212 ;
ESKSCPPCPSCP	SEQ ID NO: 213 ;	EPKYCPPCPSCP	SEQ ID NO: 214 ;
ECKYGPPCPSCP	SEQ ID NO: 215 ;	ECKYGPPSPSCP	SEQ ID NO: 216 ;
ECKYGPPCPSSP	SEQ ID NO: 217 ;	ESCYGPPCPSCP	SEQ ID NO: 218 ;
ESCYGPPSPSCP	SEQ ID NO: 219 ;	ESCYGPPCPSSP	SEQ ID NO: 220 ;
ESKCGPPCPSCP	SEQ ID NO: 221 ;	ESKCGPPSPSCP	SEQ ID NO: 222 ;
ESKCGPPCPSSP	SEQ ID NO: 223 ;	EPKSCDKCPPSP	SEQ ID NO: 317 .

En una realización la región bisagra central en una o ambas secuencias de la cadena pesada o fragmentos de las mismas tiene la secuencia CPPCP SEQ ID NO: **318**.

5 Si bien no se desea estar limitado por la teoría, se piensa que es probable que esta secuencia bloquee el intercambio dinámico de los brazos del anticuerpo a concentración de tipo "in vivo", por ejemplo se piensa que una concentración de reductor menor de 0,5 mM, en particular concentraciones de reductor del orden de 5 µM es fisiológicamente relevante (Zilmer et al., 2005 Drug Design Reviews vol. 2, núm. 2, págs. 121-127, 2005).

En una realización de la presente descripción cada cadena pesada del anticuerpo biespecífico

10 tiene regiones bisagra superior y central idénticas seleccionadas entre las secuencias anteriores, y también puede tener una región bisagra inferior idéntica. En una realización adicional, cada cadena pesada del anticuerpo biespecífico tiene regiones C_H1 idénticas, y también puede tener regiones C_H2 y C_H3 idénticas. Por consiguiente, cada cadena pesada puede tener secuencias de la región constante de la cadena pesada idénticas.

15 Se pretende que "regiones variables diferentes" según se emplea en la presente memoria haga referencia al caso en el que dichas regiones variables tienen especificidad por diferentes antígenos. Es decir, que el antígeno para el cual es específica cada región variable es un antígeno diferente o una parte de antígeno diferente, p. ej. un epítipo diferente.

20 "Específico" según se emplea en la presente memoria hace referencia al hecho de que los dominios de unión reconocían un antígeno diana con mayor afinidad y avidéz que otros antígenos para los cuales no es específico (por ejemplo 10, 20, 50, 10 o 1000 mayor). Esto no implica necesariamente que la región de unión específica no se una a ninguno de los antígenos no diana, sino que la interacción con la diana es tal que se puede utilizar para purificar el antígeno diana (para el cual es específico) de una mezcla compleja de antígenos, incluyendo antígenos de la misma familia de proteínas.

En una realización se aísla el anticuerpo de acuerdo con la presente descripción.

25 Se pretende que aislado, según se emplea en la presente memoria haga referencia a un anticuerpo que está aislado del organismo humano, por ejemplo: preparado mediante técnicas recombinantes, purificado utilizando una técnica tal como cromatografía, y/o en una formulación farmacéutica.

La presente invención también proporciona un vector de expresión que comprende una secuencia que codifica los anticuerpos de la presente invención y una célula anfitriona que comprende el vector de expresión.

5 La presente invención también proporciona un anticuerpo como se ha definido anteriormente para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno. Adicionalmente se proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad o trastorno que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo como se ha definido anteriormente.

10 En una realización el anticuerpo de acuerdo con la presente descripción comprende una o dos secuencias de cadena pesada seleccionadas independientemente entre una secuencia de cadena pesada descrita en la presente memoria. Los términos "proteína" y "polipéptido" se utilizan indistintamente en la presente memoria, a menos que el contexto indique lo contrario. Se pretende que "péptido" haga referencia a 10 o menos aminoácidos.

El término "polinucleótido" incluye un gen ADN, ADNc, ARN, ARNm etc. a menos que el contexto indique lo contrario.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "que comprende" en el contexto de la presente memoria descriptiva debe ser interpretado como "que incluye".

15 El término "de tipo salvaje" en el contexto de la presente invención representa un anticuerpo tal como se puede encontrar en la naturaleza o se puede aislar del entorno, que no comprende ninguna de las mutaciones modificadas genéticamente.

20 La designación para un mutante por sustitución en la presente memoria consiste en una letra seguida de un número seguido de una letra. La primera letra designa el aminoácido en la proteína de tipo salvaje. El número hace referencia a la posición de aminoácido en la que se está realizando la sustitución del aminoácido, y la segunda letra designa el aminoácido que se utiliza para remplazar al aminoácido de tipo salvaje. Los residuos de los dominios variables y constantes de un anticuerpo se numeran de manera convencional de acuerdo con un sistema ideado por Kabat *et al.* Este sistema se expone en Kabat *et al.*, 1987, en Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, USA (en adelante "Kabat *et al.* (*supra*)").

25 Las denominaciones de los residuos de Kabat no siempre corresponden directamente con la numeración lineal de los residuos de aminoácido. La secuencia lineal de aminoácidos real puede contener menos o más aminoácidos que la numeración de Kabat estricta correspondiente a un acortamiento de, o inserción en, un componente estructural, región marco o región determinante de la complementariedad (CDR), de la estructura del dominio variable básico. La numeración de Kabat correcta de los residuos se puede determinar para un anticuerpo dado por medio de un alineamiento de residuos de homología en la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "convencional". Alternativamente, la numeración de los residuos de aminoácido se puede llevar a cabo por medio del índice EU o sistema de numeración EU también descrito en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Un sistema adicional de numeración de residuos de aminoácidos de anticuerpos es el sistema de numeración IMGT (Lefranc, M.-P. *et al.*, Dev. Comp. Immunol., 29, 185-203 (2005)).

30

35

El sistema de numeración de Kabat se utiliza en la presente memoria descriptiva excepto cuando se indica, por el contrario, que se utiliza el sistema de numeración EU o el sistema de numeración IMGT.

40 Entre los cuatro isotipos de IgG4, las disposiciones de los enlaces disulfuro intracatenarios en las cadenas pesada y ligera son similares mientras las disposiciones de los enlaces disulfuro intercatenarios son únicas para cada isotipo [Revisado por (Wypych, J., Li, M., Guo, A., Zhang, Z., Martinez, T., Allen, M.J., Fodor, S., Kelner, D.N., Flynn, G.C., Liu, Y.D., Bondarenko, P.V., Ricci, M.S., Dillon, T.M., Bolland, A., 2008. Los anticuerpos IgG2 humanos presentan isoformas estructurales mediadas por disulfuro. J Biol Chem. 283, 16194-16205)].

45 Como se muestra en la Figura 1b, las secuencias de la región bisagra de los cuatro isotipos de IgG4 son diferentes. La región bisagra completa o genética consiste típicamente en los residuos 226 a 251 (numeración basada en el sistema de numeración de Kabat). La Figura 1b muestra las secciones superior, central e inferior de las regiones bisagra de los cuatro isotipos de IgG4. Para el isotipo IgG1, la región bisagra superior consiste en los residuos 226 a 238, la región bisagra central consiste en los residuos 239 a 243 y la región bisagra inferior consiste en los residuos 244 a 251. Para el isotipo de IgG4, la región bisagra superior consiste en los residuos 226 a 238, la región bisagra central consiste en los residuos 239 a 243 y la región bisagra inferior consiste en los residuos 244 a 251. Los nuevos anticuerpos IgG4 mutantes de acuerdo con la presente invención han sido desarrollados modificando las disposiciones del enlace disulfuro intercatenario dentro de IgG4, específicamente se ha modificado la disposición del enlace disulfuro intercatenario C_L-C_{H1} entre la cadena ligera (LC) y la cadena pesada (HC).

50

55 La Figura 1b muestra secciones de las secuencias de las cadenas pesada y ligera de IgG humana para los isotipos IgG 1-4 que indican las posiciones de la cisteína (subrayadas) que forman los enlaces disulfuro intercatenarios C_L-C_{H1}. El enlace disulfuro inter C_L-C_{H1} de IgG1 está formado entre la C214 de LC (sistema de numeración de Kabat) y la C233 (sistema de numeración de Kabat) de la HC inmediatamente antes de la región bisagra. Por el contrario, el enlace disulfuro C_{H1}-C_L para IgG2, 3 y 4 está formado entre la C214 de LC y la C127 N-terminal para el enlace

disulfuro intracatenario de la HC. Las secuencias de LC y HC colindantes a los residuos de cisteína implicados en la formación del enlace disulfuro C_L-C_{H1} se muestran y se alinean en la Figura 1b.

La presente invención ha investigado cómo afecta el enlace disulfuro C_L-C_{H1} a las propiedades de un anticuerpo IgG4 incluyendo la termoestabilidad, la estabilidad estructural y la afinidad del anticuerpo.

- 5 Los mutantes de IgG4 fueron generados por sustitución del residuo de cisteína en la C_{H1} en la posición 127 por otro aminoácido así como la sustitución de uno o más de los aminoácidos en la región de la bisagra superior, preferiblemente los aminoácidos de las posiciones seleccionadas entre 227, 228, 229 y 230, numeradas de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat, por cisteína. Las posiciones 227, 228, 229 o 230 están en o cerca de la posición en la que está situada la cisteína 233 de IgG1.
- 10 Cada cadena pesada puede comprender mutaciones adicionales incluyendo la sustitución de uno o ambos residuos de cisteína 239 y 242 en la región bisagra de IgG4 por otro aminoácido. También se incluía una mutación para alargar la región bisagra de IgG4 en tres aminoácidos entre las posiciones 238 y 239 para que tuviera la misma longitud que la bisagra de IgG1 en algunos anticuerpos. También se introdujo la mutación S241P en algunos anticuerpos.
- 15 La formación de hemimoléculas de IgG4 se puede reducir mediante la introducción de una mutación de Ser a Pro en la posición 241 (numerada de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat) en la bisagra (Angal, S. et al., 1993. Una única sustitución de aminoácido anula la heterogeneidad del anticuerpo quimérico ratón/humano (IgG4). Mol Immunol 30, 105-108). Además, esta mutación puntual no influyó en la estructura compacta de IgG4 permitiendo de ese modo que IgG4 conserve su menor capacidad para activar el complemento.
- 20 No obstante, el intercambio *in vitro* de estos anticuerpos mutados se puede promover utilizando elevadas concentraciones de anticuerpos, por ejemplo 1-10mM o más, tales como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 mM. Se ha descubierto que los anticuerpos IgG4 mutantes de acuerdo con la presente invención muestran propiedades ventajosas, por ejemplo una mejor estabilidad.

25 En una realización, los anticuerpos IgG4 mutantes de acuerdo con la presente invención muestran una mayor termoestabilidad en comparación con un anticuerpo IgG4 de tipo salvaje. Se ha descubierto sorprendentemente que los anticuerpos IgG4 mutantes que han sido mutados para remplazar la cisteína de la posición 127 en el dominio C_{H1} por otro aminoácido y en los que se ha introducido una cisteína en la región bisagra de la cadena pesada entre las posiciones 227 a 230 muestran una mayor termoestabilidad en comparación con un anticuerpo IgG4 de tipo salvaje. La mutación para eliminar una cisteína de la posición 127 altera la posición en la cual se forma el enlace disulfuro intercatenario entre la cadena pesada y la cadena ligera (C_L-C_{H1}) y obliga a la cadena ligera a formar un enlace disulfuro con una cisteína que se introduce entre las posiciones 227 y 230 en la región bisagra de la cadena pesada. Por consiguiente, en una realización, se proporciona un anticuerpo IgG4 en el que la cisteína 127 es sustituida por otro aminoácido y la cisteína de la cadena ligera está conectada a través de un enlace disulfuro a una cisteína modificada genéticamente en la posición 227, 228, 229 o 230.

30 También se encontró sorprendentemente una mejora adicional de la termoestabilidad al añadir tres aminoácidos en la región bisagra de IgG4 con el fin de alargar la región bisagra de IgG4.

35 También se ha descubierto sorprendentemente que los anticuerpos IgG4 mutantes que han sido mutados para remplazar la cisteína de la posición 127 en el dominio C_{H1} por otro aminoácido y para remplazar la cisteína de la posición 239 o la posición 242 en la región bisagra de la cadena pesada por otro aminoácido mostraban una mayor termoestabilidad en comparación con un anticuerpo IgG4 de tipo salvaje.

40 En una realización los anticuerpos de la presente invención muestran una reducción de la formación de las denominadas hemimoléculas, que están constituidas por una sola cadena ligera y una sola cadena pesada (HL). Los anticuerpos que comprenden una mutación en C239 pero no portan una mutación en C242 generalmente muestran una reducción de la formación de hemimoléculas. Sin desear estar limitados por la teoría, se piensa que esto se debe a que la eliminación de la Cisteína de la posición 239 reduce la formación del enlace disulfuro intracatenario en la cadena pesada y por lo tanto reduce el número de hemimoléculas en comparación con los anticuerpos que no portan una mutación en la C239 o la C242. Los anticuerpos que portan una mutación en C242 pero no portan una mutación en C239 parecen formar más hemimoléculas en comparación con los anticuerpos que portan una mutación en C239 pero no portan una mutación en C242. Sin desear estar limitado por la teoría, se cree que la cisteína de la posición 239 es más reactiva en comparación con la cisteína de la posición 242 y es capaz de formar un enlace disulfuro con una cisteína de la bisagra de la cadena pesada o la cisteína de la cadena ligera.

45 Los anticuerpos que portan una mutación tanto en C239 como en C242 forman una elevada proporción de hemimoléculas debido a la no formación de enlace disulfuro intercatenario entre dos cadenas pesadas. No obstante, los anticuerpos que comprenden mutaciones tanto en C239 como en C242 todavía son capaces de formar moléculas completas de anticuerpos debido a la unión de las cadenas pesadas por medio de enlaces no covalentes. La reducción de la formación de hemimoléculas también se observa en anticuerpos que portan la mutación S241P.

50 Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención también muestran una afinidad comparable hacia el antígeno

diana en comparación con el anticuerpo IgG4 de tipo salvaje.

Las mutaciones en las regiones constantes de la cadena pesada de los anticuerpos biespecíficos de la presente invención se describen con más detalle más abajo. Los métodos para reemplazar aminoácidos son bien conocidos en la técnica de la biología molecular. Tales métodos incluyen por ejemplo la mutagénesis dirigida al sitio utilizando métodos tales como la PCR para suprimir y/o sustituir aminoácidos o diseño *de novo* de secuencias sintéticas.

La Figura 2a muestra los residuos de la bisagra de IgG1 de tipo salvaje, IgG4 de tipo salvaje y las posiciones en las que se han introducido mutaciones en los anticuerpos de la presente invención. Numeración basada en el sistema de numeración de Kabat.

Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención comprenden una mutación en la posición 127 (C127), en donde el residuo de cisteína es reemplazado por otro aminoácido que no contiene un grupo tiol. Por reemplazar o sustituir, los autores de la presente invención quieren significar que donde normalmente se encontraría la cisteína 127 intercatenaria de la cadena pesada del anticuerpo, se encuentra otro aminoácido. La mutación en C127 puede ser cualquier mutación adecuada para uno, dos, o tres de los nucleótidos que codifican el aminoácido de la posición 127 que cambia el residuo de aminoácido de cisteína a otro aminoácido adecuado. Los ejemplos de los aminoácidos adecuados incluyen serina, treonina, alanina, glicina o cualquier aminoácido polar. Un aminoácido particularmente preferido es la serina.

La sustitución de la cisteína de la posición 127 por otro aminoácido elimina la cisteína del dominio C_H1 que normalmente forma un enlace disulfuro con una cisteína de la cadena ligera de IgG4 de tipo salvaje. Por lo tanto, con el fin de formar un emparejamiento de cadena ligera y cadena pesada a través de un enlace disulfuro intercatenario, la cadena ligera debe formar un enlace disulfuro con una cisteína que se sitúa en la región bisagra de la cadena pesada.

En un primer aspecto de la invención, los anticuerpos de acuerdo con la presente invención comprenden una cadena pesada en donde uno o más de los aminoácidos de las posiciones seleccionadas entre 227, 228, 229 y 230, numeradas de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat, son sustituidos por cisteína. Por consiguiente, los anticuerpos de acuerdo con la presente invención pueden portar una o más de las siguientes mutaciones: S227C; K228C; Y229C; G230C

En una realización solamente un residuo seleccionado entre 227, 228, 229 y 230 es sustituido por un residuo de cisteína.

En una realización los anticuerpos de la presente invención portan la mutación Y229C o G230C.

La inclusión de un residuo de cisteína en la posición seleccionada entre 227, 228, 229 y 230, en la región bisagra de la cadena pesada proporciona una nueva posición para que se forme un enlace disulfuro intercatenario entre la cadena pesada y la cadena ligera. Los autores de la presente invención han descubierto que esta nueva disposición del enlace disulfuro intercatenario proporciona anticuerpos IgG4 que tienen una mayor estabilidad en comparación con un anticuerpo IgG4 de tipo salvaje.

Se pueden introducir mutaciones adicionales en los anticuerpos de este aspecto de la presente invención. En una realización la cisteína de la posición 239 (C239) y/o la cisteína de la posición 242 (C242), numeradas de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat, en la cadena pesada son sustituidas por otro aminoácido, preferiblemente un aminoácido que no contiene un grupo tiol. Por reemplazar o sustituir los autores de la presente invención quieren significar que donde se encontrarían normalmente la cisteína 239 y/o la cisteína 242 en la cadena pesada del anticuerpo, se encuentra otro aminoácido. La mutación en C239 y/o C242 puede ser cualquier mutación adecuada en uno, dos o tres de los nucleótidos que codifican el aminoácido que cambia el residuo de aminoácido de cisteína a otro aminoácido adecuado. Los ejemplos de aminoácidos adecuados incluyen serina, treonina, alanina, glicina o cualquier aminoácido polar. Un aminoácido particularmente preferido es la serina.

En una realización la cisteína de la posición 239 de la cadena pesada es sustituida por otro aminoácido y la cisteína de la posición 242 de la cadena pesada es sustituida por otro aminoácido. En esta realización, la sustitución de C239 y C242 elimina ambos residuos de cisteína en la región bisagra de la cadena pesada que normalmente forman enlaces disulfuro intercatenarios con las correspondientes cisteínas de otra cadena pesada. Las hemimoléculas resultantes pueden formar moléculas de anticuerpo completas a través de enlaces no covalentes entre dos cadenas pesadas.

En una realización alternativa, la cisteína de la posición 239 de la cadena pesada es sustituida por otro aminoácido. En esta realización, la cisteína de la posición 242 no es sustituida por otro aminoácido.

En una realización alternativa más, la cisteína de la posición 242 de la cadena pesada es sustituida por otro aminoácido. En esta realización, la cisteína de la posición 239 no es sustituida por otro aminoácido.

La sustitución de C239 o C242, deja una cisteína en la cadena pesada que es capaz de formar un enlace disulfuro entre cadenas pesadas con una cisteína de otra cadena pesada. Sin desear estar limitado por la teoría, se piensa

que la sustitución de una cisteína de la región bisagra, concretamente la sustitución de C239, reduce la formación de un enlace disulfuro intracatenario en la región bisagra y por lo tanto puede reducir la formación de moléculas de medio anticuerpo.

5 En una realización de la presente invención, en donde la serina de la posición 227 es sustituida por una cisteína, preferiblemente el anticuerpo no comprende mutaciones en las posiciones C239 y C242. En otra realización, en donde la serina de la posición 227 es sustituida por una cisteína, preferiblemente la cisteína de la posición 239 de la cadena pesada es sustituida por otro aminoácido, pero la cisteína de la posición 242 no es sustituida por otro aminoácido.

10 En una realización los anticuerpos de la presente invención comprenden una cadena pesada de IgG4 que es mutada para insertar uno o más aminoácidos entre los aminoácidos 226-243. El número de aminoácidos insertado puede ser de 1 a 10, de 1 a 5, de 1 a 3, preferiblemente se insertan 1, 2, 3 o 4 aminoácidos. Los aminoácidos se insertan preferiblemente entre los aminoácidos 238 y 239. Cualquiera de los aminoácidos adecuados puede ser insertado en la región bisagra, tales como alaninas, glicinas, serinas o treoninas y combinaciones de los mismos. Preferiblemente se insertan tres alaninas (AAA), tres glicinas (GGG), tres serinas (SSS) o tres treoninas (TTT) o una treonina, una histidina y otra treonina (THT). Se ha descubierto que los anticuerpos de la presente invención que comprenden una cadena pesada de IgG4 que ha sido mutada para insertar tres aminoácidos en la región bisagra muestran una mayor termoestabilidad.

15 Una mutación adicional que puede ser introducida en los anticuerpos de acuerdo con la presente invención es la mutación S241P. Se ha demostrado previamente que esta mutación reduce la formación de hemimoléculas (Angal, S. et al., 1993. Una sustitución de un solo aminoácido anula la heterogeneidad del anticuerpo quimérico de ratón/humano (IgG4). Mol Immunol 30, 105-108). Se ha descubierto sorprendentemente que los anticuerpos mutantes de la presente invención que comprenden la mutación S241P demuestran cierto intercambio de la cadena pesada *in vitro* en condiciones reductoras fuertes en comparación con IgG4 P (IgG4 con S241P). Esto permite la creación de anticuerpos biespecíficos *in vitro* a partir de anticuerpos IgG4 mutantes de la presente invención. Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención pueden comprender una o más mutaciones adicionales en la región bisagra. Por ejemplo, los anticuerpos pueden comprender adicionalmente una o más de las siguientes mutaciones S227P, Y229S, P237D y P238K.

20 En una realización el anticuerpo de acuerdo con la presente descripción comprende eficazmente una región bisagra de IgG1 del residuo 226 al 243 (bisagra superior y bisagra central). Por consiguiente, el anticuerpo de la presente invención comprende una región bisagra en donde la glicina de la posición 230 es sustituida por cisteína, la serina de la posición 227 es sustituida por prolina, la tirosina de la posición 229 es sustituida por serina, la prolina de la posición 237 es sustituida por ácido aspártico, la prolina de la posición 238 es sustituida por lisina, la secuencia de aminoácidos treonina-histidina-treonina es insertada entre las posiciones 238 y 239 y la serina de la posición 241 es sustituida por prolina. Estas mutaciones también pueden ser escritas como S227P, Y229S, G230C, P237D, P238KHTHT y S241P, como se muestra en la Figura 2a. Se ha descubierto que la introducción de estas mutaciones adicionales en la región bisagra de IgG4 proporciona un anticuerpo con una mejor termoestabilidad.

25 El anticuerpo de acuerdo con la presente invención tiene una bisagra inferior de IgG4 desde el residuo 244 al 251 (APEFLGGP SEQ ID NO: 229). Sin desear estar limitado por la teoría, se cree que la región bisagra inferior de IgG4 contribuye a la carencia de función efectora de un anticuerpo IgG4.

40 En un segundo aspecto de la presente descripción se proporciona un anticuerpo biespecífico simétrico

en donde en una o ambas cadenas pesadas la cisteína intercatenaria de la posición 127 es sustituida por otro aminoácido, como se ha descrito anteriormente, y la cisteína de la posición 239 o la cisteína de la posición 242, numeradas de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat, de la cadena pesada son sustituidas por otro aminoácido. En este segundo aspecto, ninguno de los residuos de las posiciones 227, 228, 229 y 230 es sustituido por un residuo de cisteína.

45 Un anticuerpo biespecífico asimétrico de la clase IgG4 que comprende dos cadenas pesadas que comprenden cada una un dominio variable, un dominio C_H1 y una región bisagra, en donde en cada cadena pesada la cisteína intercatenaria de la posición 127, numerada de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat, es sustituida por otro aminoácido; y la cisteína de la posición 239 y/o la cisteína de la posición 242, numerada de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat, es sustituida por otro aminoácido, en donde la secuencia de la región constante de cada cadena pesada es similar o idéntica y la región variable de cada cadena pesada es diferente.

Se ha descubierto sorprendentemente que los anticuerpos de acuerdo con el segundo aspecto de la presente descripción

tienen una mejor termoestabilidad en comparación con un anticuerpo IgG4 de tipo salvaje.

55 En el segundo aspecto de la presente invención, el anticuerpo puede comprender una o más mutaciones adicionales. En una realización el anticuerpo comprende una cadena pesada de IgG4 que es mutada para insertar tres aminoácidos entre los aminoácidos 226-243, preferiblemente entre los aminoácidos 238 y 239, como se ha

descrito anteriormente. En una realización adicional el anticuerpo comprende la mutación S241P. En una realización adicional, el anticuerpo puede comprender adicionalmente una o más de las siguientes mutaciones S227P, Y229S, P237D y P238K.

5 Las Figuras 3a y 4a también muestran las mutaciones introducidas en los anticuerpos IgG4 de acuerdo con la presente invención. Las Figuras 3b y 4b muestran las posiciones de los residuos de cisteína en los anticuerpos IgG4 de la presente invención y también muestran los enlaces pronosticados de la cisteína a una cisteína de la cadena ligera (LC) u otra cadena pesada (HC). Para los residuos de cisteína que muestran (LC o HC), es posible que la cisteína se esté uniendo a una cisteína de la cadena ligera o la cadena pesada pero donde la LC o la HC están subrayadas, este es el enlace disulfuro que se cree que aparece predominantemente.

10 En una realización, la presente descripción proporciona un anticuerpo que comprende dos cadenas pesadas

que comprenden cada una una región variable, un dominio C_{H1} y una región bisagra y cada cadena pesada comprende las mutaciones de un anticuerpo seleccionado entre 2, 3, 6, 7, 8, 15, 16, 28, 28P, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 44, 44P, 45, 46, 47 y 48, como se muestra en la Tabla 1. Por consiguiente, la presente invención proporciona un anticuerpo que comprende dos cadenas pesadas que comprenden cada una una región variable, un dominio C_{H1} y una región bisagra y cada cadena pesada comprende una de las siguientes secuencias: SEQ ID NO: **243**, SEQ ID NO: **244**, SEQ ID NO: **245**, SEQ ID NO: **246**, SEQ ID NO: **247**, SEQ ID NO: **248**, SEQ ID NO: **249**, SEQ ID NO: **250**, SEQ ID NO: **251**, SEQ ID NO: **252**, SEQ ID NO: **253**, SEQ ID NO: **254**, SEQ ID NO: **255**, SEQ ID NO: **256**, SEQ ID NO: **257**, SEQ ID NO: **258**, SEQ ID NO: **259**, SEQ ID NO: **260**, SEQ ID NO: **261**, SEQ ID NO: **262**, SEQ ID NO: **263**, SEQ ID NO: **264**, SEQ ID NO: **265**, SEQ ID NO: **266**, SEQ ID NO: **267** y SEQ ID NO: **268**.

20 En una realización preferida, el anticuerpo de la presente descripción comprende dos cadenas pesadas

que comprenden cada una una región variable, un dominio C_{H1} y una región bisagra, y comprende una de las siguientes secuencias: SEQ ID NO: **243**, SEQ ID NO: **244**, SEQ ID NO: **245**, SEQ ID NO: **246**, SEQ ID NO: **247**, SEQ ID NO: **248**, SEQ ID NO: **249**, SEQ ID NO: **250**, SEQ ID NO: **251**, SEQ ID NO: **252**, SEQ ID NO: **253**, SEQ ID NO: **254**, SEQ ID NO: **255**, SEQ ID NO: **256**, SEQ ID NO: **257**, SEQ ID NO: **258**, SEQ ID NO: **259**, SEQ ID NO: **260**, SEQ ID NO: **261**, SEQ ID NO: **262**, SEQ ID NO: **263**, SEQ ID NO: **264**, SEQ ID NO: **265**, SEQ ID NO: **266**, SEQ ID NO: **267** y SEQ ID NO: **268**. Más preferiblemente, el anticuerpo de la presente invención comprende dos cadenas pesadas que comprenden cada una una región variable, un dominio C_{H1} y una región bisagra y cada cadena pesada comprende una de las siguientes secuencias: SEQ ID NO: **243**, SEQ ID NO: **244**, SEQ ID NO: **245**, SEQ ID NO: **246**, SEQ ID NO: **247**, SEQ ID NO: **248**, SEQ ID NO: **249**, SEQ ID NO: **250**, SEQ ID NO: **251**, SEQ ID NO: **252**, SEQ ID NO: **253**, SEQ ID NO: **254**, SEQ ID NO: **255**, SEQ ID NO: **256**, SEQ ID NO: **257**, SEQ ID NO: **258**, SEQ ID NO: **259**, SEQ ID NO: **260**, SEQ ID NO: **261**, SEQ ID NO: **262**, SEQ ID NO: **263**, SEQ ID NO: **264**, SEQ ID NO: **265**, SEQ ID NO: **266**, SEQ ID NO: **267** y SEQ ID NO: **268**.

En una realización adicional preferida, la presente descripción proporciona un anticuerpo que comprende dos cadenas pesadas que comprenden cada una una región variable, un dominio C_{H1}, una región bisagra, un dominio C_{H2} y un dominio C_{H3} y cada cadena pesada comprende las mutaciones de un anticuerpo seleccionado entre 2, 3, 6, 7, 8, 15, 16, 28, 28P, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 44, 44P, 45, 46, 47 y 48, como se muestra en la Tabla 1. Por consiguiente, la presente invención proporciona un anticuerpo que comprende dos cadenas pesadas que comprenden cada una una región variable, un dominio C_{H1}, una región bisagra, un dominio C_{H2} y un dominio C_{H3} y cada cadena pesada comprende una de las siguientes secuencias: SEQ ID NO: **281**, SEQ ID NO: **282**, SEQ ID NO: **283**, SEQ ID NO: **284**, SEQ ID NO: **285**, SEQ ID NO: **286**, SEQ ID NO: **287**, SEQ ID NO: **288**, SEQ ID NO: **289**, SEQ ID NO: **290**, SEQ ID NO: **291**, SEQ ID NO: **292**, SEQ ID NO: **293**, SEQ ID NO: **294**, SEQ ID NO: **295**, SEQ ID NO: **296**, SEQ ID NO: **297**, SEQ ID NO: **298**, SEQ ID NO: **299**, SEQ ID NO: **300**, SEQ ID NO: **301**, SEQ ID NO: **302**, SEQ ID NO: **303**, SEQ ID NO: **304**, SEQ ID NO: **305** y SEQ ID NO: **306**.

Un anticuerpo particularmente preferido de la presente invención comprende dos cadenas pesadas que comprenden cada una una región variable, un dominio C_{H1} y una región bisagra, en donde la cadena pesada comprende el SEQ ID NO: **36** (anticuerpo 28P), SEQ ID NO: **37** (anticuerpo 44P) o SEQ ID NO: **35** (anticuerpo 48). Un anticuerpo particularmente preferido adicional de la presente invención comprende dos cadenas pesadas que comprenden cada una una región variable, un dominio C_{H1}, una región bisagra, un dominio C_{H2} y un dominio C_{H3} en donde la cadena pesada comprende el SEQ ID NO: **62** (anticuerpo 28P), SEQ ID NO: **63** (anticuerpo 44P) o SEQ ID NO: **61** (anticuerpo 48). Los anticuerpos 28P, 44P y 48 son particularmente preferidos porque muestran una termoestabilidad significativamente mejor y muestran adicionalmente una reducción de la formación de hemimoléculas.

ES 2 599 503 T3

La Tabla 1 siguiente enumera anticuerpos ilustrativos con mutaciones que han sido introducidas en comparación con la secuencia de IgG4 de tipo salvaje. La Tabla 1 también incluye anticuerpos IgG1 e IgG4 de tipo salvaje y anticuerpos de control. **Tabla 1:**

Número de anticuerpo	Mutaciones de la Cadena Pesada (Numeración de Kabat)	Dominio C _H 1 & bisagra SEQ ID NO:	C _H 1, Bisagra C _H 2 & C _H 3 SEQ ID NO:
1	C127S	269	307
2	C127S,C239S	264	302
3	C127S,C242S	265	303
4	C127S, C242S, C239S	270	308
5	G230C	271	309
5P	G230C, S241P	272	310
6	C127S, G230C, C239S	243	281
7	C127S, G230C, C242S	244	282
8	C127S, G230C, C239S, C242S	245	283
9	G230C, C239S	273	311
10	G230C, C242S	274	312
11	G230C, C239S, C242S	275	313
12	C239S	276	314
13	C242S	277	315
14	C239S,C242S	278	316
15	C127S, G230C	246	284
16	C127S, G230C, S241P	247	285
17	IgG4 humana de tipo salvaje	227	-
18	S241P	-	-
19	IgG1 humana de tipo salvaje	226	-
28	C127S Y229C	248	286
28P	C127S Y229C, S241P	267	305
29	C127S Y229C C239S	249	287
30	C127S Y229C C242S	250	288

ES 2 599 503 T3

Número de anticuerpo	Mutaciones de la Cadena Pesada (Numeración de Kabat)	Dominio C _H 1 & bisagra SEQ ID NO:	C _H 1, Bisagra C _H 2 & C _H 3 SEQ ID NO:
31	C127S Y229C C239S C242S	251	289
32	C127S K228C	252	290
33	C127S K228C C239S	253	291
34	C127S K228C C242S	254	292
35	C127S K228C C239S C242S	255	293
36	C127S S227C	256	294
37	C127S S227C C239S	257	295
38	C127S S227C C242S	258	296
39	C127S S227C C239S C242S	259	297
44	C127S G230C P238PAAA	260	298
44P	C127S G230C P238PAAA, S241P	268	306
45	C127S G230C P238PAAA C239S	261	299
46	C127S G230C P238PAAA C242S	262	300
47	C127S G230C P238PAAA C239S C242S	263	301
48	C127S, S227P, Y229S, G230C, P237D, P238KTHT, S241P	266	304
49	C127S G230C P238PA		
50	C127S G230C P238PAA S241P		
51	C127S, G230C, P238PAAAA		
52	C127S, G230C, P238PAAAAA		
55	C127S, G230C, P238PTHT		
56	C127S, G230C, P237D, P238KTHT		
57	C127S, G230C, P238PGGG		
60	C127S, S227P, G230C		
62	C127S, Y229S, G230C		
64	C127S, S227P, Y229S, G230C		

Número de anticuerpo	Mutaciones de la Cadena Pesada (Numeración de Kabat)	Dominio C _H 1 & bisagra SEQ ID NO:	C _H 1, Bisagra C _H 2 & C _H 3 SEQ ID NO:
65	C127S, S227P, Y229S, G230C, P237D, P238KTHT		
66	C127S, G230C, P237D, P238KTH		
67	C127S, G230C, P237D, P238KT		
68	C127S, G230C, P237D, P238K		
69	C127S, G230C P237D, P238KAAA		
71	C127S, S227P, G230C, P237D, P238KTHT		
73	C127S, Y229S, G230C, P237D, P238KTHT		
74	C127S Y229C bisagra central SPPCP		
75	C127S G230C bisagra central CPPSP		
76	C127S Y229C bisagra central CPPSP		
77	C127S G230C bisagra central SPPCP		

5 Las Figuras 3a y 4a también muestran las mutaciones introducidas en los anticuerpos IgG4 de acuerdo con la presente invención. Las Figuras 3b y 4b muestran las posiciones de los residuos de cisteína en los anticuerpos IgG4 de la presente invención y también muestran los enlaces pronosticados de la cisteína a una cisteína de la cadena ligera (LC) u otra cadena pesada (HC). Para los residuos de cisteína que muestran (LC o HC), es posible que la cisteína se esté uniendo a una cisteína de la cadena ligera o la cadena pesada, pero cuando LC o HC están subrayadas, este es el enlace disulfuro que se cree que aparece de manera predominante.

10 En una realización preferida, la presente descripción proporciona un anticuerpo que comprende dos cadenas pesadas que comprenden cada una una región variable, un dominio C_H1 y una región bisagra y cada cadena pesada comprende las mutaciones de un anticuerpo seleccionado entre 2, 3, 6, 7, 8, 15, 16, 28, 28P, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 44, 44P, 45, 46, 47 y 48, como se muestra en la Tabla 1. Por consiguiente, la presente invención
15 proporciona un anticuerpo que comprende dos cadenas pesadas que comprenden cada una una región variable, un dominio C_H1 y una región bisagra y cada cadena pesada comprende una de las siguientes secuencias: SEQ ID NO: **243**, SEQ ID NO: **244**, SEQ ID NO: **245**, SEQ ID NO: **246**, SEQ ID NO: **247**, SEQ ID NO: **248**, SEQ ID NO: **249**, SEQ ID NO: **250**, SEQ ID NO: **251**, SEQ ID NO: **252**, SEQ ID NO: **253**, SEQ ID NO: **254**, SEQ ID NO: **255**, SEQ ID NO: **256**, SEQ ID NO: **257**, SEQ ID NO: **258**, SEQ ID NO: **259**, SEQ ID NO: **260**, SEQ ID NO: **261**, SEQ ID NO: **262**, SEQ ID NO: **263**, SEQ ID NO: **264**, SEQ ID NO: **265**, SEQ ID NO: **266**, SEQ ID NO: **267** y SEQ ID NO: 268.

20 En una realización preferida el anticuerpo de la presente descripción comprende dos cadenas pesadas que comprenden cada una una región variable, un dominio C_H1 y una región bisagra, y comprende una de las siguientes secuencias: SEQ ID NO: **243**, SEQ ID NO: **244**, SEQ ID NO: **245**, SEQ ID NO: **246**, SEQ ID NO: **247**, SEQ ID NO: **248**, SEQ ID NO: **249**, SEQ ID NO: **250**, SEQ ID NO: **251**, SEQ ID NO: **252**, SEQ ID NO: **253**, SEQ ID NO: **254**, SEQ ID NO: **255**, SEQ ID NO: **256**, SEQ ID NO: **257**, SEQ ID NO: **258**, SEQ ID NO: **259**, SEQ ID NO: **260**, SEQ ID NO: **261**, SEQ ID NO: **262**, SEQ ID NO: **263**, SEQ ID NO: **264**, SEQ ID NO: **265**, SEQ ID NO: **266**, SEQ ID NO: **267** y SEQ ID NO: **268**. Más preferiblemente, el anticuerpo de la presente invención comprende dos cadenas
25 pesadas que comprenden cada una una región variable, un dominio C_H1 y una región bisagra y cada cadena pesada comprende una de las siguientes secuencias: SEQ ID NO: **243**, SEQ ID NO: **244**, SEQ ID NO: **245**, SEQ ID NO: **246**, SEQ ID NO: **247**, SEQ ID NO: **248**, SEQ ID NO: **249**, SEQ ID NO: **250**, SEQ ID NO: **251**, SEQ ID NO: **252**, SEQ ID NO: **253**, SEQ ID NO: **254**, SEQ ID NO: **255**, SEQ ID NO: **256**, SEQ ID NO: **257**, SEQ ID NO: **258**, SEQ ID NO: **259**, SEQ ID NO: **260**, SEQ ID NO: **261**, SEQ ID NO: **262**, SEQ ID NO: **263**, SEQ ID NO: **264**, SEQ ID NO: **265**, SEQ ID NO: **266**, SEQ ID NO: **267** y SEQ ID NO: **268**.

30 En una realización preferida adicional, la presente descripción proporciona un anticuerpo

que comprende dos cadenas pesadas que comprenden cada una una región variable, un dominio C_H1, una región bisagra, un dominio C_H2 y un dominio C_H3 y cada cadena pesada comprende las mutaciones de un anticuerpo seleccionado entre 2, 3, 6, 7, 8, 15, 16, 28, 28P, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 44, 44P, 45, 46, 47 y 48, como se muestra en la Tabla 1. Por consiguiente, la presente invención proporciona un anticuerpo que comprende dos cadenas pesadas que comprenden cada una una región variable, un dominio C_H1, una región bisagra, un dominio C_H2 y un dominio C_H3 y cada cadena pesada comprende una de las siguientes secuencias: SEQ ID NO: **281**, SEQ ID NO: **282**, SEQ ID NO: **283**, SEQ ID NO: **284**, SEQ ID NO: **285**, SEQ ID NO: **286**, SEQ ID NO: **287**, SEQ ID NO: **288**, SEQ ID NO: **289**, SEQ ID NO: **290**, SEQ ID NO: **291**, SEQ ID NO: **292**, SEQ ID NO: **293**, SEQ ID NO: **294**, SEQ ID NO: **295**, SEQ ID NO: **296**, SEQ ID NO: **297**, SEQ ID NO: **298**, SEQ ID NO: **299**, SEQ ID NO: **300**, SEQ ID NO: **301**, SEQ ID NO: **302**, SEQ ID NO: **303**, SEQ ID NO: **304**, SEQ ID NO: **305** y SEQ ID NO: **306**.

Un anticuerpo particularmente preferido de la presente invención comprende dos cadenas pesadas que comprenden cada una una región variable, un dominio C_H1 y una región bisagra, en donde la cadena pesada comprende el SEQ ID NO: **267** (anticuerpo 28P), SEQ ID NO: **268** (anticuerpo 44P) o SEQ ID NO: **266** (anticuerpo 48). Un anticuerpo particularmente preferido adicional de la presente invención comprende dos cadenas pesadas que comprenden cada una una región variable, un dominio C_H1, una región bisagra, un dominio C_H2 y un dominio C_H3 en donde la cadena pesada comprende el SEQ ID NO: **305** (anticuerpo 28P), SEQ ID NO: **306** (anticuerpo 44P) o SEQ ID NO: **304** (anticuerpo 48). Los anticuerpos 28P, 44P y 48 son particularmente preferidos debido a que muestran una termoestabilidad significativamente mejor y adicionalmente muestran una reducción de la formación de hemimoléculas.

Se ha demostrado que los anticuerpos 2, 3 y 8 forman una cantidad significativa de las denominadas hemimoléculas (HL). Estos mutantes pueden formar moléculas de anticuerpo completas (H2L2) *in vitro* en condiciones no desnaturizantes pero cualquier asociación no covalente entre las cadenas pesadas y/o entre las cadenas pesada y ligera se elimina en condiciones de SDS-PAGE no reductoras. Si bien a menudo se enseña que es deseable reducir la formación de hemimoléculas, los anticuerpos que tienen una mayor tendencia a formar hemimoléculas pueden ser ventajosos para ciertos usos. Los anticuerpos que forman hemimoléculas estables (HL) y poco o ningún anticuerpo completo (H2L2) debido a que la cadena pesada del anticuerpo es incapaz de formar una asociación covalente o no covalente con otra cadena pesada son de especial interés. Los anticuerpos que forman hemimoléculas estables pueden ser ventajosos para la producción de anticuerpos monovalentes. Los anticuerpos que forman hemimoléculas también pueden proporcionar un modo útil de producir un anticuerpo biespecífico debido a la formación de anticuerpos completos a partir de hemimoléculas que tienen diferentes especificidades, en donde el anticuerpo completo es biespecífico y monovalente para cada antígeno. Las cadenas pesadas de semejante anticuerpo biespecífico deberían estar asociadas no covalentemente.

El anticuerpo 3 conserva la C239 en la región bisagra pero parece incapaz de formar enlaces disulfuro de cadenas pesadas interbisagra, presumiblemente debido a la formación eficaz de un disulfuro entre la cisteína de la cadena ligera C-terminal y la C29 de la bisagra. Una comparación de los anticuerpos 2 y 3 muestra el grado de 'alcance' de la cisteína C-terminal de la cadena ligera, ya que el disulfuro de la cadena ligera se une más eficazmente a C239 que a C242 en la región bisagra. Además, el anticuerpo 3 muestra una mayor estabilidad en comparación con el anticuerpo 2.

Si bien los anticuerpos mutados de acuerdo con la presente invención se han descrito anteriormente con respecto al isotipo IgG4, el experto en la técnica apreciará que las mutaciones realizadas en el anticuerpo IgG4 también se pueden aplicar a otros isotipos o clases de anticuerpos que tienen la misma disposición de enlaces disulfuro que un anticuerpo IgG4 con el fin de proporcionar un anticuerpo mejorado. Los ejemplos específicos de los anticuerpos que tienen la misma disposición de enlaces disulfuro que un anticuerpo IgG4 son los anticuerpos IgG3, los anticuerpos IgM y los anticuerpos IgD. Como se muestra en la Figura 1b, IgG3 e IgM tienen una cisteína en la posición 127 en el dominio C_H1 e IgD tiene una cisteína en la posición 128 en el dominio C_H1 que es equivalente a la C127 del dominio C_H1 de IgG4 que forma un enlace disulfuro intercatenario con una cisteína de la cadena ligera. Adicionalmente, también se puede observar en la Figura 1b que las regiones de la bisagra superior de IgG3 e IgD y la región C-terminal del dominio C_H1 y la región N-terminal del dominio C_H2 de IgM no contiene un residuo de cisteína que sea equivalente a los residuos de la región bisagra superior de IgG1. Por consiguiente, la presente descripción proporciona adicionalmente un anticuerpo IgG3, un anticuerpo IgD y un

anticuerpo IgM en donde la cisteína del dominio C_H1 que forma un enlace disulfuro intercatenario con una cisteína de la cadena ligera es sustituida por otro aminoácido y en donde uno o más aminoácidos que están en una posición estructuralmente análoga a la región bisagra superior de IgG1 o IgG4 son sustituidos por cisteína.

En este aspecto de la presente invención, el anticuerpo es de la clase IgG4.

El término 'anticuerpo' según se utiliza en la presente memoria incluye anticuerpos intactos (completos) y fragmentos funcionalmente activos que comprenden dos cadenas pesadas que comprenden cada una un dominio V_H, un dominio C_H1 y una región bisagra. El anticuerpo de acuerdo con la presente invención comprende preferiblemente al menos una cadena ligera. Por consiguiente, el término "anticuerpo" en la presente invención abarca anticuerpos bi-, tri- o tetra-valentes, un dímero de fragmentos Fab' y F(ab')₂ y moléculas de anticuerpos completos que comprenden dos emparejamientos de cadena ligera y cadena pesada.

Como es bien sabido en la técnica, una molécula de Fab' típica comprende un par de cadenas pesada y ligera en el que la cadena pesada comprende una región variable V_H , un dominio constante C_{H1} y una región bisagra y la cadena ligera comprende una región variable V_L y un dominio constante C_L .

5 En una realización se proporciona un dímero de Fab' de acuerdo con la presente descripción, por ejemplo puede haber dimerización en la bisagra.

10 En una realización la cadena pesada comprende un dominio C_{H2} y un dominio C_{H3} y opcionalmente un dominio C_{H4} . En una realización el anticuerpo comprende dos cadenas pesadas cada una de las cuales se define como anteriormente en el primer o segundo aspectos de la presente invención. Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención también comprenden preferiblemente dos cadenas ligeras, en donde las regiones constantes de las cadenas ligeras son preferiblemente idénticas. En esta realización en donde el anticuerpo comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, preferiblemente ambas secuencias de la región constante de la cadena pesada son idénticas como se ha definido anteriormente por el primer o segundo aspectos de la presente invención, y ambas secuencias de la región constante de la cadena ligera son idénticas.

15 En una realización preferida, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo completo que comprende dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, en donde cada cadena pesada comprende un C_{H1} de IgG4 en donde la cisteína de la posición 127, numerada de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat es sustituida por otro aminoácido, una región bisagra superior y media de IgG1, una región bisagra inferior de IgG4, un dominio C_{H2} y un dominio C_{H3} .

20 La región bisagra completa de un anticuerpo IgG4 consiste típicamente en los residuos 226 a 251 (numeración basada en el sistema de numeración de Kabat. Sin embargo, la región bisagra puede ser acortada o alargada según se requiera. Por ejemplo, en los anticuerpos de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, el aminoácido de tipo salvaje es sustituido por un residuo de cisteína de la posición 227, 228, 229 o 230, la región bisagra puede terminar después del nuevo residuo de cisteína de la posición 227, 228, 229 o 230. Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención también pueden comprender uno o más aminoácidos adicionales situados en posición N-terminal y/o C-terminal de la región bisagra. Además otras características de la bisagra pueden ser controladas, tales como la distancia de las cisteínas de la bisagra de la cisteína intercatenaria de la cadena ligera, la distancia entre las cisteínas de la bisagra y la composición de otros aminoácidos de la bisagra que pueden afectar a las propiedades de la bisagra tales como la flexibilidad p. ej. se pueden incorporar glicinas a la bisagra para incrementar la flexibilidad rotacional o se pueden incorporar prolinas para reducir la flexibilidad. Alternativamente se pueden incorporar combinaciones de residuos cargados o hidrófobos a la bisagra para conferir propiedades de multimerización o purificación. Otras regiones bisagra modificadas pueden ser completamente sintéticas y se pueden diseñar para que posean propiedades deseadas tales como longitud, composición y flexibilidad.

30 Los dominios de la región constante, en particular en el dominio Fc, cuando está presente, empleados en la presente invención, son preferiblemente de isotipo IgG4 cuando no se requieren funciones efectoras del anticuerpo. Por consiguiente, cada cadena pesada comprende preferiblemente un dominio C_{H2} y un dominio C_{H3} de IgG4, como se muestra en el SEQ ID NO: 64.

Se apreciará que también se pueden utilizar las variantes de secuencia de los dominios de la región constante Fc.

40 En una realización cada cadena pesada comprende los dominios C_{H2} y C_{H3} de IgG4 en donde la arginina de la posición 409 (numeración EU) es sustituida por lisina, treonina, metionina o leucina con el fin de inhibir la formación de agregados a pH bajo (documento US 2008/0063635 Takahashi et al.) Asimismo se ilustran mutaciones en L235, D265, D270, K322, P331 y P329 (numeradas de acuerdo con el sistema de numeración EU) con el fin de atenuar la actividad CDC (documento US 2008/0063635 Takahashi et al.).

45 Cada cadena pesada puede comprender las mutaciones ilustradas en el documento WO2008/145142 Van de Winkel et al. que describen anticuerpos IgG4 estables que tienen una capacidad reducida para experimentar intercambio del brazo Fab por sustitución del residuo de arginina de la posición 409, el residuo de Phe de la posición 405 o la Lys de la posición 370 (numerados de acuerdo con el sistema de numeración EU).

En una realización cada cadena pesada comprende un dominio C_{H2} de IgG4 y un dominio C_{H3} de IgG1, como se muestra en el SEQ ID NO: 280.

50 En una realización las mutaciones en la C127 del dominio C_{H1} se puede realizar en posiciones equivalentes en otro isotipo IgG (1, 2, 3) o en otras clases de anticuerpos. Estos anticuerpos mutantes

pueden comprender una o más mutaciones adicionales, por ejemplo en la región bisagra y/o el dominio C_{H2} y/o el dominio C_{H3} . Los ejemplos de las mutaciones específicas en la región bisagra y en los dominios C_{H2} y C_{H3} se han descrito anteriormente con respecto a otros aspectos de la presente invención.

55 Los ejemplos específicos de los anticuerpos mutantes anteriores son los anticuerpos IgG4 mutantes 4, 5, 5P, 9, 10, 11 y 14 enumerados en la Tabla 1.

Por consiguiente la presente descripción proporciona un anticuerpo que comprende dos cadenas pesadas,

en donde cada cadena pesada comprende un dominio C_{H1} y una región bisagra y cada cadena pesada comprende las mutaciones de un anticuerpo seleccionado entre 4, 5, 5P, 9, 10, 11 y 14, como se muestra en la Tabla 1. Por consiguiente, la presente invención proporciona un anticuerpo que comprende dos cadenas pesadas, en donde cada

5 cadena pesada comprende un dominio C_{H1} y una región bisagra y cada cadena pesada comprende una de las siguientes secuencias: SEQ ID NO: **270**, SEQ ID NO: **271**, SEQ ID NO: **272**, SEQ ID NO: **273**, SEQ ID NO: **274**, SEQ ID NO: **275** y SEQ ID NO: **276**.

En una realización adicional, la presente descripción proporciona un anticuerpo que comprende dos

10 cadenas pesadas, en donde cada cadena pesada comprende un dominio C_{H1} , una región bisagra, un dominio C_{H2} y un dominio C_{H3} y cada cadena pesada comprende las mutaciones de un anticuerpo seleccionado entre 4, 5, 5P, 9, 10, 11 y 14, como se muestra en la Tabla 1. Por consiguiente, la presente invención proporciona un anticuerpo que comprende dos cadenas pesadas, en donde cada cadena pesada comprende un dominio C_{H1} , una región bisagra, un dominio C_{H2} y un dominio C_{H3} y cada cadena pesada comprende una de las siguientes secuencias: SEQ ID NO: **308**, SEQ ID NO: **309**, SEQ ID NO: **310**, SEQ ID NO: **311**, SEQ ID NO: **312**, SEQ ID NO: **313** y SEQ ID NO: **316**.

15 Se ha demostrado que los anticuerpos 4 (C127S, C239S y C242S) y 14 (C239S y C242S) forman una cantidad significativa de las denominadas hemimoléculas (HL). Estos mutantes pueden formar moléculas de anticuerpo completas (H2L2) *in vitro* en condiciones no desnaturalizantes pero cualquier asociación no covalente entre las cadenas pesadas y/o entre cadenas pesadas y ligeras se elimina en condiciones de SDS-PAGE no reductoras. Si bien a menudo se ilustra que es deseable reducir la formación de hemimoléculas, los anticuerpos que tienen una mayor tendencia a formar hemimoléculas pueden ser ventajosas para ciertos usos, por ejemplo la formación *in vitro* de hemimoléculas puede facilitar el intercambio de cadena pesada y facilitar la preparación de anticuerpos IgG4

20 biospecíficos de acuerdo con la presente descripción.

También se ha demostrado que los anticuerpos 2, 3 y 8, descritos anteriormente, forman cantidades significativas de hemimoléculas y, por lo tanto, se pueden utilizar en situaciones en las que es deseable la formación de una

25 hemimolécula.

El anticuerpo 3 conserva la C239 en la región bisagra pero parece incapaz de formar enlaces disulfuro de cadena pesada interbisagra, presumiblemente debido a la formación eficaz de un disulfuro entre la cisteína de la cadena ligera C-terminal y la C239 de la bisagra. Una comparación de los anticuerpos 2 y 3 muestra el grado de 'alcance' de la cisteína C-terminal de la cadena ligera, ya que el disulfuro de la cadena ligera se une más eficazmente a C239 que a C242 en la región bisagra. Además, el anticuerpo 3 muestra una mayor estabilidad en comparación con el anticuerpo 2.

30

Los anticuerpos 5 (G230C), 5P (G230C y S241P), 9 (G230C y C239S), 10 (G230C y C242S) y 11 (G230C, C239S y C242S) comprenden dos cisteínas (una cisteína en la posición 127 en C_{H1} y en 230 en la bisagra superior) con las cuales la cisteína de la cadena ligera puede formar un enlace disulfuro. Por consiguiente, estos anticuerpos pueden comprender una cisteína no unida a disulfuro en C_{H1} o la región bisagra de la cadena pesada que se puede utilizar ventajosamente para el anclaje de una molécula efectora a la cisteína no unida a disulfuro. Otro anticuerpo 5 comprende dos cisteínas en la bisagra en C239 y C242 y, por lo tanto, será resistente a una etapa de reducción suave requerida para activar el tiol libre de la cisteína no unida a disulfuro para insertar una molécula efectora. Otro anticuerpo 11, comprende cisteínas que no están en la bisagra en 239 y 242, y por lo tanto esto reduce la oportunidad de que cualquier molécula efectora se ancle a estas posiciones en la bisagra.

35

40

El término 'anticuerpo' según se utiliza en la presente memoria incluye anticuerpos intactos (completos) y fragmentos funcionalmente activos que comprenden dos cadenas pesadas que comprenden cada una un dominio V_H , un dominio C_{H1} y una región bisagra. El anticuerpo de acuerdo con la presente invención preferiblemente comprende al menos una cadena ligera. Por consiguiente, el término "anticuerpo" en la presente invención abarca anticuerpos bi, tri o tetra-valentes, fragmentos Fab' y $F(ab')_2$, hemimoléculas de anticuerpo o hemimoléculas que comprenden un solo emparejamiento de cadena ligera y cadena pesada y moléculas de anticuerpo completas que comprenden dos emparejamientos de cadena ligera y cadena pesada.

45

Como es bien sabido en la técnica, una molécula Fab' típica comprende un par de cadenas pesada y ligera en el que la cadena pesada comprende una región variable V_H , un dominio constante C_{H1} y una región bisagra y la cadena ligera comprende una región variable V_L y un dominio constante C_L .

50

En una realización se proporciona un dímero de Fab' de acuerdo con la presente descripción, por ejemplo la dimerización puede ser en la bisagra.

En una realización la cadena pesada comprende un dominio C_{H2} y un dominio C_{H3} y opcionalmente un dominio C_{H4} . En una realización el anticuerpo comprende dos cadenas pesadas cada una de las cuales se define como antes en el primer o segundo aspectos de la presente invención. Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención también comprenden preferiblemente dos cadenas ligeras. En esta realización en donde el anticuerpo comprende dos cadenas pesadas, preferiblemente ambas secuencias de las cadenas pesadas son idénticas como se ha

55

definido anteriormente mediante el primer o segundo aspectos de la presente invención. En una realización preferida el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo completo que comprende dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, en donde cada cadena pesada comprende un C_H1 de IgG4 en donde la cisteína de la posición 127, numerada de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat es sustituida por otro aminoácido, una región bisagra superior y media de IgG1, una región bisagra inferior de IgG4, un dominio C_H2 y un dominio C_H3.

La región bisagra completa de un anticuerpo IgG4 consiste típicamente en los residuos 226 a 251 (numeración basada en el sistema de numeración de Kabat. Sin embargo, la región bisagra se puede acortar o alargar según se requiera. Por ejemplo, en los anticuerpos de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, el aminoácido de tipo salvaje es sustituido por un residuo de cisteína de la posición 227, 228, 229 o 230, la región bisagra puede terminar después del nuevo residuo de cisteína de la posición 227, 228, 229 o 230. Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención también pueden comprender uno o más aminoácidos adicionales situados en posición N-terminal y/o C-terminal de la región bisagra. Además se pueden controlar otras características de la bisagra, tales como la distancia de las cisteínas de la bisagra de la cisteína intercatenaria de la cadena ligera, la distancia entre las cisteínas de la bisagra y la composición de otros aminoácidos de la bisagra que pueden afectar a las propiedades de la bisagra tales como la flexibilidad, p. ej., se pueden incorporar glicinas a la bisagra para aumentar la flexibilidad rotacional o se pueden incorporar prolinas para reducir la flexibilidad. Alternativamente se pueden incorporar combinaciones de residuos cargados o hidrófobos a la bisagra para conferir propiedades de multimerización o purificación. Otras regiones bisagra modificadas pueden ser completamente sintéticas y se pueden diseñar para que posean propiedades deseadas tales como longitud, composición y flexibilidad.

Los dominios de la región constante, en particular en el dominio Fc, cuando está presente, empleados en la presente invención, son preferiblemente de isotipo IgG4 cuando no se requieren funciones efectoras del anticuerpo. Por consiguiente cada cadena pesada comprende preferiblemente un dominio C_H2 y un dominio C_H3 de IgG4, como se muestra en el SEQ ID NO: **279**.

En una realización, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo monoclonal completamente humano, humanizado o quimérico. En una realización el anticuerpo es completamente humano o humanizado.

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar mediante cualquier método conocido en la técnica, tal como la técnica del hibridoma (Kohler & Milstein, *Nature*, 1975, 256, 495-497), la técnica del trioma, la técnica del hibridoma de células B humanas (Kozbor et al., *Immunology Today*, 1983, 4, 72) y la técnica del EBV-hibridoma (Cole et al., "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", págs. 77-96, Alan R. Liss, Inc., 1985).

Los anticuerpos para su uso en la invención también pueden ser generados utilizando métodos de anticuerpos de linfocitos mediante la clonación y expresión de ADNc de la región variable de inmunoglobulina generados a partir de linfocitos individuales seleccionados para la producción de anticuerpos específicos, por ejemplo, mediante los métodos descritos por Babcook, J. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93(15), 7843-7848, el documento WO 92/02551, el documento WO2004/051268 y el documento WO2004/106377.

Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpos de especies no humanas que tienen una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la especie no humana y una región marco de una inmunoglobulina humana que comprende opcionalmente uno o más residuos donadores de la especie no humana (véase, por ejemplo, el documento US 5.585.089).

Los anticuerpos para su utilización en la presente invención también pueden ser generados utilizando diversos métodos de presentación en fagos conocidos en la técnica e incluyen los descritos por Brinkman et al., *J. Immunol. Methods*, 1995, 182, 41-50; Ames et al., *J. Immunol. Methods*, 1995, 184, 177-186; Kettleborough et al. *Eur. J. Immunol.*, 1994, 24, 952-958; Persic et al., *Gene*, 1997 187, 9-18; y Burton et al., *Advances in Immunology*, 1994, 57, 191-280; documento WO 90/02809; documento WO 91/10737; documento WO 92/01047; documento WO 92/18619; documento WO 93/11236; documento WO 95/15982; y documento WO 95/20401; y documentos US 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743; y 5.969.108. Asimismo se pueden utilizar ratones transgénicos, u otros organismos, incluyendo otros mamíferos, para generar anticuerpos humanizados.

Los anticuerpos completamente humanos son aquellos anticuerpos en los que las regiones variables y las regiones constantes (cuando están presentes) de las cadenas pesadas y ligeras son en su totalidad de origen humano, o sustancialmente idénticas a secuencias de origen humano, no necesariamente del mismo anticuerpo. Los ejemplos de los anticuerpos completamente humanos pueden incluir anticuerpos producidos por ejemplo mediante los métodos de presentación en fagos descritos anteriormente y anticuerpos producidos por ratones en los que los genes de las regiones variables y/o constantes de la inmunoglobulina murina han sido reemplazados por sus contrapartes humanas p. ej. como se describe en términos generales en los documentos EP0546073 B1, US 5.545.806, US 5.569.825, US 5.625.126, US 5.633.425, US 5.661.016, US 5.770.429, EP 0438474 B1 y EP0463151 B1. El anticuerpo material de partida para su uso en la presente invención se puede preparar mediante el uso de técnicas de ADN recombinante que implican la manipulación y la re-expresión de ADN que codifica las regiones variables y constantes del anticuerpo. Se pueden utilizar las técnicas convencionales de la biología molecular para modificar, añadir o suprimir aminoácidos o dominios según se desee. Cualquier alteración de las regiones variables

o constantes todavía estará incluida en los términos región 'variable' y 'constante' según se utilizan en la presente memoria.

5 El anticuerpo material de partida puede ser obtenido a partir de cualquier especie incluyendo por ejemplo ratón, rata, conejo, hámster, camello, llama, cabra o ser humano. Se pueden obtener partes del anticuerpo de más de una especie, por ejemplo el anticuerpo puede ser quimérico. En un ejemplo, las regiones constantes son de una especie y las regiones variables de otra. El anticuerpo material de partida puede ser modificado. En otro ejemplo, la región variable del anticuerpo ha sido creada utilizando técnicas de modificación de ADN recombinante. Tales versiones modificadas incluyen aquellas creadas por ejemplo a partir de regiones variables de anticuerpos naturales por medio de inserciones, deleciones o cambios en o para las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos naturales. Los ejemplos concretos de este tipo incluyen aquellos dominios de la región variable modificados genéticamente que contienen al menos una CDR y, opcionalmente, uno o más aminoácidos del marco de un anticuerpo y el resto del dominio de la región variable de un segundo anticuerpo. Los métodos para crear y elaborar estos anticuerpos son bien conocidos en la técnica (véanse por ejemplo, Boss et al., documento US 4.816.397; Cabilly et al., documento US 6.331.415; Shrader et al., documento WO 92/02551; Ward et al., 1989, Nature, 341, 544; Orlandi et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 3833; Riechmann et al., 1988, Nature, 322, 323; Bird et al., 1988, Science, 242, 423; Queen et al., documento US 5.585.089; Adair, documento WO91/09967; Mountain y Adair, 1992, Biotechnol. Genet. Eng. Rev, 10, 1-142; Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181).

20 En una realización el anticuerpo comprende un par de dominios variables que forman un dominio de unión que es un par cognado. Se pretende que par cognado según se emplea en la presente memoria haga referencia a un par natural de dominios variables, es decir, aislado de un único anticuerpo o una célula que expresa un anticuerpo.

Los dominios variables pueden haber sido optimizados y/o humanizados.

Los dominios variables optimizados/humanizados derivados de un par cognado todavía serán considerados un par cognado después de la optimización/humanización.

De este modo la invención se amplía a moléculas humanas, humanizadas o quiméricas.

25 En una realización la molécula se une específicamente a un antígeno diana. Se pretende que se une específicamente según se emplea en la presente memoria haga referencia a moléculas que tienen una elevada afinidad por un antígeno diana (para el cual son específicas) y que se unen a antígenos para los cuales no son específicas con una afinidad baja o mucho menor (o no se unen en absoluto). Los métodos para medir la afinidad son conocidos por los expertos en la técnica e incluyen análisis tales como BIAcore™.

30 Las moléculas de anticuerpo de la presente invención tienen adecuadamente una elevada afinidad de unión, en particular, nanomolar o picomolar. La afinidad se puede medir utilizando cualquier método adecuado conocido en la técnica, incluyendo BIAcore™. En una realización la molécula de la presente invención tiene una afinidad de unión de aproximadamente 100 pM o mejor. En una realización la molécula de la presente invención tiene una afinidad de unión de aproximadamente 50pM o mejor. En una realización la molécula de la presente invención tiene una afinidad de unión de aproximadamente 40pM o mejor. En una realización la molécula de la presente invención tiene una afinidad de unión de aproximadamente 30 pM o mejor. En una realización la molécula de la presente invención es completamente humana o humanizada y tiene una afinidad de unión de aproximadamente 100 pM o mejor.

40 Se pretende que un derivado de un dominio de origen natural empleado en la presente memoria haga referencia al caso en el que uno, dos, tres, cuatro o cinco aminoácidos en una secuencia de origen natural han sido reemplazados o suprimidos, por ejemplo para optimizar las propiedades del dominio, por ejemplo eliminando propiedades no deseables pero en donde los rasgos característicos del dominio se conservan. En una realización las moléculas de anticuerpo de la presente invención comprenden uno o más péptidos de unión a albúmina. *In vivo* el péptido se une a albúmina, lo que incrementa la vida media de la molécula.

45 El péptido de unión a albúmina puede ser anexado desde una o más regiones variables, una bisagra o extremo C de la molécula o cualquier localización que no interfiera en las propiedades de unión del antígeno a las moléculas.

Los ejemplos de los péptidos de unión a albúmina se proporcionan en el documento WO 2007/106120.

50 Un experto en la técnica también entenderá que el anticuerpo puede experimentar una variedad de modificaciones post-traduccionales. El tipo y el grado de estas modificaciones a menudo dependen de la línea celular anfitriona utilizada para expresar la molécula así como de las condiciones de cultivo. Tales modificaciones pueden incluir variaciones en la glicosilación, la oxidación de metionina, la formación de diceto piperazina, la isomerización de aspartato y la desamidación de asparragina. Una modificación frecuente es la pérdida de un residuo alcalino carboxi-terminal (tal como lisina o arginina) debido a la acción de carboxipeptidasas (como describe Harris, R.J. Journal of Chromatography 705:129-134, 1995).

55 Si se desea se puede conjugar una molécula para su uso en la presente invención con una o más moléculas efectoras. Se apreciará que la molécula efectora puede comprender una única molécula efectora o dos o más de tales moléculas conectadas de manera que formen un único radical que pueda ser anclado a la molécula de

anticuerpo de la presente invención. Cuando se desea obtener un anticuerpo de acuerdo con la invención conectado a una molécula efectora, éste puede ser preparado mediante procedimientos químicos o de ADN recombinante convencionales en los que el anticuerpo está conectado directamente o a través de un agente de acoplamiento a la molécula efectora. Las técnicas para conjugar tales moléculas efectoras a un anticuerpo son bien conocidas en la técnica (véanse, Hellstrom et al., *Controlled Drug Delivery*, 2ª Ed., Robinson et al., eds., 1987, págs. 623-53; Thorpe et al., 1982, *Immunol. Rev.*, 62:119-58 y Dubowchik et al., 1999, *Pharmacology and Therapeutics*, 83, 67-123). Los procedimientos químicos concretos incluyen, por ejemplo, aquellos descritos en los documentos WO 93/06231, WO 92/22583, WO 89/00195, WO 89/01476 y WO03031581. Alternativamente, cuando la molécula efectora es una proteína o un polipéptido la conexión se puede lograr utilizando procedimientos de ADN recombinante, por ejemplo como se describe en los documentos WO 86/01533 y EP0392745.

El término molécula efectora según se utiliza en la presente memoria incluye, por ejemplo, agentes antineoplásicos, fármacos, toxinas, proteínas biológicamente activas, por ejemplo enzimas, otro anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, polímeros de origen sintético o natural, ácidos nucleicos y fragmentos de los mismos p. ej. ADN, ARN y fragmentos de los mismos, radionúclidos, particularmente radioyoduro, radioisótopos, metales quelados, nanopartículas y grupos informadores tales como compuestos fluorescentes o compuestos que pueden ser detectados mediante espectroscopía NMR o ESR.

Los ejemplos de las moléculas efectoras pueden incluir citotoxinas o agentes citotóxicos que incluyen cualquier agente que sea perjudicial (p. ej. destruye) para las células. Los ejemplos incluyen combrestatinas, dolastatinas, epotilones, estaurosporina, maitansinoides, espongistatinas, rizoxina, halicondrinas, roridinas, hemiasterlinas, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenipósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi-antracino-diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puromicina y análogos u homólogos de los mismos.

Las moléculas efectoras también incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (p. ej. metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil- descabazina), agentes alquilantes (p. ej. mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, y cis-diclorodiamino-platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (p. ej. daunorrubicina (antes daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (p. ej. dactinomicina (antes actinomicina), bleomicina, mitramicina, antramina (AMC), caliqueamicinas o duocarmicinas), y agentes anti-mitóticos (p. ej. vincristina y vinblastina).

Otras moléculas efectoras pueden incluir radionúclidos quelados tales como ^{111}In e ^{90}Y , Lu^{177} , Bismuto 213 , Californio 252 , Iridio 192 y Tungsteno 188 /Rhenio 188 , o fármacos tales como, pero no limitados a, alquilfosfocolinas, inhibidores de topoisomerasa I, taxoides y suramina.

Otras moléculas efectoras incluyen proteínas, péptidos y enzimas. Las enzimas de interés incluyen, pero no se limitan a, enzimas proteolíticas, hidrolasas, liasas, isomerasas, transferasas. Las proteínas, polipéptidos y péptidos de interés incluyen, pero no se limitan a, inmunoglobulinas, toxinas tales como abrina, ricina A, exotosina de pseudomonas, o toxina de difteria, una proteína tal como insulina, factor de necrosis tumoral, interferón α , interferón β , factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas o activador de plasminógeno tisular, un agente trombotico o un agente anti-angiogénico, p. ej. angiostatina o endostatina, o, un modificador de la respuesta biológica tal como una linfoquina, interleuquina-1 (IL-1), interleuquina-2 (IL-2), factor estimulador de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento nervioso (NGF) u otro factor de crecimiento e inmunoglobulinas.

Otras moléculas efectoras pueden incluir sustancias detectables útiles por ejemplo en el diagnóstico. Los ejemplos de las sustancias detectables incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, núclidos radiactivos, metales emisores de positrones (para su uso en la tomografía de emisión de positrones), e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. Véase en general la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.741.900 para los iones metálicos que pueden ser conjugados con anticuerpos para su uso como diagnóstico. Las enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, o acetilcolinesterasa; los grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina, avidina y biotina; los materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamin-fluoresceína, cloruro de dansilo y ficoeritrina; los materiales luminiscentes adecuados incluyen luminol; los materiales bioluminiscentes adecuados incluyen luciferasa, luciferina, y aequorina; y los núclidos radiactivos adecuados incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In y ^{99}Tc .

En otro ejemplo, la molécula efectora puede incrementar la vida media del anticuerpo *in vivo*, y/o reducir la inmunogenicidad del anticuerpo y/o potenciar el suministro de un anticuerpo a través de la barrera epitelial al sistema inmunitario. Los ejemplos de las moléculas efectoras de este tipo adecuadas incluyen polímeros, albúmina, proteínas de unión a albúmina o compuestos de unión a albúmina tales como los descritos en el documento WO 05/117984.

Cuando la molécula efectora es un polímero, éste puede ser, en general, un polímero sintético o de origen natural, por ejemplo un polialquileno, polialquenileno o polioxilalquileno de cadena lineal o ramificada opcionalmente

sustituida o un polisacárido ramificado o no ramificado , p. ej. un homo- o hetero-polisacárido.

Los sustituyentes opcionales específicos que pueden estar presentes en los polímeros sintéticos anteriormente mencionados incluyen uno o más grupos hidroxilo, metilo o metoxi.

5 Los ejemplos específicos de los polímeros sintéticos incluyen poli(etilenglicol), poli(propilenglicol) poli(alcohol vinílico) de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituida o derivados de los mismos, especialmente poli(etilenglicol) opcionalmente sustituido tal como metoxipoli(etilenglicol) o derivados de los mismos.

Los polímeros de origen natural específicos incluyen lactosa, amilosa, dextrano, glicógeno o derivados de los mismos.

10 Se pretende que "derivados" según se utiliza en la presente memoria incluya derivados reactivos, por ejemplo grupos selectivos reactivos con tiol tales como maleimidados y similares. El grupo reactivo puede estar conectado directamente o a través de un segmento conector al polímero. Se apreciará que el residuo de semejante grupo formará parte, en algunos casos, del producto como grupo conector entre el anticuerpo de la descripción y el polímero.

15 El tamaño del polímero se puede variar según se desee, pero generalmente estará en un intervalo de peso molecular promedio entre 500 Da y 50000 Da, por ejemplo de 5000 a 40000 Da tal como de 20000 a 40000 Da. El tamaño del polímero se puede seleccionar en particular basándose en el uso pretendido del producto, por ejemplo la capacidad para localizar ciertos tejidos tales como tumores o ampliar la vida media en la circulación (para una revisión véase Chapman, 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 531-545). De este modo, por ejemplo, cuando se pretende que el producto deje la circulación y penetre en el tejido, por ejemplo para su uso en el tratamiento de un tumor, puede ser ventajoso utilizar un polímero de bajo peso molecular, por ejemplo con un peso molecular de alrededor de 5000 Da. Para aplicaciones en las que el producto permanece en la circulación, puede ser ventajoso utilizar un polímero de mayor peso molecular, por ejemplo con un peso molecular en el intervalo de 20000 Da a 40000 Da.

25 Los polímeros adecuados incluyen un polímero de polialquileno, tal como un poli(etilenglicol) o, especialmente, un metoxipoli(etilenglicol) o un derivado del mismo, y especialmente con un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 15000 Da a aproximadamente 40000 Da.

30 En un ejemplo, se ancla un anticuerpo para su uso en la presente invención a radicales de poli(etilenglicol) (PEG). En un ejemplo concreto, las moléculas de PEG se pueden anclar a través de cualquier cadena lateral de aminoácido disponible o grupo funcional de aminoácido terminal localizado en el anticuerpo, por ejemplo cualquier grupo amino, imino, tiol, hidroxilo o carboxilo libre. Tales aminoácidos pueden existir de forma natural en el anticuerpo o pueden ser modificados genéticamente en el anticuerpo utilizando métodos de ADN recombinante (véase por ejemplo el documento US 5.219.996; el documento US 5.667.425; el documento WO 98/25971). En un ejemplo, la molécula de la presente invención es un anticuerpo modificado en donde la modificación es la adición al extremo C-terminal de su cadena pesada de uno o más aminoácidos para permitir el anclaje de una molécula efectora. Se pueden utilizar múltiples sitios para anclar dos o más moléculas de PEG.

35 En una realización, se conecta una molécula de PEG a una cisteína 171 de la cadena ligera, por ejemplo véase el documento WO2008/038024 incorporado a la presente memoria como referencia.

40 Adecuadamente las moléculas de PEG se conectan covalentemente a través de un grupo tiol de al menos un residuo de cisteína localizado en el anticuerpo. Cada molécula de polímero anclada al anticuerpo modificado puede conectarse covalentemente al átomo de azufre de un residuo de cisteína localizado en el anticuerpo. La conexión covalente será generalmente un enlace disulfuro o, en particular, un enlace azufre-carbono. Cuando se utiliza un grupo tiol como punto de anclaje, se pueden utilizar moléculas efectoras apropiadamente activadas, por ejemplo derivados selectivos de tiol tales como maleimidados y derivados de cisteína. Se puede utilizar un polímero activado como material de partida en la preparación de un anticuerpo modificado con polímero como se ha descrito anteriormente. El polímero activado puede ser cualquier polímero que contenga un grupo reactivo con tiol tal como un ácido o éster α -halocarboxílico, p. ej. yodoacetamida, una imida, p. ej. maleimida, una vinilsulfona o un disulfuro. Tales materiales de partida se pueden obtener comercialmente (por ejemplo de Nektar, antes Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, USA) o se pueden preparar a partir de materiales de partida disponibles en el mercado utilizando procedimientos químicos convencionales. Las moléculas de PEG concretas incluyen 20K metoxi-PEG-amina (obtenible de Nektar, antes Shearwater; Rapp Polymere; y SunBio) y M-PEG-SPA (obtenible de Nektar, antes Shearwater).

50 La presente invención también proporciona ADN aislado que codifica una molécula de anticuerpo descrita en la presente memoria.

En un aspecto adicional se proporciona un vector que comprende dicho ADN.

55 Los métodos generales por medio de los cuales se pueden construir los vectores, los métodos de transfección y los métodos de cultivo son bien conocidos por los expertos en la técnica. En este sentido, se hace referencia a "Current

Protocols in Molecular Biology", 1999, F. M. Ausubel (ed), Wiley Interscience, Nueva York y el Manual de Maniatis producido por Cold Spring Harbor Publishing.

En un aspecto adicional, se proporciona una célula anfitriona que comprende dicho vector y/o ADN.

5 Se puede utilizar cualquier sistema de célula anfitriona/vector adecuado para la expresión de las secuencias de ADN que codifican la molécula de la presente invención. Se pueden utilizar sistemas bacterianos, por ejemplo *E. coli*, y otros sistemas microbianos o también se pueden utilizar sistemas de expresión de células anfitrionas eucarióticos, por ejemplo de mamífero. Las células anfitrionas de mamífero adecuadas incluyen células CHO, de mieloma o de hibridoma.

10 La presente invención también proporciona un procedimiento para la producción de una molécula de anticuerpo como se describe en la presente memoria que comprende cultivar una célula anfitriona que contiene un vector (y/o ADN) de la presente invención en condiciones adecuadas para conducir a la expresión de la proteína a partir del ADN que codifica una molécula de anticuerpo de la presente invención, y aislar una molécula de anticuerpo.

15 Para la producción de productos que comprenden cadenas tanto pesadas como ligeras, se puede transfectar la línea celular con dos vectores, un primer vector que codifica un polipéptido de cadena ligera y un segundo vector que codifica un polipéptido de cadena pesada. Alternativamente, se puede utilizar un único vector, incluyendo el vector secuencias que codifica los polipéptidos de cadena ligera y cadena pesada.

Las moléculas de anticuerpo de acuerdo con la presente descripción se expresan en niveles adecuados a partir de las células anfitrionas haciéndolas propicias para el procesamiento comercial.

20 El anticuerpo puede ser específico para cualquier antígeno diana. El antígeno puede ser una proteína asociada a la célula, por ejemplo una proteína de la superficie celular sobre células tales como células bacterianas, células de levadura, células T, células endoteliales o células tumorales, o puede ser una proteína soluble. Los antígenos de interés también pueden ser cualquier proteína médicamente relevante tales como las proteínas reguladas al alza durante una enfermedad o infección, por ejemplo receptores y/o sus correspondientes ligandos. Los ejemplos concretos de las proteínas de la superficie celular incluyen moléculas de adherencia, por ejemplo integrinas tales
25 como integrinas $\beta 1$ p. ej. VLA-4, E-selectina, P selectina o L-selectina, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD11a, CD11b, CD18, CD19, CD20, CD23, CD25, CD33, CD38, CD40, CD40L, CD45, CDW52, CD69, CD134 (OX40), ICOS, BCMP7, CD137, CD27L, CD28, CD30, CD31, CSF1 o Receptor de CSF1, DPCR1, DPCR1, dudulina 2, FLJ20584, FLJ40787, HEK2, KIAA0634, KIAA0659, KIAA1246, KIAA1455, LTBP2, LTK, MAL2, MRP2, nectina tipo 2, NKCC1, PTK7, RAIG1, TCAM1, SC6, BCMP101, BCMP84, BCMP11, DTD, antígeno carcinoembrionario (CEA), globulina de
30 grasa de leche humana (HMFG1 y 2), antígenos de MHC de Clase I y MHC de Clase II, KDR y VEGF, PD-1, DC-SIGN, TL1A, DR3, receptor A de IL-7 y cuando sea apropiado, receptores de las mismas.

Los antígenos solubles incluyen interleuquinas tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, IL-13, IL-14, IL-16 o IL-17, tales como IL17A y/o IL17F, antígenos virales, por ejemplo antígenos de virus respiratorio sincitial o de citomegalovirus, inmunoglobulinas, tales como IgE, interferones tales como interferón α , interferón β o interferón γ , factor de necrosis tumoral TNF (conocido antes como factor de necrosis tumoral α y referido en la presente memoria como TNF o TNF α), factor de necrosis tumoral β , factores estimuladores de colonias tales como G-CSF o GM-CSF, y factores de crecimiento derivados de plaquetas tales como PDGF- α , y PDGF- β , WISP-1 y cuando sea apropiado receptores de los mismos. Otros antígenos incluyen antígenos de superficie celular bacteriana, toxinas bacterianas, virus tales como influenza, EBV, HepA, B y C, agentes de terrorismo biológico, radionúclidos y metales pesados, y
40 venenos y toxinas de serpientes y arañas.

En una realización se proporciona un método para generar un anticuerpo biespecífico simétrico que comprende la etapa de mezclar un primer anticuerpo IgG4 con un segundo anticuerpo IgG4 *ex vivo*, en condiciones propicias para el intercambio de la cadena pesada, en donde la especificidad antigénica de las regiones variables en el primer anticuerpo es diferente de la especificidad antigénica de las regiones variables en el segundo anticuerpo.

45 Las condiciones *in vitro* propicias para el intercambio de la cadena pesada incluyen condiciones reductoras. Los agentes reductores adecuados incluyen GSH, 2-mercaptoetanol, 2-mercaptoetilamina, TBP, TCEP, cisteína-HCl y DTT.

Las concentraciones adecuadas de los agentes reductores se encuentran en el intervalo de 0,01 a 10 mM por ejemplo de 0,5 a 5 mM. Además, la reducción se puede lograr utilizando tampones redox, es decir diferentes razones relativas de variantes oxidadas y reducidas de los reactivos tales como por ejemplo: GSH:GSSG y Cys:diCys

Las condiciones adecuadas incluyen razones de anticuerpos que están entre 0,5:5 a 5:05, tal como 1:1 o 1:2.

La temperatura adecuada incluye de 15 a 40°C, tal como 37°C.

55 Las condiciones reductoras se pueden seleccionar para que estén entre las estabilidades reductoras de los homodímeros y los heterodímeros.

En una realización alternativa los anticuerpos de la descripción se preparan empleando un cultivo mixto de células, por ejemplo se produce un intercambio ~50%. Esto puede producir un rendimiento en el intervalo de 1-2 g/l del biespecífico deseado.

5 En una realización se proporciona un anticuerpo o fragmento obtenido u obtenible a partir de un procedimiento o método descritos en la presente memoria.

En una realización, se puede utilizar el anticuerpo para alterar funcionalmente la actividad del antígeno de interés. Por ejemplo, el anticuerpo puede neutralizar, suscitar antagonismo, o suscitar agonismo de la actividad de dicho antígeno directamente o indirectamente.

10 Las moléculas de anticuerpo de la presente invención son útiles en el tratamiento y/o la profilaxis de una afección patológica.

De este modo se proporciona un anticuerpo de acuerdo con la presente invención para su uso en el tratamiento, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del mismo, por ejemplo en una formulación farmacéutica. En una realización el anticuerpo de acuerdo con la invención se administra tópicamente a los pulmones, por ejemplo mediante inhalación.

15 Los anticuerpos proporcionados por la presente invención son útiles en el tratamiento de enfermedades o trastornos incluyendo enfermedades y trastornos inflamatorios, enfermedades y trastornos inmunitarios, trastornos fibróticos y cánceres.

20 El término "enfermedad o trastorno inflamatorio" y "enfermedad o trastorno inmunitario" incluye artritis reumatoide, artritis psoriásica, enfermedad de Still, enfermedad de Muckle Wells, psoriasis, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, LEG (Lupus Eritematoso Generalizado), asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica, esclerosis múltiple, vasculitis, diabetes mellitus Tipo I, trasplantes y enfermedad injerto versus anfitrión.

25 El término "trastorno fibrótico" incluye fibrosis pulmonar idiopática (FPI), esclerosis sistémica (o escleroderma), fibrosis renal, nefropatía diabética, nefropatía por IgA, hipertensión, enfermedad renal en fase terminal, fibrosis peritoneal (diálisis peritoneal ambulatoria continua), cirrosis hepática, degeneración macula asociada con la edad (DMAE), retinopatía, fibrosis reactiva cardíaca, cicatrización, queloides, quemaduras, úlceras de la piel, angioplastia, cirugía de bypass coronario, artroplastia y cirugía de cataratas.

30 El término "cáncer" incluye un nuevo crecimiento maligno que resulta del epitelio, se encuentra en la piel, o más comúnmente, en el revestimiento de los órganos corporales, por ejemplo: mama, ovario, próstata, pulmón, riñón, páncreas, estómago, vejiga o intestino. Los cánceres tienden a infiltrarse en el tejido adyacente y a propagarse (metastatizar) a órganos distantes, por ejemplo: a hueso, hígado, pulmón o el cerebro. La presente invención también proporciona una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende un anticuerpo de la presente invención combinado con uno o más de un excipiente, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable. Por consiguiente, se proporciona el uso de un anticuerpo de la invención para la fabricación de un medicamento. La composición se suministrará normalmente como parte de una composición farmacéutica, estéril que incluirá normalmente un portador farmacéuticamente aceptable. Una composición farmacéutica de la presente invención puede comprender adicionalmente un coadyuvante farmacéuticamente aceptable.

35 La presente invención también proporciona un procedimiento para la preparación de una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende añadir y mezclar el anticuerpo de la presente invención junto con uno o más de un excipiente, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

40 El anticuerpo de la descripción puede ser el único ingrediente activo de la composición farmacéutica o de diagnóstico o puede estar acompañado de otros ingredientes activos incluyendo otros ingredientes de anticuerpos, por ejemplo anticuerpos anti-TNF, anti-IL-1 β , anti-células T, anti-IFN γ o anti-LPS, o ingredientes que no son anticuerpos tales como xantinas. Otros ingredientes activos adecuados incluyen anticuerpos que son capaces de inducir tolerancia, por ejemplo, anticuerpos anti-CD3 o anti-CD4.

45 En una realización adicional el anticuerpo o composición de acuerdo con la descripción se emplean combinados con un agente farmacéuticamente activo adicional, por ejemplo un corticosteroide (tal como propionato de fluticasona) y/o un agonista beta-2 (tal como salbutamol, salmeterol o formoterol) o inhibidores del crecimiento y la proliferación celulares (tales como rapamicina, ciclofosfamida, metotrexato) o un inhibidor de CD28 y/o CD40 alternativo. En una realización el inhibidor es una molécula pequeña. En otra realización el inhibidor es un anticuerpo específico para la diana.

50 Las composiciones farmacéuticas comprenden adecuadamente una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de la invención. El término "cantidad terapéuticamente eficaz" según se utiliza en la presente memoria hace referencia a una cantidad de un agente terapéutico necesaria para tratar, aliviar o prevenir una enfermedad o afección elegidas como diana, o para mostrar un efecto terapéutico o preventivo detectable. La cantidad terapéuticamente eficaz puede ser estimada inicialmente en análisis de cultivo de células o en modelos animales, normalmente en roedores, conejos, perros, cerdos o primates. El modelo animal también se puede utilizar para

determinar el intervalo de concentración y la ruta de administración apropiados. Semejante información se puede utilizar a continuación para determinar las dosis y rutas útiles para la administración en seres humanos.

5 La cantidad terapéuticamente eficaz exacta para un sujeto humano dependerá de la gravedad del estado de enfermedad, de la salud general del sujeto, de la edad, el peso y el género del sujeto, de la dieta, el tiempo y la frecuencia de administración, de la combinación de fármacos, de las sensibilidades de reacción y de la tolerancia/respuesta a la terapia. Esta cantidad puede ser determinada mediante experimentación rutinaria y está dentro del criterio del profesional clínico. Generalmente, una cantidad terapéuticamente eficaz estará entre 0,01 mg/kg y 50 mg/kg, por ejemplo entre 0,1 mg/kg y 20 mg/kg. Las composiciones farmacéuticas se pueden presentar convenientemente en formas de dosificación unitarias que contienen una cantidad previamente determinada de un agente activo de la invención por dosis.

10 Las composiciones se pueden administrar individualmente a un paciente combinadas (p. ej. simultáneamente, secuencialmente o por separado) con otros agentes, fármacos u hormonas.

15 La dosis a la cual se administra un anticuerpo de la presente invención depende de la naturaleza de la afección a tratar, por ejemplo el grado de la enfermedad/inflamación presente y de que la molécula se esté utilizando profilácticamente o para tratar una afección existente. La frecuencia de las dosis dependerá de la vida media del anticuerpo y de la duración de su efecto. Si el anticuerpo tiene una vida media corta (p. ej. de 2 a 10 horas) puede ser necesario administrar una o más dosis al día. Alternativamente, si el anticuerpo tiene una vida media larga (p. ej. de 2 a 15 días) puede ser necesario administrar solamente una dosificación una vez al día, una vez a la semana, o incluso una vez cada 1 ó 2 meses. El portador farmacéuticamente aceptable no debe inducir por sí mismo la producción de anticuerpos nocivos para el individuo que recibe la composición y no debe ser tóxico. Los portadores adecuados pueden ser macromoléculas grandes, metabolizadas lentamente tales como proteínas, polipéptidos, liposomas, polisacáridos, poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas de virus inactivas.

20 Se pueden utilizar sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo sales de ácidos minerales, tales como hidrocloruros, hidrobromuros, fosfatos y sulfatos, o sales de ácidos orgánicos, tales como acetatos, propionatos, malonatos y benzoatos.

25 Los portadores farmacéuticamente aceptables de las composiciones terapéuticas pueden contener adicionalmente líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Adicionalmente, pueden estar presentes en tales composiciones sustancias coadyuvantes, tales como agentes humectantes o emulsionantes o sustancias tamponadoras del pH. Tales portadores permiten que las composiciones farmacéuticas sean formuladas en forma de comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones de partículas sólidas y suspensiones, para la ingestión por parte del paciente.

30 Las formas de administración adecuadas incluyen formas adecuadas para la administración parenteral, p. ej. mediante inyección o infusión, por ejemplo mediante inyección en embolada o infusión continua. Cuando el producto es para inyección o infusión, puede adoptar la forma de una suspensión, solución o emulsión en un vehículo oleoso o acuoso y puede contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, conservantes, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, la molécula de la descripción puede estar en forma seca, para su reconstitución antes del uso con un líquido estéril apropiado.

35 Una vez formuladas, las composiciones de la invención se pueden administrar directamente al sujeto. Los sujetos que se van a tratar pueden ser animales. Sin embargo, en una o más realizaciones, las composiciones se adaptan para la administración a sujetos humanos.

40 De manera adecuada, en las formulaciones de acuerdo con la presente descripción, el pH de la formulación final no es similar al valor del punto isoeléctrico del anticuerpo, por ejemplo si el pH de la formulación es 7, puede ser apropiado un pH de 8-9 o superior. Si bien no se desea estar limitado por la teoría, se piensa que esto puede proporcionar por último una formulación final con una estabilidad mejorada, por ejemplo el anticuerpo permanece en solución.

45 Las composiciones farmacéuticas de esta invención se pueden administrar mediante cualquiera de las numerosas rutas que incluyen, pero no se limitan a, las rutas oral, intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, transcutánea (por ejemplo, véase el documento WO98/20734), subcutánea, intraperitoneal, intranasal, entérica, tópica, sublingual, intravaginal o rectal. También se pueden utilizar inyectores a chorro para administrar las composiciones farmacéuticas de la invención. Típicamente, las composiciones terapéuticas pueden ser preparadas en forma de inyectables, ya sea como soluciones líquidas o como suspensiones. También se pueden preparar formas sólidas adecuadas para la solución en, o la suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección.

50 El suministro directo de las composiciones generalmente se completará por medio de inyección, subcutáneamente, intraperitonealmente, intravenosamente o intramuscularmente, o se suministrará en el espacio intersticial de un tejido. Las composiciones también se pueden administrar en una lesión. La dosificación del tratamiento puede ser un programa de una sola dosis o un programa de múltiples dosis.

Se apreciará que el ingrediente activo de la composición será un anticuerpo. Como tal, será susceptible de degradación en el tracto gastrointestinal. De este modo, si la composición se va a administrar mediante una ruta que utiliza el tracto gastrointestinal, será necesario que la composición contenga agentes que protejan el anticuerpo de la degradación pero que liberen el anticuerpo una vez que haya sido absorbido desde el tracto gastrointestinal.

- 5 Se encuentra disponible una discusión completa de los portadores farmacéuticamente aceptables en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J. 1991).

En una realización se proporciona la formulación en forma de una formulación para administraciones tópicas, incluyendo la inhalación.

- 10 Las preparaciones inhalables adecuadas incluyen polvos inhalables, aerosoles medidos que contienen gases propelentes o soluciones inhalables libres de gases propelentes. Los polvos inhalables de acuerdo con la descripción que contienen la sustancia activa pueden consistir solamente en las sustancias activas anteriormente mencionadas o en una mezcla de las sustancias activas anteriormente mencionadas con un excipiente fisiológicamente aceptable.

- 15 Estos polvos inhalables pueden incluir monosacáridos (p. ej. glucosa o arabinosa), disacáridos (p. ej. lactosa, sacarosa, maltosa), oligo- y polisacáridos (p. ej. dextranos), polialcoholes (p. ej. sorbitol, manitol, xilitol), sales (p. ej. cloruro de sodio, carbonato de calcio) o mezclas de estos entre sí. Se utilizan adecuadamente mono- o di-sacáridos, utilizándose lactosa o glucosa, concretamente, pero no exclusivamente, en forma de sus hidratos.

- 20 Las partículas para el depósito en el pulmón requieren un tamaño de partícula menor de 10 micras, tal como 1-9 micras por ejemplo de 0,1 a 5 μm , en particular de 1 a 5 μm . El tamaño de partícula del ingrediente activo (tal como el anticuerpo) es de una importancia primordial.

- 25 Los gases propelentes que se pueden utilizar para preparar los aerosoles inhalables son conocidos en la técnica. Los gases propelentes adecuados se seleccionan entre hidrocarburos tales como n-propano, n-butano o isobutano e hidrocarburos halogenados tales como derivados clorados y/o fluorados de metano, etano, propano, butano, ciclopropano o ciclobutano. Los gases propelentes anteriormente mencionados se pueden utilizar como tales o en mezclas de los mismos.

- Concretamente los gases propelentes adecuados son derivados de alcano halogenados seleccionados entre TG 11, TG 12, TG 134a y TG227. De los hidrocarburos halogenados mencionados anteriormente, TG134a (1,1,1,2-tetrafluoroetano) y TG227 (1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano) y las mezclas de los mismos son particularmente adecuados.

- 30 Los aerosoles inhalables que contienen gas propelente también pueden contener otros ingredientes tales como co-disolventes, estabilizadores, agentes tensioactivos (surfactantes), antioxidantes, lubricantes y medios para ajustar el pH. Todos estos ingredientes son conocidos en la técnica.

- 35 Los aerosoles inhalables que contienen gas propelente de acuerdo con la invención pueden contener hasta 5% en peso de sustancia activa. Los aerosoles de acuerdo con la invención contienen, por ejemplo, de 0,002 a 5 % en peso, de 0,01 a 3 % en peso, de 0,015 a 2 % en peso, de 0,1 a 2 % en peso, de 0,5 a 2 % en peso o de 0,5 a 1 % en peso de ingrediente activo.

- 40 Alternativamente las administraciones tópicas en el pulmón también pueden ser mediante la administración de una solución líquida o una formulación en suspensión, por ejemplo empleando un dispositivo tal como un nebulizador, por ejemplo, un nebulizador conectado a un compresor (p. ej., el nebulizador Pari LC-Jet Plus(R) conectado a un compresor Pari Master(R) fabricado por Pari Respiratory Equipment, Inc., Richmond, Va.).

- 45 El anticuerpo de la invención puede ser suministrado dispersado en un disolvente, p. ej., en forma de una solución o una suspensión. Se puede suspender en una solución fisiológica apropiada, p. ej., solución salina u otro disolvente o solución tamponada farmacológicamente aceptable. Las soluciones tamponadas conocidas en la técnica pueden contener de 0,05 mg a 0,15 mg de edetato disódico, de 8,0 mg a 9,0 mg de NaCl, de 0,15 mg a 0,25 mg de polisorbato, de 0,25 mg a 0,30 mg de ácido cítrico anhidro, y de 0,45 mg a 0,55 mg de citrato de sodio por 1 mL de agua con el fin de alcanzar un pH de aproximadamente 4,0 a 5,0. Se puede emplear una suspensión, por ejemplo, una molécula liofilizada.

- 50 Las suspensiones o formulaciones en solución terapéuticas también pueden contener uno o más excipientes. Los excipientes son bien conocidos en la técnica e incluyen tampones (p. ej., tampón de citrato, tampón de fosfato, tampón de acetato y tampón de bicarbonato), aminoácidos, urea, alcoholes, ácido ascórbico, fosfolípidos, proteínas (p. ej., albúmina de suero), EDTA, cloruro de sodio, liposomas, manitol, sorbitol, y glicerol. Las soluciones o suspensiones se pueden encapsular en liposomas o microesferas biodegradables. La formulación se proporcionará generalmente en una forma sustancialmente estéril empleando procedimientos de fabricación estériles.

- 55 Esto puede incluir la producción y esterilización por filtración del disolvente/solución tamponados utilizados para la formulación, la suspensión aséptica de la molécula en la solución disolvente tamponada estéril, y la dispensación de

la formulación en receptáculos estériles mediante métodos familiares para los expertos en la técnica.

La formulación nebulizable de acuerdo con la presente descripción puede ser proporcionada, por ejemplo, en forma de unidades de una sola dosis (p. ej., recipientes de plástico o viales sellados) envasados en sobres de aluminio. Cada vial contiene una dosis unitaria en un volumen, p. ej., 2 mL, de disolvente/tampón de solución.

- 5 Se piensa que el anticuerpo de la presente descripción es particularmente adecuado para el suministro por medio de nebulización.

Se pretende que "que comprende" en el contexto de la presente memoria descriptiva represente que incluye. Cuando sea técnicamente apropiado, se pueden combinar las realizaciones de la invención.

- 10 La invención se describirá mediante la referencia a los siguientes ejemplos, que son meramente ilustrativos y no se deben considerar limitantes del alcance de la presente invención.

Ejemplos

1 Mutagénesis de la cadena pesada de IgG4 y generación de vectores de un solo gen de la cadena pesada de IgG4 mutada.

- 15 Se realizaron mutaciones de aminoácidos utilizando el kit Quickchange® Lightning Multi Site Directed Mutagenesis (SDM) o el kit Quickchange® II DSM (obtenido de Stratagene®) (números de catálogo 210516 y 200521 respectivamente) y se llevaron a cabo de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes.

Las mutaciones se verificaron mediante secuenciación de ADN. Se produjeron las cadenas pesadas de IgG4 de los anticuerpos 1 a 47 de la siguiente Tabla:

Número de anticuerpo	Mutaciones de la Cadena pesada (Numeración de Kabat)	Dominio C _H 1 & Bisagra SEQ ID NO:	C _H 1, Bisagra, C _H 2 & C _H 3 SEQ ID NO:
1	C127S	269	307
2	C127S,C239S	264	302
3	C127S,C242S	265	303
4	C127S, C242S, C239S	270	308
5	G230C	271	309
5P	G230C, S241P	272	310
6	C127S, G230C, C239S	243	281
7	C127S, G230C, C242S	244	282
8	C127S, G230C, C239S, C242S	245	283
9	G230C, C239S	273	311
10	G230C, C242S	274	312
11	G230C, C239S, C242S	275	313
12	C239S	276	314
13	C242S	277	315
14	C239S,C242S	278	316

ES 2 599 503 T3

Número de anticuerpo	Mutaciones de la Cadena pesada (Numeración de Kabat)	Dominio C _H 1 & Bisagra SEQ ID NO:	C _H 1, Bisagra, C _H 2 & C _H 3 SEQ ID NO:
15	C127S, G230C	246	284
16	C127S, G230C, S241P	247	285
17	IgG4 humana de tipo salvaje	227	-
18	S241P	-	-
19	IgG1 humana de tipo salvaje	226	-
28	C127S Y229C	248	286
28P	C127S Y229C, S241P	267	305
29	C127S Y229C C239S	249	287
30	C127S Y229C C242S	250	288
31	C127S Y229C C239S C242S	251	289
32	C127S K228C	252	290
33	C127S K228C C239S	253	291
34	C127S K228C C242S	254	292
35	C127S K228C C239S C242S	255	293
36	C127S S227C	256	294
37	C127S S227C C239S	257	295
38	C127S S227C C242S	258	296
39	C127S S227C C239S C242S	259	297
44	C127S G230C P238PAAA	260	298
44P	C127S G230C P238PAAA, S241P	268	306
45	C127S G230C P238PAAA C239S	261	299
46	C127S G230C P238PAAA C242S	262	300
47	C127S G230C P238PAAA C239S C242S	263	301
48	C127S, S227P, Y229S, G230C, P237D, P238KTHT, S241P	266	304

La cadena pesada del anticuerpo 48 (SEQ ID NO: **266**) fue generada mediante PCR y clonación con enzimas de restricción. El producto de la PCR fue generado por un oligo directo que codificaba la secuencia de la región bisagra

superior y central de IgG1 y un sitio de restricción BgIII y un oligo inverso que codificaba la enzima de restricción DraIII. El fragmento de PCR se digirió a continuación con las enzimas mencionadas anteriormente y se ligó en el vector de un solo gen de hG4 que contenía la región variable apropiada.

2. Expresión de los anticuerpos IgG4 mutados

5 Todo el ADN mutante fue transfectado a células CHOK1. Las células (2×10^8 células/ml) se resuspendieron en 1 ml de Solución Salina Equilibrada de Earle (Sigma) y se mezclaron con 400 μ g de ADN (200 μ g de ADN de la cadena pesada y 200 μ g de ADN de la cadena ligera kappa). Se transfirieron alícuotas de 800 μ l a cubetas de 0,4 cm (Biorad). Para un cultivo de 500 ml, se sometieron a electroporación seis cubetas bajo los siguientes parámetros: 1 ms, 9,6 Amps; 10 ms, 0 Amps; 40 ms, 3,2 Amps. Las células transfectadas se incubaron durante 24 hrs, agitando a 140 rpm en un entorno humidificado con CO₂ al 0,5% a 37°C y se continuó desde el día 2 después de la transfección a 32°C durante 10-13 días. El día 4 después de la transfección se añadieron al cultivo 1,6 ml de butirato de sodio 1 M. Una vez que las células alcanzaron una viabilidad de 40% o hasta el día 13, se cosechó el sobrenadante. Los cultivos se centrifugaron durante 45 minutos a 4000 rpm. El sobrenadante se hizo pasar a través de un filtro de 0,22 μ M Stericup (Millipore) para ser purificados.

15 3. Purificación de anticuerpos IgG4 mutados

Los sobrenadantes (200-500 ml) se purificaron utilizando una columna de Proteína A de 5 ml HiTrap MabSelect SuRe (GE Healthcare, Amersham Reino Unido). Las muestras se prepararon añadiendo 1/50^o del volumen del sobrenadante de Tris-HCl 2 M pH 8,5. Las muestras se cargaron sobre la columna a 1 ml/min. La columna se lavó con PBS de pH 7.4. Para hacer eluir las muestras, se hizo circular citrato de sodio 0,1 M, pH 3,4 a través de la columna a 1 ml/min y se recogieron fracciones de 0,5 ml. Las fracciones pico se neutralizaron añadiendo 0,125 ml de Tris-HCl 2 M pH 8,5 a cada una. La detección UV se ajustó a 280 nm.

4. Caracterización de anticuerpos IgG4 mutados purificados

Análisis SDS PAGE:

25 El sobrenadante bruto se centrifugó a 1200 rpm durante 5 mins y se cuantificó con OCTET. Las muestras de anticuerpo (25-30 ng) se prepararon añadiendo las cantidades apropiadas de anticuerpo, 4x Tampón de Carga (Invitrogen) y 2 μ l de NEM 100 mM. Se elaboró un volumen total de 20 μ l utilizando dH₂O. Las muestras se hirvieron a continuación durante 3 mins a 100°C y se cargaron sobre un gel de Tris-Glicina al 40-20% de 1,5 mm de 15 pocillos. Los geles se hicieron circular a 150 V durante 1,5 hrs en 1x tampón Tank. Los anticuerpos se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa utilizando el sistema de transferencia en seco iBlot ajustado para transferir durante 8 mins. La membrana se incubó durante 1 hr a la temperatura ambiente (RT) en PBS-TM sobre una plataforma con sacudimiento, seguido de incubación con un anticuerpo conjugado con HRP anti-Fc de IgG humana de conejo (Jackson ImmunoResearch) o un anticuerpo conjugado con HRP anti-cadena ligera Kappa humana de cabra (Bethyl) durante 1 hr, con sacudimiento a RT. Esto estuvo seguido de 3 lavados de 5 mins cada uno con PBS-T. Las transferencias se revelaron utilizando un kit de sustrato de DAB potenciado con metal de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Pierce).

35 Los resultados del análisis de transferencia Western se muestran en las Figuras 7, 8, 9 y 10. En la Figura 7-10, H representa la cadena pesada y L la cadena ligera, H2L2 es una molécula de anticuerpo completo que comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras y HL es una hemimolécula que comprende una cadena pesada y una cadena ligera.

40 La Figura 7 muestra el análisis de transferencia Western para los anticuerpos 15, 16, 6, 7, 8, 17, 18, 19, 5, 5P, 9, 10, 11, 1, 2, 3, 4, 12, 13 y 14. Se puede observar a partir de la Figura 7 que los anticuerpos muestran un buen nivel de H2L2 excepto los anticuerpos 4, 8 y 14 que muestran poco o ningún H2L2 debido a la presencia de mutaciones C239S y C242S en ambas bisagras. No obstante, los anticuerpos 4, 8 y 14 pueden formar H2L2 por medio de enlaces no covalentes entre las cadenas pesadas. El mutante 3 también muestra poco H2L2, este mutante conserva C239 pero es incapaz de formar disulfuros entre las cadenas pesadas en la bisagra, presumiblemente debido a la formación eficaz de un disulfuro entre la cisteína de la cadena ligera (LC) C-terminal y la C239 de la bisagra. También se puede observar que los anticuerpos que comprenden la mutación C239S pero no C242S (anticuerpos 2, 6, 9 y 12) muestran una reducción de la formación de HL en comparación con los anticuerpos que no comprenden C239S ni C242S o los anticuerpos que comprenden C242S pero no C239S. Los anticuerpos 5P y 16 que comprenden la mutación S241P también muestran una reducción de la formación de HL. Una comparación de los mutantes 2 y 3 muestra el grado de 'alcance' de la cisteína C-terminal de la cadena ligera para formar un enlace disulfuro con la cadena pesada, parece que la cisteína de la cadena ligera se une más eficazmente a C239 que a C242 en la cadena pesada.

55 La Figura 8 muestra el análisis de transferencia Western para los anticuerpos 15, 6, 7, 8, 28, 29, 30, 31, 17, 19, 32, 33, 33, 34, 35, 36, 37, 38 y 39. Se puede observar a partir de la Figura 8 que los anticuerpos muestran un buen nivel de H2L2 excepto para los anticuerpos 8, 31, 35 y 39 que no muestran ningún o muestran muy poco H2L2 debido a la presencia de mutaciones C239S y C242S en la región bisagra y por lo tanto no forman enlaces disulfuro entre dos cadenas pesadas. Sin embargo, los anticuerpos 8, 31, 35 y 39 pueden formar H2L2 por medio de enlaces no

covalentes entre las cadenas pesadas. También se puede observar que los anticuerpos que comprenden la mutación C239S pero no C242S (anticuerpos 6, 29, 33 y 37) muestran una reducción de la formación de HL en comparación con los anticuerpos que no comprenden C239S ni C242S o los anticuerpos que comprenden C242S pero no C239S. El mutante 15 es capaz de formar un enlace disulfuro entre la cadena ligera y G230C en CH1 y los disulfuros entre cadenas pesadas dando como resultado por consiguiente una proteína unida por disulfuro y completamente ensamblada. Además, una comparación de los mutantes 15(C127S G230C), 28(C127S Y229C), 32(C127S K228C) y 36(C127S S227C) muestra que la posición de la cisteína introducida en la bisagra superior mejora la formación de enlaces disulfuro entre LC-HC. G230 e Y229 son las posiciones particularmente preferidas para introducir una cisteína. El mutante 28 (C127S Y229C) muestra un nivel bajo de HL y H2 y por lo tanto tiene poca heterogeneidad de enlaces disulfuro.

La Figura 9 muestra el análisis de transferencia Western para los anticuerpos 15, 6, 7, 8, 44, 45, 46, 47, 17 y 19. Se puede observar a partir de la Figura 9 que los anticuerpos muestran un buen nivel de H2L2 excepto para los anticuerpos 8 y 47 que no muestran ninguno o muestran muy poco H2L2 debido a la presencia de mutaciones C239S y C242S en la región bisagra y por lo tanto no forman enlaces disulfuro entre dos cadenas pesadas.

No obstante, los anticuerpos 8 y 47 pueden formar H2L2 por medio de enlaces no covalentes entre las cadenas pesadas. También se puede observar que los anticuerpos que comprenden la mutación C239S pero no la C242S (anticuerpos 6 y 45) muestran una reducción de la formación de HL en comparación con los anticuerpos que no comprenden ni C239S ni C242S o los anticuerpos que comprenden C242S pero no C239S. En particular, el mutante 44 muestra que la inserción de tres aminoácidos en la bisagra superior también puede reducir la formación de HL y H2 y por consiguiente tiene niveles inferiores de heterogeneidad de disulfuros que el mutante 15 comparable.

La Figura 10, muestra el análisis de transferencia Western para los anticuerpos 48, 17, 18 y 19. Se puede observar a partir de la Figura 10, que el anticuerpo 48 muestra un buen nivel de H2L2 y muy poca HL. El mutante 48 contiene la secuencia de la bisagra superior de IgG1 EPKSCDKTHT SEQ ID NO: 320 en lugar de la secuencia de la bisagra superior de IgG4 junto con una mutación S241P en la bisagra central. Por lo tanto, el mutante 48 tiene la secuencia de la bisagra superior y central EPKSCDKTHTCPPCP SEQ ID NO: 321. El mutante 48 muestra niveles inferiores de heterogeneidad de enlaces disulfuro en comparación con el anticuerpo 17 IgG4 de tipo salvaje y niveles bajos aproximadamente equivalentes de heterogeneidad de enlaces disulfuro en comparación con el mutante 18 S241P de IgG4 y el anticuerpo 19 de IgG1 de tipo salvaje.

Análisis Thermofluor:

Las termoestabilidades de los mAb purificados se analizaron en un análisis Thermofluor utilizando SYPRO® Orange para controlar el proceso de desplegamiento térmico de las proteínas. Se añadieron juntos 5 µl de mAb a 1 mg/ml, 5 µl de 30x colorante, y 40 µl de PBS. Se dispensaron 10 µl de la mezcla por cuadruplicado en una placa óptica para PCR de 384 pocillos y se hizo funcionar en el 7900HT Fast Real-Time PCR System (Agilent Technologies UK Ltd, Wokingham Reino Unido). Este Sistema de PCR contiene un dispositivo térmico para un control exacto de la temperatura ajustado de 20°C a 99°C; un dispositivo acoplado cargado controla simultáneamente los cambios de fluorescencia en los pocillos.

Las Figuras 11, 12, 13, 14 y 15 muestran los resultados del análisis de termoestabilidad de los mutantes del anticuerpo IgG4 en comparación con los anticuerpos IgG1 e IgG4 de tipo salvaje.

Una comparación del mutante 15 con la IgG4 de tipo salvaje (mutante 17) muestra un incremento en la Tm del Fab debido a la disposición alterada del disulfuro. Una comparación del mutante 15 y el 28 muestra una mejora adicional en la Tm del Fab para el mutante 28 que comprende la mutación Y229C en comparación con el mutante 15 que comprende la mutación G230C. Una comparación del mutante 15 y el 44 muestra que la Tm del Fab de un mutante G230C se puede incrementar adicionalmente mediante la inserción de tres aminoácidos en la bisagra superior. La comparación de los mutantes 17 y 18 muestra que la mutación en la bisagra media S241P no incrementa la Tm del Fab ni cuando se reduce significativamente la formación de HL. El mutante 48 también muestra una Tm de Fab significativamente mejorada cuando se compara con la IgG4 de tipo salvaje (mutante 17) y el mutante 15.

La Figura 15 muestra la clasificación general de las termoestabilidades de los mutantes de IgG4 seleccionados de acuerdo con la presente invención. Los mutantes 48, 44, 44P, 46, 45, 6, 29, 30, 28, 28P, 31, 8, 47 y 15 muestran todos valores de Tm de Fab significativamente más altos en comparación con la IgG4 de tipo salvaje (mutante 17) y la IgG4 de tipo salvaje S241P (mutante 18).

5. Intercambio del brazo Fab

a) Intercambio de cadena pesada in vitro

Se mezclaron un primer anticuerpo IgG4 y su compañero de intercambio potencial a una razón molar 1:1 a una concentración total de 100 µg/ml en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (en mM: NaCl 150, NaH₂PO₄ 10; pH 7,4). Para permitir la reducción del enlace disulfuro, las muestras se complementaron con Glutión reducido (GSH; Sigma) a una concentración final de 0, 0,5 o 5 mM. Al inicio del experimento (t = 0 horas) se tomó una alícuota de la mezcla, se sofocó con N-etilmaleimida (NEM; Sigma) a una concentración final de 10 mM (para

inactivar los grupos tiol potencialmente reactivos) y se incubó junto con el resto de la mezcla durante 16 horas a 37°C (t = 16 horas). Tras la incubación, la muestra de t = 16 horas se sofocó como antes.

b) Detección y cuantificación del intercambio de cadena pesada *in vitro*

5 La presencia de anticuerpos biespecíficos funcionalmente activos se determinó utilizando un análisis MSD sándwich en el que las muestras de reacción sofocadas proporcionadas en el Ejemplo 5 a), se diluyeron seriadamente en BSA en PBS (PB) al 1%, se pre-incubaron con 1 ug/ml de antígeno 1 biotinilado (antígeno del primer anticuerpo) en PB durante 1 h a RT con agitación (200 r.p.m) antes de ser transferidas a placas de MSD recubiertas con estreptavidina pre-bloqueadas con PB (Meso Scale Diagnostics). Después de una hora de incubación a RT con agitación, los pocillos se lavaron tres veces con PBS/Tween-20 al 0,1% antes de incubarlos con 1 ug/ml de antígeno 2 etiquetado con sulfo (antígeno del segundo anticuerpo) en PB. Después de la incubación, las placas se lavaron como antes y las señales se revelaron y se midieron utilizando tampón *de lectura y el aparato* Image Sector 6000 del fabricante, respectivamente. Los valores de fondo obtenidos de las reacciones de control paralelas en las que el antígeno biotinilado fue sustituido por una alternativa no biotinilada, fueron sustraídos de todas las señales. Se utilizaron valores por duplicado de al menos 3 experimentos independientes en todos los cálculos.

15 A mayor señal MSD mayor cantidad de intercambio de cadena pesada se ha producido.

Se analizaron los siguientes anticuerpos:

Anticuerpo	Mutaciones en comparación con IgG4 de tipo salvaje
IgG1 wt (tipo salvaje)	-
IgG4 wt (tipo salvaje)	-
IgG4 P	S241P
IgG4 mutante 28	C127S Y229C
IgG4 mutante 28 P	C127S Y229C S241P
IgG4 mutante 15	C127S G230C
IgG4 mutante 44	C127S G230C P238PAAA
IgG4 mutante 44P	C127S G230C P238PAAA, S241P
IgG4 mutante 48	C127S, S227P, Y229S, G230C, P237D, P238KTHT, S241P

Las Figuras 16 a 20 muestran los resultados de la cuantificación del intercambio del brazo Fab *in vitro*, donde el eje y muestra la señal MSD, en donde a mayor nivel de la barra, mayor cantidad de intercambio del brazo Fab.

20 La Figura 16 muestra el intercambio de cadena pesada para IgG1 de tipo salvaje, IgG4 de tipo salvaje y los mutantes IgG4P, 28, 28P, 15, 44, 44P y 48 a dos concentraciones de GSH y en diversos puntos temporales.

La Figura 17 muestra el intercambio de cadena pesada para IgG4 de tipo salvaje y los mutantes 15, 44 y 48 a dos concentraciones de GSH en diversos puntos temporales. Se puede observar que cuanto más bisagra de IgG4 se muta para que sea de tipo IgG1, más se reduce el intercambio, como se muestra por medio del mutante 48 que tiene el menor intercambio.

La Figura 18 muestra el intercambio de cadena pesada para IgG4 de tipo salvaje y los mutantes 15 y 28 a dos concentraciones de GSH en diversos puntos temporales. Se puede observar que la mutación de la posición 229 (mutante 28) reduce el intercambio a lo largo de 4 a 16 horas a ambas concentraciones de agente reductor en un grado mayor en comparación con la mutación de la posición 230 (mutante 15).

30 La Figura 19 muestra el cambio porcentual para los mutantes IgG4P, 15, 28, 44 y 48 en GSH 0,5 mM en comparación con la IgG4 de tipo salvaje. El intercambio se puede clasificar como sigue: IgG4 wt > 15 = 44 > 48 > 28.

La Figura 20 muestra el cambio porcentual para diversos mutantes en GSH 5 mM en comparación con la IgG4 de tipo salvaje. El intercambio se puede clasificar IgG4 wt > 15 = 44 > 48 > 28.

- 5 De acuerdo con la bibliografía (Labrijn 2011, Lewis 2009, Stubenrauch 2010, Labrijn 2009) los autores de la presente invención demuestran que la mutación S241P en la bisagra central de IgG4 representa una herramienta para prevenir el intercambio del brazo Fab. También se puede observar que los anticuerpos biespecíficos mutantes de la presente invención demostrarían menos intercambio del brazo Fab del mostrado con GSH 0,5 mM, que es 100 veces mayor que la concentración de GSH fisiológica de 4-6 μ M en plasma (Zilmer. et al, 2005. Drug Design Reviews). Por consiguiente, se pueden crear anticuerpos biespecíficos *in vitro* por medio de intercambio del brazo Fab en condiciones reductoras, que tendría en ese caso un intercambio del brazo Fab significativamente reducido *in vivo* en comparación con IgG4 wt.

Afinidad del anticuerpo:

- 10 La afinidad de los anticuerpos IgG4 mutantes seleccionados de la presente invención para la citoquina soluble diana se puede medir mediante Biacore™. El formato de análisis es la captura de las IgG sobre una superficie anti-Fc seguida de titulación de la citoquina soluble.

El término " k_d " (s^{-1}), hace referencia a la constante de la velocidad de disociación de la interacción anticuerpo-antígeno. Dicho valor también es referido como el valor de k_{off} .

- 15 El término " k_a " ($M^{-1} s^{-1}$), según se utiliza en la presente memoria, hace referencia a la constante de la velocidad de asociación de la interacción anticuerpo-antígeno.

El término " K_D " (M) o " K_D " (pM), según se utiliza en la presente memoria, hace referencia a la constante de equilibrio de disociación de la interacción anticuerpo-antígeno.

Análisis HPLC de exclusión por tamaños (SEC):

- 20 Se hicieron circular aproximadamente 50 ug de anticuerpo purificado en la HPLC utilizando una columna S200. Se utilizaron los Ab 1 a 19 para el análisis. Este resultado demuestra que el H2L2 asociado no covalentemente se forma a pesar de las alteraciones en las disposiciones DSB de una molécula de IgG4 humana.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo biespecífico simétrico de la clase IgG4 que comprende dos cadenas pesadas que comprenden cada una un dominio variable, un dominio C_H1 y una región bisagra, en donde en cada cadena pesada:
- 5 la cisteína de la posición 127, numerada de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat, en el dominio C_H1 que forma un enlace disulfuro intercatenario con un cisteína en una cadena ligera es sustituida por un aminoácido que no contiene tiol; y
- uno o más de los aminoácidos situados en la región bisagra superior es sustituido por cisteína, en donde la secuencia de la región constante de cada cadena pesada es similar o idéntica y la región variable de cada cadena pesada es diferente.
- 10 2. Un anticuerpo biespecífico simétrico de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la región bisagra es una bisagra de tipo IgG1.
3. Un anticuerpo biespecífico simétrico de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el anticuerpo está aislado.
- 15 4. Un anticuerpo biespecífico simétrico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde los uno o más aminoácidos situados en la región bisagra superior de la primera cadena pesada sustituidos por cisteína se seleccionan entre S227, K228, Y229 y G230, numerada de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.
5. Un anticuerpo biespecífico simétrico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la cisteína de la posición 239 y la cisteína de la posición 242, numeradas de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat, en una o ambas cadenas pesadas son sustituidas por un aminoácido que no contiene tiol.
- 20 6. Un anticuerpo biespecífico simétrico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la cisteína de la posición 239, numerada de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat, en la primera cadena pesada es sustituida por un aminoácido que no contiene tiol.
7. Un anticuerpo biespecífico simétrico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la cisteína de la posición 242, numerada de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat, en la primera cadena pesada es sustituida por un aminoácido que no contiene tiol.
- 25 8. Un anticuerpo biespecífico simétrico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en donde el aminoácido que no contiene tiol es serina.
9. Un anticuerpo biespecífico simétrico de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde la cisteína de la posición 127 es sustituida por serina.
- 30 10. Un anticuerpo biespecífico simétrico de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde una o ambas cadenas pesadas está/están mutadas para insertar tres aminoácidos entre los aminoácidos 226-243, numerados de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.
11. Un anticuerpo biespecífico simétrico de acuerdo con la reivindicación 10, en donde una o ambas cadenas pesadas está/están mutadas para insertar tres aminoácidos entre las positions 238 y 239, numeradas de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.
- 35 12. Un anticuerpo biespecífico simétrico de acuerdo con la reivindicación 11, en donde se insertan tres alaninas entre las posiciones 238 y 239, de la primera cadena pesada numeradas de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.
13. Un anticuerpo biespecífico simétrico de acuerdo con la reivindicación 11, en donde se insertan una treonina, una histidina y una treonina adicional entre las posiciones 238 y 239, de una o ambas cadenas pesadas numeradas de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.
- 40 14. Un anticuerpo biespecífico simétrico de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde la serina de la posición 241, de una o ambas cadenas pesadas numeradas de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat, es/son sustituidas por prolina.
- 45 15. Un anticuerpo biespecífico simétrico de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde en una o ambas cadenas pesadas la glicina de la posición 230 es sustituida por cisteína, la serina de la posición 227 es/son sustituidas por prolina, la tirosina de la posición 229 es sustituida por serina, la prolina de la posición 237 es sustituida por ácido aspártico, la prolina de la posición 238 es sustituida por lisina, la secuencia de aminoácidos treonina-histidina-treonina es insertada entre las posiciones 238 y 239 y la serina de la posición 241 es sustituida por prolina.
- 50 16. Un anticuerpo biespecífico simétrico de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde ambas cadenas pesadas comprenden un dominio C_H2 y/o un dominio C_H3.

17. Un anticuerpo biespecífico simétrico de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde la región bisagra de cada cadena pesada es idéntica.
- 5 18. Un anticuerpo biespecífico simétrico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en donde cada cadena pesada comprende una región bisagra superior y una región central de 12 a 17 aminoácidos de longitud, por ejemplo 15 aminoácidos de longitud.
19. Un vector de expresión que comprende una secuencia que codifica un anticuerpo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18.
20. Una célula anfitriona que comprende un vector como se define en la reivindicación 19.
- 10 21. Un anticuerpo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno.
- 15 22. Un método para generar un anticuerpo biespecífico simétrico que comprende la etapa de mezclar un primer anticuerpo IgG4 con un segundo anticuerpo IgG4 *ex vivo*, en condiciones reductoras propicias para el intercambio de cadena pesada, en donde la especificidad antigénica de las regiones variables del primer anticuerpo es diferente de la especificidad antigénica de las regiones variables del segundo anticuerpo y el primer anticuerpo IgG4 el segundo anticuerpo IgG4 comprenden cada uno un dominio C_H1 y una región bisagra como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18.

Figura 1a

CH1 y bisagra de IgG1 de tipo salvaje

(A) STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV

DKKV (E) PKSCDKTHTCPPCPAPELGGP (SEQ ID NO:227)

CH1 y bisagra de IgG4 de tipo salvaje

(A) STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV

DKRV (E) SKYGPFCPCPAPPEFLGGP (SEQ ID NO:228)

Cadena ligera constante kappa de Ig de tipo salvaje

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSLLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP

VTKSFNRGEC (SEQ ID NO:229)

Figura 1b

Cadena ligera	C_L				
κ humana	FNRGEC (SEQ ID NO:228)				
Cadena pesada	C_{H1} (N-term)	SUPERIOR	CENTRAL	INFERIOR	
IgGγ1 humana	LAPSKSSTS (SEQ ID NO:230)	EPKSCDKTHT (SEQ ID NO:231)	CPPCP	APELLGGP	
IgGγ2 humana	LAPCSRSTS (SEQ ID NO:232)	ERK	CCVECPPCP	APFVA GP	
IgGγ3 humana	LAPCSRSTS (SEQ ID NO:234)	ELKTPPLGDTTHT (SEQ ID NO:235)	CPRCP (EPKSCDTPPPCCPRCP) ₃	APELLGGP	
IgGγ4 humana	LAPCSRSTS ↑ C127	ESKYGPP ↑ G230	CPSCP ↑ C239	APEFLGGP ↑ C242	
Cadena pesada	C_{H1} (N-term)	(SEQ ID NO:236)			
IgD humana	IISGCRHPK (SEQ ID NO:238)	Bisagra (E)SPKAQASSVPTAQPAEGSLAKATTAPATTRNT (SEQ ID NO:239)			
Cadena pesada	C_{H1} (N-term)	C_{H1} (C-term)		C_{H2} (N-term)	
IgM humana	LVSCENSPTS (SEQ ID NO:240)	EKNVPLP (SEQ ID NO:241)		(V)IAELPPKVSV (SEQ ID NO:242)	

Figura 2a

		HSAGRA																	
CHI		216	217	218	221	233	234	222	223	224	225	226	227	228	229	230			
Numeración EU para IgG1	131																		
Numeración Kabat para IgG1	127	226	227	228	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243			
Numeración IMGT para IgG1	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15			
Residuos IgG1 wt	S	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P			
Numeración BL para IgG4	131	216	217	218	219	220	224	225	-	-	-	226	227	228	229	230			
Numeración Kabat para IgG4	127	226	227	228	229	230	237	238	-	-	-	239	240	241	242	243			
Numeración IMG I para IgG4	10	1	2	3	4	5	6	7				8	9	10	11	12			
Residuos IgG4 wt	C	E	S	K	Y	G	P	P	-	-	-	C	P	S	C	P			
Mutaciones para IgG4	S		C	C	C	C	D	K	A	A	A	S		P	S				
			O		O				O	O	O								
			P		S				T	H	T								

Figura 2b

		BISAGRA										
		CHI										
Numeración Kabat		127	226	227	228	229	230	232	233			
Numeración IMGT para IgG3		10	1	2	3	4	5	6	7			
Residuos IgG3 wt		C	E	L	K	T	P	L	G			
Mutaciones para IgG3		S	C	C	C	C	C	C	C			

Figura 2c

		CHI											CH2			
Numeración Kabat para IgM		127	223	223A	223B	223C	243G	243H	243I							
Numeración IMGT para IgM		10	121	122	123	124	1,5	1,4	1,3							
Residuos IgM wt		C	V	P	L	P	V	I	A							
Mutaciones para IgM		S	C	C	C	C	C	C	C							

Figura 2d

	CHI	Bisagra						
Numeración Kabat para IgD	128	227	228	229	230	231	232	233
Numeración IMGT para IgD	11	1	2	3	4	5	6	7
Residuos IgD wt	C	E	S	P	K	A	Q	A
Mutaciones para IgD	S	C	C	C	C	C	C	C

Figura 3a

		ANTICUERPOS																		
Mutaciones	G4	G1	1	2	3	4	5	5P	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
C127S			•	•	•	•			•	•	•							•	•	•
G230C							•	•	•	•	•	•	•	•					•	•
C239S			•			•			•		•	•	•	•	•		•			
S241P								•												•
C242S					•	•				•	•		•	•		•	•			

Figura 3b

		ANTICUERPOS																		
Posición Cvs HC	G4	G1	1	2	3	4	5	5P	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
127	LC						LC	LC				LC	LC	LC	LC	LC	LC			
230							HC	HC	LC	LC	LC	HC	HC	HC				HC	LC	HC
230 (G4)																				
233 (G1)																				
239	HC	HC					HC	HC		HC			HC			HC		HC	LC	HC
242	HC	HC					HC	HC	HC			HC			HC			HC	LC	HC

Figura 4a

		ANTIGUEROS																	
Mutaciones para G4	G4	G1	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	44	45	46	47	
C127S			•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
S227C											•	•	•	•					
K228C							•	•	•	•									
Y229C			•	•	•	•													
G230C															•	•	•	•	•
P238PAAA															•	•	•	•	•
C239S				•		•		•		•		•		•		•			•
S241P																			
C242S					•	•			•	•			•	•			•	•	•

Figura 4b

		ANTICUERPOS																									
Posi- ción	G4	G1	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	44	45	46	47									
Cys																											
HC																											
127	LC																										
227											LC ^o HC	LC	LC	LC													
228							LC ^o HC	LC	LC	LC																	
229 (G4)			LC ^o HC	LC	LC	LC																					
230 (G4) 233(G1)		LC													LC ^o HC	LC	LC	LC									
239	HC	HC	HC ^o LC		H C		HC ^o LC		HC		HC ^o LC		H C				H C										
242	HC	HC	HC ^o LC	HC			HC ^o LC	H C			HC ^o LC	H C			HC ^o LC	H C											

Figura 5

(Ab 6) (SEQ ID NO:243)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKTYTCNV^DH
 KPSNTKVDKRV (E) SKYCPPPSPCPAPEFLGGP

(Ab 7) (SEQ ID NO:244)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKTYTCNV^DH
 KPSNTKVDKRV (E) SKYCPPPSPSPAPEFLGGP

(Ab 8) (SEQ ID NO:245)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKTYTCNV^DH
 KPSNTKVDKRV (E) SKYCPPPSPSPAPEFLGGP

(Ab 15) (SEQ ID NO:246)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKTYTCNV^DH
 KPSNTKVDKRV (E) SKYCPPPSPCPAPEFLGGP

(Ab 16) (SEQ ID NO:247)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKTYTCNV^DH
 KPSNTKVDKRV (E) SKYCPPPCPAPEFLGGP

(Ab 28) (SEQ ID NO:248)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKTYTCNV^DH
 KPSNTKVDKRV (E) SKCGPPSPCPAPEFLGGP

(Ab 29) (SEQ ID NO:249)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKTYTCNV^DH
 KPSNTKVDKRV (E) SKCGPPSPCPAPEFLGGP

- (Ab 30) (SEQ ID NO:250)**
 (A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVCH
 KPSNTKVDKRV (E) SKCGPPCPSPAPAEFLGGP

- (Ab 31) (SEQ ID NO:251)**
 (A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVCH
 KPSNTKVDKRV (E) SKCGPPSPAPAEFLGGP

- (Ab 32) (SEQ ID NO:252)**
 (A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVCH
 KPSNTKVDKRV (E) SCYGPSPCPAPEFLGGP

- (Ab 33) (SEQ ID NO:253)**
 (A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVCH
 KPSNTKVDKRV (E) SCYGPSPCPAPEFLGGP

- (Ab 34) (SEQ ID NO:254)**
 (A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVCH
 KPSNTKVDKRV (E) SCYGPSPCPAPEFLGGP

- (Ab 35) (SEQ ID NO:255)**
 (A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVCH
 KPSNTKVDKRV (E) SCYGPSPCPAPEFLGGP

- (Ab 36) (SEQ ID NO:256)**
 (A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVCH
 KPSNTKVDKRV (E) CKYGPSPCPAPEFLGGP

- (Ab 37) (SEQ ID NO:257)**
 (A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVCH
 KPSNTKVDKRV (E) CKYGPSPCPAPEFLGGP

(Ab 38) (SEQ ID NO:258)
(A) STKGPSVFFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNV_DH
KPSNTKVDKRV (E) CKYGPPCPSSPAPEFLGGP

(Ab 39) (SEQ ID NO:259)
(A) STKGPSVFFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNV_DH
KPSNTKVDKRV (E) CKYGPPSPSPAPEFLGGP

(Ab 44) (SEQ ID NO:260)
(A) STKGPSVFFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNV_DH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPAAACSPCAPEFLGGP

(Ab 45) (SEQ ID NO:261)
(A) STKGPSVFFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNV_DH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPAAASPCAPEFLGGP

(Ab 46) (SEQ ID NO:262)
(A) STKGPSVFFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNV_DH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPAAACPSSPAPEFLGGP

(Ab 47) (SEQ ID NO:263)
(A) STKGPSVFFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNV_DH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPAAASPSSPAPEFLGGP

(Ab 2) (SEQ ID NO:264)
(A) STKGPSVFFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNV_DH
KPSNTKVDKRV (E) SKYGPSPSPCAPEFLGGP

(Ab 3) (SEQ ID NO:265)
(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYGPPCSPAPEFLGGP

(Ab 48) (SEQ ID NO:266)
(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) PKSCDKTHICPPAPEFLGGP

(Ab 28P) (SEQ ID NO:267)
(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKCGPPCCPAPPEFLGGP

(Ab 44P) (SEQ ID NO:268)
(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPAAACPPCAPEFLGGP

(Ab 1) (SEQ ID NO:269)
(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYGPCCPAPPEFLGGP

(Ab 4) (SEQ ID NO:270)
(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYGPSPSPAPEFLGGP

Ab5 (SEQ ID NO:271)
(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPCCPAPPEFLGGP

Ab5P (SEQ ID NO:272)
(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKYTCNVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPCCPAPPEFLGGP

Ab9 (SEQ ID NO:273)
(A) STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSQVHTTTPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTKTYTCNV^DH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPPPSPCPAPEFLGGP

Ab10 (SEQ ID NO:274)
(A) STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSQVHTTTPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTKTYTCNV^DH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPPPSPSPAPEFLGGP

Ab11 (SEQ ID NO:275)
(A) STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSQVHTTTPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTKTYTCNV^DH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPPPSPSPAPEFLGGP

Ab12 (SEQ ID NO:276)
(A) STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSQVHTTTPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTKTYTCNV^DH
KPSNTKVDKRV (E) SKYGPPPSPCPAPEFLGGP

Ab13 (SEQ ID NO:277)
(A) STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSQVHTTTPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTKTYTCNV^DH
KPSNTKVDKRV (E) SKYGPPPSPSPAPEFLGGP

Ab14 (SEQ ID NO:278)
(A) STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSQVHTTTPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTKTYTCNV^DH
KPSNTKVDKRV (E) SKYGPPPSPSPAPEFLGGP

Figura 6

CH2 y CH3 de IgG4: (SEQ ID NO:279)

SVFLFPPKPKDTLMISRTPETVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGG
LPSSIEKTIISKAKGQPRPEPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSEFFLYSRLLTVDKSR
WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

CH2 de IgG4 CH3 de IgG1: (SEQ ID NO:280)

SVFLFPPKPKDTLMISRTPETVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGG
LPSSIEKTIISKAKGQPRPEPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSEFFLYSRLLTVDKSR
WQGGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(Ab 6) (SEQ ID NO:281)

(A) STKGPSVFPFLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTKITTCNVCH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPPSPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPRPEPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPPVLDSDGSEFFLYSRLLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(Ab 7) (SEQ ID NO:282)

(A) STKGPSVFPFLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTKITTCNVCH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPPSPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPRPEPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPPVLDSDGSEFFLYSRLLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(Ab 8) (SEQ ID NO:283)

(A) STKGPSVFPFLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTKITTCNVCH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPPSPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPRPEPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPPVLDSDGSEFFLYSRLLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(Ab 15) (SEQ ID NO:284)

(A) STKGPSVFFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKIYTCNVCH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPSPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPPVLDSDGSGFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

(Ab 16) (SEQ ID NO:285)

(A) STKGPSVFFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKIYTCNVCH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPSPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPPVLDSDGSGFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

(Ab 28) (SEQ ID NO:286)

(A) STKGPSVFFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKIYTCNVCH
KPSNTKVDKRV (E) SKCGPPSPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPPVLDSDGSGFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

(Ab 29) (SEQ ID NO:287)

(A) STKGPSVFFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKIYTCNVCH
KPSNTKVDKRV (E) SKCGPPSPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPPVLDSDGSGFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

(Ab 30) (SEQ ID NO:288)

(A) STKGPSVFFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKIYTCNVCH
KPSNTKVDKRV (E) SKCGPPSPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPPVLDSDGSGFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

(Ab 31) (SEQ ID NO:289)

(A) STKGPSVFFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVCH
KPSNTKVDKRV (E) SKCGPPSPSPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSRLLTVDKSRWQEAGNPFSCSMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

(Ab 32) (SEQ ID NO:290)

(A) STKGPSVFFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVCH
KPSNTKVDKRV (E) SCYGPPCPCPAPAEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSRLLTVDKSRWQEAGNPFSCSMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

(Ab 33) (SEQ ID NO:291)

(A) STKGPSVFFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVCH
KPSNTKVDKRV (E) SCYGPPSPSPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSRLLTVDKSRWQEAGNPFSCSMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

(Ab 34) (SEQ ID NO:292)

(A) STKGPSVFFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVCH
KPSNTKVDKRV (E) SCYGPPCPCPAPAEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSRLLTVDKSRWQEAGNPFSCSMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

(Ab 35) (SEQ ID NO:293)

(A) STKGPSVFFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVCH
KPSNTKVDKRV (E) SCYGPPSPSPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSRLLTVDKSRWQEAGNPFSCSMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

(Ab 36) (SEQ ID NO:294)

(A) STKGPSVFP LAPSSRSTSE TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVCH
KPSNTKVDKRV (E) CKYGPSPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPETCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

(Ab 37) (SEQ ID NO:295)

(A) STKGPSVFP LAPSSRSTSE TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVCH
KPSNTKVDKRV (E) CKYGPSPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPETCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

(Ab 38) (SEQ ID NO:296)

(A) STKGPSVFP LAPSSRSTSE TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVCH
KPSNTKVDKRV (E) CKYGPSPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPETCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

(Ab 39) (SEQ ID NO:297)

(A) STKGPSVFP LAPSSRSTSE TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVCH
KPSNTKVDKRV (E) CKYGPSPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPETCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

(Ab 44) (SEQ ID NO:298)

(A) STKGPSVFP LAPSSRSTSE TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVCH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPAAAACPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPETCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

(Ab 45) (SEQ ID NO:299)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTVPSSSLGKTYTCNVVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPAAAASPSPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSEFFLYSRLITVDKSRWQEGNMFVSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLGLGK

(Ab 46) (SEQ ID NO:300)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTVPSSSLGKTYTCNVVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPAAAACPSSPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSEFFLYSRLITVDKSRWQEGNMFVSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLGLGK

(Ab 47) (SEQ ID NO:301)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTVPSSSLGKTYTCNVVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPAAAASPSPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSEFFLYSRLITVDKSRWQEGNMFVSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLGLGK

(Ab 2) (SEQ ID NO:302)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTVPSSSLGKTYTCNVVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYGPSPSPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPPVLDSDGSEFFLYSRLITVDKSRWQEGNMFVSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLGLGK

(Ab 3) (SEQ ID NO:303)

(A) STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTVPSSSLGKTYTCNVVDH
KPSNTKVDKRV (E) SKYGPSPSPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPPVLDSDGSEFFLYSRLITVDKSRWQEGNMFVSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLGLGK

(Ab 48) (SEQ ID NO:304)

(A) STKGPSVFFLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVCH
KPSNTKVDKRV (E) PKSCDKTHTCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

(Ab 28P) (SEQ ID NO:305)

(A) STKGPSVFFLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVCH
KPSNTKVDKRV (E) SKCGPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

(Ab 44P) (SEQ ID NO:306)

(A) STKGPSVFFLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVCH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPAAACPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

(Ab 1) (SEQ ID NO:307)

(A) STKGPSVFFLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVCH
KPSNTKVDKRV (E) SKYGPSPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

(Ab 4) (SEQ ID NO:308)

(A) STKGPSVFFLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVCH
KPSNTKVDKRV (E) SKYGPSPSPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

Ab5 (SEQ ID NO:309)

(A) STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTVPSSSLGKTYTCNVCH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPFCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHHEALHNHYTQKSLSLGLGK

Ab5P (SEQ ID NO:310)

(A) STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTVPSSSLGKTYTCNVCH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPFCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHHEALHNHYTQKSLSLGLGK

Ab9 (SEQ ID NO:311)

(A) STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTVPSSSLGKTYTCNVCH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPFCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHHEALHNHYTQKSLSLGLGK

Ab10 (SEQ ID NO:312)

(A) STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTVPSSSLGKTYTCNVCH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPFCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHHEALHNHYTQKSLSLGLGK

Ab11 (SEQ ID NO:313)

(A) STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTVPSSSLGKTYTCNVCH
KPSNTKVDKRV (E) SKYCPFCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHHEALHNHYTQKSLSLGLGK

Ab12 (SEQ ID NO:314)

(A) STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTVPSSSLGTTKTYTCNVCH
KPSNTKVDKRV (E) SKYGPSPSPAPAEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPPVLDSDGSEFFLYSRLTVDKSRWQEGNMFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

Ab13 (SEQ ID NO:315)

(A) STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTVPSSSLGTTKTYTCNVCH
KPSNTKVDKRV (E) SKYGPSPSPAPAEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPPVLDSDGSEFFLYSRLTVDKSRWQEGNMFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

Ab14 (SEQ ID NO:316)

(A) STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTVPSSSLGTTKTYTCNVCH
KPSNTKVDKRV (E) SKYGPSPSPAPAEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPPVLDSDGSEFFLYSRLTVDKSRWQEGNMFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

Figura 7

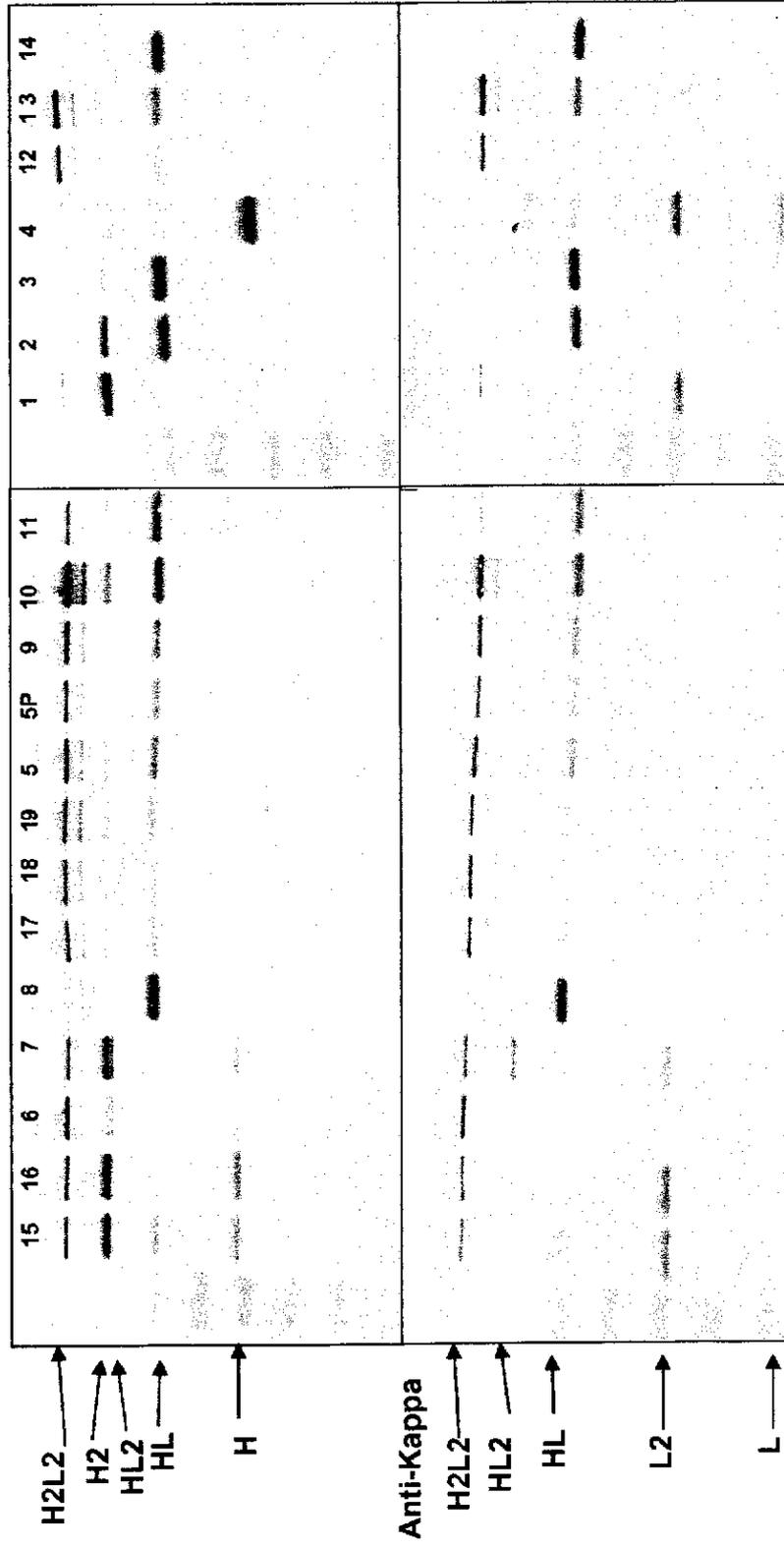


Figura 8

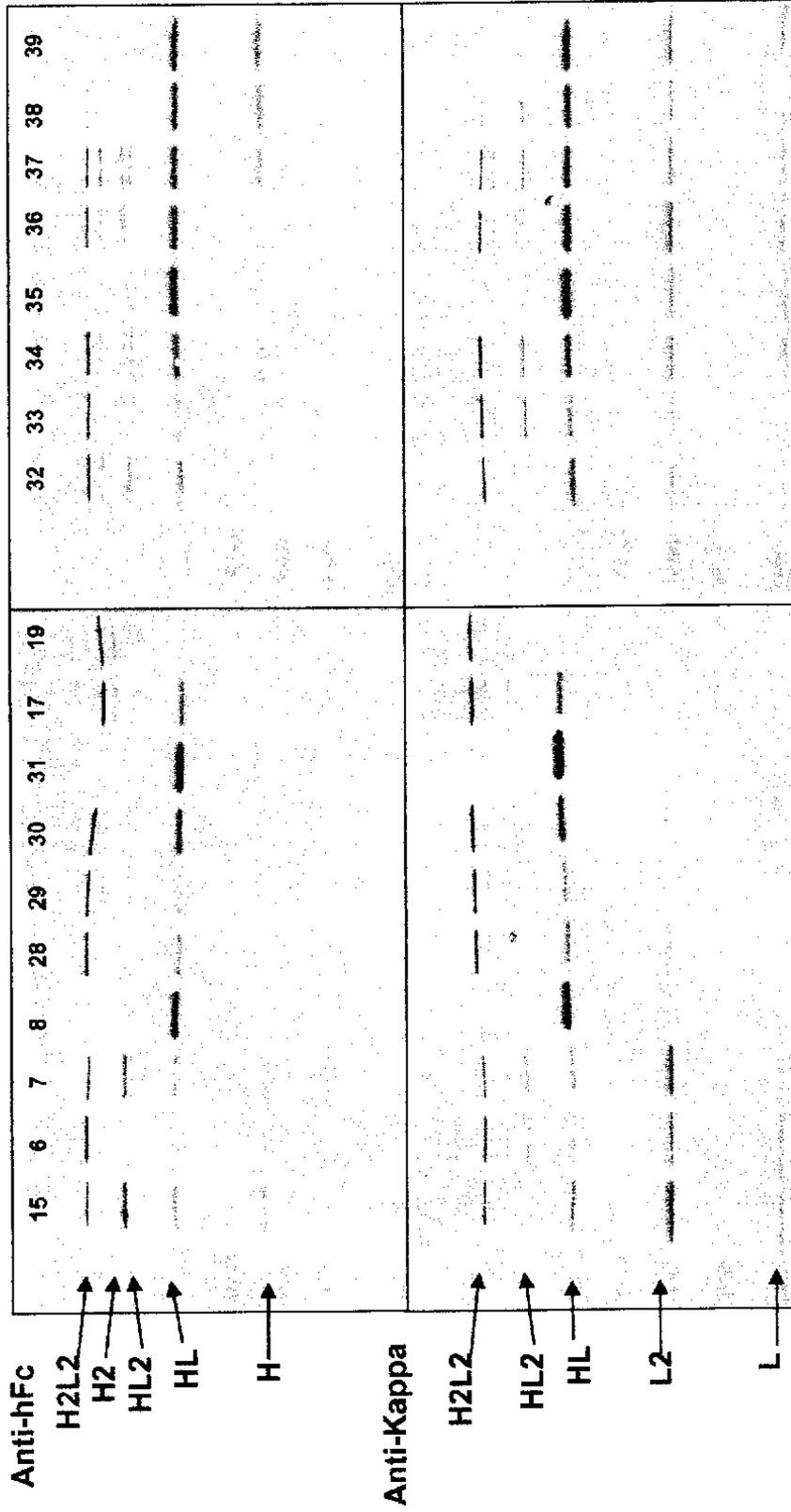


Figura 9

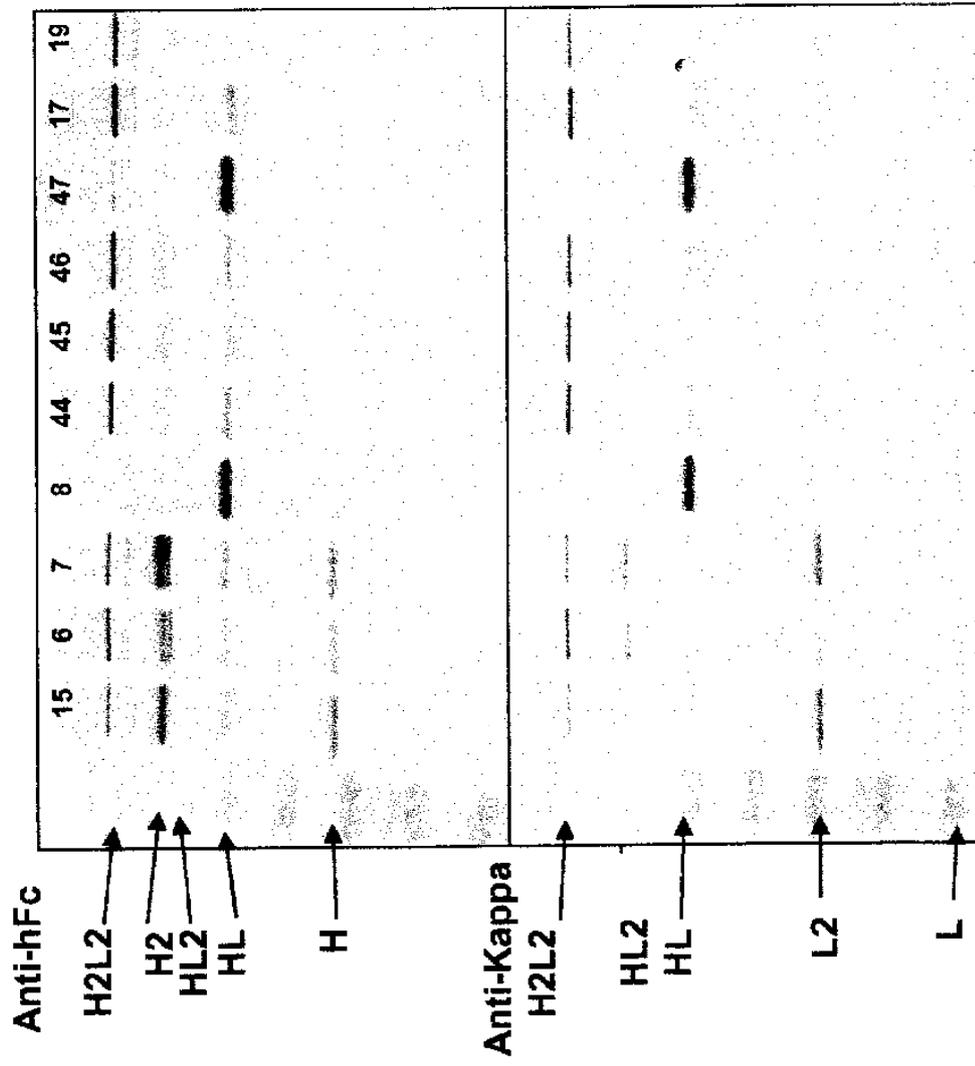


Figura 10

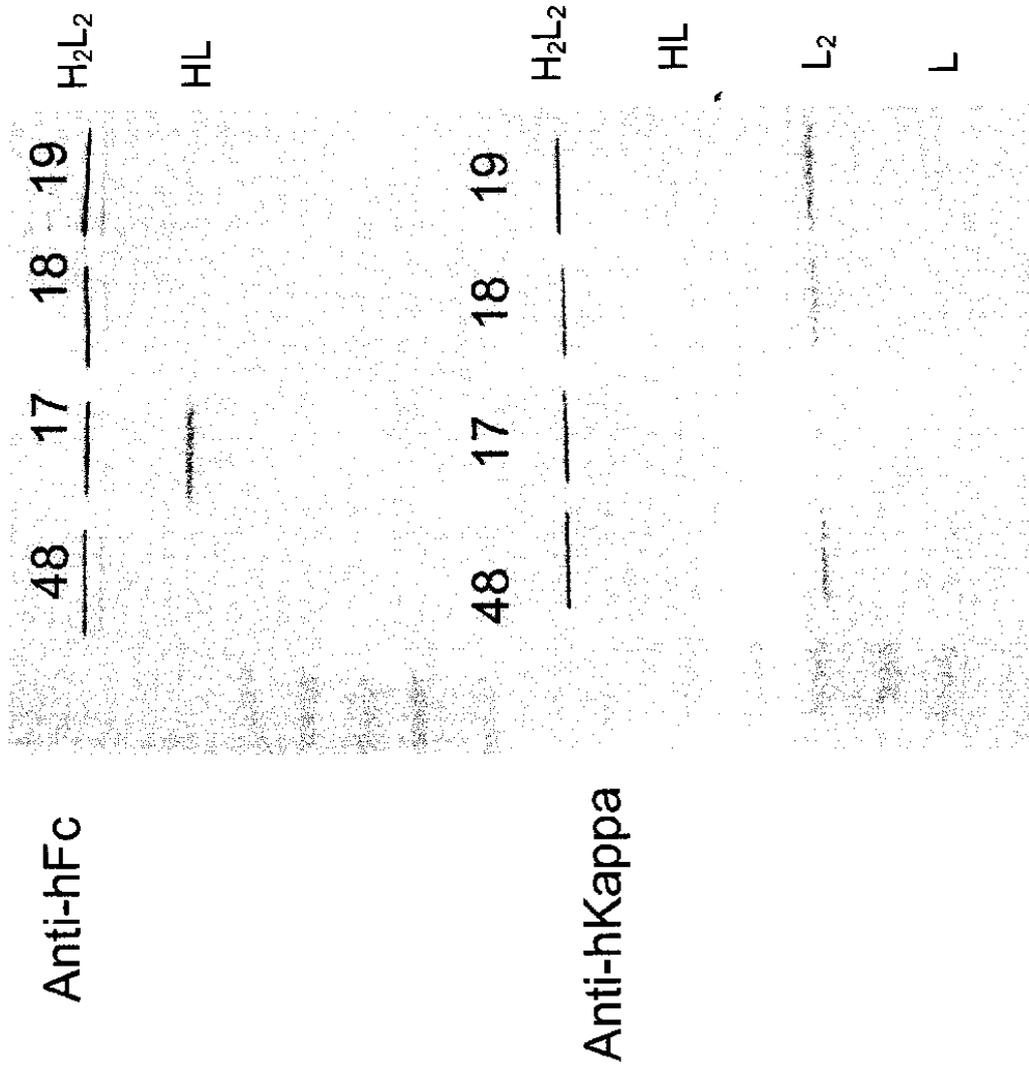


Figura 11

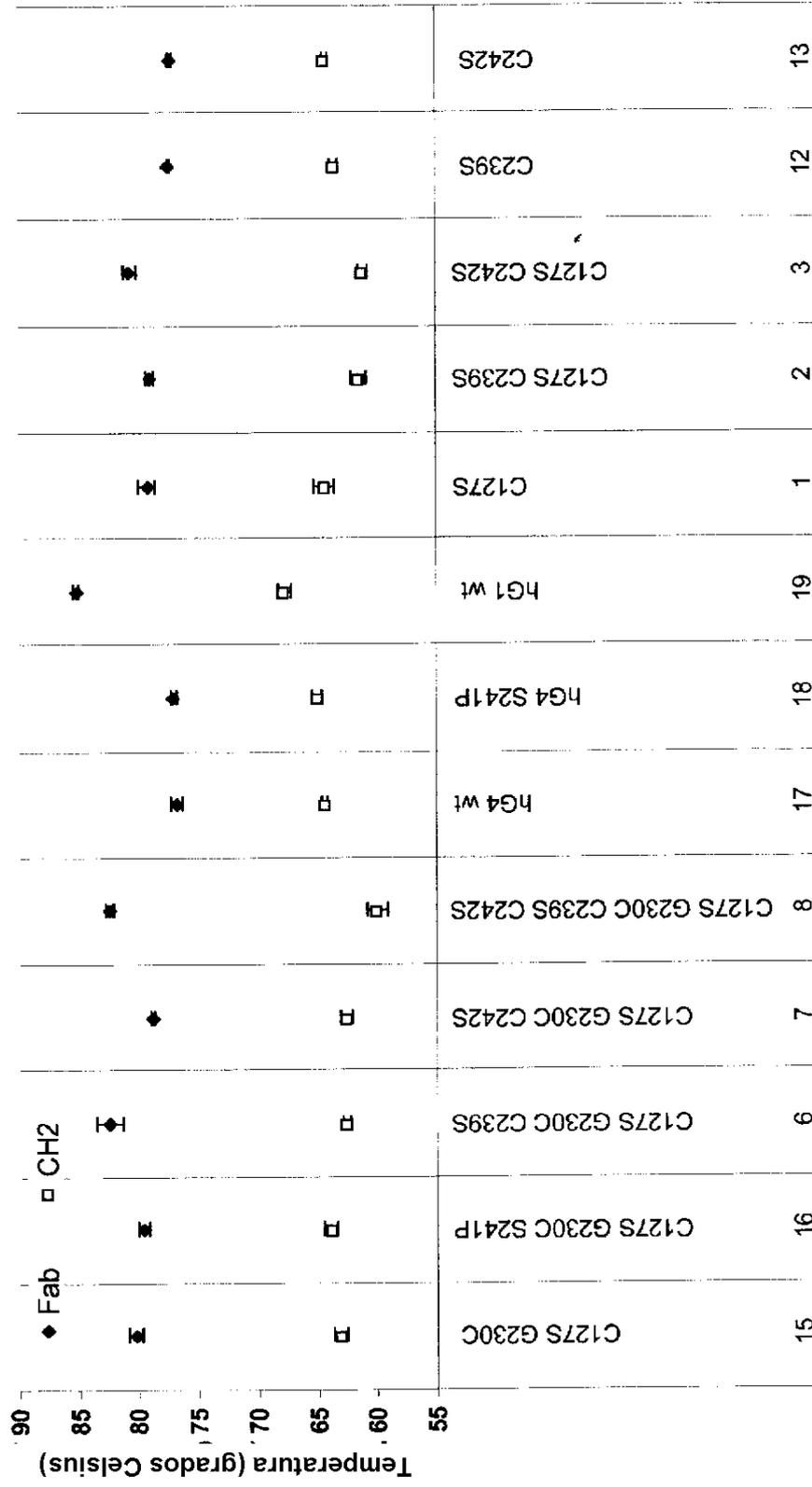


Figura 12

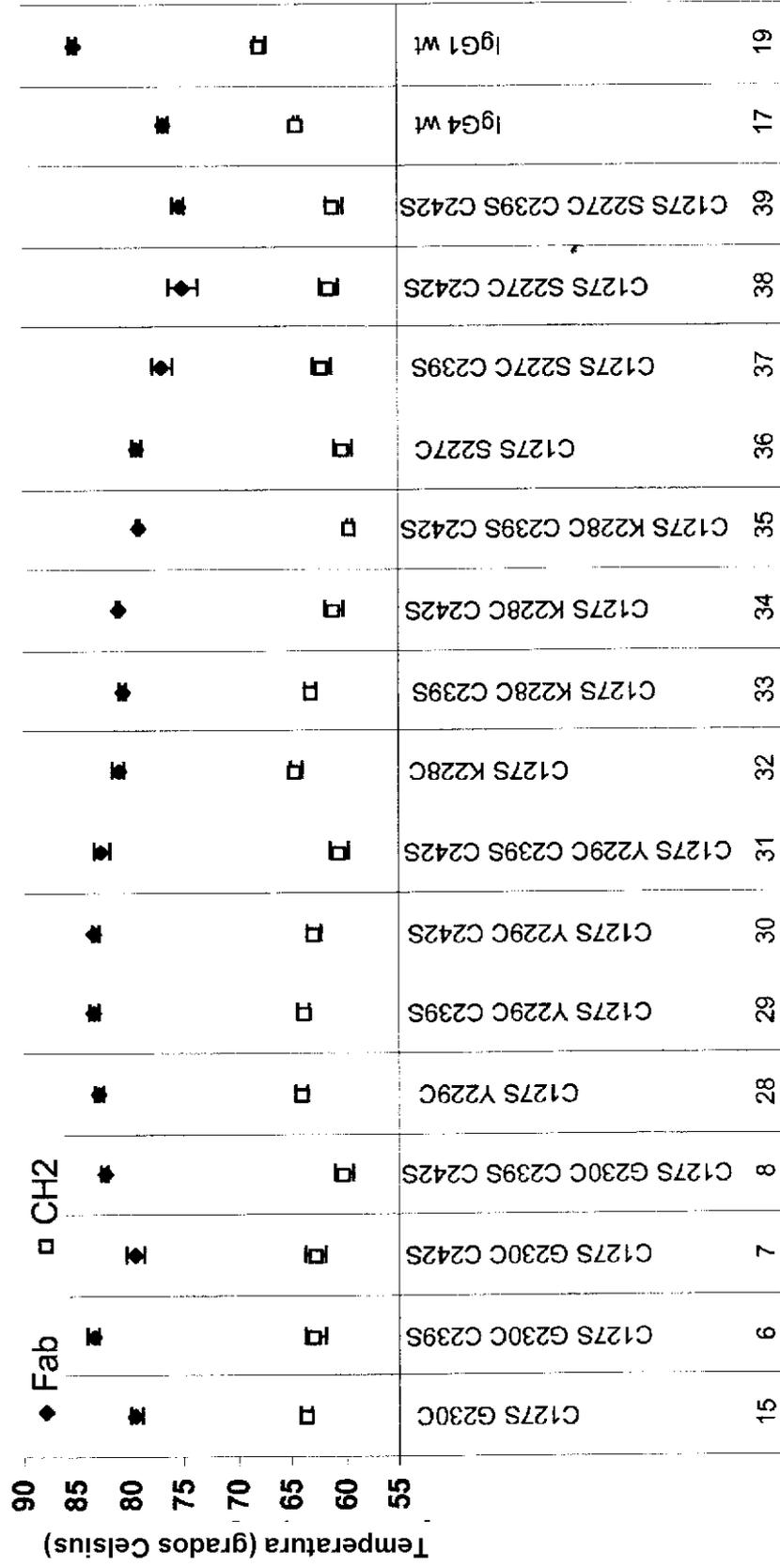
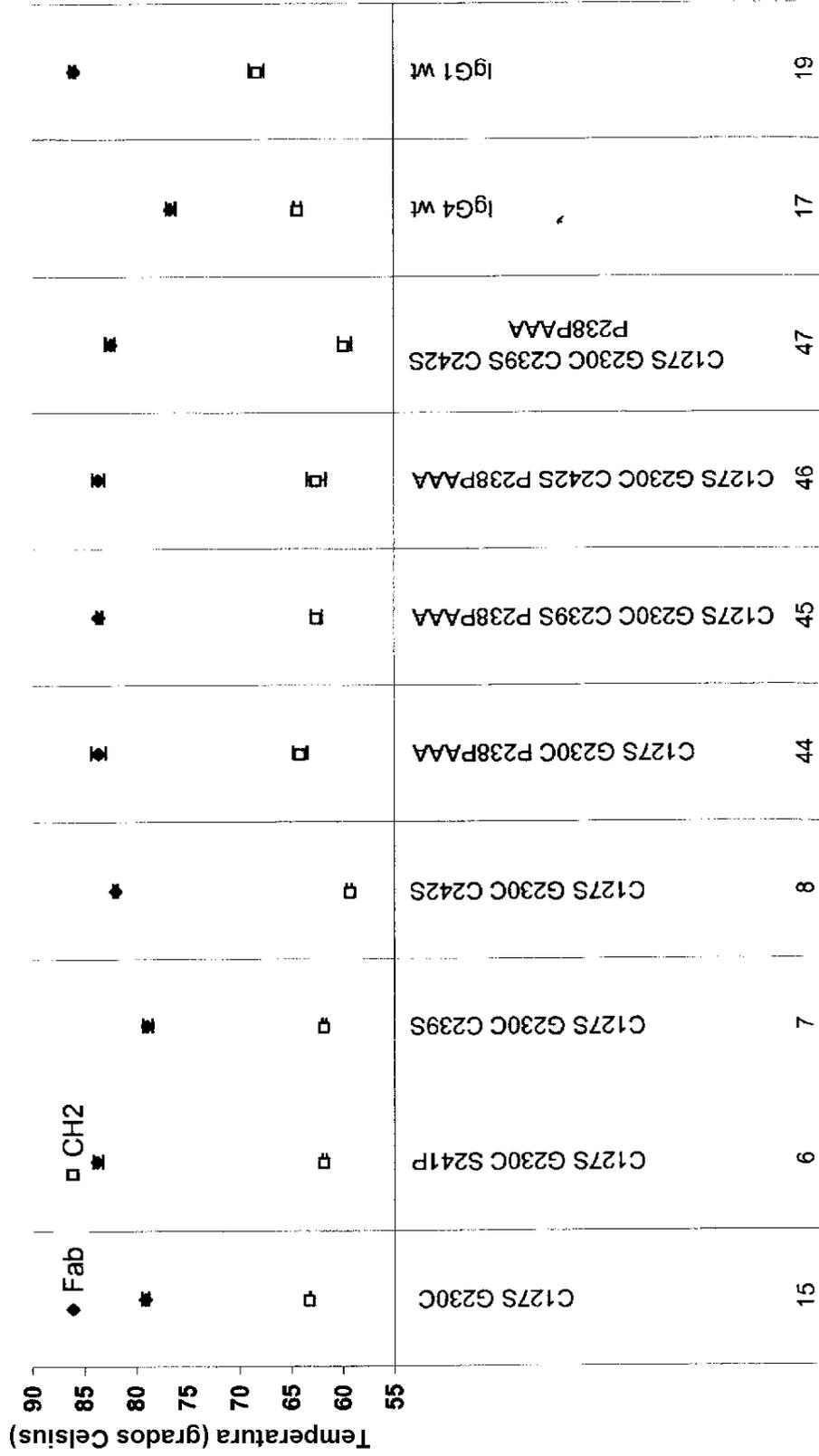


Figura 13



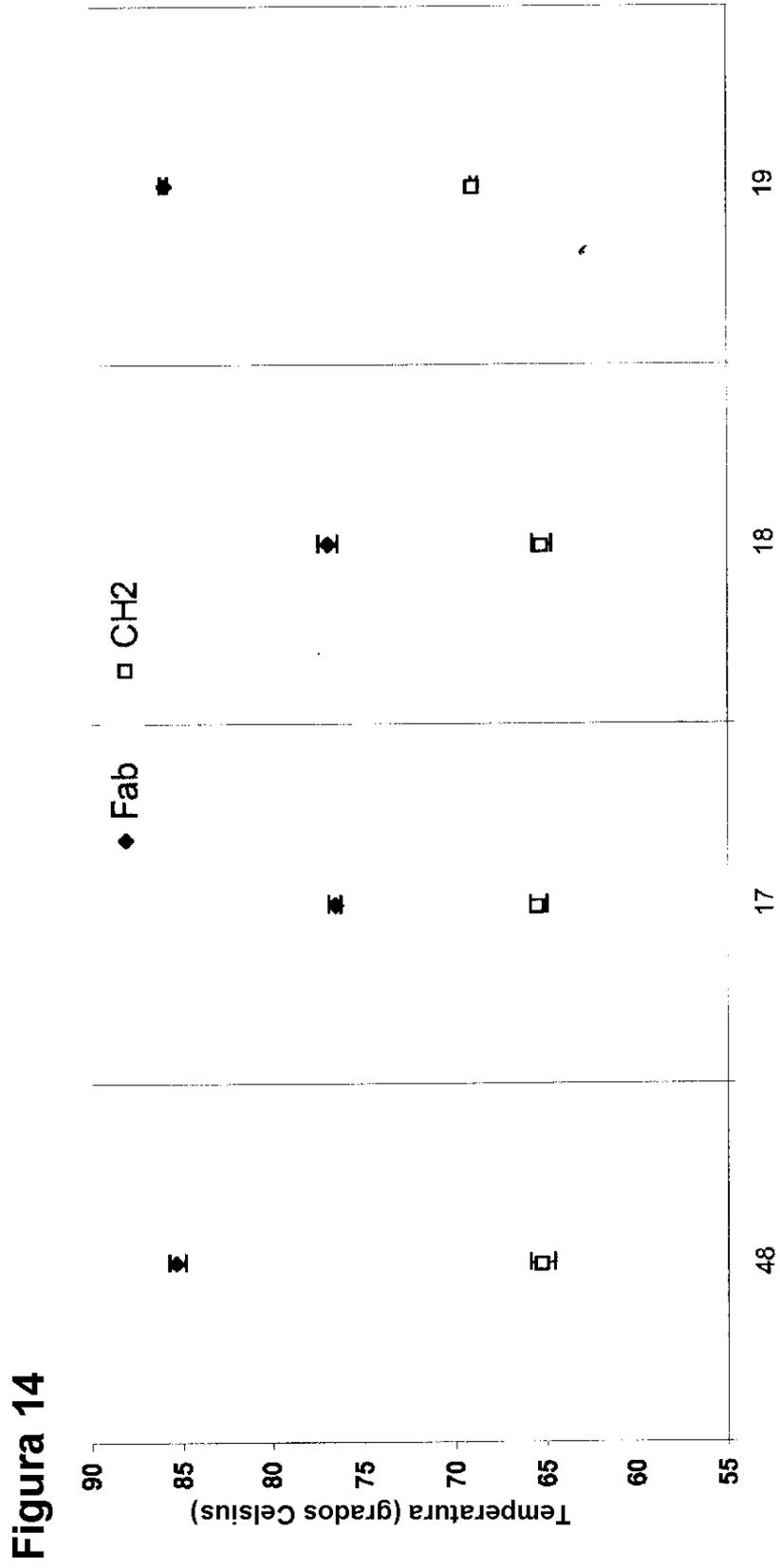


Figura 15

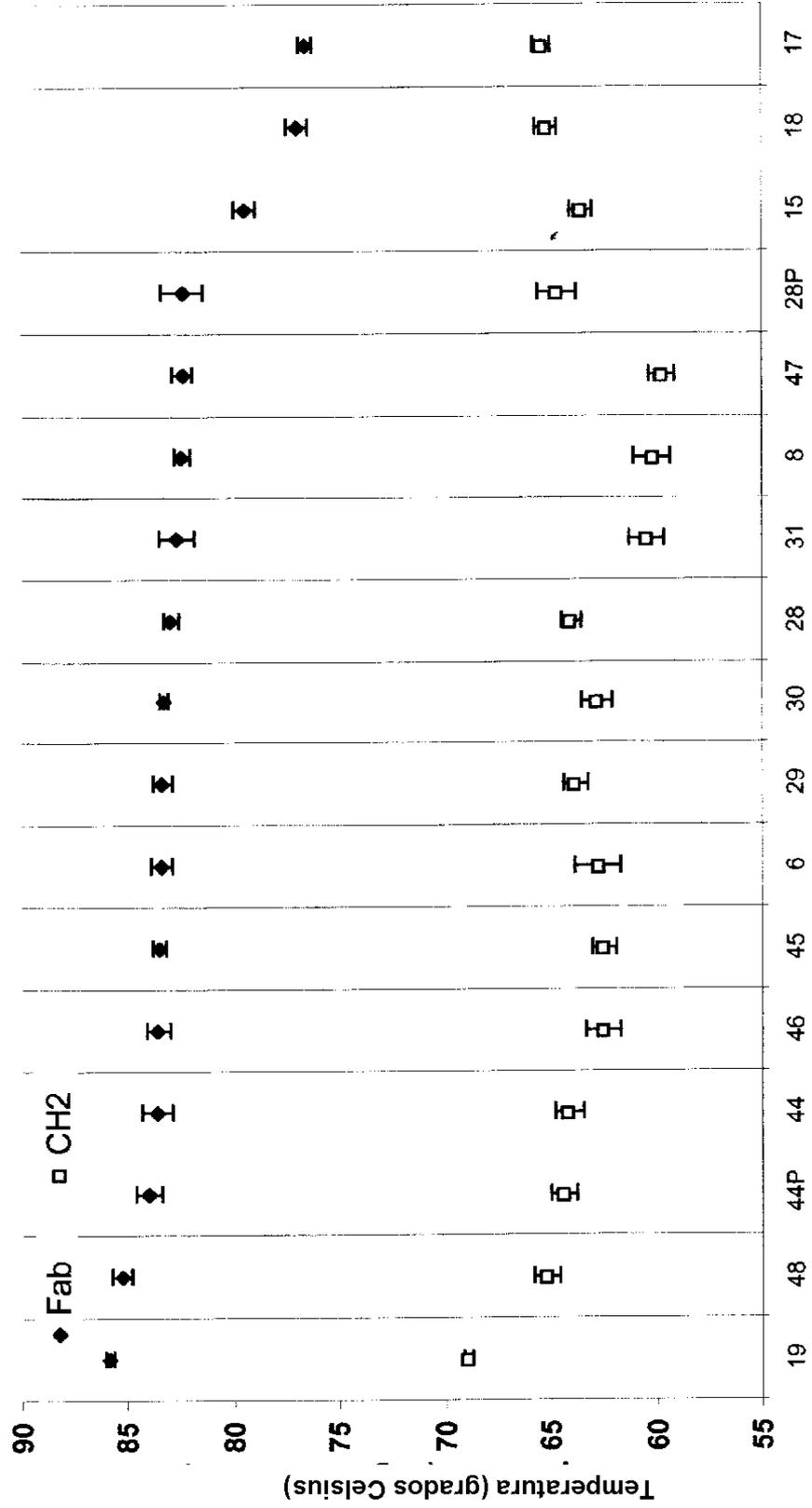


Figura 16

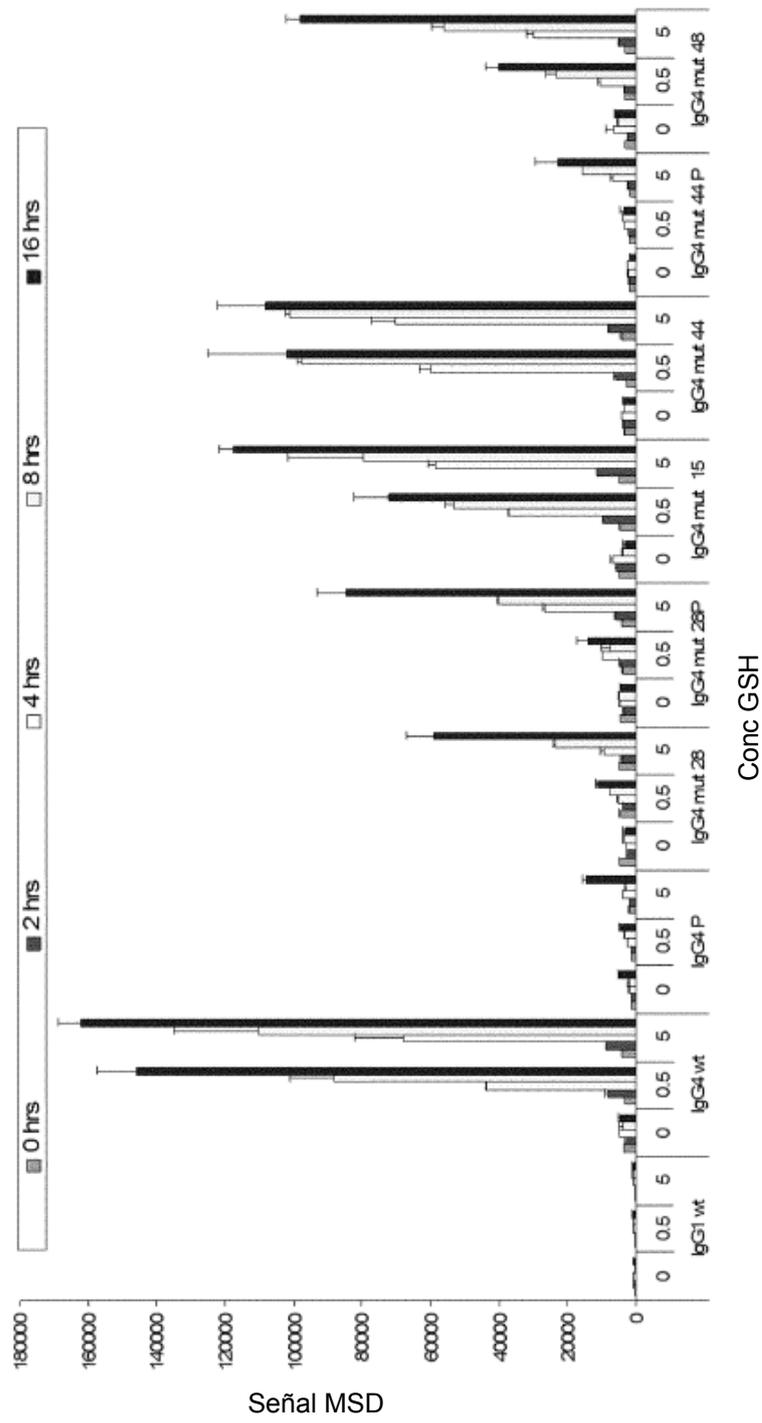


Figura 17

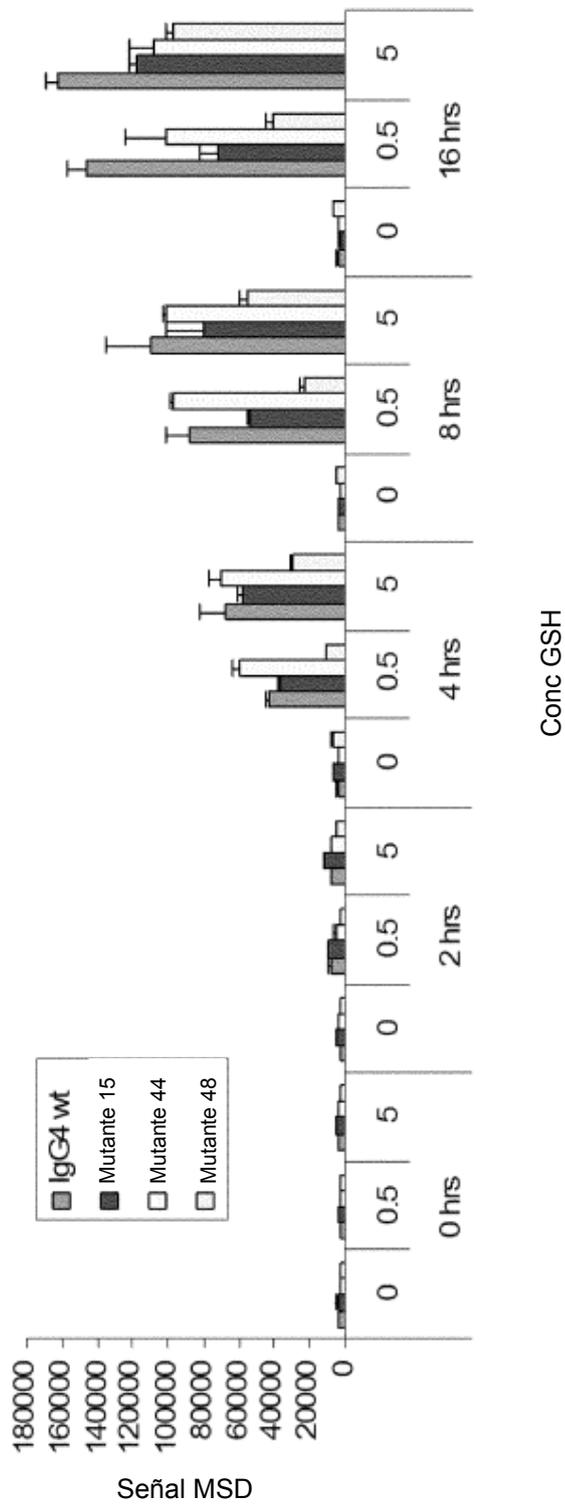


Figura 18

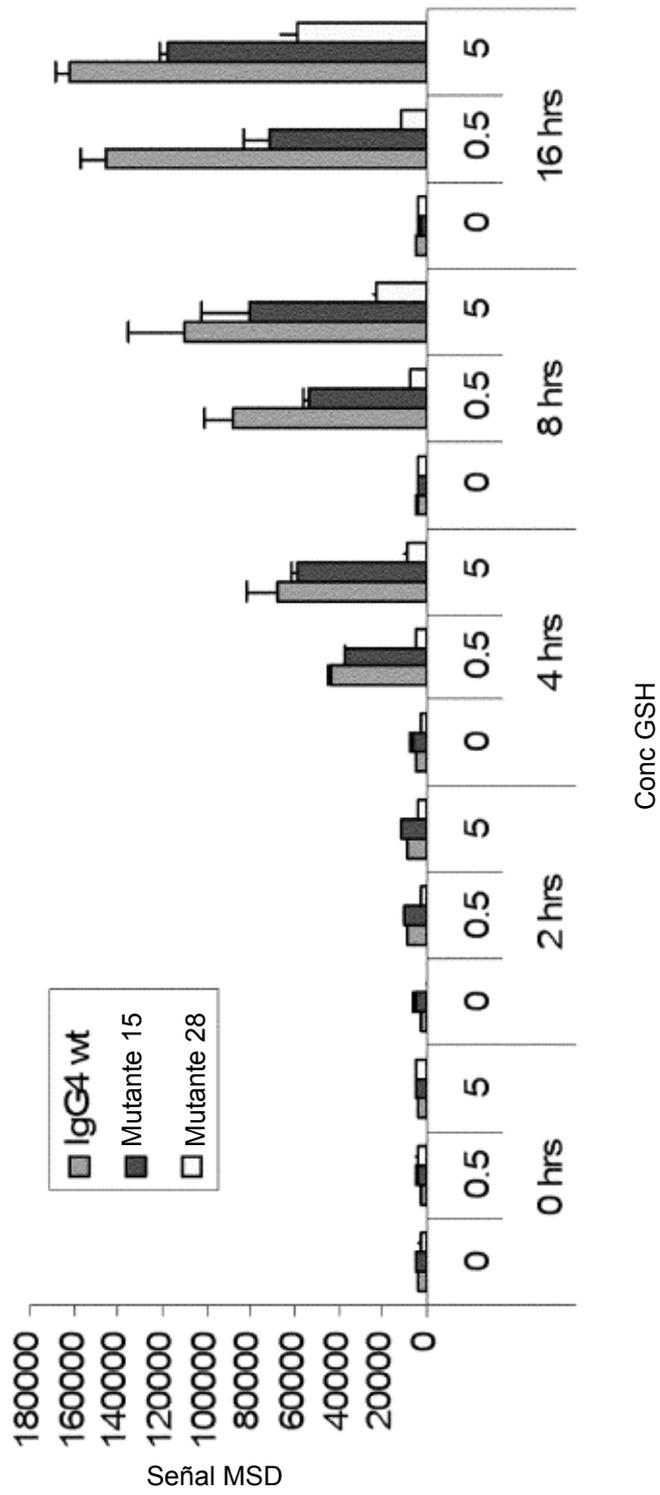


Figura 19

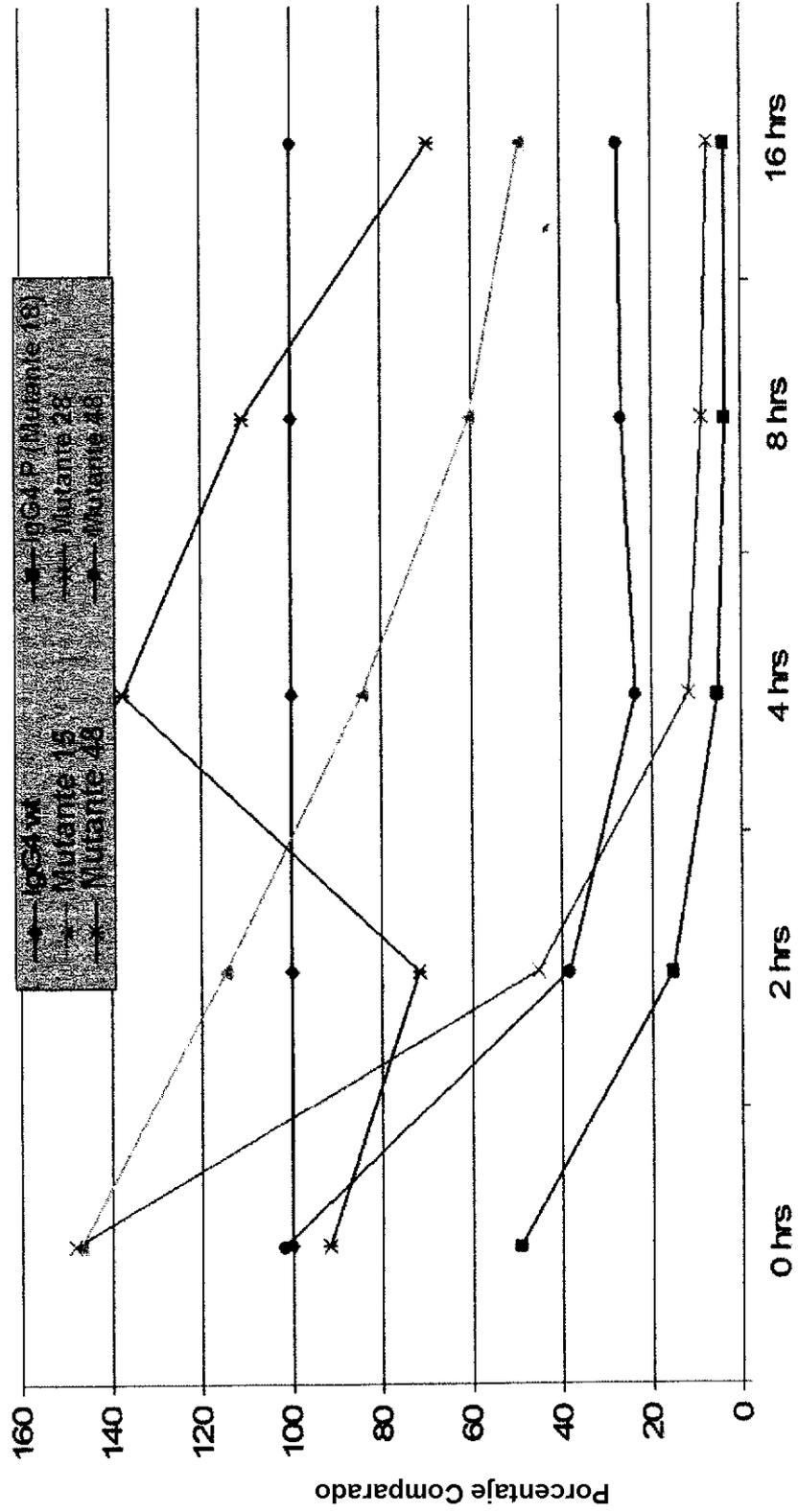


Figura 20

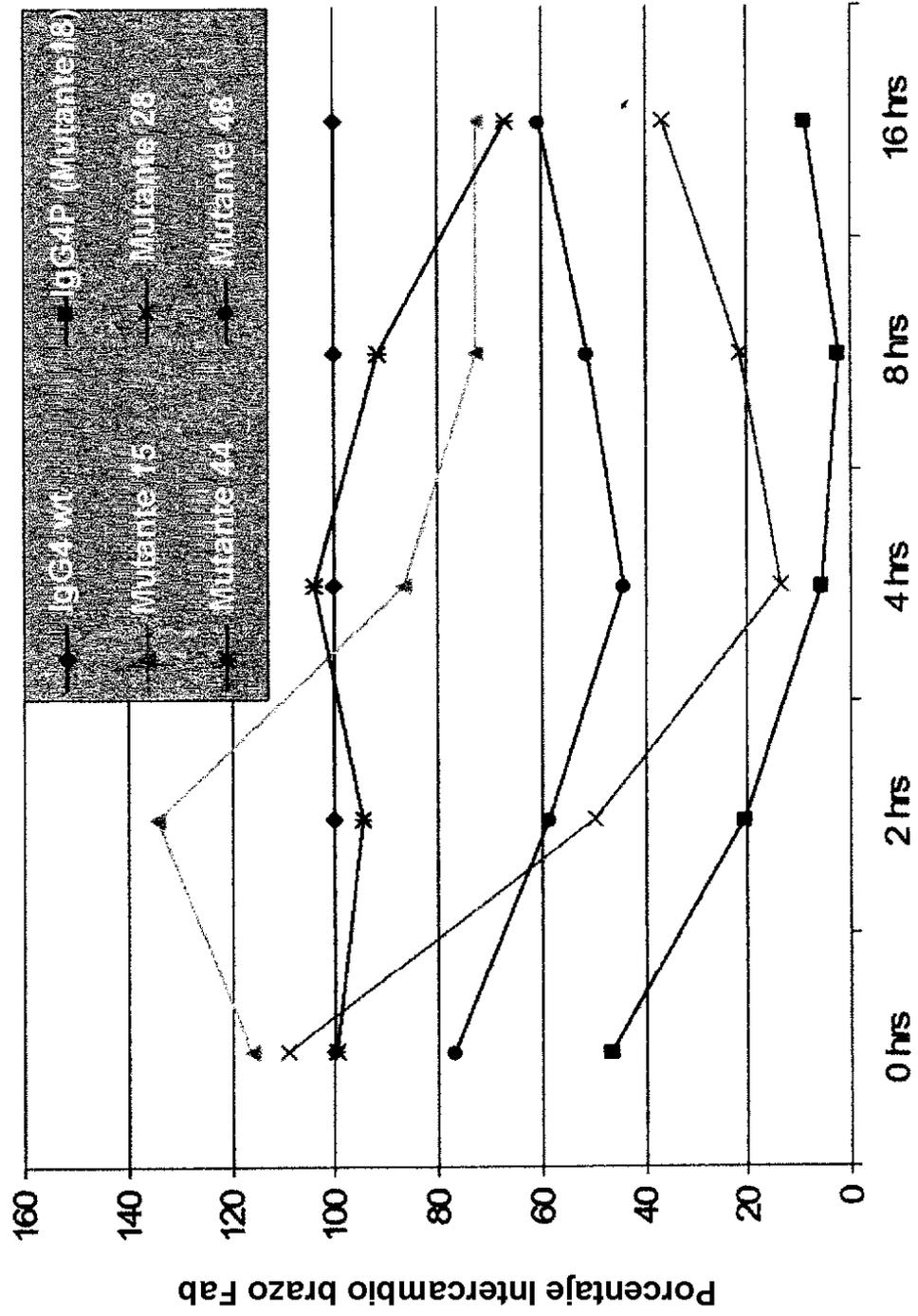


Figura 21 Análisis de intercambio de brazo simétrico de mutantes de IgG4 con residuos alternativos en la posición 241

