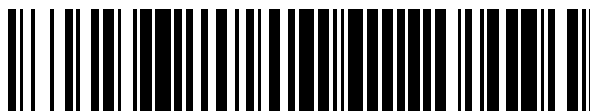


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 777**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.04.2011 PCT/US2011/033610**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **27.10.2011 WO2011133886**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.04.2011 E 11718831 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.12.2016 EP 2560683**

54 Título: **Producción de proteínas heteromultiméricas**

30 Prioridad:

23.04.2010 US 327302 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.06.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SCHEER, JUSTIN;
SPIESS, CHRISTOPH y
YANSURA, DANIEL G.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 617 777 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

Producción de proteínas heteromultiméricas

5 La presente invención se refiere a métodos para la producción de proteínas heteromultiméricas.

Antecedentes

10 Los anticuerpos monoclonales del tipo IgG contienen dos ramas de unión a antígeno idénticas y un dominio constante (Fc). En la naturaleza no aparecen anticuerpos con una especificidad diferente en sus ramas de unión y, por lo tanto, tienen que fabricarse con la ayuda de la ingeniería química (por ejemplo, reticulación química, etc.), ADN recombinante y/o tecnología de fusión celular.

15 Los anticuerpos biespecíficos pueden unirse simultáneamente con dos antígenos diferentes. Esta propiedad permite el desarrollo de estrategias terapéuticas que no son posibles con anticuerpos monoclonales convencionales. El gran panel de formatos de anticuerpos biespecíficos imaginativos que se ha desarrollado refleja el fuerte interés por estas moléculas. Véase Berg J, Lotscher E, Steimer KS, *et al.*, "Bispecific antibodies that mediate killing of cells infected with human immunodeficiency virus of any strain," Proc Natl Acad Sci USA (1991) 88(11): 4723-4727 y Fischer N y Leger O., "Biospecific Antibodies: Molecules That Enable Novel Therapeutic Strategies", Pathobiology (2007) 74: 3-14.

20 Otra clase de moléculas multiespecíficas es la de las proteínas de fusión recombinantes. Las proteínas de fusión recombinantes que consisten en el dominio extracelular de proteínas inmunorreguladoras y el dominio constante (Fc) de inmunoglobulina (Ig) representan una clase creciente de productos terapéuticos humanos. Las inmunoadhesinas combinan la región de unión de una secuencia proteica, con una especificidad deseada, con el dominio efector de un anticuerpo. Las inmunoadhesinas tienen dos propiedades importantes que son significativas para su potencial como agentes terapéuticos: la especificidad de diana, y la estabilidad farmacocinética (semivida *in vivo* que es comparable a la de anticuerpos). Las inmunoadhesinas pueden usarse como antagonistas para inhibir o bloquear interacciones deletéreas o como agonistas para imitar o potenciar las respuestas fisiológicas. Véase Chamow SM, Zhang DZ, Tan XY, *et al.*, "A humanized, bispecific immunoadhesin-antibody that retargets CD3+ effectors to kill HIV-1-infected cells", J Hematother 1995; 4(5): 439-446.

25 Otras moléculas multiespecíficas se han analizado en otra parte. Los ejemplos incluyen pero sin limitación: Fisher *et al.*, Pathobiology (2007) 74: 3-14 (revisión de diversos formatos biespecíficos); Patente de Estados Unidos n.º 6.660.843, expedida el 9 de diciembre de 2003 de Feige *et al.* (pepticuerpos); Publicación de Patente de Estados Unidos n.º 2002-004587 publicada el 10 de enero de 2002 (anticuerpos multiespecíficos); Patente de Estados Unidos n.º 7612181 expedida el 3 de noviembre de 2009 de Wu *et al.* (formato de dominio Variable Doble); Patente de Estados Unidos n.º 6.534.628, Nord K *et al.*, Prot Eng (1995) 8: 601-608, Nord K *et al.*, Nat Biotech (1997) 15: 772-777 y Grönwall *et al.*, Biotechnol Appl Biochem. (2008) Jun; 50(Pt2): 97-112 (aficuerpos); Martens *et al.*, Clin Cancer Res (2006), 12: 6144-6152 y Jin *et al.*, Cancer Res (2008) 68(11): 4360-4368 (anticuerpos de una rama); Bostrom *et al.*, Science (2009) 323: 1610-1614 (Fab de Acción Doble, también conocido como anticuerpos de valencia mixta). Los expertos en la materia conocen otros formatos.

30 La fabricación de material de uso clínico sigue siendo un reto para las moléculas multiespecíficas descritas anteriormente. Como se ha indicado anteriormente, existen muchas rutas para la producción de moléculas con ramas de unión mixtas, es decir, ramas de unión que no son idénticas entre sí. Cada uno de estos métodos tiene sus desventajas.

35 La reticulación química es laboriosa ya que puede ser aún necesario purificar la especie relevante de homodímeros y otros productos secundarios indeseados. Además, las etapas de modificación química pueden alterar la integridad de las proteínas conduciendo de este modo a escasa estabilidad. Por lo tanto, este método es con frecuencia ineficaz y puede conducir a pérdida de la actividad de anticuerpo.

40 La tecnología de fusión celular (por ejemplo, hibridomas híbridos) expresa dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras que se ensamblan aleatoriamente lo que conduce a la generación de 10 combinaciones de anticuerpos. Los anticuerpos heteromultiméricos deseados son solamente una fracción pequeña de los anticuerpos producidos de este modo. La purificación de las proteínas heteromultiméricas deseadas reduce drásticamente los rendimientos de producción y aumenta los costes de fabricación.

45 Se han usado técnicas de ADN recombinante para generar diversos formatos heteromultiméricos, por ejemplo, Fv monocatenarios, diacuerpos, etc., que no comprenden un dominio Fc. Una desventaja importante de este tipo de molécula de anticuerpo es la falta del dominio Fc y por lo tanto la capacidad del anticuerpo para desencadenar una función efectora (por ejemplo, activación del complemento, unión a receptor de Fc, etc.). Por lo tanto, se desea un anticuerpo biespecífico que comprenda un dominio Fc funcional.

50 También se han usado técnicas de ADN recombinante para generar anticuerpos biespecíficos de "botón en ojal".

Véase la Solicitud de Patente de Estados Unidos 20030078385 y documentos WO 98/50431 (Arathoon *et al.*, Genentech), US 5.807.706 (Carter *et al.*, Genentech) y otros. Una restricción de esta estrategia es que las cadenas ligeras de los dos anticuerpos parentales tienen que ser idénticas para evitar el desapareamiento y la formación de moléculas indeseadas y/o inactivas debido a que se expresan en la misma célula.

5 El documento WO 2006/028956 describe la preparación de anticuerpos biespecíficos con una especificidad por el receptor Fcγ RIIB, usando la tecnología de botón en ojal. El documento WO 2004/009618 se refiere a producción recombinante de mezclas de anticuerpos.

10 Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de métodos alternativos para producir proteínas heteromultiméricas. La invención descrita en el presente documento proporciona dichos métodos. Estos y otros aspectos y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción de la invención proporcionada en el presente documento.

15 Breve resumen de la invención

La producción de proteínas heteromultiméricas, por ejemplo, anticuerpos multiespecíficos, usando técnicas actuales tiene desventajas incluyendo la producción de una mezcla de productos, rendimiento reducido y/o reducción/eliminación de la función efectora entre otros. Por lo tanto, es deseable producir proteínas heteromultiméricas eficazmente y a altos niveles.

20 La producción de moléculas de anticuerpo, por diversos medios, en general se entiende bien. La patente de Estados Unidos 6331415 (Cabilly *et al.*), por ejemplo, describe un método para la producción recombinante de inmunoglobulina en el que las cadenas pesadas y ligeras se expresan simultáneamente a partir de un único vector o a partir de dos vectores distintos en una única célula. Wibbenmeyer *et al.*, (1999, Biochim Biophys Acta 1430(2): 191-202) y Lee y Kwak (2003, J. Biotechnology 101: 189-198) describen la producción de anticuerpos monoclonales a partir de cadenas pesadas y ligeras producidas por separado, usando plásmidos expresados en distintos cultivos de *E. coli*. Diversas otras técnicas relevantes para la producción de anticuerpos se describen, por ejemplo, en Harlow, *et al.*, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., (1988) y documento WO2006028936. Aún así cada uno de estos tiene desventajas tales como bajo rendimiento y uso de productos químicos.

30 Los métodos de la invención proporcionan la expresión de cada componente, por ejemplo, una rama de un anticuerpo, de una proteína heteromultimérica que contiene una bisagra en una célula hospedadora separada y el ensamblaje de la proteína heteromultimérica que contiene bisagra, por ejemplo, un anticuerpo multiespecífico, sin la adición de un reductor.

35 La presente invención proporciona un proceso/método de producción fácil y eficaz que permite la producción económica de proteínas heteromultiméricas, por ejemplo, anticuerpos multiespecíficos.

40 La invención proporciona métodos eficaces y nuevos para producir complejos de inmunoglobulina multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos multiespecíficos) y otras proteínas multiméricas (denominadas colectivamente en el presente documento proteínas heteromultiméricas) que superan limitaciones de métodos tradicionales. Pueden proporcionarse proteínas heteromultiméricas, tales como anticuerpos biespecíficos, como un polipéptido heteromultimérico altamente homogéneo de acuerdo con métodos de la invención. Además, los métodos proporcionados en el presente documento no se basan en la adición de un reductor para conseguir la formación de al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro enlaces disulfuro intercatenarios en la proteína heteromultimérica.

50 (1) Un método para preparar una proteína heteromultimérica que comprende un primer polipéptido que contiene bisagra que tiene un primer dominio de heterodimerización y un segundo polipéptido que contiene bisagra que tiene un segundo dominio de heterodimerización, en el que el segundo dominio de heterodimerización interacciona con el primer dominio de heterodimerización, y en el que el primer y el segundo polipéptidos que contienen bisagra se unen por al menos un enlace disulfuro intercatenario y en el que cada uno del primero y el segundo polipéptidos que contienen bisagra es una cadena pesada de anticuerpo y se empareja con una cadena ligera de anticuerpo para formar un primer par y un segundo par, y en el que las cadenas ligeras del primer par y el segundo par comprenden secuencias de dominio variable diferentes, comprendiendo el método las etapas de:

- 60 (a) cultivar una primera célula hospedadora que comprende un primer ácido nucleico que codifica el primer polipéptido que contiene bisagra en condiciones en las que el polipéptido que contiene bisagra se expresa y se empareja con una cadena ligera de anticuerpo para formar el primer par;
- 65 (b) cultivar una segunda célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica el segundo polipéptido que contiene bisagra en condiciones en las que el polipéptido que contiene bisagra se expresa y se empareja con una cadena ligera de anticuerpo para formar el segundo par;
- (c) romper las membranas celulares de las primera y segunda células hospedadoras para liberar el primer y

el segundo polipéptidos que contienen bisagra de las células hospedadoras para formar una proteína heteromultimérica, en el que la primera y la segunda células hospedadoras se han combinado entre sí en una única suspensión; y

(d) recuperar la proteína heteromultimérica,

5 en el que dicho método no requiere la adición de un reductor.

(2) Un método para preparar una proteína heteromultimérica que comprende un primer polipéptido que contiene bisagra que tiene un primer dominio de heterodimerización y un segundo polipéptido que contiene bisagra que tiene un segundo dominio de heterodimerización, en el que el segundo dominio de heterodimerización interacciona con el primer dominio de heterodimerización y en el que el primer y el segundo polipéptidos que

10 contienen bisagra se unen por al menos un enlace disulfuro intercatenario y en el que cada uno del primer y el segundo polipéptidos que contienen bisagra es una cadena pesada de anticuerpo y se empareja con una cadena ligera de anticuerpo para formar un primer par y un segundo par, y en el que las cadenas ligeras del primer par y el segundo par comprenden diferentes secuencias de dominio variable,

15 comprendiendo el método las etapas de:

(a) cultivar una primera célula hospedadora que comprende un primer ácido nucleico que codifica el primer polipéptido que contiene bisagra en condiciones en las que el polipéptido que contiene bisagra se expresa, emparejado con una cadena ligera de anticuerpo para formar el primer par y secretarse al medio de cultivo;

(b) cultivar una segunda célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica el segundo polipéptido que contiene bisagra en condiciones en las que se expresa el polipéptido que contiene bisagra, emparejado con una cadena ligera de anticuerpo para formar el segundo par y secretarse al medio de cultivo;

20 y
(c) recuperar la proteína heteromultimérica del medio de cultivo, en el que el medio de cultivo de la primera y la segunda células hospedadoras se han combinado entre sí para formar la proteína heteromultimérica,

en el que dicho método no requiere la adición de un reductor.

(3) El método de (1) o (2), en el que el primer dominio de heterodimerización y el segundo dominio de heterodimerización se encuentran en una interfaz, y la parte de interfaz del segundo dominio de heterodimerización comprende una protuberancia (un botón) que puede situarse en una cavidad (un ojal) en la parte de interfaz del primer dominio de heterodimerización, en el que la protuberancia comprende una cadena lateral de aminoácido que se proyecta desde la parte de interfaz del segundo dominio de heterodimerización, y la cavidad comprende una cadena lateral de aminoácido que forma un hueco desde la parte de interfaz del primer dominio de heterodimerización.

(4) El método de (1) o (2), en el que dicho enlace disulfuro intercatenario está entre regiones bisagra.

(5) El método de (1) o (2), en el que la célula hospedadora es una célula procariota, particularmente una célula *E. coli*, más particularmente una célula *E. coli* deficiente en *lpp*.

(6) El método de (1) o (2), en el que la célula hospedadora es una célula de mamífero, particularmente una célula CHO.

(7) El método de uno cualquiera de (1) a (6), en el que las células de las etapas (a) y (b) están en distintos cultivos celulares.

(8) El método de uno cualquiera de 1 a (6), en el que las células de las etapas (a) y (b) están en un cultivo mixto que comprende ambas células hospedadoras.

(9) El método de (7), en el que las células de las etapas (a) y (b) se (i) combinan, (ii) centrifugan y (iii) resuspenden en tampón antes de romper la membrana celular o se (i) centrifugan, (ii) resuspenden en tampón y (iii) combinan antes de romper la membrana celular.

(10) El método de (1) o (2), en el que la etapa de recuperación comprende además al menos una etapa de purificación.

(11) El método de (1) o (2), en el que la proteína heteromultimérica es un anticuerpo biespecífico o un anticuerpo multiespecífico.

(12) El método de (11), en el que dicho anticuerpo es humanizado o humano.

(13) El método de (11), en el que el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa.

(14) El método de (11), en el que el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en IgG, IgA e IgD, particularmente el anticuerpo es IgG, más particularmente IgG1 o IgG2.

(15) El método de (1) o (2), en el que al menos 45 % de los polipéptidos están en un complejo que comprende el primer par de polipéptido que contiene bisagra y cadena ligera y el segundo par de polipéptido que contiene bisagra y cadena ligera.

(16) El método de (10), en el que no más del 10 % de los polipéptidos aislados están presentes como monómeros u homodímeros antes de la etapa de purificación de la proteína heteromultimérica.

(17) Un método para generar una biblioteca de proteínas heteromultiméricas combinatoria que comprende un primer polipéptido que contiene bisagra que tiene un primer dominio de heterodimerización y un segundo polipéptido que contiene bisagra que tiene un segundo dominio de heterodimerización, en el que el segundo dominio de heterodimerización interacciona con el primer dominio de heterodimerización, y en el que el primer y el segundo polipéptidos que contienen bisagra se unen por al menos un enlace disulfuro intercatenario, y en el que cada uno del primer y el segundo polipéptidos que contienen bisagra es una cadena pesada de anticuerpo y

está emparejado con una cadena ligera de anticuerpo para formar un primer par y un segundo par, y en el que las cadenas ligeras del primer par y el segundo par comprenden diferentes secuencias de dominio variable, comprendiendo el método las etapas de:

- 5 cultivar una primera célula hospedadora y al menos dos células hospedadoras adicionales, en el que dicha primera célula hospedadora comprende un primer ácido nucleico que codifica un primer polipéptido que contiene bisagra; y
dichas células hospedadoras adicionales comprenden un ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido que contiene bisagra;
- 10 en condiciones en las que los polipéptidos que contienen bisagra se expresan y se emparejan con una cadena ligera de anticuerpo para formar el primer y el segundo par;
romper las membranas celulares de la primera célula hospedadora y las al menos dos células hospedadoras adicionales de modo que el primer y el segundo polipéptidos que contienen bisagra se liberan al medio extracelular, en el que la primera célula hospedadora y las al menos dos células hospedadoras adicionales se han combinado entre sí en una única suspensión; y
- 15 recuperar los complejos de proteínas heteromultiméricas,

en el que dicho método no requiere la adición de un reductor.

- (18) Un método para generar una biblioteca de proteínas heteromultiméricas combinatoria que comprende un primer polipéptido que contiene bisagra que tiene un primer dominio de heterodimerización y un segundo polipéptido que contiene bisagra que tiene un segundo dominio de heterodimerización, en el que el segundo dominio de heterodimerización interacciona con el primer dominio de heterodimerización, y en el que el primer y el segundo polipéptidos que contienen bisagra se unen por al menos un enlace disulfuro intercatenario, y en el que cada uno del primer y el segundo polipéptidos que contienen bisagra es una cadena de anticuerpo pesada y se empareja con una cadena ligera de anticuerpo para formar un primer par y un segundo par, y en el que las cadenas ligeras del primer par y el segundo par comprenden diferentes secuencias de dominio variable, comprendiendo el método las etapas de:

- 30 cultivar una primera célula hospedadora y al menos dos células hospedadoras adicionales, en el que dicha primera célula hospedadora comprende un primer ácido nucleico que codifica un primer polipéptido que contiene bisagra; y
dichas células hospedadoras adicionales comprenden un ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido que contiene bisagra;
- 35 en condiciones en las que los polipéptidos que contienen bisagra se expresan, y se emparejan con una cadena ligera de anticuerpo para formar el primer y el segundo par y se secretan al medio de cultivo; y
recuperar los complejos de proteínas heteromultiméricas del medio de cultivo, en el que el medio de cultivo de la primera célula hospedadora y las al menos dos células hospedadoras adicionales se han combinado entre sí para formar la proteína heteromultimérica,
en el que dicho método no requiere la adición de un reductor.

- 40 Adicionalmente, en el presente documento se describe un método para la preparación de una proteína heteromultimérica que comprende un primer polipéptido que contiene bisagra que tiene un primer dominio de heterodimerización y un segundo polipéptido que contiene bisagra que tiene un segundo dominio de heterodimerización, en el que el segundo dominio de heterodimerización interacciona con el primer dominio de heterodimerización, y en el que el primer y el segundo polipéptidos que contienen bisagra se unen por al menos un enlace disulfuro intercatenario, comprendiendo el método las etapas de:

- 50 (a) cultivar la primera célula hospedadora que comprende un primer ácido nucleico que codifica el primer polipéptido que contiene bisagra en condiciones en las que el polipéptido que contiene bisagra se expresa;
- (b) cultivar una segunda célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica el segundo polipéptido que contiene bisagra en condiciones en las que se expresa el polipéptido que contiene bisagra;
- (c) romper las membranas celulares de modo que el primer y el segundo polipéptidos que contienen bisagra se liberen al medio extracelular, en el que la primera y la segunda células se han combinado entre sí en una única suspensión; y
- 55 (d) recuperar la proteína heteromultimérica,

en el que dicho método no requiere la adición de un reductor.

- 60 Se describe además un método para preparar una proteína heteromultimérica que comprende proteína heteromultimérica que comprende un primer polipéptido que contiene bisagra que tiene un primer dominio de heterodimerización y un segundo polipéptido que contiene bisagra que tiene un segundo dominio de heterodimerización, en el que el segundo dominio de heterodimerización interacciona con el primer dominio de heterodimerización, y en el que el primer y el segundo polipéptidos que contienen bisagra se unen por al menos un enlace disulfuro intercatenario, comprendiendo el método las etapas de:

- 65 (a) proporcionar un primer polipéptido que contiene bisagra purificado que tiene un primer dominio de

heterodimerización;

(b) proporcionar un segundo polipéptido que contiene bisagra purificado que tiene un segundo dominio de heterodimerización;

(c) combinar el primer y el segundo polipéptidos que contienen bisagra;

5 (d) replegar el primer polipéptido que contiene bisagra con el segundo polipéptido que contiene bisagra; y

(e) recuperar el complejo de proteínas heteromultiméricas.

10 Adicionalmente, en el presente documento se describe un método para preparar una proteína heteromultimérica que comprende incubar un primer par de polipéptidos de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina, y un segundo par de polipéptidos de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina, en condiciones que permiten la multimerización del primer y el segundo par de polipéptidos para formar una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, en el que las condiciones no comprenden la adición de un reductor; en el que el primer par de polipéptidos es capaz de unirse con una primera diana; en el que el segundo par de polipéptidos es capaz de unirse con una segunda molécula diana; y en el que el polipéptido de Fc del primer polipéptido de cadena pesada y el polipéptido de Fc del segundo polipéptido de cadena pesada se encuentran en una interfaz, y la interfaz del segundo polipéptido de Fc comprende una protuberancia que puede situarse en una cavidad en la interfaz del primer polipéptido de Fc.

20 Adicionalmente, en el presente documento se describe un método para generar una biblioteca combinatoria de proteínas heteromultiméricas, comprendiendo dicho método un primer polipéptido que contiene bisagra que tiene un primer dominio de heterodimerización y un segundo polipéptido que contiene bisagra que tiene un segundo dominio de heterodimerización, en el que el segundo dominio de heterodimerización interactúa con el primer dominio de heterodimerización, y en el que el primer y el segundo polipéptidos que contienen bisagra se unen por al menos un enlace disulfuro intercatenario, comprendiendo el método las etapas de:

25 (a) cultivar una primera célula hospedadora y al menos dos células hospedadoras adicionales, en el que

a. dicha primera célula hospedadora comprende un primer ácido nucleico que codifica un primer polipéptido que contiene dominio de heterodimerización; y

30 b. dichas células hospedadoras adicionales comprenden un ácido nucleico que comprende un segundo polipéptido que contiene dominio de heterodimerización,

(b) combinar la primera y al menos dos células hospedadoras adicionales;

35 (c) tratar las células de modo que el primer y el segundo polipéptidos que contienen dominio de heterodimerización se liberan al medio extracelular; y

(d) recuperar las proteínas heteromultiméricas,

en el que dicho método no requiere la adición de un reductor.

40 Adicionalmente, en el presente documento se describen las proteínas heteromultiméricas producidas por los métodos descritos en el presente documento.

45 Debe entenderse que los métodos descritos en el presente documento pueden incluir otras etapas que en general son etapas rutinarias evidentes para el inicio y/o la compleción del proceso abarcado por métodos de la invención como se describe en el presente documento. Por ejemplo, en una realización, la etapa (a) de un método como se describe en el presente documento se precede de una etapa en la que un ácido nucleico que codifica un primer polipéptido que contiene bisagra se introduce en una primera célula hospedadora, y un ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido que contiene bisagra se introduce en una segunda célula hospedadora. En una realización, los métodos descritos en el presente documento comprenden además una etapa de purificar proteínas heteromultiméricas que tienen especificidad de unión por al menos dos dianas distintas. En una realización, no están presentes más de aproximadamente 10 %, 15 % o 20 % de polipéptidos aislados como monómeros o dímeros de cadena pesada-ligera antes de la etapa de purificación de las proteínas heteromultiméricas.

50 En una realización, el primer y/o segundo polipéptido que contiene bisagra es una cadena pesada de anticuerpo. En una realización adicional, la cadena pesada de anticuerpo se empareja con una cadena ligera de anticuerpo para proporcionar un par de cadenas pesada-ligera. En algunas realizaciones, el par de cadenas pesada-ligera está unido covalentemente. En otra realización, el par de cadenas pesada-ligera define una rama de unión a diana. En algunas realizaciones, las ramas de unión a diana son idénticas. En algunas realizaciones, las ramas de unión a diana reconocen cada una dos dianas distintas.

60 En algunas realizaciones, el primer y/o segundo polipéptido que contiene bisagra comprende una región Fc. En otra realización el primer y/o segundo polipéptido que contiene bisagra comprende al menos un dominio pesado constante. En otra realización, el primer y/o segundo polipéptido que contiene bisagra comprende un dominio de cadena pesada variable. En otra realización, el primer y/o segundo polipéptido que contiene bisagra comprende un dominio de unión a receptor. En algunas realizaciones, el primer y/o segundo polipéptido que contiene bisagra son sustancialmente idénticos (es decir, el dominio de heterodimerización puede no ser idéntico a las regiones fuera del dominio de heterodimerización que son idénticas). En algunas realizaciones, el primer y/o el segundo polipéptido

que contiene bisagra no son idénticos.

En algunas realizaciones, la proteína heteromultimérica se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo de una rama, anticuerpo monovalente monoespecífico, un anticuerpo monovalente multiespecífico, un maxicuerpo biespecífico, un monocuerpo, una inmunoadhesina, un pepticuerpo, un pepticuerpo biespecífico, un pepticuerpo monovalente, un anticuerpo y una proteína de fusión del receptor.

En algunas realizaciones, dichas proteínas heteromultiméricas comprenden una región bisagra que tiene al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o cualquier número entero hasta todos, de los restos de cisteína que normalmente son capaces de formar un enlace disulfuro entre cadenas pesadas. En algunas realizaciones, se han introducido cisteínas adicionales en la región bisagra.

Una proteína heteromultimérica descrita en el presente documento también puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como, por ejemplo, un Fc o polipéptido de fusión de Fc, siempre que comprenda la región bisagra de una inmunoglobulina. Un polipéptido de fusión de Fc generalmente comprende un polipéptido de Fc (o fragmento del mismo) fusionado con una secuencia polipeptídica heteróloga (tal como un dominio de unión a antígeno), tal como un dominio extracelular de receptor (ECD) fusionado con un polipéptido de Fc de inmunoglobulina (por ejemplo, ECD de receptor de Fit fusionado con un IgG2 Fc). Por ejemplo, en una realización, un polipéptido de fusión de Fc comprende un dominio de unión a VEGF, que puede ser un receptor de VEGF, que incluye fit, flk, etc. Una proteína heteromultimérica como se describe en el presente documento comprende en general un dominio constante de cadena pesada y un dominio constante de cadena ligera. En una realización, una proteína heteromultimérica como se describe en el presente documento comprende una modificación (por ejemplo, pero sin limitación, inserción de uno o más aminoácidos, por ejemplo, para formar una secuencia de dimerización tal como una cremallera de leucina) para la formación de dimerización o multimerización entre cadenas pesadas. En algunas realizaciones, está ausente una parte (pero no todo) del polipéptido Fc en un heteromultímero descrito en el presente documento, siempre que conserve la región bisagra de una inmunoglobulina. En algunas de estas realizaciones, la secuencia ausente del polipéptido de Fc es una parte de o todo el dominio CH₂ y/o CH₃. En algunas de estas realizaciones, la proteína heteromultimérica comprende un dominio de dimerización (tal como una secuencia de cremallera de leucina), por ejemplo fusionado con el extremo C terminal del fragmento de cadena pesada. En algunas de estas realizaciones, la proteína heteromultimérica comprende un dominio de dimerización que comprende mutaciones para proporcionar un dominio de dimerización de "botón en ojal" (como se define adicionalmente posteriormente).

En algunas realizaciones de los métodos y proteínas heteromultiméricas descritas en el presente documento, los polipéptidos que contienen bisagra comprenden al menos una característica que promueve la heterodimerización, mientras que minimiza la homodimerización, del primer y el segundo polipéptidos que contienen bisagra (por ejemplo, entre polipéptidos de Fc de las cadenas pesadas). Dicha característica o dichas características mejoran el rendimiento y/o la pureza y/o homogeneidad de las poblaciones de proteínas heteromultiméricas que pueden obtenerse por métodos como se describen en el presente documento. En una realización, los polipéptidos de Fc de un primer polipéptido que contiene bisagra y un segundo polipéptido que contiene bisagra se encuentran/interaccionan en una interfaz. En algunas realizaciones en las que los polipéptidos de Fc del primer y el segundo polipéptidos que contienen bisagra se encuentran en una interfaz, la interfaz del segundo polipéptido de Fc comprende una protuberancia que puede situarse en una cavidad en la interfaz del primer polipéptido de Fc. En una realización, el primer polipéptido de Fc se ha alterado a partir de un polipéptido molde/original para codificar la cavidad o el segundo polipéptido de Fc se ha alterado a partir de un polipéptido molde/original para codificar la protuberancia, o ambos. En una realización, el primer polipéptido de Fc se ha alterado a partir de un polipéptido molde/original para codificar la cavidad y el segundo polipéptido de Fc se ha alterado a partir de un polipéptido molde/original para codificar la protuberancia, o ambos. En una realización, la interfaz del segundo polipéptido de Fc comprende una protuberancia que puede situarse en una cavidad en la interfaz del primer polipéptido de Fc, en el que la cavidad o protuberancia, o ambos, se han introducido en la interfaz del primer y el segundo polipéptidos de Fc, respectivamente. En algunas realizaciones en las que el primer y el segundo polipéptidos de Fc se encuentran en una interfaz, la interfaz del primer polipéptido de Fc comprende una protuberancia que puede situarse en una cavidad en la interfaz del segundo polipéptido de Fc. En una realización, el segundo polipéptido de Fc se ha alterado a partir de un polipéptido molde/original para codificar la cavidad o el primer polipéptido de Fc se ha alterado a partir de un polipéptido molde/original para codificar la protuberancia, o ambos. En una realización, el segundo polipéptido de Fc se ha alterado a partir de un polipéptido molde/original para codificar la cavidad y el primer polipéptido de Fc se ha alterado a partir de un polipéptido molde/original para codificar la protuberancia, o ambos. En una realización, la interfaz del primer polipéptido de Fc comprende una protuberancia que puede situarse en una cavidad en la interfaz del segundo polipéptido de Fc, en el que la protuberancia o cavidad, o ambas, se han introducido en la interfaz del primer y segundo polipéptidos de Fc, respectivamente.

En una realización, la protuberancia y cavidad comprenden cada una un resto de aminoácido de origen natural. En una realización, el polipéptido de Fc que comprende la protuberancia se genera reemplazando un resto original de la interfaz de un polipéptido molde/original con un resto importado que tiene un mayor volumen de cadena lateral que el resto original. En una realización, el polipéptido de Fc que comprende la protuberancia se genera por un método que comprende una etapa en la que el ácido nucleico que codifica un resto original de la interfaz de dicho polipéptido

- se reemplaza con ácido nucleico que codifica un resto importado que tiene un volumen de cadena lateral mayor que el original. En una realización, el resto original es treonina. En una realización, el resto importado es arginina (R). En una realización, el resto importado es fenilalanina (F). En una realización, el resto importado es tirosina (Y). En una realización, el resto importado es triptófano (W). En una realización, el resto importado es R, F, Y o W. En una realización, se genera una protuberancia reemplazando dos o más restos en un polipéptido molde/original. En una realización, el polipéptido de Fc que comprende una protuberancia comprende reemplazo de treonina en la posición 366 con triptófano, numeración de aminoácidos de acuerdo con el esquema de numeración de EU de Kabat *et al.* (págs. 688-696 en *Sequences of proteins of immunological interest*, 5ª ed., Vol. 1 (1991; NIH, Bethesda, MD)).
- En algunas realizaciones, el polipéptido de Fc que comprende una cavidad se genera reemplazando un resto original en la interfaz de un polipéptido molde/original con un resto importado que tiene un volumen de cadena lateral menor que el resto original. Por ejemplo, el polipéptido de Fc que comprende la cavidad puede generarse por un método que comprende una etapa en la que el ácido nucleico que codifica un resto original de la interfaz de dicho polipéptido se reemplaza con ácido nucleico que codifica un resto importado que tiene un volumen de cadena lateral menor que el original. En una realización, el resto original es treonina. En una realización, el resto original es leucina. En una realización, el resto original es tirosina. En una realización, el resto importado no es cisteína (C). En una realización, el resto importado es alanina (A). En una realización, el resto importado es serina (S). En una realización, el resto importado es treonina (T). En una realización, el resto importado es valina (V). Puede generarse una cavidad reemplazando uno o más restos originales de un polipéptido molde/original. Por ejemplo, en una realización, el polipéptido de Fc que comprende una cavidad comprende reemplazo de dos o más aminoácidos originales seleccionados del grupo que consiste en treonina, leucina y tirosina. En una realización, el polipéptido de Fc que comprende una cavidad comprende dos o más restos importados seleccionados del grupo que consiste en alanina, serina, treonina y valina. En algunas realizaciones, el polipéptido de Fc que comprende una cavidad comprende reemplazo de dos o más aminoácidos originales seleccionados del grupo que consiste en treonina, leucina y tirosina y en el que dichos aminoácidos originales se reemplazan con restos importados seleccionados del grupo que consiste en alanina, serina, treonina y valina. En una realización, el polipéptido de Fc que comprende una cavidad comprende reemplazo de treonina en la posición 366 con serina, numeración de aminoácidos de acuerdo con el esquema de numeración de EU de Kabat *et al.*, mencionado anteriormente. En una realización, el polipéptido de Fc que comprende una cavidad comprende reemplazo de leucina en la posición 368 con alanina, numeración de aminoácidos de acuerdo con el esquema de numeración de EU de Kabat *et al.*, mencionado anteriormente. En una realización, el polipéptido de Fc que comprende una cavidad comprende reemplazo de tirosina en la posición 407 con valina, numeración de aminoácidos de acuerdo con el esquema de numeración de EU de Kabat *et al.*, mencionado anteriormente. En una realización, el polipéptido de Fc que comprende una cavidad comprende dos o más reemplazos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en T366S, L368A y Y407V, numeración de aminoácidos de acuerdo con el esquema de numeración de EU de Kabat *et al.*, mencionado anteriormente. En algunas realizaciones de estos fragmentos de anticuerpo, el polipéptido de Fc que comprende la protuberancia comprende reemplazo de treonina en la posición 366 con triptófano, numeración de aminoácidos de acuerdo con el esquema de numeración de EU de Kabat *et al.*, mencionado anteriormente.
- En diversas realizaciones, el polipéptido de Fc del primer y el segundo polipéptidos de cadena pesada pueden ser o no idénticos, siempre que sean capaces de dimerizar para formar una región de Fc (como se define en el presente documento). Un primer polipéptido de Fc está en general unido de forma contigua a uno o más dominios de una cadena pesada de inmunoglobulina en un único polipéptido, por ejemplo con secuencias de dominio bisagra, constante y/o variable. En una realización, el primer polipéptido de Fc comprende al menos una parte (incluyendo toda) de una secuencia bisagra, al menos una parte (incluyendo toda) de un dominio C_H2 y/o al menos una parte (incluyendo todo) de un dominio C_H3. En una realización, el primer polipéptido de Fc comprende la secuencia bisagra y los dominios C_H2 y C_H3 de una inmunoglobulina. En una realización, el segundo polipéptido de Fc comprende al menos una parte (incluyendo toda) de una secuencia bisagra, al menos una parte (incluyendo toda) de un dominio C_H2 y/o al menos una parte (incluyendo todo) de un dominio C_H3. En una realización, el segundo polipéptido de Fc comprende la secuencia bisagra y los dominios C_H2 y C_H3 de una inmunoglobulina. En una realización, un anticuerpo como se describe en el presente documento comprende primer y segundo polipéptidos de Fc cada uno de los cuales comprende al menos una parte del al menos un dominio constante de anticuerpo. En una realización, el dominio constante de anticuerpo es un dominio C_H2 y/o C_H3. En cualquiera de las realizaciones de un anticuerpo como se describe en el presente documento que comprende un dominio constante, el dominio constante de anticuerpo puede ser de cualquier clase de inmunoglobulina, por ejemplo una IgG. La fuente de inmunoglobulina puede ser de cualquier especie de origen adecuada (por ejemplo, una IgG puede ser IgG₁ humana) o de forma sintética.
- En una realización, un primer polipéptido de cadena ligera y un segundo polipéptido de cadena ligera en una primera y una segunda rama de unión de molécula diana, respectivamente, de un anticuerpo como se describe en la invención comprenden diferentes/distintos determinantes de unión a antígeno (por ejemplo, diferentes/distintas secuencias de dominio variable). En una realización, un primer polipéptido de cadena ligera y un segundo polipéptido de cadena ligera en una primera y una segunda rama de unión a molécula diana, respectivamente, de un anticuerpo como se describe en el presente documento comprenden el mismo (es decir, uno común) determinante de unión a antígeno, por ejemplo, la misma secuencia de dominio variable).

Los métodos descritos en el presente documento son capaces de generar moléculas heteromultiméricas con alta homogeneidad. En consecuencia, la divulgación proporciona métodos en los que al menos aproximadamente 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de polipéptidos están en un complejo que comprende un primer par de polipéptidos de cadena pesada y ligera y un segundo par de polipéptidos de cadena pesada y ligera. En una realización, la divulgación proporciona métodos en los que entre aproximadamente el 60 y el 99 %, el 70 y el 98 %, el 75 y el 97 %, el 80 y el 96 %, el 85 y el 96 %, o el 90 y el 95 % de los polipéptidos están en un complejo que comprende un primer par de polipéptidos de cadena pesada y ligera y un segundo par de polipéptidos de cadena pesada y ligera.

En una realización, un anticuerpo como se describe en el presente documento se selecciona del grupo que consiste en IgG, IgE, IgA, IgM e IgD. En algunas realizaciones, la región bisagra de un anticuerpo como se describe en el presente documento es preferentemente de una inmunoglobulina seleccionada del grupo que consiste en IgG, IgA e IgD. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una región de anticuerpo o bisagra de un anticuerpo es de IgG, que en algunas realizaciones es IgG1 o IgG2 (por ejemplo, IgG2a o IgG2b). En algunas realizaciones, un anticuerpo como se describe en el presente documento se selecciona del grupo que consiste en IgG, IgA e IgD. En una realización, el anticuerpo es de origen humano, humanizado, quimérico o no humano (por ejemplo, murino).

Proteínas heteromultiméricas como se describe en el presente documento son en general capaces de unirse, preferentemente de forma específica, con antígenos. Dichos antígenos incluyen, por ejemplo, antígenos tumorales, factores reguladores de la supervivencia celular, factores reguladores de la proliferación celular, moléculas asociadas con (por ejemplo, que se sabe o se sospecha que contribuyen funcionalmente a) el desarrollo o la diferenciación tisular, moléculas de superficie celular, linfocinas, citocinas, moléculas implicadas en la regulación del ciclo celular, moléculas implicadas en la vasculogénesis y moléculas asociadas con (por ejemplo, que se sabe o se sospecha que contribuyen funcionalmente a) la angiogénesis. Un antígeno con el que una proteína heteromultimérica, como se describe en el presente documento, es capaz de unirse puede ser un miembro de un subconjunto de una de las categorías anteriormente mencionadas, en el que el otro o los otros subconjuntos de dicha categoría comprenden otras moléculas/antígenos que tienen una característica definida (con respecto al antígeno de interés). También puede considerarse que un antígeno de interés pertenece a dos o más categorías. En una realización, la divulgación proporciona una proteína heteromultimérica que se une, preferentemente de forma específica, con un antígeno tumoral que no es una molécula de superficie celular. En una realización, un antígeno tumoral es una molécula de superficie celular, tal como un polipéptido receptor. En otro ejemplo, en algunas realizaciones, una proteína heteromultimérica, como se describe en el presente documento se une, preferentemente de forma específica, con un antígeno tumoral que no es un factor de diferenciación de grupos. En otro ejemplo, una proteína heteromultimérica como se describe en el presente documento es capaz de unirse, preferentemente de forma específica, con un factor de diferenciación de grupos, que en algunas realizaciones, por ejemplo, no es CD3 o CD4. En algunas realizaciones, una proteína heteromultimérica como se describe en el presente documento es un anticuerpo anti VEGF. En algunas realizaciones, una proteína heteromultimérica como se describe en el presente documento es un anticuerpo biespecífico seleccionado del grupo que consiste en IL-1alfa/IL-1beta, IL-12/IL-18; IL-13/IL-9; IL-13/IL-4; IL-13/IL-5; IL-5/IL-4; IL-13/IL-1beta; IL-13/IL-25; IL-13/TARC; IL-13/MDC; IL-13/MEF; IL-13/TGF- β agonista de LHR; IL-12/TWEAK, IL-13/CL25; IL-13/SPRR2a; IL-13/SPRR2b; IL-13/ADAM8, IL-13/PED2, IL17A/IL17F, CD3/CD19, CD138/CD20; CD138/CD40; CD19/CD20; CD20/CD3; CD38/CD138; CD38/CD20; CD38/CD40; CD40/CD20; CD-8/IL-6; CD20/BR3, TNFalfa/TGF-beta, TNFalfa/IL-1 beta; TNFalfa/IL-2, TNFalfa/IL-3, TNFalfa/IL-4, TNFalfa/IL-5, TNFalfa/IL6, TNFalfa/IL8, TNFalfa/IL9, TNFalfa/IL10, TNFalfa/IL-12, TNFalfa/IL-12, TNFalfa/IL-12, TNFalfa/IL-12, TNFalfa/IL-13, TNFalfa/IL-14, TNFalfa/IL-15, TNFalfa/IL-20, TNFalfa/IL-23, TNFalfa/IFNalfa, TNFalfa/CD4, TNFalfa/VEGF, TNFalfa/MIF, TNFalfa/ICAM-1, TNFalfa/PGE4, TNFalfa/PEG2, TNFalfa/ligando RANK, TNFalfa/Te38; TNFalfa/BAFF; TNFalfa/CD22; TNFalfa/CTLA-4; TNFalfa/GP130; TNFalfa/IL-12p40; VEGF-A/HER2, VEGF-A/HER2, VEGF-A/PDGF, HER1/HER2, VEGF-A/VEGF-C, VEGF-C/VEGF-D, HER2/DR5, VEGF/MET, VEGFR/receptor MET, VEG-FR/EGFR, HER2/CD64, HER2/CD3, HER2/CD16, HER2/HER3; EGFR/HER2, EGFR/HER3, EGFR/HER4, IL-13/CD40L, IL4/CD40L, TNFR1/IL-1R, TNFR1/IL-6R, TNFR1/IL-18R, EpCAM/CD3, MAPG/CD28, EGFR/CD64, CSPGs/RGM A; CTLA-4/BTNO2; IGF1/IGF2; IGF1/2/Erb2B; MAG/RGM A; NgR/RGM A; NogoA/RGM A; OMGp/RGM A; PDL-I/CTLA-4; Y RGM A/RGM B, IL1 β /IL18, NRP1/VEGFA, VEGFA/NRP2, cMET/EGFR, ALK1/BMP9, VEG-FA/ α 5 β 1, HER1/HER3-BU y CMV. En algunas realizaciones, una proteína heteromultimérica como se describe en el presente documento se une con al menos dos moléculas diana seleccionadas del grupo que consiste en: α 5 β 1, ALK1, BMP9, IL-1alfa, IL-1beta, TARC, MDC, MEF, TGF- β , agonista LHR CD3, CD4, CD16, CD3, CD4, CD16, CD3, CD4, CD16, CD28, CD40, CD38, CD64, CD138, CD-8, BR3, TNFalfa, TGF-beta, IL-11, IL-12, IL-13, IL-11, IL-10, IL-11, IL-3, I L-4, I L-5, IL-17, IL-17, IL-17, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-23, IL-25, IFNalfa, MIF, ICAM-1, PGE4, PEG2, ligando RANK, Te38, BAFF, CTLA-4, GP130, IL-12p40, VEGF, VEGF-A, PDGF, HER1, HER2, HER3, HER3-BU, HER4, VEGF-C, VEGF-D, DR5, CMET, MET, receptor de MET, VEGFR, EGFR, CD40L, TNFR1, IL-1R, IL-6R, IL-18R, EpCAM, MAPG, CSPGs, BTNO2, IGF1, IGF2, IGF1/2, Erb2B, MAG, NgR, NRP1, NRP2, OMGp, PDL-I, RGM A y RGM B. En algunas realizaciones, una proteína heteromultimérica como se describe en el presente documento se une con CD3 y al menos una molécula diana adicional seleccionada de BLR1, BR3, CD19, CD20, CD22, CD72, CD79A, CD79B, CD180 (RP105), CR2, FcRH1, FcRH2, FcRH5, FCER2, FCRL4, HLA-DOB y NAG14.

Las primera y segunda células hospedadoras en métodos de la invención pueden cultivarse en cualquier situación que permita la expresión y el aislamiento de los polipéptidos de interés. Por ejemplo, en una realización, la primera

célula hospedadora y la segunda célula hospedadora en un método de la invención se cultivan como cultivos celulares distintos. En otra realización, la primera célula hospedadora y la segunda célula hospedadora en un método de la invención se cultivan como un cultivo mixto que comprende ambas células hospedadoras.

5 En algunas realizaciones, al menos una, al menos dos, al menos tres o más células hospedadoras que expresan polipéptidos que contienen bisagra adicionales pueden cultivarse bien en el mismo cultivo o bien en distintos cultivos como la primera y/o la segunda células hospedadoras que contienen bisagra. En algunas realizaciones, el polipéptido o los polipéptidos que contienen bisagras adicionales comprenden el mismo dominio de heterodimerización que el primer polipéptido que contiene bisagra. En algunas realizaciones, el polipéptido o los polipéptidos que contiene bisagras adicionales comprenden el mismo dominio de heterodimerización que el segundo polipéptido que contiene bisagra.

15 Las proteínas heteromultiméricas pueden modificarse para potenciar y/o añadir características deseadas adicionales. Dichas características incluyen funciones biológicas tales como funciones efectoras inmunitarias, una semivida/eliminación *in vivo* deseable, biodisponibilidad, biodistribución u otras características farmacocinéticas. Dichas modificaciones se conocen bien en la técnica y también pueden determinarse empíricamente, y pueden incluir modificaciones por restos que pueden estar o no basados en péptidos. Por ejemplo, los anticuerpos pueden estar glucosilados o aglucosilados, generalmente dependiendo al menos en parte de la naturaleza de la célula hospedadora. Preferentemente, los anticuerpos como se describen en el presente documento están aglucosilados.

20 Un anticuerpo aglucosilado producido por un método de la invención puede posteriormente glucosilarse, por ejemplo, usando métodos de glucosilación *in vitro* bien conocidos en la técnica. Como se ha descrito anteriormente y en el presente documento, pueden producirse proteínas heteromultiméricas como se describe en el presente documento en una célula procarionota, tal como, por ejemplo, *E. coli*. Las proteínas heteromultiméricas producidas por *E. coli* en general están aglucosiladas y carecen de las funciones biológicas normalmente asociadas con perfiles de glucosilación hallados en proteínas heteromultiméricas producidas por células hospedadoras de mamífero (por ejemplo, CHO).

30 La divulgación también proporciona inmunoconjugados que comprenden una proteína heteromultimérica como se describe en el presente documento conjugada con un resto heterólogo. Cualquier resto heterólogo sería adecuado siempre que su conjugación con el anticuerpo no reduzca sustancialmente una función y/o característica deseada del anticuerpo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un inmunoconjugado comprende un resto heterólogo que es un agente citotóxico. En algunas realizaciones, dicho agente citotóxico se selecciona del grupo que consiste en un isótopo radiactivo, un agente quimioterapéutico y una toxina. En algunas realizaciones, dicha toxina se selecciona del grupo que consiste en calicheamicina, maitansina y tricoteno. En algunas realizaciones, un inmunoconjugado comprende un resto heterólogo que es un marcador detectable. En algunas realizaciones, dicho marcador detectable se selecciona del grupo que consiste en un isótopo radiactivo, un miembro de un par de ligando-receptor, un miembro de un par de enzima-sustrato y un miembro de un par de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia.

40 En un aspecto, la divulgación proporciona composiciones que comprenden una proteína heteromultimérica de la invención y un vehículo, que en algunas realizaciones es farmacéuticamente aceptable.

45 En otro aspecto, la divulgación proporciona composiciones que comprenden un inmunoconjugado como se describe en el presente documento y un vehículo, que en algunas realizaciones es farmacéuticamente aceptable.

50 En un aspecto, la divulgación proporciona una composición que comprende una población de proteínas heteromultiméricas multiespecíficas como se describe en el presente documento. Como resultaría evidente para un experto en la materia, en general dicha composición no sería completamente (es decir, 100 %) homogénea. Sin embargo, como se describe en el presente documento, los métodos de la invención son capaces de producir una población sustancialmente homogénea de proteínas heteromultiméricas multiespecíficas. Por ejemplo, la divulgación proporciona una composición que comprende proteínas heteromultiméricas, en las que al menos 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de dichas proteínas heteromultiméricas son un anticuerpo multiespecífico (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico, etc.) como se describe en el presente documento.

55 En un aspecto, la divulgación proporciona un cultivo celular que comprende una mezcla de una primera célula hospedadora y una segunda célula hospedadora, en la que la primera célula hospedadora comprende ácido nucleico que codifica un primer polipéptido que contiene bisagra, y la segunda célula hospedadora comprende ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido que contiene bisagra, y en la que los dos pares tienen diferentes especificidades de unión a diana. En un aspecto, la divulgación proporciona un cultivo celular que comprende una mezcla de una primera célula hospedadora y una segunda célula hospedadora, en la que la primera célula hospedadora expresa un primer par de polipéptidos de cadena pesada y ligera, y la segunda célula hospedadora expresa un segundo par de polipéptidos de cadena pesada y ligera, y en la que los dos pares tienen diferentes especificidades de unión a diana.

65 En otro aspecto, la divulgación proporciona artículos de fabricación que comprenden un recipiente y una

composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende una proteína heteromultimérica (por ejemplo, un anticuerpo) de la invención. En otro aspecto, la divulgación proporciona artículos de fabricación que comprenden un recipiente y una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un inmunocombinado como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, estos artículos de fabricación comprenden además instrucciones para usar dicha composición.

En otro aspecto más, la divulgación proporciona polinucleótidos que codifican una proteína heteromultimérica como se describe en el presente documento. En otra realización más, la divulgación proporciona polinucleótidos que codifican un inmunocombinado como se describe en el presente documento.

En un aspecto, la divulgación proporciona vectores recombinantes para expresar una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) como se describe en el presente documento. En otro aspecto, la divulgación proporciona vectores recombinantes para expresar un inmunocombinado como se describe en el presente documento.

Puede usarse cualquiera de varias células hospedadoras en métodos de la invención. Dichas células se conocen en la técnica (algunas de las cuales se describen en el presente documento) o pueden determinarse empíricamente con respecto a conveniencia para uso en métodos de la invención usando técnicas rutinarias conocidas en este campo. En una realización, una célula hospedadora es procariota. En algunas realizaciones, una célula hospedadora es una célula bacteriana gram negativa. En una realización, una célula hospedadora es *E. coli*. En algunas realizaciones, la *E. coli* es de una cepa deficiente en lipoproteína (Δ lpp). En algunas realizaciones, el genotipo de una célula hospedadora *E. coli* carece de genes *degP* y *prc* y alberga un gen de *spr* mutante. En una realización, una célula hospedadora es de mamífero, por ejemplo, una célula de Ovario de Hámster Chino (CHO).

En un aspecto, la divulgación proporciona células hospedadoras que comprenden un polinucleótido o vector recombinante como se describe en el presente documento. En una realización, una célula hospedadora es una célula de mamífero, por ejemplo una célula de Ovario de Hámster Chino (CHO). En una realización, una célula hospedadora es una célula procariota. En algunas realizaciones, una célula hospedadora es una célula bacteriana gram negativa, que en algunas realizaciones es *E. coli*. Las células hospedadoras como se describen en el presente documento pueden comprender además un polinucleótido o vector recombinante que codifica una molécula cuya expresión en una célula hospedadora potencia la producción de una proteína heteromultimérica en un método de la invención. Por ejemplo, dicha molécula puede ser una proteína chaperona. En una realización, dicha molécula es un polipéptido procariota seleccionado del grupo que consiste en DsbA, DsbC, DsbG y FkpA. En algunas realizaciones, dicho polinucleótido o vectores recombinantes codifica tanto DsbA como DsbC. En algunas realizaciones, una célula hospedadora *E. coli* es de una cepa deficiente en actividades proteasa endógenas. En algunas realizaciones, el genotipo de una célula hospedadora *E. coli* es el de una cepa de *E. coli* que carece de genes de *degP* y *prc* y alberga un gen de *spr* mutante. En algunas realizaciones, el genotipo de una célula hospedadora *E. coli* es Δ lpp.

Las proteínas heteromultiméricas como se describen en el presente documento encuentran una diversidad de usos en una diversidad de situaciones. En un ejemplo, una proteína heteromultimérica como se describe en el presente documento es un anticuerpo terapéutico. En otro ejemplo, una proteína heteromultimérica como se describe en el presente documento es un anticuerpo agonista. En otro ejemplo, una proteína heteromultimérica como se describe en el presente documento es un anticuerpo antagonista. Una proteína heteromultimérica como se describe en el presente documento también puede ser un anticuerpo de diagnóstico. En otro ejemplo más, una proteína heteromultimérica como se describe en el presente documento es un anticuerpo de bloqueo. En otro ejemplo, una proteína heteromultimérica como se describe en el presente documento es un anticuerpo neutralizante.

En un aspecto, la divulgación proporciona métodos para tratar o retardar una enfermedad en un sujeto, comprendiendo dichos métodos administrar una proteína heteromultimérica como se describe en el presente documento a dicho sujeto. En una realización, la enfermedad es cáncer. En otra realización, la enfermedad está asociada con la desregulación de la angiogénesis. En otra realización, la enfermedad es un trastorno inmunitario, tal como artritis reumatoide, púrpura trombocitopénica inmunitaria, lupus eritematoso sistémico, etc.

En un aspecto, la divulgación proporciona uso de una proteína heteromultimérica (por ejemplo, un anticuerpo) como se describe en el presente documento en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un cáncer, un tumor, un trastorno proliferativo celular, un trastorno inmunitario (tal como autoinmunitario) y/o un trastorno relacionado con angiogénesis.

En un aspecto, la divulgación proporciona el uso de un ácido nucleico de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un cáncer, un tumor, un trastorno proliferativo celular, un trastorno inmunitario (tal como autoinmunitario) y/o un trastorno relacionado con angiogénesis.

En un aspecto, la divulgación proporciona uso de un vector de expresión de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un cáncer, un tumor, un trastorno proliferativo celular, un trastorno inmunitario (tal como autoinmunitario) y/o un trastorno relacionado con angiogénesis.

En un aspecto, la divulgación proporciona uso de una célula hospedadora de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un cáncer, un tumor, un trastorno proliferativo celular, un trastorno inmunitario (tal como autoinmunitario) y/o un trastorno relacionado con angiogénesis.

5 En un aspecto, la divulgación proporciona uso de un artículo de fabricación de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un cáncer, un tumor, una enfermedad proliferativa celular, un trastorno inmunitario (tal como autoinmunitario) y/o un trastorno relacionado con angiogénesis.

10 En un aspecto, la divulgación proporciona uso de un kit de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un cáncer, un tumor, un trastorno proliferativo celular, un trastorno inmunitario (tal como autoinmunitario) y/o un trastorno relacionado con angiogénesis.

15 Otros objetos, elementos y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Debe entenderse, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones preferidas de la invención, se proporcionan solamente como ilustración, ya que diversos cambios y modificaciones resultarán evidentes para un experto en la materia a partir de esta descripción detallada.

20 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1A ilustra un semianticuerpo completamente oxidado. No se muestran los dominios de "botón" u "ojal" u otro de heterodimerización. El semianticuerpo representado en esta figura es un isotipo IgG1. Un experto en la materia apreciará que los otros isotipos de inmunoglobulina pueden preverse como semianticuerpos con los enlaces inter e intracatenarios correspondientes. En un Ab intacto las cisteínas de bisagra formarán enlaces disulfuro intercatenarios.

La Figura 1B ilustra un anticuerpo biespecífico de longitud completa. No se representan los enlaces disulfuro entre cadenas pesadas en la región bisagra.

La Figura 2A y B ilustra plásmidos que codifican los semianticuerpos de botón y ojal, respectivamente.

30 La Figura 3A ilustra la producción de proteínas heteromultiméricas, por ejemplo, anticuerpos biespecíficos, usando el método de cadena ligera común. El BsAb producido tiene dos cadenas pesadas diferentes emparejándose cada una con una cadena ligera común.

La Figura 3B ilustra la producción de proteínas heteromultiméricas, por ejemplo, anticuerpos biespecíficos, usando semianticuerpos expresados y modificados técnicamente por separado. El BsAb producido típicamente tiene dos cadenas pesadas diferentes, cada una emparejada con su cadena ligera afín. En este método cada cadena ligera no es necesariamente igual para cada semianticuerpo.

La Figura 4A es un diagrama de flujo para la producción de anticuerpos biespecíficos usando semianticuerpos expresados y modificados técnicamente por separado. En este método, se usa química redox.

La Figura 4B muestra un gel teñido con Coomassie. Los dos semianticuerpos se analizaron en condiciones reductoras y no reductoras mediante SDS-PAGE. La fracción predominante es el par de cadena pesada-cadena ligera de 75 kD para cada semianticuerpo en condiciones no reductoras. En condiciones reductoras (por ejemplo, tratamiento con DTT) cada cadena es visible como una banda separada.

La Figura 4C muestra los resultados de la espectrometría de masas de ESI-TOF de un semianticuerpo con y sin tratamiento con N-etilmaleimida (NEM) 1 mM. No se observa ningún cambio en la masa del semianticuerpo tras el tratamiento con NEM lo que indica que todas las cisteínas están completamente oxidadas. Las cisteínas de bisagra oxidadas se representan como un disulfuro cíclico en la secuencia de aminoácidos representada. La masa esperada para el semianticuerpo es de 72.548 Dalton, que es lo que se observa mediante espectrometría de masas lo que indica que no hay aductos covalentes.

La Figura 4D muestra el cromatograma de carboximetilo (CM), una fotografía de un gel de SDS-PAGE y la masa desconvolucionada para la producción de un anticuerpo biespecífico anti EGFR/anti c-met. La cromatografía de CM produce un único pico que se analiza posteriormente mediante SDS-PAGE. La banda principal en el gel es el anticuerpo biespecífico de longitud completa (es decir, intacto). También puede verse una banda menor en el intervalo de 75 kD. La banda mayor se analizó posteriormente mediante espectrometría de masas e indicó que el único producto de anticuerpo intacto detectable estaba de acuerdo con la PM teórica de un anticuerpo biespecífico anti EGFR/anti c-met.

La Figura 5A es un diagrama de flujo para la producción a gran escala de anticuerpos biespecíficos usando semianticuerpos expresados y modificados técnicamente por separado.

La Figura 5B es una fotografía de un gel que muestra que los semianticuerpos purificados eran principalmente la especie de ~75 kD en condiciones no reductoras. En condiciones reductoras (por ejemplo, tratamiento con DTT) cada cadena es visible como una banda separada.

La Figura 5C muestra los resultados del análisis de SDS-PAGE del biespecífico purificado después de retirada de agregados que indican que la especie principal es el anticuerpo biespecífico intacto a 150 kD. También se muestran las mismas muestras en condiciones reductoras lo que indica que todo el producto aislado es una cadena de anticuerpo ligera o pesada.

La Figura 6A es una gráfica que muestra la actividad biológica de los anticuerpos en un ensayo de proliferación de células TF-2 que ensaya la neutralización de las citocinas IL-4 e IL-13. La gráfica muestra que el biespecífico

posee actividad similar a los dos anticuerpos de longitud completa, producidos por mamíferos, añadidos juntos o por separado.

La Figura 6B es un panel de tres gráficas que muestran las propiedades farmacocinéticas (PK) de un anticuerpo biespecífico anti IL-4/anti IL-13 en monos cinomolgus para el Fc de tipo silvestre y un Fc mutado como se determina por ELISA. La primera gráfica muestra las propiedades PK a una dosis de 2 mg/kg para el Fc de tipo silvestre. La gráfica media muestra las propiedades PK a una dosis de 20 mg/kg, también para el Fc de tipo silvestre. La gráfica final muestra las propiedades PK a una dosis de 20 mg/kg para el Fc mutado. El biespecífico muestra las dos eliminaciones de compartimento esperadas en los animales ensayados. Las hembras están representadas por símbolos cerrados y los machos están representados por símbolos abiertos. En tres animales, se vio una respuesta antiterapéutica como se indica por la reducción aguda en el anticuerpo medido en el suero el día 21.

La Figura 7 es una fotografía de un gel de poliacrilamida. Se mezcló caldo de cultivo de fermentación completo antes de la lisis a diversas relaciones. Después se extrajo proteína de lisis y se cargó en el gel en condiciones no reductoras. Son visibles biespecíficos purificados formados durante este procedimiento como la banda superior en el gel.

La Figura 8A es una fotografía de dos geles de poliacrilamida que comparan la producción de anticuerpos biespecíficos cuando las células se cultivan por separado con un cocultivo de las células que expresan los semianticuerpos. El biespecífico intacto se forma en un nivel mucho mayor en condiciones de cocultivo. Cuando los semianticuerpos se expresan y se purifican de forma independiente, y después se mezclan, los semianticuerpos forman menos del 5 % del biespecífico intacto. En condiciones de cocultivo, más del 40 % es un biespecífico intacto como se determina por 150 kD/(150 kD + 75 kD) usando determinaciones de proteína de núcleo-Li.

La Figura 8B es un esquema de un experimento de cocultivo que varía la población celular del inóculo inicial. Las relaciones usadas y la cantidad relativa de biespecífico de longitud completa se muestran en la parte de abajo de la figura.

La Figura 8C es una fotografía de un gel para tres procesamientos de fermentación de 10 litros separados de una relación celular 1:1 de anti EGFR y anti c-Met. Cada procesamiento produjo como el producto principal el biespecífico de longitud completa lo que indica la reproducibilidad del proceso.

La Figura 8D es un diagrama de flujo del proceso de cocultivo para la producción de proteínas heteromultiméricas, por ejemplo anticuerpos biespecíficos.

La Figura 8E es un cromatograma de la absorbancia de UV a 280 nm que identifica dos picos significativos en tiempos de retención de 91,79 y 102,35. El análisis posterior por espectrometría de masas indicó que el anticuerpo biespecífico intacto se separaba eficazmente del semianticuerpo en exceso.

La Figura 8F muestra el análisis del Pico 91,79 de la Figura 8E mediante SDS-PAGE y espectrometría de masas. La desconvolución de los datos de espectrometría de masas produjo un único pico en 146.051,89 Dalton, que está de acuerdo con la masa esperada del anticuerpo biespecífico. No se detectaron especies homodiméricas contaminantes.

La Figura 8G es una comparación de los flujos de trabajo para producción independiente y producción de cocultivo de proteínas heteromultiméricas.

La Figura 9A muestra tres cromatogramas. El cromatograma superior no muestra ningún pico de absorbancia durante la elución para la muestra sin EDTA. El cromatograma medio muestra que la muestra con EDTA tiene un pico de elución distinto del que se recuperaron aproximadamente 1,5 mg de proteína. El cromatograma inferior muestra que la muestra tratada con EDTA y Mg también mostraba un pico de elución similar del que se recuperaron 1,1 mg de proteína. Las proteínas recuperadas de la muestra de EDTA, muestra de EDTA más Mg y un grupo de fracciones del mismo tiempo de retención de la muestra de EDTA no tratada se analizaron mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras.

La Figura 9B es una fotografía del gel de SDS-PAGE descrito en la Figura 9A. Las muestras tratadas con EDTA han producido anticuerpo biespecífico intacto que se ha liberado al medio de cultivo.

La Figura 9C-1, Figura 9C-2 y Figura 9C-3 muestran los cromatogramas de espectrometría de masas para las muestras recuperadas y descritas en la Figura 9A. Las muestras con el EDTA mostraron la masa esperada para el anticuerpo biespecífico y una masa para el semianticuerpo en exceso.

La Figura 9D es una fotografía de un gel de SDS-PAGE y cromatogramas de masas de las bandas indicadas. El Carril 1 es marcadores de PM, el Carril 2 es anti IL-13 expresado de forma independiente, el Carril 3 es anti IL-4 expresado de forma independiente y el Carril 4 es un cocultivo de las dos células. El análisis de espectrometría de masas de las tres muestras muestra que el cocultivo produce el biespecífico intacto y un exceso de un semianticuerpo, anti IL-4. Esto indica que el semianticuerpo anti IL-13 es estequiométricamente limitante. Cuando se expresan y se purifican de forma independiente semianticuerpos, y después se mezclan, los semianticuerpos forman aproximadamente 2 % (anti IL-13) y 3 % (anti IL-4) del biespecífico intacto. En condiciones de cocultivo, aproximadamente 60 % es un biespecífico intacto como se determina por 150 kD/(150 kD + 75 kD) usando determinaciones de proteína de Núcleo Li.

La Figura 9E-1 y Figura 9E-2 muestran dos cromatogramas de HIC para dos cocultivos que tenían diferentes relaciones celulares en el inóculo de fermentación inicial como se indica. Se observa una clara diferencia en el producto que refleja la relación de inóculo inicial. Usando este enfoque resulta evidente que la relación de inóculo inicial puede alterarse para conseguir producción óptima de la proteína heteromultimérica.

La Figura 9F es un panel de cuatro fotografías que muestran el análisis de SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras de ocho anticuerpos biespecíficos diferentes producidos por el proceso de cocultivo

descrito en el presente documento. Los geles no reductores para las proteínas heteromultiméricas anti CD3/anti CD19 no se muestran. Las flechas indican los anticuerpos biespecíficos intactos.

La Figura 10 es un esquema de un enfoque de matriz para explorar proteínas heteromultiméricas.

5 La Figura 11 muestra dos gráficas para actividad *in vitro* de anticuerpos biespecíficos producidos usando los métodos descritos en el presente documento.

La Figura 12 es una gráfica que muestra que el biespecífico anti EGFR/anti c-met posee actividad antitumoral en un modelo *in vivo* de xenoinjerto pancreático KP4.

La Figura 13 es una gráfica que muestra que el biespecífico anti EGFR/anti c-met posee actividad antitumoral en un modelo *in vivo* de xenoinjerto de carcinoma epidermoide A431.

10 La Figura 14 muestra el HIC de A) preensamblaje de botón, B) preensamblaje de ojal, C) post ensamblaje biespecífico. La Figura 14D es un gel de preensamblaje de cada rama.

La Figura 15 muestra un electroforetograma de material ensamblado que indica que el 86 % del material está completamente oxidado.

15 Figura 16: caracterización de biespecífico de ensamblado A) cromatograma de HIC de biespecífico hibridado indica que el material es >90,5 por ciento biespecífico, B) gel de material purificado, C) desconvolución de espectrometría de masas de la muestra final y D) tabla de masas teóricas.

20 La Figura 17 es un esquema del procedimiento redox (con calor): a) la muestra se calienta durante una hora para permitir la ciclación de enlaces disulfuro, b) después se enfría y las cisteínas se reducen usando DTT 2 mM durante dos horas, y c) después se concentran y las cisteínas se oxidan al aire por diálisis a temperatura ambiente.

La Figura 18 es un esquema de procedimiento redox (sin calor): a) la muestra se mezcla durante dos horas, b) las cisteínas se reducen usando DTT 2 mM durante dos horas y c) después se concentran y las cisteínas se oxidan al aire mientras que se retira EDTA por diálisis a temperatura ambiente.

25 Figura 19: analítica de biespecífico ensamblado A) cromatograma de HIC usando procedimiento de redox con etapa de calentamiento, B) cromatograma de HIC usando procedimiento redox sin etapa de calentamiento.

Abreviaturas

30 ADCC = Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo

API = Inmuno adhesinas anti patógenos

BPI = Proteína que aumenta la permeabilidad/bactericida

C1q = Factor de complemento 1q

CD = Grupo de Diferenciación

35 CDC = Citotoxicidad dependiente del complemento

CH1 o C_{H1} = Primer dominio constante de cadena pesada

CH2 o C_{H2} = Segundo dominio constante de cadena pesada

CH3 o C_{H3} = Tercer dominio constante de cadena pesada

CH4 o C_{H4} = Cuarto dominio constante de cadena pesada

40 CL o C_L = Dominio constante de cadena ligera

CTLA = Molécula asociada a linfocito T citotóxico

Fc = Fragmento cristalizante

Fc(R) = Receptor gamma para la parte Fc de IgG

VIH = Virus de la inmunodeficiencia humana

ICAM = Molécula de adhesión intercelular

45 BsAb = Anticuerpo biespecífico

BsDb = Diacuerpo biespecífico

dsFv = Fv estabilizado por disulfuro

Fc = Fragmento constante de un anticuerpo

Fd = V_H + C_{H1} de un anticuerpo

50 FcR = Receptor de Fc

Fv = Fragmento variable de un anticuerpo

IgG = Inmunoglobulina G

mAb = Anticuerpo monoclonal

PBL = Linfocito de sangre periférica

55 scDb = Diacuerpo monocatenario

scFv = Fv monocatenario

(scFv)₂ = Tándem de scFv-scFv

Tandab = Diacuerpo en tándem

VH o V_H = Dominio variable de la cadena pesada de un anticuerpo

60 VL o V_L = Dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo

Descripción detallada

La invención se describirá ahora en detalle por medio de referencia solamente usando las siguientes definiciones y ejemplos.

5 A no ser que se defina de otro modo en el presente documento, todos los términos técnicos y científicos en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Singleton, *et al.*, DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY, 2ª ED., John Wiley and Sons, Nueva York (1994) y Hale y Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY, Harper Perennial, NY (1991) proporcionan a los expertos en la materia un diccionario general de muchos de los términos usados en la presente invención. Aunque puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento en la práctica o el ensayo de la presente invención, los métodos y materiales preferidos se describen. Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. A no ser que se indique de otro modo, los ácidos nucleicos se escriben de izquierda a derecha en orientación de 5' a 3'; las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en orientación de amino a carboxilo, respectivamente. Los practicantes se dirigen particularmente a Sambrook *et al.*, 1989 y Ausubel *et al.*, 1993, para definiciones y términos de la técnica. Debe entenderse que la presente invención no está limitada a la metodología, los protocolos y los reactivos particulares descritos, ya que estos pueden variar.

20 Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo.

A no ser que se indique de otro modo, los ácidos nucleicos se escriben de izquierda a derecha en orientación de 5' a 3'; las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en orientación de amino a carboxilo, respectivamente.

25 Los encabezamientos proporcionados en el presente documento no son limitaciones de los diversos aspectos o realizaciones de la invención que pueden tenerse por referencia a la memoria descriptiva en su conjunto. En consecuencia, los términos definidos inmediatamente a continuación se definen más completamente por referencia a la memoria descriptiva en su conjunto.

30 I. Definiciones

Un "heteromultímero", "complejo heteromultimérico" o "proteína heteromultimérica" se refiere a una molécula que comprende al menos un primer polipéptido que contiene bisagra y un segundo polipéptido que contiene bisagra, en el que el segundo polipéptido que contiene bisagra difiere en su secuencia de aminoácidos del primer polipéptido que contiene bisagra en al menos un resto de aminoácido. El heteromultímero puede comprender un "heterodímero" formado por el primer y el segundo polipéptidos que contienen bisagra o pueden formar estructuras terciarias de mayor orden en las que están presentes polipéptidos además del primer y el segundo polipéptidos que contienen bisagra. Los polipéptidos del heteromultímero pueden interactuar entre sí por un enlace covalente, no peptídico (por ejemplo, enlace disulfuro) y/o una interacción no covalente (por ejemplo, enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos, fuerzas de van der Waals y/o interacciones hidrófobas).

45 Como se usa en el presente documento, "dominio de heteromultimerización" se refiere a alteraciones o adiciones a una molécula biológica para promover la formación de heteromultímeros y obstaculizar la formación de homomultímeros. Cualquier dominio de heterodimerización que tenga una fuerte preferencia por formar heterodímeros frente a homodímeros está dentro del alcance de la invención. Los ejemplos ilustrativos incluyen pero sin limitación, por ejemplo Solicitud de Patente de Estados Unidos 20030078385 (Arathoon *et al.* - Genentech; que describe botones en ojales); documento WO2007147901 (Kjærgaard *et al.* - Novo Nordisk; que describe interacciones iónicas); documento WO 2009089004 (Kannan *et al.* - Amgen; que describe efectos de dirección electrostática); Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos 61/243.105 (Christensen *et al.* - Genentech; que describe superenrollamientos). Véase también, por ejemplo, Pack, P. & Plückthun, A., Biochemistry 31, 1579-1584 (1992) que describe cremallera de leucina o Pack *et al.*, Bio/Technology 11, 1271-1277 (1993) que describe el motivo de hélice - vuelta - hélice. La expresión "dominio de heteromultimerización" y "dominio de heterodimerización" se usan indistintamente en el presente documento.

55 La expresión "polipéptido que contiene bisagra" como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido que comprende una región correspondiente a la región bisagra de una inmunoglobulina como se entiende en la técnica, por ejemplo, la región entre los dominios C_H1 y C_H2 de la cadena pesada. La "región bisagra", "secuencia bisagra" y variaciones de las mismas, como se usa en el presente documento, incluye el significado conocido en la técnica, que se ilustra, por ejemplo, en Janeway's Immunobiology, (Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, NY) (7ª ed., 2008); Bloom *et al.*, Protein Science (1997), 6: 407-415; Humphreys *et al.*, J. Immunol. Methods (1997), 209: 193-202. Véase también, por ejemplo, Burton, Molec. Immunol. 22: 161-206 (1985) y Papadea, C. y I. J. Check (1989) "Human immunoglobulin G and immunoglobulin G subclasses: biochemical, genetic, and clinical aspects." Crit Rev Clin Lab Sci 27(1): 27-58. Un experto en la materia apreciará que el número de aminoácidos así como el número de restos de cisteína disponibles para formación de enlaces disulfuro intercatenarios varía entre las clases e isotipos de inmunoglobulinas. Todas estas regiones bisagra pueden estar en los polipéptidos que contienen bisagra

y están dentro del alcance de la invención.

El término "anticuerpo" en el presente documento se usa en el sentido más amplio y se refiere a cualquier molécula de inmunoglobulina (Ig) que comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, y cualquier fragmento, mutante, variante o derivación de la misma siempre que muestren la actividad biológica deseada (por ejemplo, actividad de unión a epítipo). Los ejemplos de anticuerpos incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo como se describe en el presente documento. Un anticuerpo puede ser humano, humanizado y/o de afinidad madurada.

Como marco de referencia, como se usa en el presente documento un anticuerpo se referirá a la estructura de una inmunoglobulina G (IgG). Sin embargo, un experto en la materia entendería/reconocería que anticuerpo de cualquier clase de inmunoglobulina puede utilizarse en el método de la invención descrito en el presente documento. Para mayor claridad, una molécula de IgG contiene un par de cadenas pesadas (HC) idénticas y un par de cadenas ligeras (LC) idénticas. Cada LC tiene un dominio variable (V_L) y un dominio constante (C_L), mientras que cada HC tiene un dominio variable (V_H) y tres constantes (C_{H1} , C_{H2} y C_{H3}). Los dominios C_{H1} y C_{H2} están conectados por una región bisagra. Esta estructura se conoce bien en la técnica. Se hace referencia a la Figura 1B.

Como se usa en el presente documento, "semianticuerpo" se refiere a una cadena pesada de inmunoglobulina asociada con una cadena ligera de inmunoglobulina. Un semianticuerpo ejemplar se representa en la Figura 1A. Un experto en la materia apreciará fácilmente que un semianticuerpo también puede tener un dominio de unión a antígeno que consiste en un único dominio variable.

El término "maxicuerpo" se refiere a una proteína de fusión que comprende un scFv fusionado con un polipéptido Fc. Se hace referencia a la Figura 8a del documento WO 2009089004. Se hace referencia a la Figura 2 del documento WO 2009089004 para un maxicuerpo biespecifico.

La expresión "dominio C_{H2} " de una región Fc de IgG humana se extiende habitualmente de aproximadamente los restos 231 a aproximadamente 340 del IgG de acuerdo con el sistema de numeración de EU. El dominio C_{H2} es único porque no se empareja estrechamente con otro dominio. En su lugar, dos cadenas de carbohidratos ramificadas con enlaces N se interponen entre los dos dominios C_{H2} de una molécula de IgG nativa intacta. Se ha especulado que el carbohidrato puede proporcionar un sustituto para el emparejamiento dominio-dominio y ayudar a estabilizar el dominio C_{H2} . Burton, Molec. Immunol. 22: 161-206 (1985).

La expresión "dominio C_{H3} " comprende el tramo de restos C terminales de un dominio C_{H2} en una región Fc (es decir, de aproximadamente el resto de aminoácido 341 a aproximadamente el resto de aminoácido 447 de un IgG de acuerdo con el sistema de numeración de EU).

La expresión "región Fc", como se usa en el presente documento, se refiere en general a un complejo dimérico que comprende las secuencias polipeptídicas C terminales de una cadena pesada de inmunoglobulina, en el que una secuencia polipeptídica C terminal es la que puede obtenerse por digestión con papaína de un anticuerpo intacto. La región Fc puede comprender secuencias de Fc nativas o variantes. Aunque los límites de la secuencia de Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina podrían variar, se define habitualmente que la secuencia de Fc de cadena pesada de IgG humana se extiende desde un resto de aminoácido en aproximadamente la posición Cys226, o de aproximadamente la posición Pro230, al extremo carboxilo terminal de la secuencia de Fc. A no ser que se especifique de otro modo en el presente documento, la numeración de los restos de aminoácidos en la región Fc o región constante es de acuerdo con el sistema de numeración de EU, también denominado el índice EU, como se describe en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991. La secuencia de Fc de una inmunoglobulina comprende en general dos dominios constantes, un dominio C_{H2} y un dominio C_{H3} , y opcionalmente comprende un dominio C_{H4} . Por "polipéptido de Fc" en el presente documento se entiende uno de los polipéptidos que componen una región Fc, por ejemplo, un Fc monomérico. Un polipéptido de Fc puede obtenerse de cualquier inmunoglobulina adecuada, tal como los subtipos IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄, IgA, IgE, IgD o IgM. La región Fc comprende las partes carboxilo terminales de ambas cadenas H mantenidas unidas por disulfuros. Las funciones efectoras de anticuerpos se determinan por secuencias en la región Fc; esta región también es la parte reconocida por receptores de Fc (FcR) hallados en ciertos tipos de células. En algunas realizaciones, un polipéptido de Fc comprende parte de o toda una secuencia bisagra de tipo silvestre (generalmente en su extremo N terminal). En algunas realizaciones, un polipéptido de Fc no comprende una secuencia bisagra funcional o de tipo silvestre.

Una "región Fc funcional" posee una "función efectora" de una región Fc de secuencia nativa. Las "funciones efectoras" ejemplares incluyen unión a C1q; CDC; unión al receptor de Fc; ADCC; fagocitosis; regulación negativa de los receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B; BCR), etc. Dichas funciones efectoras generalmente requieren que la región Fc se combine con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable de anticuerpo) y puede evaluarse usando diversos ensayos como se desvela, por ejemplo, en definiciones del presente documento.

Una "región Fc de secuencia nativa" comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de

aminoácidos de una región Fc hallada en la naturaleza. Las regiones Fc humanas de secuencia nativa incluyen una región Fc IgG₁ humana de secuencia nativa (de alotipos distintos de A y A); región Fc IgG₂ humana de secuencia nativa; región Fc IgG₃ humana de secuencia nativa; y región Fc IgG₄ humana de secuencia nativa así como variantes de origen natural de las mismas.

5 Una "región Fc variante" comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una región Fc de secuencia nativa en virtud de al menos una modificación de aminoácido, preferentemente una o más sustituciones de aminoácidos. Preferentemente, la región Fc variante tiene al menos una sustitución de aminoácido en comparación con una región Fc de secuencia nativa o con la región Fc de un polipéptido parental, por ejemplo, de aproximadamente una a aproximadamente diez sustituciones de aminoácidos, y preferentemente de aproximadamente una a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido parental. La región Fc variante del presente documento preferentemente poseerá al menos aproximadamente 80 % de homología con una región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido parental, y más preferentemente al menos aproximadamente 90 % de homología con la misma, más preferentemente, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de homología con la misma.

El "componente de Fc" como se usa en el presente documento se refiere a una región bisagra, un dominio C_H2 o un dominio C_H3 de una región Fc.

20 En ciertas realizaciones, el polipéptido que contiene bisagra comprende una región Fc IgG, preferentemente derivada de una región Fc IgG humana de tipo silvestre. Por Fc IgG humana de tipo "silvestre" se entiende una secuencia de aminoácidos que aparece de forma natural dentro de la población humana. Por supuesto, al igual que la secuencia de Fc puede variar ligeramente entre individuos, pueden realizarse una o más alteraciones a una secuencia de tipo silvestre y aún permanecer dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, la región Fc puede contener alteraciones adicionales que no están relacionadas con la presente invención, tales como una mutación en un sitio de glucosilación o inclusión de un aminoácido no natural.

30 La expresión "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que está implicada en la unión del anticuerpo con el antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y cadena ligera (V_H y V_L, respectivamente) de un anticuerpo nativo generalmente tienen estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones marco conservadas (FR) y tres regiones hipervariables (HVR) (véase, por ejemplo, Kindt *et al.* Kuby Immunology, 6^a ed., W. H. Freeman and Co., página 91 (2007).). Un único dominio V_H o V_L puede ser suficiente para conferir especificidad de unión a antígeno. Además, pueden aislarse anticuerpos que se unan con un antígeno particular usando un dominio V_H o V_L de un anticuerpo que se une con el antígeno para explorar una biblioteca de dominios V_L o V_H complementarios, respectivamente. Véase, por ejemplo, Portolano *et al.*, J. Immunol. 150: 880-887 (1993); Clackson *et al.*, Nature 352: 624-628 (1991).

40 El término "Fab" como se usa en el presente documento se refiere a un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo. Como se ha indicado anteriormente, puede usarse papaína para digerir un anticuerpo intacto. La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, es decir, fragmentos "Fab", y un fragmento "Fc" residual (es decir, la región Fc, mencionada anteriormente). El fragmento Fab consiste en una cadena L completa junto con el dominio de región variable de la cadena H (V_H), y el primer dominio constante de una cadena pesada (C_H1).

45 La expresión "rama de unión a antígeno", "rama de unión a molécula diana", "rama de unión a diana" y variaciones de las mismas, como se usa en el presente documento, se refiere a una parte componente de una proteína heteromultimérica como se describe en el presente documento que tiene la capacidad para unirse específicamente con una diana de interés. En general y preferentemente, la rama de unión a antígeno es un complejo de secuencias polipeptídicas de inmunoglobulina, por ejemplo, CDR y/o secuencias de dominio variable de una cadena ligera y pesada de inmunoglobulina.

50 Una "diana" o "molécula diana" se refiere a un resto reconocido por una rama de unión de la proteína heteromultimérica. Por ejemplo, si la proteína heteromultimérica es un anticuerpo, entonces la diana puede ser epítomos en una única molécula o en diferentes moléculas, o un patógeno o una célula tumoral, dependiendo del contexto. De forma similar, si la proteína heteromultimérica es una proteína de fusión de Fc-receptor la diana sería el compañero de unión afín para el receptor. Un experto en la materia apreciará que la diana se determina por la especificidad de unión de la rama de unión a diana y que diferentes ramas de unión a diana pueden reconocer diferentes dianas. Una diana preferentemente se une con una proteína heteromultimérica como se describe en el presente documento con afinidad mayor de 1 μM Kd (de acuerdo con el análisis de Scatchard). Los ejemplos de moléculas diana incluyen, pero sin limitación, proteínas solubles en suero y/o sus receptores, tales como citocinas y/o receptores de citocinas, adhesinas, factores de crecimiento y/o sus receptores, hormonas, partículas virales (por ejemplo, proteína F de VSR, CMV, StaphA, gripe, virus de la hepatitis C), microorganismos (por ejemplo, proteínas de células bacterianas, células fúngicas), adhesinas, proteínas CD y sus receptores.

65 Un ejemplo de un anticuerpo "intacto" o "de longitud completa" es uno que comprende una rama de unión a antígeno

así como un C_L y al menos dominios constantes de cadena pesada, C_H1, C_H2 y C_H3. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (por ejemplo, dominios constantes de secuencia nativa humana) o variantes de secuencia de aminoácidos de los mismos.

5 El término “acoplamiento” como se usa en el presente documento se refiere a las etapas necesarias para ligar el primer y el segundo polipéptidos que contienen bisagra entre sí, por ejemplo, formación de un enlace covalente. Dichas etapas comprenden la reducción, hibridación y/u oxidación de restos de cisteína en el primer y el segundo polipéptidos que contienen bisagra para formar un enlace disulfuro intercatenario. El acoplamiento puede conseguirse mediante reticulación química o mediante el uso de un sistema redox. Véase, por ejemplo, Humphreys
10 *et al.*, J. Immunol. Methods (1998) 217: 1-10 y Zhu *et al.*, Cancer Lett., (1994) 86: 127-134.

La expresión “anticuerpo multiespecífico” se usa en el sentido más amplio y específicamente abarca un anticuerpo que tiene especificidad poliepitópica. Dichos anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero sin limitación, un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada (V_H) y un dominio variable de cadena ligera (V_L), en el que la
15 unidad V_HV_L tiene especificidad poliepitópica, anticuerpos que tienen dos o más dominios V_L y V_H uniéndose cada unidad V_HV_L con un epítipo diferente, anticuerpos que tienen dos o más dominios variables individuales uniéndose cada dominio variable individual con un epítipo diferente, anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpo tales como Fab, Fv, dsFv, scFv, diacuerpos, diacuerpos biespecíficos y triacuerpos, fragmentos de anticuerpo que se han unido covalentemente o de forma no covalente. “Especificidad poliepitópica” se refiere a la
20 capacidad para unirse específicamente con dos o más epítipos diferentes en la misma o diferentes dianas. “Monoespecífico” se refiere a la capacidad de unirse con un solo epítipo. De acuerdo con una realización el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo IgG que se une con cada epítipo con una afinidad de 5 μM a 0,001 pM, de 3 μM a 0,001 pM, de 1 μM a 0,001 pM, de 0,5 μM a 0,001 pM o de 0,1 μM a 0,001 pM. Se proporciona un dibujo ilustrativo de un biespecífico en la Figura 1B.

25 “Fragmentos de anticuerpo” comprenden una parte de un anticuerpo intacto, preferentemente la región de unión a antígeno o una variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos (Db); diacuerpos en tándem (taDb), anticuerpos lineales (por ejemplo, Patente de Estados Unidos n.º 5.641.870, Zapata *et al.*, Protein Eng. 8(10): 1057-1062 (1995)); anticuerpos de una rama,
30 anticuerpos de único dominio variable, minicuerpos, moléculas de anticuerpos monocatenarios; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, incluyendo pero sin limitación, Db-Fc, taDb-Fc, taDb-C_H3 y (scFV)₄-Fc).

La expresión “anticuerpos monocatenarios” (sdAb) o “anticuerpos de un único dominio variable (SVD)” generalmente se refieren a anticuerpos en los que un único dominio variable (V_H o V_L) puede conferir unión a antígeno. En otras palabras, no es necesario que el dominio variable individual interaccione con otro dominio variable para reconocer el antígeno diana. Los anticuerpos de un único dominio consisten en un único dominio de anticuerpo variable monomérico (V_H o V_L) en cada rama de unión a antígeno. Los ejemplos de anticuerpos de un único dominio incluyen los derivados de camélidos (llamas y camellos) y peces cartilaginosos (por ejemplo, tiburones nodriza) y los
40 derivados de métodos recombinantes de seres humanos y anticuerpos de ratón (Ward *et al.*, Nature (1989) 341: 544-546; Dooley y Flajnik, Dev Comp Immunol (2006) 30: 43-56; Muyldermans *et al.*, Trend Biochem Sci (2001) 26 : 230-235; Holt *et al.*, Trends Biotechnol (2003): 21: 484-490; documentos WO 2005/035572; WO 03/035694; Davies y Riechmann, Febs Lett (1994) 339: 285-290; documentos WO00/29004; WO 02/051870). Un anticuerpo de un único dominio variable puede estar presente en una rama de unión a antígeno (por ejemplo, homo o hetero-multímero) con
45 otras regiones variables o dominios variables, en cuyo caso no es un anticuerpo de un único dominio.

La expresión “anticuerpos lineales” se refiere en general a los anticuerpos descritos en Zapata *et al.*, Protein Eng. 8(10):1057-1062 (1995). Brevemente, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos Fd en tándem (V_H-C_H1 - V_H-C_H1) que, junto con polipéptidos de cadena ligera complementarios, forman un par de regiones de unión a antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.
50

La expresión tecnología de “botón en ojal” o “KnH” como se ha mencionado en el presente documento se refiere a la tecnología que dirige el emparejamiento de dos polipéptidos juntos *in vitro* o *in vivo* introduciendo una protuberancia (botón) en un polipéptido y una cavidad (ojal) en el otro polipéptido en una interfaz en la que interaccionan. Por
55 ejemplo, se han introducido KnH en las interfaces de unión de Fc:Fc, interfaces de C_L:C_H1 o interfaces de V_H/V_L de anticuerpos (por ejemplo, documentos US2007/0178552, WO 96/027011, WO 98/050431 y Zhu *et al.* (1997) Protein Science 6: 781-788). Esto es especialmente útil para conducir el emparejamiento de dos cadenas pesadas diferentes juntas durante la fabricación de anticuerpos multiespecíficos. Por ejemplo, los anticuerpos multiespecíficos que tienen KnH en sus regiones Fc pueden comprender además dominios variables individuales unidos a cada región Fc, o comprender además diferentes dominios variables de cadena pesada que se emparejan con dominios variables de cadena ligera similares o diferentes. La tecnología de KnH también puede usarse para emparejar dos dominios extracelulares de receptores diferentes juntos o cualquier otra secuencia polipeptídica que comprenda diferentes secuencias de reconocimiento de diana (por ejemplo, incluyendo anticuerpos, peptidocuerpos y otras fusiones de Fc).
60

65 “Fv” consiste en un dímero de un dominio de región variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en

asociación no covalente, estrecha. A partir del plegamiento de estos dos dominios surgen seis bucles hipervariables (3 bucles de cada una de las cadenas H y L) que aportan los restos de aminoácidos para unión a antígeno y confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solamente tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse con antígeno, aunque con frecuencia a una menor afinidad que el sitio de unión completo.

“Fv monocatenario” también abreviado como “sFv” o “scFv” son fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios de anticuerpo V_H y V_L conectados en una única cadena polipeptídica. Preferentemente, el polipéptido sFv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L , que permite que el sFv forme la estructura deseada para unión a antígeno. Para una revisión de sFv, véase Pluckthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994); Malmberg *et al.*, *J. Immunol. Methods* 183:7-13, 1995.

El término “diacuerpos” se refiere a fragmentos de anticuerpo pequeños preparados construyendo fragmentos sFv (véase párrafo precedente) con enlazadores cortos (aproximadamente 5-10 restos) entre los dominios V_H y V_L de modo que se consigue emparejamiento intercatenario pero no intracatenario de los dominios V , dando como resultado un fragmento bivalente, es decir, fragmento que tiene dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos biespecíficos son heterodímeros de dos fragmentos sFv “de cruce” en los que los dominios V_H y V_L de los dos anticuerpos están presentes en diferentes cadenas polipeptídicas. Se describen diacuerpos más completamente, por ejemplo, en los documentos EP 404.097; WO 93/11161; y Holliger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993).

La expresión “anticuerpo de una rama” o “anticuerpos de una rama” se refiere a un anticuerpo que comprende (1) un dominio variable unido por un enlace peptídico con un polipéptido que comprende un dominio C_{H2} , un dominio C_{H3} o un dominio C_{H2} - C_{H3} y (2) un segundo dominio C_{H2} , C_{H3} o C_{H2} - C_{H3} , en el que un dominio variable no se une por un enlace peptídico con un polipéptido que comprende el segundo dominio C_{H2} , C_{H3} o C_{H2} - C_{H3} . En una realización, el anticuerpo de una rama comprende 3 polipéptidos (1) un primer polipéptido que comprende un dominio variable (por ejemplo, V_H), C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} , (2) un segundo polipéptido que comprende un dominio variable (por ejemplo, V_L) y un dominio C_L , y (3) un tercer polipéptido que comprende un dominio C_{H2} y C_{H3} . En otra realización, el anticuerpo de una rama tiene una región bisagra parcial que contiene los dos restos de cisteína que forman enlaces disulfuro que unen las cadenas pesadas constantes. En una realización, los dominios variables del anticuerpo de una rama forman una región de unión a antígeno. En otra realización, los dominios variables del anticuerpo de una rama son dominios variables individuales, en los que cada dominio variable individual es una región de unión a antígeno. En una realización, el anticuerpo de una rama es un anticuerpo de un único dominio variable.

Los anticuerpos como se describe en el presente documento pueden ser anticuerpos “quiméricos” en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga de secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena o las cadenas es idéntico a u homólogo de secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (Patente de Estados Unidos n.º 4.816.567; y Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en el presente documento incluyen anticuerpos primatizados que comprenden secuencias de unión a antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, Mono del Viejo Mundo, Simio, etc.) y secuencias de región constante humana.

Las formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de roedor) son anticuerpos quiméricos que contienen secuencia mínima derivada del anticuerpo no humano. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que se han reemplazado restos de una región hipervariable del receptor por restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad de anticuerpo deseadas. En algunos casos, se reemplazan restos de región marco conservada (FR) de la inmunoglobulina humana por estos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones *et al.*, *Nature* 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332: 323-327 (1988); y Presta, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2: 593-596 (1992).

“Peptidocuerpo” o “peptidocuerpos” se refiere a una fusión de péptidos generados aleatoriamente con un dominio Fc. Véase Patente de Estados Unidos N.º 6.660.843, expedida el 9 de diciembre de 2003 de Feige *et al.* Incluyen uno o más péptidos unidos con el extremo N terminal, el extremo C terminal, cadenas laterales de aminoácidos, o con más de uno de estos sitios. La tecnología de peptidocuerpos permite el diseño de agentes terapéuticos que incorporen

péptidos que se dirijan a uno o más ligandos o receptores, péptidos de dirección tumoral, péptidos transportadores de membrana y similares. La tecnología de peptidocuerpos ha demostrado ser útil en el diseño de varias de estas moléculas, incluyendo péptidos lineales y restringidos por disulfuro, "multímeros peptídicos en tándem" (es decir, más de un péptido en una única cadena de un dominio Fc). Véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N.º 6.660.843; Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 2003/0195156, publicada el 16 de octubre de 2003 (correspondiente al documento WO 02/092620, publicada el 21 de noviembre de, 2002); Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 2003/0176352, publicada el 18 de septiembre de 2003 (correspondiente al documento WO 03/031589, publicado el 17 de abril de 2003); N.º de Serie de Estados Unidos 09/422.838, presentada el 22 de octubre de 1999 (correspondiente al documento WO 00/24770, publicado el 4 de mayo de 2000); Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 2003/0229023, publicada el 11 de diciembre de 2003; documento WO 03/057134, publicado el 17 de julio de 2003; Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 2003/0236193, publicada el 25 de diciembre de 2003 (correspondiente al documento PCT/US04/010989, presentado el 8 de abril de 2004); N.º de Serie de Estados Unidos, presentada el 18 de septiembre de 2003 (correspondiente al documento WO 04/026329, publicado el 1 de abril de 2004).

"Aficuerpos" o "aficuerpo" se refiere al uso de una proteína unida por un enlace peptídico con una región Fc, en la que la proteína se usa como un armazón para proporcionar una superficie de unión para una molécula diana. La proteína es con frecuencia una proteína de origen natural tal como una proteína estafilocócica A o dominio B de unión a IgG, o la proteína Z derivada del mismo (véase Nilsson *et al* (1987) Prot Eng 1, 107-113, y Patente de Estados Unidos N.º 5.143.844) o un fragmento o derivado de la misma. Por ejemplo, pueden crearse aficuerpos a partir de proteínas Z variantes que tienen afinidad de unión alterada con molécula o moléculas diana, en las que un segmento de la proteína Z se ha mutado por mutagénesis aleatoria para crear una biblioteca de variantes capaz de unirse con una molécula diana. Los ejemplos de aficuerpos incluyen Patente de Estados Unidos N.º 6.534.628, Nord K *et al*, Prot Eng 8:601-608 (1995) y Nord K *et al*, Nat Biotech 15: 772-777 (1997). Biotechnol Appl Biochem. Jun 2008; 50(Pt 2): 97-112.

Como se usa en el presente documento, el término "inmuno adhesina" designa moléculas que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una "adhesina") con las funciones efectoras de dominios constantes de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmuno adhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con una especificidad de unión deseada, cuya secuencia de aminoácidos es distinta del sitio de reconocimiento y unión al antígeno de un anticuerpo (es decir, es "heteróloga" en comparación con una región constante de un anticuerpo) y una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina (por ejemplo, CH2 y/o CH3 de una IgG). Las secuencias de adhesina ejemplares incluyen secuencias de aminoácidos contiguas que comprenden una parte de un receptor o un ligando que se une con una proteína de interés. Las secuencias de adhesina también pueden ser secuencias que se unen con una proteína de interés, pero no son secuencias de receptor o ligando (por ejemplo, secuencias de adhesina en peptidocuerpos). Dichas secuencias polipeptídicas pueden seleccionarse o identificarse por diversos métodos, incluyendo técnicas de presentación en fagos y métodos de clasificación de alto rendimiento. La secuencia de dominio constante de inmunoglobulina en la inmuno adhesina puede obtenerse de cualquier inmunoglobulina, tal como subtipos IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, IgA (incluyendo IgA1 e IgA2), IgE, IgD o IgM.

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

Una proteína heteromultimérica como se describe en el presente documento "que se une con un antígeno de interés es una que se une con la diana con suficiente afinidad de modo que la proteína heteromultimérica sea útil como un agente de diagnóstico y/o terapéutico en la dirección de una proteína o una célula o tejido que expresa la diana, y no reacciona de forma cruzada significativamente con otras proteínas. En dichas realizaciones, el alcance de la unión de la proteína heteromultimérica con una proteína "no diana" será menor de aproximadamente 10 % de la unión del anticuerpo con su proteína diana particular como se determina por análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) o radioinmuno precipitación (RIA) O ELISA. Con respecto a la unión de una proteína heteromultimérica con una molécula diana, la expresión "unión específica" o "se une específicamente con" o es "específica para" un polipéptido particular o un epítipo en una diana polipeptídica particular significa unión que es sensiblemente diferente de una interacción no específica (por ejemplo, una interacción no específica puede ser unión con albúmina de suero bovino o caseína). La unión específica puede medirse, por ejemplo, determinando la unión de una molécula en comparación con la unión de una molécula de control. Por ejemplo, la unión específica puede determinarse por competición con una molécula de control que es similar a la diana, por ejemplo, un exceso de diana no marcada. En este caso, la unión específica se indica si la unión de la diana marcada con una sonda se inhibe competitivamente por exceso de diana no marcada. La expresión "unión específica" o "se une específicamente con" o es "específica para" un polipéptido particular o un epítipo en una diana polipeptídica particular como se usa en el presente documento puede mostrarse, por ejemplo, por una molécula que tiene una Kd para la diana de al menos aproximadamente 200 nM, como alternativa al menos aproximadamente 150 nM, como

alternativa al menos aproximadamente 100 nM, como alternativa al menos aproximadamente 60 nM, como alternativa al menos aproximadamente 50 nM, como alternativa al menos aproximadamente 40 nM, como alternativa al menos aproximadamente 30 nM, como alternativa al menos aproximadamente 20 nM, como alternativa al menos aproximadamente 10 nM, como alternativa al menos aproximadamente 8 nM, como alternativa al menos aproximadamente 6 nM, como alternativa al menos aproximadamente 4 nM, como alternativa al menos aproximadamente 2 nM, como alternativa al menos aproximadamente 1 nM, o mayor. En una realización, la expresión "unión específica" se refiere a la unión en la que una proteína heteromultimérica se une con un polipéptido particular o epítipo en un polipéptido particular sin unirse sustancialmente con ningún otro polipéptido o epítipo polipeptídico.

La "afinidad de unión" se refiere en general a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A no ser que se indique de otro modo, como se usa en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañera Y puede en general representarse por la constante de disociación (K_d). Por ejemplo, la K_d puede ser de aproximadamente 200 nM, 150 nM, 100 nM, 60 nM, 50 nM, 40 nM, 30 nM, 20 nM, 10 nM, 8 nM, 6 nM, 4 nM, 2 nM, 1 nM, o más fuerte. La afinidad puede medirse por métodos habituales conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. Los anticuerpos de baja afinidad generalmente se unen con el antígeno lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad generalmente se unen con el antígeno más rápido y tienden a permanecer unidos más tiempo. Se conoce en la técnica una diversidad de métodos para medir la afinidad de unión, cualquiera de los cuales puede usarse para fines de la presente invención.

En una realización, el " K_d " o "valor de K_d " de acuerdo con la presente invención se mide usando ensayos de resonancia de plasmón superficial usando un BIAcore™-2000 o un BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con microplacas CM5 con diana inmovilizada (por ejemplo, antígeno) a ~10 unidades de respuesta (UR). Brevemente, se activan microplacas biosensoras de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore, Inc.) con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxi-succinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con acetato sódico 10 mM, pH 4,8, en 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de la inyección a un caudal de 5 µl/minuto para conseguir aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear grupos que no han reaccionado. Para mediciones cinéticas, se inyectan diluciones en serie dobles de Fab (por ejemplo, 0,78 nM a 500 nM) en PBS con Tween 20 0,05 % (PBST) a 25 °C a un caudal de aproximadamente 25 µl/min. Se calculan las velocidades de asociación (k_{on}) y velocidades de disociación (k_{off}) usando un modelo de unión de Langmuir de uno a uno sencillo (Software BIAcore Evaluation versión 3.2) ajustando simultáneamente el sensograma de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (K_d) se calcula como la relación k_{off}/k_{on} . Véase, por ejemplo, Chen *et al.*, J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999). Si la velocidad de asociación supera $10^6 M^{-1} S^{-1}$ por el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, la velocidad de asociación puede determinarse usando una técnica de interrupción de fluorescencia que mide el aumento o la reducción de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm; pase de banda 16 nm) a 25 °C de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2 en presencia de concentraciones crecientes de antígeno como se mide en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con detención de flujo (Aviv instruments) o un espectrofotómetro SLM-Aminco serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

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

"Aislado", cuando se usa para describir los diversos polipéptidos heteromultiméricos significa un heteromultímero que se ha separado y/o recuperado de una célula o un cultivo celular del que se expresó. Son componentes contaminantes de su ambiente natural materiales que interferirían con los usos de diagnóstico o terapéuticos para el heteromultímero, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En ciertas realizaciones, el heteromultímero se purificará (1) hasta más del 95 % en peso de proteína como se determina por el método de Lowry, y más preferentemente más del 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de secuencia de aminoácidos N terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta su homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción de plata. Habitualmente, sin embargo, se preparará polipéptido aislado por al menos una etapa de purificación.

Los heteromultímeros descritos en el presente documento se purifican en general hasta su homogeneidad sustancial. Las expresiones "sustancialmente homogéneo", "forma sustancialmente homogénea" y "homogeneidad sustancial" se usan para indicar que el producto está sustancialmente desprovisto de productos secundarios originados de combinaciones de polipéptidos no deseadas (por ejemplo, homomultímeros).

Expresado con respecto a pureza, la homogeneidad sustancial significa que la cantidad de productos secundarios

no supera 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % en peso o es menos del 1 % en peso. En una realización, el producto secundario es menor del 5 %.

5 “Molécula biológica” se refiere a un ácido nucleico, una proteína, un carbohidrato, un lípido y combinaciones de los mismos. En una realización, la molécula biológica existe en la naturaleza.

10 Por “unido” o “enlaces” como se usa en el presente documento se entiende una unión por enlace peptídico directa entre una primera y una segunda secuencia de aminoácidos o un enlace que implica una tercera secuencia de aminoácidos que está unida por enlace peptídico con y entre la primera y la segunda secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, un péptido enlazador se unió al extremo C terminal de una secuencia de aminoácidos y al extremo N terminal de la otra secuencia de aminoácidos.

15 Por “enlazador” como se usa en el presente documento se entiende una secuencia de aminoácidos de dos o más aminoácidos de longitud. El enlazador puede consistir en aminoácidos polares o no polares neutros. Un enlazador puede ser, por ejemplo, de 2 a 100 aminoácidos de longitud, tal como entre 2 y 50 aminoácidos de longitud, por ejemplo, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 aminoácidos de longitud. Un enlazador puede ser “escindible”, por ejemplo, mediante auto-escisión, o escisión enzimática o química. Se conocen bien en la técnica y también se describen en el presente documento sitios de escisión en secuencias de aminoácidos y enzimas y productos químicos que escinden en dichos sitios.

20 Por un “anclaje” como se usa en el presente documento se entiende un enlazador de aminoácidos que une otras dos secuencias de aminoácidos. Un anclaje como se describe en el presente documento puede unir el extremo N terminal de un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina con el extremo C terminal de un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina. En realizaciones particulares, un anclaje es de entre aproximadamente 15 y 50 aminoácidos de longitud, por ejemplo, entre 20 y 26 aminoácidos de longitud (por ejemplo, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o 26 aminoácidos de longitud). Un anclaje puede ser “escindible”, por ejemplo, mediante auto-escisión, o escisión enzimática o química usando métodos y reactivos convencionales en la técnica.

30 La escisión enzimática de un “enlazador” o un “anclaje” puede implicar el uso de una endopeptidasa tal como, por ejemplo, Lys-C, Asp-N, Arg-C, V8, Glu-C, quimiotripsina, tripsina, pepsina, papaína, trombina, Genenasa, Factor Xa, TEV (cisteína proteasa del virus del grabado del tabaco), Enteroquinasa, HRV C3 (proteasa C3 de rinovirus humano), Quinogenasa, así como proproteína convertasas de tipo subtilisina (por ejemplo, Furina (PC1), PC2 o PC3) o convertasa dibásica de N-arginina. La escisión química puede implicar el uso de, por ejemplo, hidroxilamina, N-clorosuccinimida, N-bromosuccinimida o bromuro de cianógeno.

35 Un “sitio de escisión de endopeptidasa Lys-C” como se usa en el presente documento es un resto de Lisina en una secuencia de aminoácidos que puede escindirse en el extremo C terminal mediante endopeptidasa Lys-C. La endopeptidasa Lys-C escinde en el extremo C terminal de un resto de Lisina.

40 Por un “agente caotrópico” se entiende una sustancia soluble en agua que altera la estructura tridimensional de una proteína (por ejemplo, un anticuerpo) interfiriendo con interacciones intra-moleculares estabilizantes (por ejemplo, enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals o efectos hidrófobos). Los agentes caotrópicos ejemplares incluyen, pero sin limitación, urea, Guanidina-HCl, perclorato de litio, Histidina y Arginina.

45 Por un “detergente suave” se entiende una sustancia soluble en agua que altera la estructura tridimensional de una proteína (por ejemplo, un anticuerpo) interfiriendo con interacciones intra-moleculares estabilizantes (por ejemplo, enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals o efectos hidrófobos), pero que no altera permanentemente la estructura proteica para provocar una pérdida de actividad biológica (es decir, no desnaturaliza la proteína). Los detergentes suaves ejemplares incluyen, pero sin limitación, Tween (por ejemplo, Tween-20), Triton (por ejemplo, Triton X-100), NP-40 (nonil fenolxilpolietoxiletanol), Nonidet P-40 (octil fenoxilpolietoxiletanol) y Dodecil Sulfato Sódico (SDS).

50 Las “funciones efectoras” de anticuerpo se refieren a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o región Fc variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo, y varían con el isotipo de anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen: unión de C1 q y citotoxicidad dependiente de complemento; unión al receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación negativa de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B); y activación de linfocitos B.

60 “Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo” o “ADCC” se refiere a una forma de citotoxicidad en la que Ig unida a receptores de Fc (FcRs) presente en ciertas células citotóxicas (por ejemplo, linfocitos Citolíticos Naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) permite que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente con una célula diana portadora de antígenos y posteriormente destruyan la célula diana con agentes citotóxicos. Los anticuerpos “arman” las células citotóxicas y se requieren absolutamente para dicha destrucción. Las células primarias para mediar en ADCC, linfocitos NK, expresan solamente Fc γ RIII, mientras que los monocitos expresan Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resumen en la Tabla 3 en la página 464

65

de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991). Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés, puede realizarse un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en la Patente de Estados Unidos N.º 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos Citolíticos Naturales (NK). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el desvelado en Clynes *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 652-656 (1998).

“Receptor de Fc” o “FcR” describe un receptor que se une con la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano. Además, un FcR preferido es uno que se une con un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas con corte y empalme alternativo de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un “receptor activador”) y FcγRIIB (un “receptor inhibidor”), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplasmáticos de las mismas. El receptor activador FcγRIIA contiene un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptor (ITAM) en su dominio citoplasmático. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición basado en tirosina inmunorreceptor (ITIM) en su dominio citoplasmático (véase revisión M. Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). Se revisan FcR en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991); Capel *et al.*, *Immunomethods* 4: 25-34 (1994); y de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126: 330-41 (1995). Otros FcR, incluyendo los que se identifiquen en el futuro, están abarcados por el término “FcR” en el presente documento. El término también incluye el receptor neonatal FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternos al feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117: 587 (1976) y Kim *et al.*, *European J. Immunol.* 24: 2429-2434 (1994)).

“Células efectoras humanas” son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. Preferentemente, las células expresan al menos FcγRIII y realizan función efectora ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que median en la ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), linfocitos citolíticos naturales (NK), monocitos, linfocitos T citotóxicos y neutrófilos; prefiriéndose las PBMC y linfocitos NK. Las células efectoras pueden aislarse de una fuente nativa, por ejemplo, de sangre.

“Citotoxicidad dependiente de complemento” o “CDC” se refiere a la lisis de una célula diana en presencia de complemento. La activación de la ruta del complemento clásica se inicia mediante la unión del primer componente del sistema de complemento (C1q) con anticuerpos (de la subclase apropiada) que se unen con su antígeno afín. Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol., Methods* 202: 163 (1996).

La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, o derivado para tratar una enfermedad o un trastorno en un sujeto. En el caso del tumor (por ejemplo, un tumor canceroso), la cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo multiespecífico) puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño de tumor primario; inhibir (es decir, ralentizar en algún grado y preferentemente detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar en algún grado y preferentemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, en algún grado, el crecimiento tumoral; y/o aliviar en algún grado uno o más de los síntomas asociados con el trastorno. En la medida en que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo pueda evitar el crecimiento y/o destruir células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. Para terapia de cáncer, la eficacia *in vivo* puede medirse, por ejemplo, evaluando la duración de la supervivencia, el tiempo hasta la progresión de enfermedad (TTP), las velocidades de respuesta (RR), la duración de respuesta y/o la calidad de vida.

Por “reducir o inhibir” se entiende la capacidad para provocar una reducción general preferentemente del 20 % o mayor, más preferentemente del 50 % o mayor, y más preferentemente del 75 %, 85 %, 90 %, 95 % o mayor. Reducir o inhibir puede referirse a los síntomas del trastorno que se trate, la presencia o el tamaño de las metástasis, el tamaño del tumor primario o el tamaño o el número de los vasos sanguíneos en trastornos angiogénicos.

Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren a o describen la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por crecimiento/proliferación celular desregulado. Se incluyen en esta definición cánceres benignos y malignos. Los ejemplos de cáncer incluyen pero sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma escamoso de pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, glioma, cáncer del cuello uterino, cáncer ovárico, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio o uterino, carcinoma de glándula salivares, cáncer de riñón (por ejemplo, carcinoma de células renales), cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer tiroideo, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma peniano, melanoma y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello. Por “cáncer de estadio temprano” se entiende un cáncer que no es invasivo o metastásico o se clasifica como un cáncer de Estadio 0, I o II. El término “precanceroso” se refiere a una afección o un crecimiento que típicamente precede a o se desarrolla en un cáncer. Por “no metastásico” se entiende un cáncer que es benigno o que permanece en el sitio primario y no ha penetrado en el sistema de vasos sanguíneos o linfáticos o en tejidos distintos del sitio primario. En general, un cáncer no metastásico es cualquier

cáncer que sea cáncer de Estadio 0, I o II, y ocasionalmente un cáncer de Estadio III.

Un “trastorno alérgico o inflamatorio” en el presente documento es una enfermedad o un trastorno que resulta de hiperactivación del sistema inmunitario de un individuo. Los trastornos alérgicos o inflamatorios ejemplares incluyen, pero sin limitación, asma, psoriasis, artritis reumatoide, dermatitis atópica, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, eccema, trasplante de órganos, degeneración macular relacionada con la edad, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, esofagitis eosinófila y enfermedades autoinmunitarias asociadas con inflamación.

Una “enfermedad autoinmunitaria” en el presente documento es una enfermedad o un trastorno que surge de y se dirige contra los tejidos del propio individuo o un cosegregado o manifestación del mismo o condición resultante del mismo. Los ejemplos de enfermedades o trastornos autoinmunitarios incluyen, pero sin limitación artritis (artritis reumatoide tal como artritis aguda, artritis reumatoide crónica, artritis gotosa, artritis gotosa aguda, artritis inflamatoria crónica, artritis degenerativa, artritis infecciosa, artritis de Lyme, artritis proliferativa, artritis psoriásica, artritis vertebral y artritis reumatoide de aparición juvenil, osteoartritis, artritis crónica progrediente, artritis deformante, poliartritis crónica primaria, artritis reactiva y espondilitis anquilosante), enfermedades cutáneas hiperproliferativas inflamatorias, psoriasis tales como psoriasis en placas, psoriasis gutata, psoriasis pustular y psoriasis de las uñas, dermatitis incluyendo dermatitis de contacto, dermatitis de contacto crónica, dermatitis alérgica, dermatitis de contacto alérgica, dermatitis herpetiforme y dermatitis atópica, síndrome de hiper IgM ligado a X, urticaria tal como urticaria alérgica crónica y urticaria idiopática crónica, incluyendo urticaria autoinmunitaria crónica, polimiositis/dermatomiositis, dermatomiositis juvenil, necrólisis epidérmica tóxica, esclerodermia (incluyendo esclerodermia sistémica), esclerosis tal como esclerosis sistémica, esclerosis múltiple (EM) tal como EM espinóptica, EM progresiva primaria (EMPP) y EM recidivante remitente (EMRR), esclerosis sistémica progresiva, aterosclerosis, arteriosclerosis, esclerosis diseminada y esclerosis atáxica, enfermedad inflamatoria del intestino (EII) (por ejemplo, enfermedad de Crohn, enfermedades gastrointestinales mediadas por autoinmunidad, colitis tal como colitis ulcerosa, colitis microscópica, colitis colagenosa, colitis poliposa, enterocolitis necrotizante y colitis transmural, y enfermedad inflamatoria del intestino autoinmunitaria), piodermia gangrenosa, eritema nodoso, colangitis esclerosante primaria, epiescleritis), síndrome de dificultad respiratoria, incluyendo síndrome de dificultad respiratoria del adulto o agudo (SDRA), meningitis, inflamación de toda o parte de la úvea, iritis, coroiditis, un trastorno hematológico autoinmunitario, espondilitis reumatoide, pérdida de audición repentina, enfermedades mediadas por IgE tales como anafilaxia y rinitis alérgica y atópica, encefalitis tal como encefalitis de Rasmussen y encefalitis límbica y/o del tronco encefálico, uveítis, tal como uveítis anterior, uveítis anterior aguda, uveítis granulomatosa, uveítis no granulomatosa, uveítis facoantigénica, uveítis posterior o uveítis autoinmunitaria, glomerulonefritis (GN) con y sin síndrome nefrótico tal como glomerulonefritis crónica o aguda tal como GN primaria, GN mediada por inmunidad, GN membranosa (nefropatía membranosa), GN membranosa idiopática o nefropatía membranosa idiopática, GN membranoproliferativa o proliferativa membranosa (GNPM), incluyendo de Tipo I y de Tipo II, y GN progresiva rápida, afecciones alérgicas, reacción alérgica, eccema incluyendo eccema alérgico o atópico, asma tal como asma bronquial, y asma autoinmunitario, afecciones que implican la infiltración de linfocitos T y respuestas inflamatorias crónicas, enfermedad inflamatoria pulmonar crónica, miocarditis autoinmunitaria, deficiencia de adhesión de leucocitos, lupus eritematoso sistémico (LES) tal como LES cutáneo, lupus eritematoso cutáneo subagudo, síndrome de lupus neonatal (LEN), lupus eritematoso diseminado, lupus (incluyendo nefritis, cerebritis, pediátrico, no renal, extra renal, discoide, alopecia), diabetes mellitus de aparición juvenil (Tipo I), incluyendo diabetes mellitus insulino dependiente pediátrica (IDDM), diabetes mellitus de aparición en adultos (diabetes de tipo II), diabetes autoinmunitaria, diabetes insípida idiopática, respuestas inmunitarias asociadas con hipersensibilidad aguda y retardada mediada por citocinas y linfocitos T, tuberculosis, sarcoidosis, granulomatosis incluyendo granulomatosis linfomatoide, granulomatosis de Wegener, agranulocitosis, vasculitis, incluyendo vasculitis (incluyendo vasculitis de vasos grandes (incluyendo polimialgia reumática y arteritis de células gigantes (de Takayasu)), vasculitis de vasos medios (incluyendo enfermedad de Kawasaki y poliartritis nodosa), poliarteritis microscópica, vasculitis del SNC, vasculitis necrotizante, cutánea o de hipersensibilidad, vasculitis necrotizante sistémica y vasculitis asociada con ANCA tal como vasculitis o síndrome de Churg-Strauss (SCS), arteritis temporal, anemia aplásica, anemia aplásica autoinmunitaria, anemia positiva de Coombs, anemia de Diamond Blackfan, anemia hemolítica o anemia hemolítica inmunitaria incluyendo anemia hemolítica autoinmunitaria (AIHA), anemia perniciosa, enfermedad de Addison, anemia de glóbulos rojos pura o aplasia (PRCA), deficiencia de Factor VIII, hemofilia A, neutropenia autoinmunitaria, pancitopenia, leucopenia, enfermedades que implican diapedesis de leucocitos, trastornos inflamatorios del SNC, síndrome de lesión de múltiples órganos tal como los secundarios de septicemia, traumatismo o hemorragia, enfermedades mediadas por complejo de antígeno-anticuerpo, enfermedades de membrana basal antiglomerular, síndrome de anticuerpo anti fosfolípido, neuritis alérgica, enfermedad de Bechet o de Behcet, síndrome de Castleman, síndrome de Goodpasture, síndrome de Reynaud, síndrome de Sjogren, síndrome de Stevens-Johnson, penfigoide tal como penfigoide ampolloso o penfigoide cutáneo, pénfigo (incluyendo pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, penfigoide de membrana mucosa y pénfigo eritematoso), poliendocrinopatías autoinmunitarias, enfermedad o síndrome de Reiter, nefritis de complejo inmunitario, nefritis mediada por anticuerpos, neuromielitis óptica, polineuropatías, neuropatía crónica tal como polineuropatías de IgM o neuropatía mediada por IgM, trombocitopenia (como se desarrolla por pacientes con infarto de miocardio, por ejemplo) incluyendo púrpura trombocitopénica trombótica (TTP) y trombocitopenia autoinmunitaria o mediada por inmunidad tal como púrpura trombocitopénica idiopática (ITP) incluyendo ITP crónica o aguda, enfermedad autoinmunitaria del testículo y el ovario incluyendo orquitis autoinmunitaria y ooforitis, hipotiroidismo primario, hipoparatiroidismo, enfermedades endocrinas autoinmunitarias incluyendo tiroiditis, tal como tiroiditis

autoinmunitaria, enfermedad de Hashimoto, tiroiditis crónica (tiroiditis de Hashimoto) o tiroiditis subaguda, enfermedad tiroidea autoinmunitaria, hipotiroidismo idiopático, enfermedad de Graves, síndromes poliglandulares tales como síndromes poliglandulares autoinmunitarios (o síndromes de endocrinopatía poliglandular), síndromes paraneoplásicos, incluyendo síndromes paraneoplásicos neurológicos tales como síndrome miasténico de Lambert-Eaton o síndrome de Eaton-Lambert, síndrome del hombre rígido o la persona rígida, encefalomiелitis tal como encefalomiелitis alérgica y encefalomiелitis alérgica experimental (EAE), miastenia grave tal como miastenia grave asociada con timoma, degeneración cerebelar, neuromiotonía, opsoclon o síndrome de mioclon opsoclon (OMS) y neuropatía sensorial, neuropatía motora multifocal, síndrome de Sheehan, hepatitis autoinmunitaria, hepatitis crónica, hepatitis lupoide, hepatitis de células gigantes, hepatitis activa crónica o hepatitis activa crónica autoinmunitaria, neumonitis intersticial linfoide, bronquiolitis obliterante (sin trasplante) frente a NSIP, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Berger (nefropatía de IgA), nefropatía de IgA idiopática, dermatosis de IgA lineal, cirrosis biliar primaria, neumocirrosis, síndrome de enteropatía autoinmunitaria, enfermedad celíaca, esprúe celíaco, (enteropatía por gluten), esprúe refractario, esprúe idiopático, crioglobulinemia, esclerosis lateral amiotrófica (ELA; enfermedad de Lou Gehrig), enfermedad de las arterias coronarias, enfermedad ótica autoinmunitaria tal como enfermedad del oído interno autoinmunitaria (AIED), pérdida de audición autoinmunitaria, síndrome de mioclon opsoclon (OMS), policondritis tal como policondritis refractaria o recidivante, proteinosis alveolar pulmonar, amiloidosis, escleritis, una linfocitosis no cancerosa, una linfocitosis primaria, que incluye linfocitosis de linfocitos B monoclonales (por ejemplo, gammapatía monoclonal benigna y gammapatía monoclonal de significación indeterminada, MGUS), neuropatía periférica, síndrome paraneoplásico, canalopatías tales como epilepsia, migraña, arritmia, trastornos musculares, sordera, ceguera, parálisis periódica y canalopatías del SNC, autismo, miopatía inflamatoria, glomeruloesclerosis segmental focal (FSGS), oftalmopatía endocrina, uveoretinitis, coriorretinitis, trastorno hepatológico autoinmunitario, fibromialgia, insuficiencia endocrina múltiple, síndrome de Schmidt, adrenalitis, atrofia gástrica, demencia presenil, enfermedades desmielinizantes tales como enfermedades desmielinizantes autoinmunitarias, nefropatía diabética, síndrome de Dressler, alopecia areata, síndrome de CREST (calcinosis, fenómeno de Raynaud, dismobilidad esofágica, esclerodactilia y telangiectasia), infertilidad autoinmunitaria masculina y femenina, enfermedad de tejidos conectivos mixtos, enfermedad de Chagas, fiebre reumática, aborto recurrente, pulmón del granjero, eritema multiforme, síndrome postcardiotomía, síndrome de Cushing, pulmón de criador de pájaros, angitis granulomatosa alérgica, angitis linfocítica benigna, síndrome de Alport, alveolitis tal como alveolitis alérgica y alveolitis fibrosante, enfermedad pulmonar intersticial, reacción a la transfusión, lepra, malaria, leishmaniosis, quipanosomiasis, esquistosomiasis, ascariasis, aspergilosis, síndrome de Sampter, síndrome de Caplan, dengue, endocarditis, fibrosis endomiocárdica, fibrosis pulmonar intersticial difusa, fibrosis pulmonar intersticial, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis quística, endoftalmitis, eritema elevatum et diutinum, eritroblastosis fetal, fascitis eosinófila, síndrome de Shulman, síndrome de Felty, flariasis, ciclitis tal como ciclitis crónica, ciclitis heterocrónica, iridociclitis o ciclitis de Fuch, púrpura de Henoch-Schonlein, infección por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), infección por ecovirus, cardiomiopatía, enfermedad de Alzheimer, infección por parvovirus, infección por virus de la rubéola, síndromes postvacunación, infección de rubéola congénita, infección por virus de Epstein-Barr, paperas, síndrome de Evans, insuficiencia gonadal autoinmunitaria, corea de Sydenham, nefritis poststreptocócica, tromboangitis obliterante, tirotoxicosis, tabes dorsal, corioiditis, polimialgia de células gigantes, oftalmopatía endocrina, neumonitis de hipersensibilidad crónica, queratoconjuntivitis seca, queratoconjuntivitis epidémica, síndrome nefrítico idiopático, nefropatía de cambio mínimo, lesión familiar benigna y de reperfusión por isquemia, autoinmunidad retiniana, inflamación de las articulaciones, bronquitis, enfermedad obstructiva crónica de las vías respiratorias, silicosis, aftas, estomatitis aftosa, trastornos arterioscleróticos, aspermiogénesis, hemólisis autoinmunitaria, enfermedad de Boeck, crioglobulinemia, contractura de Dupuytren, endoftalmia faeoanafiláctica, enteritis alérgica, eritema nodoso leproso, parálisis facial idiopática, síndrome de fatiga crónica, fiebre reumática, enfermedad de Hamman-Rich, pérdida de audición sensorial, hemoglobinuria paroxística, hipogonadismo, ileítis regional, leucopenia, mononucleosis infecciosa, mielitis transversal, mixedema idiopático primario, nefrosis, oftalmia sinfática, orquitis granulomatosa, pancreatitis, polirradiculitis aguda, piodermia gangrenosa, tiroiditis de Quervain, atrofia esplénica adquirida, infertilidad debida a anticuerpos antiespermatozoides, tímoma no maligno, vitiligo, SCID y enfermedades asociadas con virus de Epstein-Barr, síndrome de choque tóxico, intoxicación alimentaria, afecciones que implican la infiltración de linfocitos T, deficiencia de adhesión de leucocitos, respuestas inmunitarias asociadas con hipersensibilidad aguda y retardada mediada por citocinas y linfocitos T, enfermedades que implican diapédesis de leucocitos, síndrome de lesión orgánica múltiple, enfermedades mediadas por complejos antígeno-anticuerpo, enfermedad de membrana basal antiglomerular, neuritis alérgica, poliendocrinopatías autoinmunitarias, ooforitis, mixedema primario, gastritis atrófica autoinmunitaria, oftalmia simpática, enfermedades reumáticas, enfermedad del tejido conectivo mixto, síndrome nefrítico, insulinitis, insuficiencia poliendocrina, neuropatía periférica, síndrome poliglandular autoinmunitario tipo I, hipoparatiroidismo idiopático de aparición en adultos (HIAA), alopecia total, cardiomiopatía dilatada, epidermólisis ampollosa adquirida (EBA), hemocromatosis, miocarditis, síndrome nefrítico, colangitis esclerosante primaria, sinusitis purulenta o no purulenta, sinusitis aguda o crónica, sinusitis de etmoides, frontal, maxilar o de esfenoides, un trastorno relacionado con eosinófilos tal como eosinofilia, eosinofilia de infiltración pulmonar, síndrome de eosinofilia-mialgia, síndrome de Loeffler, neumonía eosinófila crónica, eosinofilia pulmonar tropical, aspergilosis bronconeumónica, aspergiloma o granulomas que contienen eosinófilos, anafilaxis, espondiloartritis seronegativos, enfermedad autoinmunitaria poliendocrina, colangitis esclerosante, esclerótica, epiesclerótica, candidiasis mucocutánea crónica, síndrome de Bruton, hipogammaglobulinemia transitoria de la infancia, síndrome de Wiskott-Aldrich, ataxia telangiectasia, trastornos autoinmunitarios asociados con la enfermedad del colágeno, reumatismo, enfermedad neurológica,

trastorno de reperfusión isquémica, reducción en la respuesta de presión sanguínea, disfunción vascular, angiectasia, lesión tisular, isquemia cardiovascular, hiperalgesia, isquemia cerebral y vascularización que acompaña a enfermedad, trastornos de hipersensibilidad alérgica, glomerulonefritis, lesión por reperfusión, lesión por reperfusión de tejidos miocárdicos u otros, dermatosis con componentes inflamatorios agudos, meningitis purulenta aguda u otros trastornos inflamatorios del sistema nervioso central, trastornos inflamatorios oculares y orbitales, síndromes asociados con transfusión de granulocitos, toxicidad inducida por citocinas, inflamación aguda grave, inflamación intratable crónica, pielitis, neumonocirrosis, retinopatía diabética, trastorno de arterias grandes diabéticas, hiperplasia endoarterial, úlcera péptica, valvulitis y endometriosis.

La expresión “agente citotóxico” como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de una célula y/o provoca destrucción de una célula. Se pretende que la expresión incluya isótopos radiactivos (por ejemplo, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², Ra²²³, P³², e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina u otros agentes intercalantes, enzimas y fragmentos de los mismos tales como enzimas nucleolíticas, antibióticos y toxinas tales como toxinas de moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de los mismos y los diversos agentes antitumorales, anticancerosos y quimioterapéuticos desvelados en el presente documento. Se describen en el presente documento otros agentes citotóxicos. Un agente tumoricida provoca destrucción de células tumorales.

Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida CYTOXAN®; alquil sulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocouona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenotiofosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapachol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina y 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiatrina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo, calicheamicina, especialmente calicheamicina gamma 1 (véase, por ejemplo, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl. 33: 183-186 (1994)), dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; así como cromóforo de neocarcinostatina y cromóforos de antibióticos de enediina de cromoproteína relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina ADRIAMYCIN® (incluyendo morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, oligomicinas, peplomicina, potfomicina, puomicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterin, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, encitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestano, mepitioestano, testolactona; anti adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reforzador de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; desfofamina; demecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiiurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo de polisacáridos PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirán; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina, tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano, vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®), dacarbazina, manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromán; gaceliosina; arabinósido (“Ara-C”); tiotepa; taxoides, por ejemplo paclitaxel TAXOL® (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ), formulación en nanopartículas modificadas con albúmina, sin Cremophor ABRAXANETM de paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, IL) y doxetaxel TAXOTERE® (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo, gemcitabina (GEMZAR®), 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina (VELBAN®); platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN®), oxaliplatino; leucovovina; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; edatretaxato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; capecitabina (XELODA®); sales, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores farmacéuticamente aceptables; así como combinaciones de dos o más de los anteriores tales como CHOP, una abreviatura de una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona y FOLFOX, una abreviatura para un

régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATINTM) combinado con 5-FU y leucovovina.

También se incluyen en esta definición agentes antihormonales que actúan para regular, reducir, bloquear o inhibir los efectos de hormonas que pueden promover el crecimiento del cáncer, y están con frecuencia en la forma de tratamiento sistémico o de cuerpo completo. Pueden ser en sí mismos hormonas. Los ejemplos incluyen antiestrógenos y moduladores del receptor de estrógenos selectivos (SERM), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno EVISTA®, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno FARESTON®; anti-progesteronas; reguladores negativos del receptor de estrógenos (ERD); agentes que actúan para suprimir o inactivar los ovarios, por ejemplo, agonistas de hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) tales como acetato de leuprolide LUPRON® y ELIGARD®, acetato de goserelina, acetato de busarelina y triptelina; otros antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida; e inhibidores de aromataza que inhiben la enzima aromataza, que regula la producción de estrógenos en las glándulas adrenales tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol MEGASE®, exemestano AROMASIN®, formestanie, fadrozol, vorozol RIVISOR®, letrozol FEMARA® y anastrozol ARIMIDEX®. Además, dicha definición de agentes quimioterapéuticos incluye bisfosfonatos tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® u OSTAC®), etidronato DIDROCAL®, NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato ZOMETA®, alendronato FOSAMAX®, pamidronato AREDIA®, tiludronato SKELID® o risedronato ACTONEL®; así como troxacitabina (un análogo de 1,3-dioxolano de nucleósido de citosina); oligonucleótidos antisentido, particularmente los que inhiben la expresión de genes en las rutas de señalización implicadas en la proliferación de células aberrantes, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras y receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas tales como vacuna de THERATOPE® y vacunas de terapia génica, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN® y vacuna VAXID®; inhibidor de topoisomerasa 1 LURTOTECAN®; rmRH ABARELIX®; ditosilato de lapatinib (un inhibidor de moléculas pequeñas tirosina quinasa doble de ErbB-2 y EGFR también conocido como GW572016); y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

Un "agente inhibidor del crecimiento" cuando se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o una composición que inhibe el crecimiento de una célula *in vitro* o *in vivo*. Por lo tanto, el agente inhibidor del crecimiento puede ser uno que reduzca significativamente el porcentaje de células en fase S. Los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un lugar distinto de la fase S), tales como agentes que inducen detención en G1 y detención en fase M. Los bloqueadores de fase M clásicos incluyen las vincas (por ejemplo, vincristina y vinblastina), taxanos e inhibidores de topoisomerasa II tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Los agentes que detienen G1 también tienen efectos en detención en fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo y ara-C. Puede encontrarse información adicional en *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn e Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" por Murakami *et al.* (WB Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente p. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos antineoplásicos derivados ambos del tejo. Docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo, es un análogo semisintético de paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). Paclitaxel y docetaxel promueven el ensamblaje de microtúbulos de dímeros de tubulina y estabilizan microtúbulos evitando la despolimerización, lo que da como resultado la inhibición de mitosis en células.

"Terapia antineoplásica" como se usa en el presente documento se refiere a un tratamiento que reduce o inhibe el cáncer en un sujeto. Los ejemplos de terapia antineoplásica incluyen radioterapia citotóxica así como la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente citotóxico, un agente quimioterapéutico, un agente inhibidor del crecimiento, una vacuna de cáncer, un inhibidor de angiogénesis, un profármaco, una citocina, un antagonista de citocina, un corticosteroide, un agente inmunosupresor, un antiemético, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, o un analgésico al sujeto.

El término "profármaco" como se usa en la presente solicitud se refiere a un precursor o forma derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxica para células tumorales en comparación con el fármaco parental y es capaz de activarse enzimáticamente o convertirse en la forma parental más activa. Véase, por ejemplo, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" *Biochemical Society Transactions*, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) y Stella *et al.*, "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," *Directed Drug Delivery*, Borchardt *et al.*, (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985). Los profármacos incluyen, pero sin limitación, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptido, profármacos modificados con D-aminoácido, profármacos glucosilados, profármacos que contienen beta-lactama, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituida o profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituida, 5-fluorocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina que pueden convertirse en el fármaco libre citotóxico más activo. Los ejemplos de fármacos citotóxicos que pueden derivatizarse en una forma de profármaco incluyen, pero sin limitación, los agentes quimioterapéuticos descritos anteriormente.

El término "citocina" es un término genérico para proteínas liberadas por una población celular que actúan en otra célula como mediadores intercelulares. Son ejemplos de dichas citocinas linfocinas, monocinas y hormonas polipeptídicas tradicionales. Se incluyen entre las citocinas hormona del crecimiento tal como hormona del

5 crecimiento humana (HGH), hormona del crecimiento humana de N-metionilo y hormona del crecimiento bovina; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorrelaxina; hormonas glucoproteicas tales como hormona estimulante del folículo (FSH), hormona estimulante de tiroides (TSH) y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos (FGF);
 10 prolactina; lactógeno placentario; factor de necrosis tumoral alfa y beta; sustancia inhibidora mulleriana; péptido asociado con gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso tales como NGF-alfa; factor de crecimiento plaquetario; factores de crecimiento transformante (TGF) tales como TGF-alfa y TGF-beta; factor de crecimiento de tipo insulina I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductores; interferones tales como interferón-alfa, -beta y -gamma, factores
 15 estimulantes de colonias (CSF), tales como CSF de macrófagos (M-CSF); CSF de granulocitos y macrófagos (GM-CSF); y CSF de granulocitos (G-CSF); interleucinas (IL) tales como IL-1, IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-18 un factor de necrosis tumoral tal como TNF-alfa o TNF-beta; y otros factores polipeptídicos incluyendo LIF y ligando de kit (KL). Como se usa en el presente documento, el término citocina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente
 20 activos de las citocinas de secuencia nativa.

Por "antagonista de citocinas" se entiende una molécula que parcialmente o completamente bloquea, inhibe o neutraliza una actividad biológica de al menos una citocina. Por ejemplo, los antagonistas de citocinas pueden inhibir la actividad de citocinas inhibiendo la expresión y/o secreción de citocinas, o mediante unión con una citocina o con un receptor de citocina. Los antagonistas de citocinas incluyen anticuerpos, péptidos sintéticos o de secuencia nativa, inmunoadhesinas y antagonistas de moléculas pequeñas que se unen con una citocina o con un receptor de citocina. El antagonista de citocina se conjuga opcionalmente con o se fusiona con un agente citotóxico. Son antagonistas de TNF ejemplares etanercept (ENBREL®), infliximab (REMICADE®) y adalimumab (HUMIRA™).

25 La expresión "agente inmunosupresor" como se usa en el presente documento se refiere a sustancias que actúan para suprimir o enmascarar el sistema inmunitario del sujeto que se trata. Esto incluye sustancias que suprimen la producción de citocinas, regulan negativamente o suprimen la expresión de autoantígeno, o enmascaran los antígenos del MHC. Los ejemplos de agentes inmunosupresores incluyen pirimidinas 2-amino-6-aryl-5 sustituidas (véase Patente de Estados Unidos n.º 4.665.077); mofetil micofenolato tal como CELLCEPT®; azatioprina (IMURAN®, AZASAN®/6-mercaptopurina; bromocriptina; danazol; dapsona; glutaraldehído (que enmascara los antígenos del MHC, como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 4.120.649); anticuerpos antiidiotípicos para antígenos del MHC y fragmentos del MHC; ciclosporina A; esteroides tales como corticosteroides y glucocorticosteroides, por ejemplo prednisona, prednisolona tal como PEDIAPRED® (fosfato sódico de prednisolona) u ORAPRED® (solución oral de fosfato sódico de prednisolona), metilprednisolona y dexametasona; metotrexato (oral o subcutáneo) (RHEUMATREX®, TREXALL™); hidroxicloroquina/cloroquina; sulfasalazina; leflunomida; antagonistas de citocinas o receptores de citocinas incluyendo anticuerpos anti-interferón γ , β o α , anticuerpos antifactor de necrosis tumoral α (infliximab o adalimumab), inmunoadhesina anti-TNF α (ENBREL®, etanercept), anticuerpos antifactor de necrosis tumoral β , anticuerpos anti-interleucina-2 y anticuerpos antirreceptor de IL-2; anticuerpos anti-LFA-1, incluyendo anticuerpos anti-CD11 y anti-CD18; anticuerpos anti-L3T4; globulina anti-linfocitos heteróloga; anticuerpos policlonales o pan-T o anticuerpos monoclonales anti-CD3 o anti-CD4/CD4a; péptido soluble que contiene un dominio de unión a LFA-3 (documento WO 90/08187); estreptoquinasa; TGF- β ; estreptodornasa; ARN o ADN del hospedador; FK506; RS-61443; desoxiespergualina; rapamicina; receptor de linfocitos T (Cohen *et al.*, patente de Estados Unidos n.º 5.114.721); fragmentos de receptores de linfocitos T (Offner *et al.* Science 251: 430-432 (1991); documento WO 90/11294; laneway, Nature 341: 482 (1989); y documento WO 91/01133); anticuerpos del receptor de linfocitos T (documento EP 340.109) tal como T10B9; ciclofosfamida (CYTOXAN®); dapsona; penicilamina (CUPRIMINE®); intercambios de plasma; o inmunoglobulina intravenosa (IVIG). Estos pueden usarse solos o en combinación entre sí, particularmente combinaciones de esteroide y otro agente inmunosupresor o dichas combinaciones seguidas de una dosis de mantenimiento con un agente no esteroideo para reducir la necesidad de esteroides.

50 Un "analgésico" se refiere a un fármaco que actúa para inhibir o suprimir el dolor en un sujeto. Los analgésicos ejemplares incluyen fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) incluyendo ibuprofeno (MOTRIN®), naproxeno (NAPROSYN®), ácido acetilsalicílico, indometacina, sulindac y tolmetina, incluyendo sales y derivados de los mismos, así como diversas otras medicaciones usadas para reducir los dolores punzantes que puedan aparecer, incluyendo anticonvulsivos (gabapentina, fenitoína, carbamazepina) o antidepresivos tricíclicos. Los ejemplos específicos incluyen paracetamol, aspirina, amitriptilina (ELAVIL®), carbamazepina (TEGRETOL®), fenitoína (DILANTIN®), gabapentina (NEURONTIN®), (E)-N-vanilil-8-metil-6-noneamida (CAPSAICIN®), o un bloqueador nervioso.

60 "Corticosteroide" se refiere a una cualquiera de varias sustancias de origen natural o sintéticas con la estructura química general de esteroides que imitan o aumentan los efectos de los corticosteroides de origen natural. Los ejemplos de corticosteroides sintéticos incluyen prednisona, prednisolona (incluyendo metilprednisolona), triamcinolona de dexametasona y betametasona.

65 Una "vacuna de cáncer" como se usa en el presente documento es una composición que estimula una respuesta inmunitaria en un sujeto contra un cáncer. Las vacunas de cáncer típicamente consisten en una fuente de material o

células asociados a cáncer (antígeno) que pueden ser autólogos (del mismo) o alogénicos (de otros) con respecto al sujeto, junto con otros componentes (por ejemplo, adyuvantes) para estimular adicionalmente y reforzar la respuesta inmunitaria contra el antígeno. Las vacunas de cáncer pueden dar como resultado la estimulación del sistema inmunitario del sujeto para producir anticuerpos para uno o varios antígenos específicos y/o para producir linfocitos T citotóxicos para atacar células cancerosas que tienen esos antígenos.

"Radioterapia citotóxica" como se usa en el presente documento se refiere a terapia de radiación que inhibe o previene la función de células y/o provoca la destrucción de células. La terapia de radiación puede incluir, por ejemplo, irradiación de haz externo o terapia con un agente marcado radiactivo, tal como un anticuerpo. Se pretende que la expresión incluya uso de isótopos radiactivos (por ejemplo ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{223}Ra , ^{32}P e isótopos radiactivos de Lu).

Un "sujeto" es un vertebrado, tal como un mamífero, por ejemplo un ser humano. Los mamíferos incluyen, pero sin limitación, animales de granja (tales como vacas), animales deportivos, mascotas (tales como perros, gatos y caballos), primates, ratones y ratas.

Excepto cuando el contexto indica otra cosa, los términos "primer" polipéptido y "segundo" polipéptido, y variaciones de los mismos, son únicamente identificadores genéricos, y no debe interpretarse que identifiquen un polipéptido o componente específico o particular de anticuerpos descritos en el presente documento.

Se usaron reactivos disponibles en el mercado a los que se hace referencia en los ejemplos de acuerdo con las instrucciones del fabricante a no ser que se indique de otro modo. La fuente de esas células identificadas en los siguientes Ejemplos, y a lo largo de la memoria descriptiva, mediante números de referencia de ATCC es la colección americana de cultivos tipo, Manassas, VA. A no ser que se indique de otro modo, se usan en el presente documento procedimientos convencionales de tecnología de ADN recombinante, tales como los descritos anteriormente en el presente documento y en los siguientes libros de texto: Sambrook *et al.*, mencionado anteriormente; Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology (Green Publishing Associates and Wiley Interscience, Nueva York, 1989); Innis *et al.*, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Academic Press, Inc., Nueva York, 1990); Harlow *et al.*, Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, 1988); Gait, Oligonucleotide Synthesis (IRL Press, Oxford, 1984); Freshney, Animal Cell Culture, 1987; Coligan *et al.*, Current Protocols in Immunology, 1991.

A lo largo de la presente memoria descriptiva y reivindicaciones, se entenderá que la palabra "comprender", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", implica la inclusión de un número entero o grupo de números enteros indicado pero no la exclusión de ningún otro número entero o grupo de números enteros.

II. Construcción de proteínas heteromultiméricas

Típicamente, las proteínas heteromultiméricas descritas en el presente documento comprenderán una parte significativa de una región Fc de anticuerpo. En otros aspectos, sin embargo, la cadena pesada comprende solamente una parte de los dominios C_{H1} , C_{H2} y/o C_{H3} .

Dominios de heteromultimerización

Las proteínas heteromultiméricas comprenden un dominio de heteromultimerización. Para generar una población sustancialmente homogénea de molécula heterodimérica, el dominio de heterodimerización debe tener una fuerte preferencia por formar heterodímeros frente a homodímeros. Aunque las proteínas heteromultiméricas ejemplificadas en el presente documento usan la tecnología de botones en ojales para facilitar la heteromultimerización, los expertos en la materia apreciarán otros dominios de heteromultimerización útiles en la presente invención.

Botones en ojales

El uso de botones en ojales como un método para producir anticuerpos multiespecíficos se conoce bien en la técnica. Véase patente de Estados Unidos n.º 5.731.168 concedida en 24 de marzo de 1998 asignada a Genentech, PCT Pub. n.º WO2009089004 publicada el 16 de julio de 2009 y asignada a Amgen, y patente de Estados Unidos Pub. N.º 20090182127 publicada el 16 de julio de 2009 y asignada a Novo Nordisk A/S. Véase también Marvin y Zhu, Acta Pharmacologica Sincia (2005) 26(6): 649-658 y Kontermann (2005) Acta Pharmacol. Sin., 26: 1-9. Se proporciona en el presente documento un breve análisis.

Una "protuberancia" se refiere a al menos una cadena lateral de aminoácido que se proyecta desde la interfaz de un primer polipéptido y se puede situar por lo tanto en una cavidad compensatoria en la interfaz adyacente (es decir la interfaz de un segundo polipéptido) para estabilizar el heteromultímero, y de este modo favorecer la formación de heteromultímero frente a la formación de homomultímero, por ejemplo. La protuberancia puede existir en la interfaz original o puede introducirse sintéticamente (por ejemplo alterando el ácido nucleico que codifica la interfaz). Normalmente, el ácido nucleico que codifica la interfaz del primer polipéptido se altera para codificar la

- 5 protuberancia. Para conseguir esto, el ácido nucleico que codifica al menos un resto de aminoácido "original" en la interfaz del primer polipéptido se reemplaza con ácido nucleico que codifica al menos un resto de aminoácido "importado" que tiene un volumen de cadena lateral mayor que el resto de aminoácido original. Se apreciará que puede haber más de un resto importado original y correspondiente. El límite superior para el número de restos originales que se reemplazan es el número total de restos en la interfaz del primer polipéptido. Los volúmenes de cadena lateral de los diversos restos de aminoácidos se muestran en la siguiente tabla.

TABLA 1

Propiedades de restos de aminoácidos				
Aminoácido	Abreviatura de una letra	MASA ^a (daltons)	VOLUMEN ^b (Angstrom ³)	Área de superficie accesible ^c (Angstrom ²)
Alanina (Ala)	A	71,08	88,6	115
Arginina (Arg)	R	156,20	173,4	225
Asparagina (Asn)	N	114,11	117,7	160
Ácido aspártico(Asp)	D	115,09	111,1	150
Cisteína (Cys)	C	103,14	108,5	135
Glutamina (Gln)	Q	128,14	143,9	180
Ácido glutámico (Glu)	E	129,12	138,4	190
Glicina (Gly)	G	57,06	60,1	75
Histidina (His)	H	137,15	153,2	195
Isoleucina (Ile)	I	113,17	166,7	175
Leucina (Leu)	L	113,17	166,7	170
Lisina (Lys)	K	128,18	168,6	200
Metionina (Met)	M	131,21	162,9	185
Fenilalanina (Phe)	F	147,18	189,9	210
Prolina (Pro)	P	97,12	122,7	145
Serina (Ser)	S	87,08	89,0	115
Treonina (Thr)	T	101,11	116,1	140
Triptófano (Trp)	W	186,21	227,8	255
Tirosina (Tyr)	Y	163,18	193,6	230
Valina (Val)	V	99,14	140,0	155

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

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

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

- 10 Los restos importados preferidos para la formación de una protuberancia son en general restos de aminoácidos de origen natural y se seleccionan preferentemente de arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W). Se prefieren más triptófano y tirosina. En una realización, el resto original para la formación de la protuberancia tiene un volumen de cadena lateral pequeño, tal como alanina, asparagina, ácido aspártico, glicina, serina, treonina o valina.
- 15 Una "cavidad" se refiere a al menos una cadena lateral de aminoácido que forma un hueco desde la interfaz de un segundo polipéptido y por lo tanto se ajusta a una protuberancia correspondiente en la interfaz adyacente de un primer polipéptido. La cavidad puede existir en la interfaz original o puede introducirse de forma sintética (por ejemplo alterando el ácido nucleico que codifica la interfaz). Normalmente, el ácido nucleico que codifica la interfaz del segundo polipéptido se altera para codificar la cavidad. Para conseguir esto, el ácido nucleico que codifica al menos un resto de aminoácido "original" en la interfaz del segundo polipéptido se reemplaza con ADN que codifica al menos un resto de aminoácido "importado" que tiene un volumen de cadena lateral menor que el resto de aminoácido original. Se apreciará que puede haber más de un resto importado original y correspondiente. El límite superior para el número de restos originales que se reemplazan es el número total de restos en la interfaz del segundo polipéptido. Los volúmenes de cadena lateral de los diversos restos de aminoácidos se han mostrado en la
- 20 Tabla 1 anterior. Los restos importados preferidos para la formación de la cavidad son habitualmente restos de aminoácidos de origen natural y se seleccionan preferentemente de alanina (A), serina (S), treonina (T) y valina (V). Se prefieren más serina, alanina o treonina. En una realización, el resto original para la formación de la cavidad tiene un volumen de cadena lateral grande, tal como tirosina, arginina, fenilalanina o triptófano
- 25
- 30 Un resto de aminoácido "original" es uno que se reemplaza por un resto "importado" que puede tener un volumen de cadena lateral menor o mayor que el resto original. El resto de aminoácido importado puede ser un resto de aminoácido de origen natural o de origen no natural, pero preferentemente es el primero. Son restos de aminoácidos "de origen natural" los restos codificados por el código genético y enumerados en la Tabla 1 anterior. Por resto de aminoácido "de origen no natural" se entiende un resto que no está codificado por el código genético, pero que es
- 35 capaz de unirse covalentemente con resto o restos de aminoácidos adyacentes en la cadena polipeptídica. Son ejemplos de restos de aminoácidos de origen no natural norleucina, ornitina, norvalina, homoserina y otros análogos de restos de aminoácidos tales como los descritos en Ellman *et al.*, Meth. Enzym. 202: 301-336 (1991), por ejemplo.

Para generar dichos restos de aminoácidos de origen no natural, pueden usarse los procedimientos de Noren *et al.* Science 244: 182 (1989) y Ellman *et al.*, mencionado anteriormente. Brevemente, esto implica activar químicamente un ARNt supresor con un resto de aminoácido de origen no natural seguido de transcripción y traducción *in vitro* del ARN. El método descrito en el presente documento implica reemplazar al menos un resto de aminoácido original, pero puede reemplazarse más de un resto original. Normalmente, no más de los restos totales en la interfaz del primer o segundo polipéptido comprenderán restos de aminoácidos originales que se reemplazan. Típicamente, los restos originales para reemplazo están "internados". Por "internado" se entiende que el resto está esencialmente inaccesible al disolvente. En general, el resto importado no es cisteína para evitar la posible oxidación o el posible desapareamiento de enlaces disulfuro.

La protuberancia es "posicionable" en la cavidad lo que significa que la localización espacial de la protuberancia en la cavidad de la interfaz de un primer polipéptido y segundo polipéptido respectivamente y los tamaños de la protuberancia y la cavidad son tales que la protuberancia puede localizarse en la cavidad sin alterar significativamente la asociación normal del primer y el segundo polipéptidos en la interfaz. Ya que las protuberancias tales como Tyr, Phe y Trp no se extienden típicamente en dirección perpendicular desde el eje de la interfaz y tienen conformaciones preferidas, el alineamiento de una protuberancia con una cavidad correspondiente se basa en la modelación del par de protuberancia/cavidad basándose en una estructura tridimensional tal como la obtenida por cristalografía de rayos X o resonancia magnética nuclear (RMN). Esto puede conseguirse usando técnicas ampliamente aceptadas en este campo.

Por "ácido nucleico original o molde" se entiende el ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés que puede "alterarse" (es decir modificarse por ingeniería genética o mutarse) para codificar una protuberancia o cavidad. El ácido nucleico original o de partida puede ser un ácido nucleico de origen natural o puede comprender un ácido nucleico que se ha sometido a alteración previa (por ejemplo un fragmento de anticuerpo humanizado). Por "alterar" el ácido nucleico se entiende que el ácido nucleico original se muta insertando, suprimiendo o reemplazando al menos un codón que codifica un resto de aminoácido de interés. Normalmente, un codón que codifica un resto original se reemplaza por un codón que codifica un resto importado. Se han revisado técnicas para modificar genéticamente un ADN de esta manera en Mutagenesis: a Practical Approach, M. J. McPherson, Ed., (IRL Press, Oxford, Reino Unido. (1991)), e incluye mutagénesis dirigida, mutagénesis por casete y mutagénesis de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), por ejemplo. Mutando un ácido nucleico original/molde, se altera por lo tanto de forma correspondiente un polipéptido original/molde codificado por el ácido nucleico original/molde.

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

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

III. Vectores, células hospedadoras y métodos recombinantes

Para producción recombinante de una proteína heteromultimérica (por ejemplo, un anticuerpo) descrita en el presente documento, el ácido nucleico que la codifica se aísla y se inserta en un vector replicable para clonación adicional (amplificación del ADN) o para expresión. El ADN que codifica el anticuerpo se aísla y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente con genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo). Están disponibles muchos vectores. La elección del vector depende en parte de la célula hospedadora para usar. Generalmente, las células hospedadoras preferidas son de origen procariota o eucariota (generalmente mamíferos, pero también incluyendo células de hongos (por ejemplo, levadura), insectos, plantas y nucleadas de otros organismos multicelulares). Se apreciará que pueden usarse regiones constantes de cualquier isotipo para este fin, incluyendo regiones constantes de IgG, IgM, IgA, IgD y IgE, y que dichas regiones constantes pueden obtenerse de cualquier especie humana o animal.

a. Generar proteínas heteromultiméricas usando células hospedadoras procariotas

i. Construcción de vector

Pueden obtenerse secuencias polinucleotídicas que codifican componentes polipeptídicos de las proteínas heteromultiméricas (por ejemplo, un anticuerpo) descritas en el presente documento usando técnicas recombinantes convencionales. Las secuencias polinucleotídicas deseadas pueden aislarse y secuenciarse a partir de, por ejemplo, células productoras de anticuerpos tales como hibridoma. Como alternativa, pueden sintetizarse polinucleótidos

usando sintetizadores de nucleótidos o técnicas de PCR. Una vez obtenidas, las secuencias que codifican los polipéptidos se insertan en un vector recombinante capaz de replicar y expresar polinucleótidos heterólogos en hospedadores procariotas. Muchos vectores que están disponibles y se conocen en la técnica pueden usarse para el fin de la presente invención. La selección de un vector apropiado dependerá principalmente del tamaño de los ácidos nucleicos para insertar en el vector y la célula hospedadora particular para transformar con el vector. Cada vector contiene diversos componentes, dependiendo de su función (amplificación o expresión de polinucleótido heterólogo, o ambas) y su compatibilidad con la célula hospedadora particular en la que reside. Los componentes del vector generalmente incluyen pero sin limitación: un origen de replicación, un gen marcador de selección, un promotor, un sitio de unión a ribosomas (RBS), una secuencia señal, el inserto de ácido nucleico heterólogo y una secuencia de terminación de la transcripción.

En general, se usan vectores plasmídicos que contienen secuencias de replicón y de control que derivan de especies compatibles con la célula hospedadora en relación con estos hospedadores. El vector porta habitualmente un sitio de replicación, así como secuencias marcadoras que son capaces de proporcionar selección fenotípica en células transformadas. Por ejemplo, *E. coli* se transforma típicamente usando pBR322, un plásmido derivado de una especie de *E. coli*. pBR322 contiene genes que codifican resistencia a ampicilina (Amp) y tetraciclina (Tet) y por lo tanto proporciona medios sencillos para identificar células transformadas. pBR322, sus derivados, u otros plásmidos microbianos o bacteriófagos también pueden contener, o modificarse para contener, promotores que puede usar el organismo microbiano para expresión de proteínas endógenas. Se describen ejemplos de derivados de pBR322 usados para expresión de anticuerpos particulares en detalle en Carter *et al.*, Patente de Estados Unidos N.º 5.648.237.

Además, pueden usarse vectores de fagos que contienen secuencias de replicón y de control que son compatibles con el microorganismo hospedador como vectores transformantes en relación con estos hospedadores. Por ejemplo, puede utilizarse bacteriófago tal como γ GEM.TM.-11 en la preparación de un vector recombinante que puede usarse para transformar células hospedadoras susceptibles tales como *E. coli* LE392.

El vector de expresión descrito en el presente documento puede comprender dos o más pares de promotor-cistrón, que codifican cada uno de los componentes polipeptídicos. Un promotor es una secuencia reguladora no traducida localizada cadena arriba (5') de un cistrón que modula su expresión. Los promotores procariotas típicamente se clasifican en dos clases, inducibles y constitutivos. Un promotor inducible es un promotor que inicia niveles aumentados de transcripción del cistrón bajo su control en respuesta a cambios en las condiciones de cultivo, por ejemplo, la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio de temperatura.

Se conoce bien un gran número de promotores reconocidos por una diversidad de células hospedadoras potenciales. El promotor seleccionado puede unirse operativamente con ADN cistrónico que codifica, por ejemplo, la cadena ligera o pesada retirando el promotor del ADN fuente mediante digestión con enzimas de restricción e insertando la secuencia promotora aislada en el vector descrito en el presente documento. Tanto la secuencia promotora nativa como muchos promotores heterólogos pueden usarse para amplificación y/o expresión directa de los genes diana. En algunas realizaciones, se utilizan promotores heterólogos, ya que permiten en general mayor transcripción y mayores rendimientos del gen diana expresado en comparación con el promotor polipeptídico diana nativo.

Los promotores adecuados para uso con hospedadores procariotas incluyen el promotor de PhoA, los sistemas promotores de β -galactamasa y lactosa, un sistema promotor de triptófano (*trp*) y promotores híbridos tales como el promotor de *tac* o *trc*. Sin embargo, otros promotores que son funcionales en bacterias (tales como otros promotores bacterianos o de fagos conocidos) también son adecuados. Sus secuencias de nucleótidos se han publicado, permitiendo de este modo que un trabajador experto los ligue operativamente con cistrones que codifican los genes de la proteína heteromultimérica, por ejemplo, las cadenas ligera y pesada diana (Siebenlist *et al.*, (1980) Cell 20: 269), usando enlazadores o adaptadores para aportar cualquier sitio de restricción requerido.

En un aspecto de la invención, cada cistrón dentro del vector recombinante comprende un componente de secuencia señal de secreción que dirige la traslocación de los polipéptidos expresados a través de una membrana. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector o puede ser parte del ADN polipeptídico diana que se inserta en el vector. La secuencia señal seleccionada para el fin de la presente invención debería ser una que se reconozca y procese (es decir, se escinda por una peptidasa señal) por la célula hospedadora. Para células hospedadoras procariotas que no reconocen y procesan las secuencias señal nativas de los polipéptidos heterólogos, la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo que consiste en la fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp o líderes de enterotoxina termoestable II (STII), LamB, PhoE, PelB, OmpA y MBP. En una realización, las secuencias señal usadas en ambos cistrones del sistema de expresión son secuencias señal de STII o variantes de las mismas.

En otro aspecto, la producción de las inmunoglobulinas de acuerdo con la invención puede suceder en el citoplasma de la célula hospedadora, y por lo tanto no requiere la presencia de secuencias señal de secreción dentro de cada cistrón. A este respecto, se expresan cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulina, se pliegan y se ensamblan para formar inmunoglobulinas funcionales dentro del citoplasma. Ciertas cepas hospedadoras (por ejemplo, las

cepas de *E. coli trxB*) proporcionan condiciones de citoplasma que son favorables para la formación de enlaces disulfuro, permitiendo de este modo el plegamiento y ensamblaje apropiado de subunidades proteicas expresadas. Véase, Proba y Pluckthun Gene, 159: 203 (1995).

5 Las células hospedadoras procariotas adecuadas para expresar proteínas heteromultiméricas (por ejemplo, anticuerpos) como se describe en el presente documento incluyen Arqueobacterias y Eubacterias, tales como organismos Gram negativos o Gram positivos. Los ejemplos de bacterias útiles incluyen *Escherichia* (por ejemplo, *E. coli*), Bacilos (por ejemplo, *B. subtilis*), Enterobacterias, especies de *Pseudomonas* (por ejemplo, *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescans*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla* o *Paracoccus*. En una realización, se usan células gram negativas. En una realización, se usan células de *E. coli* como hospedadores. Los ejemplos de cepas de *E. coli* incluyen la cepa W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219; N.º de Depósito de ATCC 27.325) y derivados de la misma, incluyendo la cepa 33D3 que tiene el genotipo W3110 $\Delta fhua$ ($\Delta tonA$) *ptr3 lac lq lacL8* $\Delta ompT\Delta(nmpc-fepE)$ *degP41 kan^R* (Patente de Estados Unidos N.º. 5.639.635). Otras cepas y derivados de las mismas, tales como *E. coli* 294 (ATCC 31.446), *E. coli* B, *E. coli*, 1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* RV308 (ATCC 31.608) también son adecuados. En una realización, *E. coli* Δlpp encuentra uso particular. Estos ejemplos son ilustrativos más que limitantes. Se conocen en la técnica métodos para construir derivados de cualquiera de las bacterias anteriormente mencionadas que tienen genotipos definidos y se describen en, por ejemplo, Bass *et al.*, Proteins, 8: 309-314 (1990). Es necesario en general seleccionar las bacterias apropiadas teniendo en consideración la capacidad de replicación del replicón en las células de una bacteria. Por ejemplo, *E. coli*, especies de *Serratia* o de *Salmonella* pueden usarse convenientemente como el hospedador cuando se usen plásmidos bien conocidos tales como pBR322, pBR325, pACYC177 o pKN410 para proveer el replicón. Típicamente la célula hospedadora debería secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas y pueden incorporarse convenientemente inhibidores de proteasa adicionales en el cultivo celular.

25 ii. Producción de polipéptidos

Se transforman células hospedadoras con los vectores de expresión descritos anteriormente y se cultivan en medio nutriente convencional modificado según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

La transformación significa introducir ADN en el hospedador procariota de modo que el ADN sea replicable, bien como un elemento extracromosómico o mediante integrante cromosómico. Dependiendo de la célula hospedadora usada, la transformación se realiza usando técnicas convencionales apropiadas para dichas células. El tratamiento de calcio que emplea cloruro de calcio se usa en general para células bacterianas que contienen barreras de pared celular sustanciales. Otro método para transformación emplea polietilenglicol/DMSO. Otra técnica más usada es electroporación.

Las células procariotas usadas para producir los polipéptidos descritos en el presente documento se cultivan en medios conocidos en la técnica y adecuados para cultivo de las células hospedadoras seleccionadas. Los ejemplos de medios adecuados incluyen caldo de cultivo Luria (LB) más complementos de nutrientes necesarios. En algunas realizaciones, el medio también contiene un agente de selección, seleccionado basándose en la construcción del vector de expresión, para permitir selectivamente el crecimiento células procariotas que contienen el vector de expresión. Por ejemplo, se añade ampicilina al medio para cultivo de células que expresan gen resistente a ampicilina.

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

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

Si se usa un promotor inducible en el vector de expresión descrito en el presente documento, se induce expresión de proteínas en condiciones adecuadas para la activación del promotor. En un aspecto de la invención, se usan promotores de PhoA para controlar la transcripción de los polipéptidos. En consecuencia, las células hospedadoras transformadas se cultivan en un medio con fosfato limitante para inducción. Preferentemente, el medio con fosfato limitante es el medio C.R.A.P. (véase, por ejemplo, Simmons *et al.*, J. Immunol. Methods (2002), 263: 133-147). Puede usarse una diversidad de otros inductores, de acuerdo con la construcción de vector empleada, como se conoce en la técnica.

En una realización, la primera y la segunda células hospedadoras que contienen bisagras se cultivan por separado y los polipéptidos expresados se secretan al y se recuperan del periplasma de las células hospedadoras por separado. En una segunda realización, la primera y la segunda células hospedadoras que contienen bisagras se cultivan por separado y antes del aislamiento de los polipéptidos que contienen bisagras, los dos cultivos de células hospedadoras se mezclan entre sí y las células se sedimentan. En una tercera realización, la primera y la segunda células hospedadoras que contienen bisagras se cultivan por separado, se centrifugan y se resuspenden por separado y después se mezclan entre sí antes del aislamiento de los polipéptidos que contienen bisagras. En una cuarta realización, la primera y la segunda células hospedadoras que contienen bisagras se cultivan juntas en el mismo recipiente de cultivo. La recuperación de proteínas típicamente implica romper la membrana celular del microorganismo, generalmente por medios tales como choque osmótico, ultrasonidos o lisis. Una vez que se han roto las células, el residuo celular o las células completas pueden retirarse por centrifugación o filtración. Las proteínas pueden purificarse adicionalmente, por ejemplo, mediante cromatografía en resina de afinidad. Como alternativa, las proteínas pueden transportarse al medio de cultivo y aislarse en el mismo. Las células pueden retirarse del cultivo y el sobrenadante de cultivo que se filtra y concentrarse para purificación adicional de las proteínas producidas. Los polipéptidos expresados pueden aislarse e identificarse adicionalmente usando métodos conocidos habitualmente tales como electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y ensayo de transferencia de Western. Los polipéptidos aislados se usarán para producir las proteínas heteromultiméricas.

En un aspecto de la invención, se realiza producción de proteína heteromultimérica (por ejemplo, anticuerpo) en gran cantidad por un proceso de fermentación. Están disponibles diversos procedimientos de fermentación semidiscontinuos a gran escala para producción de proteínas recombinantes. Las fermentaciones a gran escala tienen al menos 1000 litros de capacidad, preferentemente de aproximadamente 1000 a 100.000 litros de capacidad. Estos fermentadores usan propulsores agitadores para distribuir oxígeno y nutrientes, especialmente glucosa (la fuente de energía/carbono preferida). La fermentación a gran escala se refiere en general a fermentación en un fermentador que no tiene más de aproximadamente 100 litros de capacidad volumétrica, y puede variar de aproximadamente 1 litro a aproximadamente 100 litros.

En un proceso de fermentación, la inducción de expresión de proteínas se inicia típicamente después de haberse cultivado las células en condiciones adecuadas hasta una densidad deseada, por ejemplo, una DO_{550} de aproximadamente 180-220, en cuyo estadio las células están en la fase estacionaria temprana. Puede usarse una diversidad de inductores, de acuerdo con la construcción de vector empleada, como se conoce en la técnica y se ha descrito anteriormente. Las células pueden cultivarse durante periodos más cortos antes de la inducción. Las células se inducen habitualmente durante 12-50 horas, aunque puede usarse tiempo de incubación más largo o más corto.

Para mejorar el rendimiento de producción y la calidad de los polipéptidos descritos en el presente documento, pueden modificarse diversas condiciones de fermentación. Por ejemplo, para mejorar el ensamblaje y plegamiento apropiado de las proteínas heteromultiméricas secretadas (por ejemplo, anticuerpos), pueden usarse vectores adicionales que sobreexpresan proteínas chaperonas, tales como proteínas de Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD y/o DsbG) o FkpA (una peptidilpropil cis,trans-isomerasa con actividad de chaperona) para co-transformar las células procariontas hospedadoras. Se ha demostrado que las proteínas chaperonas facilitan el plegamiento y la solubilidad apropiados de proteínas heterólogas producidas en células hospedadoras bacterianas. Chen *et al.* (1999) *J Bio Chem* 274: 19601-19605; Georgiou *et al.*, Patente de Estados Unidos N.º 6.083.715; Georgiou *et al.*, Patente de Estados Unidos N.º 6.027.888; Bothmann y Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275: 17100-17105; Ramm y Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275: 17106-17113; Arie *et al.* (2001) *Mol. Microbiol.* 39: 199-210.

Para minimizar la proteólisis de proteínas heterólogas expresadas (especialmente las que son proteolíticamente sensibles), ciertas cepas hospedadoras deficientes para enzimas proteolíticas pueden usarse para la presente invención. Por ejemplo, pueden modificarse cepas de células hospedadoras para efectuar una mutación o mutaciones genéticas en los genes que codifican proteasas bacterianas conocidas tales como Proteasa III, OmpT, DegP, Tsp, Proteasa I, Proteasa Mi, Proteasa V, Proteasa VI y combinaciones de las mismas. Algunas cepas deficientes en proteasa de *E. coli* están disponibles y se describen en, por ejemplo, Joly *et al.* (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 2773-2777; Georgiou *et al.*, Patente de Estados Unidos N.º 5.264.365; Georgiou *et al.*, Patente de Estados Unidos N.º 5.508.192; Hara *et al.*, *Microbial Drug Resistance*, 2: 63-72 (1996).

En una realización, se usan cepas de *E. coli* deficientes para enzimas proteolíticas y transformadas con plásmidos que sobreexpresan una o más proteínas chaperonas como células hospedadoras en el sistema de expresión descrito en el presente documento. En una segunda realización, la cepa de *E. coli* es deficiente para una lipoproteína de una membrana externa (Δlpp).

iii. Purificación de proteínas heteromultiméricas

En una realización, la proteína heteromultimérica producida en el presente documento se purifica adicionalmente para obtener preparaciones que son sustancialmente homogéneas para ensayos y usos adicionales. Pueden emplearse métodos de purificación de proteínas convencionales conocidos en la técnica. Los siguientes procedimientos son ejemplares de procedimientos de purificación adecuados: fraccionamiento en columnas de inmunoafinidad o intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice o en

una resina de intercambio catiónico, tal como DEAE, cromatofoco, SDS-PAGE, precipitación con sulfato de amonio y filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75.

En un aspecto, la Proteína A inmovilizada en una fase sólida se usa para purificación de inmunoadfinidad de, por ejemplo, productos de anticuerpos de longitud completa como se describe en el presente documento. La proteína A es una proteína de pared celular de 41 kD de *Staphylococcus aureus* que se une con una alta afinidad con la región Fc de anticuerpos. Lindmark *et al.* (1983) *J. Immunol. Meth.* 62: 1-13. La fase sólida en la que se inmoviliza la Proteína A es preferentemente una columna que comprende una superficie de vidrio o sílice, más preferentemente una columna de vidrio de poro controlado o una columna de ácido silícico. En algunas aplicaciones, la columna se ha recubierto con un reactivo, tal como glicerol, en un intento de prevenir la adherencia no específica de contaminantes.

Como la primera etapa de purificación, la preparación derivada del cultivo celular como se ha descrito anteriormente se aplica a la fase sólida con Proteína A inmovilizada para permitir la unión específica del anticuerpo de interés con Proteína A. La fase sólida se lava después para retirar contaminantes unidos de forma no específica con la fase sólida. La proteína heteromultimérica (por ejemplo, anticuerpo) se recupera de la fase sólida por elución.

b. Generación de proteínas heteromultiméricas usando células hospedadoras eucariotas:

Los componentes de vector generalmente incluyen, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor, y una secuencia de terminación de la transcripción.

i. Componente de secuencia señal

Un vector para uso en una célula hospedadora eucariota también puede contener una secuencia señal u otro polipéptido que tenga un sitio de escisión específico en el extremo N terminal de la proteína madura o el polipéptido de interés. La secuencia señal heteróloga seleccionada preferentemente es una que se reconoce y procesa (es decir, se escinde por una peptidasa señal) por la célula hospedadora. En expresión de células de mamífero, están disponibles secuencia señal de mamífero, así como líderes secretores virales, por ejemplo, la señal de gD del herpes simple. El ADN para dicha región precursora se liga en fase de lectura con ADN que codifica la proteína o las proteínas heteromultiméricas deseadas (por ejemplo, anticuerpos).

ii. Origen de replicación

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

iii. Componente de gen de selección

Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también denominado marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) deficiencias auxotróficas de complemento, cuando sean relevantes, o (c) aportan nutrientes críticos no disponibles del medio complejo.

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

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

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

Como alternativa, pueden seleccionarse células hospedadoras (particularmente hospedadores de tipo silvestre que contienen DHFR endógeno) transformadas o co-transformadas con secuencias de ADN que codifican un anticuerpo, proteína de DHFR de tipo silvestre, y otro marcador seleccionable tal como aminoglucosido 3'-fosfotransferasa (APH) por cultivo celular en medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable tal como un antibiótico aminoglucosídico, por ejemplo, kanamicina, neomicina o G418. Véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N.º 4.965.199.

iv. Componente de promotor

Los vectores de expresión y clonación habitualmente contienen un promotor que el organismo hospedador reconoce y se unen operativamente con el ácido nucleico de polipéptido o polipéptidos que contienen bisagras deseadas (por ejemplo, anticuerpos). Se conocen secuencias promotoras para eucariotas. Prácticamente todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada de aproximadamente 25 a 30 bases cadena arriba del sitio en el que se inicia la transcripción. Otra secuencia hallada de 70 a 80 bases cadena arriba del inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT en la que N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de genes eucariotas hay una secuencia AATAAA que puede ser la señal para adición de la cola de poli A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan convenientemente en vectores de expresión eucariotas.

La transcripción de polipéptido o polipéptidos que contienen bisagras deseadas (por ejemplo, anticuerpo) de vectores en células hospedadoras de mamífero se controla, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus tales como, por ejemplo, virus del polio, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como Adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus de sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y Virus del Simio 40 (SV40), de promotores de mamíferos heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, o de promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células hospedadoras.

Los promotores temprano y tardío del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación viral SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción de HindIII E. Se desvela un sistema para expresar ADN en hospedadores mamíferos usando el virus del papiloma bovino como un vector en la Patente de Estados Unidos N.º 4.419.446. Se describe una modificación de este sistema en la Patente de Estados Unidos N.º 4.601.978. Véase también Reyes *et al.*, Nature 297: 598-601 (1982) sobre la expresión de ADNc de β -interferón humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina quinasa del virus del herpes simple. Como alternativa, puede usarse repetición terminal larga de Virus del Sarcoma de Rous como el promotor.

v. Componente de elemento potenciador

La transcripción de ADN que codifica el polipéptido o los polipéptidos que contienen bisagras deseadas (por ejemplo, anticuerpo) por eucariotas superiores puede aumentarse insertando una secuencia potenciadora en el vector. Muchas secuencias potenciadoras se conocen ahora a partir de genes de mamífero (por ejemplo, genes de globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). También, se puede usar un potenciador de un virus de célula eucariota. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador de promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polio en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, Nature 297: 17-18 (1982) para una descripción de elementos para potenciar la activación de promotores eucariotas. El potenciador puede cortarse y empalmarse en el vector en una posición 5' o 3' de la secuencia codificante de polipéptido de anticuerpo, siempre que se consiga potenciación, pero en general se localiza en un sitio 5' del promotor.

vi. Componente de terminación de la transcripción

Los vectores de expresión usados en células hospedadoras eucariotas contendrán también típicamente secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias están disponibles habitualmente en las regiones no traducidas 5', y ocasionalmente 3', de ADN o ADNc eucariotas o virales. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica un anticuerpo. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de hormona del crecimiento bovina. Véase el documento WO94/11026 y el vector de expresión desvelado en el mismo.

vii. Selección y transformación de células hospedadoras

Las células hospedadoras adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores del presente documento incluyen células eucariotas superiores descritas en el presente documento, incluyendo células hospedadoras de vertebrados. La propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo tisular) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Son ejemplos de líneas celulares hospedadoras de mamífero útiles la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para crecer en cultivo en suspensión, Graham *et al.*, J. Gen Virol. 36: 59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma del cuello uterino humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células

TRI (Mather *et al.*, Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

Las células hospedadoras se transforman con los vectores de expresión o clonación anteriormente descritos para producción de polipéptido o polipéptidos que contienen bisagras deseadas (por ejemplo, anticuerpo) y se cultivan en medio nutriente convencional modificado según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

viii. Cultivo de las células hospedadoras

Las células hospedadoras usadas para producir un polipéptido o polipéptidos que contienen bisagras deseadas (por ejemplo, anticuerpo) descritos en el presente documento pueden cultivarse en una diversidad de medios. Medios disponibles en el mercado tales como F10 de Ham (Sigma), Medio Esencial Mínimo ((MEM), Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y Medio de Eagle Modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para cultivar las células hospedadoras. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham *et al.*, Meth. Enz. 58: 44 (1979), Barnes *et al.*, Anal. Biochem. 102:255 (1980), Patentes de Estados Unidos N.º 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; documentos WO 90/03430; WO 87/00195; o Patentes de Estados Unidos Re. 30.985 puede usarse como medio de cultivo para las células hospedadoras. Cualquiera de estos medios puede complementarse según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina, o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro sódico, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como fármaco GENTAMYCIN™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos habitualmente presentes a concentraciones finales en el intervalo micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. También puede incluirse cualquier otro complemento necesario a concentraciones apropiadas que conocerían los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son las previamente usadas con la célula hospedadora seleccionada para expresión, y resultarán evidentes para los expertos habituales en la materia.

ix. Purificación de proteínas heteromultiméricas

Cuando se usan técnicas recombinantes, los polipéptidos que contienen bisagra pueden producirse intracelularmente, o secretarse directamente al medio. Si el polipéptido que contiene bisagra se produce intracelularmente, como una primera etapa, los residuos en partículas, bien células hospedadoras o bien fragmentos lisados, se retiran, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Cuando el polipéptido que contiene bisagra se secreta al medio, en general en primer lugar se concentran sobrenadantes de dichos sistemas de expresión usando un filtro de concentración de proteínas disponible en el mercado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Puede incluirse un inhibidor de proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y pueden incluirse antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes adventicios.

La composición heteromultimérica preparada a partir de las células puede purificarse usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La conveniencia de la proteína A como un ligando de afinidad depende de la especie e isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A puede usarse para purificar anticuerpos que se basan en cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ humanas (Lindmark *et al.*, J. Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humana (Guss *et al.*, EMBO J. 5: 1567-1575 (1986)). La matriz con la que se une el ligando de afinidad es con más frecuencia agarosa, pero están disponibles otras matrices. Matrices mecánicamente estables tales como vidrio de poro controlado o poli(estirendivinil)benceno permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que los que pueden conseguirse con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio C_H3, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para purificación. Otras técnicas para purificación de proteínas tales como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina, cromatografía SEPHAROSE™ en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía en SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio también están disponibles dependiendo del anticuerpo para recuperar.

Después de cualquier etapa o etapas de purificación preliminares, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y contaminantes puede someterse a cromatografía de interacción hidrófoba de pH bajo usando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5 y 4,5, preferentemente realizado a concentraciones salinas bajas (por ejemplo, sal de aproximadamente 0-0,25 M). La producción de las proteínas heteromultiméricas puede como alternativa o adicionalmente (a cualquiera de los métodos particulares anteriores) comprender dializar una solución que comprenda una mezcla de los polipéptidos.

x. Producción de anticuerpos usando baculovirus

Pueden generarse baculovirus recombinantes cotransfectando un plásmido que codifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo y ADN de virus BaculoGold™ (Pharmingen) en una célula de insecto tal como una célula de

Spodoptera frugiperda (por ejemplo, células Sf9; ATCC CRL 1711) o una célula S2 de *Drosophila melanogaster* usando, por ejemplo, lipofectina (disponible en el mercado de GIBCO-BRL). En un ejemplo particular, una secuencia de anticuerpo se fusiona cadena arriba de un marcador epitópico contenido dentro de un vector de expresión de baculovirus. Dichos marcadores epitópicos incluyen marcadores de poli-His. Puede emplearse una diversidad de plásmidos, incluyendo plásmidos derivados de plásmidos disponibles en el mercado tales como pVL1393 (Novagen) o pAcGP67B (Pharmingen). Brevemente, la secuencia que codifica un anticuerpo o un fragmento del mismo puede amplificarse mediante PCR con cebadores complementarios de las regiones 5' y 3'. El cebador 5' puede incorporar sitios de enzimas de restricción flanqueantes (seleccionados). El producto puede después digerirse con las enzimas de restricción seleccionadas y subclonarse en el vector de expresión.

Después de transfección con el vector de expresión, las células hospedadoras (por ejemplo, células Sf9) se incuban durante 4-5 días a 28 °C y el virus liberado se recoge y se usa para amplificaciones adicionales. Puede realizarse infección viral y expresión de proteínas como se describe, por ejemplo, en O'Reilley *et al.* (Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual. Oxford: Oxford University Press (1994)).

Después puede purificarse anticuerpo marcado con poli His expresado, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad de quelado de Ni²⁺ de la siguiente manera. Pueden prepararse extractos de células Sf9 infectadas por virus recombinante como se describe en Rupert *et al.* (Nature 362: 175-179 (1993)). Brevemente, las células Sf9 se lavan, se resuspenden en tampón para ultrasonidos (25 ml de HEPES pH 7,9; MgCl₂ 12,5 mM; EDTA 0,1 mM; glicerol 10 %; NP-40 0,1 %; KCl 0,4 M), y se someten a ultrasonidos dos veces durante 20 segundos en hielo. Los productos de los ultrasonidos se aclaran por centrifugación, y el sobrenadante se diluye 50 veces en tampón de carga (fosfato 50 mM; NaCl 300 mM; glicerol 10 % pH 7,8) y se filtra a través de un filtro de 0,45 µm. Se prepara una columna de agarosa Ni²⁺-NTA (disponible en el mercado de Qiagen) con un volumen de lecho de 5 ml, se lava con 25 ml de agua, y se equilibra con 25 ml de tampón de carga. El extracto celular filtrado se carga en la columna a 0,5 ml por minuto. La columna se lava hasta la línea basal A280 con tampón de carga, en cuyo momento se inicia la recogida de fracción. A continuación, la columna se lava con un tampón de lavado secundario (fosfato 50 mM; NaCl 300 mM; glicerol 10 % pH 6,0), que eluye proteína unida de forma no específica. Después de alcanzar de nuevo la línea basal de A280, la columna se desarrolla con un gradiente de imidazol de 0 a 500 mM en el tampón de lavado secundario. Se recogen fracciones de un ml y se analizan mediante SDS-PAGE y tinción de plata o transferencia de Western con Ni²⁺-NTA conjugado con fosfatasa alcalina (Qiagen). Se agrupan fracciones que contienen el anticuerpo marcado con His₁₀ eluido y se dializan frente a tampón de carga.

Como alternativa, puede realizarse purificación del anticuerpo usando técnicas de cromatografía conocidas, incluyendo por ejemplo, cromatografía en columna de proteína A o proteína G. en una realización, el anticuerpo de interés puede recuperarse de la fase sólida de la columna mediante elución en una solución que contiene un agente caotrópico o detergente suave. Los agentes caotrópicos y detergentes suaves ejemplares incluyen, pero sin limitación, guanidina-HCl, urea, perclorato de litio, arginina, histidina, SDS (dodecilsulfato sódico), Tween, Triton y NP-40, todos los cuales están disponibles en el mercado.

IV. Formación/ensamblaje de proteína heteromultimérica

La formación de la proteína heteromultimérica completa implica el reensamblaje del primer y el segundo polipéptidos que contienen bisagras por formación de enlaces disulfuro que en la presente divulgación se denomina plegamiento. El plegamiento incluye la asociación del primer polipéptido que contiene bisagra con el segundo polipéptido que contiene bisagra y la formación de los enlaces disulfuro intercatenarios. El plegamiento, también denominado renaturalización, en la presente invención se realiza *in vitro* sin la adición de reductor.

Las células hospedadoras pueden cultivarse usando los métodos anteriormente descritos bien como cultivos distintos o bien como un único cultivo. En un método, las primeras células hospedadoras y segundas células hospedadoras se cultivan en el mismo recipiente de cultivo (denominado en ocasiones en el presente documento cocultivado o un cultivo mixto). En otro método, la primera y la segunda células hospedadoras se cultivan en distintos recipientes de cultivo. En un método, los distintos cultivos se procesan por separado y después se mezclan/combinan antes de la rotura de la membrana celular. En otro método, los distintos cultivos se mezclan y después se procesan antes de la rotura de la membrana celular. En un método, los distintos cultivos se mezclan sin procesamiento adicional antes de la rotura de la membrana celular. En un método, el cultivo individual que comprende la primera y la segunda célula hospedadora se procesa antes de la rotura de la membrana celular. En otro método, las células cocultivadas no se procesan antes de la rotura de la membrana celular. El procesamiento de las células comprende centrifugación y resuspensión en un tampón apropiado (por ejemplo, tampón de extracción).

Se conocen en la técnica tampones de extracción y los expertos en la materia podrán determinar qué tampón usar sin experimentación indebida.

Las membranas de células hospedadoras se rompen usando métodos conocidos en la técnica. Dichos métodos incluyen permeabilización de la membrana celular y disgregación de la membrana celular. La permeabilización de la membrana celular se refiere a hacer a la membrana "filtrante", por ejemplo, introduciendo agujeros, sin destruir la integridad general de la membrana de modo que la célula siga siendo viable. En otras palabras, la permeabilización

proporciona movimiento macromolecular a través de la membrana celular y conserva la estructura celular lo suficiente para permitir la viabilidad celular continuada. Por el contrario, la disgregación de la membrana celular da como resultado que los contenidos celulares se liberen al medio extracelular y muerte celular.

5 Los métodos para romper las membranas celulares incluyen pero sin limitación lisis enzimática, ultrasonidos, choque osmótico, pase a través de un microfluidificador, adición de EDTA, uso de diversos detergentes, disolventes (tales como tolueno, dimetil sulfoxido, etc.), tensioactivos (tales como Triton-X 100, Tween 20, etc.), tampones hipotónicos, uso de técnicas de congelación/descongelación, electroporación y pase a través de un homogeneizador de bola de acero inoxidable.

10 Una vez que los polipéptidos que contienen bisagra se liberan de la célula (bien por permeabilización o disgregación) los dominios de heteromultimerización conducirán la asociación de las proteínas heteromultiméricas. La formación de disulfuro intercatenario de los polipéptidos que contienen bisagra asociados continúa sin la adición de agentes reductores. Después se purifica la proteína heteromultimérica con enlaces disulfuro resultante.
15 Opcionalmente, puede formularse para investigación, diagnóstico, terapia u otros fines.

V. Moléculas diana

20 Los ejemplos de moléculas que pueden ser diana de una proteína heteromultimérica como se describen en el presente documento incluyen, pero sin limitación, proteínas de suero solubles y sus receptores y otras proteínas unidas a membrana (por ejemplo, adhesinas).

En otra realización la proteína heteromultimérica descrita en el presente documento es capaz de unirse con una, dos o más citocinas, proteínas relacionadas con citocinas y receptores de citocinas seleccionados del grupo que consiste en BMPI, BMP2, BMP3B (GDFIO), BMP4, BMP6, BMP8, CSFI (M-CSF), CSF2 (GM-CSF), CSF3 (G-CSF), EPO, FGFI (aFGF), FGF2 (bFGF), FGF3 (int-2), FGF4 (HST), FGF5, FGF6 (HST-2), FGF7 (KGF), FGF9, FGF10, FGF11, FGF12, FGF12B, FGF14, FGF16, FGF17, FGF19, FGF20, FGF21, FGF23, IGF1, IGF2, IFNAI, IFNA2, IFNA4, IFNA5, IFNA6, IFNA7, IFNBI, IFNG, IFNWI, FELI, FELI (EPSELON), FELI (ZETA), IL1A, IL1B, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL11, IL12A, IL12B, IL13, IL14, IL15, IL16, IL17, IL17B, IL18, IL19, IL20, IL22, IL23, IL24, IL25, IL26, IL27, IL28A, IL28B, IL29, IL30, PDGFA, PDGFB, TGFA, TGFB1, TGFB2, TGFB3, LTA (TNF-b), LTb, TNF (TNF-a), TNFSF4 (ligando OX40), TNFSF5 (ligando CD40), TNFSF6 (FasL), TNFSF7 (ligando CD27), TNFSF8 (ligando CD30), TNFSF9 (ligando 4-1 BB), TNFSF10 (TRAIL), TNFSF11 (TRANCE), TNFSF12 (APO3L), TNFSF13 (April), TNFSF13B, TNFSF14 (HVEM-L), TNFSF15 (VEGI), TNFSF18, HGF (VEGFD), VEGF, VEGFB, VEGFC, ILIR1, IL1R2, IL1RL1, LL1 RL2, IL2RA, IL2RB, IL2RG, IL3RA, IL4R, IL5RA, IL6R, IL7R, IL8RA, IL8RB, IL9R, IL10RA, IL10RB, IL11RA, IL12RB1, IL12RB2, IL13RA1, IL13RA2, IL15RA, IL17R, IL18R1, IL20RA, IL21R, IL22R, IL1HY1, IL1RAP, IL1RAPL1, IL1RAPL2, IL1RN, IL6ST, IL18BP, IL18RAP, IL22RA2, AIFI, HGF, LEP (leptina), PTN y THPO.

En otra realización, una molécula diana es una quimiocina, un receptor de quimiocinas, o una proteína relacionada con quimiocinas seleccionada del grupo que consiste en CCLI (I- 309), CCL2 (MCP -1 / MCAF), CCL3 (MIP-Ia), CCL4 (MIP-Ib), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP- 3), CCL8 (mcp-2), CCLH (eotaxina), CCL13 (MCP-4), CCL15 (MIP-Id), CCL16 (HCC-4), CCL17 (TARC), CCL18 (PARC), CCL19 (MDP-3b), CCL20 (MIP-3a), CCL21 (SLC / exodus-2), CCL22 (MDC / STC-I), CCL23 (MPIF-I), CCL24 (MPIF-2 / eotaxina-2), CCL25 (TECK), CCL26 (eotaxina- 3), CCL27 (CTACK / ILC), CCL28, CXCL1 (GRO1), CXCL2 (GRO2), CXCL3 (GR03), CXCL5 (ENA-78), CXCL6 (GCP-2), CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP 10), CXCL11 (I-TAC), CXCL12 (SDFI), CXCL13, CXCL14, CXCL16, PF4 (CXCL4), PPBP (CXCL7), CX3CL1 (SCYDI), SCYEI, XCLI (linfotactina), XCL2 (SCM-Ib), BLRI (MDR15), CCBP2 (D6 / JAB61), CCRI (CKRI / HM145), CCR2 (mcp-IRB / RA), CCR3 (CKR3 / CMKBR3), CCR4, CCR5 (CMKBR5 / ChemR13), CCR6 (CMKBR6 / CKR-L3 / STRL22 / DRY6), CCR7 (CKR7 / EBII), CCR8 (CMKBR8 / TERI / CKR- LI), CCR9 (GPR-9-6), CCRL1 (VSHKI), CCRL2 (L-CCR), XCRI (GPR5 / CCXCRI), CMKLR1, CMKOR1 (RDCI), CX3CR1 (V28), CXCR4, GPR2 (CCRIO), GPR31, GPR81 (FKSG80), CXCR3 (GPR9/CKR-L2), CXCR6 (TYMSTR /STRL33/ Bonzo), HM74, IL8RA (IL8Ra), IL8RB (IL8Rb), LTB4R (GPR16), TCPIO, CKLFSF2, CKLFSF3, CKLFSF4, CKLFSF5, CKLFSF6, CKLFSF7, CKLFSF8, BDNF, C5R1, CSF3, GRCCIO (CIO), EPO, FY (DARC), GDF5, HDFIA, DL8, PRL, RGS3, RGS13, SDF2, SLIT2, TLR2, TLR4, TREM1, TREM2 y VHL.

En otra realización las proteínas heteromultiméricas descritas en el presente documento son capaces de unirse con una o más dianas seleccionadas del grupo que consiste en ABCFI; ACVRI; ACVRIB; ACVR2; ACVR2B; ACVRLI; AD0RA2A; Aggrecan; AGR2; AICDA; AIFI; AIGI; AKAPI; AKAP2; AMH; AMHR2; ANGPT1; ANGPT2; ANGPTL3; ANGPTL4; ANPEP; APC; APOCI; AR; AZGPI (cinc-a-glucoproteína); B7.1; B7.2; BAD; BAFF (BLys); BAGI; BAIL; BCL2; BCL6; BDNF; BLNK; BLRI (MDR15); BMPI; BMP2; BMP3B (GDFIO); BMP4; BMP6; BMP8; BMPRI; BMPRII; BMPRI3; BMPRI4; BPAGI (plectina); BRCA1; C19orf10 (IL27w); C3; C4A; C5; C5R1; CANTI; CASP1; CASP4; CAVI; CCBP2 (D6 / JAB61); CCLI (1-309); CCLII (eotaxina); CCL13 (MCP-4); CCL15 (MIP-Id); CCL16 (HCC-4); CCL17 (TARC); CCL18 (PARC); CCL19 (MIP-3b); CCL2 (MCP -1); MCAF; CCL20 (MIP-3a); CCL21 (MTP-2); SLC; exodus-2; CCL22 (MDC / STC-I); CCL23 (MPIF- 1); CCL24 (MPIF-2 / eotaxina-2); CCL25 (TECK); CCL26 (eotaxina-3); CCL27 (CTACK / ILC); CCL28; CCL3 (MTP-Ia); CCL4 (MDP- Ib); CCL5 (RANTES); CCL7 (MCP-3); CCL8 (mcp-2); CCNA1; CCNA2; CCND1; CCNE1; CCNE2; CCRI (CKRI / HM145); CCR2 (mcp-IRB / RA); CCR3 (CKR3 / CMKBR3); CCR4; CCR5 (CMKBR5 / ChemR13); CCR6 (CMKBR6 / CKR-L3 /STRL22 / DRY6); CCR7 (CKR7 / EBII); CCR8 (CMKBR8 / TERI / CKR-LI); CCR9 (GPR-9-6); CCRL1 (VSHKI); CCRL2 (L-CCR); CD164; CD19; CDIC; CD20;

CD200; CD22; CD24; CD28; CD3; CD37; CD38; CD3E; CD3G; CD3Z; CD4; CD40; CD40L; CD44; CD45RB; CD52;
 CD69; CD72; CD74; CD79A; CD79B; CD8; CD80; CD81; CD83; CD86; CDHI (E-cadherina); CDH10; CDH12;
 CDH13; CDH18; CDH19; CDH20; CDH5; CDH7; CDH8; CDH9; CDK2; CDK3; CDK4; CDK5; CDK6; CDK7; CDK9;
 CDKNIA (p21Wapl/Cipl); CDKNIB (p27Kipl); CDKNIC; CDKN2A (P16INK4a); CDKN2B; CDKN2C; CDKN3; CEBPB;
 5 CER1; CHGA; CHGB; quitinasa; CHST10; CKLFSF2; CKLFSF3; CKLFSF4; CKLFSF5; CKLFSF6; CKLFSF7;
 CKLFSF8; CLDN3; CLDN7 (claudina-7); CLN3; CLU (clusterina); CMKLRI; CMKORI (RDCI); CNRI; COL18A1;
 COLIAI; COL4A3; COL6A1; CR2; CRP; CSFI (M-CSF); CSF2 (GM-CSF); CSF3 (GCSF); CTLA4; CTNNA4; CTNNA1 (b-
 catenina); CTSB (cathepsina B); CX3CL1 (SCYDI); CX3CR1 (V28); CXCL1 (GRO1); CXCL10 (IP-10); CXCL11 (I-TAC /
 10 IP-9); CXCL12 (SDF1); CXCL13; CXCL14; CXCL16; CXCL2 (GRO2); CXCL3 (GRO3); CXCL5 (ENA-78 / LIX); CXCL6
 (GCP-2); CXCL9 (MIG); CXCR3 (GPR9/CKR-L2); CXCR4; CXCR6 (TYMSTR /STRL33 / Bonzo); CYB5; CYCI;
 CYSLTRI; DAB2IP; DES; DKFZp451J0118; DNCL1; DPP4; E2F1; ECGFI; EDG1; EFNA1; EFNA3; EFNB2; EGF;
 EGFR; ELAC2; ENG; ENO1; ENO2; ENO3; EPHB4; EPO; ERBB2 (Her-2); EREG; ERK8; ESRI; ESR2; F3 (TF);
 FADD; FasL; FASN; FCERIA; FCER2; FCGR3A; FGF; FGF1 (aFGF); FGF10; FGF11; FGF12; FGF12B; FGF13;
 FGF14; FGF16; FGF17; FGF18; FGF19; FGF2 (bFGF); FGF20; FGF21; FGF23; FGF24; FGF25; FGF26; FGF4 (HST);
 15 FGF5; FGF6 (HST-2); FGF7 (KGF); FGF8; FGF9; FGFR3; FIGF (VEGFD); FELI (EPSILON); FILI (ZETA); FLJ12584;
 FLJ25530; FLRT1 (fibronectina); FLTI; FOS; FOSL1 (FRA-I); FY (DARC); GABRP (GABAa); GAGEBI; GAGECI;
 GALNAC4S-6ST; GATA3; GDF5; GF11; GGT1; GM-CSF; GNAS1; GNRHI; GPR2 (CCR10); GPR31; GPR44; GPR81
 (FKSG80); GRCCIO (CIO); GRP; GSN (gelsolina); GSTPI; HAVCR2; HDAC4; HDAC5; HDAC7A; HDAC9; HGF;
 HIFIA; HDPI; histamina y receptores de histamina; HLA-A; HLA-DRA; HM74; HMOX1; HUMCYT2A; ICEBERG;
 20 ICOSL; ID2; IFN-a; IFNA1; IFNA2; IFNA4; IFNA5; IFNA6; IFNA7; IFNB1; IFNgamma; DFNWI; IGBPI; IGF1; IGFIR;
 IGF2; IGFBP2; IGFBP3; IGFBP6; IL-1; IL10; IL10RA; IL10RB; IL11; IL11 RA; IL-12; IL12A; IL12B; IL12RB1; IL12RB2;
 IL13; IL13RA1; IL13RA2; IL14; IL15; IL15RA; IL16; IL17; IL17B; IL17C; IL17R; IL17R; IL18; IL18BP; IL18R1; IL18RAP; IL19;
 IL1A; IL1B; IL1F10; IL1F5; IL1F6; IL1F7; IL1F8; IL1F9; IL1HY1; IL1RI; IL1R2; IL1RAP; IL1RAPL1; IL1RAPL2; IL1RL1;
 25 IL1RL2; ILIRN; IL2; IL20; IL20RA; IL21 R; IL22; IL22R; IL22RA2; IL23; IL24; IL25; IL26; IL27; IL28A; IL28B; IL29;
 IL2RA; IL2RB; IL2RG; IL3; IL30; IL3RA; IL4; IL4R; IL5; IL5RA; IL6; IL6R; IL6ST (glucoproteína 130); EL7; EL7R;
 EL8; IL8RA; DL8RB; IL8RB; DL9; DL9R; DLK; INHA; INHBA; INSL3; INSL4; IRAKI; ERAK2; ITGAI; ITGA2; ITGA3;
 ITGA6 (integrina a6); ITGAV; ITGB3; ITGB4 (integrina b4); JAG1; JAK1; JAK3; JUN; K6HF; KAIL; KDR; KITLG; KLF5
 (GC Box BP); KLF6; KLK10; KLK12; KLK13; KLK14; KLK15; KLK3; KLK4; KLK5; KLK6; KLK9; KRT1; KRT19
 (queratina 19); KRT2A; KHTHB6 (queratina H de tipo específico del cabello); LAMAS; LEP (leptina); Lingo-p75;
 30 Lingo-Troy; LPS; LTA (TNF-b); LTB; LTBA4R (GPR16); LTBA4R2; LTBR; MACMARCKS; MAG o Omgp ; MAP2K7 (c-
 Jun); MDK; MIB1; midkina; MEF; MIP-2; MKI67; (Ki-67); MMP2; MMP9; MS4A1; MSMB; MT3 (metalotionectina-III);
 MTSSI; MUC1 (mucina); MYC; MYD88; NCK2; neurocan; NFKB1; NFKB2; NGFB (NGF); NGFR; NgR-Lingo; NgR-
 Nogo66 (Nogo); NgR-p75; NgR-Troy; NME1 (NM23A); NOX5; NPPB; NROB1; NR0B2; NR1D1; NR1 D2; NR1 H2; NR1
 H3; NR1 H4; NR1I2; NR1I3; NR2C1; NR2C2; NR2E1; NR2E3; NR2F1; NR2F2; NR2F6; NR3C1; NR3C2; NR4A1;
 35 NR4A2; NR4A3; NR5A1; NR5A2; NR6A1; NRPI; NRP2; NT5E; NTN4; ODZI; OPRD1; P2RX7; PAP; PARTI; PATE;
 PAWR; PCA3; PCNA; PDGFA; PDGFB; PECAMI; PF4 (CXCL4); PGF; PGR; fosfacan; PIAS2; PIK3CG; PLAU
 (uPA); PLG; PLXDC1; PPBP (CXCL7); PPID; PRI; PRKQ; PRKDI; PRL; PROC; PROK2; PSAP; PSCA; PTAFR;
 PTEN; PTGS2 (COX-2); PTN; RAC2 (p21 Rac2); RARB; RGS1; RGS13; RGS3; RNFIIO (ZNF144); ROBO2; S100A2;
 SCGB1 D2 (lipofilina B); SCGB2A1 (mammaglobina 2); SCGB2A2 (mammaglobina 1); SCYE1 (citocina activadora de
 40 monocitos endoteliales); SDF2; SERPINA1; SERPINA3; SERP1 NB5 (maspina); SERPINE1 (PAI-I); SERPDMF1;
 SHBG; SLA2; SLC2A2; SLC33A1; SLC43A1; SLIT2; SPPI; SPRRIB (Sprl); ST6GAL1; STAB1; STAT6; STEAP;
 STEAP2; TB4R2; TBX21; TCPIO; TDGFI; TEK; TGFA; TGFB1; TGFBIII; TGFB2; TGFB3; TGFB1; TGFBRI; TGFBRI2;
 TGFBRI3; THIL; THBS1 (trombospondina-1); THBS2; THBS4; THPO; TIE (Tie-1); TMP3; factor tisular; TLRIO; TLR2;
 TLR3; TLR4; TLR5; TLR6; TLR7; TLR8; TLR9; TNF; TNF-a; TNFAEP2 (B94); TNFAIP3; TNFRSFIIA; TNFRSFIA;
 45 TNFRSFIB; TNFRSF21; TNFRSF5; TNFRSF6 (Fas); TNFRSF7; TNFRSF8; TNFRSF9; TNFS- FIO (TRAIL); TNFSFI
 1 (TRANCE); TNFSF12 (APO3L); TNFSF13 (April); TNFSF13B; TNFSF14 (HVEM-L); TNFSF15 (VEGI); TNFSF18;
 TNFSF4 (ligando OX40); TNFSF5 (ligando CD40); TNFSF6 (FasL); TNFSF7 (ligando CD27); TNFSF8 (ligando
 CD30); TNFSF9 (ligando 4-1 BB); TOLLIP; receptores de tipo Toll; TOP2A (topoisomerasa Ea); TP53; TPM1; TPM2;
 TRADD; TRAF1; TRAF2; TRAF3; TRAF4; TRAF5; TRAF6; TREM1; TREM2; TRPC6; TSLP; TWEAK; VEGF; VEGFB;
 50 VEGFC; versicano; VHL C5; VLA-4; XCLI (linfotactina); XCL2 (SCM-Ib); XCRI(GPR5 / CCXGRI); YY1; y ZFPM2.

Las moléculas diana moleculares preferidas para anticuerpos abarcados por la presente divulgación incluyen
 proteínas CD tales como CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, CD20, CD34; miembros CD64, CD200 de la familia de
 55 receptores ErbB tal como el receptor de EGF, receptor HER2, HER3 o HER4; moléculas de adhesión celular tales
 como LFA-1, Mac1, p150.95, VLA-4, ICAM-1, VCAM, integrina alfa4/beta7 e integrina alfav/beta3 incluyendo
 subunidades alfa o beta de las mismas (por ejemplo, anticuerpos anti-CD11 a, anti-CD18 o anti-CD11 b); factores de
 crecimiento tales como VEGF-A, VEGF-C; factor tisular (TF); interferón alfa (alfalFN); TNFalfa, una interleucina, tal
 como IL-1beta, IL-3, IL-4, IL-5, IL-8, IL-9, IL-13, IL17A/F, IL-18, IL-13Ralfa1, IL13Ralfa2, IL-4R, IL-5R, IL-9R, IgE;
 60 antígenos de grupo sanguíneo; receptor de flk2/flt3; receptor de obesidad (OB); receptor de mpl; CTLA-4; RANKL,
 RANK, proteína F de VSR, proteína C, etc.

En una realización, las proteínas heteromultiméricas descritas en el presente documento se unen con proteína
 relacionada con receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP)-1 o LRP-8 o receptor de transferrina, y al menos
 65 una diana seleccionada del grupo que consiste en 1) beta-secretasa (BACE1 o BACE2), 2) alfa-secretasa, 3)
 gamma-secretasa, 4) tau-secretasa, 5) proteína precursora amiloide (APP), 6) receptor de muerte 6 (DR6), 7)
 péptido beta amiloide, 8) alfa-sinucleína, 9) parquína, 10) Huntingtina, 11) p75 NTR y 12) caspasa 6.

En una realización, las proteínas heteromultiméricas descritas en el presente documento se unen con al menos dos moléculas diana seleccionadas del grupo que consiste en: IL-1 alfa e IL-1 beta, IL-12 e IL-18; IL-13 e IL-9; IL-13 e IL-4; IL-13 e IL-5; IL-5 e IL-4; IL-13 e IL-1 beta; IL-13 e IL- 25; IL-13 y TARC; IL-13 y MDC; IL-13 y MEF; IL-13 y TGF- β ; IL-13 y agonista de LHR; IL-12 y TWEAK, IL-13 y CL25; IL-13 y SPRR2a; IL-13 y SPRR2b; IL-13 y ADAM8, IL-13 y PED2, IL17A e IL17F, CD3 y CD19, CD138 y CD20; CD138 y CD40; CD19 y CD20; CD20 y CD3; CD38 y CD138; CD38 y CD20; CD38 y CD40; CD40 y CD20; CD-8 e IL-6; CD20 y BR3, TNFalfa y TGF-beta, TNFalfa e IL-1 beta; TNFalfa e IL-2, TNF alfa e IL-3, TNFalfa e IL-4, TNFalfa e IL-5, TNFalfa e IL6, TNFalfa e IL8, TNFalfa e IL-9, TNFalfa e IL-10, TNFalfa e IL- 11, TNFalfa e IL-12, TNFalfa e IL-13, TNFalfa e IL-14, TNFalfa e IL-15, TNFalfa e IL-16, TNFalfa e IL-17, TNFalfa e IL-18, TNFalfa e IL-19, TNFalfa e IL-20, TNFalfa e IL-23, TNFalfa y IFNalfa, TNFalfa y CD4, TNFalfa y VEGF, TNFalfa y MIF, TNFalfa y ICAM-1, TNFalfa y PGE4, TNFalfa y PEG2, TNFalfa y ligando RANK, TNFalfa y Te38; TNFalfa y BAFF; TNFalfa y CD22; TNFalfa y CTLA-4; TNFalfa y GP130; TNF α e IL-12p40; VEGF y HER2, VEGF-A y HER2, VEGF-A y PDGF, HER1 y HER2, VEGF-A y VEGF-C, VEGF-C y VEGF-D, HER2 y DR5, VEGF e IL-8, VEGF y MET, VEGFR y receptor de MET, VEGFR y EGFR, HER2 y CD64, HER2 y CD3, HER2 y CD16, HER2 y HER3; EGFR (HER1) y HER2, EGFR y HER3, EGFR y HER4, IL-13 y CD40L, IL4 y CD40L, TNFR1 e IL-1 R, TNFR1 e IL-6R y TNFR1 e IL-18R, EpCAM y CD3, MAPG y CD28, EGFR y CD64, CSPGs y RGM A; CTLA-4 y BTNO2; IGF1 y IGF2; IGF1/2 y Erb2B; MAG y RGM A; NgR y RGM A; NogoA y RGM A; OMGp y RGM A; PDL-I y CTLA-4; y RGM A y RGM B.

Pueden usarse antígenos solubles o fragmentos de los mismos, opcionalmente conjugados con otras moléculas, como inmunógenos para generar anticuerpos. Para moléculas transmembrana, tales como receptores, pueden usarse fragmentos de estos (por ejemplo, el dominio extracelular de un receptor) como el inmunógeno. Como alternativa, pueden usarse como el inmunógeno células que expresan la molécula transmembrana. Dichas células pueden derivar de una fuente natural (por ejemplo, líneas celulares cancerosas) o pueden ser células que se han transformado por técnicas recombinantes para expresar la molécula transmembrana. Otros antígenos y formas de los mismos útiles para preparar anticuerpos resultarán evidentes para los expertos en la materia.

VI. Ensayos de actividad

Las proteínas heteromultiméricas descritas en el presente documento pueden caracterizarse por sus propiedades físicas/químicas y funciones biológicas por diversos ensayos conocidos en la técnica.

Las proteínas heteromultiméricas purificadas pueden caracterizarse adicionalmente por una serie de ensayos incluyendo, pero sin limitación, secuenciación N terminal, análisis de aminoácidos, cromatografía líquida de alta presión de exclusión por tamaño no desnaturizante (HPLC), espectrometría de masas, cromatografía de intercambio iónico y digestión con papaína.

En ciertas realizaciones las inmunoglobulinas producidas en el presente documento se analizan con respecto a su actividad biológica. En algunas realizaciones, las inmunoglobulinas descritas en el presente documento se ensayan con respecto a su actividad de unión a antígeno. Los ensayos de unión a antígeno que se conocen en la técnica y pueden usarse en el presente documento incluyen, sin limitación, cualquier ensayo de unión competitiva o directo usando técnicas tales como transferencias de western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, inmunoensayos fluorescentes e inmunoensayos de proteína A. Se proporciona posteriormente un ensayo de unión a antígeno ilustrativo en la sección de Ejemplos.

En una realización, la presente divulgación contempla un anticuerpo alterado que posee algunas pero no todas las funciones efectoras, lo que lo hace un candidato deseado para muchas aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante pero ciertas funciones efectoras (tales como complemento y ADCC) son innecesarias o deletéreas. En ciertas realizaciones, las actividades de Fc de la proteína heteromultimérica producida se miden para asegurar que solamente se mantengan las propiedades deseadas. Pueden realizarse ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/el agotamiento de actividades CDC y/o ADCC. Por ejemplo, pueden realizarse ensayos de unión a receptor de Fc (FcR) para asegurar que la proteína heteromultimérica carezca de unión a Fc γ R (que por lo tanto probablemente carece de actividad ADCC), pero conserva la capacidad de unión al FcRn. Las células primarias para mediar en ADCC, linfocitos NK, expresan Fc γ RIII solamente, mientras que los monocitos expresan Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9: 457-92 (1991). Un ejemplo de un ensayo *in vitro* para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés se describe en la patente de Estados Unidos n.º 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el desvelado en Clynes *et al.* *PNAS (USA)* 95: 652-656 (1998). También pueden llevarse a cabo ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo es incapaz de unirse con C1q y por lo tanto carece de actividad CDC. Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo de CDC, por ejemplo como se describe en Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996), también pueden realizarse determinaciones de unión de FcRn y eliminación/semivida *in vivo* usando métodos conocidos en la técnica.

VII. Proteínas conjugadas

La divulgación también proporciona proteínas conjugadas tales como anticuerpos conjugados o inmunoconjugados (por ejemplo, "conjugados anticuerpo-fármaco" o "ADC"), que comprenden cualquiera de las proteínas heteromultiméricas descritas en el presente documento (por ejemplo, un anticuerpo preparado de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento) en las que una de las regiones constantes de la cadena ligera o la cadena pesada se conjuga con una molécula química tal como un colorante o agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, un fármaco, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma), un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado). En particular, como se describe en el presente documento, el uso de dominios de heteromultimerización permite la construcción de anticuerpos que contienen dos cadenas pesadas diferentes (HC1 y HC2) así como dos cadenas ligeras diferentes (LC1 y LC2). Un inmunoconjugado construido usando los métodos descritos en el presente documento puede contener el agente citotóxico conjugado con una región constante de solamente una de las cadenas pesadas (HC1 o HC2) o solamente una de las cadenas ligeras (LC1 o LC2). También, debido a que el inmunoconjugado puede tener el agente citotóxico unido a solamente una cadena pesada o ligera, la cantidad del agente citotóxico que se administra a un sujeto se reduce en relación con la administración de un anticuerpo que tiene el agente citotóxico unido a ambas cadenas pesadas o ligeras. La reducción de la cantidad del agente citotóxico que se administra a un sujeto limita los efectos secundarios graves asociados con el agente citotóxico.

El uso de conjugados de anticuerpo-fármaco para el suministro local de agentes citotóxicos o citostáticos, es decir, fármacos para destruir o inhibir células tumorales en el tratamiento de cáncer (Syrigos y Epenetos, *Anticancer Research* 19: 605-614 (1999); Niculescu- Duvaz y Springer, *Adv. Drg. Del. Rev.* 26: 151-172 (1997); patente de Estados Unidos n.º 4.975.278) permite el suministro dirigido del resto farmacológico a tumores, y la acumulación intracelular en los mismos, cuando la administración sistémica de estos agentes farmacológicos no conjugados pueda dar como resultado niveles inaceptables de toxicidad a células normales así como las células tumorales que se busca eliminar (Baldwin *et al.*, *Lancet* (Mar. 15, 1986): 603-605 (1986); Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, A. Pinchera *et al.* (eds.), pp. 475-506). Se busca de este modo máxima eficacia con mínima toxicidad. Se ha indicado que tanto anticuerpos policlonales como anticuerpos monoclonales son útiles en estas estrategias (Rowland *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.* 21: 183-187 (1986)). Los fármacos usados en estos métodos incluyen daunomicina, doxorubicina, metotrexato y vindesina (Rowland *et al.*, (1986) mencionado anteriormente). Las toxinas usadas en los conjugados de anticuerpo-toxina incluyen toxinas bacterianas tales como toxina diftérica, toxinas vegetales tales como ricina, toxinas de moléculas pequeñas tales como geldanamycin (Mandler *et al.*, *Jour. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19): 1573-1581 (2000); Mandler *et al.*, *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10: 1025-1028 (2000); Mandler *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 13: 786-791 (2002)), maitansinoides (documento EP 1391213; Liu *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8618-8623 (1996)) y calicheamicina (Lode *et al.*, *Cancer Res.* 58: 2928 (1998); Hinman *et al.*, *Cancer Res.* 53: 3336-3342 (1993)). Las toxinas pueden efectuar sus efectos citotóxicos y citostáticos por mecanismos que incluyen unión a tubulina, unión a ADN o inhibición de topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tienden a estar inactivos o menos activos cuando se conjugan con grandes anticuerpos o ligandos de receptores de proteínas.

Se describen en el presente documento agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de inmunoconjugados (por ejemplo, anteriormente). Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen cadena A de difteria, fragmentos activos que no se unen de la toxina diftérica, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAPS), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993. Está disponible una diversidad de radionúclidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y y ¹⁸⁶Re. Se preparan conjugados del anticuerpo y agente citotóxico usando una diversidad de agentes de acoplamiento a proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de iminoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazonio-benzoil)-etilenediamina), diisocianatos (tales como tolueno 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina ricina como se describe en Vitetta *et al.*, *Science* 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilen triaminopentaaacético marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un agente quelante ejemplar para conjugación de radionucleótido con el anticuerpo. Véase, por ejemplo, documento WO94/11026.

También se contemplan en el presente documento conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de moléculas pequeñas, tales como calicheamicina, maitansinoides, dolastatinas, aurostatinas, un tricoteceno y CC1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad tóxica.

i. Maitansina y maitansinoides

En algunas realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo (de longitud completa o fragmentos) como se describe en el presente documento conjugado con una o más moléculas maitansinoides.

Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de tubulina. La maitansina se aisló por primera vez del arbusto africano oriental *Maytenus serrata* (patente de Estados Unidos n.º 3.896.111). Posteriormente, se ha descubierto que ciertos microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres de maitansinol C-3 (patente de Estados Unidos n.º 4.151.042). Se desvelan maitansinol sintético y derivados y análogos del mismo, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos n.º 4.137.230; 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663; y 4.371.533.

Los restos farmacológicos de maitansinoides son restos farmacológicos atractivos en conjugados farmacológicos de anticuerpo porque son: (i) fácilmente accesibles para preparar por fermentación o modificación química, derivatización de productos de fermentación, (ii) susceptibles de derivatización con grupos funcionales adecuados para conjugación a través de los enlazadores distintos de disulfuro con anticuerpos, (iii) estables en plasma, y (iv) eficaces contra una diversidad de líneas celulares tumorales.

Se desvelan inmunoconjugados que contienen maitansinoides, métodos para prepararlos y su uso terapéutico, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos n.º 5.208.020, 5.416.064 y patente europea EP 0 425 235 B1. Liu *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8618-8623 (1996) describieron inmunoconjugados que comprendían un maitansinoide designado DM1 unido al anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra cáncer colorrectal humano. Se descubrió que el conjugado era altamente citotóxico para células cancerosas de colon cultivadas, y mostraron actividad antitumoral en un ensayo de crecimiento de tumor *in vivo*. Chari *et al.*, Cancer Research 52: 127-131 (1992) describen inmunoconjugados en los que se conjugó maitansinoide mediante un enlazador disulfuro con el anticuerpo murino A7 que se unía con un antígeno en líneas celulares de cáncer de colon humano, o con otro anticuerpo monoclonal murino TA.1 que se une con el oncogén HER-2/neu. La citotoxicidad del conjugado de TA.1-maitansinoide se ensayó *in vitro* en la línea celular de cáncer de mama humano SK-BR-3, que expresa 3×10^5 antígenos de superficie de HER-2 por célula. El conjugado farmacológico consiguió un grado de citotoxicidad similar al fármaco maitansinoide libre, que podría aumentarse aumentando el número de moléculas maitansinoides por molécula de anticuerpo. El conjugado de A7-maitansinoide mostró baja citotoxicidad sistémica en ratones.

Se preparan conjugados de anticuerpo-maitansinoide uniendo químicamente un anticuerpo con una molécula de maitansinoide sin reducir significativamente la actividad biológica del anticuerpo o la molécula de maitansinoide. Véase, por ejemplo, patente de Estados Unidos n.º 5.208.020. Un promedio de 3-4 moléculas de maitansinoide conjugadas por molécula de anticuerpo ha mostrado eficacia en la potenciación de la citotoxicidad de células diana sin afectar negativamente a la función o solubilidad del anticuerpo, incluso aunque se esperaría que una molécula de toxina/anticuerpo potenciara la citotoxicidad frente al uso de anticuerpo desnudo. Se conocen bien en la técnica maitansinoides y pueden sintetizarse por técnicas conocidas o aislarse de fuentes naturales. Se desvelan maitansinoides adecuados, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 5.208.020 y en otras patentes y publicaciones no de patente indicadas en el presente documento anteriormente. Los maitansinoides preferidos son maitansinol y análogos de maitansinol modificados en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula de maitansinol, tales como diversos ésteres de maitansinol.

Existen muchos grupos de enlace conocidos en la técnica para preparar conjugados de anticuerpo-maitansinoide, incluyendo, por ejemplo, los desvelados en la patente de Estados Unidos n.º 5.208.020 o patente EP 0 425 235 B1, Chari *et al.*, Cancer Research 52: 127-131 (1992) y publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2005/0169933. Pueden prepararse conjugados de anticuerpo-maitansinoide que comprenden el componente enlazador SMCC como se desvela en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2005/0169933. Los grupos de enlace incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles por ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles por peptidasa o grupos lábiles por esterasa, como se ha desvelado en las patentes anteriormente identificadas, prefiriéndose los grupos de disulfuro y tioéter. Se describen y ejemplifican en el presente documento grupos de enlace adicionales.

Pueden prepararse conjugados del anticuerpo y maitansinoide usando una diversidad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenediamina), diisocianatos (tales como tolueno 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Los agentes de acoplamiento particularmente preferidos incluyen N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP) (Carlsson *et al.*, Biochem. J. 173: 723-737 (1978)) y N-succinimidil-4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP) para proporcionar un enlace disulfuro.

El enlazador puede unirse con la molécula de maitansinoide en diversas posiciones, dependiendo del tipo del

enlace. Por ejemplo, puede formarse un enlace éster por reacción con un grupo hidroxilo usando técnicas de acoplamiento convencionales. La reacción puede producirse en la posición C 3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C 14 modificada con hidroximetilo, la posición C 15 modificada con un grupo hidroxilo y la posición C 20 que tiene un grupo hidroxilo. En una realización preferida, el enlace se forma en la posición C 3 de maitansinol o un análogo de maitansinol.

ii. Auristatinas y dolastatinas

En algunas realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo como se describe en el presente documento conjugado con dolastatinas o análogos peptídicos de dolastatina y derivados, las auristatinas (patentes de Estados Unidos n.º 5.635.483 y 5.780.588). Se ha mostrado que las dolastatinas y auristatinas interfieren con dinámicas de microtúbulos, hidrólisis de GTP y división nuclear y celular (Woyke *et al.*, *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12): 3580-3584 (2001)) y tienen actividad antineoplásica (patente de Estados Unidos n.º 5.663.149) y antifúngica (Pettit *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 2961-2965 (1998)). El resto farmacológico de dolastatina o auristatina puede unirse con el anticuerpo a través del extremo N- (amino) terminal o el extremo C- (carboxilo) terminal del resto farmacológico peptídico (documento WO 02/088172).

Las realizaciones de auristatina ejemplares incluyen los restos farmacológicos de monometilauristatina ligados al extremo N DE y DF, desvelados en "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands," publicación de solicitud de Estados Unidos n.º 2005/0238649.

Típicamente, pueden prepararse restos farmacológicos basados en péptidos formando un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos peptídicos. Dichos enlaces peptídicos pueden prepararse, por ejemplo, de acuerdo con el método de síntesis en fase líquida (véase E. Schroder y K. Lübke, "The Peptides," volumen 1, pp. 76-136, 1965, Academic Press) que se conoce bien en el campo de la química peptídica. Los restos farmacológicos de auristatina/dolastatina pueden prepararse de acuerdo con los métodos de: patentes de Estados Unidos 5.635.483 y 5.780.588; Pettit *et al.*, *J. Nat. Prod.* 44: 482-485 (1981); Pettit *et al.*, *Anti-Cancer Drug Design* 13: 47-66 (1998); Poncet, *Curr. Pharm. Des.* 5: 139-162 (1999); y Pettit, *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* 70: 1-79 (1997). Véase también Doronina, *Nat. Biotechnol.* 21 (7): 778-784 (2003); y "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands," publicación de solicitud de Estados Unidos n.º 2005/0238649 (que desvela, por ejemplo, enlazadores y métodos para preparar compuestos de monometilvalina tales como MMAE y MMAF conjugados con enlazadores).

iii. Calicheamicina

En otras realizaciones, el inmunoconjugado comprende uno como se ha descrito en el presente documento conjugado con una o más moléculas de calicheamicina. La familia de calicheamicina de antibióticos es capaz de producir roturas de ADN bicatenarias a concentraciones subpicomolares. Para la preparación de conjugados de la familia de calicheamicina, véase patentes de Estados Unidos n.º 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001 y 5.877.296 (todas de American Cyanamid Company). Los análogos estructurales de calicheamicina que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, γ_1^1 , α_2^1 , α_3^1 , N-acetil- γ_1^1 , PSAG y θ_1 (Hinman *et al.*, *Cancer Research* 53: 3336-3342 (1993), Lode *et al.*, *Cancer Research* 58: 2925-2928 (1998) y las patentes de Estados Unidos anteriormente mencionadas de American Cyanamid). Otro fármaco antitumoral con el que puede conjugarse el anticuerpo es QFA, que es un antifolato. Tanto calicheamicina como QFA tienen sitios intracelulares de acción y no cruzan fácilmente la membrana plasmática. Por lo tanto, la captación celular de estos agentes a través de internalización mediada por anticuerpos potencia en gran medida sus efectos citotóxicos.

iv. Otros agentes citotóxicos

Otros agentes antitumorales que pueden conjugarse con los anticuerpos descritos en el presente documento o prepararse de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento incluyen BCNU, estreptozocina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocidos colectivamente como complejo LL-E33288 descrita en las patentes de Estados Unidos n.º 5.053.394 y 5.770.710, así como esperamicinas (patente de Estados Unidos n.º 5.877.296).

Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen cadena A de la difteria, fragmentos activos que no se unen de la toxina diftérica, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos (véase, por ejemplo, documento WO 93/21232, publicado el 28 de octubre de 1993).

La presente divulgación contempla además un inmunoconjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una endonucleasa de ADN tal como una desoxirribonucleasa; DNasa).

Para destrucción selectiva de un tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo altamente radiactivo. Está

disponible una diversidad de isótopos radiactivos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² e isótopos radiactivos de Lu. Cuando el conjugado se usa para detección, puede comprender un átomo radiactivo para estudios escintigráficos, por ejemplo tc^{99m} o I¹²³, o un marcador de espín para captura de imágenes por resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como captura de imágenes por resonancia magnética, irm), tal como de nuevo yodo 123, yodo 131, indio 111, flúor 19, carbono 13, nitrógeno 15, oxígeno 17, gadolinio, manganeso o hierro.

Los radiomarcadores u otros marcadores pueden incorporarse en el conjugado de diversas maneras. Por ejemplo, el péptido puede biosintetizarse o puede sintetizarse por síntesis de aminoácidos química usando precursores de aminoácidos adecuados que implican, por ejemplo, flúor 19 en lugar de hidrógeno. Pueden unirse marcadores tales como tc^{99m} o I¹²³, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸ e In¹¹¹ mediante un resto de cisteína en el péptido. Puede unirse itrio 90 mediante un resto de lisina. El método de IODOGEN (Fraker *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57 (1978)) puede usarse para incorporar yodo 123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describe otros métodos en detalle.

Pueden prepararse conjugados del anticuerpo y agente citotóxico usando una diversidad de agentes de acoplamiento a proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenediamina), diisocianatos (tales como tolueno 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta *et al.*, Science 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildietileno triaminopentaacético marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un agente quelante ejemplar para conjugación de radionucleótido con el anticuerpo. Véase, por ejemplo, documento WO94/11026. El enlazador puede ser un "enlazador escindible" que facilite la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, puede usarse un enlazador lábil por ácidos, enlazador sensible a peptidasa, enlazador fotolábil, enlazador de dimetilo o enlazador que contiene disulfuro (Chari *et al.*, Cancer Research 52: 127-131 (1992); patente de Estados Unidos n.º 5.208.020).

Los compuestos de la divulgación contemplan de forma expresa, pero sin limitación, ADC preparado con reactivos de reticulación: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB, y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) que están disponibles en el mercado (por ejemplo, de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., Estados Unidos). Véase páginas 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog.

v. Preparación de anticuerpos conjugados

En los anticuerpos conjugados descritos en el presente documento, un anticuerpo está conjugado con uno o más restos (por ejemplo, restos farmacológicos), por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 restos por anticuerpo, opcionalmente mediante un enlazador. Los anticuerpos conjugados pueden prepararse por varias vías, empleando reacciones químicas orgánicas, condiciones y reactivos conocidos por los expertos en la materia, incluyendo: (1) reacción de un grupo nucleófilo de un anticuerpo con un reactivo de enlazador bivalente mediante un enlace covalente, seguido de reacción con un resto de interés, y (2) reacción de un grupo nucleófilo de un resto con un reactivo de enlazador bivalente mediante un enlace covalente, seguido de reacción con el grupo nucleófilo de un anticuerpo. Se describen en el presente documento métodos adicionales para preparar anticuerpos conjugados.

El reactivo de enlazador puede estar compuesto de uno o más componentes enlazadores. Los componentes enlazadores ejemplares incluyen 6-maleimidocaproilo ("MC"), maleimidopropanoilo ("MP"), valina-citrulina ("val-cit"), alanina-fenilalanina ("ala-phe"), p-aminobenziloxycarbonilo ("PAB"), N-succinimidil 4-(2-piridiltio) pentanoato ("SPP"), N-succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1 carboxilato ("SMCC") y N-succinimidil (4-yodo-acetil) aminobenzoato ("SIAB"). Se conocen en la técnica componentes enlazadores adicionales y algunos se describen en el presente documento. Véase también "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands," publicación de solicitud de Estados Unidos n.º 2005/0238649.

En algunas realizaciones, el enlazador puede comprender restos de aminoácidos. Los componentes de enlazadores de aminoácidos ejemplares incluyen un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido o un pentapéptido. Los dipéptidos ejemplares incluyen: valina-citrulina (vc o val-cit), alanina-fenilalanina (af o ala-phe). Los tripéptidos ejemplares incluyen: glicina-valina-citrulina (gly-val-cit) y glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly). Los restos de aminoácidos que comprenden un componente enlazador de aminoácidos incluyen los de origen natural, así como aminoácidos menores y análogos de aminoácidos de origen no natural, tales como citrulina. Pueden diseñarse componentes de enlazadores de aminoácidos y optimizarse en su selectividad para escisión enzimática por enzimas particulares, por ejemplo, una proteasa asociada a tumores, cathepsina B, C y D, o una proteasa de plasmina.

Los grupos nucleófilos en anticuerpos incluyen, pero sin limitación: (i) grupos amino N terminales, (ii) grupos amino de cadena lateral, por ejemplo, lisina, (iii) grupos tiol de cadena lateral, por ejemplo, cisteína y (iv) grupos hidroxilo o amino de azúcares en los que el anticuerpo está glucosilado. Los grupos de amina, tiol e hidroxilo son nucleófilos y

son capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en restos enlazadores y reactivos enlazadores incluyendo: (i) ésteres activos tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformatos y haluros ácidos; (ii) alquil y bencil haluros tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas carboxilo y grupos de maleimida. Ciertos anticuerpos tienen disulfuros intercatenarios reducibles, es decir, enlaces de cisteína. Pueden prepararse anticuerpos reactivos para conjugación con reactivos enlazadores mediante tratamiento con un agente reductor tal como DTT (ditiotreitól). Cada enlace de cisteína formará por lo tanto, teóricamente, dos nucleófilos de tiol reactivos. Pueden introducirse grupos nucleófilos adicionales en anticuerpos mediante la reacción de lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) dando como resultado la conversión de una amina en un tiol. Pueden introducirse grupos de tiol reactivos en el anticuerpo (o fragmentos del mismo) introduciendo uno, dos, tres, cuatro o más restos de cisteína (por ejemplo, preparando anticuerpos mutantes que comprenden uno o más restos de aminoácidos de cisteína no nativos).

También pueden producirse anticuerpos conjugados como se describe en el presente documento mediante modificación del anticuerpo para introducir restos electrófilos, que pueden reaccionar con sustituyentes nucleófilos en el reactivo enlazador o fármaco u otro resto. Los azúcares de anticuerpos glucosilados pueden estar oxidados, por ejemplo, con reactivos oxidantes de peryodato, para formar grupos aldehído o cetona que pueden reaccionar con el grupo de amina de reactivos enlazadores o fármaco u otros restos. Los grupos de base de Schiff de imina resultantes pueden formar un enlace estable, o pueden reducirse, por ejemplo, por reactivos de borohidruro para formar enlaces de amina estables. En una realización, la reacción de la parte de carbohidrato de un anticuerpo glucosilado con galactosa oxidasa o metaperyodato sódico puede producir grupos de carbonilo (aldehído y cetona) en la proteína que pueden reaccionar con grupos apropiados en el fármaco u otro resto (Hermanson, Bioconjugate Techniques). En otra realización, proteínas que contienen restos de serina o treonina N terminales pueden reaccionar con metaperyodato sódico, dando como resultado la producción de un aldehído en lugar del primer aminoácido (Geoghegan y Stroh, Bioconjugate Chem. 3: 138-146 (1992); patente de Estados Unidos n.º 5.362.852). Dicho aldehído puede hacerse reaccionar con un resto farmacológico o nucleófilo enlazador.

De forma similar, los grupos nucleófilos en un resto (tal como un resto farmacológico) incluyen, pero sin limitación: grupos amina, tiol, hidroxilo, hidrazida, oxima, hidracina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidracina y arilhidrazida capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en restos enlazadores y reactivos enlazadores incluyendo: (i) ésteres activos tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformatos y haluros ácidos; (ii) alquil y bencil haluros tales como haloacetamidas; y (iii) aldehídos, cetonas, carboxilo y grupos maleimida.

Como alternativa, puede prepararse una proteína de fusión que comprende el anticuerpo y agente citotóxico, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes o síntesis peptídica. La longitud del ADN puede comprender regiones respectivas que codifican las dos partes del conjugado bien adyacentes entre sí o bien separadas por una región que codifica un péptido enlazador que no destruye las propiedades deseadas del conjugado. En otra realización más, el anticuerpo puede conjugarse con un "receptor" (tal como estreptavidina) para utilización en la predirección tumoral en la que el conjugado de anticuerpo-receptor se administra al individuo, seguido de retirada del conjugado no unido de la circulación usando un agente de clasificación y después administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

VIII. Utilidad

Los presentes métodos proporcionados en el presente documento encuentran aplicabilidad industrial en la producción de proteínas heteromultiméricas. Los métodos de la invención reducen la cantidad de trabajo implicado en dos fermentaciones separadas y aislamientos así como las dificultades técnicas inherentes en dos fermentaciones separadas. Además, la eliminación de las etapas de hibridación y redox de los procedimientos de los métodos anteriores puede aumentar el rendimiento y reducir la complejidad y los costes de procesamiento.

Las proteínas heteromultiméricas descritas en el presente documento encuentran uso, por ejemplo, en métodos terapéuticos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. La divulgación proporciona diversos métodos basados en el uso de una o más de estas moléculas. En ciertas condiciones patológicas, es necesario y/o deseable utilizar proteínas heteromultiméricas, por ejemplo, anticuerpos multiespecíficos. La divulgación proporciona estas proteínas heteromultiméricas que pueden usarse para una diversidad de fines, por ejemplo como productos terapéuticos, profilácticos y de diagnóstico. Por ejemplo, la divulgación proporciona métodos para tratar una enfermedad, comprendiendo dichos métodos administrar a un sujeto que necesite tratamiento una proteína heteromultimérica como se describe en el presente documento por la que se trata la enfermedad. Puede usarse cualquiera de las proteínas heteromultiméricas descritas en el presente documento en métodos terapéuticos (o profilácticos o de diagnóstico) descritos en el presente documento.

Por ejemplo, cuando la proteína heteromultimérica es multivalente, un beneficio valioso es la avidéz potenciada que presenta por su antígeno. Además de tener alta afinidad intrínseca basándose en una unidad de unión (es decir, un Fab) con respecto a antígeno, los anticuerpos IgG normales también aprovechan el efecto de avidéz para aumentar su asociación con antígenos como resultado de su unión bivalente para las dianas.

Una proteína heteromultimérica dirigida contra dos epítomos distintos en la misma molécula de antígeno puede no

solamente proporcionar el beneficio de potenciar la avidéz de unión (debido a la unión bivalente), sino que también adquieren nuevas propiedades que no se asocian con ninguno de los anticuerpos parentales. Por lo tanto, las proteínas heteromultiméricas descritas en el presente documento encuentran uso, por ejemplo, en el bloqueo de interacciones de receptor-ligando.

5 Las proteínas heteromultiméricas descritas en el presente documento también encuentran uso en la aplicación de bloqueo simultáneo de las rutas de señalización de dos dianas con una molécula.

IX. Usos terapéuticos

10 Las proteínas heteromultiméricas tales como anticuerpos y fragmentos de anticuerpos descritos en el presente documento (por ejemplo, un anticuerpo y/o fragmento del mismo preparado de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento) pueden usarse para aplicaciones terapéuticas. Por ejemplo, dichas proteínas heteromultiméricas pueden usarse para el tratamiento de tumores, incluyendo tumores precancerosos, no metastásicos, metastásicos y cancerosos (por ejemplo, cáncer de estadio temprano), para tratamiento de trastornos alérgicos o inflamatorios, o para el tratamiento de enfermedad autoinmunitaria o para tratamiento de un sujeto en riesgo de desarrollar cáncer (por ejemplo, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, carcinoma de células renales, glioma o cáncer ovárico), un trastorno alérgico o inflamatorio o una enfermedad autoinmunitaria.

20 El término cáncer abarca una colección de trastornos proliferativos, incluyendo pero sin limitación crecimientos precancerosos, tumores benignos y tumores malignos. Los tumores benignos permanecen localizados en el sitio de origen y no tienen la capacidad de infiltrar, invadir o metastatizar a sitios distantes. Los tumores malignos invadirán y dañarán otros tejidos alrededor de ellos. También pueden obtener la capacidad de separarse de donde se iniciaron y propagarse a otras partes del cuerpo (metastatizar), habitualmente a través del torrente sanguíneo o a través del sistema linfático en el que se localizan los ganglios linfáticos. Los tumores primarios se clasifican según el tipo de tejido del que surgen; los tumores metastásicos se clasifican según el tipo de tejido del que derivan las células cancerosas. A lo largo del tiempo, las células de un tumor maligno se hacen más anómalas y aparecen menos como células normales. Este cambio en la apariencia de células cancerosas se denomina el grado de tumor y las células cancerosas se describen como bien diferenciadas, moderadamente diferenciadas, escasamente diferenciadas o indiferenciadas. Las células bien diferenciadas tienen apariencia bastante normal y se asemejan a las células normales de las que se originan. Las células indiferenciadas son células que se han vuelto tan anómalas que ya no es posible determinar el origen de las células.

35 El tumor puede ser un tumor sólido o un tumor no sólido o de tejido blando. Los ejemplos de tumores de tejido blando incluyen leucemia (por ejemplo, leucemia mielógena crónica, leucemia mielógena aguda, leucemia linfoblástica aguda de adulto, leucemia mielógena aguda, leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B maduros, leucemia linfocítica crónica, leucemia polilinfocítica o leucemia por tricoleucitos) o linfoma (por ejemplo linfoma no de Hodgkin, linfoma de linfocitos T cutáneo o enfermedad de Hodgkin). Un tumor sólido incluye cualquier cáncer de tejidos corporales distintos de sangre, médula ósea o el sistema linfático. Los tumores sólidos pueden separarse adicionalmente en los de origen en células epiteliales y los que no tienen origen en células epiteliales. Los ejemplos de tumores sólidos de células epiteliales incluyen tumores del tracto gastrointestinal, colon, mama, próstata, pulmón, riñón, hígado, páncreas, ovario, cabeza y cuello, cavidad oral, estómago, duodeno, intestino delgado, intestino grueso, ano, vesícula biliar, labio, nasofaringe, piel, útero, órganos genitales masculinos, órganos urinarios, vejiga y piel. Los tumores sólidos de origen no epitelial incluyen sarcomas, tumores cerebrales y tumores óseos.

45 Los cánceres epiteliales generalmente evolucionan desde un tumor benigno hasta un estadio preinvasivo (por ejemplo, carcinoma *in situ*), a un cáncer maligno, que ha penetrado en la membrana basal e invadido el estroma subepitelial.

50 También pueden usarse complejos proteicos multiespecíficos en estas aplicaciones terapéuticas, y en particular pueden usarse anticuerpos que se unen con HER2 para tratar el cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, carcinoma de células renales, glioma o cáncer ovárico.

55 Otros sujetos que son candidatos para recibir composiciones como se describe en el presente documento tienen, o están en riesgo de desarrollar, proliferación anómala de tejido fibrovascular, acné rosácea, síndrome de inmunodeficiencia adquirido, oclusión arterial, queratitis atópica, úlceras bacterianas, enfermedad de Bechet, tumores portados por la sangre, enfermedad obstructiva carótida, neovascularización coroidal, inflamación crónica, desprendimiento crónico de la retina, uveítis crónica, vitreítis crónica, exceso de uso de lentes de contacto, rechazo de injerto corneano, neovascularización corneana, neovascularización de injerto corneano, enfermedad de Crohn, enfermedad de Eales, queratoconjuntivitis epidémica, úlceras fúngicas, infecciones por herpes simple, infecciones por herpes zoster, síndromes de hiperviscosidad, sarcoma de Kaposi, leucemia, degeneración de lípidos, enfermedad de Lyme, queratolisis marginal, úlcera de Mooren, infecciones por micobacterias distintas de lepra, miopía, enfermedad neovascular ocular, fosas ópticas, síndrome de Osler-Weber (Osler-Weber-Rendu), osteoartritis, enfermedad de Paget, pars planitis, pemfigoide, filectenulosis, poliarteritis, complicaciones posláser, infecciones protozoarias, pseudoxtoma elástico, queratitis seca pterigica, queratotomía radial, neovascularización retiniana, retinopatía del prematuro, fibroplasia retrolental, sarcoidosis, escleritis, anemia falciforme, síndrome de Sogren,

tumores sólidos, enfermedad de Stargart, enfermedad de Steven's Johnson, queratitis límbica superior, sífilis, lupus sistémico, degeneración marginal de Terrien, toxoplasmosis, tumores de sarcoma de Ewing, tumores de neuroblastoma, tumores de osteosarcoma, tumores de retinoblastoma, tumores de rabdomiosarcoma, colitis ulcerosa, oclusión de las venas, deficiencia de vitamina A, sarcoidosis de Wegener, angiogénesis no deseada asociada con diabetes, enfermedades parasitarias, curación de heridas anómala, hipertrofia después de cirugía, lesión o traumatismo (por ejemplo, lesión pulmonar aguda/SDRA), inhibición del crecimiento del cabello, inhibición de la ovulación y formación del cuerpo lúteo, inhibición de la implantación e inhibición del desarrollo del embrión en el útero.

Los ejemplos de trastornos alérgicos o inflamatorios o enfermedad o trastornos autoinmunitarios que pueden tratarse usando un anticuerpo preparado de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitación, artritis (artritis reumatoide, tal como artritis aguda, artritis reumatoide crónica, artritis gotosa, artritis gotosa aguda, artritis inflamatoria crónica, artritis degenerativa, artritis infecciosa, artritis de Lyme, artritis proliferativa, artritis psoriásica, artritis vertebral y artritis reumatoide de aparición juvenil, osteoartritis, artritis crónica progrediente, artritis deformante, poliartritis crónica primaria, artritis reactiva y espondilitis anquilosante), enfermedades cutáneas hiperproliferativas inflamatorias, psoriasis tal como psoriasis en placas, psoriasis gutata, psoriasis pustular, y psoriasis de las uñas, dermatitis incluyendo dermatitis de contacto, dermatitis de contacto crónica, dermatitis alérgica, dermatitis de contacto alérgica, dermatitis herpetiforme y dermatitis atópica, síndrome de hiper IgM ligado a X, urticaria tal como urticaria alérgica crónica y urticaria idiopática crónica, incluyendo urticaria autoinmunitaria crónica, polimiositis/dermatomiositis, dermatomiositis juvenil, necrólisis epidérmica tóxica, esclerodermia (incluyendo esclerodermia sistémica), esclerosis tal como esclerosis sistémica, esclerosis múltiple (EM), tal como EM espino-óptica, EM progresiva primaria (EMPP) y EM recidivante remitente (EMRR), esclerosis sistémica progresiva, aterosclerosis, arteriosclerosis, esclerosis diseminada y esclerosis atáxica, enfermedad inflamatoria del intestino (EII) (por ejemplo, enfermedad de Crohn, enfermedades gastrointestinales mediadas por autoinmunidad, colitis tales como colitis ulcerosa, colitis microscópica, colitis colagenosa, colitis poliposa, enterocolitis necrotizante y colitis transmural y enfermedad inflamatoria del intestino autoinmunitaria), piodermia gangrenosa, eritema nodoso, colangitis esclerosante primaria, episcleritis), síndrome de dificultad respiratoria, incluyendo síndrome de dificultad respiratoria del adulto o agudo (SDRA), meningitis, inflamación de toda o parte de la úvea, iritis, coroiditis, un trastorno hematológico autoinmunitario, espondilitis reumatoide, pérdida de audición repentina, enfermedades mediadas por IgE tales como anafilaxis y rinitis alérgica y atópica, encefalitis tal como encefalitis de Rasmussen y encefalitis límbica y/o del tronco encefálico, uveítis, tal como uveítis anterior, uveítis anterior aguda, uveítis granulomatosa, uveítis no granulomatosa, uveítis facoantigénica, uveítis posterior, o uveítis autoinmunitaria, glomerulonefritis (GN) con y sin síndrome nefrótico tal como glomerulonefritis crónica y aguda tal como GN primaria, GN mediada por inmunidad, GN membranosa (nefropatía membranosa), GN membranosa idiopática o nefropatía membranosa idiopática, GN membrana proliferativa o membrana proliferativa (GNMP), incluyendo el Tipo I y Tipo II, y GN de progresión rápida, afecciones alérgicas, reacción alérgica, eccema incluyendo eccema alérgico atópico, asma tal como asma bronquial y asma autoinmunitaria, afecciones que implican la infiltración de linfocitos T y respuestas inflamatorias crónicas, enfermedad inflamatoria pulmonar crónica, miocarditis autoinmunitaria, deficiencia en la adhesión de leucocitos, lupus eritematoso sistémico (LES) tal como LES cutáneo, lupus eritematoso cutáneo subagudo, síndrome de lupus neonatal (LEN), lupus eritematoso diseminado, lupus (incluyendo nefritis, cerebritis, pediátrico, no renal, extra-renal, discoide, alopecia), diabetes mellitus de aparición juvenil (Tipo I), incluyendo diabetes mellitus insulino dependiente pediátrica (IDM), diabetes mellitus de aparición en adultos (diabetes de Tipo II), diabetes autoinmunitaria, diabetes insípida idiopática, respuestas inmunitarias asociadas con hipersensibilidad aguda y retardada mediada por citocinas y linfocitos T, tuberculosis, sarcoidosis, granulomatosis incluyendo granulomatosis linfomatoide, granulomatosis de Wegener, agranulocitos, vasculitis, incluyendo vasculitis (incluyendo vasculitis de vasos grandes (incluyendo polimialgia reumática y arteritis de células gigantes (Takayasu)), vasculitis de vasos medianos (incluyendo enfermedad de Kawasaki y poliarteritis nodosa), poliarteritis microscópica, vasculitis del SNC, vasculitis necrotizante, cutánea o de hipersensibilidad, vasculitis necrotizante sistémica y vasculitis asociada con ANCA, tal como vasculitis o síndrome de Churg-Strauss (CSS)), arteritis temporal, anemia aplásica, anemia aplásica autoinmunitaria, anemia Coombs positiva, anemia de Diamond Blackfan, anemia hemolítica o anemia hemolítica inmunitaria incluyendo anemia hemolítica autoinmunitaria (AIHA), anemia perniciosa, enfermedad de Addison, anemia de glóbulos rojos pura o aplasia (PRCA), deficiencia del Factor VIII, hemofilia A, neutropenia autoinmunitaria, pancitopenia, leucopenia, enfermedades que implican diapédesis de leucocitos, trastornos inflamatorios del SNC, síndrome de lesión de órganos múltiples tal como las secundarias de septicemia, traumatismo o hemorragia, enfermedad mediadas por complejo de antígeno-anticuerpo, enfermedad de membrana basal antiglomerular, síndrome de anticuerpos anti-fosfolípidos, neuritis alérgica, enfermedad de Behcet o Behcet, síndrome de Castleman, síndrome de Goodpasture, síndrome de Reynaud, síndrome de Sjogren, síndrome de Stevens-Johnson, penfigoide tal como penfigoide ampolloso y penfigoide cutáneo, pénfigo (incluyendo pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, pénfigo de mucus-penfigoide de membrana y pénfigo eritematoso), poliendocrinopatías autoinmunitarias, enfermedad o síndrome de Reiter, nefritis de complejo inmunitario, nefritis mediada por anticuerpos, neuromielitis óptica, polineuropatías, neuropática crónica, tal como polineuropatías de IgG o neuropatía mediada por IgM, trombocitopenia (como se desarrolla por pacientes con infarto de miocardio, por ejemplo), incluyendo púrpura trombocitopénica trombótica (TTP) y trombocitopenia autoinmunitaria o mediada por inmunidad tal como púrpura trombocitopénica idiopática (ITP) incluyendo ITP crónica o aguda, enfermedad autoinmunitaria del testículo y el ovario incluyendo orquitis autoinmunitaria y ooforitis, hipotiroidismo primario, hipoparatiroidismo, enfermedades endocrinas autoinmunitarias incluyendo tiroiditis tal como tiroiditis autoinmunitaria, tiroiditis de

Hashimoto, tiroiditis crónica (tiroiditis de Hashimoto) o tiroiditis subaguda, enfermedad tiroidea autoinmunitaria, hipotiroidismo idiopático, enfermedad de Graves, síndromes poliglandulares tales como síndromes poliglandulares autoinmunitarios (o síndromes de endocrinopatía poliglandular), síndromes paraneoplásicos, incluyendo síndromes paraneoplásicos neurológicos tales como síndrome miasténico de Lambert-Eaton o síndrome de Eaton-Lambert,

5 síndrome del hombre rígido o la persona rígida, encefalomiелitis tal como encefalomiелitis alérgica y encefalomiелitis alérgica experimental (EAE), miastenia grave tal como miastenia grave asociada a timoma, degeneración cerebelar, neuromiotonía, opsoclon o síndrome de opsoclon mioclono (SOM) y neuropatía sensorial, neuropatía motora multifocal, síndrome de Sheehan, hepatitis autoinmunitaria, hepatitis crónica, hepatitis lupoide, hepatitis de células gigantes, hepatitis activa crónica o hepatitis activa crónica autoinmunitaria, pneumonitis intersticial linfoide,

10 bronquiolitis obliterante (sin trasplante) frente a NSIP, síndrome de Guillain-Barré, enfermedad de Berger (nefropatía de IgA), nefropatía de IgA idiopática, dermatosis de IgA lineal, cirrosis biliar primaria, pneumocirrosis, síndrome de enteropatía autoinmunitaria, enfermedad Celíaca, esprúe celíaco (enteropatía del gluten), esprúe refractario, esprúe idiopático, crioglobulinemia, esclerosis lateral amiotrófica (ELA; enfermedad de Lou Gehrig), enfermedad de las arterias coronarias, enfermedad ótica autoinmunitaria tal como enfermedad del oído interno autoinmunitaria (EOIA),

15 pérdida de audición autoinmunitaria, síndrome de opsoclon mioclono (SOM), policondritis tal como policondritis refractaria o recidivante, proteinosis alveolar pulmonar, amiloidosis, escleritis, una linfocitos no cancerosa, una linfocitosis primaria, que incluye linfocitosis de linfocitos B monoclonales (por ejemplo, gammapatía monoclonal benigna y gammapatía monoclonal de significación indeterminada, GMSI), neuropatía periférica, síndrome paraneoplásico, canalopatías tales como epilepsia, migraña, arritmia, trastornos musculares, sordera, ceguera, parálisis periódica y canalopatías del SNC, autismo, miopatía inflamatoria, glomeruloesclerosis segmental focal (FSGS), oftalmopatía endocrina, uveorretinitis, coriorretinitis, trastorno hepatológico autoinmunitario, fibromialgia, insuficiencia endocrina múltiple, síndrome de Schmidt, adrenalitis, atrofia gástrica, demencia presenil, enfermedades desmielinizantes tales como enfermedades desmielinizantes autoinmunitarias, nefropatía diabética, síndrome de Dressler, alopecia areata, síndrome de CREST (calcinosis, fenómeno de Raynaud, dismovilidad esofágica,

25 esclerodactilia y telangiectasia), infertilidad autoinmunitaria masculina y femenina, enfermedad del tejido conectivo mixto, enfermedad de Chagas, fiebre reumática, aborto recurrente, pulmón de granjero, eritema multiforme, síndrome pos-cardiotomía, síndrome de Cushing, pulmón de criador de pájaros, angitis granulomatosa alérgica, angitis linfocítica benigna, síndrome de Alport, alveolitis tal como alveolitis alérgica y alveolitis fibrosante, enfermedad pulmonar intersticial, reacción de transfusión, lepra, malaria, leishmaniosis, quipanosomiasis,

30 esquistosomiasis, ascariasis, aspergilosis, síndrome de Sampter, síndrome de Caplan, dengue, endocarditis, fibrosis endomiocárdica, fibrosis pulmonar intersticial difusa, fibrosis pulmonar intersticial, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis quística, endoftalmitis, eritema elevatum et diutinum, eritroblastosis fetal, fascitis eosinófila, síndrome de Shulman, síndrome de Felty, flariasis, ciclitis tal como ciclitis crónica, ciclitis heterocrónica, iridociclitis o ciclitis de Fuch, púrpura de Henoch-Schonlein, infección por virus de inmunodeficiencia humana (VIH), infección por ecovirus,

35 cardiomiopatía, enfermedad de Alzheimer, infección por parvovirus, infección por virus de la rubéola, síndromes post-vacunación, infección por rubéola congénica, infección por virus de Epstein-Barr, paperas, síndrome de Evan, insuficiencia gonadal autoinmunitaria, corea de Sydenham, nefritis post-estreptocócica, tromboangitis obliterante, tirotoxicosis, tabes dorsal, corioiditis, polimialgia de células gigantes, oftalmopatía endocrina, neumonitis de hipersensibilidad crónica, queratoconjuntivis seca, queratoconjuntivis epidémica, síndrome nefrítico idiopático,

40 nefropatía de cambio mínimo, lesión de reperfusión por isquemia y familiar benigna, autoinmunidad retiniana, inflamación de las articulaciones, bronquitis, enfermedad de las vías respiratorias obstructiva crónica, silicosis, aftas, estomatitis aftosa, trastornos arterioscleróticos, aspermiogénesis, hemolisis autoinmunitaria, enfermedad de Boeck, crioglobulinemia, contractura de Dupuytren, endoftalmía faecoanafiláctica, enteritis alérgica, eritema nodoso leproso, parálisis facial idiopática, síndrome de fatiga crónica, fiebre reumática, enfermedad de Hamman-Rich, pérdida de audición sensorial, hemoglobinuria paroxística, hipogonadismo, ileítis regional, leucopenia, mononucleosis infecciosa, mielitis transversal, mixedema idiopático primario, nefrosis, oftalmia simpática, orquitis granulomatosa, pancreatitis, polirradiculitis aguda, piodermia gangrenosa, tiroiditis de Quervain, atrofia esplénica adquirida, infertilidad debida a anticuerpos antispermatozoides, timoma no maligno, vitíligo, SCID y enfermedades asociadas con virus de Epstein-Barr,

45 síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), enfermedades parasitarias tales como Leishmania, síndrome de choque tóxico, intoxicación alimentaria, afecciones que implican la infiltración de linfocitos T, deficiencia de adhesión de leucocitos, respuestas inmunitarias asociadas con hipersensibilidad aguda y retardada mediada por citocinas y linfocitos T, enfermedades que implican diapédesis de leucocitos, síndrome de lesión orgánica múltiple, enfermedades mediadas por complejos de antígeno-anticuerpo, enfermedad de membrana basal antiglomerular, neuritis alérgica, poliendocrinopatías autoinmunitarias, ooforitis, mixedema primario, gastritis atrófica autoinmunitaria, oftalmia simpática, enfermedades reumáticas, enfermedad del tejido conectivo mixto, síndrome nefrótico,

50 insulinitis, insuficiencia poliendocrina, neuropatía periférica, síndrome poliglandular autoinmunitario de tipo I, hipoparatiroidismo idiopático de aparición de adultos (HIAA), alopecia total, cardiomiopatía dilatada, epidermolisis ampollosa adquirida (EBA), hemocromatosis, miocarditis, síndrome nefrótico, colangitis esclerosante primaria, sinusitis purulenta o no purulenta, sinusitis aguda o crónica, sinusitis del etmoides, frontal, maxilar o esfenoides, un trastorno relacionado con eosinófilos tales como eosinofilia, eosinofilia de infiltración pulmonar, síndrome de mialgia-eosinofilia,

60 síndrome de Löffler, neumonía eosinófila crónica, eosinofilia pulmonar tropical, aspergilosis bronconeumónica, aspergiloma o granulomas que contienen eosinófilos, anafilaxis, espondiloartritis seronegativas, enfermedad autoinmunitaria poliendocrina, colangitis esclerosante, esclerótica, epiesclerótica, candidiasis mucocutánea crónica, síndrome de Bruton, hipogammaglobulinemia transitoria de la infancia, síndrome de Wiskott-Aldrich, ataxia telangiectasia, trastornos autoinmunitarios asociados con enfermedad de colágeno, reumatismo, enfermedad neurológica, trastorno de reperfusión por isquemia, reducción de la respuesta de la tensión sanguínea,

disfunción vascular, angiectasia, lesión tisular, isquemia cardiovascular, hiperalgesia, isquemia cerebral y enfermedad que acompaña a vascularización, trastornos de hipersensibilidad alérgica, glomerulonefritis, lesión por reperfusión, lesión por reperfusión de tejidos miocárdicos u otros, dermatosis con componentes inflamatorios agudos, meningitis purulenta aguda u otros trastornos inflamatorios del sistema nervioso central, trastornos inflamatorios oculares y orbitales, síndromes asociados con transfusión de granulocitos, toxicidad inducida por citocinas, inflamación grave aguda, inflamación intratable crónica, pielitis, neumonocirrosis, retinopatía diabética, trastorno de arterias grandes diabéticas, hiperplasia endarterial, úlcera péptica, valvulitis y endometriosis.

Además de los usos terapéuticos, los anticuerpos descritos en el presente documento pueden usarse para otros fines, incluyendo métodos de diagnóstico, tales como métodos de diagnóstico para las enfermedades y afecciones descritas en el presente documento.

X. Dosificación, formulaciones y duración

Las proteínas descritas en el presente documento se formularán, dosificarán y administrarán de una manera coherente con la buena práctica médica. Los factores para consideración en este contexto incluyen el trastorno particular que se trate, el mamífero particular que se trate, la afección clínica del sujeto individual, la causa del trastorno, el sitio de suministro del agente, el método de administración, el programa de administración y otros factores conocidos por los practicantes médicos. La "cantidad terapéuticamente eficaz" de las proteínas para administrar estará controlada por dichas consideraciones, y es la cantidad mínima necesaria para prevenir, aliviar o tratar un trastorno particular (por ejemplo, un cáncer, trastorno alérgico o inflamatorio o trastorno autoinmunitario). No es necesario que las proteínas se formulen, pero se pueden formular opcionalmente, con uno o más agentes usados actualmente para prevenir o tratar el trastorno. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de proteínas presentes en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento, y otros factores analizados anteriormente. Estos se usan en general en las mismas dosificaciones y con vías de administración como se han usado anteriormente en el presente documento o de aproximadamente 1 a 99 % de las dosificaciones empleadas hasta el momento. En general, el alivio o el tratamiento de un cáncer implican la reducción de uno o más síntomas o problemas médicos asociados con el cáncer. La cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede conseguir uno o una combinación de los siguientes: reducir (en al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 % o más) el número de células cancerosas, reducir o inhibir el tamaño tumoral o la carga tumoral; inhibir (es decir, reducir en algún grado y/o detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; reducir la secreción hormonal en el caso de adenomas; reducir la densidad vascular; inhibir la metástasis tumoral; reducir o inhibir el crecimiento tumoral; y/o aliviar en algún grado uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. En algunas realizaciones, las proteínas se usan para prevenir la aparición o reaparición de cáncer o un trastorno autoinmunitario en el sujeto.

En una realización, las proteínas descritas en el presente documento pueden usarse para aumentar la duración de la supervivencia de un sujeto humano susceptible de o al que se diagnostica un cáncer o trastorno autoinmunitario. La duración de supervivencia se define como el tiempo desde la primera administración del fármaco hasta la muerte. La duración de la supervivencia también puede medirse por la relación de riesgo estratificado (HR) del grupo de tratamiento frente al grupo de control, que representa el riesgo de muerte para un sujeto durante el tratamiento.

En otra realización más, el tratamiento descrito en el presente documento aumenta significativamente la tasa de respuesta en un grupo de sujetos humanos susceptibles de o a los que se diagnostica un cáncer que se tratan con diversas terapias antineoplásicas. La tasa de respuesta se define como el porcentaje de sujetos tratados que respondieron al tratamiento. En un aspecto, el tratamiento de combinación descrito en el presente documento, usando proteínas como describe en el presente documento y cirugía, terapia de radiación o uno o más agentes quimioterapéuticos aumenta significativamente la tasa de respuesta en el grupo de sujetos tratado en comparación con el grupo tratado con cirugía, terapia de radiación o quimioterapia sola, teniendo el aumento un p valor de Chi cuadrado de menos de 0,005. Se describen mediciones adicionales de la eficacia terapéutica en el tratamiento de cánceres en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 20050186208.

Se preparan formulaciones terapéuticas usando métodos convencionales conocidos en la técnica mezclando el principio activo que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizantes fisiológicamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences (20ª edición), ed. A. Gennaro, 2000, Lippincott, Williams & Wilkins, Filadelfia, PA). Los vehículos aceptables incluyen solución salina, o tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menores de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona, aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparaginas, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcares tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o PEG.

Opcionalmente, pero preferentemente, la formulación contiene una sal farmacéuticamente aceptable, preferentemente cloruro sódico, y preferentemente a concentraciones aproximadamente fisiológicas. Opcionalmente, las formulaciones descritas en el presente documento pueden contener un conservante farmacéuticamente

aceptable. En algunas realizaciones la concentración del conservante varía de 0,1 a 2,0 %, típicamente v/v. Los conservantes adecuados incluyen los conocidos en la técnica farmacéutica. Son conservantes preferidos alcohol bencílico, fenol, m-cresol, metilparabeno y propilparabeno. Opcionalmente, las formulaciones descritas en el presente documento pueden incluir un tensioactivo farmacéuticamente aceptable a una concentración de 0,005 a 0,02 %.

La formulación del presente documento también puede contener más de un compuesto activo necesario para la indicación particular que se trate, preferentemente los que tienen actividades complementarias que no se afectan de forma adversa entre sí. Dichas moléculas están convenientemente presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el fin pretendido.

Los principios activos también pueden inmovilizarse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsula de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsula de poli-(metil-metacrilato), respectivamente, en sistemas de suministro de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences, mencionado anteriormente.

Puede prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen la proteína heteromultimérica, estando dichas matrices en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxiethyl-metacrilato) o poli(vinilalcohol)), polilactidas (Patente de Estados Unidos N.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ etil-L-glutamato, etilen-vinil acetato no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxi-butírico. Aunque polímeros tales como etilvinil acetato y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando permanecen en el cuerpo una proteína o proteínas heteromultiméricas encapsuladas durante un largo tiempo, estas pueden desnaturalizarse, o agregarse como resultado de la exposición a humedad a 37 °C, dando como resultado pérdida de la actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Pueden idearse estrategias racionales para estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es formación de enlaces S-S intermoleculares mediante el intercambio de tio-disulfuro, puede conseguirse estabilización modificando restos de sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matrices poliméricas específicas.

Las proteínas descritas en el presente documento (por ejemplo, una proteína heteromultimérica tal como un anticuerpo multiespecífico preparado de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento) se administran a un sujeto humano, de acuerdo con métodos conocidos, tales como administración intravenosa como una embolada o mediante infusión continua durante un periodo de tiempo, mediante vías intramuscular, intraperitoneal, intra-cerebroespinal, subcutánea, intra-articular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o de inhalación. La administración local puede desearse particularmente si se asocian efectos secundarios o toxicidad extensivos con el antagonismo de la molécula diana reconocida por las proteínas. Puede usarse también una estrategia *ex vivo* para aplicaciones terapéuticas. Las estrategias *ex vivo* implican transfectar o transducir células obtenidas del sujeto con un polinucleótido que codifica una proteína como se describe en el presente documento. Las células transfectadas o transducidas se devuelven después al sujeto. Las células pueden ser cualquiera de una amplia serie de tipos incluyendo, sin limitación, células hemopoyéticas (por ejemplo, células de médula ósea, macrófagos, monocitos, células dendríticas, linfocitos T o linfocitos B), fibroblastos, células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos o células musculares.

En un ejemplo, el complejo proteico (por ejemplo, una proteína heteromultimérica tal como un anticuerpo multi específico preparado de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento), se administra por vía local, por ejemplo, mediante inyecciones directas, cuando el trastorno o localización del tumor lo permita, y las inyecciones pueden repetirse periódicamente. El complejo proteico también puede suministrarse de forma sistémica al sujeto o directamente a las células tumorales, por ejemplo, a un tumor o a un lecho tumoral después de escisión quirúrgica del tumor, para prevenir o reducir la reaparición local o metástasis.

XI. Artículos de fabricación

Otra realización descrita en el presente documento es un artículo de fabricación que contiene uno o más complejos proteicos descritos en el presente documento, y materiales útiles para el tratamiento o diagnóstico de un trastorno (por ejemplo, una enfermedad autoinmunitaria o cáncer). El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o un prospecto en o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, etc. Los recipientes pueden formarse de una diversidad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es eficaz para tratar la afección y puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por

una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es una proteína heteromultimérica (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo) como se describe en el presente documento. La etiqueta o el prospecto indican que la composición se usa para tratar la afección particular. La etiqueta o el prospecto comprenderán además instrucciones para administrar la composición de proteína heteromultimérica al sujeto. También se contemplan artículos de fabricación y kits que comprenden terapias combinatorias descritas en el presente documento.

El prospecto se refiere a instrucciones incluidas habitualmente en envases comerciales de productos terapéuticos que contienen información acerca de las indicaciones, el uso, la dosificación, la administración, las contraindicaciones y/o las advertencias con respecto al uso de dichos productos terapéuticos. En ciertas realizaciones, el prospecto indica que la composición se usa para tratar cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, carcinoma de células renales, glioma o cáncer ovárico.

Adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales considerados desde un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

También se proporcionan kits que son útiles para diversos fines, por ejemplo, para purificación o inmunoprecipitación de un antígeno (por ejemplo, HER2 o EGFR) de células. Para aislamiento y purificación de un antígeno (por ejemplo, HER2 o EGFR), el kit puede contener una proteína heteromultimérica (por ejemplo, un anticuerpo de EGFR/HER2) acoplada a perlas (por ejemplo, perlas de sepharose). Pueden proporcionarse kits que contienen la proteína o las proteínas heteromultiméricas para detección y cuantificación del antígeno *in vitro*, por ejemplo, en un ELISA o una transferencia de Western. Como con el artículo de fabricación, el kit comprende un recipiente y una etiqueta o un prospecto en o asociado con el recipiente. El recipiente contiene una composición que comprende al menos una proteína heteromultimérica (por ejemplo, anticuerpo o fragmento de anticuerpo multiespecífico) como se describe en el presente documento. Pueden incluirse recipientes adicionales que contienen, por ejemplo, diluyentes y tampones o anticuerpos de control. La etiqueta o el prospecto pueden proporcionar una descripción de la composición así como instrucciones para el uso de diagnóstico o *in vitro* pretendido.

Se considera que la descripción escrita anterior es suficiente para permitir al experto en la materia practicar la invención. Se ofrecen los siguientes Ejemplos solamente para fines ilustrativos, y no se pretende que limiten el alcance de la presente invención de ninguna manera. De hecho, diversas modificaciones de la invención además de las mostradas y descritas en el presente documento resultarán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior y quedan dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

En la divulgación experimental a continuación, se aplican las siguientes abreviaturas: eq (equivalentes); M (Molar); μM (micromolar); N (Normal); mol (moles); mmol (milimoles); μmol (micromoles); nmol (nanomoles); g (gramos); mg (miligramos); kg (kilogramos); μg (microgramos); l (litros); ml (mililitros); μl (microlitros); cm (centímetros); mm (milímetros); μm (micrómetros); nm (nanómetros); $^{\circ}\text{C}$ (grados centígrados); h (horas); min (minutos); s (segundos); ms (milisegundos); ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo); BsAb (anticuerpo biespecífico); C_L (dominio constante de cadena ligera); C_H (dominio constante de cadena pesada); CMC (citotoxicidad mediada por complemento); Fab (fragmento de unión a antígeno); Fc (fragmento cristalizado); Fv (fragmento variable ($V_L + V_H$)); EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico); HC (cadena pesada); IGFR (receptor del factor de crecimiento de tipo insulina); LC (cadena ligera); scFv (fragmento variable monocatenario (V_L y V_H anclados por un enlazador de aminoácidos), VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), VEGFR2 (receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 2); V_H (dominio pesado variable); V_L (dominio ligero variable).

Ejemplos

La presente invención se describe en más detalle en los siguientes ejemplos que no se pretende en ningún modo que limiten el alcance de la invención como se reivindica. Se pretende que las figuras adjuntas se consideren partes integrales de la memoria descriptiva y descripción de la invención. Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no limitar, la invención reivindicada.

Ejemplo 1

Construcción de vectores de expresión

Este ejemplo ilustra la construcción de ácido nucleico usada para transformar células hospedadoras.

En general, las secuencias codificantes de ADN, tanto de cadena pesada como de cadena ligera, se clonaron en un plásmido de expresión que contenía elementos promotores distintos para cada una de las secuencias y una resistencia a antibióticos para la selección de células bacterianas que contienen el plásmido de expresión. Las construcciones de vector también codifican la señal de secreción de enterotoxina termoestable II (STII) (Picken *et*

5 *al.*, 1983, *Infect. Immun.* 42: 269-275, y Lee *et al.*, 1983, *Infect. Immun.* 42: 264-268) para la exportación de los polipéptidos de anticuerpos al espacio periplásmico de la célula bacteriana. La transcripción de cada cadena se controla por el promotor de *phoA* (Kikuchi *et al.*, 1981, *Nucleic Acids Res.*, 9: 5671-5678) y se proporciona control de la traducción por variantes de secuencia señal de STII previamente descritas de fuerza traduccional relativa medida, que contienen cambios de codones silenciosos en la región de inicio de la traducción (TIR) (Simmons y Yansura, 1996, *Nature Biotechnol.* 14: 629-634 y Simmons *et al.*, 2002, *J. Immunol Methods*, 263: 133-147). Se muestra un dibujo esquemático de los plásmidos de botón y ojal en las Figuras 2A y 2B, respectivamente.

10 Aunque la presente invención no se basa en secuencias de unión a anticuerpo específicas, y es aplicable a cualquier combinación de semianticuerpos, los Ejemplos del presente documento se dirigen a anticuerpos heteromultiméricos dirigidos a c-met, EGFR, IL-4 e IL-13. Se proporcionan ejemplos de anticuerpos anti c-met en la Patente de Estados Unidos n.º 7.472.724 y Patente de Estados Unidos n.º 7.498.420. Se proporcionan ejemplos de anticuerpos anti EGFR en la Solicitud Provisional de Estados Unidos 61/210.562 (presentada el 20 de marzo de 2009), Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 20080274114 (publicada el 6 de noviembre de 2008) y Patente de Estados Unidos n.º 5.844.093 (concedida el 1 de diciembre de 1998). Se describen ejemplos de anticuerpos anti IL-13 en la Patente de Estados Unidos n.º 7.501.121 (concedida el 10 de marzo de 2009), Patente de Estados Unidos n.º 7.615.213 (concedida el 10 de noviembre de 2009), documento WO 2006/085938 (publicado el 17 de agosto de 2006), Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 20090214523 (publicada el 27 de agosto de 2009) y Patente de Estados Unidos n.º 7.674.459 (concedida el 9 de marzo de 2010). Se describen ejemplos de anticuerpos anti IL-4 en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º US 20080241160 (publicada el 2 de octubre de 2008) y Patente de Estados Unidos n.º 6.358.509 (concedida el 19 de marzo de 2002).

25 Cada semianticuerpo tuvo un botón (protuberancia) o un ojal (cavidad) introducido por ingeniería genética en la cadena pesada como se describe en la Patente de Estados Unidos n.º 7.642.228. Brevemente, se generó en primer lugar un mutante de botón de C_H3. Después se creó una biblioteca de mutantes de ojal de C_H3 introduciendo aleatoriamente restos 366, 368 y 407 que están próximos al botón en el dominio C_H3 compañero. En los siguientes ejemplos, la mutación de botón es T366W, y el ojal tiene mutaciones T366S, L368A y Y407V en una cadena principal de IgG1. Un experto en la materia determina fácilmente mutaciones equivalentes en otros isotipos de inmunoglobulina. Además, el experto en la materia apreciará fácilmente que se prefiere que los dos semianticuerpos usados para el biespecífico sean del mismo isotipo. Pueden usarse semianticuerpos de diferentes isotipos pero pueden necesitar mutaciones adicionales.

35 Aunque el vector descrito en este Ejemplo es para semianticuerpo anti c-Met o anti EGFR, un experto en la materia apreciará fácilmente que cualquier anticuerpo puede codificarse en el plásmido. El plásmido de partida para todas las construcciones usadas en el presente documento es el plásmido de cistrón separado anti factor tisular descrito previamente, paTF50, con TIR relativos de 1 para pesada y 1 para ligera (Simmons *et al.*, 2002, *J. Immunol Methods*, 263:133-147, y Patente de Estados Unidos n.º 6.979.556). Se usó un aumento en las fuerzas de TIR relativas para aumentar los títulos de expresión de estos semianticuerpos.

40 Ejemplo 2

Producción de proteínas heteromultiméricas usando distintos cultivos celulares

45 El siguiente ejemplo muestra la producción de proteínas heteromultiméricas cuando las células que expresan los componentes monoméricos se cultivan en distintos cultivos. En este método las células se cultivan y se induce que expresen el semianticuerpo en distintos cultivos. En un método, los cultivos de células hospedadoras pueden combinarse antes de la purificación de proteínas. En otro método los componentes pueden purificarse primero y después combinarse para formar la proteína heteromultimérica.

50 En ambos métodos, se introduce un ácido nucleico que codifica el primer polipéptido que contiene bisagra (por ejemplo, un semianticuerpo (botón)) en una primera célula hospedadora y un ácido nucleico que codifica el segundo polipéptido que contiene bisagra (por ejemplo, un semianticuerpo (ojal)) se introduce en una segunda célula hospedadora. Aunque este ejemplo ilustra la formación de un BsAb, un experto en la materia apreciará fácilmente que los métodos descritos son aplicables a cualquier proteína heteromultimérica que comprende una región bisagra, por ejemplo, anticuerpos, etc.

Método n.º 1 - Producción independiente de semianticuerpo de botón y semianticuerpo de ojal en distintos cultivos, purificación separada de los semianticuerpos, mezcla y redox para formar BsAb intacto.

60 Se generaron semianticuerpos que contenían las mutaciones de botón o de ojal en distintos cultivos expresando las cadenas pesadas y ligeras usando las construcciones descritas en el Ejemplo 1 en una célula hospedadora bacteriana, por ejemplo, *E. coli*. Véase Figura 3B y 4A. En este método n.º 1, el semianticuerpo de botón fue un anti EGFR y el semianticuerpo de ojal fue un anti c-met. Los plásmidos de expresión del Ejemplo 1 se introdujeron en cepas hospedadoras de *E. coli* 33D3 (Ridgway *et al.* 1999, *Cancer Res.* 59 (11): 2718) o 64B4 (W3110 Δ *fhuA* Δ *phoA* *ilvG+* Δ *prc* *spr43H1* Δ *degP* Δ *manA* *lac^f* Δ *ompT*) y se seleccionaron transformantes en placas de LB que contenían carbenicilina. Después se usaron transformantes para inocular un cultivo iniciador de LB que contiene carbenicilina y

este se cultivó durante una noche con agitación a 30 °C. El cultivo iniciador se diluyó 100X en un medio con fosfato limitante C.R.A.P. (Simmons *et al.*, 2002, J. Immunol Methods, 263: 133-147) que contenía carbenicilina, y este se cultivó durante 24 horas con agitación a 30 °C. Los cultivos se centrifugaron, y los sedimentos celulares se congelaron hasta el inicio de la purificación de anticuerpos. Los sedimentos se descongelaron y se resuspendieron en un tampón de extracción que contenía base Tris 25 mM ajustado a pH 7,5 con ácido clorhídrico, NaCl 125 mM y EDTA 5 mM (TEB o Tampón de Extracción de Tris) con una relación de volumen con respecto a peso de 100 ml de TEB por cada 5 gramos de sedimento celular, y se extrajeron rompiendo las células usando microfluidos pasando la mezcla resuspendida a través de un microfluidificador modelo 110F de Microfluidics Corporation (Newton, MA) tres veces. El extracto de células bacterianas se clasificó después por centrifugación durante 20 minutos a 15.000 x g y el sobrenadante se recogió y se filtró a través de un filtro de acetato de 0,22 micrómetros antes de la purificación.

Cada semianticuerpo se purificó por separado por captura de Proteína A seguido de cromatografía de intercambio catiónico. Se cargaron extractos celulares clarificados del semianticuerpo de botón en una columna HiTrap MabSelect SURE de 1 ml de GE Healthcare (Piscataway, NJ) a 2 ml/min. Después de la carga la columna se lavó con 10 volúmenes de columna (VC) de citrato sódico 40 mM, pH 6,0, cloruro sódico 125 mM y EDTA 5 mM seguido de 5 volúmenes de columna de citrato sódico 20 mM a pH 6,0 para facilitar la captura por la columna de intercambio catiónico. Los semianticuerpos capturados por afinidad se eluyeron con 10 volúmenes de columna (VC) de ácido acético 0,2 mM (pH 2-3) y se capturaron directamente en una columna de intercambio catiónico fuerte SP-HP HiTrap de 1 ml de GE Healthcare. La columna se lavó con 10 VC de tampón A que contenía ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES) 25 mM pH 5,8. Los semianticuerpos se eluyeron con un gradiente lineal de tampón B 0-50 % (MES 25 mM, pH 5,8 y cloruro sódico 1 M (NaCl)). Ambas proteínas se eluyeron entre 20-40 % de B y el pico eluyente como se determinó por absorbancia de UV a 280 nm y por análisis de SDS-PAGE no reductor de las fracciones recogidas se agruparon por separado como el semianticuerpo de botón o de ojal. Ambas proteínas mostraron en general un pico de elución principal y todas las fracciones que contenían especies de cadena pesada y cadena ligera que se oxidaron entre sí se incluyeron en el grupo. Se muestra análisis de los semianticuerpos purificados por SDS-PAGE reductor y no reductor en la Figura 4B. Los resultados indican que la mayoría de la proteína expresada y capturada es de un tamaño de 75 kD. Se confirmó esto mediante espectrometría de masas ESI-TOF mostrada en la Figura 4C. La masa de los semianticuerpos fueron las masas esperadas que indicaban que no había ningún aducto de disulfuro en ninguna cisteína, incluyendo los dos restos de cisteína en la región bisagra. Para determinar si las cisteínas bisagra se reducían mostrando un tiol libre reactivo, las proteínas se hicieron reaccionar a pH neutro con N-etilmaleimida (NEM) 1 mM durante una hora antes del análisis por espectrometría de masas. La masa de la proteína no cambió, lo que indicaba que las cisteínas bisagra se oxidaron entre sí más probablemente en un disulfuro intracatenario, por ejemplo, un disulfuro cíclico. Para ensamblar un anticuerpo biespecífico completamente intacto, usando estos dos semianticuerpos (botón y ojal), fue necesario en primer lugar reducir los disulfuros intracatenarios en la región bisagra para liberar los tioles sin cisteína de modo que pudieran oxidarse posteriormente con la otra cadena pesada para formar el anticuerpo biespecífico de 150 kD.

Para conseguir la hibridación, reducción y reoxidación de los dos semianticuerpos complementarios para formar las moléculas biespecíficas intactas, se desarrolló el siguiente procedimiento. Después de aislamiento independiente, las proteínas purificadas se combinaron entre sí a masa igual en la etapa de agrupamiento del procedimiento (mostrada en la Figura 5A), el pH del grupo se ajustó a 7,5 añadiendo un décimo de volumen de Tris 1 M, pH 7,5, y las proteínas se redujeron con Tris[2-carboxietil]fosfina (TCEP) 0,5 mM a temperatura ambiente. Después de reducción durante 2 horas se intercambió el tampón de las proteínas agrupadas en Tris 25 mM, pH 7,5 y NaCl 125 mM usando columnas de centrifugación de Desalación Zeba de 5 ml (Pierce, Rockford, IL) dando como resultado un volumen de aproximadamente 4 ml de una concentración de proteína de 1 mg/ml. Las proteínas se hibridaron después calentando la mezcla hasta 52 °C durante 25 minutos seguido de enfriamiento a temperatura ambiente, aproximadamente 20 °C. Los anticuerpos hibridados se concentraron usando concentradores de centrifugación de punto de corte de 10 kD de PM a un volumen de 0,5 ml con una concentración de proteína de aproximadamente 8 mg/ml y se oxidaron mediante la adición de ácido deshidroascórbico (DHAA) 300 micromolar a la mezcla de reacción desde una solución de reserva de DHAA 100 mM disuelta en dimetilsulfóxido. La cantidad de DHAA añadida para oxidación es aproximadamente 10 veces más que la concentración molar de la proteína. Después de oxidación durante una noche a temperatura ambiente, el material oxidado se procesó en una columna de filtración en gel S-200 (22 ml de Tricorn S200 de GE Healthcare) en un tampón que contenía MES 25 mM pH 6,0 y NaCl 300 mM. El anticuerpo intacto se agrupó y se diluyó 10 veces en agua. La proteína BsAb se purificó después por cromatografía de intercambio catiónico débil usando una resina de carboximetilo (CM) (HiTrap CM-FF 1 ml, GE Healthcare) con una elución en gradiente de pH de 4,5 a 9,2. La composición del tampón A y B consistió en citrato sódico 20 mM, MES 30 mM, HEPES 20 mM, imidazol 20 mM, Tris 20 mM, CAPS 20 mM y NaCl 25 mM, en la que el tampón A se ajusta a pH 4,2 con HCl y el tampón B se ajusta a pH 9,2 (o 10,4) usando NaOH. El material purificado obtenido después de la cromatografía de CM se analizó por espectrometría de masas para determinar la composición molecular exacta (Figura 4D). El análisis de espectrometría de masas indicó que el único producto de anticuerpo intacto detectable tenía una PM de 146.051,89, que coincide casi idénticamente con la especie de botón-oyal heterodimérica anti EGFR/anti c-met con un PM teórico de 145.051,75. El rendimiento de este procedimiento, comenzando con aproximadamente 2 mg del botón y 2 mg del ojal fue de aproximadamente 0,5-1 mg.

Para producción a gran escala de anticuerpos para experimentación *in vivo* tal como la determinación de propiedades farmacocinéticas en primates no humanos, son necesarias cantidades de anticuerpo en escala de

100 mg a gramos. Se desarrolló un procedimiento usando un cultivo separado, independiente para cada semianticuerpo como se muestra en la Figura 5A para producir anticuerpos biespecíficos intactos en estas cantidades. Para estas preparaciones, se requerían fermentaciones de 10 litros para producir sedimentos celulares o caldo de cultivo completo con suficientes cantidades de anticuerpo (Simmons *et al.*, 2002. J. Immunol. Methods, 263: 133-147 y Patente de Estados Unidos n.º 6.979.556). Durante la experimentación se usaron sedimentos celulares o cultivos bacterianos completos para biomasa que contenía semianticuerpos expresados. En algunos casos, una fracción significativa del anticuerpo se había filtrado al medio, en el que el caldo de cultivo completo proporcionó rendimientos mayores. Para sedimentos celulares, el material se resuspendió en tampón de extracción que contenía Tris 25 mM, pH 7,5, EDTA 5 mM y NaCl 125 mM y se lisó por microfluidificación usando un microfluidificador Modelo HC80003A de Microfluidics (Newton, MA). Se microfluidificó directamente caldo de cultivo completo sin la adición de aditivos. En ambos casos, se realizaron tres pases del material a través del instrumento. En este ejemplo, se prepararon 500 mg de dos versiones de un anticuerpo biespecífico que se dirigía a las citocinas interleucina 4 (botón) e interleucina 13 (ojal).

La primera versión del biespecífico contenía un Fc IgG1a humano solamente con las mutaciones de botón y ojal y el segundo contenía un Fc modificado adicionalmente con dos mutaciones, T307Q y N434A, que conducen a una mayor afinidad por el receptor de Fc neonatal FcRn). Se espera que las segundas versiones transmitan una eliminación más lenta y semivida más larga para el anticuerpo. El anticuerpo de ojal (que se dirige a IL-4) y el anticuerpo de botón (que se dirige a IL-13) de ambas versiones del Fc (WT-Fc para el primero y variante de FcRn para el segundo) se cultivaron ambos por separado en 10 litros de fermentación y el caldo de cultivo completo que contenía medio de cultivo y células bacterianas se homogeneizaron y se purificaron de forma independiente. Después de la microfluidificación del caldo de cultivo completo, el extracto se trató con un volumen igual de polietilenoimina (PEI) 0,4 % (pH 9,0) para preparar el extracto para clarificación por centrifugación. La mezcla se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente o durante una noche a 4 °C. PEI provocó precipitación extensiva del extracto que se clarificó por centrifugación a 15.000 Xg durante 45 minutos. El sobrenadante se filtró posteriormente por filtros de 0,22 micrómetros antes de cargar en una columna de captura de Proteína A Mab Select SURE de 100 ml. El extracto se cargó a 20 ml/min y se lavó con citrato sódico 40 mM, pH 6,0 y NaCl 100 mM hasta que la absorbancia de UV a 280 alcanzó una línea basal estable, generalmente de aproximadamente 10 volúmenes de columna (VC). El tampón de lavado se cambió a citrato sódico 20 mM, pH 6,0 y se lavó durante aproximadamente 2 VC. El semianticuerpo capturado se eluyó usando ácido acético 0,2 M. Después de aislamiento por Proteína A los anticuerpos se purificaron por cromatografía de intercambio catiónico usando resina de S-FF (GE Healthcare) o cromatografía de filtración en gel usando resina S200 (GE Healthcare) para retirar impurezas y agregados. Los semianticuerpos purificados fueron en su mayoría las especies de ~75 kD como se ve en la Figura 5B. Después de la segunda etapa de aislamiento, se agruparon 500 mg de cada semianticuerpo juntos a una concentración de 1 mg/ml y el pH se ajustó a 7,5 usando Tris 1 M, pH 7,5. La mezcla se calentó a 37 °C en un incubador y se supervisó por filtración en gel con respecto a aparición de la especie de anticuerpo de 150 kD. Después de 2 horas, la hibridación se completó mostrando conversión completa a la especie dimérica de 150 kD y la mezcla se enfrió a temperatura ambiente. Las proteínas se redujeron mediante la adición de DTT 2 mM durante dos horas a 24 °C y posteriormente se concentraron a 20 mg/ml usando filtros de centrifugación de punto de corte de 10 kD. La solución concentrada se oxidó por diálisis durante una noche en un tampón que contenía solamente Tris 25 mM, pH 8,0. El material oxidado se analizó posteriormente con respecto a pureza y agregación. Se determinó por espectrometría de masas que la especie de anticuerpo intacta era la molécula biespecífica heterodimérica completamente oxidada, intacta, sin embargo, la filtración en gel y el análisis de SDS-PAGE indicaron la presencia de cantidades significativas de agregado, parte del cual era claramente el resultado de multímeros con enlaces disulfuro (datos no mostrados). Para purificar adicionalmente el anticuerpo biespecífico para experimentación *in vivo*, el anticuerpo se separó sobre una columna de filtración en gel S-200 en Tris, pH 7,5 y NaCl 125 mM. El material purificado mostró una pérdida mayor del 30 % de material debido a la retirada de agregados introducidos. Para los estadios finales de la preparación, la proteína se adhirió a una columna de intercambio catiónico, se lavó con TX114 al 0,1 % en acetato sódico 50 mM, pH 5,0, para retirar la endotoxina contaminante, y se eluyó con un tampón de pH alto que contenía Tris 50 mM, pH 8,0. La proteína eluida se formuló después por diálisis en un tampón adecuado para experimentación *in vivo* y se almacenó a 4 °C. El material final que consistía en el WT-Fc y el FcRn-variante se analizó por SDS-PAGE, espectrometría de masas, ensayos de LAL para determinar los niveles de endotoxina contaminante y análisis de filtración en gel. Los resultados del SDS-PAGE se muestran en la Figura 5C, e indican que la especie principal es el anticuerpo biespecífico intacto a 150 kD. La Figura 6A muestra la actividad biológica de los anticuerpos en un ensayo de proliferación de células TF-2 que ensaya la neutralización de las citocinas IL-4 e IL-13. Para el ensayo, se usaron anticuerpos biespecíficos anti IL-4/IL-13, anti IL-4 y anti IL-13 a una concentración de partida de 25 µg/ml y se diluyeron en serie 10 veces en una placa de cultivo de 96 pocillos (Falcon, Cat n.º 353072) hasta una concentración final de 0,025 µg/ml en medio de ensayo (medio de cultivo sin rhGM-CSF) o medio de ensayo que contenía IL-4 humano 0,4 ng/ml (R&D Systems, Catálogo n.º 204-IL) más IL-13 humana 20 ng/ml (Genentech Inc.) en un volumen final de 50 µl/pocillo. Los anticuerpos diluidos se preincubaron durante 30 minutos a 37 °C.

Después de la preincubación, las células TF-1 cultivadas en RPMI 1640 (Genentech, Inc.), suero bovino fetal al 10 % (HyClone, Cat n.º SH300071.03), L-glutamina 2 mM 100 unidades/ml, penicilina 100 µg/ml, estreptomina (Gibco, Cat n.º 10378) y rhGM-CSF 2 ng/ml (R & D Systems, Cat n.º 215-GM) se lavaron 2 veces con medio de ensayo y se resuspendieron en medio de ensayo para obtener una concentración final de 2×10^5 células/ml. Se

añadieron 50 µl de células a cada pocillo que contenía los anticuerpos diluidos, medio de ensayo más citocinas IL-4 e IL-13 (control de proliferación máximo) o medio de ensayo solamente (control de fondo). Todas las muestras se sembraron en placas por duplicado. Las placas se incubaron a 37 °C a CO₂ 5 % durante 4 días. Se añadió 1 µCi de ³H Timidina (Perkin Elmer, Cat n.º NET027005MC) a cada pocillo durante las últimas 4 horas de incubación. Las

5 placas se recogieron en un Unifilter-96 GF/C (Perkin Elmer, Cat n.º 6005174) usando un Packard Filtermate, la incorporación de ³H timidina se midió usando un TopCount NXT (Perkin Elmer). Los datos se representaron usando KaleidaGraph. Los resultados indican que el anticuerpo biespecífico anti IL-4/anti IL-13 WT es tan eficaz como combinaciones de anticuerpos IgG de IL-4 e IL-13 en la neutralización de la actividad de IL-4 e IL-13.

10 Los dos anticuerpos (WT anti-IL-4/anti-IL-13 y variante de FcRn anti-IL-4/anti-IL-13) se ensayaron después con respecto a sus propiedades farmacocinéticas (PK) en mono cinomologus. Usando una inyección de una única dosis, la molécula WT formulada en acetato de histidina 20 mM, pH 5,5, sacarosa 240 mM, y Tween 20 0,02 % a 10,8 mg/ml y 1 mg/ml y la variante de FcRn en fosfato sódico 20 mM, pH 7,5, sacarosa 240 mM, y Tween 20 0,02 % a 10,5 mg/ml, se administraron por inyección IV. El nivel de dosificación fue de 20 mg/kg y 2 mg/kg para las dos

15 concentraciones WT y 20 mg/kg para la variante de FcRn. Se tomaron muestras de suero de dos monos macho y dos hembra a los que se les inyectaron los tres tratamientos periódicamente a lo largo de 42 días. Las muestras de suero se ensayaron con respecto al anticuerpo biespecífico intacto por ELISA en el que un antígeno, bien IL-4 o IL-13, se extendió sobre las placas y el anticuerpo se capturó posteriormente del suero. La cantidad de anticuerpo biespecífico capturado presente se determinó por detección con un segundo ligando biotinilado bien IL-13 o IL-4 (en

20 el ligando que no se hubiera extendido sobre las placas) y estreptavidina acoplada a enzima. Los resultados de la Figura 6B muestran las eliminaciones de dos compartimentos esperadas de las tres muestras. Las propiedades PK de las dos versiones diferentes del anticuerpo se muestran en la Tabla 2 en comparación con otros dos anticuerpos que derivan de hospedadores de producción CHO (Avastin y Herceptin) y contienen glucosilación de Fc. Resulta evidente que el anticuerpo biespecífico producido por *E. coli* es similar a los anticuerpos derivados de CHO de un

25 proceso convencional y que la variante de FcRn tiene una semivida más larga.

Tabla 2					
Población	Media (% de RSE)	Vc (ml/kg)	CL (ml/kg/día)	T1/2 (día)	
WT	29,0	(9,48)	4,49	(7,66)	~ 10
FcRn	15,8	(5,72)	2,11	(2,47)	~ 18
Avastin			4,3		~ 12
Herceptin			5,5		~ 9

30 Método n.º 2 – Producción de semi-anticuerpo de botón y semi-anticuerpo de ojal en distintos cultivos (es decir, independientes), mezcla de caldo de cultivo completo antes de la purificación de los semi-anticuerpos y lisis sin la adición de un reductor para formar BsAb intacto.

Este método fue un intento de reducir el número de etapas en el proceso purificando los semi-anticuerpos de botón y ojal al mismo tiempo. Por lo tanto, los caldos de fermentación se mezclaron antes de sedimentar y resuspender en

35 tampón de extracción. Se ha creído que cada célula hospedadora liberaría su semi-anticuerpo expresado que contiene el disulfuro cíclico dentro de la región bisagra en el tampón de extracción tras rotura de la membrana celular. Posteriormente, la purificación de ambos semi-anticuerpos podría realizar simultáneamente seguido de la etapa de redox-hibridación para formar el BsAb intacto. Sorprendentemente, se ha descubierto que los anticuerpos de botón-oyal se heterodimerizaron y oxidaron por sí solos para formar un anticuerpo de longitud completa (~150 kD)

40 a más de 20 % del total combinado del semi-anticuerpo y el anticuerpo intacto (~75 kD) (véase Tabla 3).

Se cultivaron las células hospedadoras que expresaban el semi-anticuerpo de botón y semi-anticuerpo de ojal y se indujeron en distintos cultivos usando el proceso como se ha descrito en el Método n.º 1 anterior. El caldo de cultivo de fermentación celular completo de cada cultivo se mezcló con el otro a tres relaciones de volúmenes diferentes y después se centrifugó para formar un único sedimento celular. Los caldos de cultivo de fermentación de células completas se mezclaron juntos hasta un volumen final de 500 ml a una relación de (anti-c-met):(anti-EGFR) de 1:1, 2:1 o 1:2, con la intención de igualar la recuperación de los dos anticuerpos en abundancia relativamente igual y sabiendo que el semi-anticuerpo anti-EGFR se expresó de forma similar al anticuerpo de cMet en las mismas

45 condiciones. Cada segmento celular se resuspendió en tampón de extracción y se lisó. Se extrajo y se purificó proteína por cromatografía de Proteína-A seguido de cromatografía de intercambio catiónico como se describe en el Ejemplo 2, Método n.º 1. El tampón de extracción contenía Tris 25 mM, pH 7,5, NaCl 125 mM y EDTA 5 mM. Cuando se purificaron por separado, cada uno del semi-anticuerpo de botón y semi-anticuerpo de ojal forman un disulfuro cíclico dentro de la región bisagra, es decir, un disulfuro intracatenario, evitando la asociación covalente de las cadenas pesadas de botón y ojal. Sin embargo, se descubrió que cuando la primera y la segunda células

50 hospedadoras se lisaron entre sí después de cocultivar o después de mezclar caldos de cultivo de fermentación completos antes de la centrifugación, hubo algún nivel de ensamblaje en la especie de anticuerpo intacta. La Figura 7 muestra la especie de anticuerpo intacta observada en las tres relaciones. Esto sugiere que las modificaciones del procedimiento podrían dar como resultado formación espontánea del anticuerpo biespecífico intacto que podría eliminar sustancialmente la necesidad de etapas químicas adicionales.

55

60

Se realizó cuantificación de las dos especies proteicas separando 5 microgramos de proteína por SDS-PAGE

usando un gel de Tris-Glicina 4-20 % Novex (Invitrogen, Carlsbad CA). Después de electroforesis el gel se tiñó con tinción de Coomassie coloidal que contenía sulfato de amonio 150 mM, ácido acético 1,74 M, metanol 10 % y colorante de Coomassie R250 0,4 g/l en agua. El gel se destiñó con ácido acético 10 % en agua y posteriormente se equilibró en solución de secado Gel-Dry (Invitrogen) y se secó entre dos láminas de celofán. Después de secar el gel, las bandas proteicas se cuantificaron por el sistema de captura de imágenes Odyssey IR (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE) a 700 nm.

Tabla 3. Señales fluorescentes de licor para anticuerpos intactos y semi-anticuerpos después de aislamientos mixtos de dos cultivos de botón y ojal cultivados por separado. [Esta es una medida de una bisagra]

Relación en volumen (c-met:EGFR)	UFR 150 kD	UFR 75 kD	Combinado UFR	% de UFR 150/total
1:1	36,01	98,78	134,8	26,72
2:1	36,8	107	143,8	25,59
1:2	34,64	107,83	142,5	24,31

Método n.º 3 – Producción de semi-anticuerpo de botón y semi-anticuerpo de ojal en cultivos independientes, centrifugación independiente, sedimentos mezclados y resuspendidos seguido de lisis, y purificación del BsAB sin la adición de un reductor

Este método es un intento de reducir el número de etapas en el proceso de purificación del botón y el ojal al mismo tiempo.

Las células se cultivan independientemente y se sedimentan por centrifugación. Los sedimentos se mezclan y se resuspenden juntos en tampón de extracción. Se cree que los semi-anticuerpos se liberarán al tampón de extracción tras rotura de las membranas celulares y que se verá un perfil de producto similar al del Método n.º 2, anterior.

Ejemplo 3

Producción de proteínas heteromultiméricas usando un cultivo de células mixtas individuales

Este ejemplo ilustra la formación de proteína heteromultiméricas de un cultivo que comprende dos poblaciones de células hospedadoras, en el que no hay ninguna adición de un reductor en el proceso.

Método n.º 4 – Producción de semi-anticuerpo de botón y semi-anticuerpo de ojal de diferentes poblaciones celulares en el mismo cultivo para formar BsAb sin la adición de reductor.

Se realizaron en primer lugar experimentos de co-cultivo en matraces de agitación de 0,5 litros con dos transformantes de *E. coli* diferentes que contenían un semi-anticuerpo de botón o de ojal. Para este experimento, se produjo un cultivo iniciador de los semi-anticuerpos tanto de botón (anti-EGFR) como de ojal (anti-cMet) por cultivo durante una noche en medio LB (carbenicilina 100 µg/ml) en cultivos de 5 ml a 30 °C. Los cultivos de una noche de DO₆₀₀ igual se usaron para inocular 500 ml de medio CRAP completo (carbenicilina 100 µg/ml) en tres relaciones diferentes (anti-EGFR:anti-cMet; 1.5:1, 1:1 y 1:1.5) manteniendo el volumen de siembra total a 1/100 del cultivo. Las células se cultivaron durante 24 horas a 30 °C, 200 rpm. Las células se sedimentaron después por centrifugación (6750 x g, 10 minutos, 4 °C) y se usaron para purificación.

Las células se resuspendieron en tampón de extracción que contenía Tris 25 mM, pH 7,5, EDTA 7 mM y NaCl 125 mM a una relación de 100 ml por cada 10 g de sedimento celular. Después de la extracción por microfluidización y preparación para cromatografía como se describe en el Ejemplo 2, los extractos celulares de las tres relaciones diferentes se purificaron capturando en primer lugar el anticuerpo biespecífico en una columna HiTrap de 1 ml Mab Select SURE (GE Healthcare, S. San Francisco, CA) y con un tampón de lavado de columna que contiene solamente citrato sódico 40 mM a pH 6,0. Después del lavado y la elución como se describe en el Ejemplo 2, los grupos de captura de proteína A se cargaron en una columna de intercambio catiónico SP-HP y se purificaron como se ha descrito en el Ejemplo 2. Después de separación por intercambio catiónico, los picos cromatográficos de cada una de las tres purificaciones se agruparon y se concentraron a un volumen de aproximadamente 50 – 100 microlitros, y con una concentración de proteínas de aproximadamente 15 mg/ml. Las relaciones de inoculación inicial parecían suponer una diferencia en la cantidad final de anticuerpo intacto, y esta fue una mayor proporción de anticuerpo biespecífico intacto con respecto a formas de menor peso molecular de lo que se observó cuando los sedimentos celulares se mezclaron entre sí después de cultivar durante una noche a 37 °C. Véase Tabla 4.

Tabla 4

Relación de inoculación	UFR 150 kD	UFR 75 kD	UFR combinadas	% de UFR 150/ total
1,5 frente 1	11,71	10,28	22,0	53,25
1 frente 1	9,09	8,96	18,1	50,36
1 frente 1,5	7,28	8,71	16,0	45,53

Para determinar si el co-cultivo puede extenderse a la escala de fermentación de 10 litros, lo que es crítico para procedimientos de aumento de escala, se realizaron varios experimentos con los semi-anticuerpos anti-EGFR y anti-cMet. Para fermentaciones de 10 litros, se usó un cultivo iniciador de inoculación que contenía una relación celular 1:1 de anti-EGFR y anti-cMet. Los co-cultivos de 10 litros se cultivaron en condiciones idénticas a las de los cultivos de semi-anticuerpos individuales descritos en el Ejemplo 2. Se usó sedimento celular o caldo de cultivo completo para extracción y aislamiento del material de anticuerpo, también como se ha descrito anteriormente. Para extracción de material de los sedimentos celulares, se produjeron aproximadamente 2,5 kg de pasta a partir de una fermentación de 10 litros. Los sedimentos celulares se resuspendieron en 5 litros de tampón que contenía Tris 25 mM, pH 7,5 y NaCl 125 mM. El sedimento se trató con un mezclador polytron durante 2 minutos antes de resuspender el sedimento, y después se microfluidificó, se clarificó y se preparó para captura de Proteína A como se ha descrito en el Ejemplo 2. El experimento de fermentación se repitió dos veces más y los resultados del aislamiento de co-cultivo de fermentadores de 10 litros se muestran en la Figura 8C. Se usó espectrometría de masas para caracterizar la proteína de ~ 150 kD y la proteína de ~ 75 kD para determinar los componentes moleculares. Sorprendentemente, la proteína de mayor PM dominante es el anticuerpo biespecífico y la proteína de ~ 75 kD fue principalmente el semi-anticuerpo de cMet debido a su perfil de expresión diferencial. Esto indica que el anticuerpo biespecífico se ha formado completamente sin la necesidad de etapas químicas adicionales. Debido a que el anticuerpo biespecífico es una combinación estequiométrica 1:1 de los semi-anticuerpos de botón y ojal, la presencia de solamente una proteína de 75 kD indica que la mayoría del semi-anticuerpo limitante se ha incorporado espontáneamente en el anticuerpo biespecífico intacto.

Esta observación condujo al desarrollo de un esquema de expresión y purificación simplificado como se muestra en la Figura 8D. Después de captura de proteína A, el anticuerpo se diluyó 1:1 con un tampón que contenía sulfato de amonio 1,5 M y fosfato sódico 25 mM, pH 6,5 y se cargó en una columna de interacción hidrófoba (HIC) Dionex Pro Pac HIC-10 4,6 mm x 100 mm (Sunnyvale, CA). Un gradiente de 30-60 % de B, con el tampón A compuesto de fosfato sódico 25 mM, pH 6,95, y sulfato de amonio 1,5 M y el tampón B compuesto de fosfato sódico 25 mM, pH 6,95 y alcohol isopropílico 25 %. Las proteínas se separaron con un gradiente de 15 VC. La proteína se separó en dos especies principales, una que contenía el anticuerpo biespecífico intacto y la otra que contenía el semi-anticuerpo anti-EGFR en exceso. Los resultados de la separación cromatográfica se muestran en la Figura 8E. Las fracciones que contienen el anticuerpo intacto se agruparon y se trataron para retirar cualquier endotoxina contaminante restante por adherencia a una columna de S-FF en un tampón de acetato sódico 25 mM a pH 5,0, lavando con el mismo tampón de acetato que contiene Triton X114 0,1 % y después retirando el detergente lavando con el tampón de acetato de partida. La proteína se eluyó de la columna S-FF usando Tris 25 mM, pH 8,0, se agrupó y se analizó mediante SDS-PAGE, espectrometría de masas y ensayos de LAL para endotoxinas. La proteína contenía 0,076 UE/mg de endotoxina en la preparación final, lo que indica que es adecuada para aplicaciones *in vivo*. La caracterización final se muestra en la Figura 8F. El análisis de SDS-PAGE muestra que una mayoría de la proteína es el anticuerpo biespecífico intacto final, y el análisis de espectrometría de masas muestra el peso molecular esperado para el anticuerpo biespecífico, y la falta de cualquier especie contaminante, en particular las formas homodiméricas que podrían estar presentes. La comparación del procedimiento modificado usando co-cultivo en comparación con el procedimiento que requiere hibridación y química redox se muestra en la Figura 8G.

Método n.º 5 – Producción de semi-anticuerpo de botón y semi-anticuerpo de ojal en el mismo cultivo para formar BsAb intacto usando diferentes relaciones de botón:ojal

Este ejemplo muestra que células hospedadoras que usan construcciones de expresión similares (que difieren solamente en el semi-anticuerpo para expresar) no crecen de forma diferente entre sí y producen BsAb intacto.

Los experimentos han demostrado que el control de la relación de una de las cadenas se realizó fácilmente ajustando la relación de inoculación antes de expansión y expresión. Las dos cepas no crecen de forma diferente entre sí.

Para determinar si se conserva la relación de inóculo frente a la fermentación de un co-cultivo, se realizó un experimento para determinar la cantidad de la cadena pesada de botón u ojal que estaba presente al final de una fermentación de 24 horas de co-cultivos con relaciones celulares diferentes. Se cultivaron células que albergaban el plásmido de botón (anti-EGFR) u ojal (anti c-Met) por separado en medio LB (carbenicilina 100 µg/ml) durante una noche a 30 °C. El cultivo iniciador se usó para inocular medio CRAP completo (carbenicilina 100 µg/ml) con diferentes relaciones de cultivo de una noche manteniendo el volumen de inoculación combinado a 1:100 del cultivo final. Las relaciones ensayadas para anti-EGFR:anti-c-Met fueron 10:1, 5:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:5 y 1:10. Después de cultivar durante 24 horas a 30 °C se obtuvieron muestras celulares y se analizaron mediante SDS-PAGE no reductor (TrisGlicina al 12 %) seguido de transferencia de Western con Anticuerpo IgG-Fc de Cabra anti-Humano conjugado con HRP (Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TX). Las cadenas pesadas de las dos especies se resuelven por SDS-PAGE y el resultado se muestra en la Figura 8B. La cantidad de cada semi-anticuerpo se correlaciona con la relación de inoculación del co-cultivo, lo que indica que las células que albergan plásmidos que codifican semi-anticuerpos diferentes no crecen en forma diferente entre sí en un co-cultivo.

Método n.º 6 – Producción de semi-anticuerpo de botón y semi-anticuerpo de ojal en el mismo cultivo para formar permeabilización de membrana a BsAb intacto.

Este ejemplo muestra que la permeabilización de membrana libera los semi-anticuerpos al medio y con la formación posterior de un BsAb intacto sin la necesidad de química adicional (por ejemplo, redox o acoplamiento).

Se sabe que mutaciones que conducen a la pérdida de síntesis de lipoproteínas alteran la membrana celular de *E. coli* lo que confiere filtración de proteínas periplásmicas al medio y también hace a *E. coli* hipersensible a EDTA (Hirota, Y. *et al.* PNAS 74: 1417-1420 (1977)). Se comparó la liberación de anticuerpo expresado de la cepa 65G4 (W3110 $\Delta fhuA \Delta phoA ilvG^+ \Delta prc spr43H1 \Delta degP \Delta manA lacI^f \Delta ompT \Delta/pp$) con y sin adición de EDTA. Se co-cultivaron células que expresaban α -IL-4 (ojal) o α -IL-13 (botón) como se ha descrito en el método n.º 4 en una relación 1:1 y se cultivaron en un agitador incubador a 200 rpm durante 20 horas a 30 °C. Al final de la incubación el cultivo se dividió en tres alcuotas iguales. Una muestra actuó como un control sin EDTA añadido. A las otras dos muestras se añadió EDTA, pH 8,0 a una concentración final de 10 mM. La incubación continuó para todas las muestras durante 30 minutos, después de lo cual se añadió $MgCl_2$ a una concentración final de 20 mM a una de las muestras tratadas con EDTA. Todas las muestras se incubaron durante 30 minutos adicionales en el agitador incubador antes de retirar células por centrifugación (9200 x g, 20 minutos, 4 °C) y el sobrenadante se filtró a través de un filtro de GF/F (Whatman, Piscataway, NJ) y filtro PES de 0,2 μm (Nalgene, Rochester, NY). Puede añadirse DNasal, de páncreas bovino (Sigma, St. Louis, MO) a 4 mg/l para mejorar la filtración.

El sobrenadante filtrado se cargó después directamente sobre una columna de Proteína A MabSelect SURE HiTrap de 1 ml (GE Healthcare) como se ha descrito previamente. La proteína capturada se eluyó con ácido acético como se ha descrito anteriormente y puede verse recuperación de pico de la proteína en la Figura 9A. Los resultados muestran que la absorbancia de UV total aumenta en las muestras tratadas con EDTA. Esta absorbancia es anticuerpo específico intacto y semi-anticuerpo en exceso. Véase Figuras 9B y 9C.

En un experimento separado los semi-anticuerpos anti-IL-4 y anti-IL-13 se expresaron por separado o como un cultivo 1:1 de células 65G4. Se cultivaron células como se ha descrito anteriormente (Método n.º 4) con la excepción de complementar el medio CRAP completo con Antiespumante de Silicona (Fluka, Buchs, Suiza) hasta 0,02 % (v/v). Después de cultivar las células durante 24 horas, 30 °C, 200 rpm en un agitador incubador, se añadió EDTA, pH 8,0, a una concentración final 10 mM y la incubación continuó durante una hora antes de añadir $MgCl_2$ hasta 20 mM. Las células se recogieron por centrifugación (6750 x g, 10 minutos, 4 °C), el sobrenadante se filtró (PES 0,2 μm , Nalgene, Rochester, NY) y los anticuerpos se capturaron por la proteína A como se ha descrito anteriormente y se analizaron mediante SDS-PAGE y espectrometría de masas. Los resultados mostrados en la Figura 9D indican que la formación de anticuerpos biespecíficos intactos se observa solamente en presencia de ambas mitades del biespecífico. Adicionalmente, la mayoría del anticuerpo anti-IL-13 se incorporó en el anticuerpo biespecífico sin ninguna química redox adicional ya que el análisis de espectrometría de masas indicó que la banda proteica de 75 kD era principalmente el semi-anticuerpo anti-IL-4. El anticuerpo biespecífico purificado por proteína A se diluyó 1:1 con tampón de sulfato de amonio y se purificó adicionalmente con una columna ProPac HIC-10 de 7,5 mm x 150 mm (Dionex, Sunnyvale, CA) usando el mismo procedimiento que se ha descrito en el Ejemplo 3. Se descubrió que el anticuerpo biespecífico intacto se eluía a un tiempo de retención de 99,68. Este pico se agrupó y se analizó mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras y se descubrió que estaba compuesto casi completamente por la especie de anticuerpo intacta. Para confirmar que esta proteína era una molécula biespecífica heterodimérica pura, se analizó la proteína mediante ESI-TOF CL/EM. Se inyectaron aproximadamente 10 microgramos del anticuerpo biespecífico en una columna de fase inversa PLRP-S 300 A de 3 micrómetros 50 x 2,1 mm (Polymer Laboratories) y se separó por un gradiente de 4,3 minutos de 34-45 % 0,5 % de TFA y acetonitrilo usando una HPLC Agilent Serie 1200 y un caudal de 0,5 ml/min y un calentador de columna a 80 °C. Se analizó la proteína que eluía de la CL mediante un TOF Agilent 6210. Se observó un único pico que contenía proteína, y este pico se desconvolucionó usando software Agilent Mass Hunter versión B.02.00 usando un intervalo de masas de 50.000-160.000, etapa de 1,0 Da, umbral de 30,0 S/N, masa promedio de 90, un intervalo de masa limitada y una anchura de isótopos ajustada a automática. La mayoría de la señal representa la masa esperada de la molécula biespecífica. La masa para el biespecífico heterodimérico intacto calculada a partir de la secuencia de aminoácidos es de 144.044 que está en un intervalo de 1-2 Daltons de la masa medida, mientras que las masas calculadas de las posibles proteínas homodiméricas son 144.954,6 para anti-IL-4 y 145.133,4 para anti-IL-13.

Se ensayó si diferentes relaciones de inoculación persistirían de nuevo a lo largo del cultivo para este conjunto de anticuerpos y también en el contexto de la supresión en *lpp* de 65G4. Se usaron cultivos de siembra con anti-IL-4 (ojal) o anti-IL-13 (botón) de DO_{600} igual para inocular 500 ml de medio CRAP a relaciones 2:1 y 1:2, se cultivaron y se permeabilizaron al final de la fermentación como se ha descrito anteriormente (véase Método n.º 6). Las dos preparaciones de medios diferentes se purificaron mediante captura por Proteína A seguido de separación por HIC como se ha descrito anteriormente, excepto que el pH de los tampones de HIC A y B se redujeron a 6,5. Los resultados de las dos relaciones de cultivos iniciadores diferentes se muestran en la Figura 9E. Se observa que la mayoría de la proteína es el anticuerpo biespecífico intacto. Los otros picos se caracterizaron por espectrometría de masas y se marcaron en la Figura 9E. El semi-anticuerpo anti-IL-13 se detecta ligeramente, y se ve una cantidad significativa más de anti-IL-4. En la relación 33/66 de anti-IL-4 con respecto a anti-IL-13, hay más anti-IL-13 observado con una cantidad ligera de anti-IL-4 restante. Aquí se ven que la relación de inoculación se mantiene a lo

largo del cultivo y que la optimización del proceso podría conseguirse equilibrando las relaciones de mitades de anticuerpos expresadas mediante manipulación de relaciones de cultivos iniciadores.

5 Se ha continuado ensayando este proceso de expresión de co-cultivo en células delta-Ipp en varias variantes de anticuerpos diferentes. En la Figura 9F se muestran proteínas purificadas finales después de formulación post-cromatografía de HIC de algunos semi-anticuerpos ejemplares.

Ejemplo 4

10 Bibliotecas de proteínas heteromultiméricas

Este ejemplo ilustra la construcción de una biblioteca de proteínas heteromultiméricas.

15 Ciertos métodos que puede usarse para explorar mezclas de anticuerpos biespecíficos o para generar rápidamente grandes matrices de anticuerpos biespecíficos usando los métodos descritos.

Método n.º 7

20 En algunos casos la elección de anticuerpo biespecífico se desconoce, pero podría ser el resultado de la combinación de muchos semi-anticuerpos diferentes. Como alternativa, puede desearse una combinación diana específica, por ejemplo, anti-IL-4/anti-IL-13 pero hay varios semi-anticuerpos candidatos de los que elegir. Puede conseguir hallar la combinación de semi-anticuerpos específica que produce la mejor unión o eficacia combinando los semi-anticuerpos en un formato de matriz, y se pueden producir muchas variantes de anticuerpos biespecíficos rápidamente. Para este experimento, puede producirse un anticuerpo tal como anti-CD3 en un exceso de
25 aproximadamente 10 veces (o mayor) frente a la cantidad de anticuerpo necesaria para explorar. Esta molécula puede después hibridarse y oxidarse usando el procedimiento descrito en el Ejemplo n.º 1. Aproximadamente un décimo de la cantidad total del primer anticuerpo puede usarse para combinar con una cantidad igual de aproximadamente 10 semi-anticuerpos que se dirigen a antígenos diferentes (tales como anti-CD19, anti-CD20, etc.) como se representa en diagrama en la Figura 10. Si es necesario combinar un semi-anticuerpo primario adicional con el segundo repertorio de semi-anticuerpo, esto puede hacerse para producir un conjunto de moléculas de exploración.

35 En una segunda modificación del método, el anticuerpo primario (tal como anti-CD3) puede cultivarse como un co-cultivo usando células hospedadoras de *E. coli* "normales" o con una cepa mutante que tiene un fenotipo de lipoproteínas no funcionales. Este semi-anticuerpo puede después añadirse sistémicamente a cada uno de los semi-anticuerpos variables produciendo una matriz de moléculas biespecíficas que contienen todas el semi-anticuerpo de dirección primario.

40 Método n.º 8

El semi-anticuerpo primario puede combinarse con una serie de semi-anticuerpos compañeros alternativos en una manera que consiste en producir este semi-anticuerpo en cantidad suficiente para combinar con todos los otros semi-anticuerpos combinados. Después puede realizarse una hibridación a granel en una única reacción de modo que el semi-anticuerpo primario sea la versión de botón o de ojal de la cadena pesada y el conjunto de semi-anticuerpos de dirección secundarios sean el mutante complementario. Aquí, puede producirse una mezcla compleja de anticuerpos que puede ser útil para tratar la enfermedad como una combinación.

50 Como alternativa, puede usarse un enfoque de co-cultivo usando los métodos descritos en los Ejemplos anteriores para producir una mezcla compleja de anticuerpos biespecíficos con un semi-anticuerpo primario determinado y un semi-anticuerpo secundario variable. Dicha mezcla podría después aislarse a granel y usarse como un material de exploración de modo que un resultado positivo en el grupo de variantes biespecíficas podría después desconvolucionarse para determinar la especie de anticuerpo biespecífica activa, o la mezcla combinada podría usarse como una mezcla terapéutica más eficaz.

55 Ejemplo 5

Actividad *in vitro*

60 Aquí se ejemplifica que los anticuerpos biespecíficos descritos en el presente documento poseen actividad en sistemas *in vitro*. Se emplearon dos líneas celulares en este Ejemplo 5 y en el Ejemplo 6, posterior. En estos experimentos KP4, una línea celular de carcinoma ductal pancreático, y A431, una línea celular de carcinoma epidermoide, están ambas fuertemente conducidas por Met o EGFR, respectivamente, por lo tanto estas son buenas líneas celulares y xenoinjertos tumorales para explorar la eficacia de bsAb contra cada diana de forma independiente.

65 La línea celular KP4 se obtuvo del Banco de Células del Centro Riken BioResource (n.º de línea Celular RCB1005;

3-1-1 Koyadai, Tuskubashi, Ibaraki 305-0074 Japón). La línea celular A431 (CRL-1555) se obtuvo de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Manassas, VA).

Se lavaron una vez células cancerosas A431, con PBS, se resuspendieron en medio sin suero, se contaron y después se añadieron a placas de 96 pocillos (2500 células/pocillo). Después las células se trataron con HGF humano (0,5 nM) y TGF α (0,05 nM) solos o con un intervalo de dosis de (1) anti EGFR, (2) anticuerpo anti c-met (c-Met "de una rama"), (3) la combinación de anticuerpo anti EGFR y anti c-met o (4) el anticuerpo biespecífico anti EGFR/anti c-met. Se realizaron ensayos de tres días de AlamarBlue™ de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (BioSource International; Camarillo, CA). Se determinaron los valores de CI₅₀ mediante análisis de regresión no lineal con un modelo de cuatro parámetros (Software KaleidaGraph ver. 3.6, Synergy, Reading, PA).

En el ensayo de células KP4 que es dependiente de Met *in vitro* e *in vivo*, el crecimiento estimulado por tratamiento con TGF-alfa y HGF puede inhibirse mediante anticuerpo anti c-met, la combinación de anticuerpo anti c-met y anti EGFR y el anticuerpo biespecífico. El tratamiento con anti EGFR muestra actividad limitada como un único agente en estas células. Hubo, sin embargo, inhibición más potente por el anticuerpo biespecífico en células KP4 que Ab anti c-met solo o anti c-met más anti EGFR añadidos por separado. En células A431, que se conducen principalmente por EGFR, ni el anticuerpo anti EGFR ni el anticuerpo anti c-met por sí solos fueron capaces de inhibir significativamente la proliferación celular. La combinación de ambas moléculas sí mostró algo de inhibición de la proliferación celular, sin embargo, el anticuerpo biespecífico mostró mayor actividad a las mismas concentraciones. Además, las células mostraron apoptosis además de anti proliferación.

En estos ensayos el anticuerpo biespecífico mostró rendimiento mejorado en relación con los otros anticuerpos solos o la combinación de anticuerpos anti Met y anti EGFR añadidos por separado. Estos datos sugieren que es la disposición de anticuerpos anti Met y anti EGFR juntos en un anticuerpo lo que hace al biespecífico superior. Los resultados se muestran en la Figura 11.

Ejemplo 6

Actividad *in vivo*

Este ejemplo demuestra que los anticuerpos biespecíficos descritos en el presente documento poseen actividad en modelos *in vivo*.

Se obtuvieron ratones hembras desnudos que tenían 6-8 semanas de edad y pesaban 22-30 g de Charles River Laboratories, Inc. (Hollister, CA). Los ratones se alojaron en Genentech en jaulas microaislantes de roedores convencionales y se aclimataron a las condiciones de estudio durante al menos 3 días antes de la implantación de células tumorales. Solamente se usaron para el estudio animales que parecían ser sanos y que estaban libres de anomalías evidentes. Todos los procedimientos experimentales se adaptaron a los principios directrices de la Sociedad de Fisiología American y se aprobaron por el Comité de Cuidado y Uso Animal Institucional de Genentech. Se inyectaron a los ratones por vía subcutánea células cancerosas pancreáticas KP4 humanas (5 millones de células en Solución Salina Equilibrada de Hank (HBSS) más Matrigel (BD Biosciences) por ratón) o células de carcinoma epidermoide A431 humano (5 millones de células en HBSS más Matrigel/ratón). Cuando los tumores alcanzaron ~150 mm³, los ratones se clasificaron aleatoriamente y se trataron con vehículo o el EGFR/c-met biespecífico (bsEGFR/c-met) (50 mg/kg IP 1x/semana) durante 2 semanas.

Los volúmenes tumorales se midieron en dos dimensiones (longitud y anchura) usando calibradores Ultra Cal-IV (Modelo 54-10-111, Fred V. Fowler Co, Newton, MA) y se analizaron usando Excel, versión 11.2 (Microsoft Corporation Redmond, WA). Se representaron gráficas de inhibición tumoral usando KaleidaGraph, versión 3.6 (Software Synergy, Reading, PA). El volumen tumoral se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Tamaño del tumor (mm}^3\text{)} = (\text{medida más larga} \times \text{medida más corta}^2) \times 0,5$$

Los datos se analizaron por el enfoque de modelación mixta descrito posteriormente. Aquí, no se calculan un promedio y desviación típica estrictos. En lugar de proporcionar desviaciones típicas para representar la variabilidad, se usan intervalos de confianza. Estos se presentan en la tabla como los límites superior e inferior en el paréntesis al lado de ABC/día % de TGI. Se midieron los pesos corporales animales usando una escala Adventura Pro AV812 (Ohaus Corporation; Pine Brook, NJ). Se generaron gráficas usando KaleidaGraph, versión 3.6. Se calculó el porcentaje de cambio de peso usando la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de cambio de peso de grupo} = (\text{nuevo peso} - \text{peso inicial}) / \text{peso inicial} \times 100$$

Para analizar apropiadamente la medición repetida de los volúmenes tumorales de los mismos animales a lo largo del tiempo, se usó un enfoque de modelización mixta (Pinheiro *et al.*, Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. (2008) R package versión 3.1-89). Este enfoque aborda tanto mediciones repetidas como bajas modestas debido a cualquier muerte no relacionada con el tratamiento de animales antes del final del estudio.

Se usaron splines de regresión cúbica para ajustar un perfil no lineal a los ciclos temporales del volumen tumoral \log_2 a cada nivel de dosis. Estos perfiles no lineales se relacionaron después con la dosis dentro del modelo mixto. Se calculó la inhibición del crecimiento tumoral como porcentaje del vehículo (% TGI) como el porcentaje del área bajo la curva ajustada (ABC) para el grupo de dosis respectivo por día en relación con el vehículo, usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de TGI} = 100 \times (1 - \text{ABC}_{\text{dosis}} / \text{ABC}_{\text{veh}})$$

Para determinar los intervalos de incertidumbre (II) para % de TGI, la curva ajustada y la matriz de covarianza ajustada se usaron para generar una muestra aleatoria como una aproximación a la distribución del % de TGI. La muestra aleatoria estaba compuesta de 1000 realizaciones simuladas del modelo mixto-ajustado, en el que el % de TGI se ha recalculado para cada realización. Los II indicados fueron los valores para los que el 95 % del tiempo, los valores recalculados del % de TGI quedarían en esta región dado el modelo ajustado. Los percentiles 2,5 y 97,5 de la distribución simulada se usaron como los II superior e inferior.

Se realizó y generó representación usando R, versión 2.8.1 (R Development Core Team 2008; R Foundation for Statistical Computing; Viena, Austria) y Excel, versión 12.0.1 (Microsoft Corporation). Los datos se analizaron usando R, versión 2.8.1, y los modelos mixtos se ajustaron dentro de R usando el paquete nlme, versión 3.1-89 (Pinheiro *et al.*, 2008).

Las Figuras 12 y 13 muestran la actividad *in vivo* del anticuerpo biespecífico anti EGFR/c-met en modelo de xenoinjerto pancreático KP4 y modelo de xenoinjerto de carcinoma epidermoide A431, respectivamente. El anticuerpo biespecífico fue capaz de inhibir el crecimiento de los tumores *in vivo* para ambos modelos en comparación con animales de control que recibieron solamente el vehículo como un tratamiento. Las gráficas indican que el volumen tumoral se redujo por la administración del anticuerpo biespecífico con el volumen tumoral ajustado por efectos mixtos lineales (LME) de 505 mm³ en xenoinjertos KP4 a los 20 días después del tratamiento en comparación con 1710 mm³ para la rama solo de vehículo y 328 mm³ en xenoinjertos de A431 después de 20 días en comparación con 495 mm³ en el control solo de vehículo. En general hubo un cambio significativo en el ABC/día expresado como % de TGI. Para el tratamiento de anticuerpos biespecíficos en los xenoinjertos de KP4, hubo 85 % de inhibición del crecimiento tumoral (TGI) y en los modelos de xenoinjerto de A431 hubo una TGI del 68 %.

Ejemplo 7

Producción de proteínas heteromultiméricas usando cultivos de células CHO

Este ejemplo ilustra la formación de proteínas heteromultiméricas a partir de un cultivo que comprende dos poblaciones de células CHO hospedadoras.

Se generaron semianticuerpos que contenían las mutaciones de botón y ojal en distintos cultivos expresando transitoriamente las cadenas pesadas y ligeras usando construcciones y técnicas bien conocidas en este campo. (Véase, por ejemplo Ye *et al.*, *Biotechnol Bioeng.* 15 de jun de 2009; 103(3): 542-51.) Las células se cultivaron en 1 litro de medio (véase, por ejemplo, Wong *et al.*, *J. Biol. Chem.* 2007 282(31): 22953-22963) y se recogieron después de 14 días.

Cada semianticuerpo se capturó en una columna MabSURE SELECT de 5 ml. La columna se lavó después con 10 volúmenes de columna (VC) del tampón de equilibrado seguido de 10 VC de un tampón de baja conductividad de citrato sódico (tampón de equilibrado que consiste en TRIS 50 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, Triton X-100 0,05 %, Triton X-114 0,05 %; tampón de lavado de baja conductividad que consiste en citrato sódico 25 mM pH 6,0). Cada rama se eluyó con Acetato Sódico 0,15 M pH 2,7.

Cada semianticuerpo se dializó en TRIS 50 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM a una relación de 1 a 300 a temperatura ambiente durante una noche. Después cada rama se centrifugó, se filtró usando filtros de acetato de celulosa de 0,22 micrómetros y las dos ramas se mezclaron entre sí a una relación de 1 a 1 (la concentración total fue menor de 2 mg/ml). La mezcla se procesó después de una de dos formas de la siguiente manera:

Redox (con baño de agua): la mezcla se calentó después en un baño de agua a 37 °C. Después de una hora, la mezcla de redox se retiró del baño de agua y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Una vez que la mezcla alcanzó temperatura ambiente, se añadió agente reductor recién preparado, ditiotreitól (DTT), para conseguir una concentración final de DTT 2 mM. La mezcla se dejó a temperatura ambiente durante dos horas, después se concentró usando filtros de centrifuga Amicon Ultracell (10K) a 11 mg/ml y se dializó en TRIS 50 mM pH 8,0, 150 ml NaCl (1:300) durante una noche.

Redox (sin baño de agua): la mezcla se dejó a temperatura ambiente durante 3 horas, después de lo cual se añadió agente reductor recién preparado, ditiotreitól (DTT), para conseguir una concentración final de DTT 2 mM. La mezcla se dejó a temperatura ambiente durante dos horas, se concentró usando filtros de centrifuga Amicon Ultracell (10K) hasta 11 mg/ml, y se dializó en TRIS 50 mM pH 8,0, 150 ml de NaCl (1:300) durante una noche.

5 Después de redox, el material ensamblado se purificó en una columna de HIC ProPac 10 de 15 ml usando un gradiente de 20 VC similar a la sección anterior. El tampón de ejecución fue Fosfato Potásico 25 mM, Sulfato de Amonio 0,7 M pH 6,5 y el tampón de elución fue Fosfato Potásico 25 mM pH 6,5, isopropanol 25 %. Se recogieron fracciones de 1 ml y se separaron fracciones pico mediante Tris-Glicina SDS-PAGE 4-20 % para analizar la pureza y agrupar en consecuencia. Los grupos se concentraron después usando filtros de centrifuga Amicon Ultracell (10K) hasta aproximadamente 1,5 mg/ml y se dializaron en TRIS 50 mM pH 8,0, NaCl 150 mM y se filtró a 0,22 µm.

10 La identidad de cada biespecifico ensamblado se confirmó por Espectrometría de Masas. La pureza se analizó mediante gel de Tris-Glicina SDS PAGE 4-20 % y bioanalizador. Los niveles de agregados se determinaron mediante SEC-MALS.

15 Los resultados se muestran en las Figuras 14-19. Este ejemplo demuestra que pueden producirse anticuerpos biespecíficos usando células hospedadoras CHO. Un experto en la materia reconocerá que el método puede usarse para producir otras proteínas heteromultiméricas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar una proteína heteromultimérica que comprende un primer polipéptido que contiene bisagra que tiene un primer dominio de heterodimerización y un segundo polipéptido que contiene bisagra que tiene un segundo dominio de heterodimerización, en el que el segundo dominio de heterodimerización interacciona con el primer dominio de heterodimerización, y en el que el primer y el segundo polipéptidos que contienen bisagras se unen por al menos un enlace disulfuro intercatenario, y en el que cada uno del primer y el segundo polipéptidos que contienen bisagra es una cadena pesada de anticuerpo y se empareja con una cadena ligera de anticuerpo para formar un primer par y un segundo par, y en el que las cadenas ligeras del primer par y del segundo par comprenden diferentes secuencias de dominio variable, comprendiendo el método las etapas de:

(a) cultivar una primera célula hospedadora, que comprende un primer ácido nucleico que codifica el primer polipéptido que contiene bisagra, en condiciones en las que el polipéptido que contiene bisagra se expresa y se empareja con una cadena ligera de anticuerpo para formar el primer par;

(b) cultivar una segunda célula hospedadora, que comprende un primer ácido nucleico que codifica el segundo polipéptido que contiene bisagra, en condiciones en las que el polipéptido que contiene bisagra se expresa y se empareja con una cadena ligera de anticuerpo para formar el segundo par;

(c) romper las membranas celulares de la primera y la segunda células hospedadoras, para liberar el primer y el segundo polipéptidos que contienen bisagra de las células hospedadoras para formar una proteína heteromultimérica, en el que la primera y la segunda células hospedadoras se han combinado entre sí en una única suspensión; y

(d) recuperar la proteína heteromultimérica,

en el que dicho método no requiere la adición de un reductor.

2. Un método para preparar una proteína heteromultimérica que comprende un primer polipéptido que contiene bisagra que tiene un primer dominio de heterodimerización y un segundo polipéptido que contiene bisagra que tiene un segundo dominio de heterodimerización, en el que el segundo dominio de heterodimerización interacciona con el primer dominio de heterodimerización, y en el que el primer y el segundo polipéptidos que contienen bisagra se unen por al menos un enlace disulfuro intercatenario, y en el que cada uno del primer y el segundo polipéptidos que contienen bisagra es una cadena pesada de anticuerpo y se empareja con una cadena ligera de anticuerpo para formar un primer par y un segundo par, y en el que las cadenas ligeras del primer par y el segundo par comprenden diferentes secuencias de dominio variable, comprendiendo el método las etapas de:

(a) cultivar una primera célula hospedadora, que comprende un primer ácido nucleico que codifica el primer polipéptido que contiene bisagra, en condiciones en las que el polipéptido que contiene bisagra se expresa, se empareja con una cadena ligera de anticuerpo para formar el primer par y se secreta al medio de cultivo;

(b) cultivar una segunda célula hospedadora, que comprende un primer ácido nucleico que codifica el segundo polipéptido que contiene bisagra, en condiciones en las que el polipéptido que contiene bisagra se expresa, se empareja con una cadena ligera de anticuerpo para formar el segundo par y se secreta al medio de cultivo; y

(c) recuperar la proteína heteromultimérica del medio de cultivo, en el que el medio de cultivo de la primera y la segunda células hospedadoras se han combinado entre sí para formar la proteína heteromultimérica,

en el que dicho método no requiere la adición de un reductor.

3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que el primer dominio de heterodimerización y el segundo dominio de heterodimerización se encuentran en una interfaz, y la parte de interfaz del segundo dominio de heterodimerización comprende una protuberancia (un botón) que puede situarse en una cavidad (un ojal) en la parte de interfaz del primer dominio de heterodimerización, en el que la protuberancia comprende una cadena lateral de aminoácido que se proyecta desde la parte de interfaz del segundo dominio de heterodimerización, y la cavidad comprende una cadena lateral de aminoácido que forma un hueco desde la parte de interfaz del primer dominio de heterodimerización.

4. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que dicho enlace disulfuro intercatenario está entre las regiones bisagra.

5. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que la célula hospedadora es una célula procariota, particularmente una célula de *E. coli*, más particularmente una célula de *E. coli* deficiente en lpp.

6. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que la célula hospedadora es una célula de mamífero, particularmente una célula CHO.

7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que las células de las etapas (a) y (b) están en distintos cultivos celulares.

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que las células de las etapas (a) y (b) están en una mezcla de cultivo que comprende ambas células hospedadoras.
- 5 9. El método de la reivindicación 7, en el que las células de las etapas (a) y (b) se (i) combinan, (ii) centrifugan y (iii) resuspenden en tampón antes de romper la membrana celular o se (i) centrifugan, (ii) resuspenden en tampón y (iii) combinan antes de romper la membrana celular.
- 10 10. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que la etapa de recuperación comprende además al menos una etapa de purificación.
11. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que la proteína heteromultimérica es un anticuerpo biespecífico o un anticuerpo multiespecífico.
- 15 12. El método de la reivindicación 11, en el que dicho anticuerpo es humanizado o humano.
13. El método de la reivindicación 11, en el que el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa.
14. El método de la reivindicación 11, en el que el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en IgG, IgA e IgD, particularmente el anticuerpo es IgG, más particularmente IgG1 o IgG2.
- 20 15. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que al menos el 45 % de los polipéptidos están en un complejo que comprende el primer par de polipéptido que contiene bisagra y cadena ligera y el segundo par de polipéptido que contiene bisagra y cadena ligera.
- 25 16. El método de la reivindicación 10, en el que no más del 10 % de los polipéptidos aislados están presentes como monómeros u homodímeros antes de la etapa de purificación de la proteína heteromultimérica.
- 30 17. Un método para generar una biblioteca de proteínas heteromultiméricas combinatorias que comprende un primer polipéptido que contiene bisagra que tiene un primer dominio de heterodimerización y un segundo polipéptido que contiene bisagra que tiene un segundo dominio de heterodimerización, en el que el segundo dominio de heterodimerización interacciona con el primer dominio de heterodimerización, y en el que el primer y el segundo polipéptidos que contienen bisagra se unen por al menos un enlace disulfuro intercatenario y en el que cada uno del primer y el segundo polipéptidos que contienen bisagra es una cadena pesada de anticuerpo y se empareja con una cadena ligera de anticuerpo para formar un primer par y un segundo par, y en el que las cadenas ligeras del primer par y del segundo par comprenden diferentes secuencias de dominio variable, comprendiendo el método las etapas de:
- 35 (a) cultivar una primera célula hospedadora y al menos dos células hospedadoras adicionales, en el que
- 40 i. dicha primera célula hospedadora comprende un primer ácido nucleico que codifica un primer polipéptido que contiene bisagra; y
- ii. dichas células hospedadoras adicionales comprenden un ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido que contiene bisagra;
- 45 en condiciones en las que los polipéptidos que contienen bisagra se expresan y se emparejan con una cadena ligera de anticuerpo para formar el primer y el segundo par;
- (b) romper las membranas celulares de la primera célula hospedadora y las al menos dos células hospedadoras adicionales de modo que el primer y el segundo polipéptidos que contienen bisagra se liberan al medio extracelular, en el que la primera célula hospedadora y las al menos dos células hospedadoras adicionales se han combinado entre sí en una única suspensión; y
- 50 (c) recuperar los complejos de proteínas heteromultiméricas,
- en el que dicho método no requiere la adición de un reductor.
- 55 18. Un método para generar una biblioteca de proteínas heteromultiméricas combinatorias que comprende un primer polipéptido que contiene bisagra que tiene un primer dominio de heterodimerización y un segundo polipéptido que contiene bisagra que tiene un segundo dominio de heterodimerización, en el que el segundo dominio de heterodimerización interacciona con el primer dominio de heterodimerización, y en el que el primer y el segundo polipéptidos que contienen bisagra se unen por al menos un enlace disulfuro intercatenario y
- 60 en el que cada uno del primer y el segundo polipéptidos que contienen bisagra es una cadena pesada de anticuerpo y se empareja con una cadena ligera de anticuerpo para formar un primer par y un segundo par, y en el que las cadenas ligeras del primer par y del segundo par comprenden diferentes secuencias de dominio variable, comprendiendo el método las etapas de:
- 65 (a) cultivar una primera célula hospedadora y al menos dos células hospedadoras adicionales, en el que

i. dicha primera célula hospedadora comprende un primer ácido nucleico que codifica un primer polipéptido que contiene bisagra; y

ii. dichas células hospedadoras adicionales comprenden un ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido que contiene bisagra;

5 en condiciones en las que los polipéptidos que contienen bisagra se expresan, se emparejan con una cadena ligera de anticuerpo para formar el primer y el segundo par y se secretan al medio de cultivo; y

10 (b) recuperar los complejos de proteínas heteromultiméricas del medio de cultivo, en el que el medio de cultivo de la primera célula hospedadora y las al menos dos células hospedadoras adicionales se han combinado entre sí para formar la proteína heteromultimérica,

en el que dicho método no requiere la adición de un reductor.

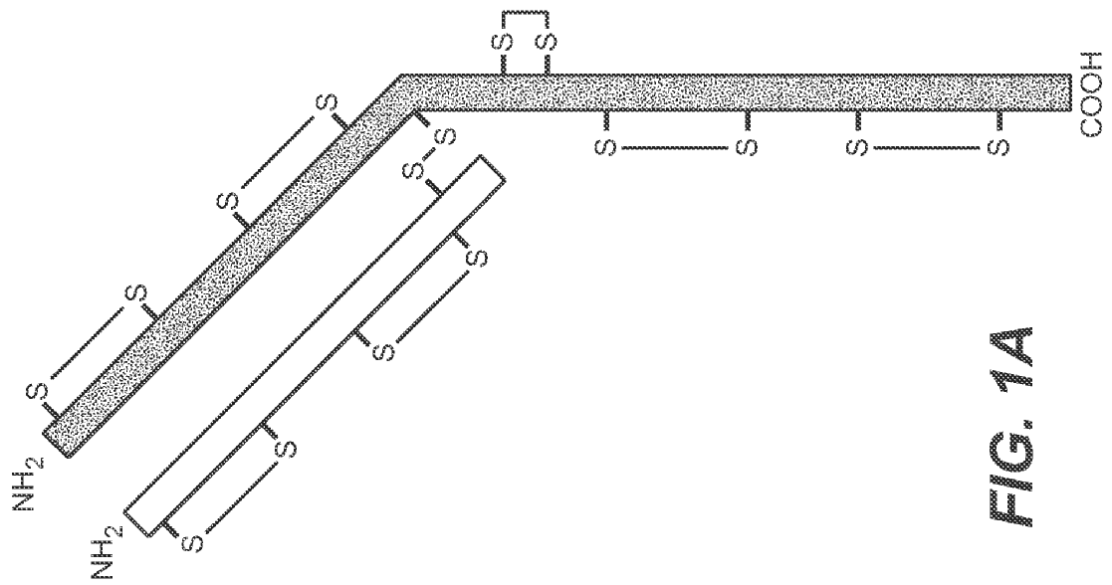


FIG. 1A

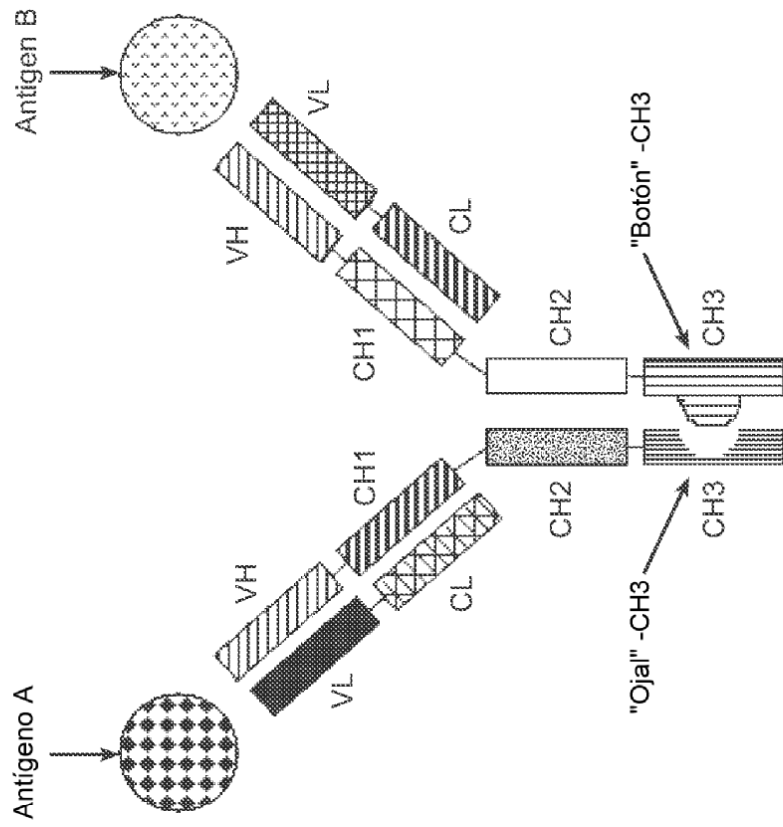
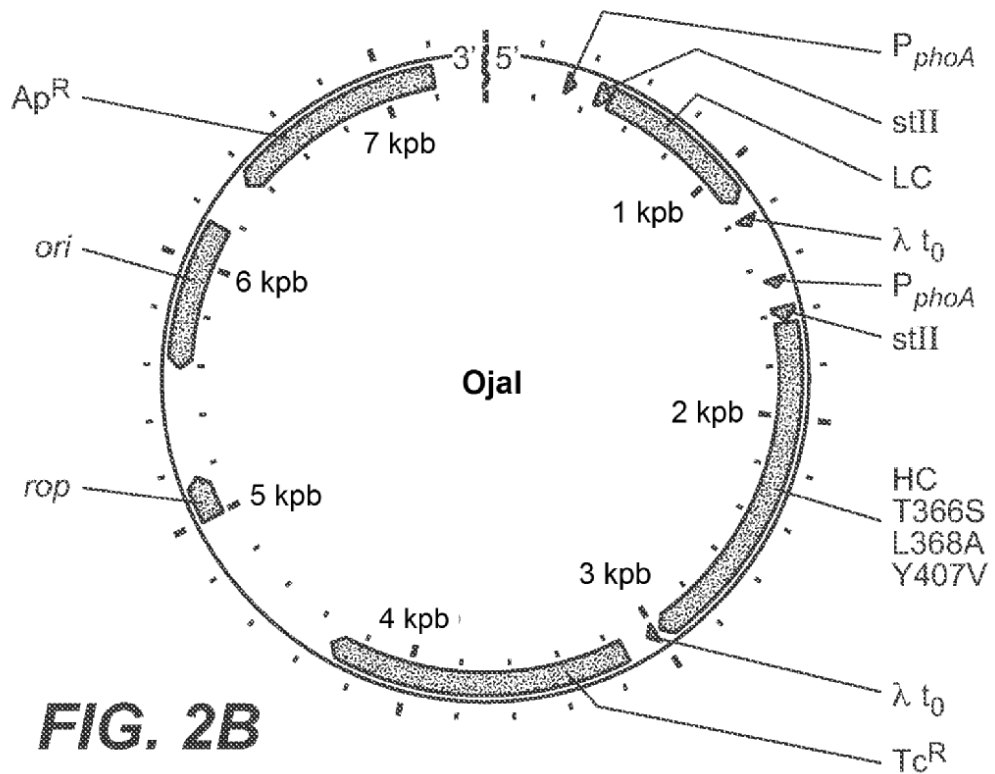
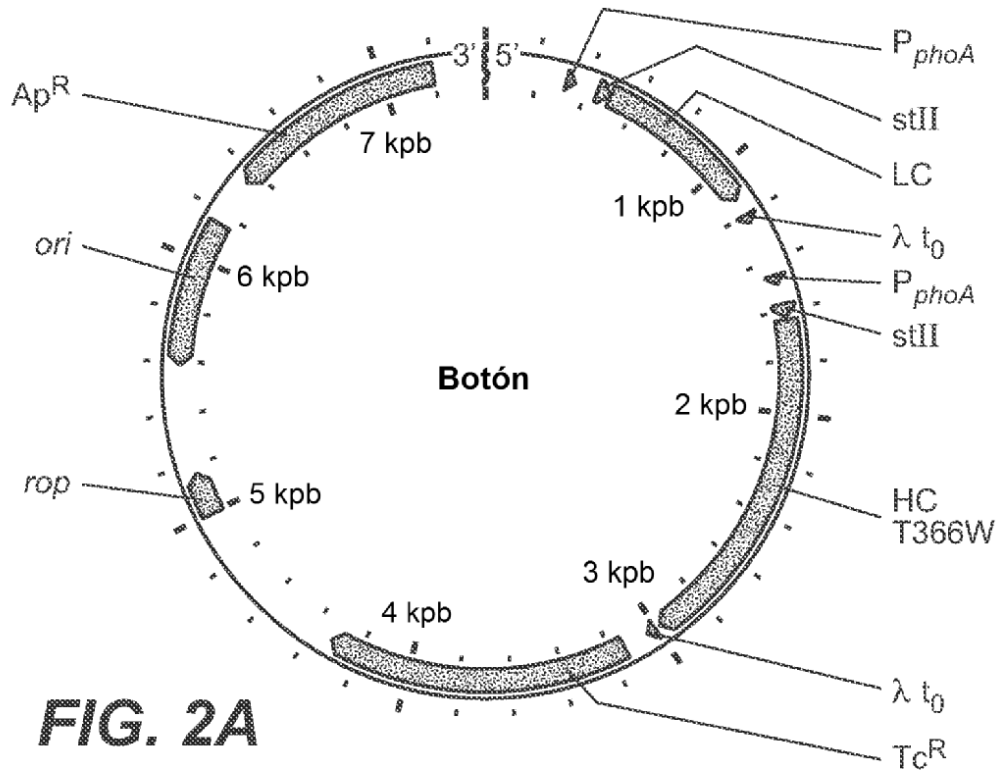
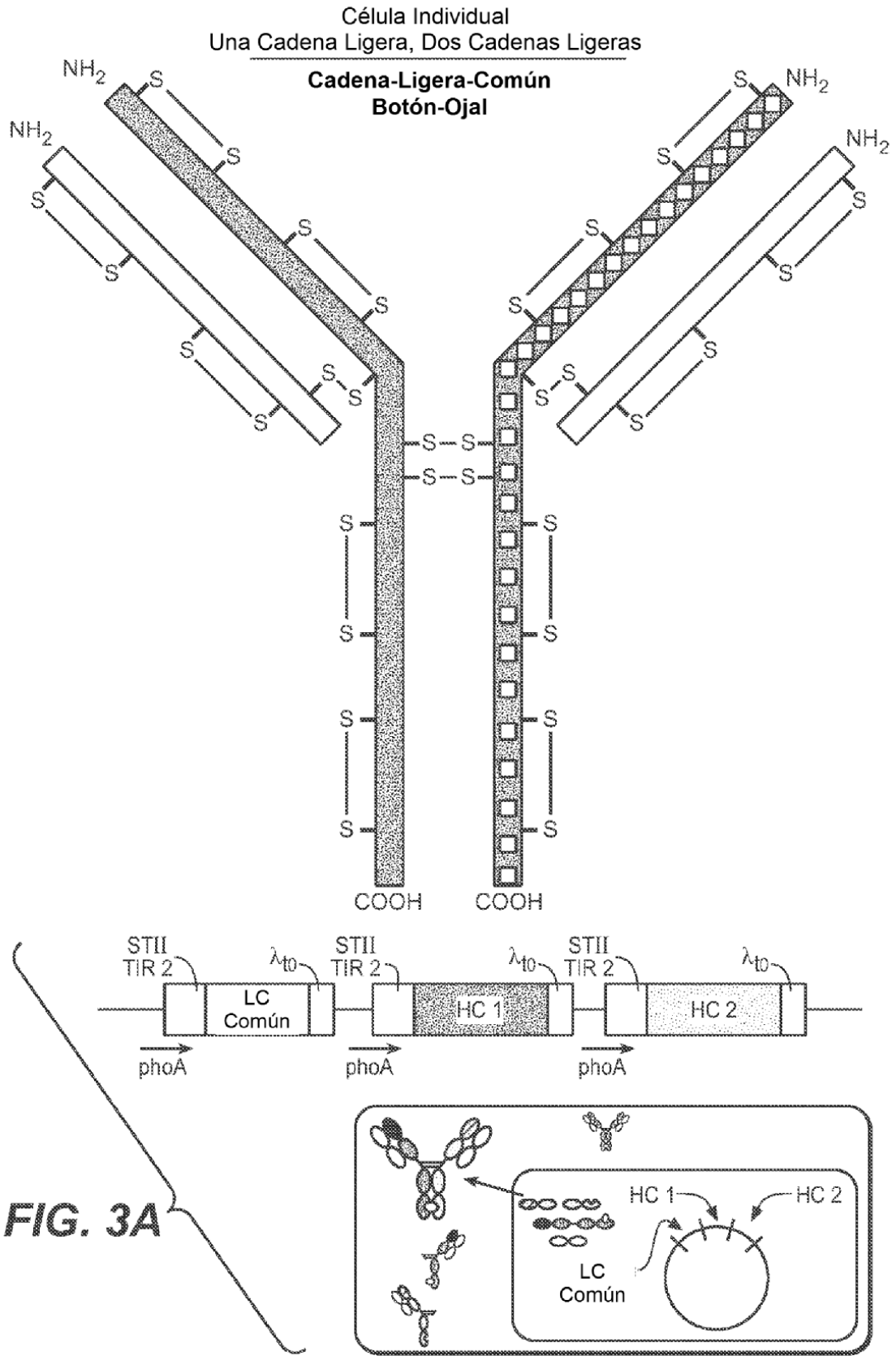
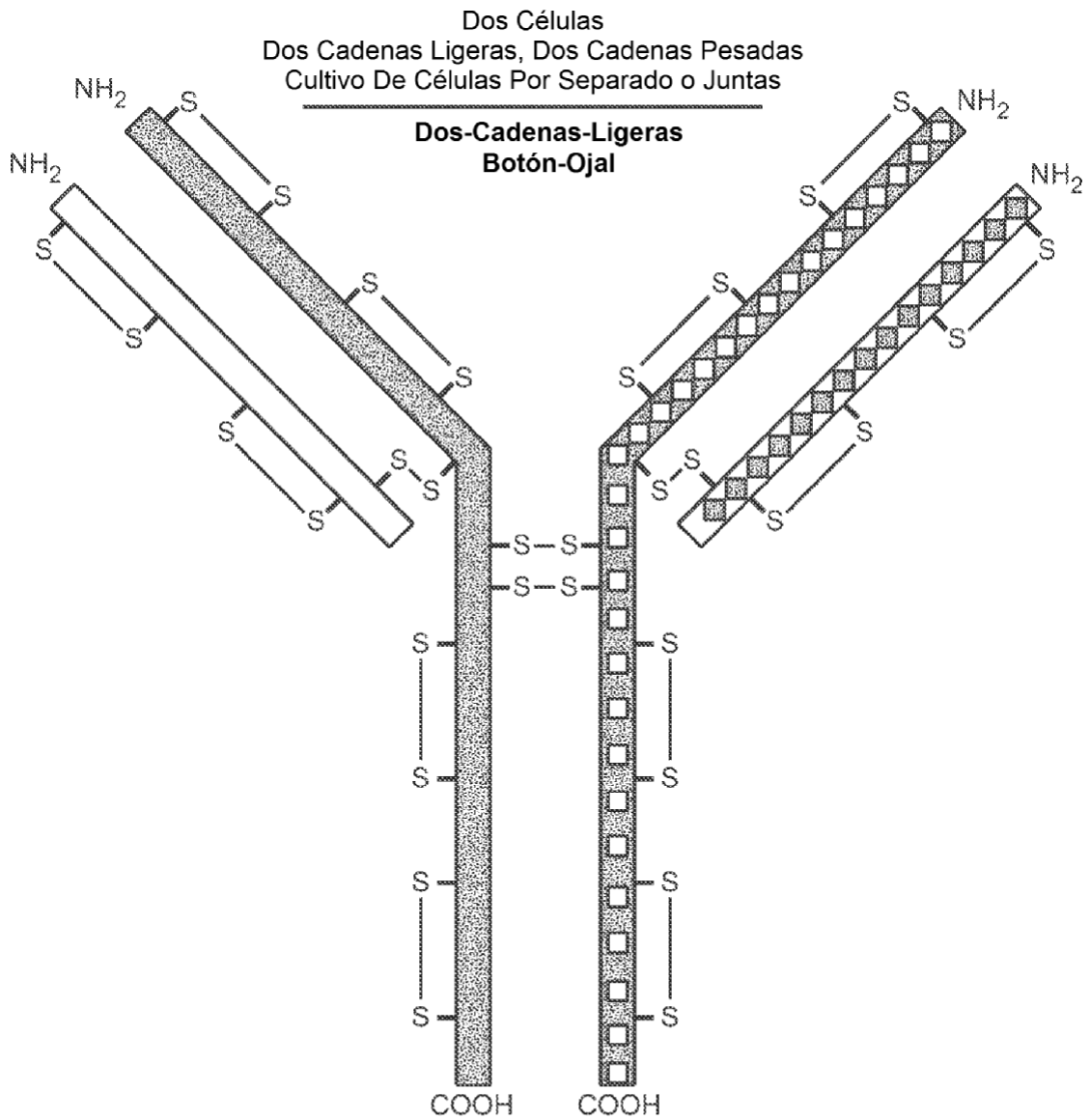


FIG. 1B







Dos Células *E. Coli* Diferentes

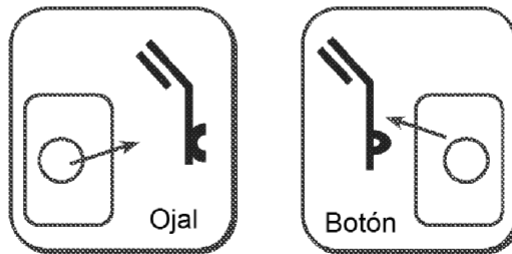


FIG. 3B

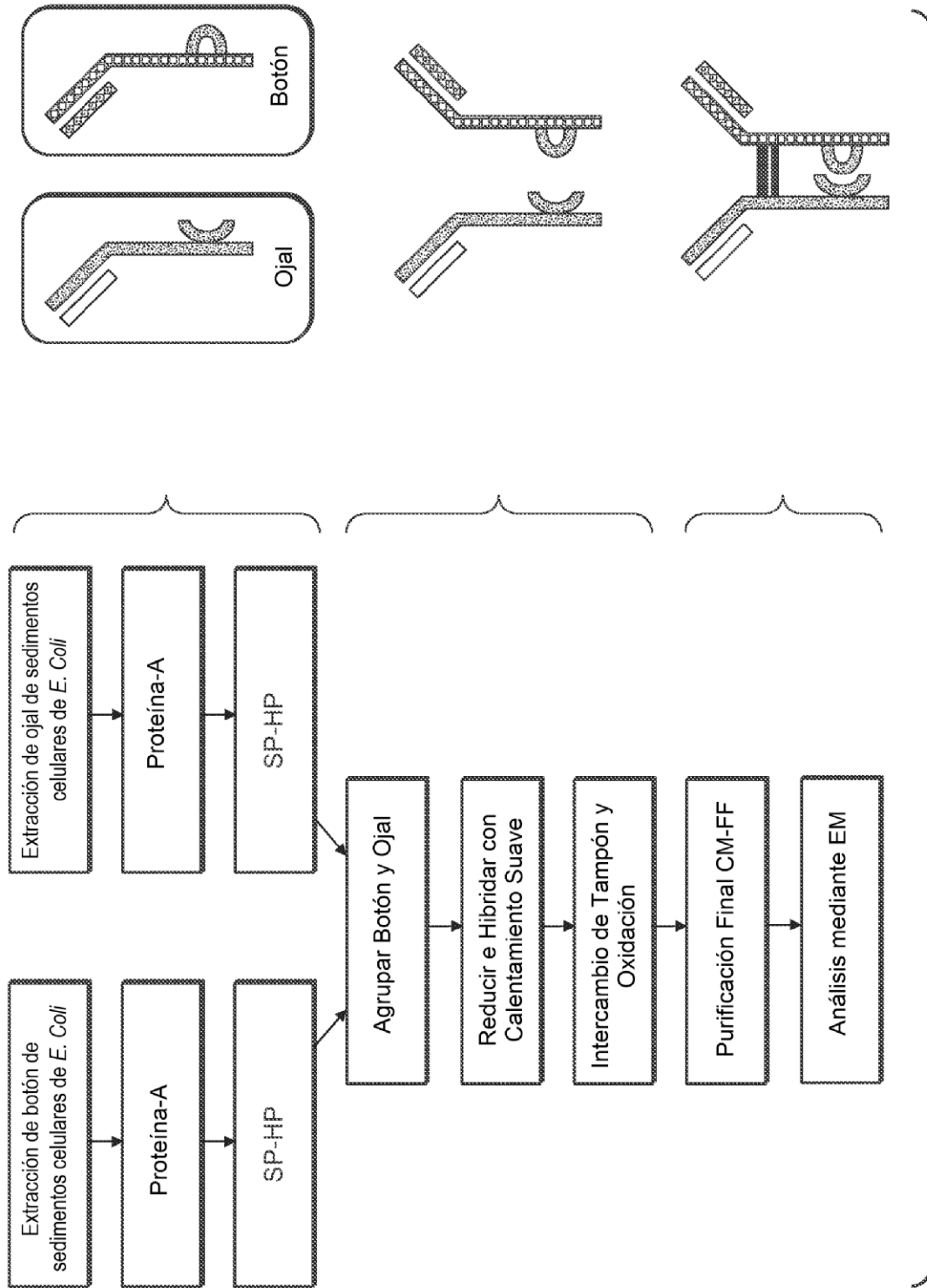


FIG. 4A

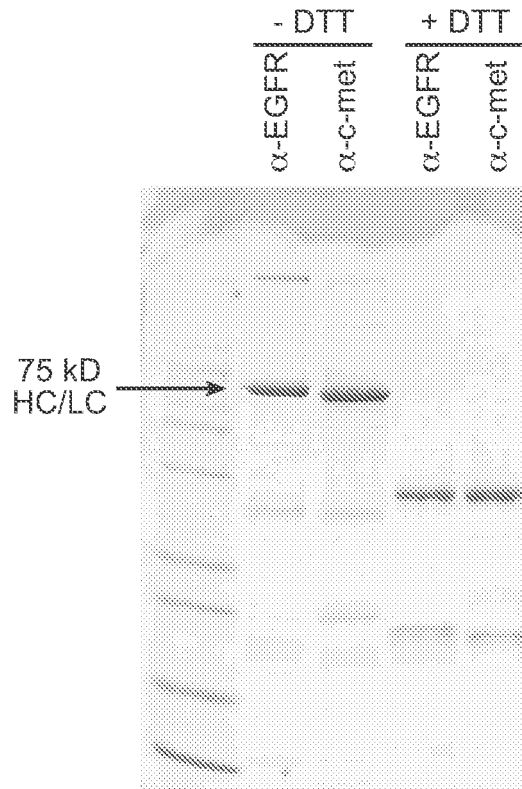
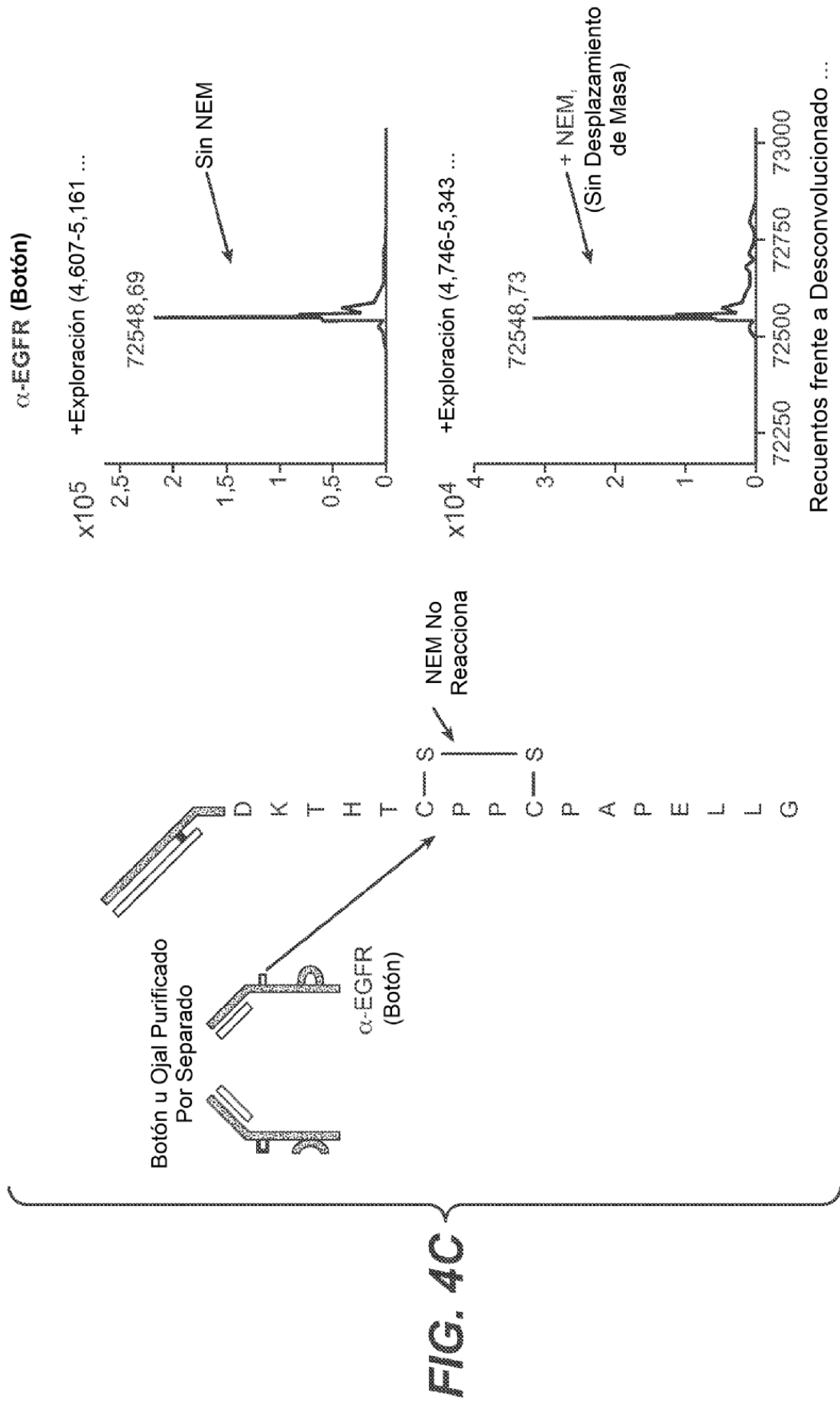
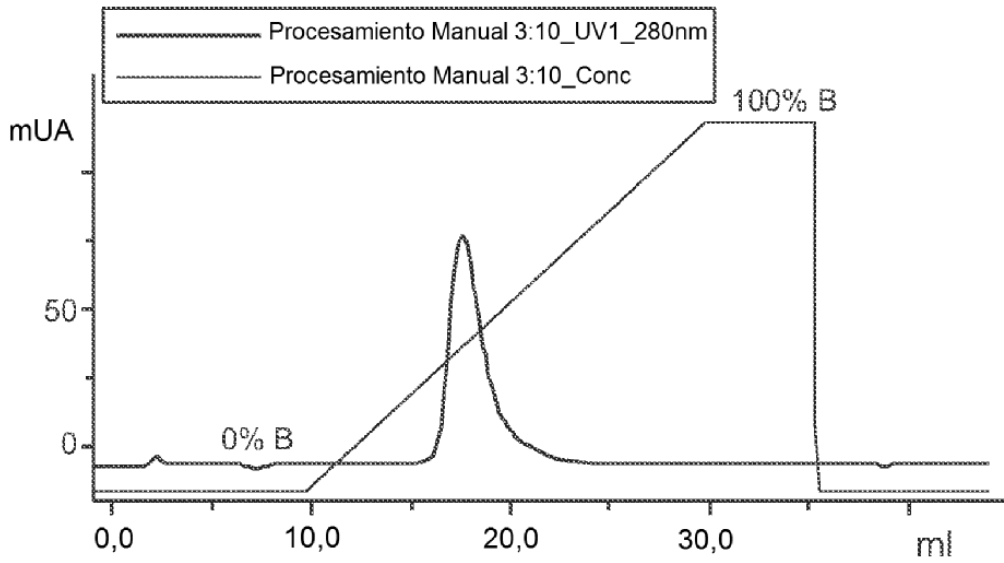


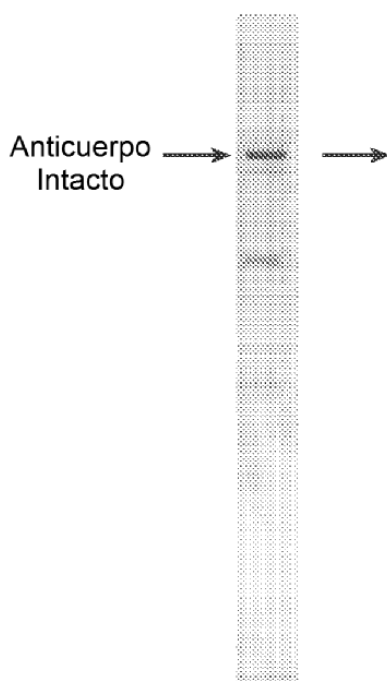
FIG. 4B



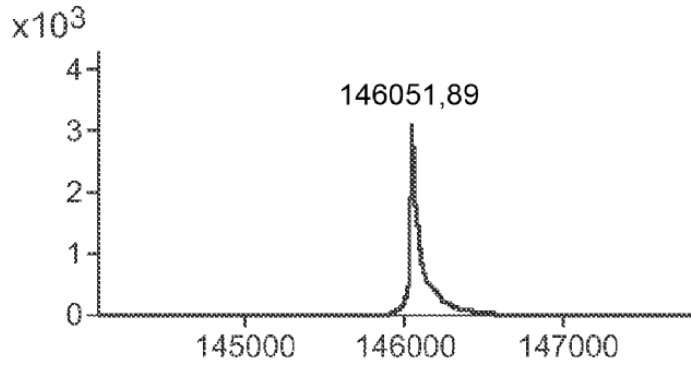
Purificación de CM



SDS-PAGE



+ Exploración (4,992-5,397 Min, 20 Exploraciones) D15_5D5_



Recuentos frente a Masa con respecto a Carga (m/z)

Forma de Dímero	PM Esperada
α -EGFR/ α -c-met	146051,75 Da
α -EGFR/ α -EGFR	145097,38 Da
α -c-met/ α -c-met	147006,12 Da

FIG. 4D

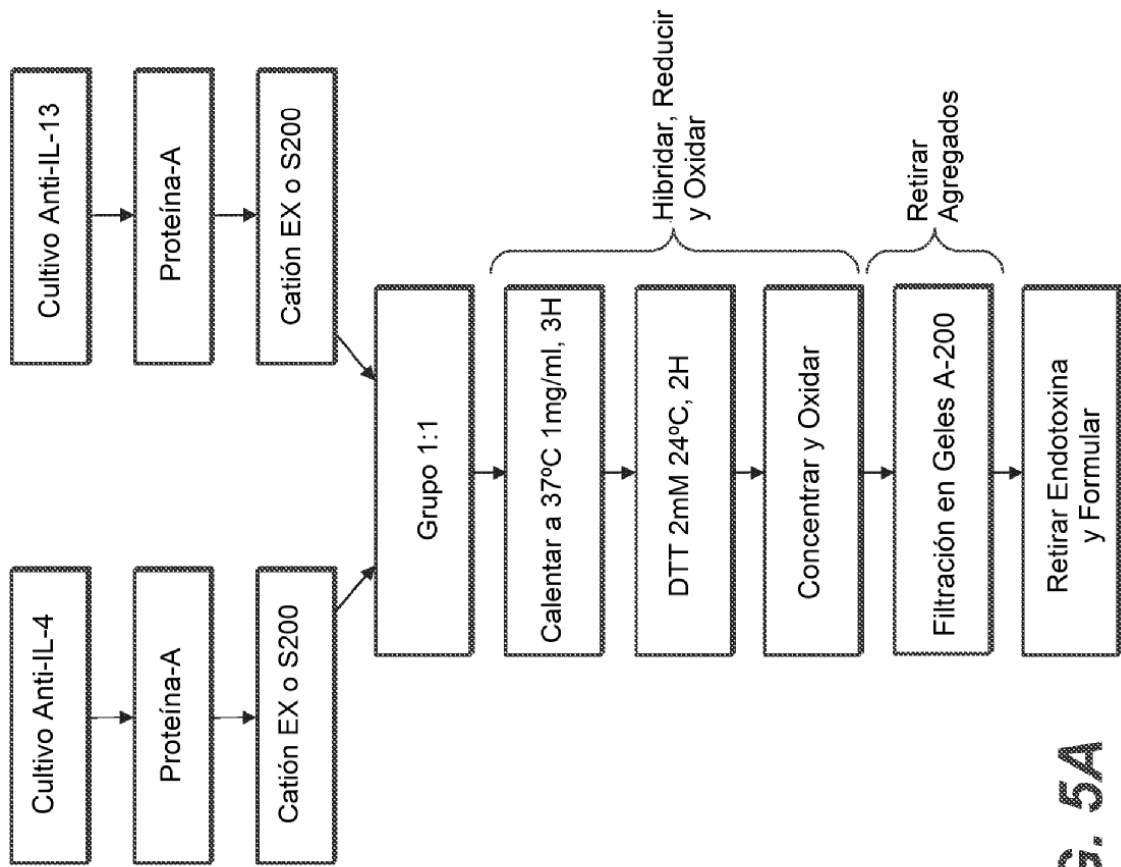


FIG. 5A

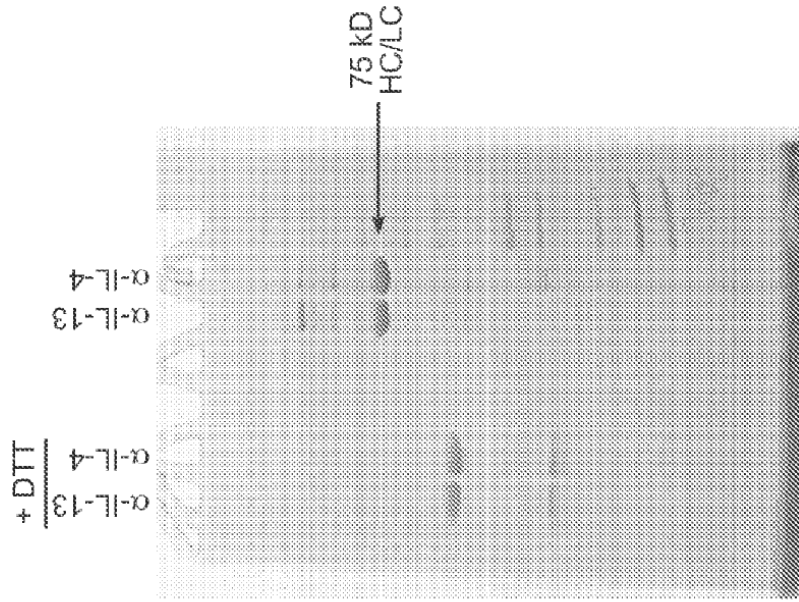


FIG. 5B

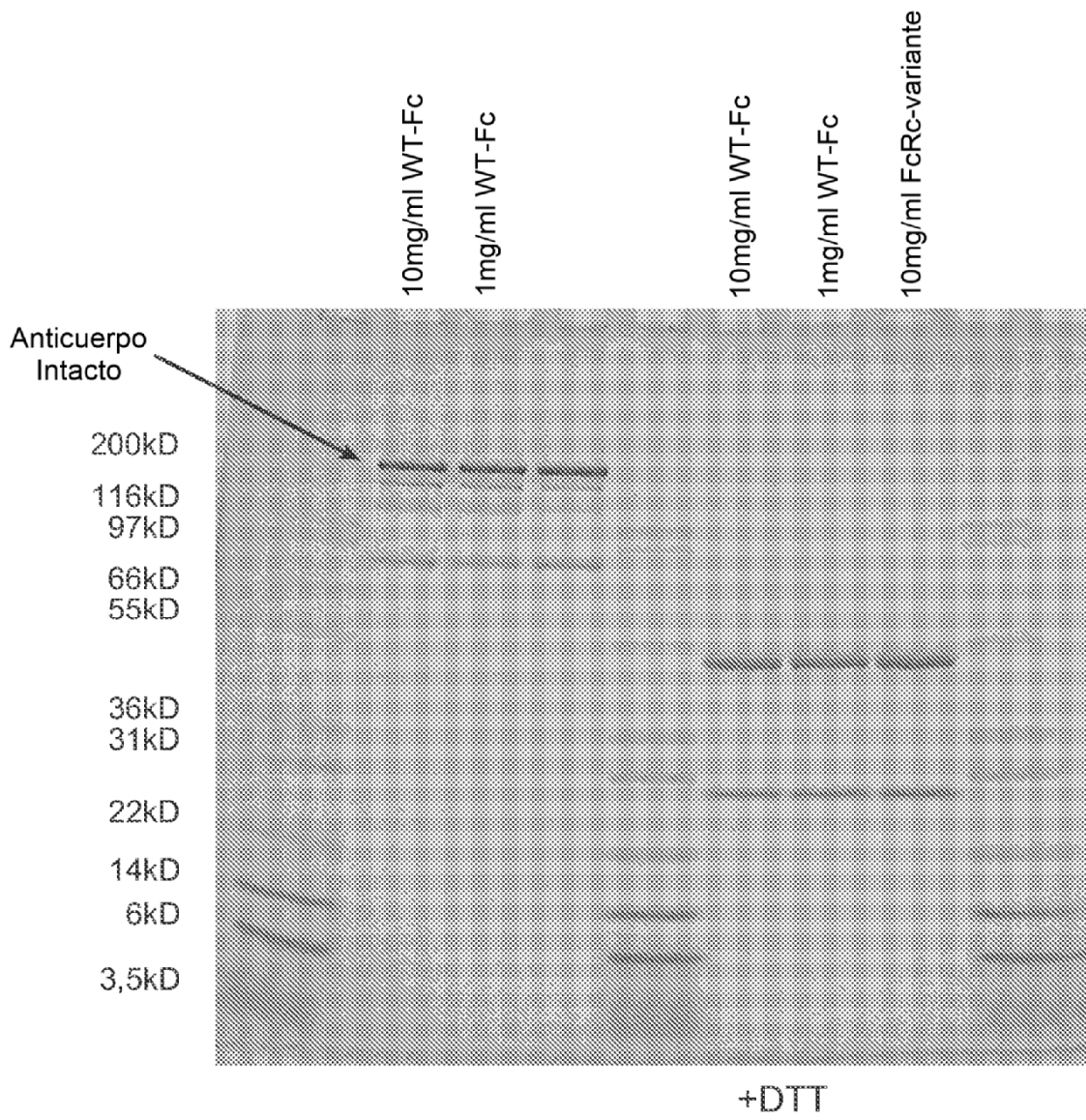


FIG. 5C

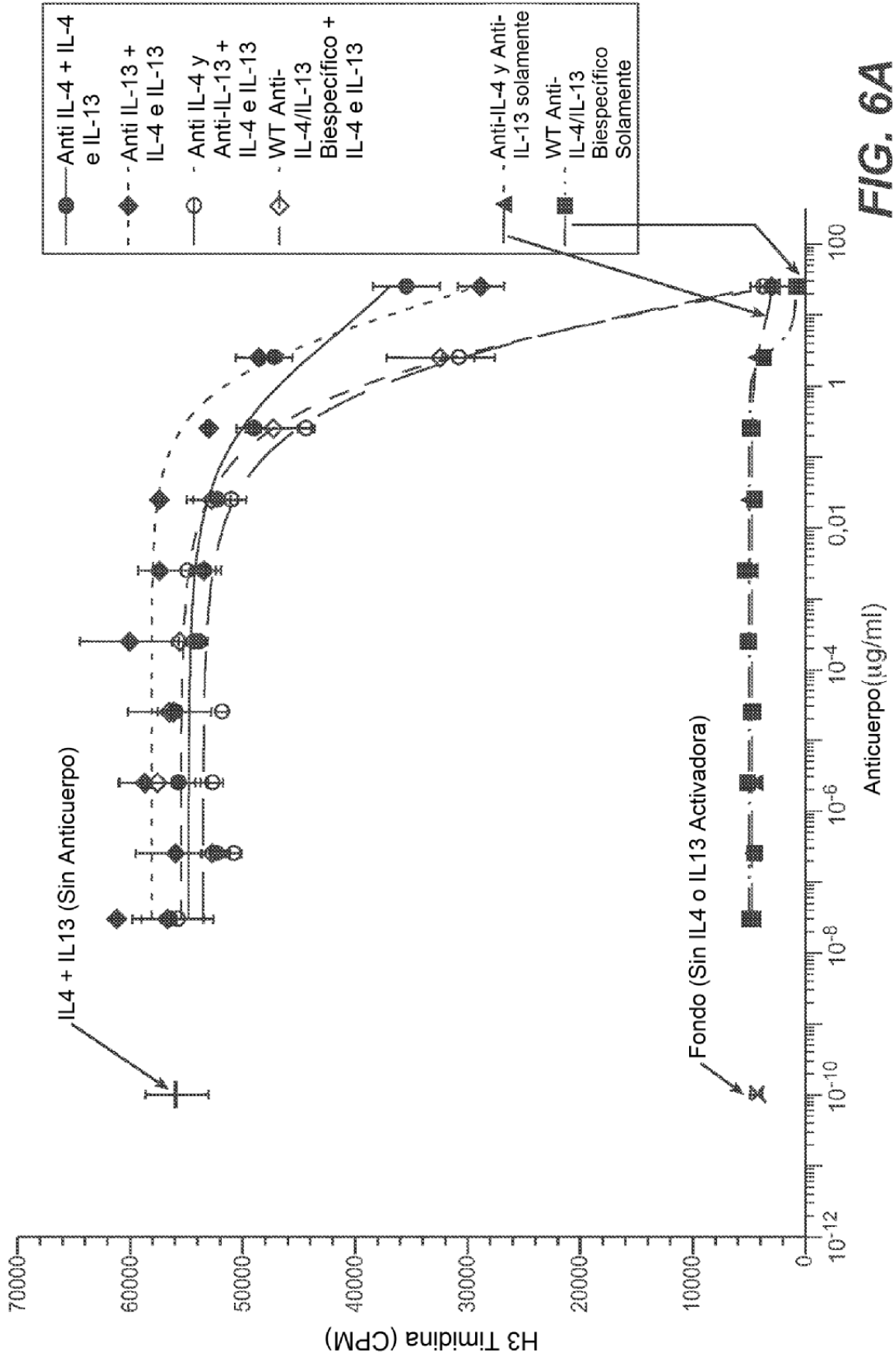
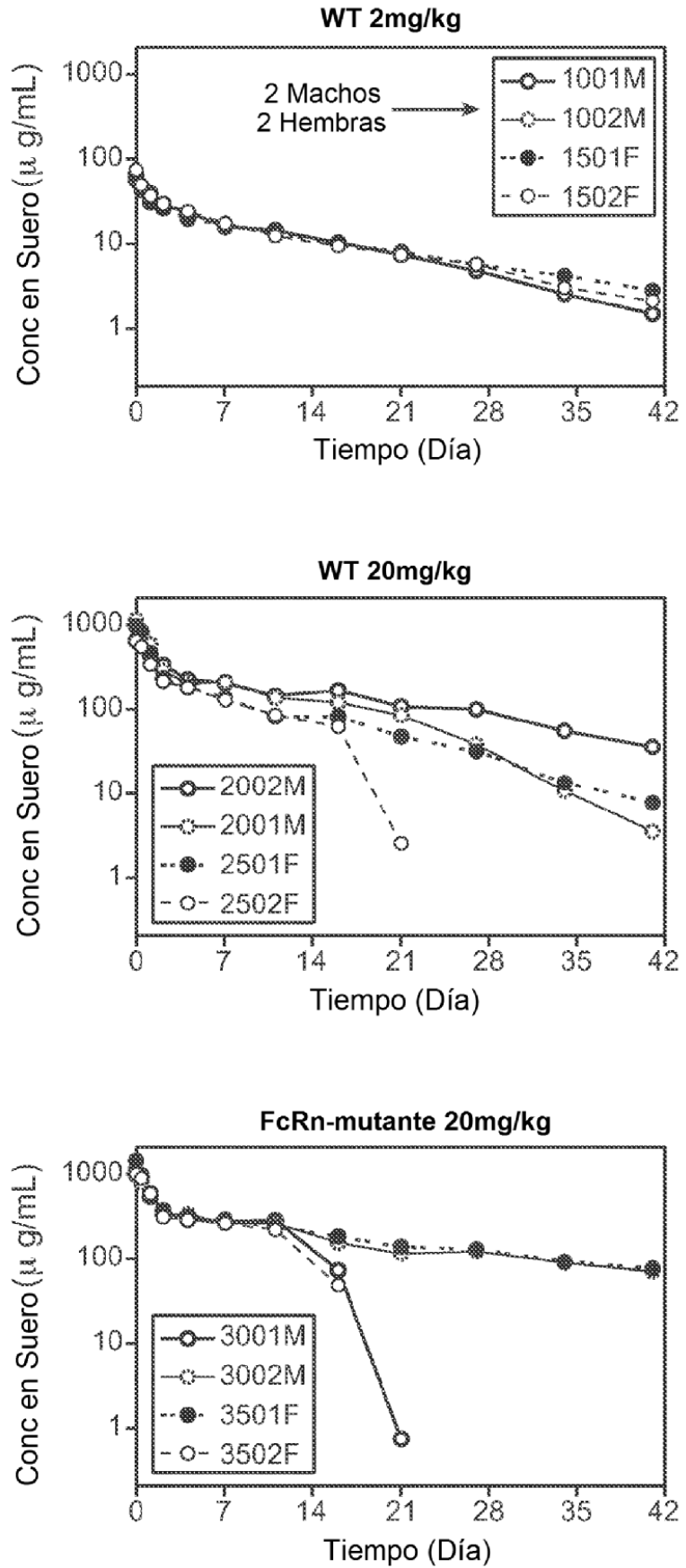


FIG. 6B



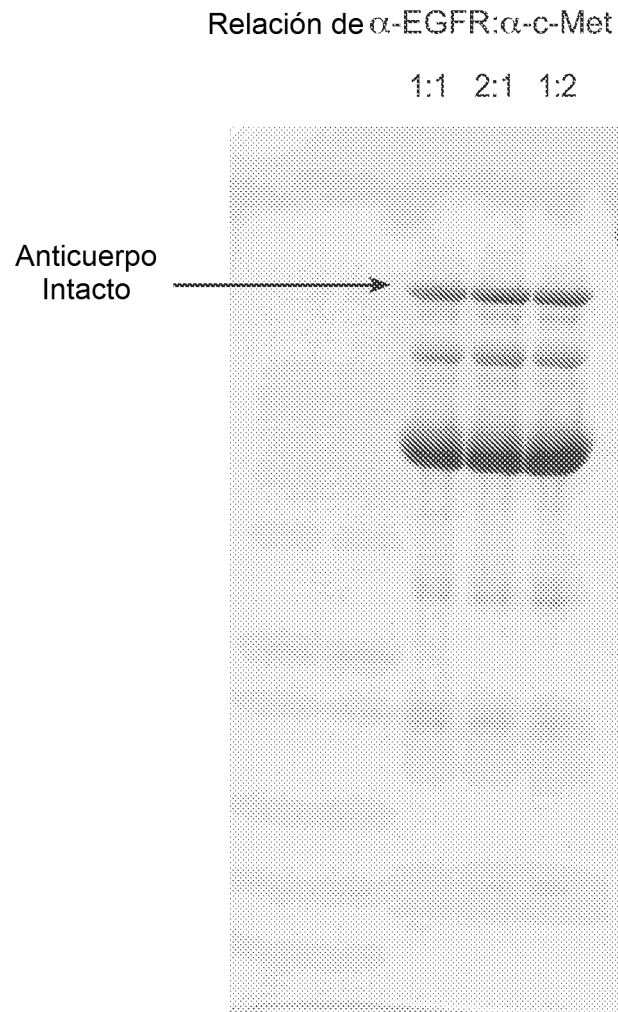


FIG. 7

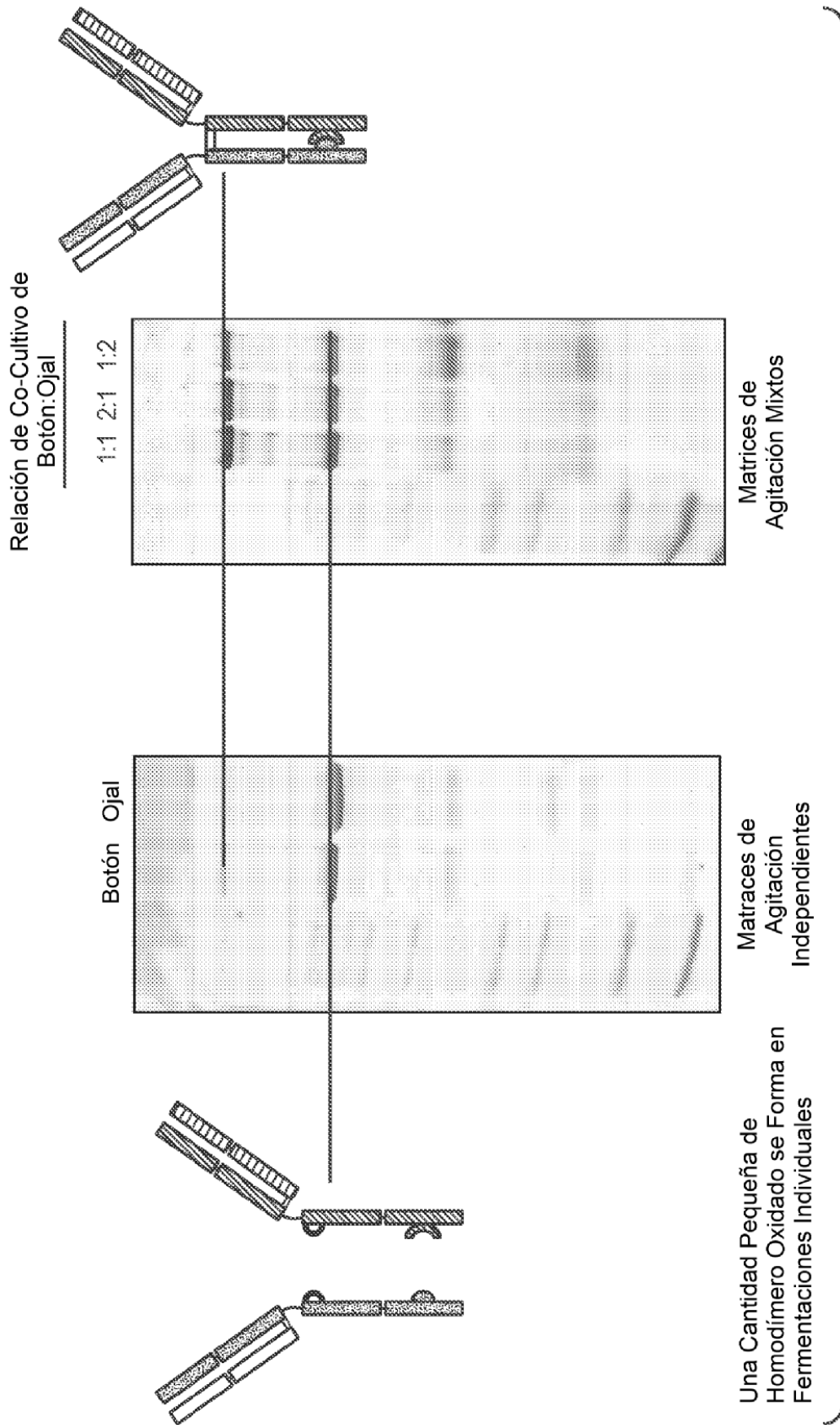


FIG. 8A

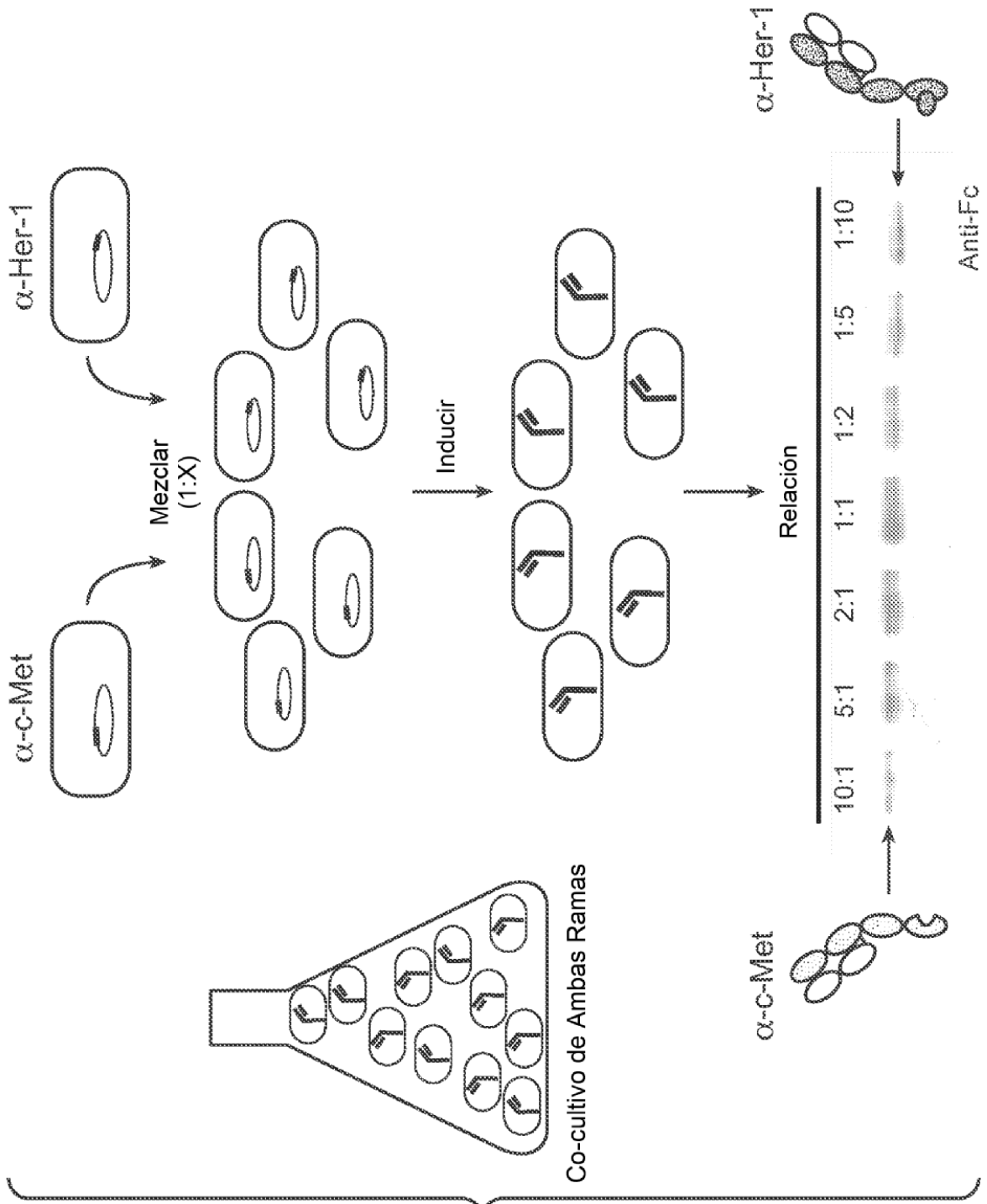


FIG. 8B

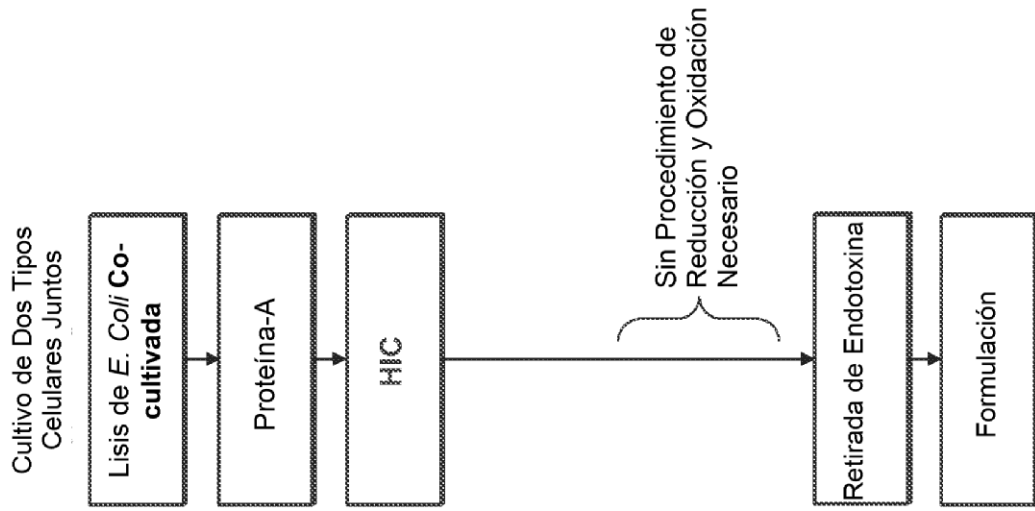


FIG. 8D

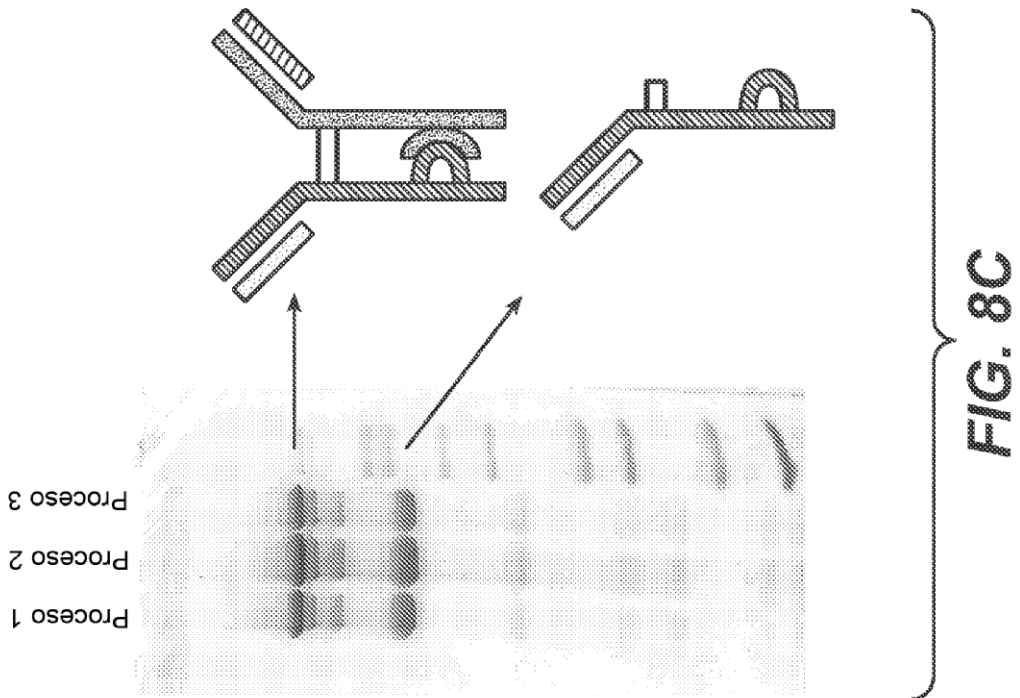


FIG. 8C

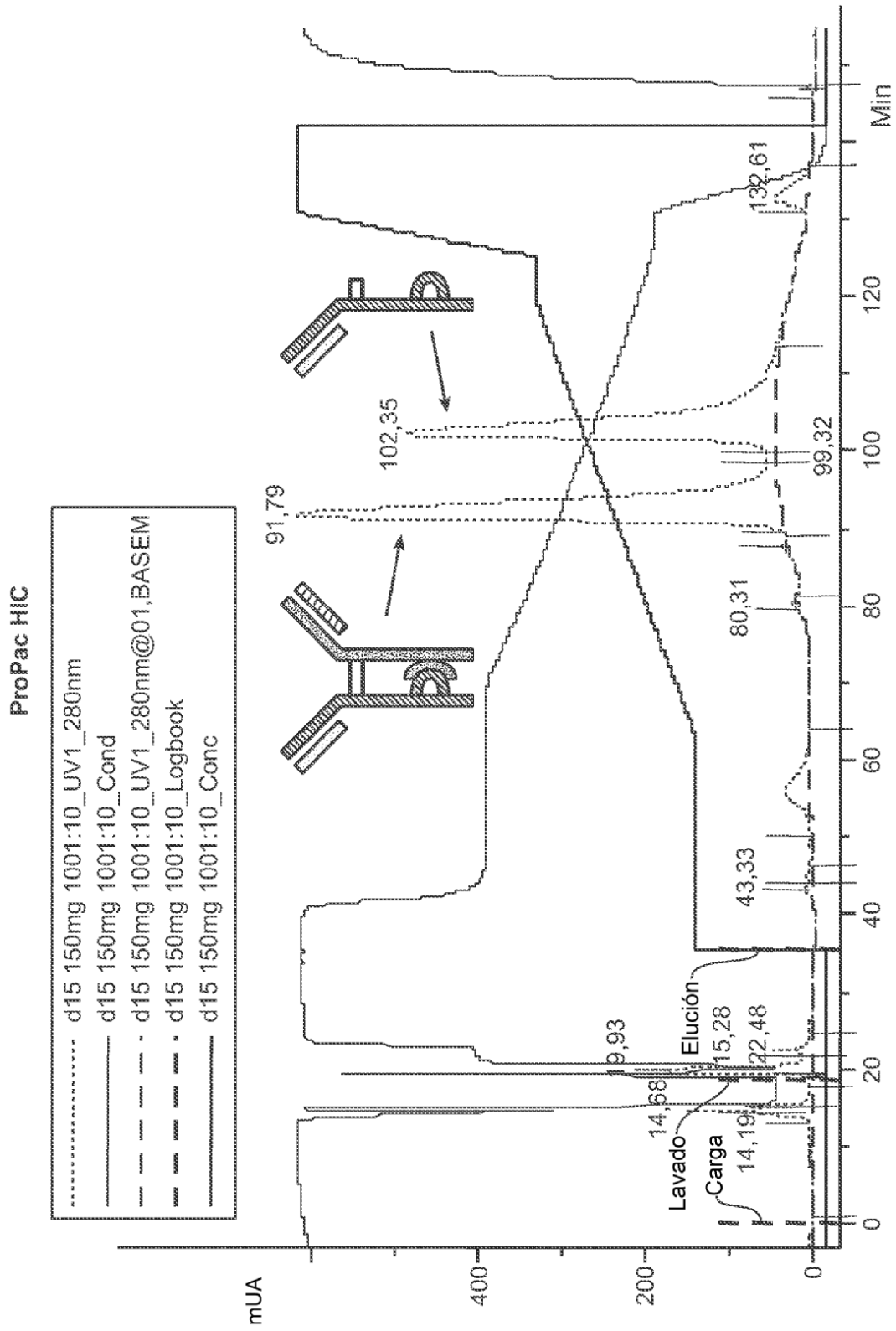
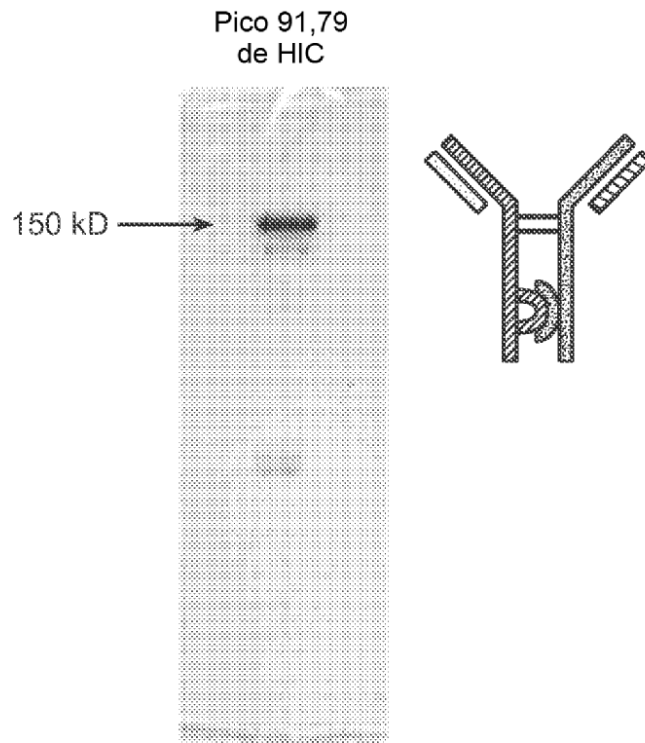
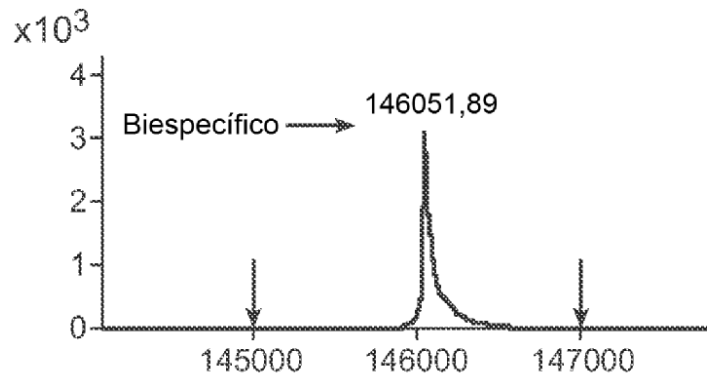


FIG. 8F



+ Exploración (4,992-5,397 Min, 20 Exploraciones) D15_5D5



Recuentos frente a Masa con Respecto a Carga (m/z)

α -EGFR/ α -c-met	146051,75
α -EGFR/ α -EGFR	145097,38
α -c-met/ α -c-met	147006,12

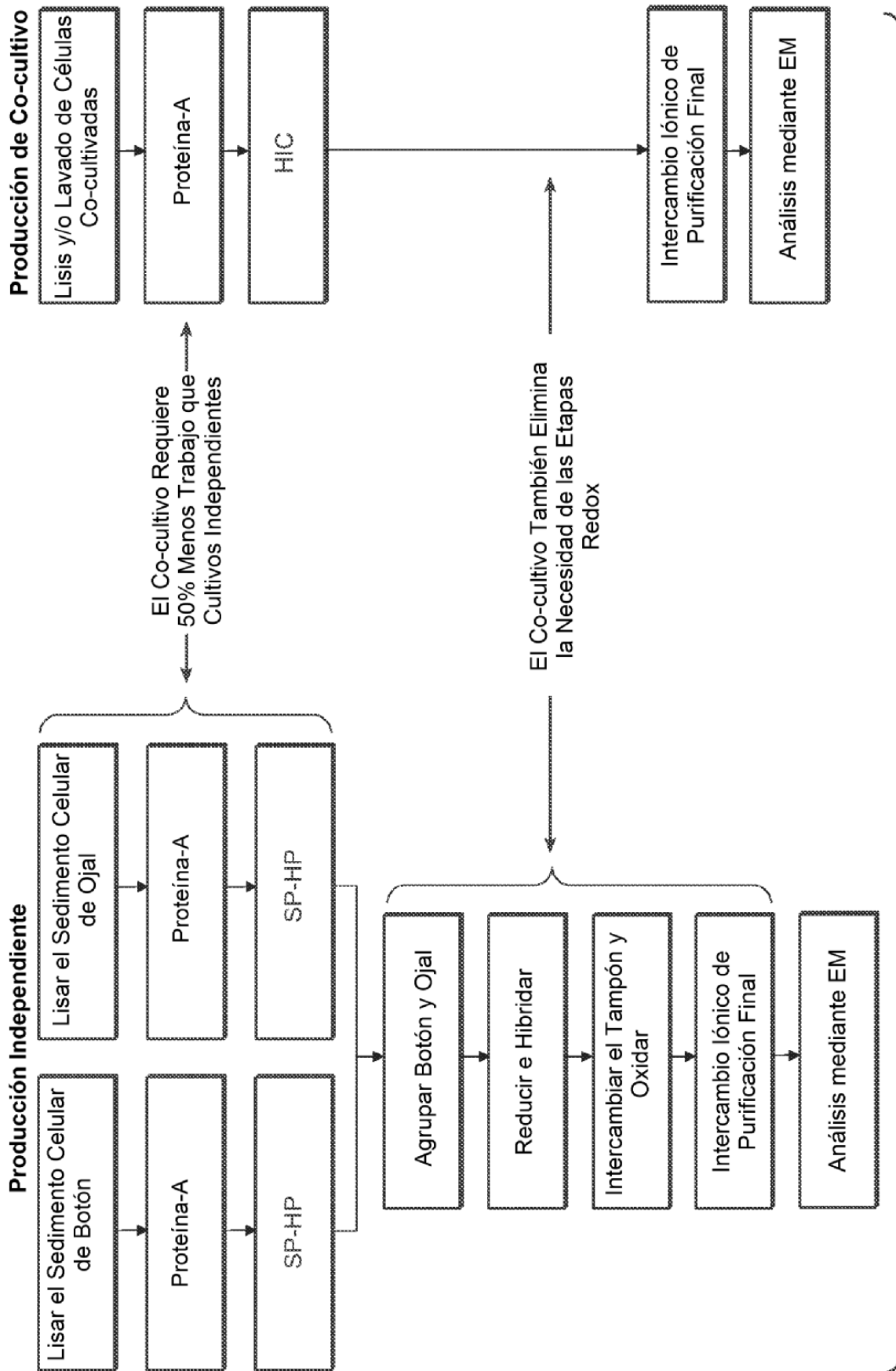


FIG. 8G

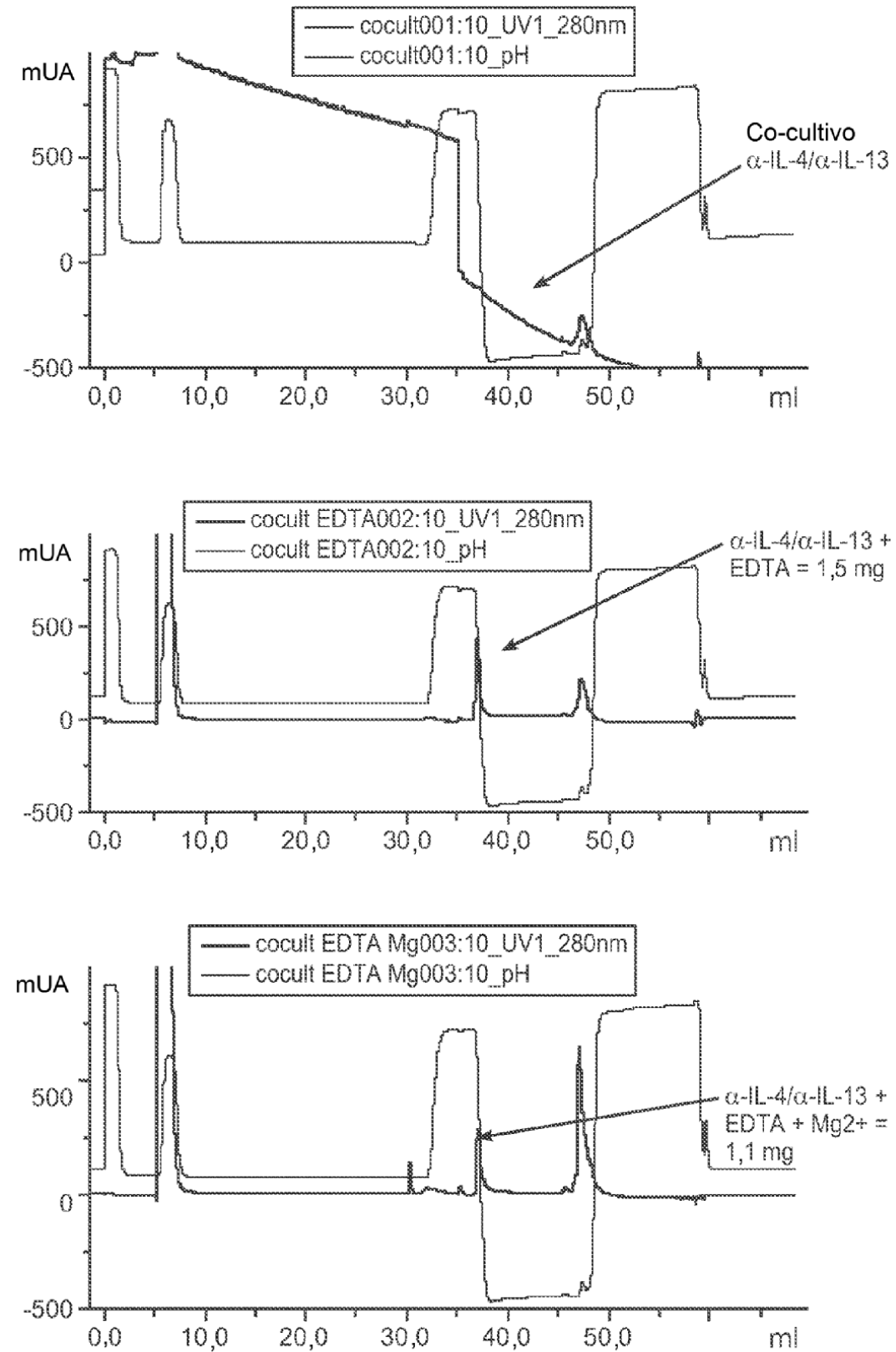
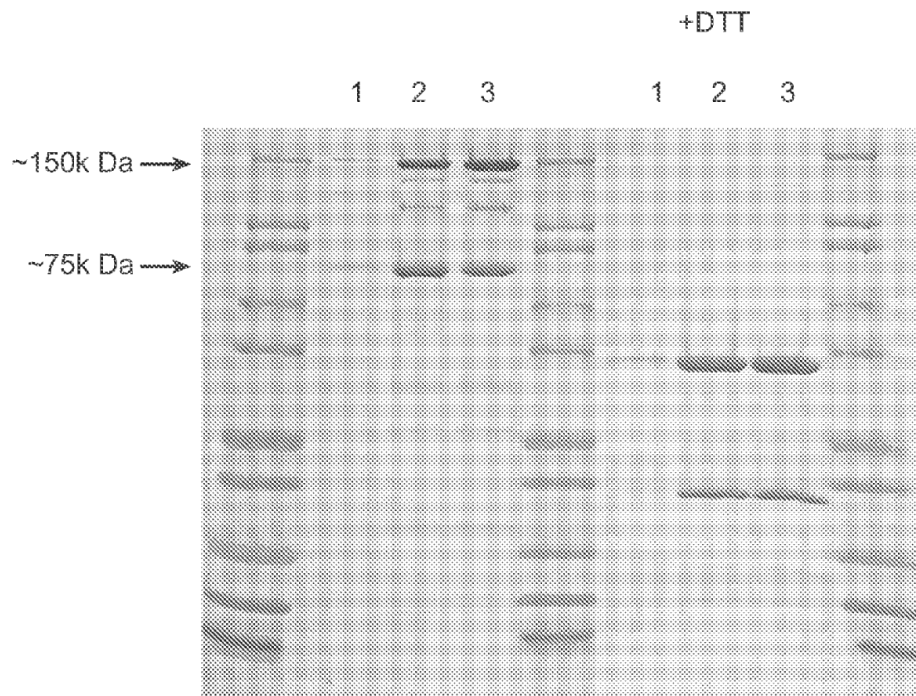
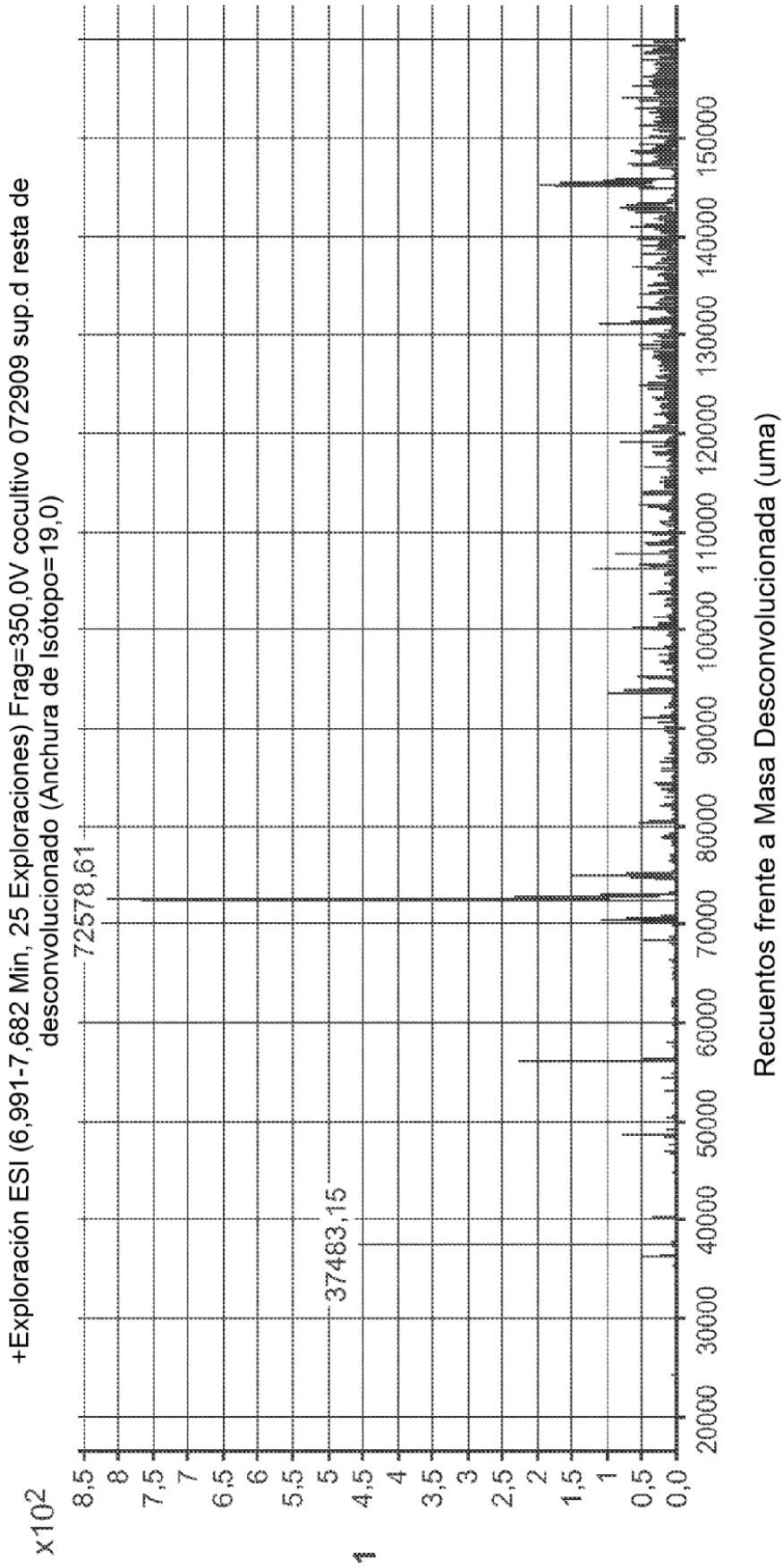


FIG. 9A



Carril 1) Grupo de Elución 36,6-37,6 Minutos para Co-cultivo con mutación -lpp
 Carril 2) Grupo de Elución 36,6-37,6 Minutos para Co-cultivo con mutación -lpp y EDTA
 Carril 3) Grupo de Elución 36,6-37,6 Minutos para Co-cultivo con mutación -lpp y EDTA y Mg²⁺

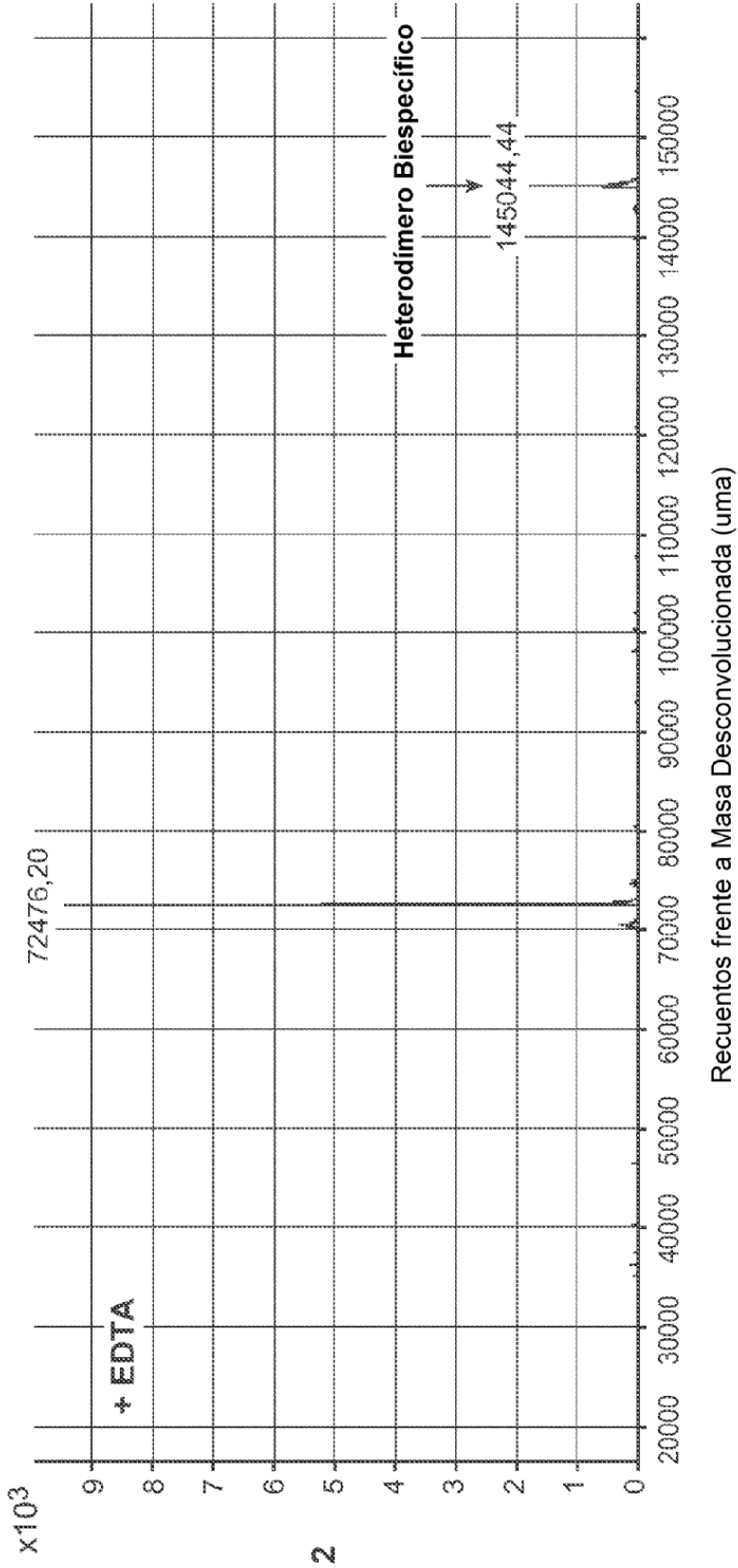
FIG. 9B



Carril 1) Grupo de Elución 36,6-37-6 para Co-cultivo de IL-4/IL-13 con mutación -lpp

FIG. 9C-1

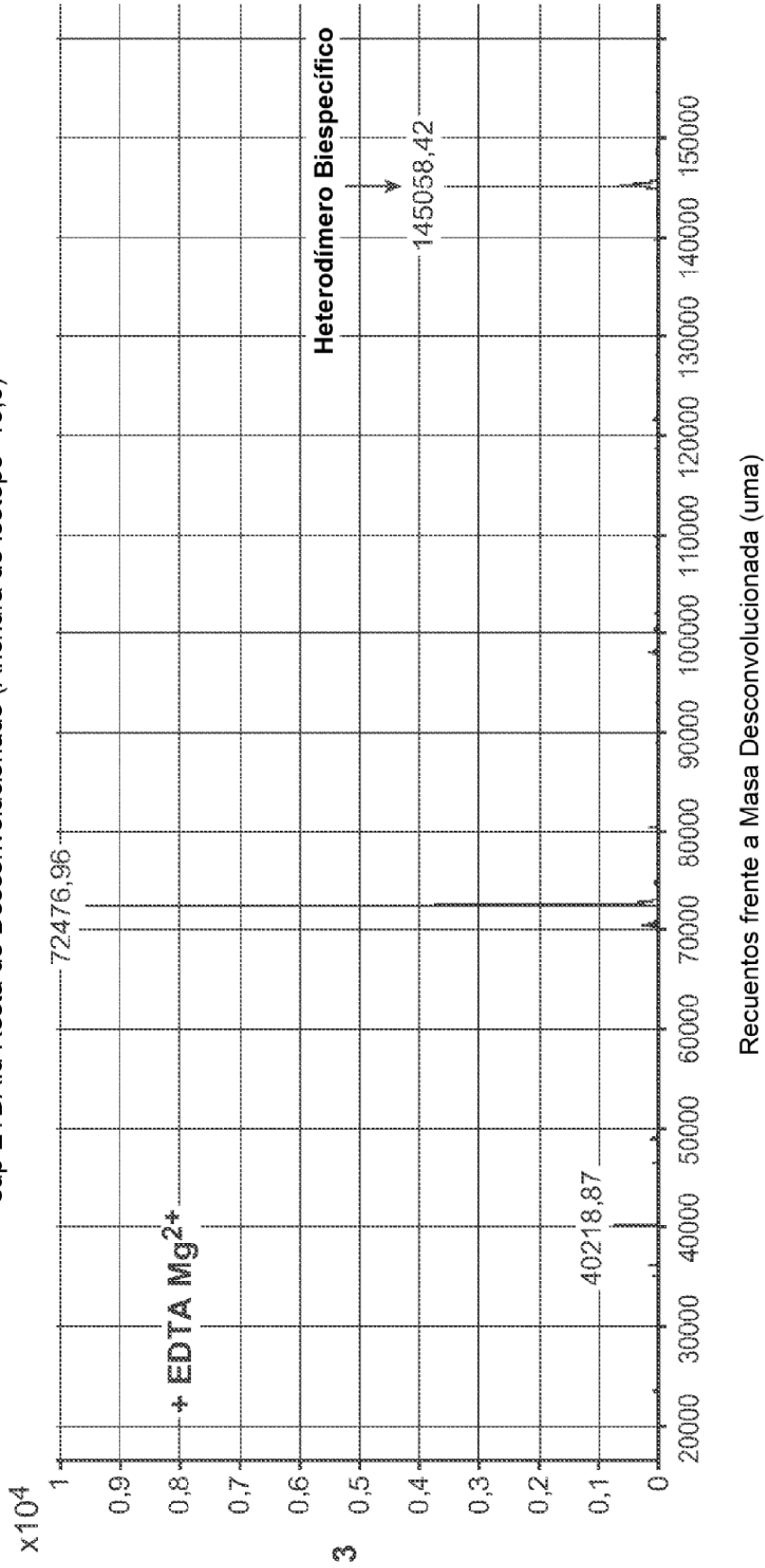
+Exploración ESI (5,652-7,985 Min, 82 exploraciones) Frag=350,0V cocultivo 072909 sup ETDA.d Resta de Desconvolucionado (Anchura de Isótopo=19,0)



Carril 2) Grupo de Elución 36,6-37,6 Minutos para Co-cultivo de IL-4/IL-13 con Mutación -Ipp y EDTA

FIG. 9C-2

+Exploración ESI (5,483-8,018 Min, 89 exploraciones) Frag=350,0V cocultivo 072909
 sup ETDA.d Resta de Desconvolucionado (Anchura de Isótopo=19,0)



Carril 3) Grupo de Elución 36,6-37,6 Minutos para Co-cultivo de IL-4/IL-13 con Mutación -lpp y EDTAYMg²⁺

FIG. 9C-3

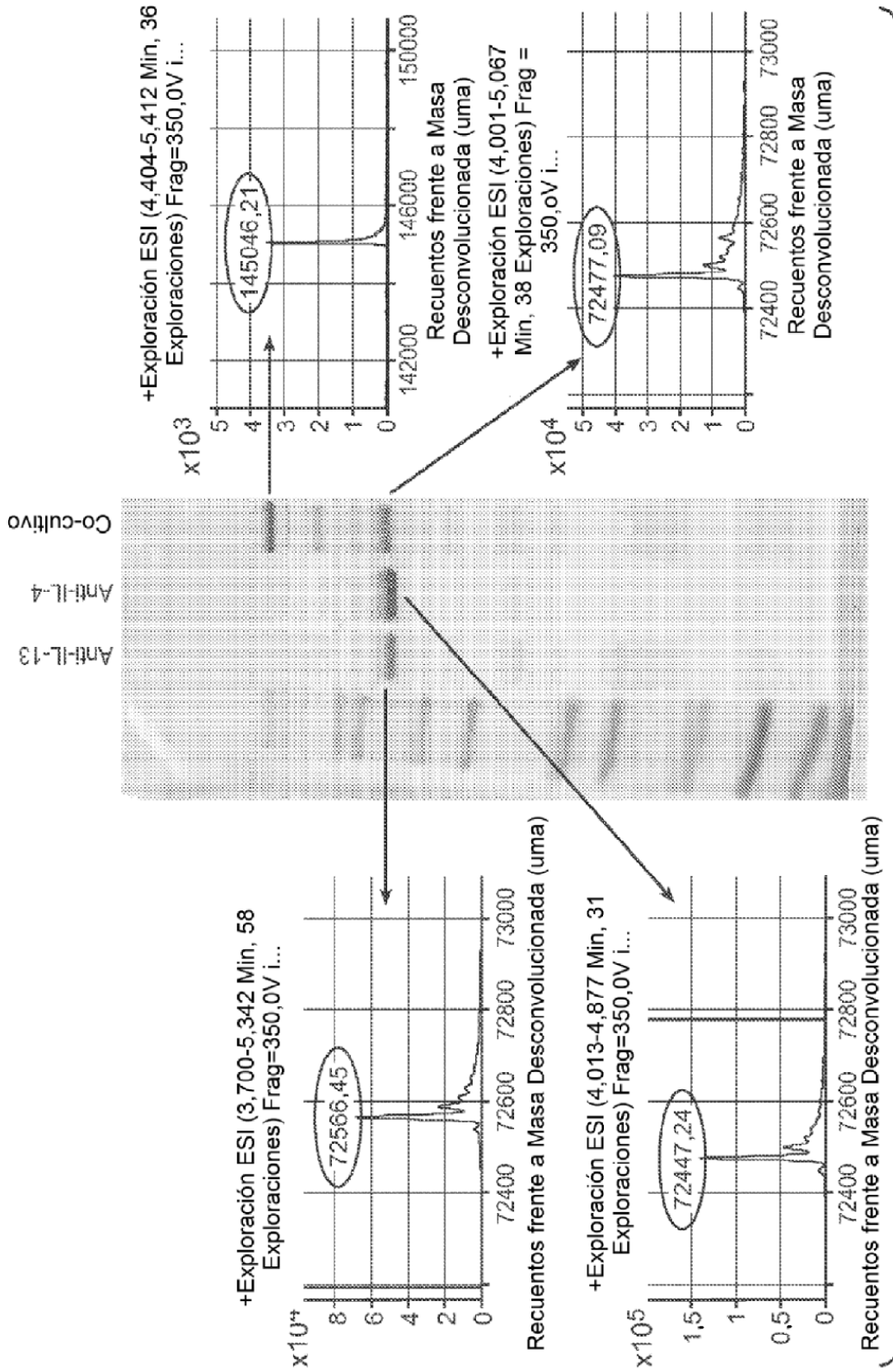


FIG. 9D

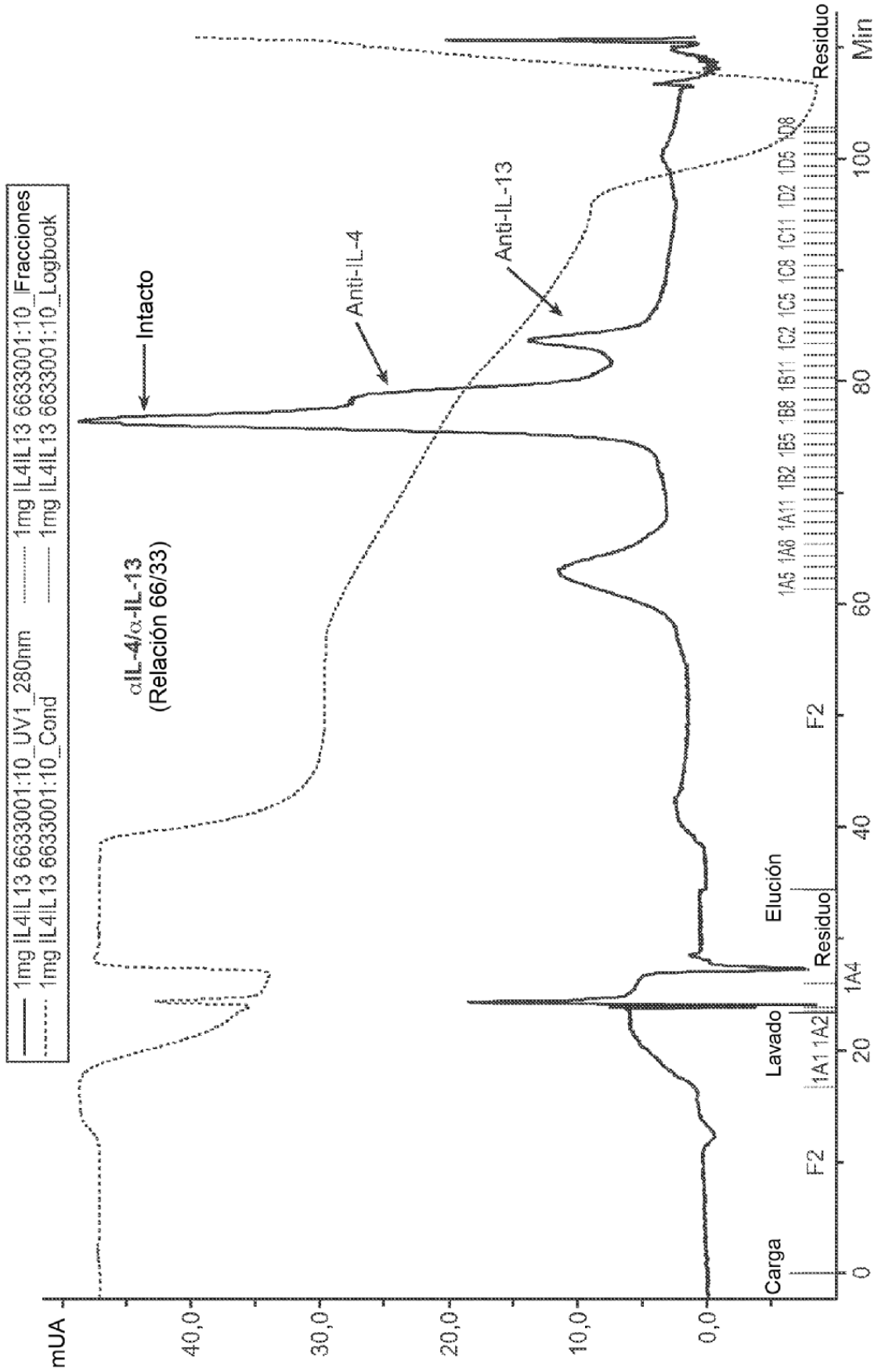


FIG. 9E-1

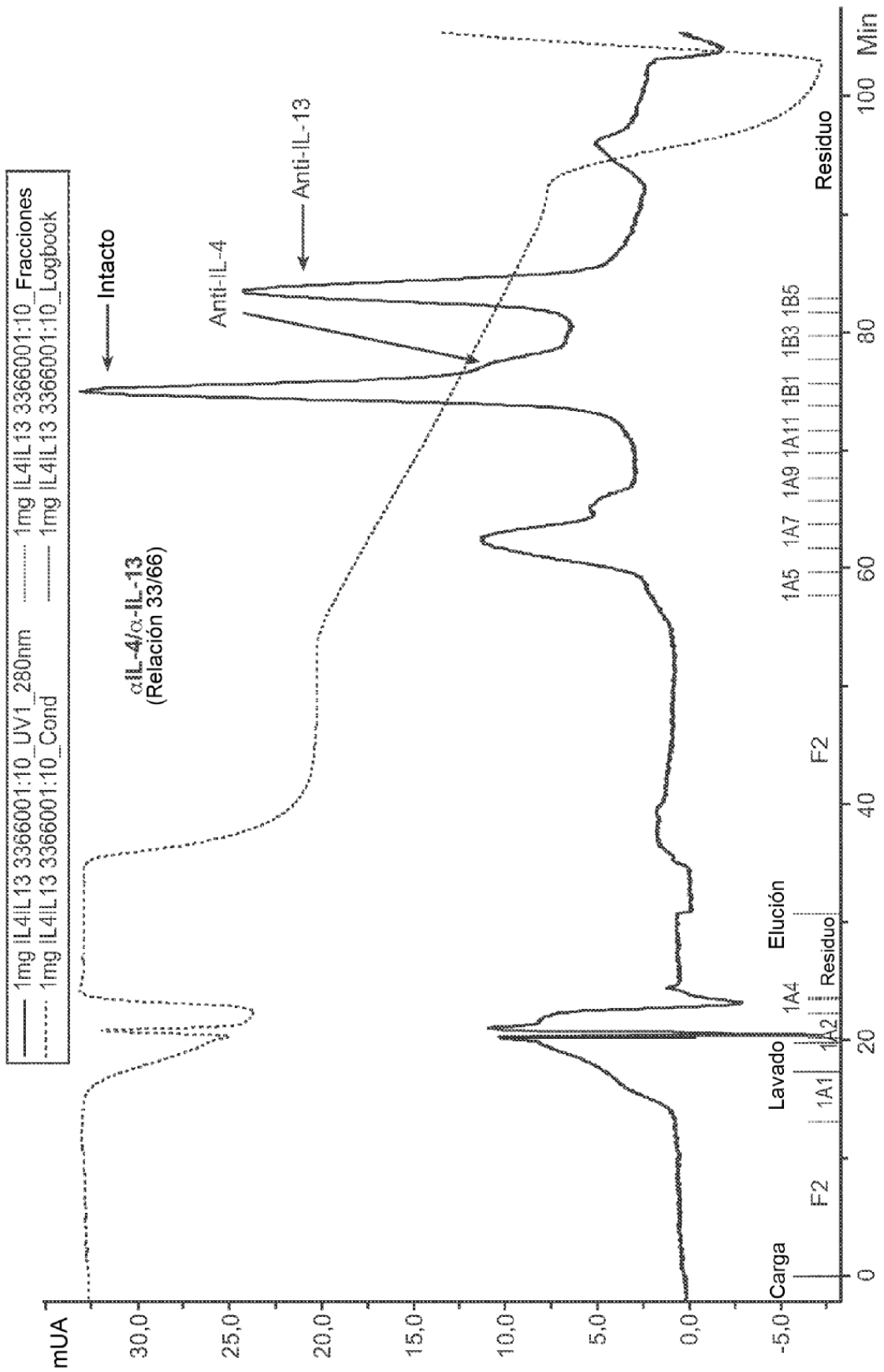


FIG. 9E-2

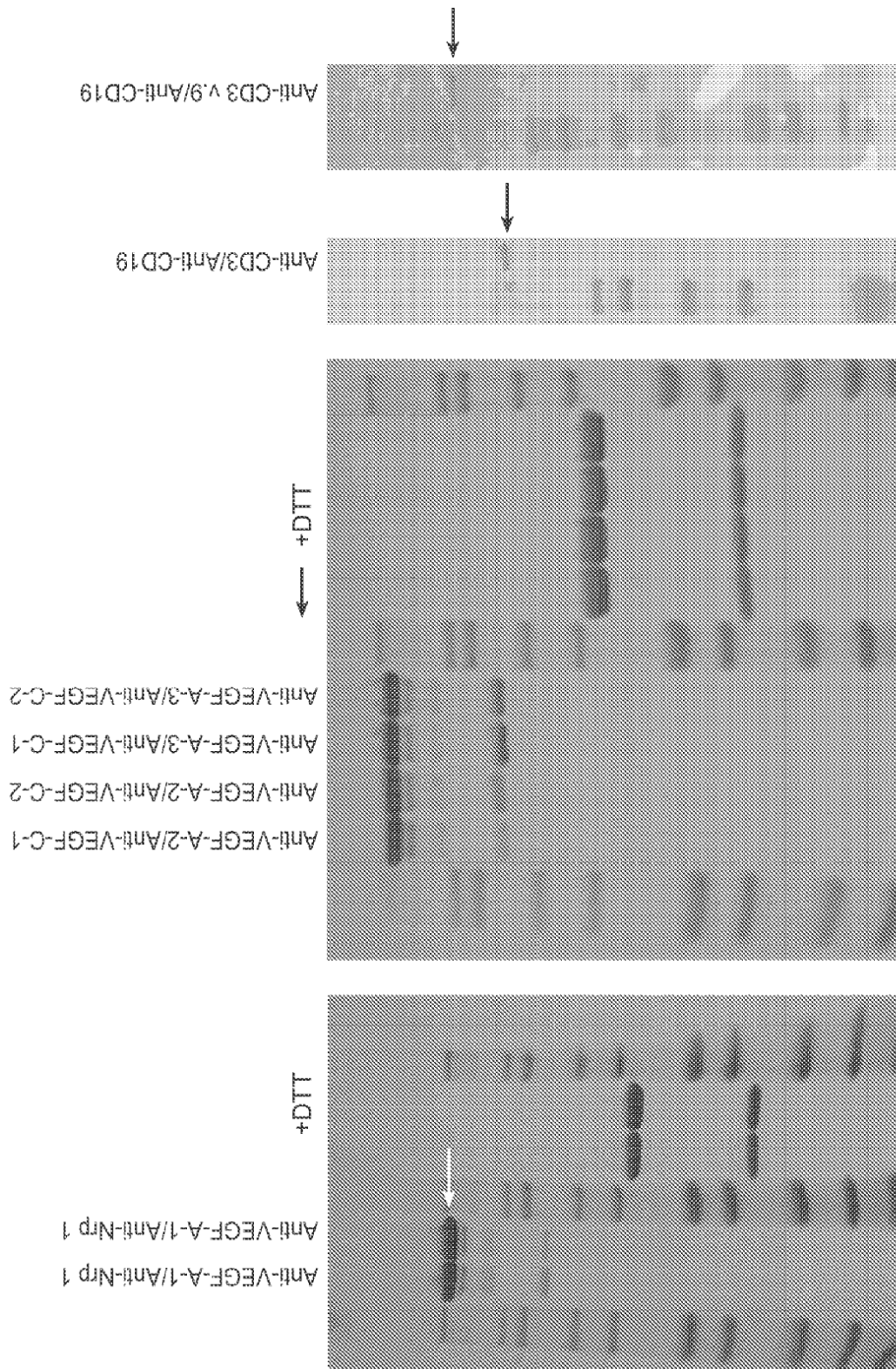


FIG. 9F

Facilitación del Descubrimiento: Uso de Enfoque de Matriz

Ejemplo: Dianas de Antígeno Tumoral y Linfocitos T citotóxicos

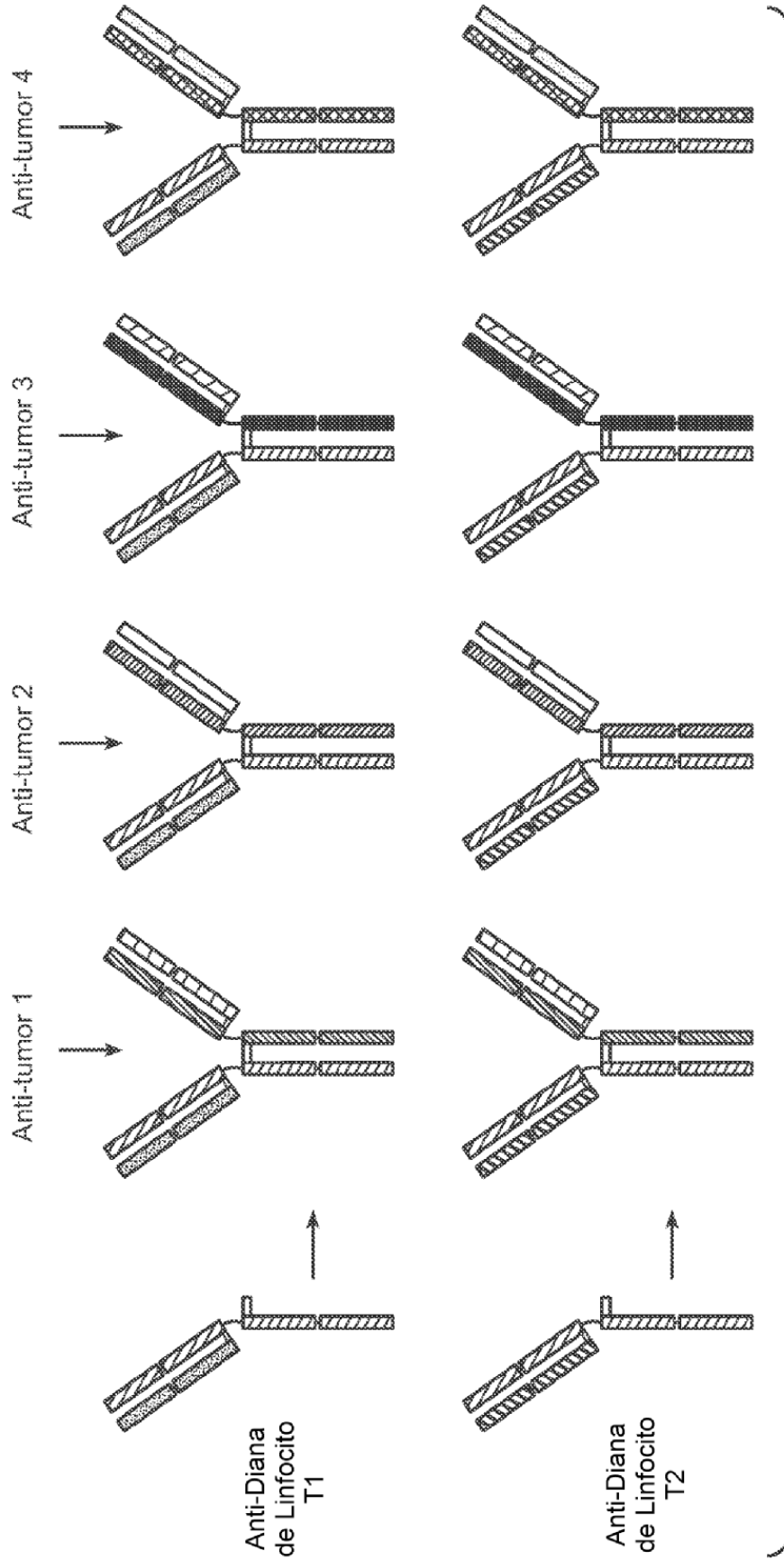


FIG. 10

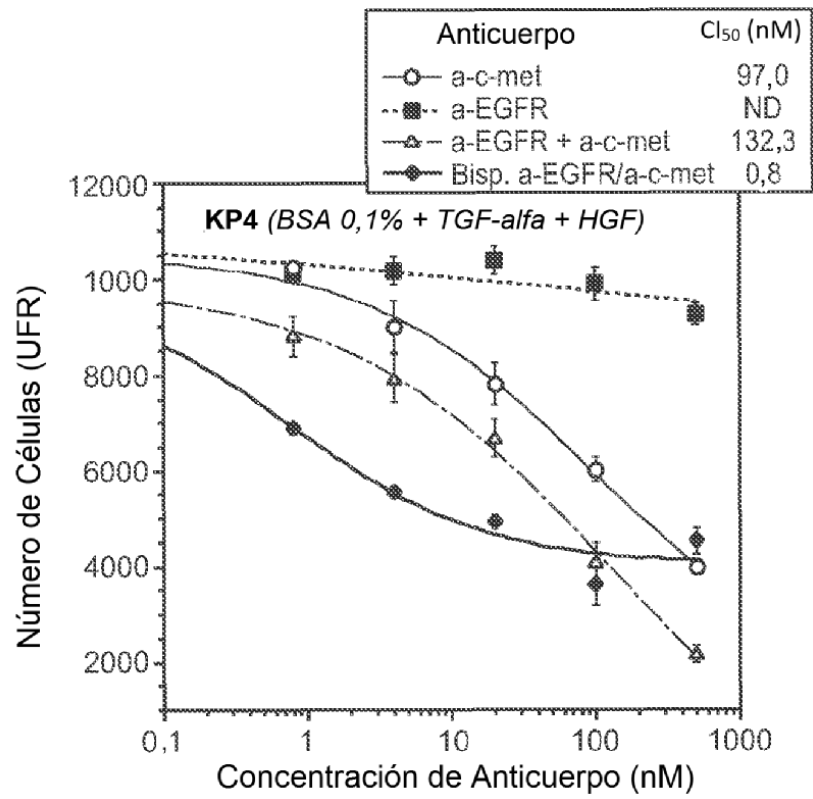


FIG. 11

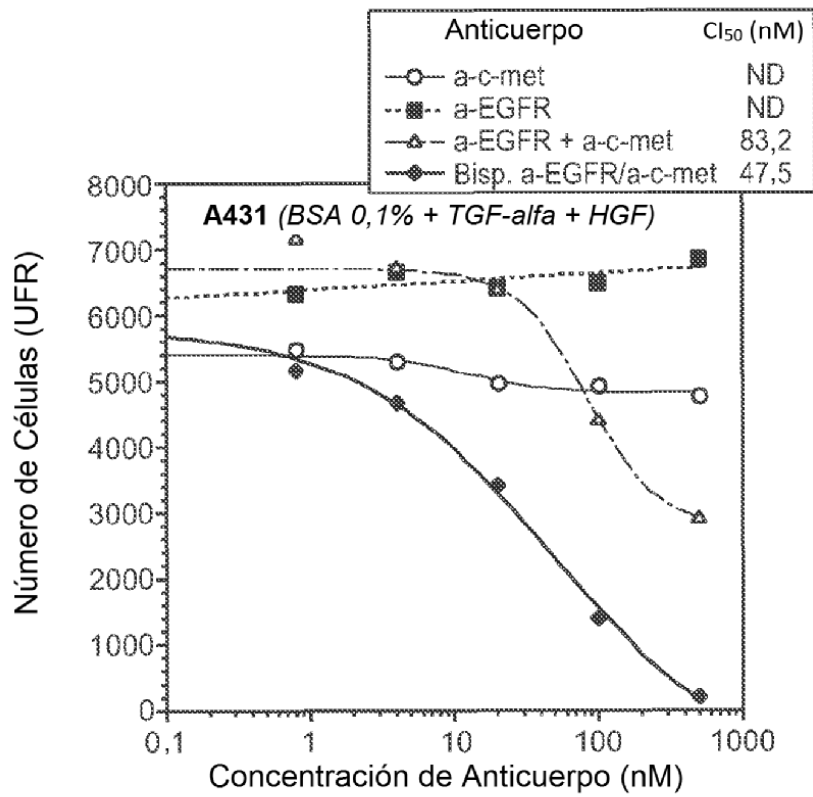
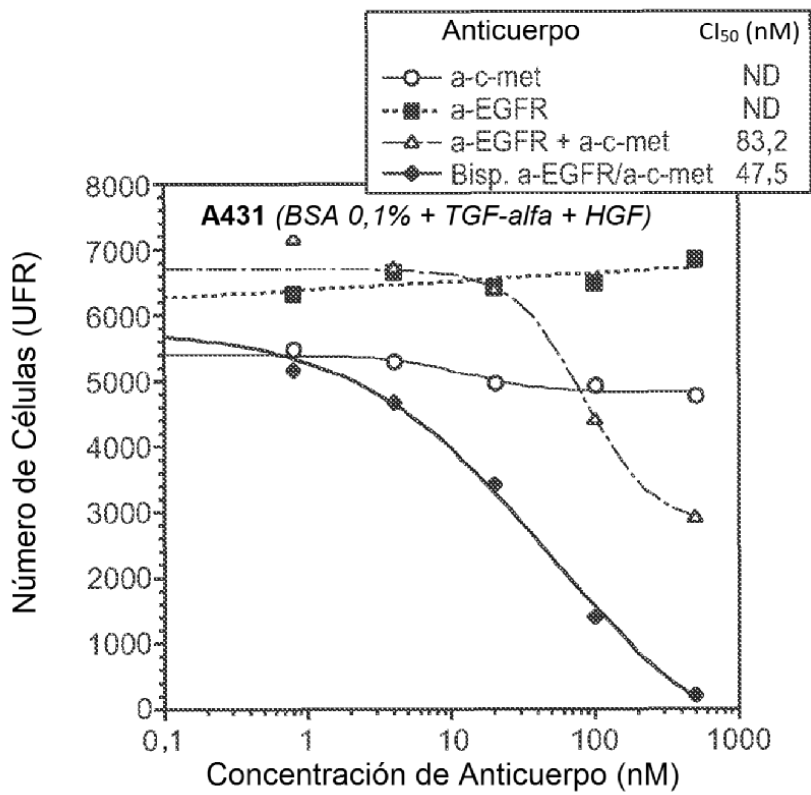
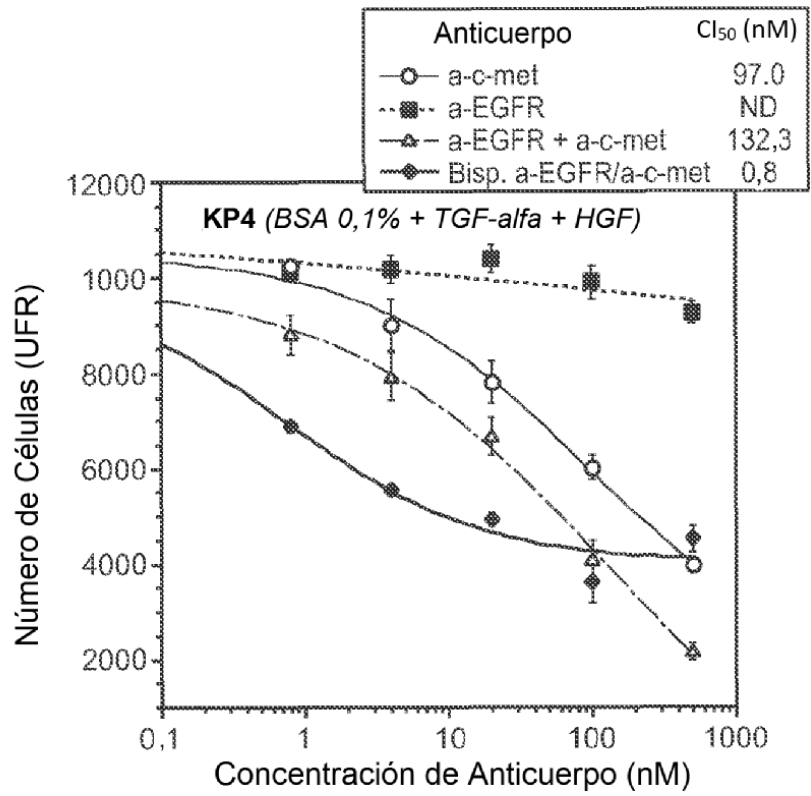


FIG. 11



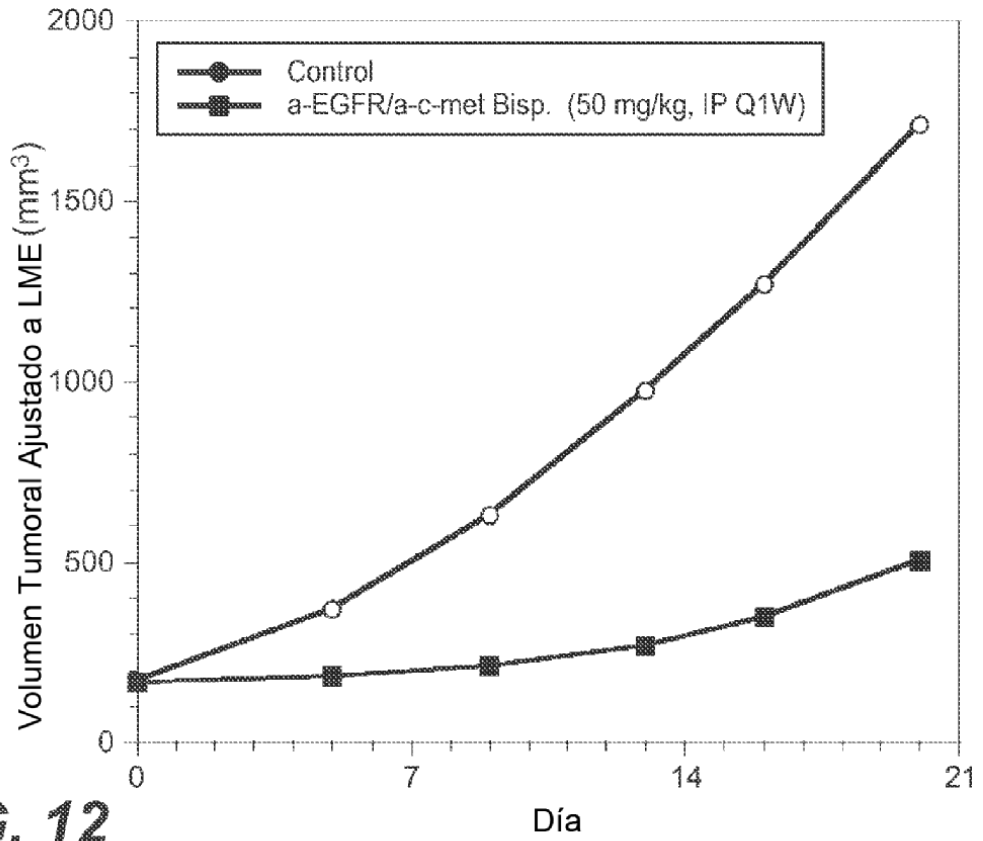


FIG. 12

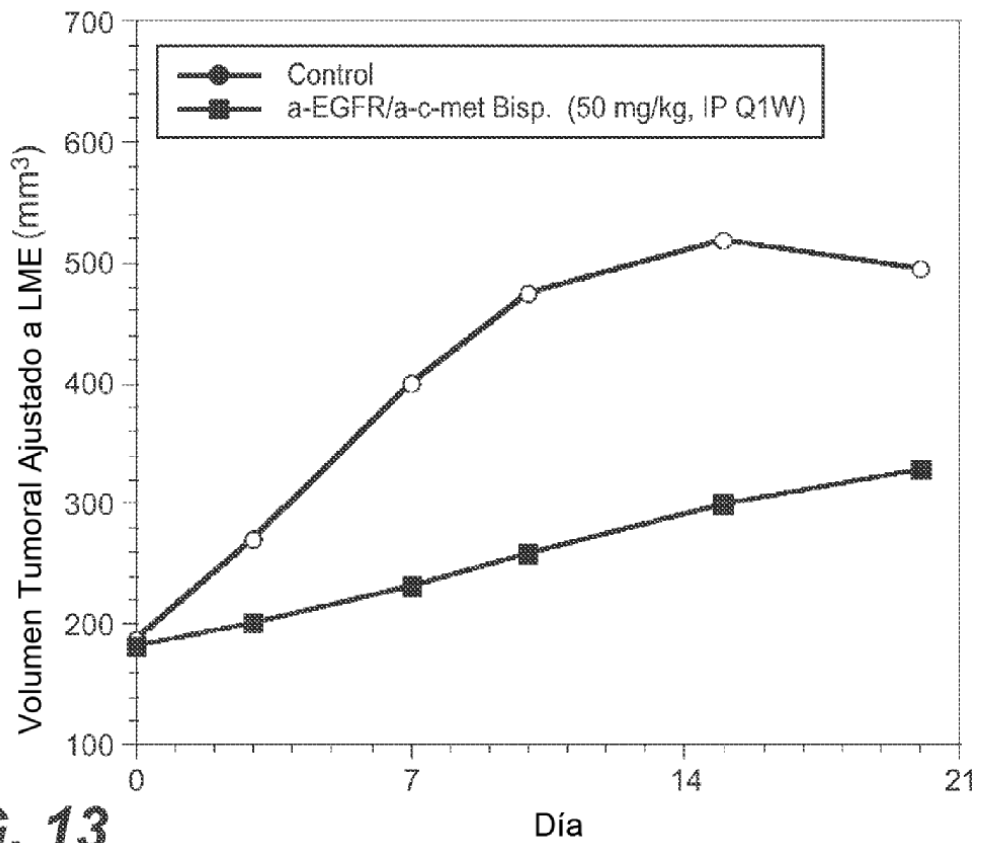


FIG. 13

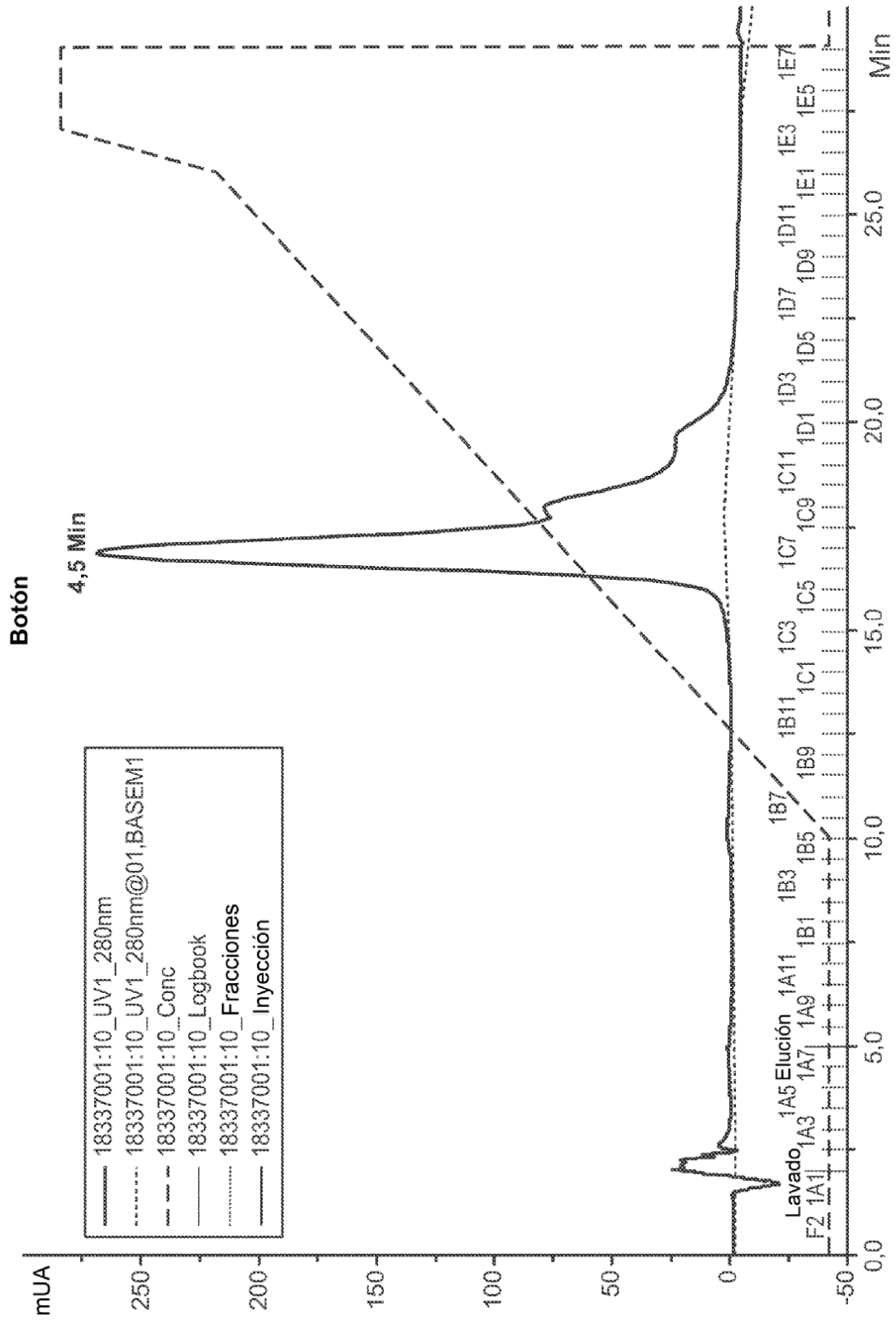


FIG. 14A

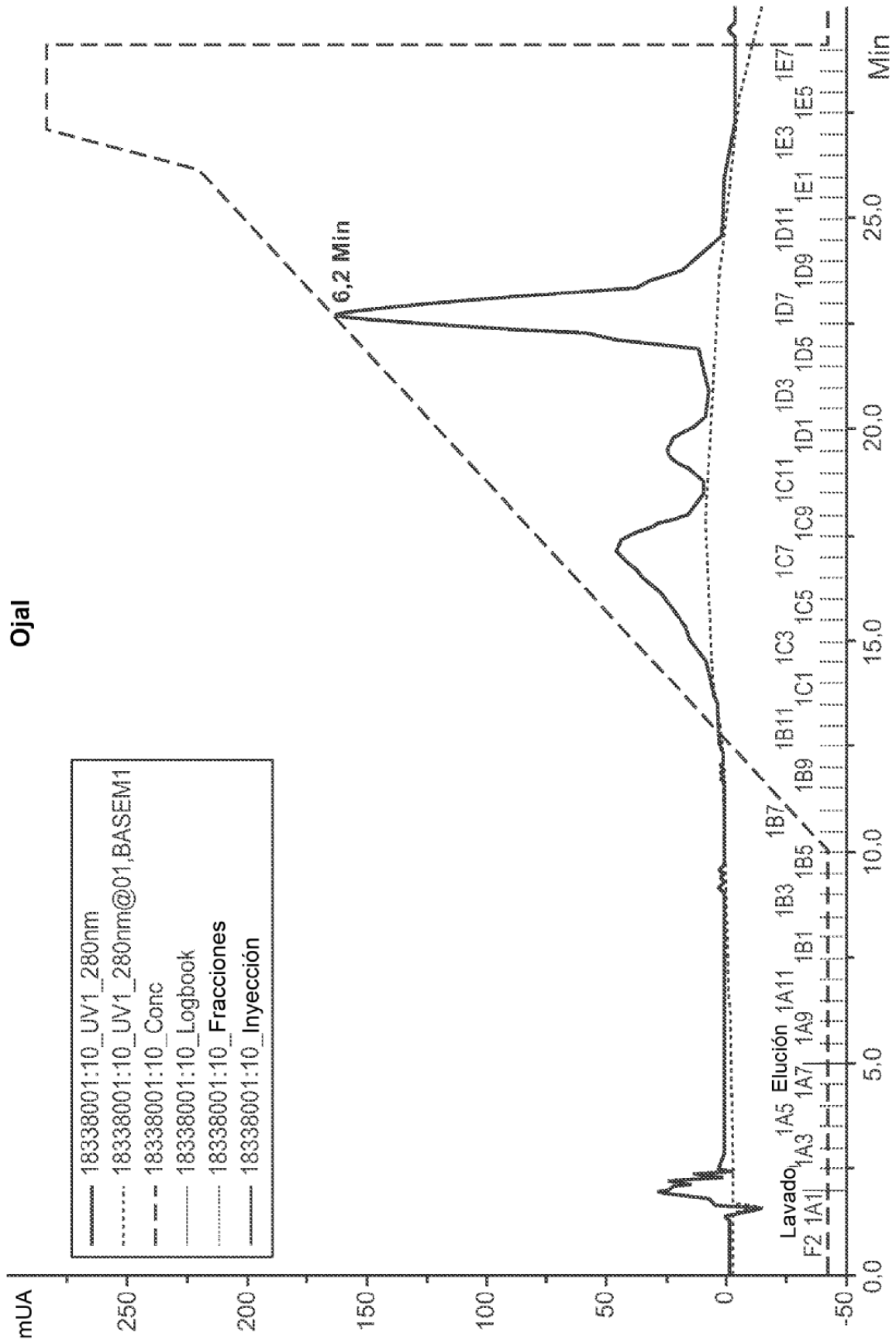


FIG. 14B

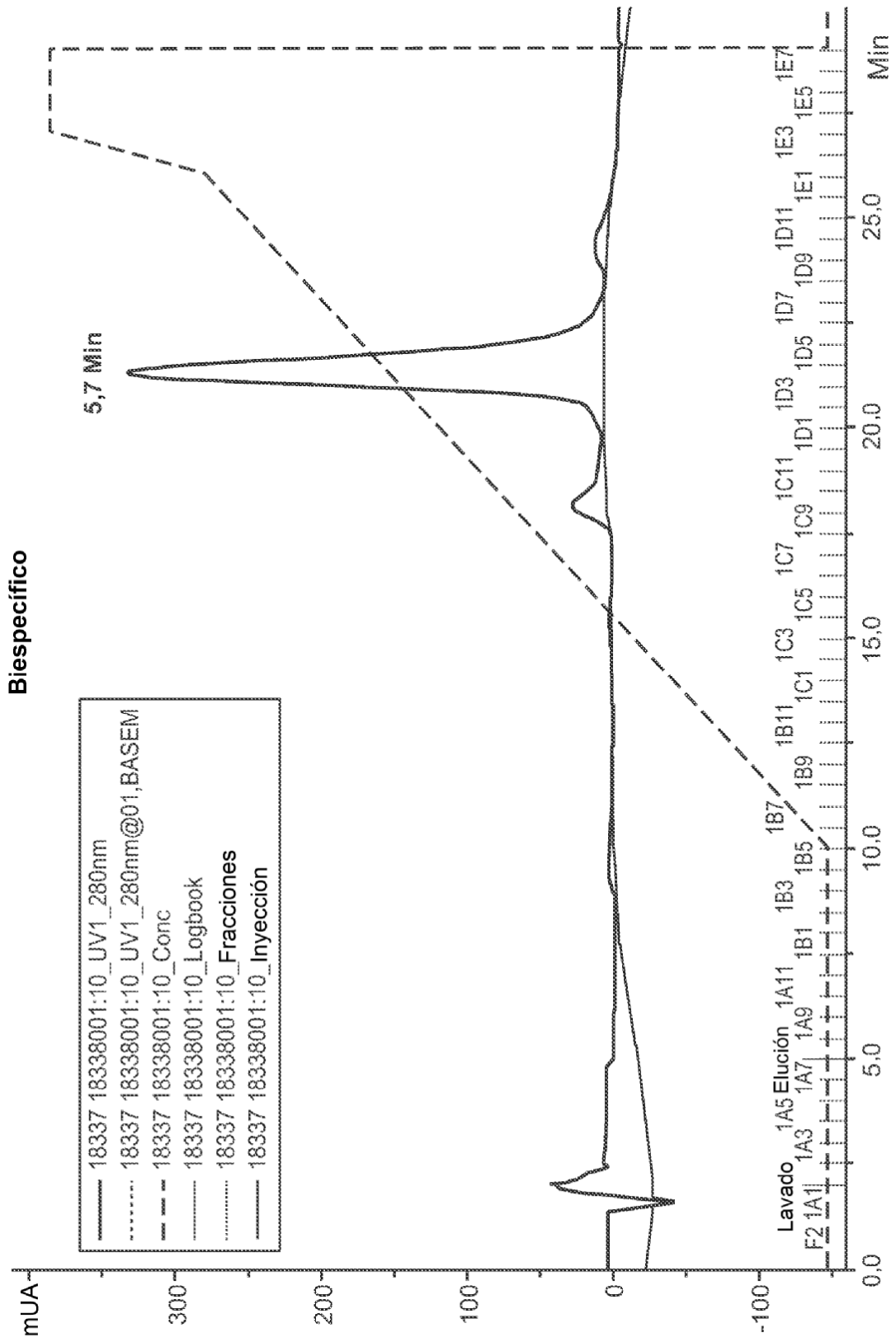
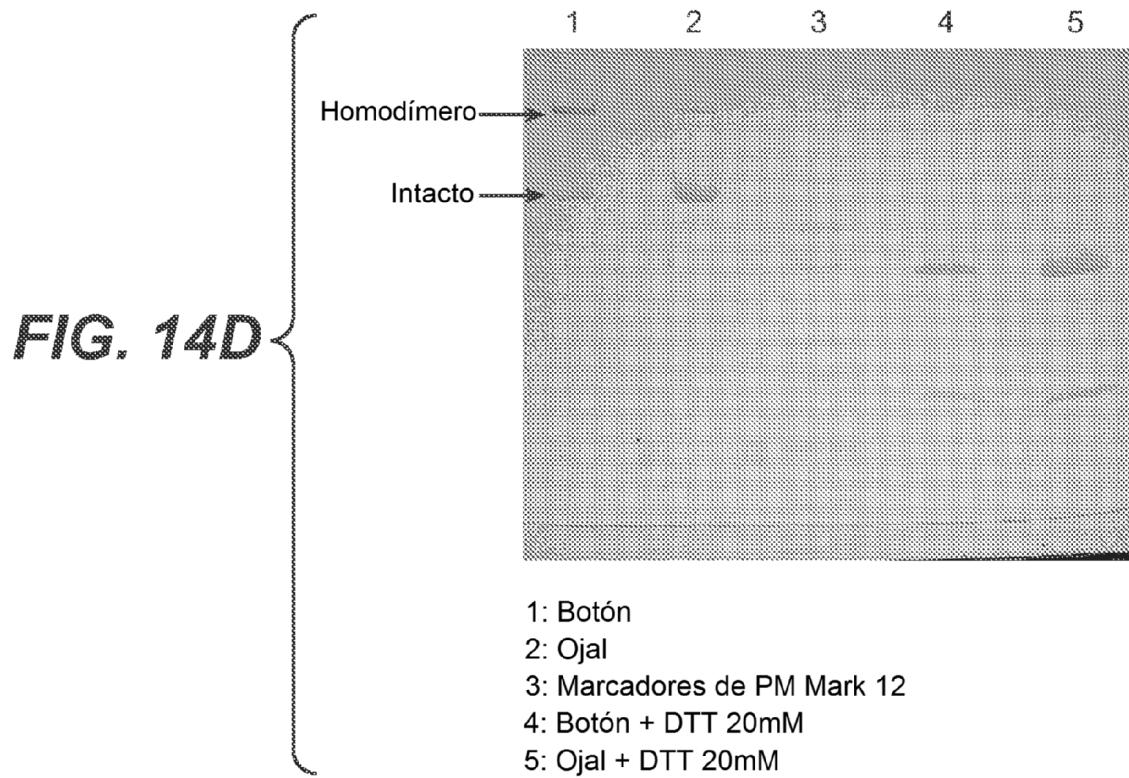


FIG. 14C



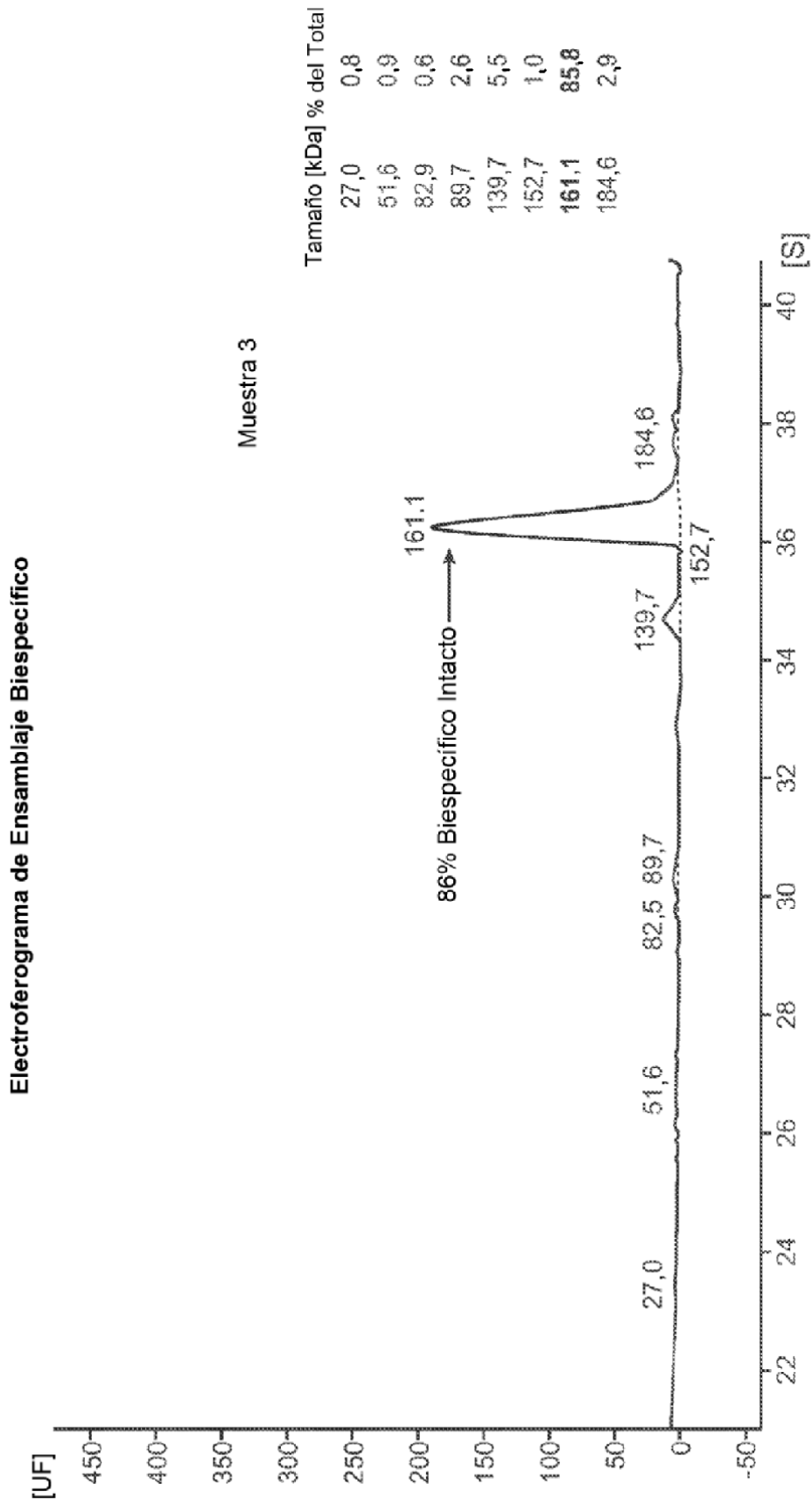


FIG. 15

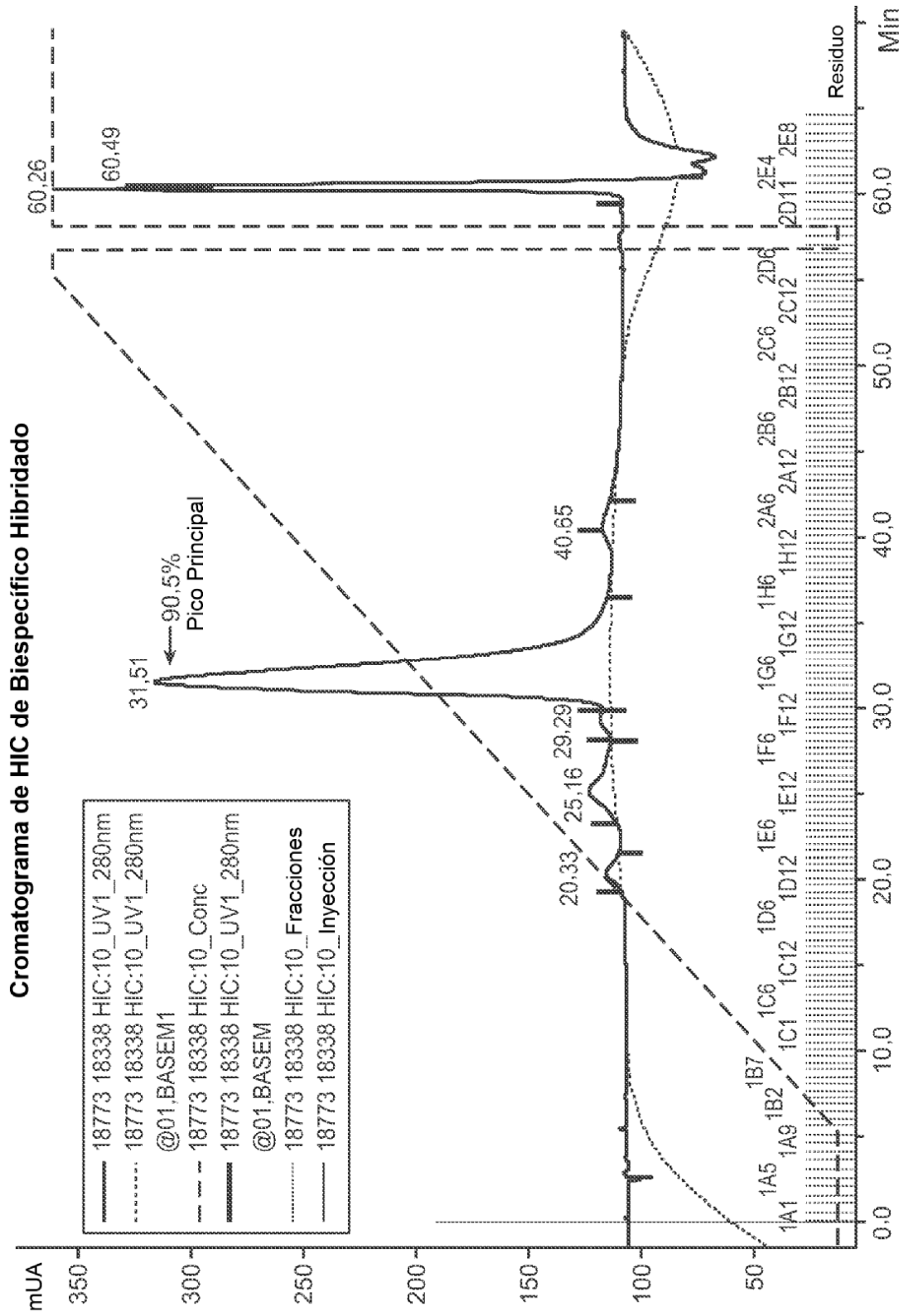


FIG. 16A

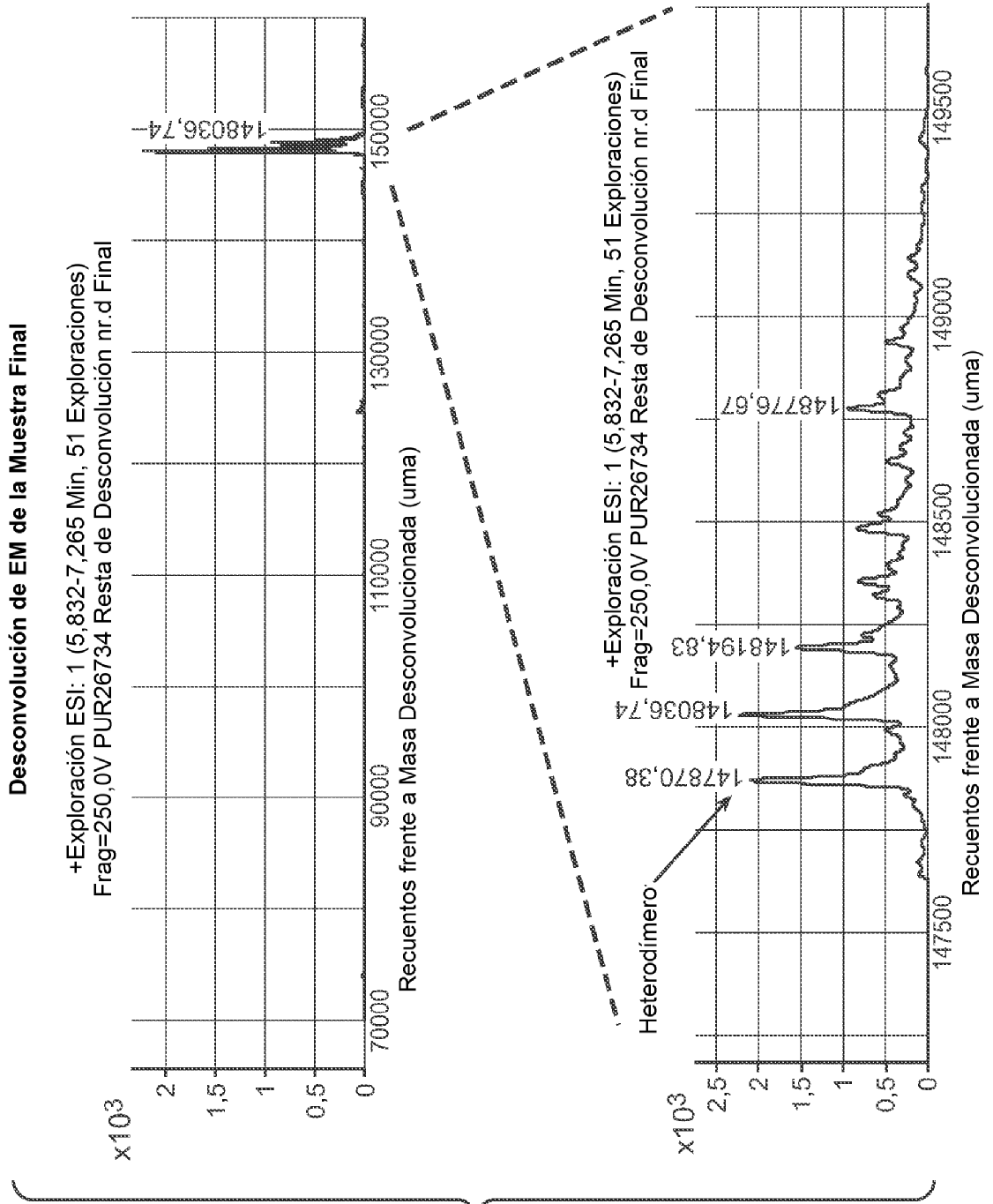


FIG. 16B

Gel de Material Purificado de HIC

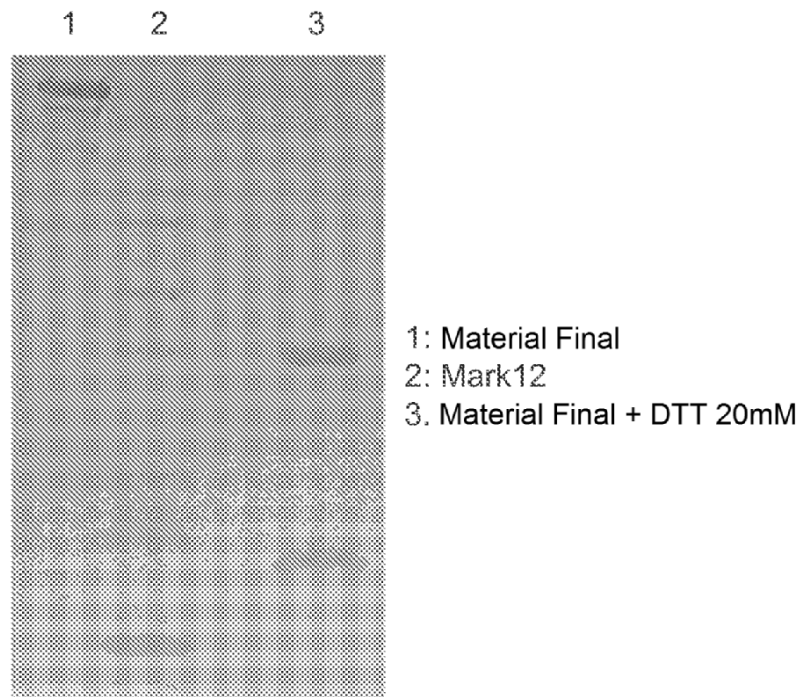


FIG. 16C

	Masa Teórica (Da)	Masa Medida (Da)
Botón/Botón	148.819,02	N/D
Ojal/Ojal	146.910,40	N/D
Botón/Ojal	147.864,71	147.870,38

FIG. 16D

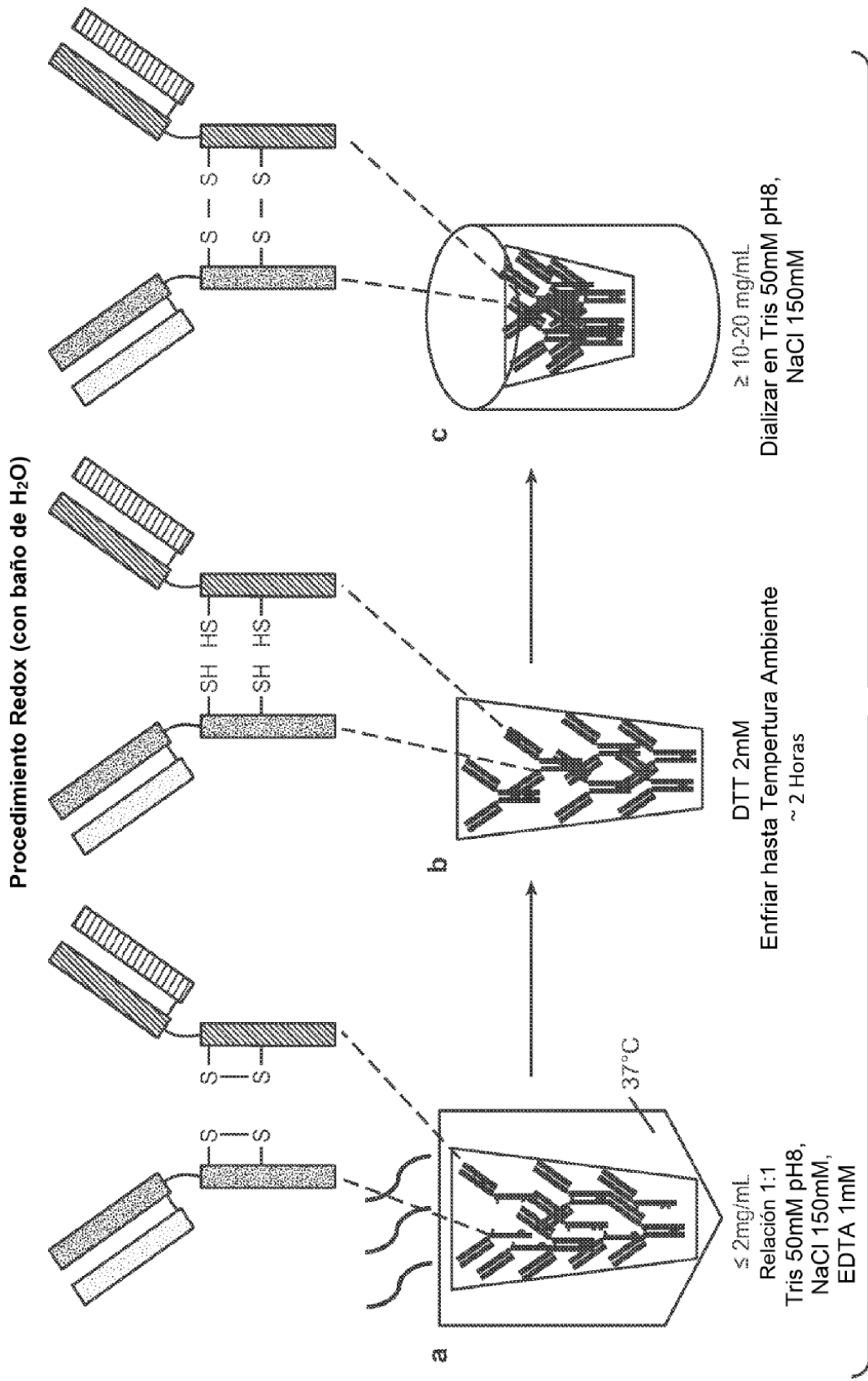


FIG. 17

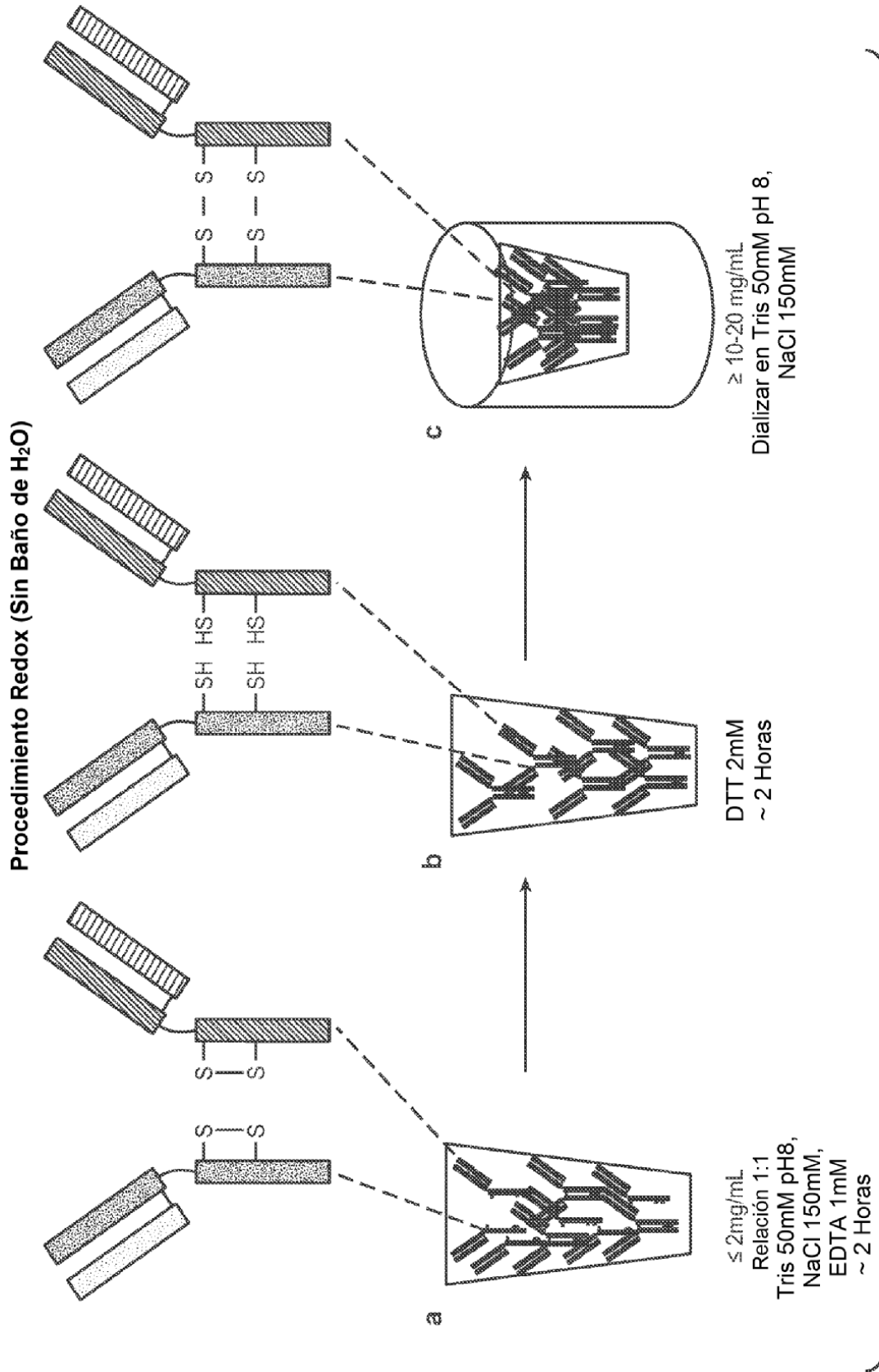


FIG. 18

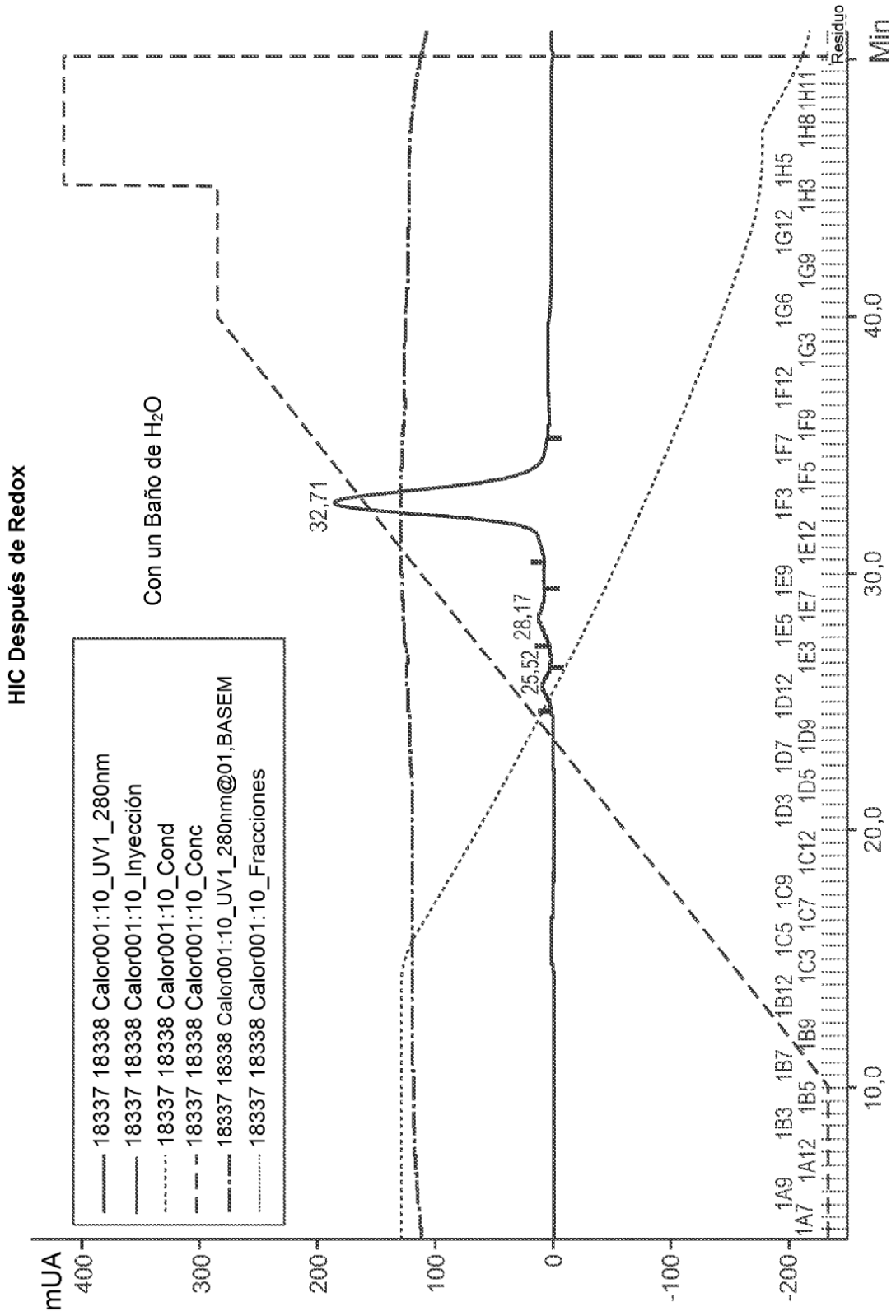


FIG. 19A

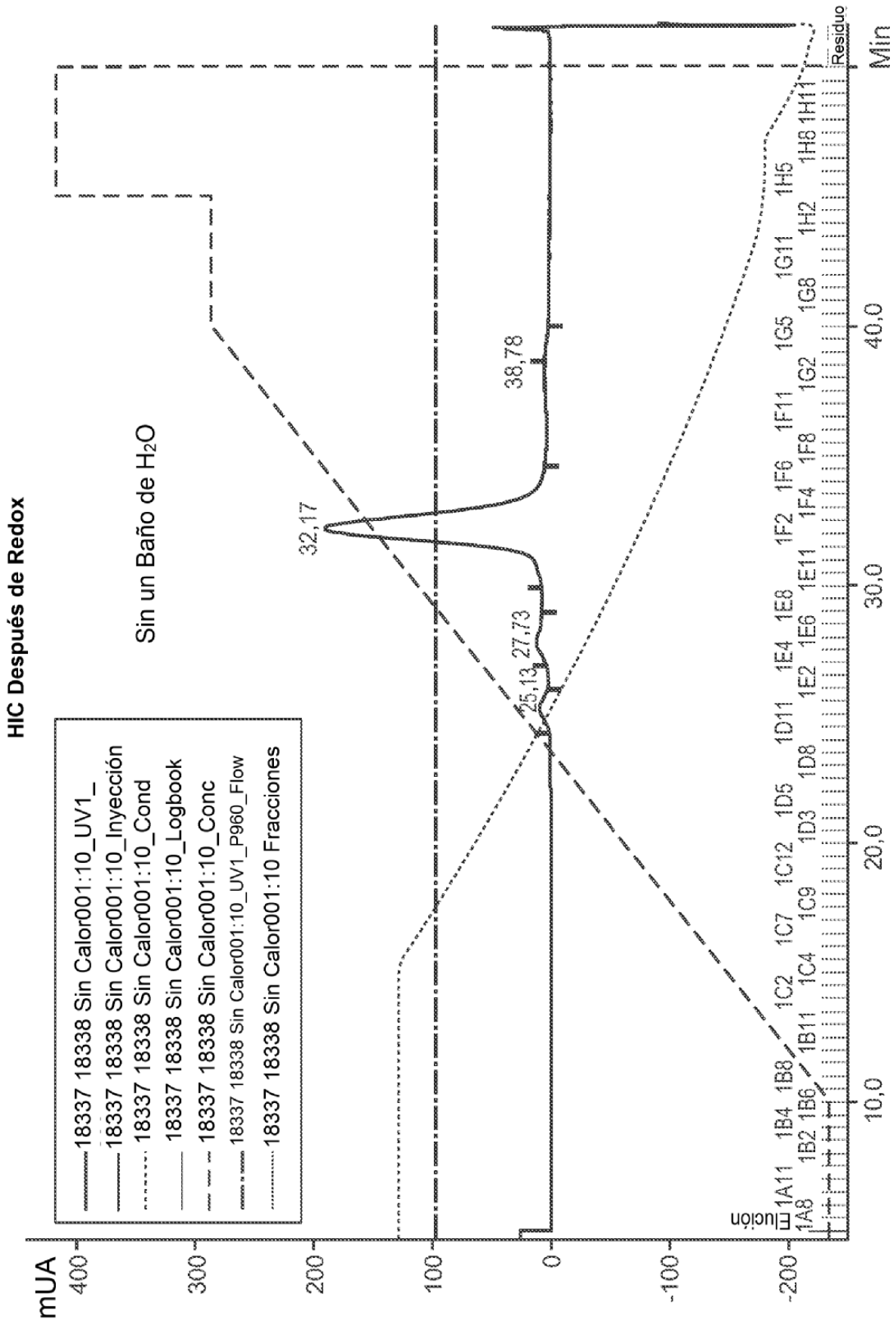


FIG. 19B