

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 654 040**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.03.2007 PCT/JP2007/057058**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.10.2007 WO07114325**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2007 E 07740494 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017 EP 2009101**

54 Título: **Método de modificación de anticuerpos para la purificación de anticuerpos biespecíficos**

30 Prioridad:

31.03.2006 JP 2006097795
06.10.2006 JP 2006275804

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.02.2018

73 Titular/es:

CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA (100.0%)
5-1, UKIMA 5-CHOME
KITA-KU, TOKYO 115-8543, JP

72 Inventor/es:

IGAWA, TOMOYUKI y
TSUNODA, HIROYUKI

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 654 040 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

Método de modificación de anticuerpos para la purificación de anticuerpos biespecíficos

Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos para producir o purificar anticuerpos biespecíficos.

5 Antecedentes de la invención

Debido a su naturaleza altamente estable en sangre y a sus relativamente pocos efectos secundarios, los anticuerpos han recibido mucha atención como productos farmacéuticos. De particular interés son los anticuerpos biespecíficos que pueden reconocer simultáneamente dos tipos de antígenos, por ejemplo, el anticuerpo A y el anticuerpo B (véase el documento no de patente 1). MDX-210, que se encuentra actualmente bajo investigación de ensayo clínico, es un anticuerpo biespecífico de tipo IgG que retarda los monocitos que expresan FcγRI y tales como las células cancerosas que expresan HER-2/neu (véase el Documento no de Patente 2). En general, los anticuerpos se producen usando técnicas de recombinación genética. Una técnica específica implica la clonación de un ADN que codifica una proteína de anticuerpo de células productoras de anticuerpos, tales como hibridomas o linfocitos sensibilizados que producen anticuerpos o una biblioteca de fagos que presenta genes de anticuerpos, y la inserción de tales en un vector adecuado, que luego se transfecta en las células huésped para la producción de anticuerpos. La producción de anticuerpos biespecíficos de tipo IgG usando técnicas de recombinación genética implica la introducción de un total de cuatro tipos de genes en células, en las cuales estos genes de cadenas H y cadenas L constituyen dos tipos de IgG de interés, y la secreción de anticuerpos por coexpresión. En este tipo de sistema, la expresión de los genes constituyentes de las cadenas H y L de tipo natural conduce a una asociación aleatoria entre dos tipos de cadenas H y la asociación entre las cadenas H y L, y así la proporción del anticuerpo biespecífico de interés se hace muy pequeña. Más particularmente, solo uno de cada diez tipos producidos es el anticuerpo biespecífico de interés, lo que hace que la eficacia de producción sea bastante baja. La disminución de la eficacia en la producción del anticuerpo de interés no solo es un obstáculo para purificar el anticuerpo de interés, sino que también aumenta la falta de uniformidad, tales como las diferencias entre lotes, lo que a su vez conduce a un aumento en los costos de producción.

Las técnicas para obtener cadenas L comúnmente compartidas por ambas cadenas H, y la técnica de "botón en hojal" para la asociación heteróloga de cadenas H se han mostrado como métodos de producción de anticuerpos biespecíficos eficientes para desarrollar anticuerpos biespecíficos. Más específicamente, una cadena L común, que puede mantener ambas actividades de unión a antígeno de las cadenas H respectivas que reconocen el antígeno A y el antígeno B, se identifica a partir de una biblioteca de fagos o similar. Luego, se promueve la formación de heterodímeros de la cadena H mediante la sustitución de una cadena lateral de aminoácidos presente en la región CH3 de una de las cadenas H con una cadena lateral más grande (botón) y sustituyendo una cadena lateral de aminoácidos presente en la región CH3 de la otra cadena H con una cadena lateral más pequeña (hojal), para colocar la el botón dentro del hojal. Por lo tanto, los anticuerpos biespecíficos de interés pueden obtenerse de forma eficiente (véase el Documento de Patente 1, el Documento No de Patente 3, y el Documento no de Patente 4).

Sin embargo, incluso cuando la técnica de botón en hojal se usa para heterodímeros de la cadena H, aunque el contenido del heterodímero de cadena A-cadena B de interés se puede aumentar hasta un máximo de aproximadamente 95% como se muestra en el Documento no de patente 3 y el Documento no de patente 4, el 5% restante son impurezas y consiste en homodímeros de cadena A y cadena B. Para desarrollar anticuerpos biespecíficos como productos farmacéuticos, los heterodímeros de cadena A-cadena B deben purificarse hasta la pureza más alta posible de los tres tipos de especies moleculares (homodímero de cadena A, homodímero de cadena B y heterodímero de cadena A-cadena B) que se producen cuando se usa una cadena L común (Documento no de patente 3 y documento no de patente 4). Por lo tanto, es necesario eliminar las impurezas al 5%, que son los homodímeros de la cadena A y de la cadena B, purificando así el heterodímero de la cadena A-cadena B a una alta pureza que permita que el heterodímero se desarrolle en un producto farmacéutico. Cuando se usa una cadena L común sin la técnica de botón en hojal, la relación de producción del homodímero de la cadena A, el heterodímero de cadena A-cadena B y el homodímero de la cadena B es teóricamente 1:2:1 y las impurezas del 50% que son los homodímeros de la cadena A y de la cadena B deben eliminarse.

Se han mostrado varios métodos cromatográficos para separar el heterodímero de cadena A-cadena B de los homodímeros de cadena A-cadena B a nivel de fabricación farmacéutica. El documento no de patente 5 describe un método para purificar selectivamente el heterodímero de cadena A-cadena B usando IgG2a de ratón como cadena A e IgG2b de rata como cadena B. Este método usa la diferencia entre las cadenas H de IgG2a de ratón e IgG2b de rata respectivas en su afinidad por la proteína A, y purifica el heterodímero de cadena A-cadena B controlando el pH para la elución de la proteína A. Sin embargo, dado que se usan regiones constantes de ratón y rata, este método es difícil de aplicar a productos farmacéuticos para humanos desde la perspectiva de la antigenicidad. Además, dado que este método no puede separar el heterodímero de cadena A-cadena B, que se compone de cadenas H que pertenecen al mismo isotipo, su uso es limitado.

Un método para purificar el heterodímero de cadena A-cadena B usando cromatografía de interacción hidrofóbica se

muestra en el Documento no de patente 6. Sin embargo, el pico del heterodímero de cadena A-cadena B de interés que contiene IgG2a de ratón anti-CD3 e IgG1 de ratón anti-CD19 no está suficientemente separado. Además, se usan cadenas H que pertenecen a diferentes isotipos, y la diferencia en su hidrofobicidad parece usarse para la separación. Por lo tanto, este método puede no separar necesariamente el heterodímero de cadena A-cadena B compuesto de cadenas H que pertenecen al mismo isotipo.

Un método para purificar el heterodímero de cadena A-cadena B usando cromatografía de afinidad tiofílica se muestra en el Documento no de patente 7. Sin embargo, este método no puede adoptarse para separar el heterodímero de cadena A-cadena B compuesto de cadenas H pertenecientes al mismo isotipo, porque utiliza IgG1 de ratón e IgG2a de rata, y las cisteínas libres (grupos tiol) en las regiones de bisagra. Además, dado que las cisteínas libres están implicadas en la agregación durante el almacenamiento, este método no es adecuado para el desarrollo de formulaciones farmacéuticas estables.

La cromatografía de afinidad que usa antígenos se muestra en el documento no de patente 8. Sin embargo, dado que la cromatografía de afinidad que usa proteínas o antígenos peptídicos es problemática en términos de costo y estabilidad de la columna, la producción de productos farmacéuticos que utilizan cromatografía de afinidad no es convencional. Además, para purificar el heterodímero de cadena A-cadena B que se une a ambos antígenos, la cromatografía de afinidad se debe realizar dos veces, y se espera que esto sea costoso. Se ha publicado que hay anticuerpos que reconocen solo las estructuras tridimensionales de los antígenos, así como anticuerpos que tienen las funciones deseadas pero de baja afinidad. Para los anticuerpos con tales características, es difícil adoptar una cromatografía de afinidad que use antígenos. Por lo tanto, la purificación de anticuerpos biespecíficos usando cromatografía de afinidad no puede usarse en todos los casos.

Como se ha descrito anteriormente, la purificación del heterodímero de cadena A-cadena B de un anticuerpo biespecífico se ha realizado solo dentro de un alcance limitado. No se han publicado métodos para purificar el heterodímero de cadena A-cadena B de un anticuerpo biespecífico compuesto del mismo isotipo de la cadena H y la secuencia de la región constante con una alta pureza que es aceptable para productos farmacéuticos. Cuando dos tipos de anticuerpos que constituyen un anticuerpo biespecífico tienen la misma secuencia de región constante, el heterodímero de cadena A-cadena B necesita separarse basándose únicamente en las diferencias en sus secuencias de región variable. Sin embargo, dado que la homología de secuencia de aminoácidos entre las regiones variables de anticuerpos es muy alta (Documento no de patente 9), ha sido difícil purificar el heterodímero de cadena A-cadena B a una pureza elevada que fuera aceptable para productos farmacéuticos basándose únicamente en las diferencias en sus secuencias de región variable.

[Documento de patente 1]

WO 96/27011

[Documento no de patente 1]

Marvin JS, and Zhu Z, "Recombinant approaches to IgG-like bispecific antibodies.", *Acta. Pharmacol. Sin.*, June 2005, Vol. 26(6), p.649-58.

[Documento no de patente 2]

Segal D. M. et al., *Current Opinion in Immunology*, 1999, Vol. 11, p.558-562.

[Documento no de patente 3]

Merchant AM et al., "An efficient route to human bispecific IgG.", *Nat. Biotechnol.*, Jul 1998, Vol. 16(7), p.677-81.

[Documento no de patente 4]

Carter P, "Bispecific human IgG by design.", *J. Immunol. Methods.*, Feb 2001, Vol. 248(1-2), p.7-15.

[Documento no de patente 5]

Lindhofer H et al., "Preferential species-restricted heavy/light chain pairing in rat/mouse quadromas. Implications for a single-step purification of bispecific antibodies.", *J. Immunol.*, Jul 1, 1995, Vol. 155(1), p.219-25.

[Documento no de patente 6]

Manzke O et al., "Single-step purification of bispecific monoclonal antibodies for immunotherapeutic use by hydrophobic interaction chromatography.", *J. Immunol. Methods.*, Oct 13, 1997, Vol. 208(1), p.65-73.

[Documento no de patente 7]

Kreutz FT et al., "Efficient bispecific monoclonal antibody purification using gradient thiophilic affinity chromatography.", *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, Sep 4, 1998, Vol. 714(2), p.161-70.

[Documento no de patente 8]

Gupta S and Suresh M, "Affinity chromatography and co-chromatography of bispecific monoclonal antibody immunoconjugates.", J. Biochem. Biophys. Methods., May 31, 2002, Vol. 51(3), p.203-16. Revisión.

[Documento no de patente 9]

5 Carl Branden, Introduction to Protein Structure 2nd edition, Newton Press.

Descripción de la invención

[Problemas a resolver por la invención]

10 La presente invención se logró a la vista de las circunstancias anteriores. Un objetivo de la presente invención es proporcionar métodos para modificar los aminoácidos de regiones constantes y variables de anticuerpos de la cadena H de anticuerpos para producir o purificar de manera eficiente anticuerpos biespecíficos.

[Medios para resolver los problemas]

Los presentes inventores llevaron a cabo investigaciones minuciosas sobre métodos que sustituyen aminoácidos en las regiones variables de anticuerpos. Estos métodos usan una columna de cromatografía estándar para purificar eficientemente anticuerpos biespecíficos de interés que eran convencionalmente problemáticos.

15 Los presentes inventores idearon métodos para purificar eficazmente anticuerpos biespecíficos usando una columna de cromatografía basada en la diferencia en los puntos isoelectrónicos de las cadenas H de dos tipos de anticuerpos, y la diferencia se introduce modificando los aminoácidos presentes en la superficie de las regiones variables de los dos tipos de anticuerpos que constituyen un anticuerpo biespecífico. Específicamente, los presentes inventores descubrieron sitios de modificación en la cadena H del anticuerpo que permiten la regulación del punto isoelectrónico solo sin reducir la función (actividad) del anticuerpo. Además, los presentes inventores confirmaron que los anticuerpos biespecíficos obtenidos mediante los métodos de la presente invención realmente mantienen sus funciones.

20 Como se describió anteriormente, los presentes inventores desarrollaron con éxito métodos para sustituir aminoácidos en las regiones variables del anticuerpo como métodos eficientes para purificar cualquier anticuerpo biespecífico mediante el uso de una columna de cromatografía estándar, y de ese modo completaron la presente invención.

25 Los presentes inventores desarrollaron además métodos para purificar eficazmente anticuerpos biespecíficos usando una columna de cromatografía basada en la diferencia en el punto isoelectrónico. Las regiones constantes de los diferentes isotipos que tienen originalmente diferentes puntos isoelectrónicos se usan como las regiones constantes de los dos tipos de cadenas H que constituyen un anticuerpo biespecífico. Además, los presentes inventores confirmaron que los anticuerpos biespecíficos obtenidos mediante los métodos de la presente invención realmente mantienen sus funciones.

30 La presente descripción se refiere a métodos de sustitución de aminoácidos en las regiones variables del anticuerpo para una purificación eficiente mediante el uso de una columna de cromatografía, composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos biespecíficos modificados, y métodos para producir las composiciones farmacéuticas de anticuerpos biespecíficos. La presente descripción también se refiere a anticuerpos biespecíficos en los que las regiones constantes de la cadena pesada se han modificado, a las composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos biespecíficos modificados, y a los métodos para producir las composiciones farmacéuticas de anticuerpos biespecíficos. Más específicamente, la presente invención se refiere a lo siguiente:

35 1. Un método para producir un anticuerpo multiespecífico que comprende un primer polipéptido y un segundo polipéptido cuyos puntos isoelectrónicos son diferentes, en donde el método comprende los pasos de:

40 (a) modificar ambos o cualquiera de los ácidos nucleicos que codifican los restos de aminoácidos del primer polipéptido y un ácido nucleico que codifica los restos de aminoácidos del segundo polipéptido, de manera que la diferencia entre el punto isoelectrónico del primer polipéptido y el del segundo polipéptido será 0,5 o más, en donde la(s) posición(es) modificada(s) de dicho ácido nucleico se seleccionan del grupo que consiste en (i) y (ii) a continuación:

45 (i) al menos una de las posiciones 1, 3, 5, 8, 10, 12, 13, 15, 16, 19, 23, 25, 26, 39, 42, 43, 44, 46, 68, 71, 72, 73, 75, 76, 81, 82b, 83, 85, 86, 97, 105, 108, 110 y 112, numeración Kabat, en la región variable de la cadena H, y

50 (ii) al menos una de las posiciones 137, 196, 203, 214, 217, 233, 268, 274, 276, 297, 355, 392, 419 y 435, numeración de la UE, en la región constante de la cadena H;

(b) cultivar células hospedadoras para expresar los ácidos nucleicos; y

(c) recuperar el anticuerpo multiespecífico del cultivo de la célula huésped.

, usando la diferencia en el punto isoeléctrico, en donde el primer polipéptido y el segundo polipéptido comprenden una región variable de cadena pesada.

5 2. Un método para purificar un anticuerpo multiespecífico que comprende un primer polipéptido y un segundo polipéptido cuyos puntos isoeléctricos son diferentes, en donde el método comprende los pasos de:

10 (a) modificar ambos o cualquiera de un ácido nucleico que codifica los residuos de aminoácidos del primer polipéptido y un ácido nucleico que codifica los residuos de aminoácidos del segundo polipéptido, de modo que la diferencia entre el punto isoeléctrico del primer polipéptido y el del segundo polipéptido será 0,5 o más, en donde la (s) posición (es) modificada (s) de dicho ácido nucleico se selecciona (n) del grupo que consiste en (i) y (ii) a continuación:

(i) al menos una de las posiciones 1, 3, 5, 8, 10, 12, 13, 15, 16, 19, 23, 25, 26, 39, 42, 43, 44, 46, 68, 71, 72, 73, 75, 76, 81, 82b, 83, 85, 86, 97, 105, 108, 110 y 112, numeración Kabat, en la región variable de la cadena H, y

(ii) al menos una de las posiciones 137, 196, 203, 214, 217, 233, 268, 274, 276, 297, 355, 392, 419 y 435, numeración de la UE, en la región constante de la cadena H;

15 (b) cultivar células hospedadoras para expresar los ácidos nucleicos; y

(c) purificar dicho anticuerpo multiespecífico a partir del cultivo de la célula huésped por cromatografía estándar, usando la diferencia en el punto isoeléctrico, en donde el primer polipéptido y el segundo polipéptido comprenden una región variable de cadena pesada.

20 3. El método del punto 1 ó 2, en el que la modificación de la etapa (a) modifica los ácidos nucleicos de modo que los picos del homomultímero del primer polipéptido, el homomultímero del segundo polipéptido y el heteromultímero del primer polipéptido y el segundo polipéptido se separarán en un análisis de cromatografía estándar.

4. El método de uno cualquiera de los puntos 1 a 3, en el que el anticuerpo multiespecífico comprende un tercer polipéptido que comprende una región variable de cadena ligera, y en donde el primer polipéptido y el segundo polipéptido forman cada uno un multímero con dicho tercer polipéptido.

25 5. El método de uno cualquiera de los puntos 1 a 4, en el que las regiones constantes de cadena pesada comprendidas en el primer polipéptido y el segundo polipéptido son regiones constantes de cadena pesada cuyos puntos isoeléctricos son diferentes entre sí.

6. El método de uno cualquiera de los puntos 1 a 5, en el que las regiones constantes de cadena pesada con diferentes puntos isoeléctricos son IgG1 e IgG4, o IgG1 e IgG2.

30 7. El método de uno cualquiera de los puntos 1 a 6, en el que el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo biespecífico.

Breve descripción de los dibujos

35 La figura 1 representa el resultado de evaluar la actividad de coagulación de un anticuerpo biespecífico humanizado (A69 humanizado (hA69a)/B26 humanizado (hB26-F123e4)/BBA humanizado (hAL-F123j4)). El resultado muestra que el anticuerpo biespecífico humanizado tiene una actividad de coagulación igual o mayor que la de un anticuerpo biespecífico quimérico.

40 La figura 2 representa el resultado del modelado de anticuerpos para la región variable de la cadena H humanizada A69 (hA69a) con BBA humanizado (hAL-F123j4) y la región variable de la cadena H B26 humanizada (hB26-F123e4) con BBA humanizado (hAL-F123j4). Se enfatizan las cadenas laterales de los aminoácidos cuyas cargas superficiales pueden modificarse. La numeración se adoptó a partir de números de secuencia en la base de datos de Kabat (Kabat EA et al. 1991. Sequences of Proteins of Immunological Interest. NIH).

45 La figura 3 es una fotografía que representa el resultado del análisis de enfoque isoeléctrico del homodímero de anticuerpo A69 humanizado no modificado, homodímeros de anticuerpo A69 humanizados que tienen una región variable modificada, el homodímero de anticuerpo B26 humanizado no modificado y homodímeros de anticuerpo B26 humanizado que tienen una región variable modificada. El resultado confirma que los puntos isoeléctricos son alterados por las modificaciones.

La Fig. 4 representa el resultado del análisis cromatográfico de intercambio catiónico de homodímeros de anticuerpos A69 humanizados que tienen una región variable modificada. El resultado confirma que los picos de los anticuerpos modificados se han cambiado en comparación con el del anticuerpo no modificado.

50 La Fig. 5 representa el resultado del análisis cromatográfico de intercambio catiónico de homodímeros de anticuerpos B26 humanizados que tienen una región variable modificada. El resultado confirma que los picos de los

anticuerpos modificados se han cambiado en comparación con el del anticuerpo no modificado.

5 La Fig. 6 representa el resultado de evaluar la actividad de coagulación de anticuerpos biespecíficos humanizados que tienen una región variable modificada (se ha aplicado la técnica del botón en hojal a las regiones constantes de la cadena H). El resultado muestra que los anticuerpos modificados tienen una actividad de coagulación equivalente a la del anticuerpo no modificado.

La figura 7 es una fotografía que representa el resultado del análisis de enfoque isoeléctrico de un homodímero de anticuerpo A69 humanizado que tiene una región variable modificada (CDR). Los resultados confirman que la banda del anticuerpo modificado ha sido desplazada en comparación con la del anticuerpo no modificado.

10 La Fig. 8 representa el resultado de evaluar la actividad de unión del homodímero de anticuerpo A69 humanizado que tiene una región variable modificada (CDR) hacia el Factor IXa del antígeno. El resultado muestra que el anticuerpo modificado tiene una actividad de unión equivalente a la del anticuerpo no modificado.

15 La Fig. 9 representa el resultado del análisis cromatográfico de intercambio catiónico de un anticuerpo biespecífico humanizado no modificado preparado usando la cadena A69-H humanizada no modificada hA69a, la cadena B26-H humanizada no modificada hB26-F123e4 y la cadena humanizada BBA-L hAL-F123j4. Como resultado, los dos tipos de homodímeros y el anticuerpo biespecífico se eluyeron como un único pico sin separación.

20 La Fig. 10 representa el resultado del análisis cromatográfico de intercambio catiónico de un anticuerpo PF biespecífico humanizado preparado usando hA69-PF, una forma modificada de la cadena A69-H humanizada; hA26-PF, una forma modificada de la cadena B26-H humanizada; y hAL-s8, la cadena BBA-L humanizada. Como resultado, los dos tipos de homodímeros y el anticuerpo biespecífico se separaron individualmente y se eluyeron como tres picos en el siguiente orden: homodímero thA69-PF, anticuerpo PF biespecífico humanizado y homodímero hB26-PF.

La figura 11 es una fotografía que representa el resultado del análisis de enfoque isoeléctrico de homodímeros PF de anticuerpo A69 humanizado purificados, homodímeros de anticuerpos B26-PF humanizados y anticuerpos PF biespecíficos humanizados. El resultado confirma que el anticuerpo biespecífico de interés se ha purificado.

25 La Fig. 12 representa el resultado de evaluar la actividad de coagulación de anticuerpos PF biespecíficos humanizados purificados (la región constante de la cadena H es de tipo silvestre). El resultado muestra que los anticuerpos purificados tienen una actividad de coagulación equivalente a la del anticuerpo biespecífico KiH, cuya región constante de cadena H se produjo mediante la técnica del botón en hojal.

30 La figura 13 representa un cromatograma obtenido cuando el anticuerpo biespecífico se purificó a partir de un sobrenadante de cultivo que contenía tres tipos de anticuerpos, el homodímero de anticuerpo A69 humanizado, homodímero de anticuerpo B26 humanizado y anticuerpo biespecífico humanizado, usando una columna preparativa estándar.

35 La Fig. 14 representa el resultado de evaluar la actividad de coagulación de un anticuerpo biespecífico humanizado (la región constante de la cadena H es de tipo natural) purificado usando una columna preparativa estándar. Los resultados muestran que el anticuerpo biespecífico humanizado tiene una actividad de coagulación equivalente a la del anticuerpo PF biespecífico humanizado.

40 La Fig. 15 es una fotografía que representa el resultado del análisis de enfoque isoeléctrico de anticuerpos de PM-1 no modificados, sustituidos con IgG2 y sustituidos con IgG4. El resultado confirma que las modificaciones alteran el punto isoeléctrico del anticuerpo. A: anticuerpo PM-1 humanizado no modificado; B: anticuerpo PM-1 humanizado sustituido con IgG2; C: anticuerpo PM-1 humanizado sustituido con IgG4.

45 La figura 16 es una fotografía que representa el resultado del análisis de enfoque isoeléctrico del anticuerpo PM-1 humanizado no modificado coexpresado con el anticuerpo PM-1 humanizado sustituido con IgG2 o sustituido con IgG4. El resultado muestra que los diferentes anticuerpos de isotipo y los anticuerpos híbridos de isotipo están separados según sus diferencias de pI. A: coexpresión del anticuerpo PM-1 humanizado no modificado y el anticuerpo PM-1 humanizado sustituido con IgG2; B: coexpresión del anticuerpo PM-1 humanizado no modificado y el anticuerpo PM-1 humanizado sustituido con IgG4; C: producto purificado del anticuerpo PM-1 humanizado (a granel).

50 La figura 17 representa el resultado del análisis cromatográfico de intercambio catiónico de anticuerpos de PM-1 humanizados no modificados expresados individualmente, sustituidos con IgG2 y sustituidos con IgG4. El resultado confirma que los picos de los anticuerpos modificados se han cambiado en comparación con el del anticuerpo no modificado.

55 La Fig. 18 representa el resultado del análisis cromatográfico de intercambio catiónico del anticuerpo PM-1 humanizado no modificado coexpresado con el anticuerpo PM-1 humanizado sustituido con IgG2 o sustituido con IgG4. Como resultado, los homodímeros de cada isotipo y el heterodímero se observaron como tres picos principales en la combinación del anticuerpo PM-1 humanizado no modificado y el anticuerpo PM-1 humanizado

sustituido con IgG2, y en la combinación del anticuerpo PM-1 humanizado no modificado y el anticuerpo PM-1 humanizado sustituido con IgG4. A: coexpresión del anticuerpo PM-1 humanizado no modificado y el anticuerpo PM-1 humanizado sustituido con IgG2; B: coexpresión del anticuerpo PM-1 humanizado no modificado y el anticuerpo PM-1 humanizado sustituido con IgG4.

5 La Fig. 19 representa el resultado de la purificación de los homodímeros y el heterodímero mediante cromatografía de intercambio catiónico a partir de la coexpresión del anticuerpo PM-1 humanizado no modificado y el anticuerpo PM-1 humanizado sustituido con IgG4. Como resultado, se eluyeron tres picos en el siguiente orden: homodímero de anticuerpo PM-1 humanizado sustituido con IgG4, anticuerpo híbrido PM-1 humanizado no modificado sustituido con PM-1/IgG4 y homodímero de anticuerpo PM-1 humanizado no modificado. Estos picos fueron fraccionados. Las flechas indican los intervalos aproximados de fraccionamiento.

La figura 20 representa el resultado de la recromatografía del homodímero de anticuerpo PM-1 humanizado no modificado, anticuerpo híbrido PM-1 humanizado no modificado sustituido con PM-1/IgG4 y homodímero de anticuerpo PM-1 humanizado sustituido con IgG4, que se purificaron por cromatografía de intercambio catiónico. Como resultado, se confirmó que el anticuerpo híbrido isotipo se purificó.

15 La figura 21 es una fotografía que representa el resultado del análisis de enfoque isoeléctrico del homodímero de anticuerpo PM-1 humanizado no modificado, anticuerpo híbrido PM-1 humanizado no modificado/IgG4-sustituido y homodímero de anticuerpo PM-1 humanizado IgG4-sustituido, que se purificaron mediante cromatografía de intercambio catiónico. Como resultado, se confirmó que el anticuerpo híbrido isotipo de interés se purificaba. A: coexpresión del anticuerpo PM-1 humanizado no modificado y el anticuerpo PM-1 humanizado sustituido con IgG4; B: fracción del anticuerpo PM-1 humanizado no modificado; C: fracción del anticuerpo híbrido PM-1 humanizado PM-1/IgG4-sustituido humanizado no modificado; D: fracción del anticuerpo PM-1 humanizado sustituido con IgG4.

La figura 22 representa el resultado de evaluar la actividad neutralizante de IL-6 humana del homodímero de anticuerpo PM-1 humanizado no modificado, anticuerpo híbrido PM-1 humanizado sustituido con PM-1/IgG4 no modificado humanizado y homodímero del anticuerpo PM-1 humanizado sustituido con IgG4, que se purificaron por cromatografía de intercambio catiónico. Como resultado, todos los anticuerpos mostraron una actividad neutralizante equivalente a la del anticuerpo PM-1 humanizado purificado. A y B: línea celular BaF3 que expresa gp130 humana; C y D: línea celular BaF3 que coexpresa gp130 humano y receptor de IL-6 humano. Círculo relleno (*): producto purificado del anticuerpo PM-1 humanizado (a granel); cuadrado abierto (\square): anticuerpo PM-1 humanizado no modificado; triángulo abierto (Δ): anticuerpo PM-1 humanizado sustituido con IgG4; x: anticuerpo híbrido PM-1 humanizado sustituido con PM-1/IgG4 humanizado no modificado.

El mejor modo para llevar a cabo la invención

La presente invención se refiere a métodos para modificar anticuerpos para la producción de anticuerpos multiespecíficos. Una realización preferida de los métodos de producción de la presente invención es un método que comprende modificar uno o ambos de un ácido nucleico que codifica los residuos de aminoácidos de un primer polipéptido y un ácido nucleico que codifica los residuos de aminoácidos de un segundo polipéptido, de modo que los puntos isoeléctricos del primer polipéptido y el segundo polipéptido serán diferentes, como se define en las reivindicaciones.

Es decir, se pueden producir anticuerpos multiespecíficos basándose en las diferencias en el punto isoeléctrico (pI), y la diferencia se puede introducir en los polipéptidos alterando las cargas de los residuos de aminoácidos en el primer polipéptido y el segundo polipéptido.

El método descrito en este documento comprende las siguientes etapas de:

(a) modificar ambos o cualquiera de los ácidos nucleicos que codifican los residuos de aminoácidos del primer polipéptido y un ácido nucleico que codifica los residuos de aminoácidos del segundo polipéptido, de modo que la diferencia entre los puntos isoeléctricos del primer polipéptido y el segundo polipéptido se incrementará;

45 (b) cultivar células hospedadoras para expresar los ácidos nucleicos; y

(c) recuperar un anticuerpo multiespecífico del cultivo de la célula huésped.

En la presente invención, los "polipéptidos" generalmente se refieren a péptidos y proteínas cuya longitud es de aproximadamente diez aminoácidos o más. Los polipéptidos se derivan generalmente de organismos, pero no están particularmente limitados a los mismos, y, por ejemplo, pueden estar compuestos por una secuencia diseñada artificialmente. También pueden ser polipéptidos derivados naturalmente, polipéptidos sintéticos, polipéptidos recombinantes, o similares. Adicionalmente, los fragmentos de los polipéptidos mencionados anteriormente también se incluyen en los polipéptidos de la presente descripción.

En la presente invención, la frase "la diferencia entre los puntos isoeléctricos de los polipéptidos" significa que los puntos isoeléctricos de dos o más polipéptidos se vuelven desiguales y es 0,5 o más al modificar las cargas de los aminoácidos sobre la superficie de cada polipéptido. La diferencia en los puntos isoeléctricos se puede observar, por

ejemplo, mediante el uso de una técnica tal como el enfoque isoeléctrico. En la presente invención, los puntos isoeléctricos se modifican preferiblemente sin alterar la estructura y/o la función (actividad) de los polipéptidos.

Es decir, se describe un método para producir un anticuerpo multiespecífico que comprende un primer polipéptido y un segundo polipéptido, en donde el método comprende las etapas de:

- 5 (a) modificar ambos o cualquiera de los ácidos nucleicos que codifican los residuos de aminoácidos del primer polipéptido y un ácido nucleico que codifica los residuos de aminoácidos del segundo polipéptido, de modo que la diferencia entre el punto isoeléctrico del primer polipéptido y el del segundo polipéptido será de 0,5 o más, 0,7 o más, o 0,9 o más;

(b) cultivar células hospedadoras para expresar los ácidos nucleicos; y

- 10 (c) recuperar el anticuerpo multiespecífico del cultivo de la célula huésped.

Además, la presente invención se refiere a métodos para modificar anticuerpos para la purificación de anticuerpos multiespecíficos. Una realización preferida de los métodos de purificación de la presente invención es un método que comprende la etapa de modificar ambos o cualquiera de un ácido nucleico que codifica los residuos de aminoácidos de un primer polipéptido y un ácido nucleico que codifica los residuos de aminoácidos de un segundo polipéptido, de modo que los puntos isoeléctricos del primer polipéptido y el segundo polipéptido serán diferentes, como se define en las reivindicaciones. Es decir, la diferencia en el punto isoeléctrico (pI) se introduce en los polipéptidos alterando las cargas de los residuos de aminoácidos del primer polipéptido y las del segundo polipéptido. Por lo tanto, los anticuerpos multiespecíficos se pueden purificar usando esta diferencia en los puntos isoeléctricos. Un método de purificación descrito en este documento comprende las siguientes etapas de:

- 20 (a) modificar ambos o cualquiera de un ácido nucleico que codifica los residuos de aminoácidos del primer polipéptido y un ácido nucleico que codifica los residuos de aminoácidos del segundo polipéptido, de modo que la diferencia entre el punto isoeléctrico del primer polipéptido y el segundo polipéptido aumentará;

(b) cultivar células hospedadoras para expresar los ácidos nucleicos; y

(c) purificar dicho anticuerpo multiespecífico del cultivo de la célula huésped mediante cromatografía estándar.

- 25 Los métodos para producir anticuerpos multiespecíficos que comprenden las etapas de purificación de los métodos de purificación mencionados anteriormente también se incluyen en la presente invención.

Los ácidos nucleicos de la presente descripción generalmente se clonan (insertan) en vectores adecuados y luego se introducen en células hospedadoras. Estos vectores no están particularmente limitados siempre que los ácidos nucleicos insertados se mantengan de forma estable. Por ejemplo, cuando se usa *Escherichia coli* como huésped, los vectores de clonación pueden ser vectores pBluescript (Stratagene) y similares, aunque se pueden usar varios vectores comercialmente disponibles. Cuando se usan vectores con el fin de producir los anticuerpos multiespecíficos (polipéptidos) de la presente descripción, los vectores de expresión son particularmente útiles. No existe una limitación particular en los vectores de expresión, siempre que puedan expresar polipéptidos en tubos de ensayo, *E. coli*, células cultivadas u organismos individuales. Por ejemplo, los vectores pueden incluir vectores pBEST (Promega) para la expresión en tubos de ensayo, vectores pET (Invitrogen) en *E. coli*, el vector pME18S-FL3 (número de entrada de GenBank AB009864) en células cultivadas, y el vector pME18S (Mol. Cell Biol. 8: 466-472 (1998)) en organismos individuales. La inserción de los ADN de la presente descripción en vectores se puede realizar, por ejemplo, mediante métodos estándar tales como reacciones de ligasa usando sitios de enzimas de restricción (Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel y col. (1987) Ed. John Wiley & Sons. Sección 11.4-11.11).

No existe una limitación particular sobre las células hospedadoras mencionadas anteriormente, y se usan varias células hospedadoras dependiendo del propósito. Las células usadas para expresar polipéptidos incluyen las células bacterianas (por ejemplo, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *E. coli*, *Streptomyces* y *Bacillus subtilis*), células fúngicas (por ejemplo, levadura y *Aspergillus*), células de insecto (por ejemplo, *Drosophila S2* y *Spodoptera SF9*), células animales (por ejemplo, CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, HEK293, células de melanoma Bowes) y células vegetales. Los vectores pueden introducirse en células hospedadoras usando métodos conocidos, tales como el método de precipitación con fosfato de calcio, el método de electroporación (Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel y col. (1987) Ed. John Wiley & Sons. Sección 9.1-9.9), método de lipofección y método de microinyección.

50 Para secretar polipéptidos expresados en células hospedadoras en el lumen del retículo endoplásmico, el espacio periplásmico o el entorno extracelular, se pueden incorporar señales de secreción adecuadas en los polipéptidos de interés. Estas señales pueden ser intrínsecas o ajenas a los polipéptidos de interés.

55 Cuando los polipéptidos de la presente descripción se secretan en medios de cultivo, los anticuerpos multiespecíficos (polipéptidos) producidos por los métodos mencionados anteriormente pueden recuperarse recuperando los medios. Cuando los polipéptidos de la presente descripción se producen dentro de las células,

primero se lisan las células, y luego estos polipéptidos se recuperan.

5 Los polipéptidos de la presente descripción pueden recuperarse y purificarse a partir de cultivos de células recombinantes usando métodos conocidos, que incluyen sulfato de amonio o precipitación con etanol, extracción ácida, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de afinidad, cromatografía con hidroxiapatita y cromatografía con lectina.

Además, la presente descripción se refiere a composiciones (agentes) que comprenden un anticuerpo multiespecífico descrito en este documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En la presente descripción, "composiciones farmacéuticas" generalmente se refiere a agentes para tratar o prevenir, o probar y diagnosticar enfermedades.

10 Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción se pueden formular mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, tales composiciones farmacéuticas pueden usarse por vía parenteral en forma de inyecciones, que son soluciones o suspensiones estériles preparadas con agua u otro líquido farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, tales composiciones se pueden formular combinando apropiadamente con un vehículo o medio farmacéuticamente aceptable, específicamente, agua estéril, solución salina fisiológica, aceite vegetal, emulsionante, suspensión, agente tensioactivo, estabilizante, agente aromatizante, excipiente, 15 vehículo, conservante, aglutinante o tal, y mezclado en una forma de dosis unitaria que cumpla con los requisitos generalmente aceptados para la preparación de productos farmacéuticos. En tales preparaciones, la cantidad de ingrediente activo se ajusta de tal manera que se obtiene una cantidad adecuada dentro de un intervalo especificado.

20 Las composiciones estériles para inyección pueden formularse usando vehículos tales como agua destilada para inyección, de acuerdo con los protocolos estándares para la formulación.

25 Las soluciones acuosas para la inyección incluyen, por ejemplo, solución salina fisiológica y soluciones isotónicas que contienen glucosa u otros adyuvantes (por ejemplo, D-sorbitol, D-manosa, D-manitol y cloruro de sodio). Los solubilizantes apropiados, por ejemplo, alcoholes (etanol y similares), polialcoholes (propilenglicol, polietilenglicol, y similares), tensioactivos no iónicos (polisorbato 80TM, HCO-50, y similares) se pueden usar en combinación.

30 Los aceites incluyen aceites de sésamo y de soja. El benzoato de bencilo y/o el alcohol bencílico se pueden usar como solubilizantes en combinación. Se pueden combinar también tampones (por ejemplo, tampón de fosfato y tampón de acetato de sodio), agentes calmantes (por ejemplo, hidrocloreto de procaína), estabilizantes (por ejemplo, alcohol bencílico y fenol) y/o antioxidantes. Las inyecciones preparadas generalmente se llenan en ampollas apropiadas.

Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción se administran preferiblemente por vía parenteral. Por ejemplo, las composiciones pueden estar en forma de inyecciones, agentes transnasales, agentes transpulmonares o agentes transdérmicos. Por ejemplo, tales composiciones se pueden administrar sistémica o localmente mediante inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, inyección subcutánea, o similares.

35 Los métodos de administración se pueden seleccionar de manera apropiada teniendo en cuenta la edad y los síntomas del paciente. La dosificación de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o un polinucleótido que codifica un anticuerpo puede establecerse, por ejemplo, dentro del intervalo de 0,0001 a 1000 mg/kg de peso para cada administración. Alternativamente, la dosificación puede ser, por ejemplo, de 0,001 a 100.000 mg por paciente. Sin embargo, la dosificación no está necesariamente limitada a los intervalos descritos 40 anteriormente. Aunque la dosificación y el método de administración varían dependiendo del peso, la edad, los síntomas del paciente y similares, los expertos en la técnica pueden seleccionar la dosificación y los métodos de administración apropiados teniendo en cuenta los factores descritos anteriormente.

Los anticuerpos multiespecíficos de la presente descripción se pueden formular combinando con otros componentes farmacéuticos según sea necesario.

45 La presente descripción también describe ácidos nucleicos que codifican polipéptidos que constituyen los anticuerpos multiespecíficos de la presente descripción. Además, también se describen vectores que llevan a estos ácidos nucleicos.

50 La presente descripción también proporciona células hospedadoras que llevan a los ácidos nucleicos descritos anteriormente. Las células huésped no están particularmente limitadas e incluyen, por ejemplo, E. coli y varias células animales. Las células huésped pueden usarse, por ejemplo, como un sistema de producción para producir y expresar los anticuerpos o polipéptidos de la presente descripción. Existen sistemas in vitro y sistemas in vivo para la producción de polipéptidos. Los sistemas de producción que usan células eucariotas o células procariotas son ejemplos de un sistema de producción in vitro.

55 Las células eucariotas que pueden usarse como células hospedadoras incluyen, por ejemplo, células animales, células vegetales y células fúngicas. Las células animales incluyen: células de mamíferos, por ejemplo, CHO (J. Exp.

Med. (1995)108, 945), COS, HEK293, 3T3, mieloma, BHK (riñón de cría de hámster), HeLa, y Vero; células de anfibios tales como oocitos de *Xenopus laevis* (Valle, et al., *Nature* (1981) 291: 338-340); y células de insectos tales como Sf9, Sf21 y Tn5. Para expresar los anticuerpos de la presente descripción, se pueden usar adecuadamente células CHO-DG44, CHO-DX11B, COS7, células HEK293 y células BHK. De las células animales, se pueden usar las células CHO para la expresión a gran escala. Se pueden introducir vectores en una célula huésped mediante, por ejemplo, métodos de fosfato cálcico, métodos DEAE-dextrano, métodos que usan liposomas catiónicos DOTAP (Boehringer-Mannheim), métodos de electroporación o métodos de lipofección.

Se sabe que las células vegetales tales como las células derivadas de *Nicotiana tabacum* y las células de *Lemna minor* son sistemas de producción de proteínas, y estas células se pueden usar para producir los anticuerpos de la presente descripción mediante métodos que cultivan callos a partir de estas células. Los sistemas de expresión de proteínas que usan células fúngicas, incluyendo células de levadura, por ejemplo, células del género *Saccharomyces* (*Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pombe*, etc.) y células de hongos filamentosos, por ejemplo, el género *Aspergillus* (*Aspergillus niger*, etc.) son conocidos, y estas células se pueden usar como un huésped para producir los anticuerpos de la presente descripción.

Cuando se usan células procarióticas, los sistemas de producción que usan células bacterianas están disponibles. Sistemas de producción que usan células bacterianas incluyendo *Bacillus subtilis* así como *E. coli* anteriormente citados son conocidos, y pueden usarse para producir los anticuerpos de la presente descripción.

Cuando se produce un anticuerpo usando una célula hospedadora de la presente descripción, se puede expresar un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la presente descripción cultivando la célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende el polinucleótido. El cultivo se puede realizar de acuerdo con métodos conocidos. Por ejemplo, cuando se usan células animales como huésped, se puede usar DMEM, MEM, RPMI 1640 o IMDM como medio de cultivo. El medio de cultivo se puede usar con soluciones de suplementos de suero tales como FBS o suero de ternera fetal (FCS). Alternativamente, las células se pueden cultivar en cultivos libres de suero. El pH puede ser de aproximadamente 6 a 8 durante el transcurso del cultivo. La incubación se lleva a cabo típicamente a aproximadamente 30 a 40°C durante aproximadamente 15 a 200 horas. El medio se intercambia, se airea o agita según sea necesario.

Por otro lado, los sistemas para producir polipéptidos in vivo incluyen, por ejemplo, aquellos que usan animales y aquellos que usan plantas. Se introduce un polinucleótido de interés en un animal o planta para producir el polipéptido en el cuerpo del animal o la planta, y luego se recupera el polipéptido. El "huésped" de la presente descripción incluye tales animales y plantas.

Cuando se utilizan animales, los sistemas de producción que usan mamíferos o insectos están disponibles. Se pueden usar mamíferos tales como cabra, cerdo, oveja, ratón y ganado (Vicki Glaser, *SPECTRUM Biotechnology Applications* (1993)). Cuando se usan mamíferos, se pueden usar animales transgénicos.

Por ejemplo, se puede preparar un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la presente descripción como un gen de fusión con un gen que codifica un polipéptido específicamente producido en la leche, tal como la beta-caseína de cabra. A continuación, se inyectan fragmentos de polinucleótidos que contienen este gen de fusión en embriones de cabra, que luego se vuelven a introducir en cabras hembras. El anticuerpo de interés se puede obtener de la leche producida por las cabras transgénicas, que nacen de las cabras que recibieron los embriones, o por sus crías. Se pueden administrar hormonas apropiadas a las cabras transgénicas para aumentar el volumen de leche que contiene el anticuerpo producido por las cabras transgénicas (Ebert et al., *Bio/Technology* (1994) 12: 699-702).

Se pueden usar insectos tales como gusanos de seda para producir los anticuerpos de la presente descripción. Cuando se usan gusanos de seda, pueden usarse baculovirus que portan un polinucleótido que codifica un anticuerpo de interés para infectar los gusanos de seda, de modo que el anticuerpo de interés se puede obtener de los fluidos corporales de estos gusanos de seda (Susumu et al., *Nature* (1985) 315: 592-594).

Las plantas usadas para producir los anticuerpos de la presente invención incluyen, por ejemplo, el tabaco. Cuando se usa tabaco, se inserta un polinucleótido que codifica un anticuerpo de interés en un vector de expresión de planta, por ejemplo, pMON 530, y luego el vector se introduce en una bacteria tal como *Agrobacterium tumefaciens*. Las bacterias se usan luego para infectar el tabaco, tal como *Nicotiana tabacum*, y el anticuerpo deseado puede obtenerse a partir de las hojas del tabaco (Ma et al., *Eur. J. Immunol.* (1994)24: 131-138). Alternativamente, se pueden usar las mismas bacterias para infectar a *Lemna minor*, y después de la clonación, el anticuerpo deseado se puede obtener a partir de las células de *Lemna minor* (Cox K.M. et al., *Nat. Biotechnol.* 2006 Dic; 24 (12): 1591 - 1597).

El anticuerpo así obtenido se puede aislar desde el interior o el exterior (como el medio y la leche) de las células huésped, y se puede purificar como un anticuerpo sustancialmente puro y homogéneo. Los métodos usados para separar y purificar un anticuerpo no están limitados, y se pueden aplicar los métodos usados en la purificación de los polipéptidos estándar. Los anticuerpos se pueden aislar y purificar seleccionando una combinación apropiada de, por ejemplo, columnas cromatográficas, filtración, ultrafiltración, precipitación salina, precipitación con disolvente, extracción con disolvente, destilación, inmunoprecipitación, electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, enfoque

isoeléctrico, diálisis, recristalización, y similares.

5 Las cromatografías incluyen, por ejemplo, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, filtración en gel, cromatografía de fase inversa y cromatografía de adsorción (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak y otros, (1996) Cold Spring Harbor Laboratory Press). Estas cromatografías pueden llevarse a cabo usando cromatografía en fase líquida tal como HPLC y FPLC. Los ejemplos de columnas para la cromatografía de afinidad incluyen columnas de proteína A y columnas de proteína G. Los ejemplos de las columnas que usan proteína A incluyen Hyper D, POROS y Sepharose F. F. (Farmacia).

10 Un anticuerpo puede modificarse arbitrariamente, y los péptidos pueden eliminarse parcialmente del anticuerpo por tratamiento con una enzima modificadora de proteínas apropiada antes o después de la purificación del anticuerpo, según sea necesario. Dichas enzimas modificadoras de proteínas incluyen, por ejemplo, tripsinas, quimotripsinas, lisil endopeptidasas, proteínas quinasas y glucosidasas.

15 Otra realización preferida de la presente invención incluye un método para producir un anticuerpo multiespecífico, en el que el método comprende las etapas de cultivar las células hospedadoras como se describió anteriormente y recuperar el polipéptido del cultivo celular, como se define en las reivindicaciones.

20 En la presente invención, la expresión "anticuerpo multiespecífico" se refiere a un anticuerpo que se puede unir específicamente a al menos dos tipos diferentes de antígenos. Los ejemplos de anticuerpos multiespecíficos obtenidos mediante los métodos de producción o métodos de purificación de la presente invención incluyen anticuerpos biespecíficos (BsAbs) (también denominados anticuerpos de doble especificidad) que se pueden unir específicamente a dos antígenos.

25 En la presente invención, la expresión "antígenos diferentes" no significa necesariamente que los propios antígenos sean diferentes, y puede significar que los epítomos sean diferentes. Por lo tanto, por ejemplo, epítomos diferentes dentro de una sola molécula también se incluyen en los "diferentes antígenos" de la presente descripción. En la presente invención, dos anticuerpos que reconocen diferentes epítomos dentro de una sola molécula se consideran anticuerpos que reconocen diferentes antígenos.

Los anticuerpos multiespecíficos descritos en este documento son anticuerpos que tienen especificidad por dos o más antígenos diferentes, o moléculas que comprenden fragmentos de tales anticuerpos.

30 En los métodos anteriormente mencionados de la presente invención, la frase "modificación de ácidos nucleicos" comprende la modificación de ácidos nucleicos que da como resultado picos separados de un primer polipéptido y un segundo polipéptido mediante análisis de cromatografía estándar.

35 En los métodos de la presente invención, la frase "modificación de ácidos nucleicos" se refiere a la modificación de ácidos nucleicos que corresponden a los residuos de aminoácidos que se introducen por la "modificación" descrita en este documento. Más específicamente, la frase se refiere a la alteración de ácidos nucleicos que codifican los residuos de aminoácidos originales (antes de la modificación) en ácidos nucleicos que codifican residuos de aminoácidos que se introducen por la modificación.

40 Usualmente, la frase significa manipulación génica o mutagénesis que modifica los ácidos nucleicos originales insertando, eliminando o sustituyendo al menos un nucleótido, para producir un codón que codifica un residuo de aminoácido de interés. Más específicamente, un codón que codifica el residuo de aminoácido original se reemplaza por un codón que codifica el residuo de aminoácido que se va a introducir mediante la modificación. Dichas modificaciones de ácido nucleico pueden llevarse a cabo apropiadamente por los expertos en la técnica usando técnicas conocidas, por ejemplo, mutagénesis dirigida a sitio o mutagénesis por PCR.

Las posiciones de modificación pueden incluir, por ejemplo, (1) residuos de aminoácidos en la superficie de un polipéptido, (2) residuos de aminoácidos en la región variable, preferiblemente en la región FR, y (3) residuos de aminoácidos en la región constante.

45 "Aminoácidos en la superficie de un polipéptido" son aminoácidos cuyas cadenas laterales pueden entrar en contacto con moléculas de disolvente (generalmente moléculas de agua). No es necesario que toda la cadena lateral esté en contacto con moléculas de disolvente, e incluso si solo parte de la cadena lateral está en contacto con moléculas de disolvente, se considera que el aminoácido es un aminoácido en la superficie. Los expertos en la técnica pueden producir modelos de homología de polipéptidos o anticuerpos mediante modelado de homología y tal uso de software comercialmente disponible, y seleccionar de ese modo los residuos apropiados como aminoácidos en la superficie.

50

55 Los expertos en la materia pueden seleccionar adecuadamente los aminoácidos de superficie en la región variable del anticuerpo usando modelos de homología producidos por modelado de homología y similares. Por ejemplo, en la región FR de la cadena H, H1, H3, H5, H8, H10, H12, H13, H15, H16, H19, H23, H25, H26, H39, H42, H43, H44, H46, H68, H71, H72, H73, H75, H76, H81, H82b, H83, H85, H86, H105, H108, H110 y H112 son ejemplos de aminoácidos de superficie. Sin embargo, los aminoácidos de superficie descritos en este documento no están

limitados a los mismos. Para la región CDR de la cadena H, los aminoácidos de superficie se pueden seleccionar de forma similar usando modelos de homología. Por ejemplo, H97 está expuesto a la superficie en la mayoría de los anticuerpos. En la región FR de la cadena L, L1, L3, L7, L8, L9, L11, L16, L17, L18, L20, L22, L38, L39, L41, L42, L43, L45, L46, L49, L57, L60, L63, L65, L66, L68, L69, L70, L74, L76, L77, L79, L80, L81, L85, L100, L103, L105, L106, L107 y L108 son ejemplos de aminoácidos de superficie. Sin embargo, los aminoácidos de superficie descritos en este documento no están limitados a los mismos. Además, para la región CDR de la cadena L, los aminoácidos de superficie se pueden seleccionar de forma similar usando modelos de homología.

Como se describe en este documento, los residuos de aminoácidos en la región variable incluyen residuos de aminoácidos en la región variable de la cadena pesada (VH) o la región variable de la cadena ligera (VL), y pueden ser residuos de aminoácidos en la región marco (FR).

Como se describe en este documento, los aminoácidos expuestos a la superficie distintos de los que están en CDR son, por ejemplo, H10, H12, H23, H39, H43 y H105 en la región FR, pero no están limitados a los mismos.

Como se describe en este documento, los polipéptidos con modificación de ácido nucleico pueden ser un homomultímero de un primer polipéptido, un homomultímero de un segundo polipéptido y un heteromultímero del primer polipéptido y el segundo polipéptido. Como se describe en los ejemplos siguientes, el homomultímero de un primer polipéptido es, por ejemplo, un homodímero de la cadena A69-H humanizada y la cadena BBA-L humanizada; un homomultímero de un segundo polipéptido es, por ejemplo, un homodímero de la cadena B26-H humanizada y la cadena BBA-L humanizada; y un heteromultímero de un primer polipéptido y un segundo polipéptido es, por ejemplo, un heterodímero de la cadena humanizada A69-H, cadena B26-H humanizada y cadena BBA-L humanizada. Sin embargo, los polipéptidos no están limitados a esto.

Los ejemplos de cromatografía estándar incluyen cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía hidrófoba, cromatografía de hidroxapatita, cromatografía de interacción de carga hidrófoba y cromatoenfoque.

En los métodos mencionados anteriormente de la presente invención, un primer polipéptido y un segundo polipéptido comprenden preferiblemente una región variable de cadena pesada (VH). La región variable puede comprender, por ejemplo, una región determinante de la complementariedad (CDR) y una región marco (FR).

El número de restos de aminoácidos que sufren modificación no está particularmente limitado. Sin embargo, por ejemplo, cuando se modifican las regiones variables de un anticuerpo, puede ser que, para la separación de los polipéptidos de interés, el número de residuos de aminoácidos modificados se mantenga al mínimo necesario, para no disminuir la actividad de unión al antígeno o aumentar la antigenicidad del anticuerpo.

Con el fin de no aumentar la antigenicidad, las secuencias de aminoácidos después de la modificación pueden ser secuencias humanas, pero no están limitadas a ellas. Además, para convertir cada una de las FR modificadas (FR1, FR2, FR3 y FR4) en una secuencia humana, las mutaciones pueden introducirse en posiciones distintas a las que se han modificado para la alteración del punto isoeléctrico. El método para reemplazar cada FR con una secuencia humana de esta manera se ha informado en un documento no de patente (Ono K. y col., Mol. Immunol. 1999 Abr; 36 (6): 387 - 395). Además, para alterar el punto isoeléctrico de cada FR, el FR puede modificarse en otro FR humano que tenga un punto isoeléctrico diferente (por ejemplo, FR3 puede reemplazarse con otro FR humano que tenga un punto isoeléctrico inferior). Tal método de humanización se ha mostrado en un documento no de patente (Dall'Acqua WF., Methods. 2005 Mayo; 36 (1): 43 - 60).

Además, cuando la separación de los polipéptidos de interés no se puede lograr mediante ligeras modificaciones en la carga superficial, se puede obtener el anticuerpo multiespecífico deseado repitiendo la modificación de la carga superficial y la evaluación de la separación del polipéptido.

Además, en los métodos anteriormente mencionados de la presente invención, un anticuerpo multiespecífico preferiblemente comprende un tercer polipéptido que comprende una región variable de cadena ligera, y preferiblemente, el primer polipéptido y el segundo polipéptido forman cada uno un multímero con el tercer polipéptido.

Adicionalmente, en los métodos mencionados anteriormente de la presente invención, un primer polipéptido y un segundo polipéptido comprenden preferiblemente una región constante de cadena pesada que preferiblemente genera pI diferentes para el primer polipéptido y el segundo polipéptido. Los ejemplos de tales regiones constantes de cadena pesada incluyen regiones constantes de cadena pesada de anticuerpos que tienen pI diferentes. La diferencia de pI se puede introducir en el primer polipéptido y el segundo polipéptido usando las regiones constantes de cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 que tienen pI que son originalmente diferentes entre sí. Alternativamente, los aminoácidos en las regiones constantes de cadena pesada del primer polipéptido y el segundo polipéptido que causan diferencias en el punto isoeléctrico entre estos isotipos se pueden modificar solos, o en combinación con aminoácidos adyacentes que no tienen ningún efecto sobre los puntos isoeléctricos para generar regiones constantes humanas no de tipo natural, y la diferencia de pI se puede introducir en las dos regiones constantes. Ejemplos de posiciones a modificar para introducir la diferencia de pI en las regiones constantes incluyen, por ejemplo, las posiciones 137, 196, 203, 214, 217, 233, 268, 274, 276, 297, 355, 392, 419 y 435,

numeración UE, en la región constante de la cadena H.

Además, dado que la eliminación de las cadenas de azúcar de una región constante de la cadena pesada genera la diferencia de pI, la posición 297, que es un sitio glicosilado, es otro ejemplo de una posición a modificar para introducir la diferencia de pI.

- 5 Para métodos que comprenden el primer polipéptido mencionado anteriormente y el segundo polipéptido que comprende una región constante de cadena pesada, los métodos que se combinan con el método en el que el primer polipéptido y el segundo polipéptido mencionados anteriormente comprenden una región variable de cadena pesada, y/o el método en que el anticuerpo multiespecífico comprende un tercer polipéptido que comprende una región variable de cadena ligera, y un primer polipéptido y un segundo polipéptido que forma cada uno un multímero con el tercer polipéptido, están incluidos en la presente invención.

También se describen en este documento anticuerpos multiespecíficos producidos por los métodos mencionados anteriormente.

- 15 Además, cuando el primer polipéptido en el anticuerpo multiespecífico proporcionado por la presente invención comprende una región variable de cadena pesada y/o una región constante de cadena pesada, al menos un residuo de aminoácido en la región está hecho para llevar una carga de modo que "los puntos isoeléctricos serán diferentes". Por ejemplo, el(los) residuo(s) de aminoácido se selecciona(n) de residuos de aminoácidos en las posiciones 10, 12, 23, 39, 43 y 105, numeración Kabat, en la región variable de la cadena pesada, o restos de aminoácidos en las posiciones 137, 196, 203, 214, 217, 233, 268, 274, 276, 297, 355, 392, 419 y 435, numeración de la UE, en la región constante de la cadena pesada. De los residuos de aminoácidos del primer polipéptido indicado por la numeración mencionada anteriormente, los residuos de aminoácidos distintos del residuo de aminoácido cargado pueden tener el mismo tipo de carga que el residuo de aminoácido cargado, o pueden estar sin carga, o pueden tener la carga opuesta a la del residuo de aminoácido cargado, siempre que el punto isoeléctrico del primer polipéptido y el del segundo polipéptido sean diferentes.

- 25 Los anticuerpos multiespecíficos mencionados anteriormente de la presente descripción comprenden un segundo polipéptido que puede tener la carga opuesta a la del residuo de aminoácido cargado en el primer polipéptido, o no está cargado. Más específicamente, el segundo polipéptido en los anticuerpos multiespecíficos comprende una región variable de cadena pesada y/o una región constante de cadena pesada, y al menos un residuo de aminoácido en la región no está cargado o tiene la carga opuesta a la del residuo de aminoácido seleccionado para llevar una carga en la región variable de la cadena pesada y/o la región constante de la cadena pesada en el primer polipéptido. El(los) residuo(s) de aminoácido se selecciona(n) de residuos de aminoácidos en las posiciones 10, 12, 23, 39, 43 y 105, numeración Kabat, en la región variable de la cadena pesada, o residuos de aminoácidos en las posiciones 137, 196, 203, 214, 217, 233, 268, 274, 276, 297, 355, 392, 419 y 435, numeración de la UE, en la región constante de la cadena pesada. De los residuos de aminoácidos del segundo polipéptido indicado por la numeración mencionada anteriormente, los residuos de aminoácidos distintos del residuo de aminoácido cargado pueden tener el mismo tipo de carga que el residuo de aminoácido cargado, o pueden estar sin carga, o pueden tener la carga opuesta a la del residuo de aminoácido cargado, siempre que el punto isoeléctrico del primer polipéptido y el del segundo polipéptido sean diferentes.

- 40 Para disminuir los puntos isoeléctricos, es deseable aplicar, por ejemplo, una secuencia IgG2 o IgG4 a la posición 137, una secuencia IgG1, IgG2 o IgG4 a la posición 196, una secuencia IgG2 o IgG4 a la posición 203, una secuencia IgG2 a la posición 214, una secuencia IgG1, IgG3 o IgG4 a la posición 217, una secuencia IgG1, IgG3 o IgG4 en la posición 233, una secuencia IgG4 en la posición 268, una secuencia IgG2, IgG3 o IgG4 en la posición 274, una secuencia IgG1, IgG2 o IgG4 a la posición 276, una secuencia IgG4 a la posición 355, una secuencia IgG3 a la posición 392, una secuencia IgG4 a la posición 419, y una secuencia IgG1, IgG2 o IgG4 a la posición 435. Para aumentar los puntos isoeléctricos, es deseable aplicar, por ejemplo, una secuencia IgG1 o IgG3 a la posición 137, una secuencia IgG3 a la posición 196, la secuencia IgG1 o IgG3 a la posición 203, una secuencia IgG1, IgG3 o IgG4 a la posición 214, una secuencia IgG2 a la posición 217, una secuencia IgG2 a la posición 233, una secuencia IgG1, IgG2 o IgG3 a la posición 268, una secuencia IgG1 a la posición 274, una secuencia IgG3 a la posición 276, una secuencia IgG1, IgG2 o IgG3 a la posición 355, una secuencia IgG1, IgG2 o IgG4 a la posición 392, una secuencia IgG1, IgG2 o IgG3 en la posición 419, y una secuencia IgG3 en la posición 435.

- 50 No es necesario aplicar todas estas secuencias, siempre que haya suficiente diferencia entre los puntos isoeléctricos de las dos cadenas H.

Algunos aminoácidos son conocidos por tener aminoácidos cargados. En general, la lisina (K), la arginina (R) y la histidina (H) se conocen como aminoácidos cargados positivamente (aminoácidos catiónicos). El ácido aspártico (D), el ácido glutámico (E) y otros son conocidos como aminoácidos cargados negativamente (aminoácidos aniónicos).

- 55 Los "restos de aminoácidos cargados" mencionados anteriormente pueden seleccionarse adecuadamente entre restos de aminoácidos incluidos en uno de los grupos (a) y (b) a continuación, pero no están particularmente limitados a los mismos:

(a) ácido glutámico (E), y ácido aspártico (D); y

(b) lisina (K), arginina (R) e histidina (H).

5 Con respecto a los anticuerpos mencionados anteriormente, la frase "que tiene el mismo tipo de carga" significa, por ejemplo, que el resto de aminoácido mencionado anteriormente en la región variable de cadena pesada de acuerdo con la numeración de Kabat y el resto de aminoácido mencionado anteriormente en la región constante de la cadena pesada de acuerdo con la numeración de la UE lleva ambos un residuo de aminoácido incluido en cualquiera de los grupos (a) y (b) mencionados anteriormente.

10 La frase "que tiene la carga opuesta" significa que, por ejemplo, al menos uno de los restos de aminoácidos mencionados anteriormente, por la numeración de Kabat o la numeración de la UE, en el segundo polipéptido que comprende una región variable de cadena pesada y/o una región constante de cadena pesada se incluye en cualquiera de los grupos (a) o (b) mencionados anteriormente, y se incluye su residuo de aminoácido correspondiente en una posición en la región variable de cadena pesada y/o la región constante de cadena pesada comprendida en el primer polipéptido en el otro grupo.

15 Más específicamente, la presente descripción describe anticuerpos multiespecíficos, en los que los restos de aminoácidos mencionados anteriormente que tienen el mismo tipo de carga se seleccionan entre los restos de aminoácidos incluidos en cualquiera de los grupos (a) o (b) mencionados anteriormente.

Si el residuo de aminoácido original (antes de la modificación) ya está cargado, se puede modificar para que sea un residuo de aminoácido sin carga.

20 En la presente invención, un residuo de aminoácido se modifica preferiblemente de modo que el punto isoeléctrico (pI) del primer polipéptido y el del segundo polipéptido serán diferentes. Además, cuando se introducen múltiples residuos de aminoácidos por modificación, pueden incluirse algunos residuos de aminoácidos no cargados en estos residuos de aminoácidos.

25 Además, la presente descripción describe anticuerpos multiespecíficos, en los que la región variable del primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de uno cualquiera de (a1) a (a7) a continuación, en el que la región variable del segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de uno cualquiera de (b1) a (b3) a continuación, y en el que la región variable del tercer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de (c1) o (c2) a continuación:

(a1) SEQ ID NO: 7

(a2) SEQ ID NO: 8

(a3) SEQ ID NO: 9

30 (a4) SEQ ID NO: 10

(a5) SEQ ID NO: 11

(a6) SEQ ID NO: 12

(a7) SEQ ID NO: 13

(b1) SEQ ID NO: 14

35 (b2) SEQ ID NO: 15

(b3) SEQ ID NO: 16

(c1) SEQ ID NO: 17

(c2) SEQ ID NO: 18

40 Las secuencias de aminoácidos anteriores son ejemplos específicos de los aminoácidos sometidos a modificación en la presente invención. Sin embargo, las regiones variables no están limitadas a aquellas que comprenden estos aminoácidos.

45 Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser, por ejemplo, un anticuerpo multiespecífico, en el que la región variable del primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 11, en donde la región variable del segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, y en el que la región variable del tercer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17.

Un anticuerpo multiespecífico puede ser, por ejemplo, un anticuerpo multiespecífico, en donde la región variable del primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 12, en donde la región variable del segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 16, y en el que la región variable del tercer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18.

Un anticuerpo multiespecífico adicional puede ser un anticuerpo multiespecífico, en el que el primer polipéptido y el segundo polipéptido comprenden la región constante de IgG4 humana, y en el que el tercer polipéptido comprende la región constante de kappa humana.

5 En este documento, el término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio, e incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales y anticuerpos mutantes, tales como anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, minicuerpos (incluidos fragmentos de anticuerpos) y anticuerpos multiespecíficos, siempre que muestren una actividad biológica deseada. En este documento, los métodos de modificación de anticuerpos de la presente descripción se pueden usar favorablemente sobre estos anticuerpos cuando se obtienen (producen).

10 Los "anticuerpos" de la presente descripción incluyen anticuerpos en los que la carga de residuos de aminoácidos se ha modificado como se describió anteriormente, y cuyas secuencias de aminoácidos se han modificado adicionalmente mediante sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos. Los anticuerpos también incluyen anticuerpos cuyas secuencias de aminoácidos se han modificado por sustitución, deleción, adición y/o inserción de aminoácidos, o quimerización, humanización, o similares, y en los que la carga de residuos de aminoácidos se ha modificado adicionalmente. En resumen, se pueden realizar modificaciones al mismo tiempo
15 cuando los anticuerpos de ratón se humanizan, o se pueden realizar modificaciones adicionales en anticuerpos humanizados.

20 Las modificaciones de la secuencia de aminoácidos, tales como sustituciones, deleciones, adiciones, y/o inserciones de aminoácidos, y la humanización y la quimerización, se pueden lograr por métodos conocidos por los expertos en la técnica. Cuando los anticuerpos de la presente descripción se preparan como anticuerpos recombinantes, del mismo modo, las secuencias de aminoácidos de las regiones variable y constante del anticuerpo también se pueden modificar por sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos, o quimerización, humanización y similares.

25 Los anticuerpos de la presente descripción se pueden derivar de cualquier animal, tal como un ratón, ser humano, rata, conejo, cabra o camello. Además, pueden modificarse anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos quiméricos y, en particular, anticuerpos modificados que incluyen sustituciones de aminoácidos en su secuencia, tales como anticuerpos humanizados. Los anticuerpos pueden ser cualquier tipo de anticuerpo, tales como productos de modificación de anticuerpos unidos a diversas moléculas, fragmentos de anticuerpos y minicuerpos.

30 Los "anticuerpos quiméricos" son anticuerpos preparados combinando secuencias derivadas de diferentes animales. Un ejemplo es un anticuerpo que tiene regiones variables (V) de cadena pesada y ligera a partir de un anticuerpo de ratón y regiones constantes de cadena pesada y ligera (C) de un anticuerpo humano. Los anticuerpos quiméricos pueden prepararse por métodos conocidos. Para obtener tales anticuerpos quiméricos, por ejemplo, un ADN que codifica una región V de anticuerpo se puede ligar con un ADN que codifica una región C de anticuerpo humano; el producto de ligación resultante puede insertarse en un vector de expresión; y la construcción se puede introducir en un huésped para producir el anticuerpo quimérico.

35 Los "anticuerpos humanizados" también se denominan anticuerpos humanos reconfigurados, y se pueden obtener sustituyendo la región determinante de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo humano por la CDR de un anticuerpo derivado de un mamífero no humano, por ejemplo, un ratón. Los métodos para identificar CDR son conocidos en la técnica (Kabat et al., *Sequence of Proteins of Immunological Interest* (1987), National Institute of Health, Bethesda, Md.; Chothia et al., *Nature* (1989) 342: 877). También se conocen técnicas generales de recombinación genética adecuadas para este fin (véanse la solicitud de patente europea EP 125023 y el documento WO 96/02576). Por ejemplo, la CDR de un anticuerpo de ratón se puede determinar mediante métodos conocidos, y se puede preparar un ADN de manera que codifique un anticuerpo en el que la CDR se ligue con la región marco (FR) de un anticuerpo humano. Entonces puede producirse un anticuerpo humanizado usando un sistema que use vectores de expresión convencionales. Dichos ADN pueden sintetizarse por PCR, usando como cebadores varios oligonucleótidos diseñados para incluir porciones que se solapan con los extremos tanto de las regiones CDR como FR (véase el método descrito en el documento WO 98/13388). Los FR de anticuerpos humanos unidos a través de CDR se seleccionan de manera que las CDR formen un sitio de unión a antígeno adecuado. Si es necesario, los aminoácidos en las FR de una región variable de anticuerpo pueden estar sustituidos de modo que las CDR del anticuerpo humano reconfigurado pueden formar un sitio de unión a antígeno adecuado (Sato, K. y col., *Cancer Res.* (1993)53: 851 - 856). Los residuos de aminoácidos modificables en las FR incluyen porciones que se unen directamente a enlaces no covalentes a través del antígeno (Amit et al., *Science* (1986) 233: 747-53), porciones que tienen algún impacto o efecto sobre la estructura de la CDR (Chothia et al., *J. Mol. Biol.* (1987) 196: 901 - 17), y porciones implicadas en la interacción entre VH y VL (documento EP 239400).

55 Cuando los anticuerpos de la presente descripción son anticuerpos quiméricos o anticuerpos humanizados, las regiones C de estos anticuerpos derivan preferiblemente de anticuerpos humanos. Por ejemplo, C_γ1, C_γ2, C_γ3 y C_γ4 se pueden usar para la cadena H, mientras que C_κ y C_λ se pueden usar para la cadena L. Mientras tanto, la región C del anticuerpo humano se puede modificar según se requiera para mejorar la estabilidad del anticuerpo o la producción. Un anticuerpo quimérico de la presente descripción puede incluir una región variable de un anticuerpo derivado de un mamífero no humano y una región constante de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado puede incluir las CDR de un anticuerpo derivado de un mamífero no humano y regiones FR y C de un anticuerpo
60

humano. Las regiones constantes de los anticuerpos humanos incluyen secuencias de aminoácidos específicas, que varían dependiendo del isotipo del anticuerpo, por ejemplo, IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), IgM, IgA, IgD e IgE. Las regiones constantes usadas para preparar los anticuerpos humanizados de la presente descripción pueden ser las regiones constantes de anticuerpos de cualquier isotipo. Se puede usar una región constante de IgG humana, aunque la descripción no se limita a ésta. Las FR derivadas de un anticuerpo humano, que se usan para preparar los anticuerpos humanizados, no están particularmente limitadas y, por lo tanto, pueden derivarse de un anticuerpo de cualquier isotipo.

Las regiones variables y constantes de los anticuerpos quiméricos o humanizados de la presente descripción se pueden modificar mediante delección, sustitución, inserción y/o adición, siempre que los anticuerpos exhiban la misma especificidad de unión que los anticuerpos originales.

Como se ha atenuado su antigenicidad en el cuerpo humano, se espera que los anticuerpos quiméricos y humanizados que usan secuencias derivadas de humanos encuentren utilidad cuando se administran a humanos con fines terapéuticos o similares.

Además, los minicuerpos son útiles como anticuerpos debido a sus características cinéticas in vivo y a la producción de bajo costo usando *E. coli*, células vegetales, o similares.

Los fragmentos de anticuerpos son un tipo de minicuerpo. El término "minicuerpos" incluye anticuerpos que incluyen un fragmento de anticuerpo como una unidad estructural parcial. Los minicuerpos de la presente descripción no están particularmente limitados por su estructura ni por su método de producción, siempre que tengan actividad de unión a antígeno. Algunos minicuerpos tienen una actividad mayor que la de un anticuerpo completo (Orita et al., *Blood* (2005) 105: 562-566). En este documento, los "fragmentos de anticuerpo" no están particularmente limitados, siempre que sean una porción de un anticuerpo completo (por ejemplo, IgG completa). Sin embargo, los fragmentos de anticuerpo pueden incluir una región variable de cadena pesada (VH) o una región variable de cadena ligera (VL). Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos son: Fab, F(ab')₂, Fab' y Fv. La secuencia de aminoácidos de una VH o VL en un fragmento de anticuerpo puede modificarse mediante sustitución, delección, adición y/o inserción. Además, algunas porciones de una VH y VL pueden eliminarse, siempre que los fragmentos resultantes conserven su capacidad de unión al antígeno. Por ejemplo, de los fragmentos de anticuerpo descritos anteriormente, "Fv" es un fragmento de anticuerpo mínimo compuesto por los sitios completos de reconocimiento y unión de antígeno. "Fv" es un dímero (dímero VH-VL) compuesto de una unidad de VH y una unidad de VL unida fuertemente por enlaces no covalentes. Se forma un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL mediante las tres regiones determinantes complementarias (CDR) de cada región variable. Seis CDR confieren un sitio de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso una región variable (o la mitad de un Fv compuesto por solo tres CDR específicas de antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse a un antígeno, aunque su afinidad es menor que la del sitio de unión completo. Por lo tanto, las moléculas más pequeñas que Fv también se incluyen en el contexto de fragmentos de anticuerpos de la presente descripción. Las regiones variables de un fragmento de anticuerpo también pueden ser quimerizadas o humanizadas.

Los minicuerpos pueden incluir tanto VH como VL. Los ejemplos de minicuerpos adecuados incluyen fragmentos de anticuerpos tales como Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, y scFv (Fv de cadena simple), que se pueden preparar usando fragmentos de anticuerpos (Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1988) 85: 5879 - 83; Pluckthun "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies" vol. 113, Resenbury y Moore (eds.), Springer Verlag, Nueva York, páginas 269-315, (1994)); diacuerpos (Holliger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1993) 90: 6444 - 8; documento EP 404097; documento WO93/11161; Johnson et al., *Method in Enzymology* (1991) 203: 88 - 98; Holliger et al., *Protein Engineering* (1996) 9: 299 - 305; Perisic et al., *Structure* (1994) 2: 1217 - 26; John et al., *Protein Engineering* (1999) 12 (7): 597 - 604; Atwell et al., *Mol. Immunol.* (1996) 33: 1301 - 12); sc(Fv)₂ (Hudson et al, *J Immunol. Methods* (1999) 231: 177 - 89; Orita et al., *Blood* (2005) 105: 562 - 566); triacuerpos (*Journal of Immunological Methods* (1999) 231: 177 - 89); y diacuerpos en tándem (*Cancer Research* (2000) 60: 4336 - 41).

Se puede preparar un fragmento de anticuerpo tratando un anticuerpo con una enzima, por ejemplo, una proteasa tal como la papaína o pepsina (véase Morimoto y col., *J. Biochem. Biophys. Methods* (1992) 24: 107 - 17; Brennan et al., *Science* (1985) 229: 81). Alternativamente, también se pueden producir fragmentos de anticuerpos por recombinación genética en base a su secuencia de aminoácidos.

Puede prepararse un minicuerpo que tenga una estructura que resulte de la modificación de un fragmento de anticuerpo usando fragmentos de anticuerpo obtenidos mediante tratamiento enzimático o recombinación genética. Alternativamente, después de construir un gen que codifique un minicuerpo completo, e introducir el constructo en un vector de expresión, el minicuerpo se puede expresar en células hospedadoras apropiadas (véase, por ejemplo, Co et al., *J. Immunol.* (1994) 152: 2968 - 76; Better y Horwitz, *Methods Enzymol.* (1989) 178: 476 - 96; Pluckthun y Skerra, *Methods Enzymol.* (1989) 178: 497 - 515; Lamoyi, *Methods Enzymol.* (1986) 121: 652 - 63; Rousseaux et al., *Methods Enzymol.* (1986) 121: 663 - 9; Bird y Walker, *Trends Biotechnol.* (1991) 9: 132-7).

Los scFv descritos anteriormente son polipéptidos monocatenarios que incluyen dos regiones variables unidas entre sí por un enlazante o similar, según se requiera. Las dos regiones variables en un scFv son típicamente una VH y una VL, pero un scFv puede incluir dos VH o dos VL. En general, los polipéptidos scFv incluyen un enlazante entre

los dominios VH y VL, formando así una porción emparejada de VH y VL requerida para la unión al antígeno. Un enlazante peptídico compuesto por diez o más aminoácidos se usa típicamente como el enlazante entre VH y VL cuando se forma una porción emparejada intramolecular entre VH y VL. Sin embargo, los enlazantes del scFv de la presente descripción no están limitados a dichos enlazantes peptídicos, siempre que no inhiba la formación de un scFv. Para revisar scFv, véase Pluckthun "The Pharmacology of Monoclonal Antibody", vol. 113 (Rosenburg y Moore ed., Springer Verlag, NY, págs. 269-315 (1994)).

El término "diacuerpos (Db)" se refiere a fragmentos de anticuerpos bivalentes construidos por fusión génica (P. Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444 - 6448 (1993); documento EP 404,097; documento WO93/11161 y similares). Los diacuerpos son dímeros compuestos de dos cadenas polipeptídicas, en donde cada cadena polipeptídica incluye dentro de la misma cadena una región variable de cadena ligera (VL) y una región variable de cadena pesada (VH) conectada con un enlazante suficientemente corto para desactivar la interacción de estas dos regiones, por ejemplo, un enlazante de aproximadamente cinco residuos de aminoácidos. VL y VH codificados en la misma cadena polipeptídica formarán un dímero porque el enlazante entre VL y VH es demasiado corto para formar un fragmento de la región V de cadena única. Por lo tanto, el diacuerpo resultante tiene dos sitios de unión a antígeno. En este documento, cuando VL y VH dirigidos contra dos epítomos diferentes (a y b) se expresan simultáneamente como combinaciones de VLa-VHb y VLb-VHa conectadas con un enlazante de aproximadamente cinco residuos, se secretan como Db biespecífico.

Como los diacuerpos incluyen dos moléculas de scFv, se componen así de cuatro regiones variables y, como resultado, tienen dos sitios de unión a antígeno. Cuando el objetivo es formar un diacuerpo, a diferencia de como en el caso de scFvs que no forman dímeros, ordinariamente, los enlazantes que forman una conexión entre VH y VL en cada molécula scFv son enlazantes de aproximadamente cinco aminoácidos cuando se usan como enlazantes peptídicos. Sin embargo, los enlazantes de scFv para la formación de diacuerpos no están limitados a dichos enlazantes peptídicos siempre que no interfieran con la expresión de scFv y la formación de diacuerpos. Más preferiblemente, en los métodos de la presente invención, un ejemplo de un anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo biespecífico.

El "anticuerpo biespecífico" mencionado anteriormente puede ser, por ejemplo, un anticuerpo que tiene una estructura en la que una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera están unidas en una sola cadena (por ejemplo, sc(Fv)₂). El anticuerpo biespecífico también puede ser una molécula tipo anticuerpo (por ejemplo, scFv-Fc) producida mediante la fusión de un scFv (o sc(Fv)₂), en el que están unidas una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera a una región Fc (una región constante que carece del dominio CH1). Un anticuerpo multiespecífico que consiste en scFv-Fc tiene una estructura de tipo (scFv)₂-Fc con VH1-enlazante-VL1-Fc como el primer polipéptido y VH2-enlazante-VL2-Fc como el segundo polipéptido. Alternativamente, el anticuerpo biespecífico puede ser una molécula de tipo anticuerpo en la que un anticuerpo de dominio único está unido a una región Fc (Curr. Opin. Drug Discov. Devel. 2006, 9 (2), 184 - 93).

En cuanto a los genes que codifican la cadena H o la cadena L de anticuerpos antes de la introducción de mutaciones por los métodos descritos en este documento (en este documento, se puede hacer referencia simplemente a "un anticuerpo de la presente invención"), pueden usarse secuencias conocidas, o se pueden obtener mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se pueden obtener a partir de una biblioteca de anticuerpos, o se pueden obtener clonando genes que codifican el anticuerpo a partir de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales.

Con respecto a las bibliotecas de anticuerpos, muchas bibliotecas de anticuerpos ya son muy conocidas, y dado que se conocen métodos para producir bibliotecas de anticuerpos, los expertos en la técnica pueden obtener bibliotecas de anticuerpos de manera apropiada. Por ejemplo, con respecto a las bibliotecas de anticuerpos en fagos, se puede hacer referencia a bibliografía tal como la de Clackson et al., Nature 1991, 352: 624-8; Marks y col., J. Mol. Biol. 1991, 222: 581 - 97; Waterhouses et al., Nucleic Acids Res. 1993, 21: 2265 - 6; Griffiths y col., EMBO J. 1994, 13: 3245 - 60; Vaughan y col., Nature Biotechnology 1996, 14: 309 - 14; y la publicación de patente japonesa Kohyo No. (JP-A) H20-504970 (publicación de fase nacional japonesa no examinada correspondiente a una publicación internacional no japonesa). Además, pueden usarse métodos conocidos, tales como métodos que usan células eucariotas como bibliotecas (documento WO95/15393) y métodos de presentación de ribosomas. Además, también se conocen técnicas para obtener anticuerpos humanos por selección usando bibliotecas de anticuerpos humanos. Por ejemplo, las regiones variables de anticuerpos humanos se pueden expresar en la superficie de fagos como anticuerpos de cadena simple (scFv) usando métodos de presentación en fagos, y se pueden seleccionar fagos que se unan a antígenos. El análisis genético de los fagos seleccionados puede determinar las secuencias de ADN que codifican las regiones variables de anticuerpos humanos que se unen a los antígenos. Una vez que se revelan las secuencias de ADN de los scFv que se unen a los antígenos, se pueden producir vectores de expresión adecuados en base a estas secuencias para obtener anticuerpos humanos. Estos métodos ya son bien conocidos, y se puede hacer referencia a los documentos WO92/01047, WO92/20791, WO93/06213, WO93/11236, WO93/19172, WO95/01438 y WO95/15388.

En cuanto a los métodos para obtener genes que codifican anticuerpos de hibridomas, se pueden usar técnicas conocidas que implican el uso de antígenos deseados o células que expresan los antígenos deseados como antígenos sensibilizantes, usándolos para realizar inmunizaciones de acuerdo con métodos de inmunización

convencionales, fusionando las células inmunes así obtenidas con células parentales conocidas por métodos de fusión celular ordinarios, cribando células productoras de anticuerpos monoclonales (hibridomas) mediante métodos de cribado ordinarios, sintetizando ADNc de regiones variables de anticuerpos (regiones V) a partir de ARNm de los hibridomas obtenidos usando transcriptasa inversa, y uniéndolos con ADN que codifica la regiones constantes de anticuerpos deseados (regiones C).

Más específicamente, sin limitarse en particular a los siguientes ejemplos, los antígenos sensibilizantes para obtener los genes de anticuerpos mencionados anteriormente que codifican las cadenas H y las cadenas L incluyen ambos antígenos completos con inmunogenicidad y antígenos incompletos compuestos de haptenos y tales que no muestran antigenicidad. Por ejemplo, pueden usarse proteínas de longitud completa y péptidos parciales de proteínas de interés. Además, se sabe que las sustancias compuestas de polisacáridos, ácidos nucleicos, lípidos y similares pueden convertirse en antígenos. Por lo tanto, no existen limitaciones particulares sobre los antígenos de los anticuerpos de la presente invención. Los antígenos se pueden preparar mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, y se pueden preparar, por ejemplo, mediante los siguientes métodos que usan baculovirus (por ejemplo, el documento WO98/46777). Los hibridomas pueden producirse, por ejemplo, con los siguientes métodos de Milstein et al. (G. Kohler y C. Milstein, *Methods Enzymol.* 1981, 73: 3-46), y similares. Cuando la inmunogenicidad de un antígeno es baja, puede unirse a una macromolécula que tenga inmunogenicidad, tal como la albúmina, y luego usarse para la inmunización. Además, uniendo antígenos con otras moléculas si es necesario, se pueden convertir en antígenos solubles. Cuando se usan moléculas transmembrana tales como receptores como antígenos, se pueden usar porciones de las regiones extracelulares de los receptores como un fragmento, o se pueden usar células que expresan moléculas transmembrana en su superficie celular como inmunoógenos.

Las células productoras de anticuerpos pueden obtenerse inmunizando animales usando los antígenos sensibilizantes adecuados descritos anteriormente. Alternativamente, las células productoras de anticuerpos se pueden preparar mediante inmunización in vitro de linfocitos que pueden producir anticuerpos. Se pueden usar diversos mamíferos como animales para la inmunización, donde generalmente se usan roedores, lagomorfos y primates. Ejemplos de tales animales incluyen ratones, ratas y hamsters para roedores, conejos para lagomorfos y monos, incluyendo el mono cynomolgus, el mono rhesus, hamadryas y chimpancés para primates. Además, también se conocen animales transgénicos que portan repertorios de genes de anticuerpos humanos, y se pueden obtener anticuerpos humanos usando estos animales (véase el documento WO96/34096; Méndez et al., *Nat. Genet.* 1997, 15: 146-56). En lugar de usar tales animales transgénicos, por ejemplo, pueden obtenerse anticuerpos humanos deseados que tengan actividad de unión contra antígenos mediante sensibilización in vitro de linfocitos humanos con antígenos o células deseadas que expresen los antígenos deseados, y luego fusionar los linfocitos sensibilizados con células de mieloma humano tales como U266 (véase la Publicación de Solicitud de Patente Japonesa Kokoku No. (JP-B) H-59878 (solicitud de patente japonesa examinada, publicada y aprobada para oposición)). Además, los anticuerpos humanos deseados pueden obtenerse inmunizando animales transgénicos que portan un repertorio completo de genes de anticuerpos humanos, con los antígenos deseados (véanse los documentos WO93/12227, WO92/03918, WO94/02602, WO96/34096 y WO96/33735).

La inmunización animal se puede llevar a cabo diluyendo y suspendiendo apropiadamente un antígeno sensibilizante en solución salina tamponada con fosfato (PBS), solución salina fisiológica o similar, y formando una emulsión mezclando un adyuvante si es necesario, seguido de una inyección intraperitoneal o subcutánea en animales. Después de eso, el antígeno sensibilizante mezclado con el adyuvante incompleto de Freund se puede administrar varias veces cada cuatro a 21 días. La producción de anticuerpos se puede confirmar midiendo el título de anticuerpos diana en sueros de animales usando métodos convencionales.

Las células productoras de anticuerpos obtenidas de linfocitos o animales inmunizados con un antígeno deseado se pueden fusionar con células de mieloma para generar hibridomas usando agentes de fusión convencionales (por ejemplo, polietilenglicol) (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, 1986, 59 -103). Cuando se requiera, las células de hibridoma se pueden cultivar y desarrollar, y la especificidad de unión del anticuerpo producido a partir de estos hibridomas se puede medir usando métodos de análisis conocidos, tales como inmunoprecipitación, radioinmunoensayo (RIA) y enzoinmunoanálisis (ELISA). A continuación, los hibridomas que producen anticuerpos de interés cuya especificidad, afinidad o actividad se han determinado se pueden subclonar por métodos tales como la dilución limitante.

A continuación, los genes que codifican los anticuerpos seleccionados pueden clonarse a partir de hibridomas o células productoras de anticuerpos (linfocitos sensibilizados y similares) usando sondas que pueden unirse específicamente a los anticuerpos (por ejemplo, oligonucleótidos complementarios de las secuencias que codifican las regiones constantes del anticuerpo). La clonación a partir de ARNm usando RT-PCR también es posible. Las inmunoglobulinas se clasifican en cinco clases diferentes, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Estas clases se dividen además en varias subclases (isotipos) (por ejemplo, IgG-1, IgG-2, IgG-3 e IgG-4, IgA-1 e IgA-2 y similares). Las cadenas H y L utilizadas en la presente descripción para producir anticuerpos no están particularmente limitadas y pueden derivarse de anticuerpos que pertenecen a cualquiera de estas clases o isotipos; sin embargo, puede usarse IgG.

En este documento, es posible modificar genes que codifican la cadena H y genes que codifican la cadena L usando técnicas de ingeniería genética. Los anticuerpos genéticamente modificados, tales como anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados que han sido modificados artificialmente con el propósito de disminuir la antigenicidad

heteróloga y similar frente a humanos, pueden producirse apropiadamente si es necesario para anticuerpos tales como anticuerpos de ratón, anticuerpos de rata, anticuerpos de conejo, anticuerpos de hámster, anticuerpos de oveja y anticuerpos de camello. Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos compuestos por una cadena H de anticuerpo de mamífero no humano y regiones variables de la cadena L, tales como anticuerpos de ratón, y las regiones constante de la cadena H y la cadena L del anticuerpo humano. Se pueden obtener ligando el ADN que codifica una región variable de un anticuerpo de ratón al ADN que codifica una región constante de un anticuerpo humano, incorporándolos en un vector de expresión, e introduciendo el vector en un huésped para la producción del anticuerpo. Un anticuerpo humanizado, que también se denomina anticuerpo humano reconfigurado, se puede sintetizar por PCR a partir de varios oligonucleótidos producidos de modo que tengan partes solapantes en los extremos de las secuencias de ADN diseñadas para unir las regiones determinantes complementarias (CDR) de un anticuerpo de un mamífero no humano tal como un ratón. El ADN obtenido se puede ligar a un ADN que codifica una región constante de anticuerpo humano. El ADN ligado se puede incorporar en un vector de expresión, y el vector se puede introducir en un huésped para producir el anticuerpo (véanse los documentos EP239400 y WO96/02576). Las FR del anticuerpo humano que se ligan a través de la CDR se seleccionan cuando la CDR forma un sitio de unión a antígeno favorable. Si es necesario, los aminoácidos en la región estructural de una región variable de anticuerpo pueden estar sustituidos de manera que la CDR del anticuerpo humano reformado forme un sitio de unión a antígeno apropiado (K. Sato y col., Cancer Res. 1993, 53: 851 - 856).

Además de las técnicas de humanización descritas anteriormente, los anticuerpos pueden modificarse para mejorar sus propiedades biológicas, por ejemplo, la afinidad antigénica. Tales modificaciones se pueden llevar a cabo usando métodos tales como mutagénesis dirigida al sitio (véase, por ejemplo, Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488), mutagénesis por PCR y mutagénesis en casete. En general, los anticuerpos mutantes cuyas propiedades biológicas se han mejorado muestran homología y/o similitud de secuencia de aminoácidos de 70% o superior, 80% o superior, o 90% o superior (por ejemplo, 95% o superior, 97%, 98%, 99%, etc.), en comparación con la secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo original. En este documento, la homología y/o similitud de secuencia se define como la proporción de residuos de aminoácidos que son homólogos (mismo residuo) o similares (residuos de aminoácidos clasificados en el mismo grupo en función de las propiedades generales de las cadenas laterales de aminoácidos) de los residuos del anticuerpo original, después de que el valor de homología de secuencia se haya maximizado por alineamiento de secuencia e introducción del intervalo, si es necesario. En general, los residuos de aminoácidos de origen natural se clasifican en grupos en función de las características de sus cadenas laterales: (1) hidrofóbicas: alanina, isoleucina, valina, metionina y leucina; (2) hidrófilo neutro: asparagina, glutamina, cisteína, treonina y serina; (3) ácido: ácido aspártico y ácido glutámico; (4) básico: arginina, histidina y lisina; (5) residuos que afectan la orientación de la cadena: glicina y prolina; y (6) aromático: tirosina, triptófano y fenilalanina.

Normalmente, un total de seis regiones determinantes complementarias (CDR, regiones hipervariables) presentes en las regiones variables de la cadena H y de la cadena L interactúan para formar el(los) sitio(s) de unión a antígeno de un anticuerpo. Incluso se sabe que una de estas regiones variables tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque la afinidad será menor que cuando se incluyen todos los sitios de unión. Por lo tanto, los genes de anticuerpos de la presente descripción que codifican la cadena H y la cadena L solo tienen que codificar porciones de fragmentos que tienen cada uno de los sitios de unión a antígeno de la cadena H y la cadena L, y los polipéptidos codificados por estos genes solo tienen que mantener la afinidad con los antígenos deseados.

Por ejemplo, como se describió anteriormente, los anticuerpos biespecíficos deseados que realmente tienen actividades se pueden obtener de manera eficiente mediante los métodos de la presente invención.

Las regiones variables de cadena pesada generalmente están compuestas por tres regiones CDR y cuatro regiones FR, como se describió anteriormente. Los residuos de aminoácidos sometidos a "modificación" pueden seleccionarse apropiadamente, por ejemplo, a partir de residuos de aminoácidos en las regiones CDR o regiones FR. Generalmente, la modificación de residuos de aminoácidos en las regiones CDR puede disminuir la afinidad hacia los antígenos. Por lo tanto, los residuos de aminoácidos sometidos a "modificación" no están particularmente limitados, pero pueden seleccionarse apropiadamente a partir de residuos de aminoácidos en las regiones FR.

Además, las secuencias que pueden usarse como FR de región variable para anticuerpos en organismos tales como el humano o el ratón pueden obtenerse de manera apropiada por los expertos en la técnica usando bases de datos públicas. Más específicamente, la información de las secuencias de aminoácidos de las regiones FR se puede obtener por los medios descritos más adelante en los Ejemplos.

Ejemplos

A continuación en este documento, la presente invención se describirá específicamente con referencia a los Ejemplos, pero no debe interpretarse como limitada a los mismos.

[Ejemplo 1] Humanización de anticuerpos biespecíficos que llevan una cadena L híbrida

Un anticuerpo biespecífico compuesto por una combinación del anticuerpo anti-Factor IXa A69-VH, anticuerpo B26-VH anti-Factor X y cadena L híbrida (BBA), que fue el más eficaz para acortar el tiempo de coagulación sanguínea

en la solicitud de patente japonesa No. 2005-112514, se humanizó de la siguiente manera.

1-1. Búsqueda de homología de anticuerpos humanos

Se construyó una base de datos obteniendo datos de la secuencia de aminoácidos de anticuerpos humanos de la base de datos pública de Kabat (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/kabat/>) y de la base de datos IMGT (<http://imgt.cines.fr/>), y se realizó la búsqueda de homología en la base de datos para la región variable de la cadena H de A69 de ratón (secuencia de aminoácidos: SEQ ID N°: 19), región variable de cadena H de B26 de ratón (secuencia de aminoácidos: SEQ ID N°: 20), y la región variable de la cadena L de BBA de ratón (secuencia de aminoácidos: SEQ ID N°: 21). Los resultados confirmaron que tienen una alta homología con las secuencias de anticuerpos humanos a continuación y, por lo tanto, se decidió que podrían usarse como región estructural (en lo sucesivo denominada FR) para anticuerpos humanizados.

(1) Región variable de la cadena A69 H: KABATID-000064 (base de datos Kabat) (Kipps et al., J. Clin. Invest. 1991; 87: 2087-2096)

(2) Región variable de la cadena H B26: N° de entrada EMBL AB063872 (base de datos IMGT) (datos no publicados)

(3) Región variable de la cadena L de BBA: KABATID-024300 (base de datos Kabat) (Welschof et al. J. Immunol. Method. 1995; 179: 203-214).

La región determinante de la complementariedad (en lo sucesivo denominada CDR) de cada uno de los anticuerpos de ratón se injertó en la FR de anticuerpos humanos de (1) - (3), y se prepararon así anticuerpos humanizados.

Además, el sitio web de búsqueda de homología descrito públicamente por NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) se utilizó para buscar secuencias de señal secretoras de anticuerpos humanos que son altamente homólogas a los anticuerpos humanos de (4) - (6). Se usaron las siguientes secuencias de señal secretoras obtenidas mediante la búsqueda.

(4) Región variable de la cadena H A69: N° de entrada GenBank AF062257

(5) Región variable de la cadena B B26: N° de entrada GenBank ACC18248

(6) Región variable de la cadena L BBA: N° de entrada Genbank AAA59100

1-2. Construcción de vectores de expresión de genes de anticuerpos humanizados

Para una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos que cubre desde la secuencia señal secretora a la región variable del anticuerpo, se prepararon doce oligo-ADN sintéticos de aproximadamente 50 bases, de manera que aproximadamente 20 bases en el extremo 3' se hibridan entre sí. Los oligo-ADN sintéticos se diseñaron de manera que codifican una secuencia humana en el lado 5' y una secuencia de ratón en el lado 3', o de manera que todos los nucleótidos codifican una secuencia humana. Además, se prepararon un cebador que se hibrida con el extremo 5' de un gen de la región variable del anticuerpo y tiene la secuencia de escisión de XhoI, y un cebador que codifica la secuencia del extremo 5' de la secuencia del intrón, se hibrida con el extremo 3' de un gen de la región variable del anticuerpo, y tiene la secuencia de escisión SfiI.

Se mezclaron 1 µL de cada oligo-ADN sintético preparado a 2,5 µM, y se añadieron 1x TaKaRa Ex Taq Buffer, 0,4 mM dNTPs y 0,5 unidades de TaKaRa Ex Taq (todos de Takara) para preparar una solución de reacción de 48 µL. Después de calentar a 94°C durante cinco minutos, se llevaron a cabo dos ciclos de reacción a 94°C durante dos minutos, 55°C durante dos minutos y 72°C durante dos minutos para ensamblar y alargar cada uno de los oligo-ADN sintéticos. A continuación, se añadieron 1 µL (10 µM cada uno) de cada uno de los cebadores que se hibridan al extremo 5' y al extremo 3' del gen del anticuerpo, y el gen de la región variable del anticuerpo se amplificó mediante 35 ciclos de reacción a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos, y 72°C durante un minuto, y luego la reacción a 72°C durante cinco minutos. Después de llevar a cabo la PCR, la cantidad total de la solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los fragmentos amplificados del tamaño deseado (aproximadamente 400 pb) se purificaron usando el kit de extracción de gel QIAquick (QIAGEN) según el método descrito en el manual de instrucciones adjunto, y se eluyeron con 30 µL de agua esterilizada. Los fragmentos se clonaron usando el sistema pGEM-T Easy Vector (Promega) de acuerdo con el método descrito en el manual de instrucciones adjunto. La secuencia de nucleótidos de cada fragmento de ADN se determinó usando el kit de secuenciación de ciclo BigDye Terminator (Applied Biosystems) y el secuenciador de ADN ABI PRISM 3730xL o el secuenciador de ADN ABI PRISM 3700 (Applied Biosystems) de acuerdo con el método descrito en el manual de instrucciones adjunto.

El plásmido insertado en el fragmento de la región variable de la cadena H se digirió con XhoI y SfiI, y el plásmido insertado en el fragmento de la región variable de la cadena L se digirió con EcoRI, después de confirmarse que tenían la secuencia del gen de la región variable del anticuerpo humanizado correcta. Luego, las soluciones de reacción se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los fragmentos de ADN que tenían el tamaño

deseado (aproximadamente 400 pb) se purificaron usando el kit de extracción de gel QIAquick (QIAGEN) según el método descrito en el manual de instrucciones adjunto, y se eluyeron con 30 µL de agua esterilizada. A continuación, los vectores para la expresión en células animales se prepararon de la siguiente manera. Para expresar preferentemente IgG4 con cadenas H de una combinación heteróloga, se utilizó una IgG4 que tenía sustitución de aminoácidos en su porción CH3 haciendo referencia a la técnica de botón en hojal para IgG1 (Merchant AM y col., Nature Biotechnology, 1998, Vol. 16, p. 677-681). Además, para promover la formación del dímero de la cadena H, también se introdujo la sustitución de aminoácidos (-ppcpScp- → -ppcpPcp-) en la bisagra. El vector de expresión humanizado de la cadena H A69 se preparó insertando el fragmento humanizado del gen del anticuerpo de la región variable de la cadena H A69 en un vector de expresión preparado insertando un gen de la región constante Y349C y sustituido con T366W en pCAGGS que comprende un promotor de β-actina de pollo (Niwa et al., Gene, 1991, 108: 193 - 199). Se preparó el vector de expresión de la cadena H B26 humanizado insertando el fragmento del gen de anticuerpo de la región variable de la cadena H B26 humanizado en un vector de expresión preparado insertando un gen de la región constante E356C, T366S, L368A y sustituido con Y407V a pCAGGS. El plásmido (pCAG-gkDNA) se preparó insertando una región constante de la cadena L del anticuerpo de tipo natural en pCAGGS, y se digirió con EcoRI para preparar un vector de expresión en el que se insertó el fragmento del gen del anticuerpo de la región variable de la cadena L BBA humanizado. La reacción de ligadura se realizó usando el kit Rapid DNA Ligation (Roche Diagnostics) y la cepa de E. coli DH5α (TOYOBO) se transformó.

1-3. Expresión de anticuerpos biespecíficos humanizados

Los anticuerpos biespecíficos humanizados se expresaron usando el siguiente método. Los anticuerpos biespecíficos humanizados derivados de células de carcinoma renal humano fetal se expresaron usando el método descrito en el Ejemplo 1-2, o usando el siguiente método. Se suspendió la cepa HEK293H derivada de células humanas de carcinoma renal fetal (Invitrogen) en un medio DMEM (Invitrogen) que contenía 10% de suero bovino fetal (Invitrogen), se sembraron a una densidad celular de $5-6 \times 10^5$ células/ml (10 mL por placa) en placas usadas para células adhesivas (10 cm de diámetro, CORNING) y se cultivaron durante un día y una noche en una incubadora de CO₂ (37°C, 5% de CO₂). A continuación, el medio se eliminó por succión y se añadieron 6,9 ml de medio CHO-S-SFM-II (Invitrogen) que contenía suero fetal bovino al 1% (Invitrogen). La solución de la mezcla de ADN plasmídico preparada en 1-2 (total de 13,8 µg) se mezcló con 20,7 µl de polietilimina 1 µg/ml (Polysciences Inc.) y 690 µl de medio CHO-S-SFMII, se dejó reposar a temperatura ambiente durante diez minutos, y luego se agregó a las células en cada placa. Las células se incubaron en una incubadora de CO₂ (37°C, 5% de CO₂) durante cuatro a cinco horas. Luego, se añadieron 6,9 ml de medio CHO-S-SFM-II (Invitrogen) que contenía un 1% de suero fetal bovino (Invitrogen) y luego las células se incubaron en una incubadora de CO₂ durante tres días. El sobrenadante del cultivo se recogió, luego las células se eliminaron por centrifugación (a aproximadamente 2000 g durante cinco minutos a temperatura ambiente), y la solución se esterilizó haciéndola pasar a través de un filtro MILLEX® - GV (Millipore) de 0,22 µm. La muestra se almacenó a 4°C hasta su uso.

1-4. Purificación de anticuerpos biespecíficos humanizados

Se añadieron 100 µl de rProtein A Sepharose™ Fast Flow (Amersham Biosciences) al sobrenadante del cultivo obtenido mediante el método descrito en el Ejemplo 1-2, y la solución se mezcló por rotación a 4°C durante cuatro horas. La solución se transfirió a una copa de filtro Ultrafree® - MC de 0,22 µm (Millipore). Después de tres lavados con 500 µL de TBS que contenía 0,01% de Tween® 20, la resina rProtein A Sepharose® se suspendió en 100 µL de solución acuosa de acetato de sodio 50 mM que contenía 0,01% de Tween® 20 a pH 3,3, y se dejó reposar durante dos minutos, y luego, el anticuerpo se eluyó. El eluato se neutralizó inmediatamente añadiendo 6,7 µl de Tris-HCl 1,5 M, pH 7,8.

1-5. Cuantificación de la concentración de anticuerpos biespecíficos humanizados

Las mediciones se realizaron mediante los dos métodos que se describen a continuación.

La IgG antihumana de cabra (Biosource International) se ajustó a 1 µg/ml con un tampón de revestimiento, y se inmovilizó en una placa Nunc-Immuno (Nunc). Después de bloquear con un tampón diluyente (D.B.), una muestra del sobrenadante del cultivo diluida adecuadamente con D.B. fue añadida. Además, se hicieron once diluciones triples en serie de IgG4 humana (anticuerpo anti-TF humanizado, véase el documento WO 99/51743) a partir de 2000 ng/ml con D.B., y se añadieron como patrón para el cálculo de la concentración de anticuerpo. Después de tres lavados, se añadió IgG antihumana de cabra, fosfatasa alcalina (Biosource International) para la reacción. Después de cinco lavados, el color se desarrolló usando sustrato de fosfatasa Sigma 104® (Sigma-Aldrich) como sustrato, y la absorbancia a 405 nm se midió en un lector de absorbancia Modelo 3550 (Bio-Rad Laboratories) con una longitud de onda de referencia de 655 nm. Utilizando el software Microplate Manager III (Bio-Rad Laboratories), se calculó la concentración de IgG humana en el sobrenadante del cultivo a partir de la curva estándar.

Alternativamente, se realizaron mediciones con Biacore 1000 (BIACORE) usando un Sensor Chip CM5 inmovilizado con Proteína A (BIACORE). Más específicamente, de acuerdo con el protocolo del fabricante, se hizo reaccionar un chip sensor activado con solución de Proteína A (SIGMA) diluida a 50 µg/ml con solución acuosa de acetato de sodio 10 mM (pH 4,0, BIACORE) a 5 µL/minuto durante 30 minutos, y luego se llevó a cabo un procedimiento de bloqueo para producir un chip sensor inmovilizado con Proteína A. Este chip sensor se usó para medir las

concentraciones del sobrenadante del cultivo y los productos purificados en Biacore 1000 (BIACORE). Se usó HBS-EP Buffer (BIACORE) para la inmovilización del chip sensor y para las mediciones de la concentración. Se realizaron seis diluciones en serie de dos veces de un anticuerpo IgG4 humanizado (anticuerpo anti-TF humanizado, véase el documento WO99/51743) a partir de 4000 ng/ml con tampón HBS-EP, y se usaron como patrón para las mediciones de la concentración.

1-6. Ensayo de actividad de coagulación sanguínea para anticuerpos biespecíficos humanizados

Para determinar si un anticuerpo biespecífico era capaz de corregir la capacidad de coagulación de la sangre en hemofilia A, se determinaron los efectos del anticuerpo sobre el tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT) usando plasma deficiente en Factor VIII. Se mezclaron 50 μ L de una solución de anticuerpo a una variedad de concentraciones, 50 μ L de plasma deficiente en Factor VIII (Biomerieux) y 50 μ L del reactivo APTT (Dade Behring) y se calentaron a 37°C durante tres minutos. La reacción de coagulación se inició añadiendo 50 μ L de CaCl_2 20 mM (Dade Behring) a la mezcla. El período de tiempo hasta la coagulación se midió con KC10A (Amelung) unido a CR-A (Amelung).

Utilizando una curva de calibración producida definiendo el tiempo de coagulación del plasma deficiente en Factor VIII como 0% y el tiempo de coagulación del plasma normal como 100%, se calculó la actividad (%) tipo Factor VIII de un anticuerpo biespecífico a partir del tiempo de coagulación medido cuando se agregó el anticuerpo biespecífico.

1-7. Adquisición de anticuerpos biespecíficos humanizados que tienen actividad de coagulación sanguínea

El anticuerpo FR humano de anticuerpos biespecíficos humanizados que presentaba una capacidad de coagulación sanguínea disminuida en el ensayo de actividad de coagulación sanguínea mencionado anteriormente se sometió a modificación de aminoácidos para aumentar la actividad. Más específicamente, se utilizó el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange (Stratagene) para introducir mutaciones en la región variable del anticuerpo humanizado de acuerdo con el método descrito en el manual de instrucciones adjunto. El plásmido insertado en el fragmento de la región variable de la cadena H digerido con XhoI y SfiI, y el plásmido insertado en el fragmento de la región variable de la cadena L se digirieron con EcoRI, después de que se confirmó que tenían la secuencia deseada del gen de la región variable del anticuerpo humanizado. Luego, las soluciones de reacción se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los fragmentos de ADN que tenían el tamaño deseado (aproximadamente 400 pb) se purificaron usando el kit de extracción de gel QIAquick (QIAGEN) según el método descrito en el manual de instrucciones adjunto, y se eluyeron con 30 μ L de agua esterilizada. Luego, se prepararon plásmidos para expresión en células animales de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 1-2. Los anticuerpos biespecíficos humanizados se prepararon de acuerdo con el método descrito en los Ejemplos 1-3, 1-4 y 1-5, y la actividad de la coagulación sanguínea se evaluó de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 1-6.

Repitiendo modificaciones de aminoácidos de la secuencia de FR y la evaluación de la capacidad de coagulación sanguínea, se obtuvo un anticuerpo biespecífico humanizado (A69 humanizado (hA69a)/B26 humanizado (hB26-F123e4)/BBA humanizado (hAL-F123j4)) que tenía el mismo nivel de actividad que el anticuerpo biespecífico quimérico (A69/B26/BBA) (Fig. 1) Las secuencias de la región variable del anticuerpo se muestran en las siguientes SEQ ID NOs.

(1) VH del anticuerpo A69 humanizado (hA69a): SEQ ID NO: 1 (secuencia de nucleótidos), SEQ ID NO: 2 (secuencia de aminoácidos)

(2) VH del anticuerpo B26 humanizado (hB26-F123e4): SEQ ID NO: 3 (secuencia de nucleótidos), SEQ ID N°: 4 (secuencia de aminoácidos)

(3) VL del anticuerpo BBA humanizado (hAL-F123j4): SEQ ID N°: 5 (secuencia de nucleótidos), SEQ ID N°: 6 (secuencia de aminoácidos)

[Ejemplo 2] Selección de sitios en las posiciones de modificación de aminoácidos de la región variable para la separación de anticuerpos biespecíficos

En la preparación de un anticuerpo biespecífico, cuando se usan dos tipos de cadenas H y un tipo de cadena L para la expresión, se expresan los siguientes tres tipos de anticuerpos: un homodímero de la cadena H humanizada A69 y la cadena L de BBA humanizada, un homodímero de la cadena H B26 humanizada y la cadena L de BBA humanizada, y un heterodímero de la cadena H A69 humanizada, la cadena H B26 humanizada y la cadena L de BBA humanizada. El objetivo es purificar solo el anticuerpo biespecífico separando estos tres tipos de anticuerpos y, por lo tanto, se llevaron a cabo modificaciones de aminoácidos para disminuir el punto isoeléctrico de la región variable de la cadena H humanizada A69 y aumentar el punto isoeléctrico de la región variable de la cadena H humanizada B26.

Primero, se prepararon modelos de la región Fv de anticuerpo para el anticuerpo humanizado A69 y el anticuerpo B26 humanizado mediante modelado de homología usando el software MOE (Chemical Computing Group Inc.), y se confirmaron los residuos de aminoácidos expuestos en la superficie de las regiones variables del anticuerpo A69

humanizado y el anticuerpo B26 humanizado. Los modelos se muestran en la Fig. 2. De acuerdo con un análisis detallado de estos modelos, de los aminoácidos expuestos a la superficie en la secuencia de FR fuera de CDR, H10, H12, H23, H39, H43 y H105 (basado en la numeración de Kabat, Kabat EA y otros, 1991. Sequences of Proteins of Immunological Interest. NIH) se cree que son candidatos que pueden alterar el punto isoelectrónico sin disminuir la actividad.

[Ejemplo 3] Modificaciones de aminoácidos en las regiones variables de anticuerpos biespecíficos humanizados

Se llevaron a cabo modificaciones de aminoácidos en los sitios seleccionados en el Ejemplo 2 para preparar anticuerpos modificados. Específicamente, se utilizó el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange (Stratagene) para introducir mutaciones en la región variable de la cadena H del anticuerpo A69 humanizado producido (hA69a, nucleótido SEQ ID NO: 1) y la región variable de la cadena H del anticuerpo B26 humanizado (hB26-F123e4, nucleótido SEQ ID NO: 3) de acuerdo con el método descrito en el manual de instrucciones adjunto. Se confirmó que el plásmido insertado en el fragmento de la región variable de la cadena H tenía la secuencia deseada del gen de la región variable del anticuerpo humanizado, y se digirió con XhoI y SfiI. Luego, la solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los fragmentos de ADN que tenían el tamaño deseado (aproximadamente 400 pb) se purificaron usando el kit de extracción de gel QIAquick (QIAGEN) según el método descrito en el manual de instrucciones adjunto, y se eluyeron con 30 µl de agua esterilizada. De acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 1-2, los vectores de expresión de la cadena H se prepararon insertando los fragmentos de ADN preparados en un plásmido de expresión que portaba una región constante de tipo natural y un plásmido de expresión en el que los aminoácidos de la región constante habían sido reemplazados usando la técnica del botón en hojal.

A continuación, se prepararon anticuerpos biespecíficos humanizados mediante el método descrito en los Ejemplos 1-3, 1-4 y 1-5. Las secuencias de las regiones variables del anticuerpo humanizado modificado se muestran en las SEQ ID NO en la Tabla 1 que se muestra a continuación.

Tabla 1

Nombre	Región variable de la cadena H de A69 humanizado	
	Posición(es) modificada(s)	SEQ ID NO de aminoácidos:
hA69a	-	2
hA69-p18	Q43E, Q105E	7
hA69-p8	K12V, Q43E, Q105E	8
hA69-p17	K23T, Q43E, Q105E	9
hA69-p16	K12V, K23T, Q43E, Q105E	10
hA69-PFL	Q1E, K12V, K23T, G27Y, Q43E, N97L, Q105E	11
hA69-KQ	Q1E, K12Q, G16A, G27Y, S30T, Q43E, N97Q, Q105E	12
hA69-N97R	N97R	13

Nombre	Región variable de la cadena H de B26 humanizada	
	Posición(es) modificada(s)	SEQ ID NO de aminoácidos:
hB26 -F123e4	-	4
hB26-p19	Q43K, Q105R	14
hB26-p15	Q39K, Q43K, Q105R	15
hB26- PF	Q1E, P9A, D10Q, M28T, A37V, Q43K, Q105R	16

[Ejemplo 4] Análisis de anticuerpos humanizados modificados por isoelectroenfoco

Para evaluar la alteración de la carga superficial debida a modificaciones de aminoácidos en la región variable, se

prepararon y analizaron anticuerpos modificados por isoelectroenfoco.

El vector de expresión de la cadena L de BBA humanizado (hAL-F123j4) se expresó simultáneamente junto con el vector de expresión de la cadena H de hA69a no modificado, o hA69-p18, hA69-p8, hA69-p17 o hA69-p16 modificado a partir de la cadena H de A69 humanizado. Se prepararon cinco tipos de anticuerpos compuestos por los homodímeros hA69a, hA69-p18, hA69-p8, hA69-p17 o hA69-p16. De forma similar, el vector de expresión de la cadena L de BBA humanizado se expresó simultáneamente junto con el vector de expresión de la cadena H de hB26-F123e4 no modificado, o hB26-p19 o hB26-p15 modificado a partir de la cadena H B26 humanizada. Se prepararon tres tipos de anticuerpos compuestos por los homodímeros hB26-F123e4, hB26-p19 o hB26-p15. El enfoque isoelectroenfoco se realizó de la siguiente manera. El gel PhastGel Dry IEF (Amersham Biosciences) se hinchó durante aproximadamente 30 minutos en la solución de hinchamiento que se describe a continuación usando el Casete PhastSystem (Amersham Biosciences).

	20% de glicerol	0,95 mL
	agua MilliQ	0,95 mL
	Bio-Lyte 7/9 (Bio-Rad)	10 µL
15	Bio-Lyte 3/10 (Bio-Rad)	10 µL
	Pharmalyte 8-10.5 para IEF (Amersham Biosciences)	80 µL

La electroforesis se realizó usando el gel hinchado por PhastSystem (Amersham Biosciences) de acuerdo con el siguiente programa. Las muestras se aplicaron al gel en el Paso 2. Se utilizó un kit de calibración pI (Amersham Biosciences) como marcador pI.

20	Paso 1: 2000 V	2,5 mA	3,5 W	15°C	75 Vh
	Paso 2: 200 V	2,5 mA	3,5 W	15°C	15 Vh
	Paso 3: 2000 V	2,5 mA	3,5 W	15°C	410 Vh

Después de la electroforesis, el gel se fijó con 20% de TCA, y luego se tiñó con plata usando un kit de tinción de plata, proteína (Amersham Biosciences) de acuerdo con el protocolo adjunto al kit. Después de la tinción, los puntos isoelectroenfoco de las muestras se calcularon a partir de los puntos isoelectroenfoco conocidos del marcador pI.

Los resultados del análisis de los homodímeros de anticuerpo A69 no modificados y modificados y el homodímero de anticuerpo B26 humanizado se muestran en la Fig. 3. Se observaron cambios de banda en el enfoque isoelectroenfoco debido a la modificación de la carga superficial. Los puntos isoelectroenfoco de los respectivos anticuerpos estimados en referencia al marcador pI fueron aproximadamente 8,4 para hA69-p18 modificado, aproximadamente 8,2 para hA69-p17 modificado, aproximadamente 8,2 para hA69-p8 modificado, y aproximadamente 8,1 para hA69-p16 modificado, en contraste a aproximadamente 8,8 para el homodímero hA69a no modificado. Es decir, la modificación fue capaz de proporcionar una diferencia máxima de punto isoelectroenfoco de aproximadamente 0,7. De forma similar, con respecto a los homodímeros B26 humanizados, los puntos isoelectroenfoco fueron aproximadamente 9,3 para hB26-p19 modificado y aproximadamente 9,4 para hB26-p15 modificado, en contraste con aproximadamente 9,1 para hB26-F123e4 no modificado. Es decir, la modificación fue capaz de proporcionar una diferencia máxima de punto isoelectroenfoco de aproximadamente 0,3. Se demostró que el punto isoelectroenfoco puede alterarse modificando las cargas en los aminoácidos de superficie en la región variable seleccionada para este examen: H12, H23, H39, H43 y H105.

[Ejemplo 5] Análisis cromatográfico de intercambio catiónico de anticuerpos humanizados modificados

El análisis cromatográfico de intercambio catiónico se realizó por el siguiente método usando los anticuerpos modificados producidos en el Ejemplo 4 para evaluar el efecto de la modificación sobre la separación de los dos anticuerpos. Las condiciones para el análisis cromatográfico de intercambio catiónico fueron las siguientes. El tiempo de retención se calculó para el homodímero de anticuerpo A69 humanizado y el homodímero de anticuerpo B26 humanizado.

45	Columna: ProPac WCX-10, 4 x 250 mm, (Dionex)
	Fase móvil: A: 10 mmol/l NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ , pH 6,25
	B: 10 mmol/l NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ , 500 mmol/l NaCl, pH 6,25
	Caudal: 1,0 mL/min
	Gradiente: 10% B (5 min) → (40 min) → 60% B → (5 min) → 100% B (5 min)
50	Detección: 220 nm

Los resultados del análisis de los cinco tipos de homodímeros de anticuerpos A69 no modificados y modificados humanizados, y los tres tipos de homodímeros de anticuerpos B26 humanizados no modificados y modificados se muestran en la Fig. 4 y la Fig. 5, respectivamente. El tiempo de retención para el homodímero de anticuerpo A69 humanizado no modificado y el homodímero de anticuerpo B26 humanizado fue de aproximadamente 25 minutos, y por lo tanto la separación de estos homodímeros fue imposible, y mucho menos el aislamiento del anticuerpo biespecífico deseado. Se observaron desplazamientos de los máximos al comparar el anticuerpo A69 humanizado no modificado con los que se modificaron para tener puntos isoelectrónicos inferiores, y el tiempo de retención disminuyó a aproximadamente 22,4 minutos, aproximadamente 21,2 minutos y aproximadamente 20,2 minutos, a medida que aumentaba el número de modificaciones. Se observaron desplazamientos de los máximos al comparar el anticuerpo B26 humanizado no modificado con los que se modificaron para tener puntos isoelectrónicos superiores para la región variable, y el tiempo de retención aumentó a aproximadamente 28,4 minutos y a aproximadamente 29,4 minutos, a medida que aumentaba el número de modificaciones. Por lo tanto, se demostró que el tiempo de retención se puede modificar modificando las cargas en los aminoácidos de superficie en la región variable seleccionada para este examen, H12, H23, H39, H43 y H105, y modificando así las cargas superficiales de los dos tipos de anticuerpos.

Según las mediciones del punto isoelectrónico en el Ejemplo 4, a pesar de una diferencia pI de 0,3 entre el homodímero hA69a no modificado y el homodímero hB26-F123e4 no modificado, el tiempo de retención para ambos homodímeros fue de alrededor de 25 minutos, y por lo tanto no pudieron separarse (Fig. 9). Sin embargo, la diferencia de pI entre el homodímero hA69a no modificado y hB26-p19 fue de 0,5, y por lo tanto se separaron por una diferencia de tiempo de retención de aproximadamente 2,6 minutos. Además, la diferencia de pI entre hA69-p18 y el homodímero hB26 fue 0,7, y por lo tanto se separaron por una diferencia de tiempo de retención de aproximadamente 3,4 minutos. Además, se generó una diferencia de pI máxima de 1,3 entre hA69-p16 y hB26-p15, y por lo tanto se separaron por una diferencia de tiempo de retención de aproximadamente 9,2 minutos. Como se describió, las modificaciones hicieron posible separar los dos homodímeros por primera vez.

[Ejemplo 6] Evaluación de la actividad de coagulación de anticuerpos biespecíficos humanizados modificados

Basándose en la observación de la alteración de la carga superficial realizada a través de los análisis en los Ejemplos 4 y 5, se expresaron dos tipos de cadenas H de anticuerpo humanizado modificado (hA69-p8 y hB26-p15) y una cadena L humanizada (hAL-F123j4) para preparar anticuerpos biespecíficos humanizados. Un vector de expresión, en el que la región constante de IgG4 basada en la técnica de botón se insertó en un vector de expresión, se usó como el vector de expresión de la cadena H para promover eficazmente la heterodimerización. Las actividades de coagulación se evaluaron de acuerdo con el método descrito a continuación usando anticuerpos biespecíficos humanizados preparados.

Para determinar si un anticuerpo biespecífico era capaz de corregir la capacidad de coagulación de la sangre en hemofilia A, se determinaron los efectos del anticuerpo sobre el tiempo de la tromboplastina parcial activada (APTT) usando plasma deficiente en Factor VIII. Se mezclaron 50 μ L de una solución de anticuerpo a una variedad de concentraciones, 50 μ L de plasma deficiente en Factor VIII (Biomerieux) y 50 μ L del reactivo APTT (Dade Behring) y se calentaron a 37°C durante tres minutos. La reacción de coagulación se inició añadiendo 50 μ L de $CaCl_2$ 20 mM (Dade Behring) a la mezcla. El período de tiempo hasta la coagulación se midió con KC10A (Amelung) unido a CR-A (Amelung).

Utilizando una curva de calibración producida definiendo el tiempo de coagulación del plasma deficiente en Factor VIII como 0% y el tiempo de coagulación del plasma normal como 100%, se calculó la actividad (%) tipo Factor VIII de un anticuerpo biespecífico a partir del tiempo de coagulación medido cuando se agregaba el anticuerpo biespecífico.

Los resultados de la evaluación de la actividad se muestran en la Fig. 6. Dado que el anticuerpo biespecífico humanizado con una región variable modificada mostraba una actividad de coagulación equivalente a la del anticuerpo biespecífico humanizado no modificado, se demostró que la modificación de la región variable en este ejemplo no afectaba a las actividades de los anticuerpos.

[Ejemplo 7] Preparación y evaluación de anticuerpos humanizados modificados con CDR

Como resultado del análisis del modelo de anticuerpo A69 humanizado producido en el Ejemplo 2, se confirmó que H97 era un aminoácido expuesto a la superficie. De los anticuerpos mostrados en la Tabla 1, la cadena H humanizada A69 hA69-N97R tiene una secuencia en la que la asparagina en la posición 97 en CDR3 ha sido reemplazada por arginina. Los anticuerpos modificados se prepararon produciendo un vector de expresión que portaba hA69-N97R de acuerdo con el método del Ejemplo 1-2, y expresándolo junto con la cadena L de BBA humanizada hAL-F123j4. Para evaluar la alteración de la carga superficial de este anticuerpo, se realizó el enfoque isoelectrónico de acuerdo con el método del Ejemplo 4. Como se indica en la Fig. 7, mientras que el punto isoelectrónico del anticuerpo no modificado (hA69a/hAL-F123j4) fue de 8,9, el del anticuerpo modificado (hA69-N97R/hAL-F123j4) fue de 9,1 y, por lo tanto, la alteración de la carga superficial también se observó en la sustitución de aminoácidos de CDR.

Para evaluar la función de los anticuerpos modificados, la actividad de unión al antígeno, Factor IXa, se ensayó mediante el siguiente método. Se dispensó factor IXa β (Enzyme Research Laboratories) diluido a 1 μ g/ml con tampón de recubrimiento (bicarbonato sódico 100 mM, pH 9,6, azida sódica al 0,02%) a 100 μ L/pocillo en una placa Nunc-Immuno (placas Nunc-Immuno™ 96 MicroWell™ MaxiSorp™ (Nalge Nunc International)), y luego se incubaron durante la noche a 4°C. Después de tres lavados con PBS (-) que contenía Tween® 20, la placa se bloqueó con tampón diluyente (Tris-HCl 50 mM, pH 8,1, albúmina de suero bovino al 1%, MgCl₂ 1 mM, NaCl 0,15 M, Tween® 20 al 0,05%, 0,02% de azida sódica) a temperatura ambiente durante dos horas. Después de la eliminación del tampón, se añadió un anticuerpo purificado diluido en el tampón diluyente a la placa a 100 μ L/pocillo y se incubó a temperatura ambiente durante una hora. La placa se lavó tres veces, luego se añadió IgG de cabra anti-ratón marcada con fosfatasa alcalina (BIOSOURCE) diluida a 1/4000 con el tampón diluyente a 100 μ L/pocillo. Esto se incubó después a temperatura ambiente durante una hora. La placa se lavó cinco veces, luego se añadió un sustrato cromogénico (Sigma) a 100 μ L/pocillo. Esto se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La absorbancia a 405 nm (control: 655 nm) se midió usando el lector de microplacas Model 3550 (Bio-Rad Laboratories). Como resultado, como se muestra en la Fig. 8, el anticuerpo en el que la CDR se había modificado para alterar la carga superficial mostró una actividad de unión equivalente a la del anticuerpo antes de la modificación. Por lo tanto, se demostró que cuando se modificaba la carga superficial, los sitios de modificación podían estar no solo en el FR indicado en el Ejemplo 5, sino también en el CDR.

[Ejemplo 8] Preparación y evaluación de anticuerpos PF biespecíficos humanizados

Se preparó un anticuerpo biespecífico humanizado no modificado usando los anticuerpos no modificados (cadena H humanizada A69 hA69a y cadena B26 H humanizada hB26-F123e4) mostrados en la Tabla 1, así como la cadena L de BBA humanizada hAL-F123j4 (SEQ ID NO: 5). Se preparó un anticuerpo PF biespecífico humanizado usando los anticuerpos modificados (la forma modificada de la cadena H humanizada A69 hA69-PFL y la forma modificada de la cadena H B26 humanizada hB26-PF) mostrados en la Tabla 1, así como la cadena L humanizada BBA hAL-s8 (SEQ ID NO: 17). De acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 1-2, los vectores de expresión de la cadena H se prepararon usando un vector de expresión que portaba la región constante de tipo natural, y los anticuerpos se prepararon por el método descrito en los Ejemplos 1-3, 1-4, y 1-5. Usando una solución de mezcla que contenía los dos tipos de homodímeros y el anticuerpo biespecífico, se llevó a cabo un análisis cromatográfico de intercambio catiónico de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 5.

Los resultados del análisis del anticuerpo biespecífico humanizado no modificado y el anticuerpo PF biespecífico humanizado se muestran en las Figs. 9 y 10. Con respecto al anticuerpo biespecífico humanizado no modificado, los resultados mostraron que los dos tipos de homodímeros y el anticuerpo biespecífico no se separaron, y se eluyeron como un único pico. Por el contrario, con respecto al anticuerpo PF biespecífico humanizado, cada uno de los dos tipos de homodímeros y el anticuerpo biespecífico deseado se separaron y se eluyeron como tres picos en el siguiente orden: homodímero hA69-PF, anticuerpo PF biespecífico humanizado y homodímero hB26-PF. Mediante el fraccionamiento de los tres tipos de picos en el análisis cromatográfico de intercambio catiónico, se purificaron los dos tipos de homodímeros y el anticuerpo PF biespecífico humanizado. Estas fracciones se concentraron utilizando Amicon Ultra, MWCO 10000 (Millipore), luego se dializaron durante la noche frente a acetato de sodio 20 mM, NaCl 150 mM, pH 6,0 mientras se enfriaban. Luego, las concentraciones fueron medidas.

Después de purificar cada anticuerpo, se realizó el enfoque isoeléctrico de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 4. Como se muestra en la Fig. 11, las tres bandas de anticuerpos estaban presentes antes del análisis cromatográfico de intercambio catiónico, y así se confirmó que cada uno de los anticuerpos se puede purificar por cromatografía de intercambio catiónico. Lo siguiente también fue confirmado. Los puntos isoeléctricos del homodímero de anticuerpo A69-PF humanizado, anticuerpo PF biespecífico humanizado, homodímero de anticuerpo B26-PF humanizado fueron aproximadamente 7,9, aproximadamente 8,6, y aproximadamente 9,2, respectivamente. La diferencia del punto isoeléctrico entre el homodímero de anticuerpo A69-PF humanizado y el anticuerpo PF biespecífico humanizado fue de aproximadamente 0,7, mientras que la diferencia del punto isoeléctrico entre el homodímero de anticuerpo B26-PF humanizado y el anticuerpo PF biespecífico humanizado fue de aproximadamente 0,6.

A continuación, se evaluó la actividad de coagulación del anticuerpo PF biespecífico purificado de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 6. La actividad de coagulación se comparó con las de los tres tipos siguientes de anticuerpos expresados usando una región constante de IgG4 con la técnica de botón en hojal: el anticuerpo biespecífico quimérico mencionado anteriormente; el anticuerpo biespecífico compuesto por hA69a (SEQ ID NO: 2), hB26-F123e4 (SEQ ID NO: 4) y hAL-F123j4 (SEQ ID NO: 6) cuyas regiones variables no se modificaron; y el anticuerpo biespecífico que tiene las mismas regiones variables que las del anticuerpo PF biespecífico purificado. Los resultados de la evaluación se muestran en la Fig. 12. La actividad de coagulación del anticuerpo PF biespecífico que lleva una región constante de IgG4 preparada en base a la técnica de botón en hojal fue equivalente a la del anticuerpo PF biespecífico que lleva una región constante de tipo natural purificada por cromatografía de intercambio catiónico. Por lo tanto, se demostró que en el presente ejemplo, las modificaciones en H10, H12, H23, H39, H43 y H105 en la región variable permiten la purificación de anticuerpos biespecíficos a una alta pureza sin afectar sus actividades.

[Ejemplo 8] Establecimiento de líneas celulares que expresan anticuerpos biespecíficos humanizados

Para preparar anticuerpos biespecíficos humanizados modificados, se establecieron líneas celulares que expresaban anticuerpos de la siguiente manera.

5 La región constante de la cadena H se amplificó por PCR usando el gen de la región constante de cadena H natural de IgG4 humana como plantilla, así como un cebador del extremo 5' diseñado de manera que la secuencia de nucleótidos que codifica los dos aminoácidos (Ala-Ser) en el extremo N de la región constante de la cadena H será la secuencia de reconocimiento NheI (GCTAGC) y un cebador diseñado para hibridar al extremo 3' y llevar el sitio de reconocimiento NotI, y se unió a un vector preparado digiriendo el vector pBluescriptKS+ (TOYOBO) con NheI y NotI (ambos de Takara), para producir pBCH4 que comprende el gen de la región constante de IgG4. La PCR se realizó usando un cebador que es complementario a la secuencia de nucleótidos del extremo 5' de la región variable de la cadena H del anticuerpo humanizado de la cadena H A69 (hA69-KQ) y el anticuerpo de la cadena H B26 humanizado (hB26-PF) mostrado en la Tabla 1, y que tiene una secuencia Kozak (CCACC) y la secuencia de reconocimiento EcoRI, y un cebador para la secuencia de nucleótidos del extremo 3' y tiene la secuencia de reconocimiento NheI. Los productos de PCR obtenidos se digirieron con EcoRI y NheI (ambos de Takara), y se insertaron en pBCH4 digerido de forma similar con EcoRI y NheI, para unir la región variable y la región constante. El vector de anticuerpo de la cadena H humana A69 humanizado se digirió con EcoRI y NheI (ambos de Takara), y se clonó en el vector de expresión pCXND3 para células de animales digeridas de forma similar con EcoRI y NotI.

10 El curso de construcción del presente vector pCXND3 se describirá a continuación. Para separar el gen de la cadena H del anticuerpo y el vector en DHFR- Δ E-rVH-PM1-f (véase el documento WO92/19759), se digirió en los sitios de restricción EcoRI y SmaI para recuperar solo la parte del vector. Posteriormente, el adaptador EcoRI-NotI-BamHI (Takara) se clonó en este vector. El vector resultante se denominó pCHOI. La región de pCHOI para expresar el gen de DHFR se clonó en el sitio de restricción HindIII de pCXN (Niwa et al., Gene 1991; 108: 193-200). El vector resultante se denominó pCXND3. Además, el vector de anticuerpo de cadena H B26 humanizado preparado se digirió con EcoRI y NotI (ambos de Takara), y se clonó en el vector de expresión pCXZD1 para células de animales digeridas de forma similar con EcoRI y NotI. El vector pCXZD1 es un vector de expresión en el que el gen de resistencia a neomicina del vector pCXND3 ha sido reemplazado por un gen de resistencia a zeocina. Además, la PCR se realizó usando un oligonucleótido sintético que es complementario a la secuencia de nucleótidos del extremo 5' de la región variable de la cadena L del anticuerpo de la cadena L de BBA humanizado (hAL-AQ, SEQ ID NO: 18) y que tiene una secuencia de Kozak, y un oligonucleótido sintético que es complementario a la secuencia de nucleótidos del extremo 3' y tiene el sitio BsiWI. El producto de PCR obtenido se clonó en el vector pBCL, en el que la región constante de la cadena kappa humana se insertó en el vector pBluescript KS+. La región variable de la cadena L humana y la región constante se unieron mediante el sitio BsiWI. El fragmento del gen de la cadena L producido se clonó en el vector de expresión pUCAG. El vector pUCAG se preparó digiriendo pCXN (Niwa y col., Gene 1991; 108: 193-200) con la enzima de restricción BamHI para obtener un fragmento de 2,6 kbp, y clonando el fragmento en el sitio de restricción BamHI del vector pUC19 (TOYOBO). El vector producido clonando la cadena L en pUCAG se digirió con la enzima de restricción BamHI, y esto se clonó en el vector de expresión pHygDHFR-4b que contiene un gen de resistencia a la higromicina. Los tres tipos de vectores de expresión así producidos se linealizaron con enzimas de restricción, y luego se transfectaron en células CHO-DG44 para establecer líneas celulares que expresan anticuerpos.

40 La preparación de líneas celulares de expresión estable se llevó a cabo de la siguiente manera. Los genes se introdujeron por el método de electroporación usando Gene Pulser II (Bio-Rad). Cada vector de expresión de anticuerpo y 0,75 ml de células CHO (1×10^7 células/ml) suspendidas en PBS se mezclaron entre sí y se enfriaron en hielo durante diez minutos. Luego, la mezcla se transfirió a una cubeta, y luego se aplicó un impulso a 1,5 kV y una capacitancia de 25 μ FD. Después de un tiempo de recuperación de diez minutos a temperatura ambiente, las células sometidas al tratamiento de electroporación se suspendieron en 40 ml de medio CHO-S-SFMIII (Invitrogen) que contenía 1 x suplemento HT (Invitrogen). Se preparó una solución diez veces diluida usando el mismo medio de cultivo, y se añadió a 100 μ l/pocillo a una placa de cultivo de 96 pocillos. Después de cultivar en una incubadora de CO₂ (5% de CO₂) durante un día y una noche, se agregaron Geneticin (Invitrogen), Zeocin (Invitrogen) e Higromicina B (Invitrogen) a 0,5 mg/ml, 0,6 mg/ml y 0,4 mg/ml, respectivamente, y el cultivo se continuó durante dos semanas. Las colonias de células transfectadas que muestran resistencia al fármaco se cultivaron secuencialmente y se expandieron. El cultivo a gran escala se llevó a cabo usando las líneas celulares de alta expresión establecidas, y se obtuvo el sobrenadante del cultivo.

[Ejemplo 9] Separación y purificación de anticuerpos biespecíficos humanizados usando una columna preparativa estándar

55 Los anticuerpos biespecíficos se purificaron del sobrenadante de cultivo obtenido en el Ejemplo 8 mediante el siguiente método. El sobrenadante del cultivo se aplicó a una columna de rProtein A Sepharose Fast Flow (Amersham Biosciences, 50 mm ID x 9,9 cm H. = 194,3 ml con resina) equilibrada usando un tampón de equilibrado (20 mmol/l de tampón fosfato sódico, 1 mol/l NaCl). Después de lavar con tampón de lavado 1 (20 mmol/l de tampón de fosfato de sodio, 1 mol/l de NaCl, pH 7,0) y luego con tampón de lavado 2 (50 mmol/l de tampón de acetato de sodio, pH 6,0), la elución se llevó a cabo usando 100 mmol/L de ácido acético. Inmediatamente después de la elución, el eluato se diluyó tres veces con 20 mmol/l de tampón de acetato de sodio, pH 6,0.

La solución purificada obtenida se aplicó a una columna preparativa estándar, columna SP TOYOPEARL 650M (TOSO, 26 mm I.D. x 22,3 cm H. = 118,3 ml con resina) equilibrada con Disolvente A (20 mmol/l de tampón de acetato sódico, pH 6,0). La separación se realizó en función de la diferencia en la carga superficial entre anticuerpos, usando las siguientes soluciones y condiciones de gradiente.

5	Disolvente A: tampón de acetato de sodio 20 mmol/l, pH 6,0		
	Disolvente B: tampón de acetato de sodio 20 mmol/l, NaCl 1 mol/l, pH 6,0		
	Velocidad de flujo: 10 ml/min (113 cm/h) o 5,3 ml/mín (60 cm/h) solo en el momento de elución		
	Gradiente:	0 → 15% B	Paso por paso 3 Volumen de columna (CV) enjuagado
		15 → 22 % B	gradiente 2,5 CV
10		22 → 30% B	gradiente 6 CV
		30 → 100% B	Paso por paso 3 CV enjuagado

Como resultado de la elución, se detectaron tres picos como se muestra en la Fig. 13. Por lo tanto, se demostró que los anticuerpos biespecíficos también se pueden separar y purificar usando una columna preparativa estándar.

[Ejemplo 10] Evaluación de la actividad de anticuerpos biespecíficos humanizados modificados

- 15 La actividad de coagulación del anticuerpo biespecífico humanizado preparado en el Ejemplo 9 se evaluó de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 6. Los resultados de la evaluación se muestran en la Fig. 14. El anticuerpo biespecífico humanizado purificado en el Ejemplo 9 tenía una actividad de coagulación equivalente a la del anticuerpo PF biespecífico humanizado preparado en el Ejemplo 8. Por lo tanto, se demostró que incluso si las secuencias de aminoácidos de las regiones variables son ligeramente diferentes en hA69-PFL y hA69-KQ, o incluso si los anticuerpos se purifican usando una columna preparativa estándar, las actividades del anticuerpo no se vieron afectadas.

- 20 En vista de lo anterior, se demostró que el anticuerpo biespecífico humanizado de interés y los dos tipos de anticuerpos homodiméricos se pueden separar y purificar sin modificar la estructura o función (actividad) del anticuerpo, alterando la carga superficial a través de la modificación de la región variable de la cadena H cuando se prepara el anticuerpo biespecífico. Como se demostró que los anticuerpos biespecíficos se pueden separar y purificar en una columna preparativa estándar usando el presente método, esto será útil como un método para producir productos farmacéuticos que comprenden un anticuerpo biespecífico.

[Ejemplo 11] Producción de anticuerpos híbridos de isotipo

11-1. Clonación del gen de la región constante de la cadena H del anticuerpo IgG2 humano

- 30 Los siguientes procedimientos se llevaron a cabo para clonar el gen de la región constante de la cadena H del anticuerpo IgG2 humano.

- 35 Para la amplificación del fragmento de cDNA, 50 µL de solución de reacción (1 µL de cada uno de 20 µM de cebador K62 (5' cac cgt ctc ctc agc ctc cac caa 3', SEQ ID NO: 22) y cebador K63 (5' gtg gca ctc att tac ccg gag aca 3', SEQ ID NO: 23), 5 µL de paneles de ADNc de tejido múltiple MTC (leucocitos periféricos) (Clontech), 4 µL de 5 x tampón Prime STAR, 4 µL de dNTP 2,5 mM y 1 µL de la ADN polimerasa PrimeSTAR HS (la anterior de Takara)), y esto se sometió a PCR. La PCR se realizó usando un ciclador térmico GeneAmp PCR system 9700 (Perkin Elmer), calentando a 98°C durante dos minutos, seguido de 30 ciclos de reacción a 98°C durante diez segundos, 60°C durante cinco segundos y 72°C durante dos minutos por ciclo, y finalmente calentando a 72°C durante diez minutos.
- 40 Después de la PCR, la solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los fragmentos amplificados que tenían el tamaño de interés (aproximadamente 1000 pb) se purificaron usando el kit de extracción de gel QIAquick (QIAGEN) según el método descrito en el manual de instrucciones adjunto, y se eluyeron con 50 µl de agua estéril. Luego, se realizó el tratamiento r-Taq para añadir A (adenosina) a los extremos de los fragmentos amplificados. Para el tratamiento r-Taq, los fragmentos amplificados obtenidos se incubaron en 10 µL de solución de reacción rTaq (1 µL de solución de reacción 10 x rTaq, 1 µL de dNTP 2,5 mM, 1 µL de rTaq y 7 µL de los fragmentos
- 45 amplificados anteriormente mencionados) a 72°C durante 30 minutos. Los fragmentos tratados con r-Taq se clonaron en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen) y se determinaron las secuencias de nucleótidos. La secuencia de nucleótidos de cada fragmento de ADN se determinó mediante un secuenciador de ADN ABI PRISM 3730xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) usando el BigDye Terminator 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) de acuerdo con el método descrito en el manual de instrucciones adjunto.

- 50 Las secuencias de nucleótidos determinadas se compararon con la secuencia del N° de entrada BX640623. Si los nucleótidos en una secuencia determinada codifican una secuencia de aminoácidos diferente de la secuencia correspondiente de BX640623, tales nucleótidos se consideraron mutaciones insertadas durante la amplificación por PCR. En tales casos, las sustituciones de aminoácidos se realizaron usando el kit de mutagénesis dirigida de sitio

Quick Change (Stratagene) de modo que la secuencia de aminoácidos será la misma que la de BX640623. El kit de mutagénesis dirigida al sitio Quick Change (Stratagene) se usó de acuerdo con el método descrito en el manual de instrucciones adjunto. Además, para unir el gen de la región constante de la cadena H de IgG2 humana a un gen de la región variable deseado, se introdujo una mutación tal que los primeros dos aminoácidos (Ala-Ser) de la región constante de la cadena H de IgG2 humana fueron codificados por la secuencia de reconocimiento NheI de la enzima de restricción (GCTAGC). La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena H de IgG2 humana utilizada en este examen se muestran en las SEQ ID NOs: 24 y 25, respectivamente.

11-2. Construcción de vectores de expresión de anticuerpos sustituidos por isotipo

Los vectores de expresión de anticuerpos, en los que la región variable de la cadena H del anticuerpo PM-1 humanizado se une a una de las regiones constantes de la cadena H de IgG1 humana, IgG2 humana e IgG4 humana, se prepararon de la siguiente manera.

La PCR se realizó usando un oligonucleótido sintético que tiene una secuencia de Kozak y es complementaria a la secuencia de nucleótidos del extremo 5' de la región variable de la cadena H del anticuerpo del receptor de interleuquina 6 anti-humano humanizado (anticuerpo PM-1 humanizado) descrito en el documento no de patente (Sato K. y col., Cancer Research 1993, 53: 851-856), y un oligonucleótido sintético que tiene la secuencia de reconocimiento NheI y es complementario a la secuencia de nucleótidos del extremo 3'. El producto de PCR obtenido se clonó en el vector pB-CH, en el que se insertó la región constante de la cadena H de IgG1 humana (véase Sato, K. y col., Cancer Research 1993, 53: 851-856) en el vector pBluescript KS+ (TOYOBO). El fragmento del gen de la cadena H, en el que se unieron la región variable de la cadena H y la región constante, se insertó en el vector pCAGGS cuya expresión está regulada por el promotor de β -actina de pollo (Niwa y col., 1991 Gene, 108: 193-199). El gen de la región variable de la cadena H amplificada por PCR del anticuerpo PM-1 humanizado se unió al gen de la región constante IgG4 humana (véase el documento WO 99/51743) o el gen de la cadena H de IgG2 humana preparado en el Ejemplo 11-1 por el sitio NheI del extremo 5', y luego se insertó en el vector pCAGGS. Cada vector de expresión de la cadena H expresa la cadena H uniendo la región variable de la cadena H del anticuerpo PM-1 humanizado a la región constante de la cadena H humanizada a través de la secuencia NheI.

De forma similar, la PCR se realizó usando un oligonucleótido sintético que tiene una secuencia de Kozak y es complementaria a la secuencia de nucleótidos del extremo 5' de la región variable de la cadena L del anticuerpo PM-1 humanizado, y un oligonucleótido sintético que tiene la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción BsiWI y es complementaria a la secuencia de nucleótidos del extremo 3'. El producto de PCR obtenido se clonó en el vector pB-CL, en el que la región constante de la cadena kappa humana se insertó en el vector pBluescript KS+ (TOYOBO). El fragmento del gen de la cadena L, en el que se unieron la región variable de la cadena L y la región constante, se insertó en el vector pCAGGS cuya expresión está regulada por el promotor de β -actina de pollo. La cadena L se expresa uniendo la región variable de la cadena L del anticuerpo PM-1 humanizado a la región constante de la cadena kappa humana mediante la secuencia de BsiWI.

11-3. Expresión de anticuerpos híbridos de isotipo

Los anticuerpos híbridos de isotipo pueden producirse combinando cualesquiera dos de los vectores de expresión de la cadena H del anticuerpo PM-1 humanizado que llevan la región constante de IgG1 humana, IgG2 humana o IgG4 humana, y que los coexpresan con el vector de expresión de la cadena L del anticuerpo PM-1 humanizado en las células para la expresión. Cada anticuerpo se expresó mediante el método descrito en el Ejemplo 4-2 o el siguiente método. La cepa HEK293H derivada de células humanas de carcinoma renal fetal (Invitrogen) se suspendió en un medio DMEM (Invitrogen) que contenía un 10% de suero fetal bovino (Invitrogen), y esto se sembró a una densidad celular de $5-6 \times 10^5$ células/mL (10 mL por placa) en placas usadas para células adhesivas (10 cm de diámetro, CORNING) y se cultivaron durante un día y una noche en una incubadora de CO₂ (37°C, 5% de CO₂). Luego, el medio se eliminó por succión y se agregaron 6,9 ml de medio CHO-S-SFM-II (Invitrogen). Como se describe a continuación, las soluciones de mezcla para expresar los diferentes anticuerpos de isotipo y las soluciones de mezcla para expresar los anticuerpos híbridos (un total de 13,8 μ g) se prepararon usando los ADN de plásmido preparados en 11-2.

(1) Vector de expresión de cadena L 6,9 μ g, vector de expresión de cadena H de IgG1 6,9 μ g

(2) Vector de expresión de cadena L 6,9 μ g, vector de expresión de cadena H de IgG2 6,9 μ g

(3) Vector de expresión de cadena L 6,9 μ g, vector de expresión de cadena H de IgG4 6,9 μ g

(4) Vector de expresión de cadena L 6,9 μ g, vector de expresión de cadena H de IgG1 3,45 μ g, vector de expresión de cadena H de IgG2 3,45 μ g

(5) Vector de expresión de cadena L 6,9 μ g, vector de expresión de cadena H de IgG2 3,45 μ g, vector de expresión de cadena H de IgG4 3,45 μ g

(6) Vector de expresión de cadena L 6,9 μ g, vector de expresión de cadena H de IgG1 3,45 μ g, vector de expresión de cadena H de IgG4 3,45 μ g

5 Cada solución de mezcla se mezcló con 20,7 µl de polietilenimina 1 µg/ml (Polysciences Inc.) y 690 µl de medio CHO-S-SFMII, se dejó reposar a temperatura ambiente durante diez minutos y luego se añadió a las células de cada placa, y luego, las células se incubaron entonces en una incubadora de CO₂ (37°C, 5% de CO₂) durante cuatro a cinco horas. A continuación, se añadieron 6,9 ml de medio CHO-S-SFM-II (Invitrogen) y luego las células se incubaron en un incubador de CO₂ durante tres días. El sobrenadante del cultivo se recogió, luego las células se eliminaron por centrifugación (a aproximadamente 2000 g durante cinco minutos a temperatura ambiente), y la solución se esterilizó haciéndola pasar a través de un filtro MILLEX®-GV (Millipore) de 0,22 µm. La muestra se almacenó a 4°C hasta su uso.

11-4. Purificación de anticuerpos híbridos de isotipo

10 Se añadieron 100 µl de rProtein A Sepharose™ Fast Flow (Amersham Biosciences) al sobrenadante de cultivo obtenido mediante el método descrito en el Ejemplo 11 - 3, y la solución se mezcló por rotación a 4°C durante cuatro horas. La solución se transfirió a una copa de filtro Ultrafree™ - CM de 0,22 µm (Millipore). Después de tres lavados con 500 µl de TBS, la resina rProtein A Sepharose™ se suspendió en 100 µl de solución acuosa de acetato de sodio 50 mM a pH 3,0, y se dejó reposar durante dos minutos, y luego se eluyó el anticuerpo. El eluato se neutralizó inmediatamente añadiendo 6,7 µl de Tris-HCl 1,5 M, NaCl 150 mM, pH 8,0. El tampón de la solución de anticuerpo obtenida se intercambió dializándolo contra PBS para medir la actividad, o frente a tampón de ácido acético 20 mM que contenía NaCl 150 mM, pH 6,0 para la medición de DSC. A continuación, el anticuerpo purificado que porta la región constante de cadena H de IgG1 humana se denominará "anticuerpo anti-PM-1 humanizado no modificado", el anticuerpo que porta la región constante de cadena H de IgG2 humana se denominará "anticuerpo anti-PM-1 humanizado sustituido con IgG2", y el anticuerpo que lleva la región constante de cadena H de IgG4 humana se denominará "anticuerpo anti-PM-1 humanizado sustituido con IgG4".

11-5. Cuantificación de la concentración de anticuerpos híbridos de isotipo

25 La absorbancia de la solución que contiene anticuerpos obtenida en 11-4 a 280 nm se midió en el espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop) usando 2 µL de la solución, o en el espectrofotómetro DU600 (BECKMAN) usando 50 µL de la solución. La concentración de anticuerpo se calculó a partir de los valores obtenidos usando la siguiente ecuación. Se usó PBS o tampón de ácido acético 20 mM que contenía NaCl 150 mM a pH 6,0 como blanco.

$$\text{Concentración de anticuerpos (mg/ml)} = \text{absorbancia} \times \text{factor de dilución} / 14,6 \times 10$$

[Ejemplo 12] Análisis de anticuerpos híbridos de isotipo

12-1. Análisis de anticuerpos híbridos de isotipo por isoelectroenfoque

30 Se realizó un análisis de isoelectroenfoque para evaluar la alteración de la carga superficial como resultado de la sustitución en la región constante.

El enfoque isoelectrico se realizó de la siguiente manera. El gel PhastGel Dry IEF (Amersham Biosciences) se hinchó durante aproximadamente 30 minutos en la solución de hinchamiento que se describe a continuación usando el Casete Phastsystem (Amersham Biosciences).

35	20% de glicerol	1,5 ml
	Pharmalyte 8-10.5 para IEF (Amersham Biosciences)	100 ml

La electroforesis se realizó usando el gel hinchado por PhastSystem (Amersham Biosciences) de acuerdo con el siguiente programa. Las muestras se aplicaron al gel en el Paso 2. Se utilizó un kit de calibración pI (Amersham Biosciences) como marcador pI.

40	Paso 1: 2000 V	2,5 mA	3,5 W	15°C	75 Vh
	Paso 2: 200 V	2,5 mA	3,5 W	15°C	15 Vh
	Paso 3: 2000 V	2,5 mA	3,5 W	15°C	410 Vh

45 Después de la electroforesis, el gel se fijó con 20% de TCA, y luego se tiñó con plata usando un kit de tinción de plata, proteína (Amersham Biosciences) de acuerdo con el protocolo adjunto al kit. Después de la tinción, los puntos isoelectricos de las muestras se calcularon a partir de los puntos isoelectricos conocidos del marcador pI.

50 Los resultados del análisis de los anticuerpos de PM-1 humanizados no modificados, sustituidos con IgG2 y sustituidos con IgG4, se muestran en la Fig. 15. Se observaron desplazamientos de banda en el enfoque isoelectrico debido a la sustitución de isotipo. Los puntos isoelectricos de los anticuerpos respectivos estimados en referencia al marcador pI fueron aproximadamente 8,9 para el anticuerpo PM-1 humanizado sustituido con IgG2, y aproximadamente 8,7 para el anticuerpo PM-1 humanizado sustituido con IgG4, en contraste con aproximadamente 9,3 para el no anticuerpo modificado humanizado PM-1. Es decir, la sustitución fue capaz de proporcionar una diferencia de punto isoelectrico máxima de aproximadamente 0,6. Se demostró en este examen que los puntos

isoelectrónicos pueden alterarse sustituyendo la región constante de un isotipo de anticuerpo.

A continuación, los resultados del análisis de anticuerpos de PM-1 humanizados no modificados coexpresados y sustituidos con IgG2, y anticuerpos de PM-1 humanizados no modificados coexpresados y sustituidos con IgG4 se muestran en la Fig. 16. Aquí, se observaron tres bandas principales correspondientes a los homodímeros de los isotipos respectivos y el heterodímero en cada combinación. Los puntos isoelectrónicos de los respectivos anticuerpos híbridos del isotipo estimados en referencia al marcador pI fueron 9,2 para el anticuerpo híbrido PM-1 humano humanizado no modificado PM-1/IgG2-sustituido y de 9,0 para el anticuerpo híbrido PM-1 humano no modificado humanizado PM-1/sustituido con IgG4. Se demostró en este estudio que los anticuerpos híbridos de isotipo se pueden producir coexpresando una combinación de vectores de expresión de anticuerpos de isotipo, y que los anticuerpos híbridos se pueden separar por su diferencia en puntos isoelectrónicos.

12-2. Análisis cromatográfico de intercambio catiónico de anticuerpos híbridos de isotipo

El análisis cromatográfico de intercambio catiónico se realizó por el siguiente método usando los anticuerpos híbridos de isotipo preparados en el Ejemplo 11, y se evaluó el efecto de la sustitución de isotipo en la separación. Las condiciones para el análisis cromatográfico de intercambio catiónico fueron las siguientes. El tiempo de retención se calculó para el anticuerpo PM-1 humanizado no modificado, el anticuerpo PM-1 humanizado IgG2-sustituido, el anticuerpo PM-1 humanizado IgG4-sustituido, el anticuerpo híbrido del anticuerpo PM-1 humanizado no modificado y el anticuerpo PM-1 humanizado IgG2-sustituido y el anticuerpo híbrido del anticuerpo PM-1 humanizado no modificado y el anticuerpo PM-1 humanizado sustituido con IgG4.

Columna: ProPac WCX-10, 4 x 250 mm, (Dionex)

Fase móvil: A: 25 mmol/L MES/NaOH, pH 6,1

B: 25 mmol/L MES/NaOH, 250 mmol/L NaCl, pH 6,1

Caudal: 0,5 ml/min

Gradiente: 25% B (5 min) → (105 min) → 67% B → (1 min) → 100% B (5 min)

Detección: 280 nm

Los resultados del análisis de anticuerpos de PM-1 humanizados no modificados, sustituidos con IgG2 y sustituidos con IgG4 individualmente expresados se muestran en la Fig. 17. El tiempo de retención del anticuerpo PM-1 humanizado no modificado, anticuerpo PM-1 humanizado sustituido con IgG2 y anticuerpo PM-1 humanizado sustituido con IgG4 fue de 60,2 minutos, 30,5 minutos y 30,3 minutos, respectivamente. Es decir, el tiempo de retención se modificó ligeramente menos de 30 minutos debido a la sustitución de isotipo. Por otro lado, el tiempo de retención fue casi el mismo para el anticuerpo PM-1 humanizado sustituido con IgG2 y el anticuerpo PM-1 humanizado sustituido con IgG4, que mostró una diferencia de pI de acuerdo con el enfoque isoelectrónico. A continuación, los resultados del análisis de coexpresión de anticuerpos de PM-1 humanizados no modificados y sustituidos con IgG2, y la coexpresión de anticuerpos de PM-1 humanizados no modificados y sustituidos con IgG4 se muestran en la Fig. 18. Los homodímeros de cada isotipo y heterodímero se observaron como tres picos principales en la combinación del anticuerpo PM-1 humanizado no modificado y el anticuerpo PM-1 humanizado sustituido con IgG2, y la combinación del anticuerpo PM-1 humanizado no modificado y el anticuerpo PM-1 humanizado IgG4-sustituido. El tiempo de retención fue de aproximadamente 43,8 minutos para el anticuerpo híbrido PM-1 humanizado no modificado/PM-1 humanizado sustituido con IgG2, y aproximadamente 45,1 minutos para el anticuerpo híbrido PM-1 humanizado no modificado/PM-1 humanizado IgG4-sustituido. Es decir, estos anticuerpos se separaron de los homodímeros respectivos con una diferencia de tiempo de retención de 10 minutos o más. Se demostró en este examen que los anticuerpos híbridos de isotipo se pueden producir coexpresando una combinación de vectores de expresión de anticuerpos de isotipo, y que los anticuerpos híbridos se pueden separar mediante cromatografía de intercambio iónico.

[Ejemplo 13] Separación y purificación de anticuerpos híbridos de isotipo por cromatografía de intercambio catiónico

Las soluciones de anticuerpos obtenidas en el Ejemplo 11 se concentraron usando Amicon-Ultra4 (Amicon), luego se desarrollaron en EasySep (TOMY SEIKO). Después de que se realizó el intercambio de tampón por diálisis frente a tampón de ácido cítrico 5 mM (pH 6,5), se purificaron anticuerpos híbridos de isotipo en las siguientes condiciones.

Columna: Poli CAT A, 4,6 x 100 mm, diámetro de partícula: 3 µm, diámetro de poro: 150 nm (Poly LC)

Fase móvil: A: 25 mmol/L MES/NaOH, pH 6,1

B: 25 mmol/L MES/NaOH, 250 mmol/L de acetato de sodio, pH 6,1

Velocidad de flujo: 1,0 mL/min

Gradiente: 35% B (5 min) → (54 min) → 65% B → (1 min) → 100% B (5 min)

Detección: 280 nm

Aproximadamente de 100 a 200 µg se cargaron cada vez, y se fraccionaron los picos del anticuerpo PM-1 humanizado no modificado, anticuerpo híbrido de isotipo PM-1 humanizado no modificado/PM-1 humanizado sustituido con IgG4 y anticuerpo de PM-1 humanizado sustituido con IgG4. Un cromatograma de los fraccionamientos se muestra en la Fig. 19. Las fracciones máximas de múltiples experimentos se combinaron, se concentraron usando Amicon-Ultra4 (Amicon), y luego se desarrollaron en EasySep (TOMY SEIKO). El tampón se cambió por diálisis frente a PBS para medir la actividad, o frente a tampón de ácido acético 20 mM que contenía NaCl 150 mM, pH 6,0 para la medición de DSC. Los picos fraccionados se volvieron a analizar bajo condiciones similares a las descritas anteriormente y los resultados se muestran en la Fig. 20. Esto muestra que los anticuerpos híbridos de isotipo pueden fraccionarse y purificarse mediante métodos de cromatografía de intercambio iónico.

Esta técnica permite la separación de anticuerpos que portan una región variable de cadena H común usando regiones constantes de diferentes isotipos con diferentes valores de pI. Por lo tanto, incluso si las diferentes regiones variables de la cadena H no tienen una diferencia de pI, los anticuerpos biespecíficos se pueden separar mediante cromatografía de intercambio iónico uniendo las regiones variables de la cadena H a las regiones constantes de la cadena H del isotipo con diferentes valores de pI. Además, si las regiones variables de la cadena H son diferentes, la diferencia de pI entre las moléculas se puede aumentar para facilitar aún más la separación y purificación combinando la técnica anterior con la técnica para introducir mutaciones en la región variable como se muestra en el Ejemplo 9. Incluso si la introducción de mutaciones en la región variable de la cadena H es difícil, los anticuerpos biespecíficos pueden separarse y purificarse mediante cromatografía de intercambio iónico sustituyendo la región variable de la cadena H con una secuencia de isotipo de IgG natural, sin preocuparse por la antigenicidad.

[Ejemplo 14] Enfoque isoelectrico de productos de anticuerpos híbridos de isotipo fraccionados y purificados

Para evaluar la pureza de los productos fraccionados, se llevó a cabo un análisis de enfoque isoelectrico.

El enfoque isoelectrico se llevó a cabo de la siguiente manera. El gel PhastGel Dry IEF (Amersham Biosciences) se hinchó durante aproximadamente 30 minutos en la solución de hinchamiento que se describe a continuación usando el Casete Phastsystem (Amersham Biosciences).

Agua MilliQ	1,5 ml.
Pharmalyte 5-8 para IEF (Amersham Biosciences)	50 µL
Pharmalyte 8-10.5 para IEF (Amersham Biosciences)	50 µL

La electroforesis se realizó usando el gel hinchado por PhastSystem (Amersham Biosciences) de acuerdo con el siguiente programa. Las muestras se aplicaron al gel en el Paso 2. Se utilizó un kit de calibración de pI (Amersham Biosciences) como marcador pI.

Paso 1: 2000 V	2,5 mA	3,5 W	15°C	75 Vh
Paso 2: 200 V	2,5 mA	3,5 W	15°C	15 Vh
Paso 3: 2000 V	2,5 mA	3,5 W	15°C	410 Vh

Después de la electroforesis, el gel se fijó con 20% de TCA, y luego se tiñó con plata usando un kit de tinción de plata, proteína (Amersham Biosciences) de acuerdo con el protocolo adjunto al kit.

Los resultados del análisis de los productos de anticuerpos híbridos de isotipo fraccionados y purificados se muestran en la Fig. 21. Se demostró que los productos se pueden purificar sin contener ningún homodímero de isotipo usando cromatografía de intercambio iónico.

[Ejemplo 15] Evaluación de la actividad de los productos de anticuerpos híbridos de isotipo fraccionados y purificados 15-1. Establecimiento de la línea celular BaF3 que expresa gp130 humana y la línea celular BaF3 que coexpresa el receptor gp130 humano/IL-6 humano

Para obtener una línea celular que muestra un crecimiento dependiente de IL-6, se estableció una línea celular BaF3 que expresaba gp130 humana como se describe a continuación.

El cDNA de gp130 humano de longitud completa (Hibi y col., Cell 1990; 63: 1149-1157 (Nº de registro de GenBank NM_002184)) se amplificó mediante PCR, y se clonó en el vector de expresión pCOS2Zeo, desde el cual el sitio de expresión del gen DHFR de pCHOI (Hirata y col., FEBS Letter 1994; 356: 244-248) se eliminó, y al que se insertó un sitio de expresión del gen de resistencia a zeocina, para construir pCOS2Zeo/gp130.

Se mezclaron 10 µg de pCOS2Zeo/gp130 con células BaF3 ($0,8 \times 10^7$ células) suspendidas en PBS, luego se aplicó un impulso a 0,33 kV y una capacidad de 950 µFD usando Gene Pulser (Bio - Rad). Las células BaF3 sometidas a la transferencia génica por tratamiento de electroporación se cultivaron durante un día y una noche en medio

RPMI1640 (Invitrogen) que contenía 0,2 ng/ml de interleucina-3 de ratón (PeproTech), suero fetal bovino al 10% (en lo sucesivo, FBS, HyClone). Luego, las células se seleccionaron mediante la adición de medio RPMI1640 que contenía 100 ng/ml de interleucina-6 humana (R & D), 100 ng/ml del receptor de interleucina-6 humana soluble (R & D systems) y 10% de SFB, para establecer una línea celular BaF3 que expresaba gp130 humano (en lo sucesivo denominada BaF3/gp130).

15-2. Evaluación de la actividad de productos de anticuerpos híbridos de isotipo fraccionados y purificados para neutralizar IL-6 humana

La actividad neutralizante de IL-6 se evaluó usando BaF3/gp130 que muestra el crecimiento dependiente de IL-6, como se describe a continuación. El anticuerpo PM-1 humanizado sin modificar purificado, el anticuerpo híbrido de isotipo PM-1 humanizado no modificado/sustituido con IgG4 y el anticuerpo PM-1 humanizado sustituido con IgG4 se diluyeron en RPMI1640 que contenía 10% de FBS hasta 10 µg/ml. Se prepararon siete diluciones seriales triples en esta solución, y se dispensaron 50 µl de cada solución en cada pocillo de una placa de 96 pocillos (CORNING). A continuación, después de lavar tres veces con medio RPMI1640 que contiene 10% de SFB (HyClone), se suspendió BaF3/gp130 a 5×10^4 células/ml en medio RPMI1640 que contenía 60 ng/ml de interleucina-6 humana (TORAY), 60 ng/ml del receptor de IL-6 humano soluble (preparado por la compañía de los presentes inventores), y 10% de SFB. Se añadieron 50 µl de esta suspensión a cada pocillo y se mezclaron. Luego, se dispensaron muestras de anticuerpos. El receptor de IL-6 humano soluble se preparó mediante el método indicado a continuación. Se introdujo un gen que codifica de los aminoácidos 1° a 344° del receptor de IL-6 humano soluble (Yamasaki et al., Science 1988; 241: 825-828 (N° de entrada de GenBank X12830)) en células CHO. Luego, el receptor se purificó del sobrenadante del cultivo. Las células se cultivaron durante 72 horas bajo condiciones de 37°C y 5% de CO₂. Luego, se añadió reactivo WST-8 (Cell Counting Kit-8, Dojindo Laboratories) diluido dos veces con PBS a 20 µl/pocillo. Inmediatamente después, se midió la absorbancia a 450 nm (longitud de onda de referencia: 620 nm) usando SUNRISE CLASSIC (TECAN). Después de un cultivo de dos horas, se midió nuevamente la absorbancia a 450 nm (longitud de onda de referencia: 620 nm). La actividad neutralizante de IL-6 se evaluó usando el cambio en la absorbancia durante el cultivo de dos horas como índice.

Como resultado, como se muestra en la Fig. 22, el anticuerpo PM-1 humanizado no modificado fraccionado y purificado, el anticuerpo híbrido de isotipo PM-1 humanizado no sustituido/IgG4-sustituido y el anticuerpo PM-1 humanizado sustituido con IgG4 tenían actividades neutralizantes equivalentes a la de un producto purificado de anticuerpo PM-1 humanizado (a granel). En vista de lo anterior, se demostró que los anticuerpos híbridos de isotipo no pierden sus actividades originales de unión a antígeno, y funcionan como anticuerpos neutralizantes.

Aplicabilidad industrial

En los métodos de la presente invención, el punto isoeléctrico de un anticuerpo se puede alterar mediante solo un pequeño número de sustituciones de aminoácidos sin cambiar su estructura/función (actividad). Esto permite la purificación eficiente de anticuerpos biespecíficos a alta pureza usando una columna de cromatografía estándar. La alta pureza permite el desarrollo de anticuerpos biespecíficos en productos farmacéuticos. Por lo tanto, los métodos de la presente invención son muy útiles para desarrollar anticuerpos biespecíficos como productos farmacéuticos.

Los anticuerpos biespecíficos que realmente tienen actividades se pueden obtener de manera eficiente mediante los métodos de la presente invención.

Listado de secuencias

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> Método de modificación de anticuerpos para la purificación de anticuerpos biespecíficos

<130> C1-A0603Y1P

<150> JP 2006-097795

<151> 2006-03-31

<150> JP 2006-275804

<151> 2006-10-06

<160> 25

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

ES 2 654 040 T3

<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 1

```

caggtccagc ttgtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc agtgaaggtt      60
tcctgcaagg cctctggagg caccttcagt gactactata tgcactgggt gcgccaggcc      120
cccggacaag ggcttgagtg gatgggatac attaatccta gcagtggtta tactaagtac      180
aatcggaaagt tcagggacag agtcaccatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac      240
atggagctga gcagcctgag atctgaagac acggctgtgt attactgtgc gagagggggt      300
aacggttact accttgacta ctggggccag ggcaccacgg tcaccgtctc ctca          354
  
```

<210> 2

5 <211> 118
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

10 <400> 2

```

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1          5          10          15

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

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
          35          40          45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Arg Lys Phe
          50          55          60

Arg Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65          70          75          80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95

Ala Arg Gly Gly Asn Gly Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
          100          105          110

Thr Val Thr Val Ser Ser
          115
  
```

<210> 3

15 <211> 357
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

20 <400> 3

ES 2 654 040 T3

cagggtgcagc tgggtgcagtc tggacctgac gtgaagaagc cgggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cctctggcta catgttttcc gacaacaaca tggactgggc gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggagat attaatacta aaagtgggtg ttctatctac 180
 aaccagaagt tcaagggcag agtcatcatg accatagaca aatccacggg cacagcctac 240
 atggaattga ggagcctgag atcagacgac acggccatat attactgtgc gaggaggagg 300
 agctacggct actactttga ctactggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctctca 357

<210> 4
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 4
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Asp Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Met Phe Ser Asp Asn
 20 25 30

Asn Met Asp Trp Ala Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

10

Gly Asp Ile Asn Thr Lys Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Ile Met Thr Ile Asp Lys Ser Thr Gly Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Arg Arg Ser Tyr Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 5
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> Artificial

15

<220>
 <223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 5
 gacatcgtga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgca aggccagtca gaatgtgggg actgctgtag cctggatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctattog gcatcctacc ggtacagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtcgata tgggacagat ttcactctca ccatctcaag cttgcaacct 240
 gaagatttag caacttacta ctgtcagcaa tatagcaact atatcacgtt cggcggaggg 300
 accaaggtgg agatcaaa 318

ES 2 654 040 T3

<210> 6
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial

5 <220>
<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 6
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Arg Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Ile Thr
85 90 95

10 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 7
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 7

ES 2 654 040 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

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

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Arg Lys Phe
50 55 60

Arg Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Asn Gly Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Glu Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 8
<211> 118
<212> PRT
5 <213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 8
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

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

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Arg Lys Phe
50 55 60

Arg Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Asn Gly Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Glu Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

10 <210> 9

ES 2 654 040 T3

<211> 118
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

5 <223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 9

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

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

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Arg Lys Phe
 50 55 60

Arg Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Gly Asn Gly Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Glu Gly Thr
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

10 <210> 10
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

15 <223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 10

ES 2 654 040 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

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

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Arg Lys Phe
50 55 60

Arg Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Asn Gly Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Glu Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 11

<211> 118

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 11

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

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

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Arg Lys Phe
50 55 60

Arg Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Leu Gly Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Glu Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

10 <210> 12

ES 2 654 040 T3

<211> 118
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

5 <223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 12

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Gln Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Arg Lys Phe
 50 55 60

Arg Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Gly Gln Gly Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Glu Gly Thr
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

10 <210> 13
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

15 <223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 13

ES 2 654 040 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

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

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Arg Lys Phe
50 55 60

Arg Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Arg Gly Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 14

<211> 119

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 14

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Asp Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Met Phe Ser Asp Asn
20 25 30

Asn Met Asp Trp Ala Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Asp Ile Asn Thr Lys Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Ile Met Thr Ile Asp Lys Ser Thr Gly Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Arg Ser Tyr Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Arg Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

10 <210> 15

ES 2 654 040 T3

<211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

5 <223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 15

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Asp Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Met Phe Ser Asp Asn
 20 25 30

Asn Met Asp Trp Ala Arg Lys Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Asp Ile Asn Thr Lys Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Ile Met Thr Ile Asp Lys Ser Thr Gly Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Arg Arg Ser Tyr Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Arg Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

10 <210> 16
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

15 <223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 16

ES 2 654 040 T3

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Gln Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Asp Ile Asn Thr Lys Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Ile Met Thr Ile Asp Lys Ser Thr Gly Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Arg Ser Tyr Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Arg Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 17
<211> 106
<212> PRT
5 <213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 17
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Arg Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Ile Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

10 <210> 18
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial

ES 2 654 040 T3

<220>

<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 18

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Arg Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

5

Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Ile Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 19

<211> 119

<212> PRT

10

<213> Mus musculus

<400> 19

Met Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly
1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp
20 25 30

Tyr Tyr Met His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Leu Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Arg Lys
50 55 60

Phe Arg Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
65 70 75 80

Tyr Met Gln Leu Thr Ser Leu Thr Tyr Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Gly Gly Asn Gly Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 20

<211> 120

<212> PRT

15

<213> Mus musculus

ES 2 654 040 T3

<400> 20

Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly
1 5 10 15

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

Asn Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Asp Ile Asn Thr Lys Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Lys
50 55 60

Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ile Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
65 70 75 80

Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Arg Arg Ser Tyr Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

- 5 <210> 21
- <211> 107
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

<400> 21

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Arg Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Leu Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Ile Thr
85 90 95

10 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
100 105

- <210> 22
- <211> 24
- <212> DNA
- <213> Artificial

- 15 <220>
- <223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

ES 2 654 040 T3

<400> 22
 caccgtctcc tcagcctcca ccaa 24

5 <210> 23
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

10 <400> 23
 gtggcactca tttaccggga gaca 24

<210> 24
 <211> 981
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

15 <400> 24
 gctagcacca agggcccatac ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 60
 agcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacggtgtcg 120
 tggaaactcag gcgctctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctca 180
 ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcaacttcgg caccagacc 240
 tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac agttgagcgc 300
 aatgttgtg tcgagtgcc accgtgccca gcaccacctg tggcaggacc gtcagtcttc 360
 ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacgtgc 420
 gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacccc gaggtccagt tcaactggtta cgtggacggc 480
 gtggagggtgc ataatgcca gacaaaagcca cgggaggagc agttcaacag cacgttccgt 540
 gtggtcagcg tcctcaccgt cgtgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc 600
 aaggtctcca acaaaggcct ccagccccc atcgagaaaa ccatctcca aaccaaaggg 660
 cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccatccc gggaggagat gaccaagaac 720
 caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctaccca gcgacatcgc cgtggagtgg 780
 gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacac ctcccatgct ggactccgac 840
 ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 900
 gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacaca gaagagcctc 960
 tcctgtctc cgggtaaatg a 981

20 <210> 25
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 25

ES 2 654 040 T3

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

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

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

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

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

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

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 115 120 125

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

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un anticuerpo multiespecífico que comprende un primer polipéptido y un segundo polipéptido cuyos puntos isoeléctricos son diferentes, en donde el método comprende los pasos de:
- 5 (A) modificar ambos o uno cualquiera de un ácido nucleico que codifica los residuos de aminoácidos del primer polipéptido y un ácido nucleico que codifica los residuos de aminoácidos del segundo polipéptido, tal que la diferencia entre el punto isoeléctrico del primer polipéptido y el del segundo polipéptido será 0,5 o más, en el que la(s) posición(es) modificada(s) de dicho ácido nucleico se seleccionan del grupo que consiste en (i) y (ii) a continuación:
- 10 (i) al menos una de las posiciones 1, 3, 5, 8, 10, 12, 13, 15, 16, 19, 23, 25, 26, 39, 42, 43, 44, 46, 68, 71, 72, 73, 75, 76, 81, 82b, 83, 85, 86, 97, 105, 108, 110 y 112, numeración Kabat, en la región variable de la cadena H, y
- (ii) al menos una de las posiciones 137, 196, 203, 214, 217, 233, 268, 274, 276, 297, 355, 392, 419, y 435, numeración de la UE, en la región constante de la cadena H;
- (b) cultivar células hospedadoras para expresar los ácidos nucleicos; y
- 15 (c) recuperar el anticuerpo multiespecífico del cultivo de la célula huésped, usando la diferencia en el punto isoeléctrico,
- en el que el primer polipéptido y el segundo polipéptido comprenden una región variable de la cadena pesada.
2. Un método para purificar un anticuerpo multiespecífico que comprende un primer polipéptido y un segundo polipéptido cuyos puntos isoeléctricos son diferentes, en donde el método comprende los pasos de:
- 20 (a) modificar tanto ambos como uno cualquiera de un ácido nucleico que codifica los residuos de aminoácidos del primer polipéptido y un ácido nucleico que codifica los residuos de aminoácidos del segundo polipéptido, tal que la diferencia entre el punto isoeléctrico del primer polipéptido y el del segundo polipéptido será 0,5 o más, en el que la(s) posición(es) modificada(s) de dicho ácido nucleico se seleccionan del grupo que consiste en (i) y (ii) a continuación:
- 25 (i) al menos una de las posiciones 1, 3, 5, 8, 10, 12, 13, 15, 16, 19, 23, 25, 26, 39, 42, 43, 44, 46, 68, 71, 72, 73, 75, 76, 81, 82b, 83, 85, 86, 97, 105, 108, 110 y 112, numeración Kabat, en la región variable de la cadena H, y
- (ii) al menos una de las posiciones 137, 196, 203, 214, 217, 233, 268, 274, 276, 297, 355, 392, 419, y 435, numeración UE, en la región constante de la cadena H;
- (b) cultivar células hospedadoras para expresar los ácidos nucleicos; y
- 30 (c) purificar dicho anticuerpo multiespecífico del cultivo de la célula huésped mediante cromatografía estándar, usando la diferencia en el punto isoeléctrico,
- en el que el primer polipéptido y el segundo polipéptido comprenden una región variable de la cadena pesada.
3. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que la modificación de la etapa (a) se lleva a cabo modificando los ácidos nucleicos de modo que los picos del homomultímero del primer polipéptido, el homomultímero del segundo polipéptido, y el heteromultímero del primer polipéptido y el segundo polipéptido se separarán en un análisis de cromatografía estándar.
- 35 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo multiespecífico comprende un tercer polipéptido que comprende una región variable de cadena ligera, y en el que el primer polipéptido y el segundo polipéptido forman cada uno un multímero con dicho tercer polipéptido.
- 40 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que las regiones constantes de la cadena pesada comprendidas en el primer polipéptido y el segundo polipéptido son las regiones constantes de la cadena pesada cuyos puntos isoeléctricos son diferentes entre sí.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que las regiones constantes de la cadena pesada con diferentes puntos isoeléctricos son IgG1 e IgG4, o IgG1 e IgG2.
- 45 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo biespecífico.

FIG. 1

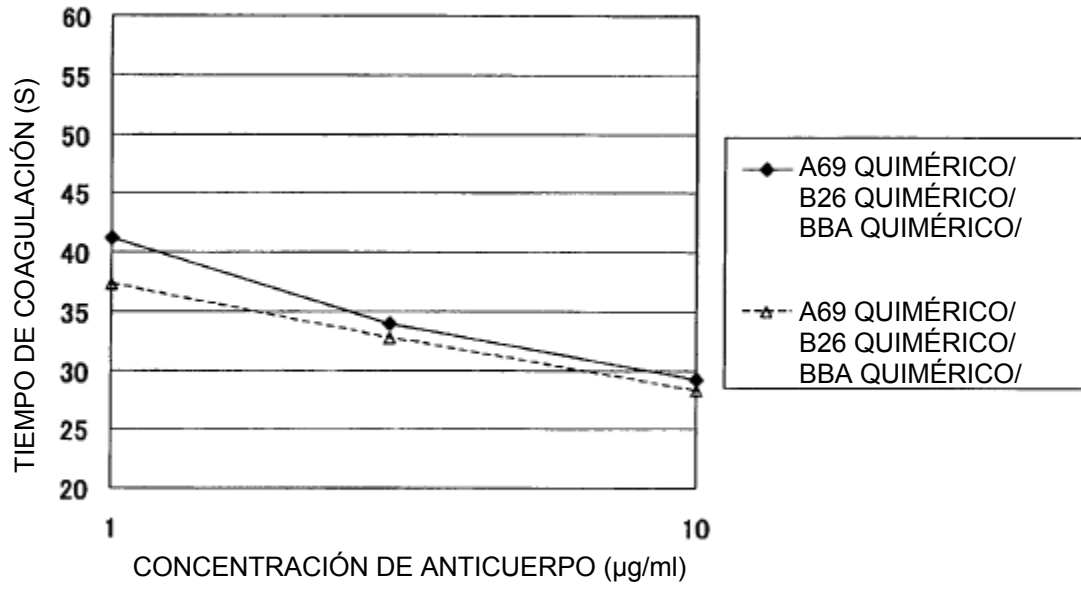


FIG. 2

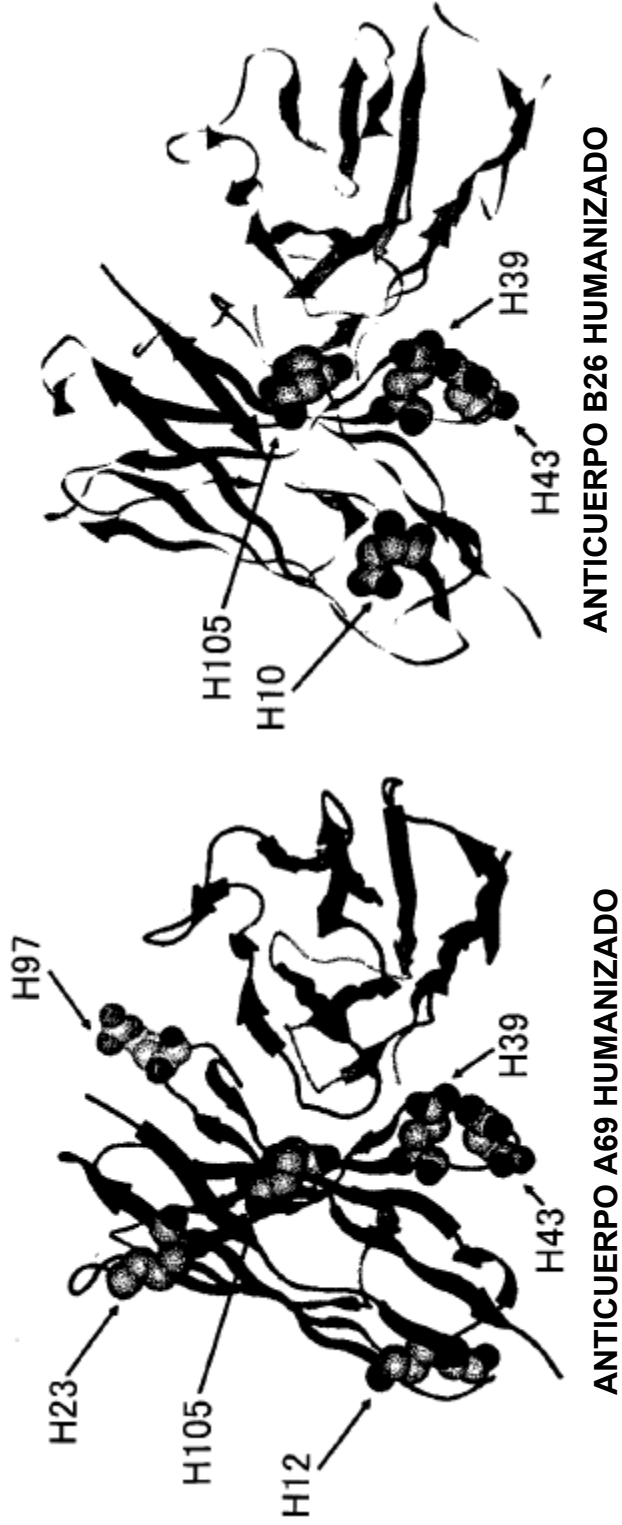


FIG. 3

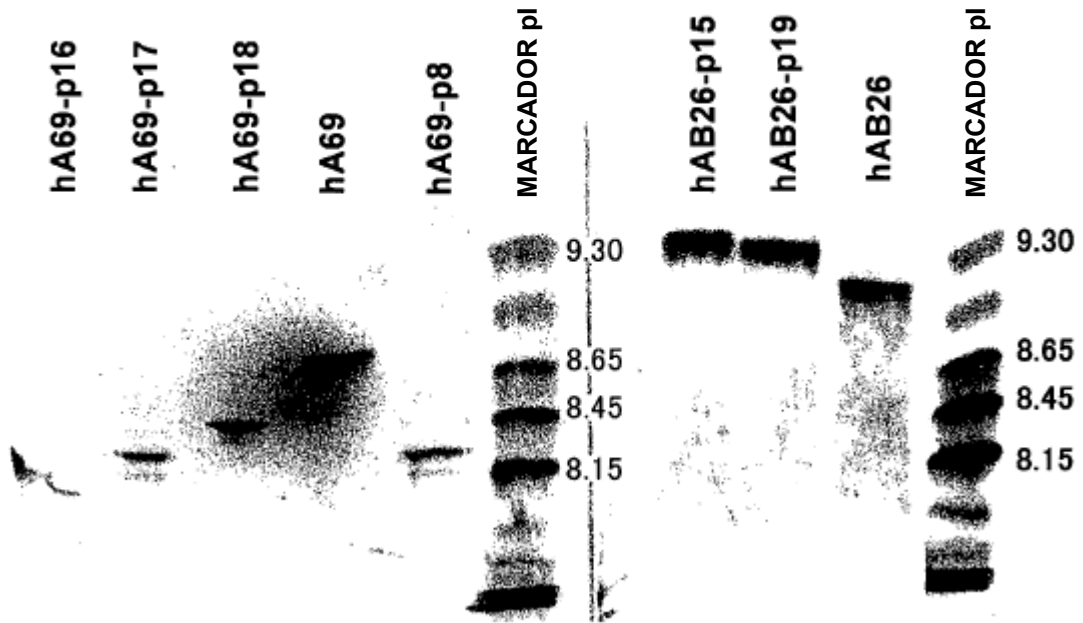


FIG. 4

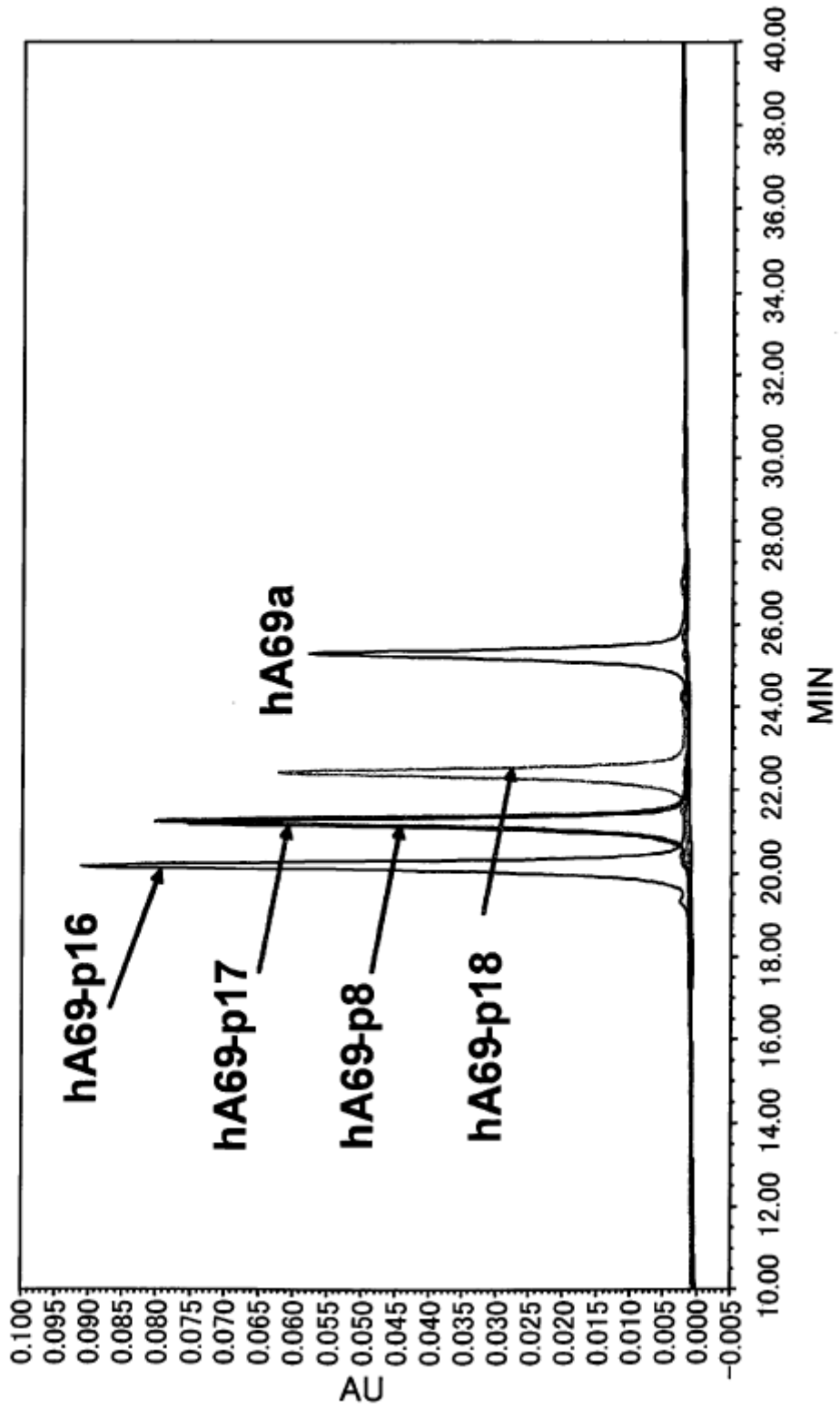


FIG. 5

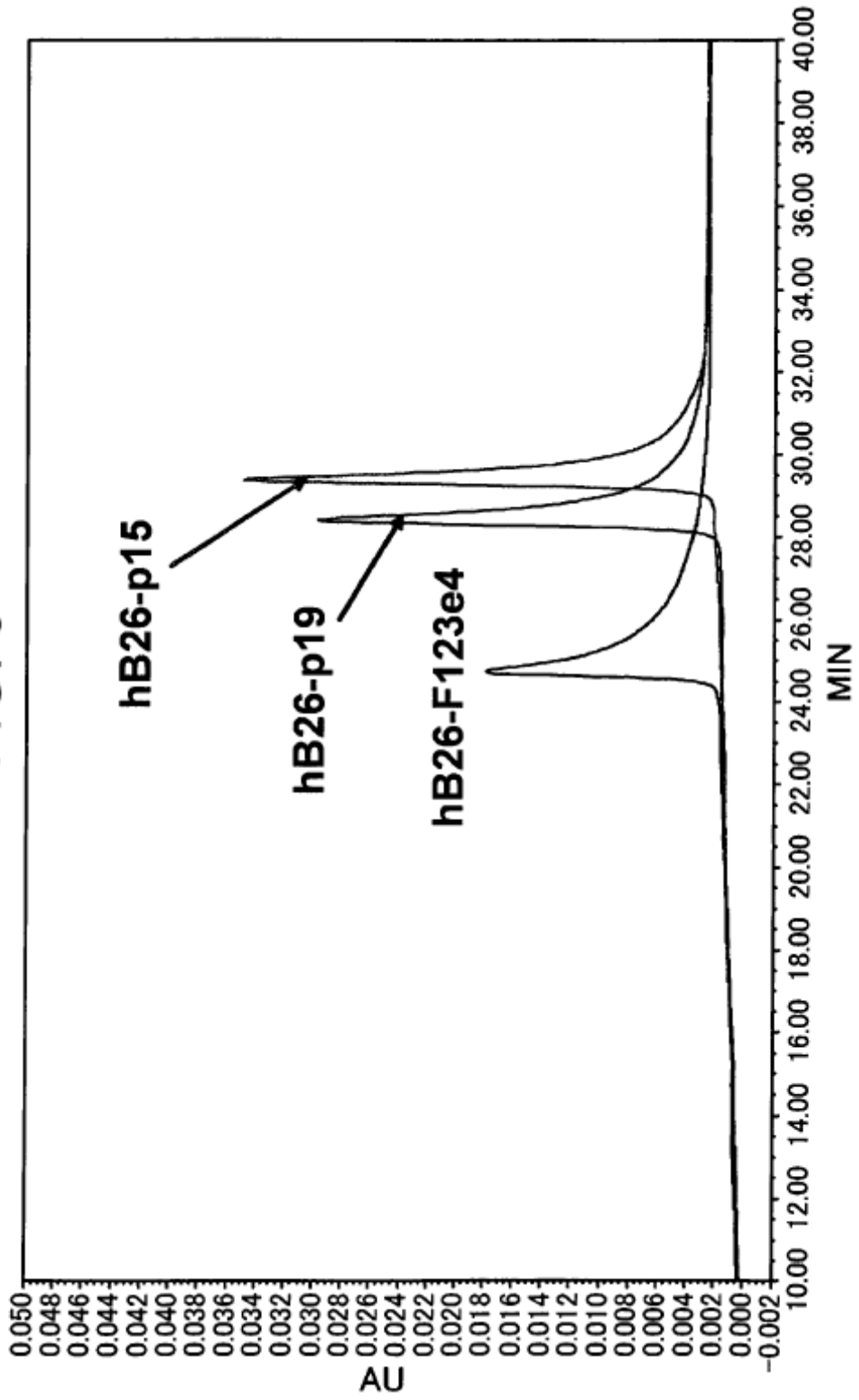


FIG. 6

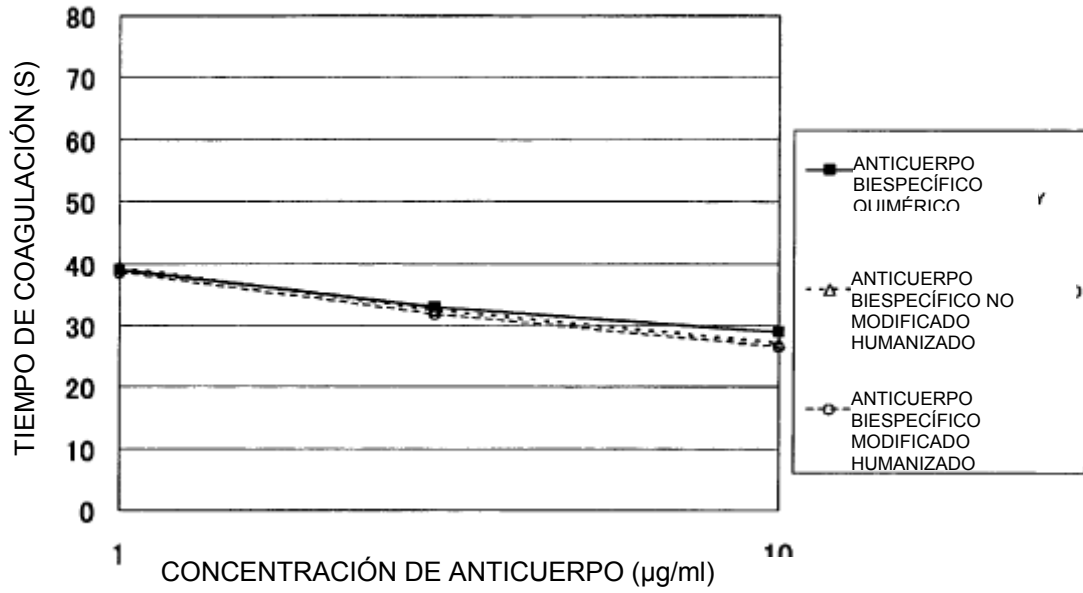


FIG. 7

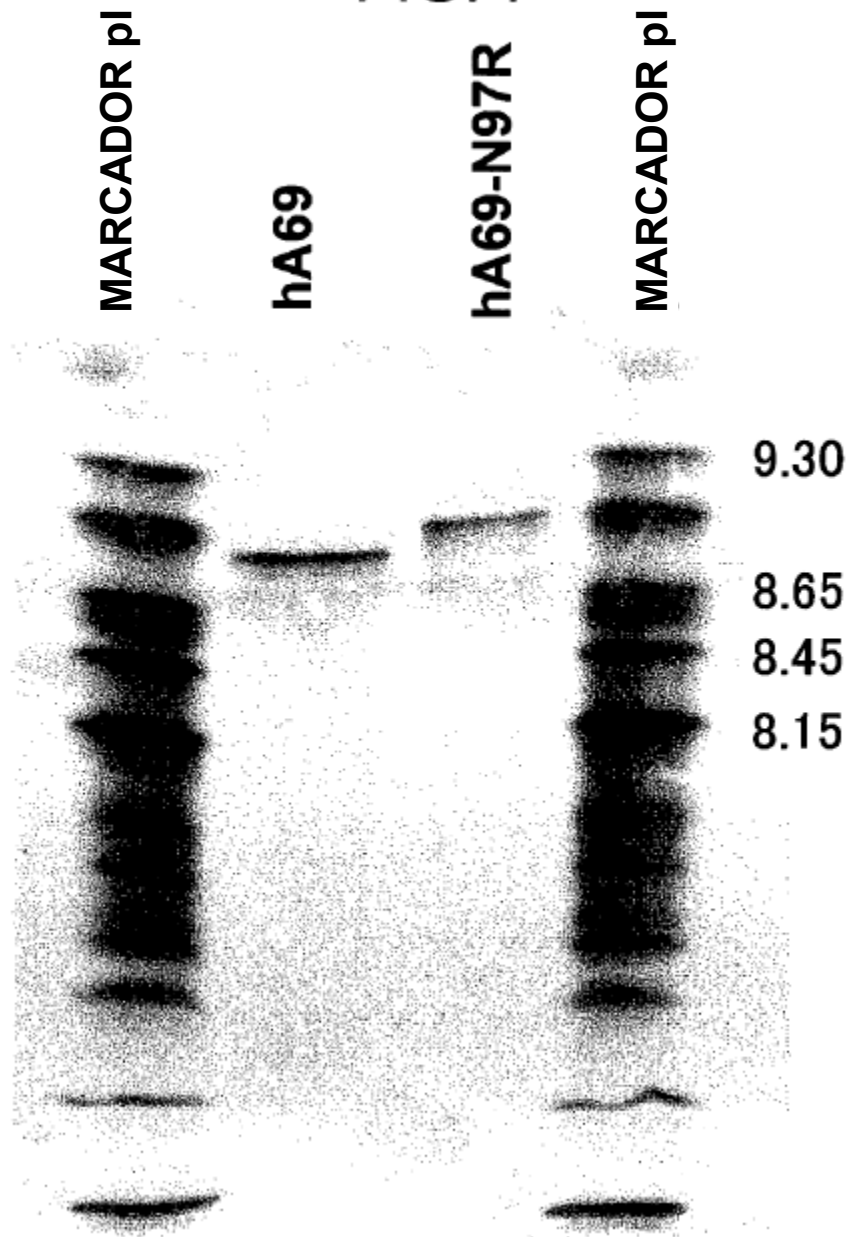


FIG. 8

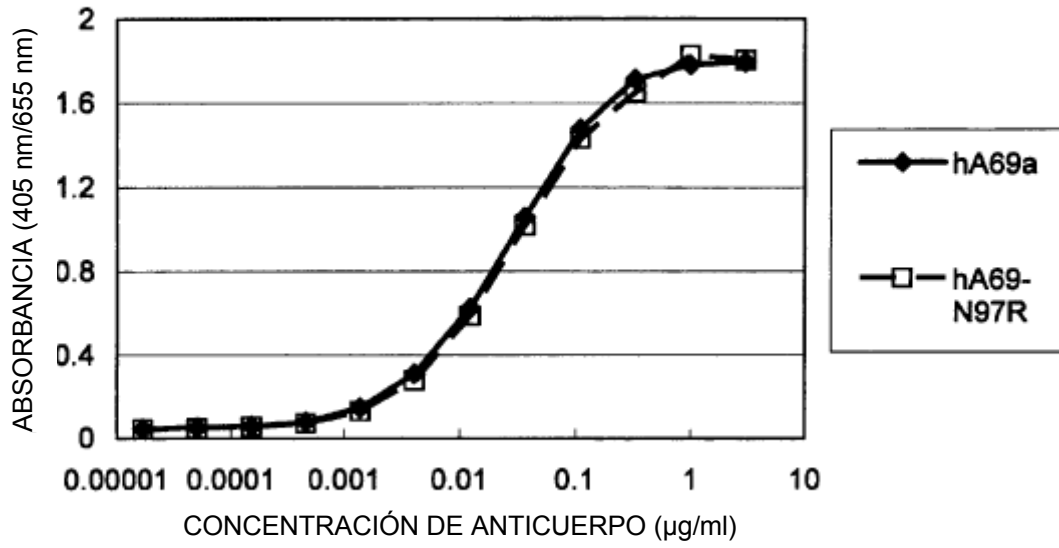
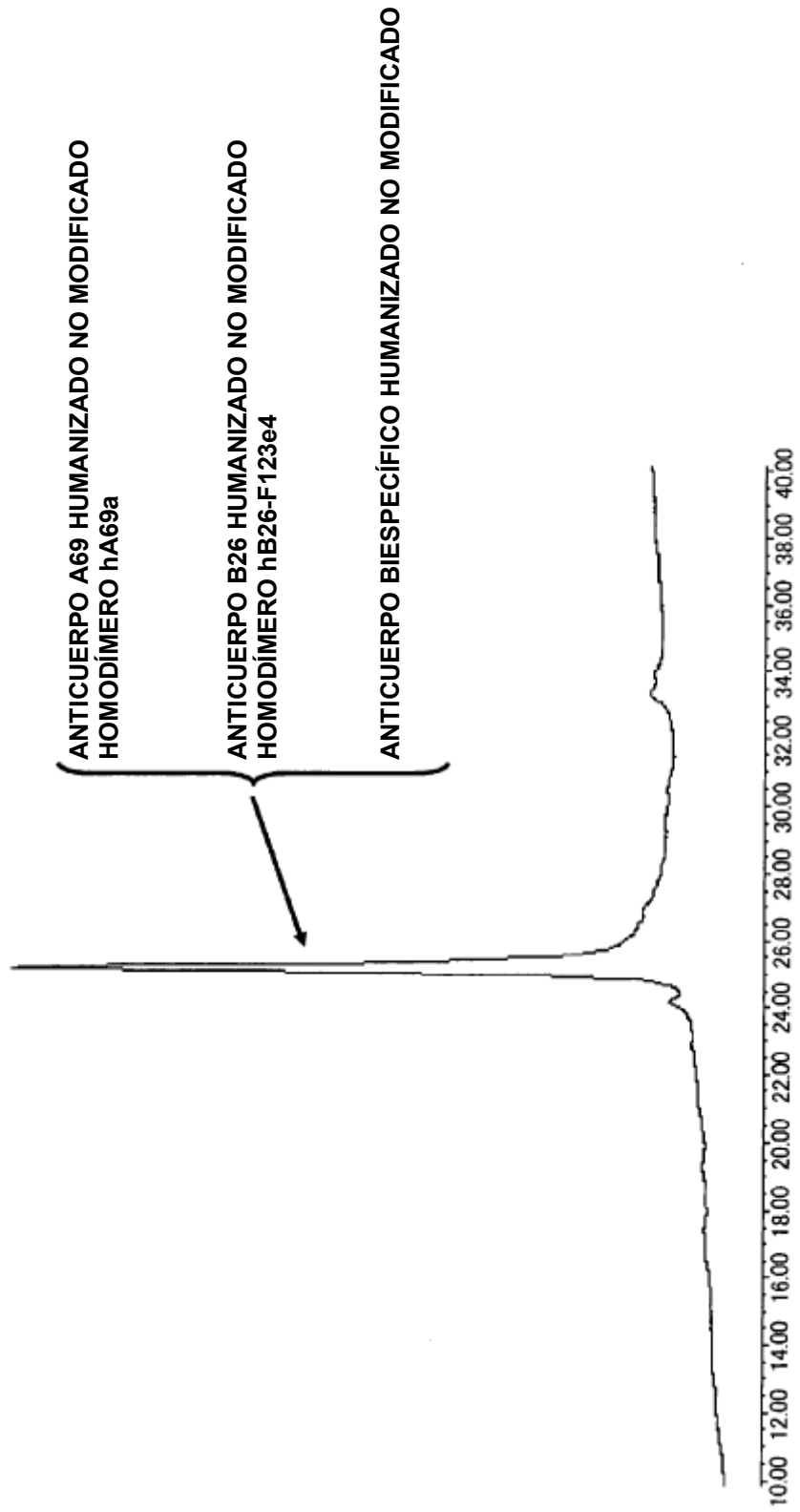


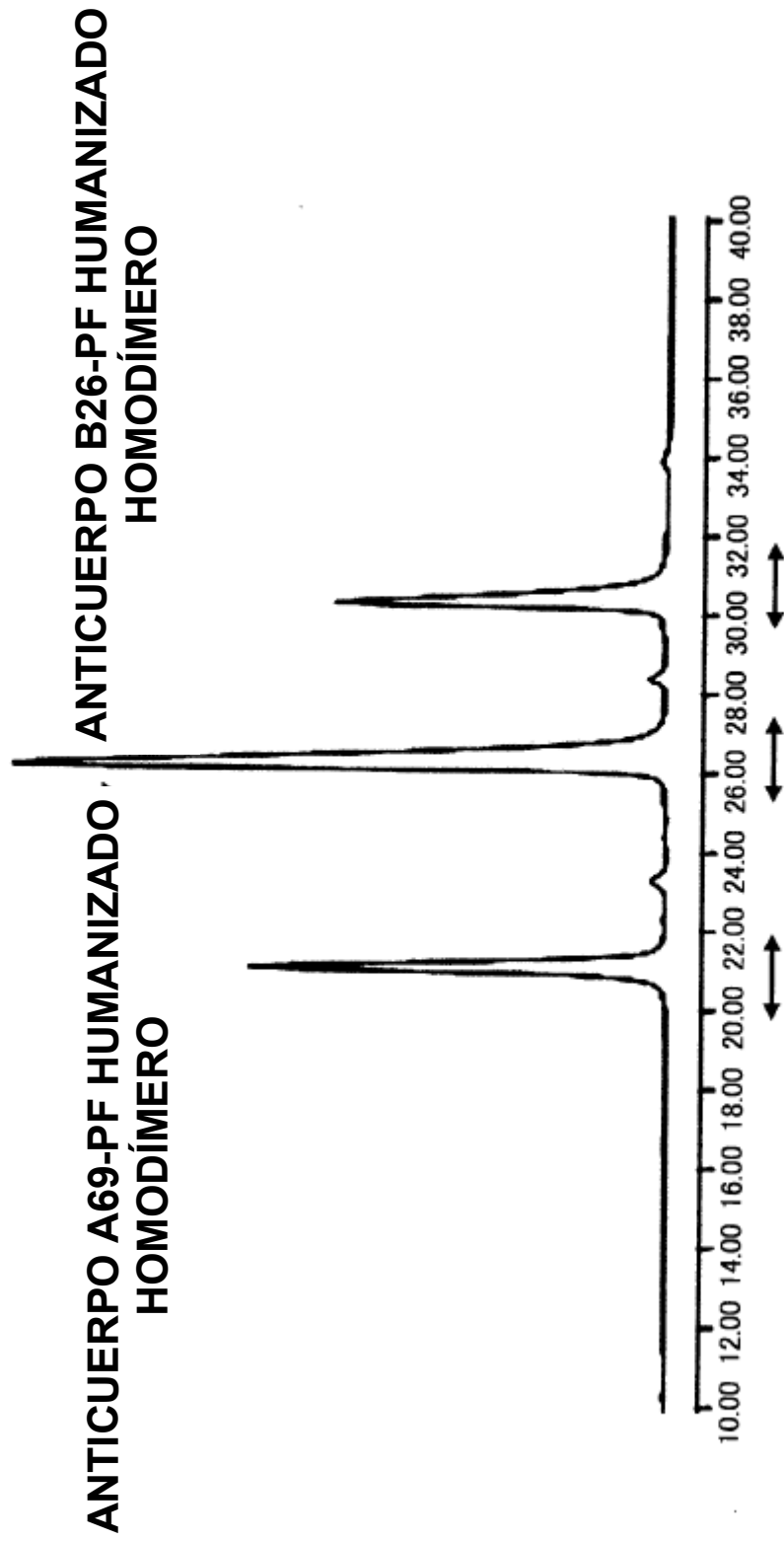
FIG. 9



c

FIG. 10

ANTICUERPO PF BIESPECÍFIO HUMANIZADO



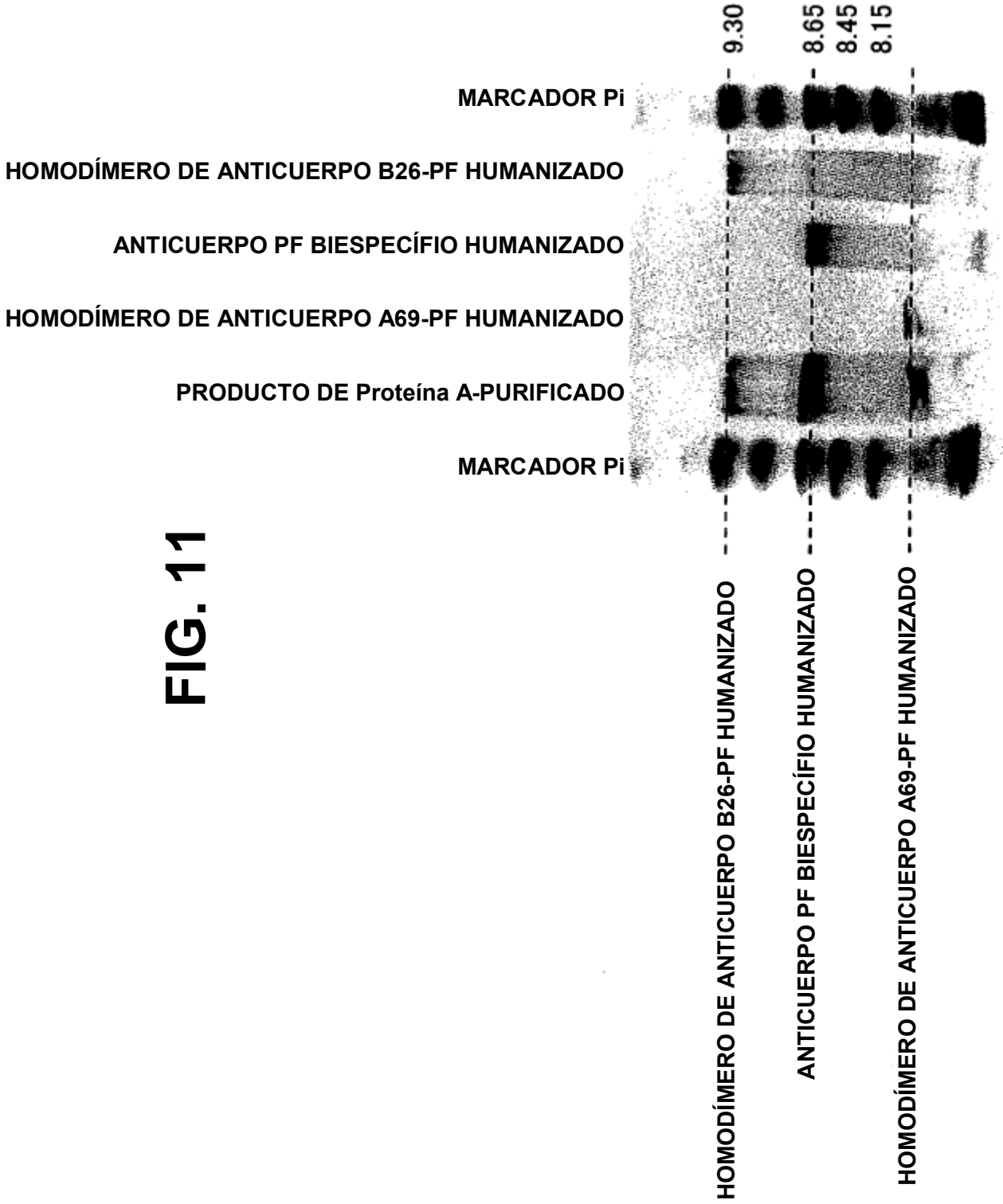


FIG. 12

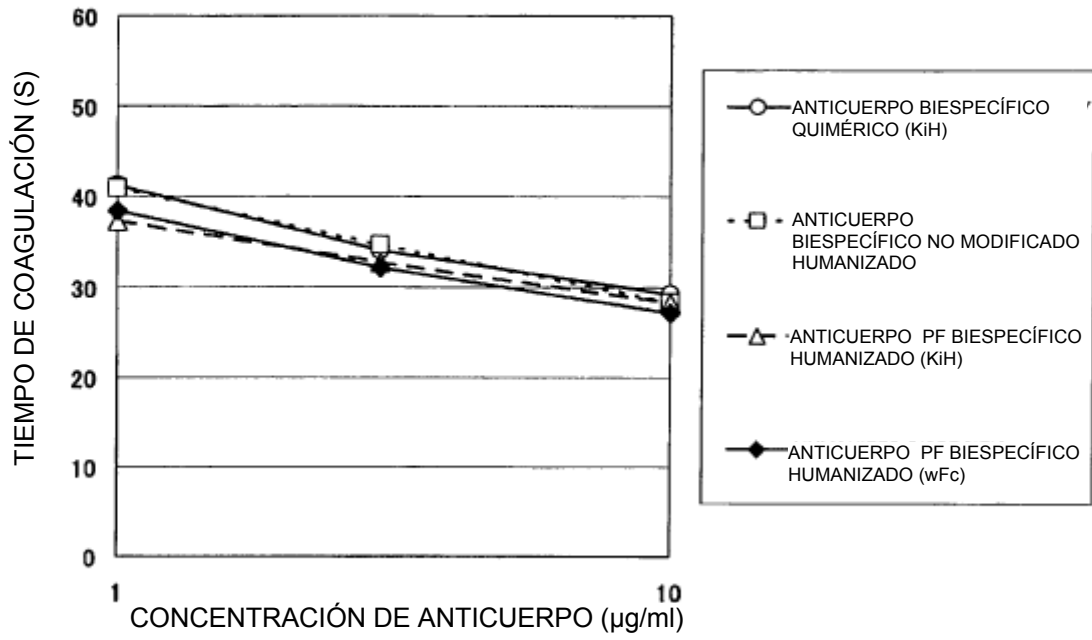


FIG. 13

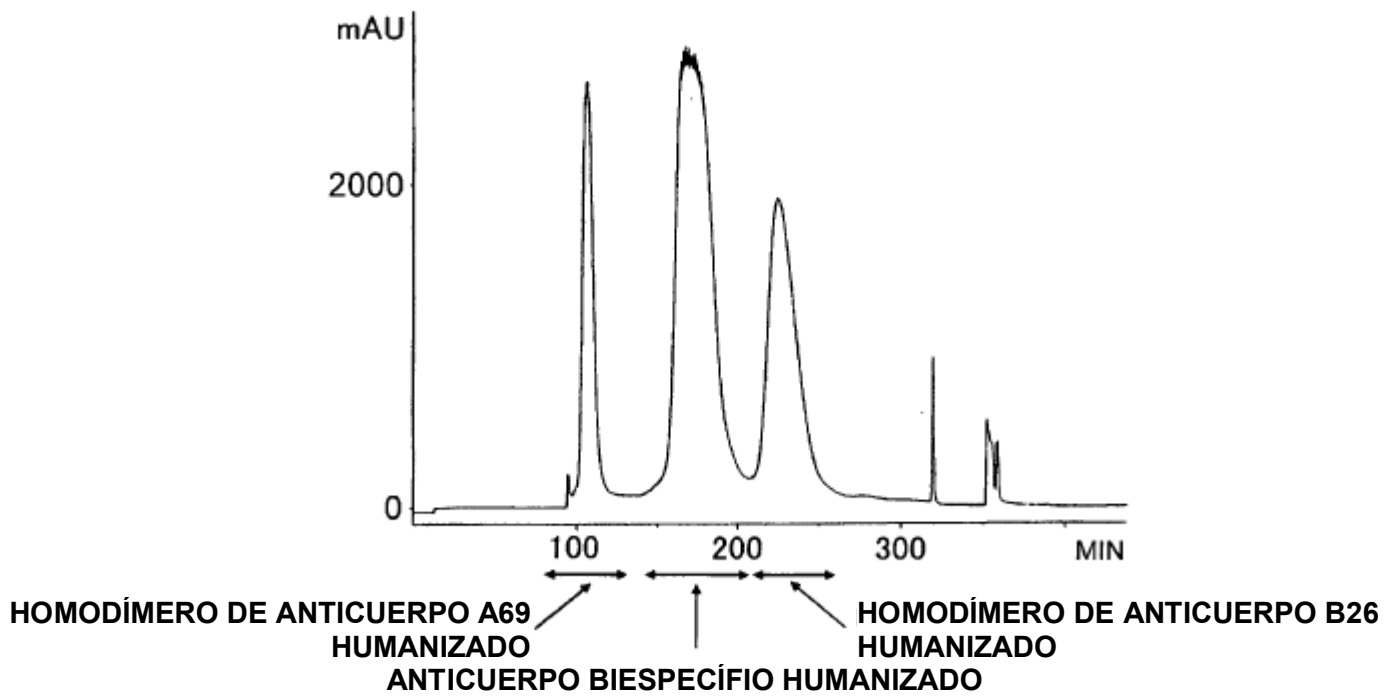


FIG. 14

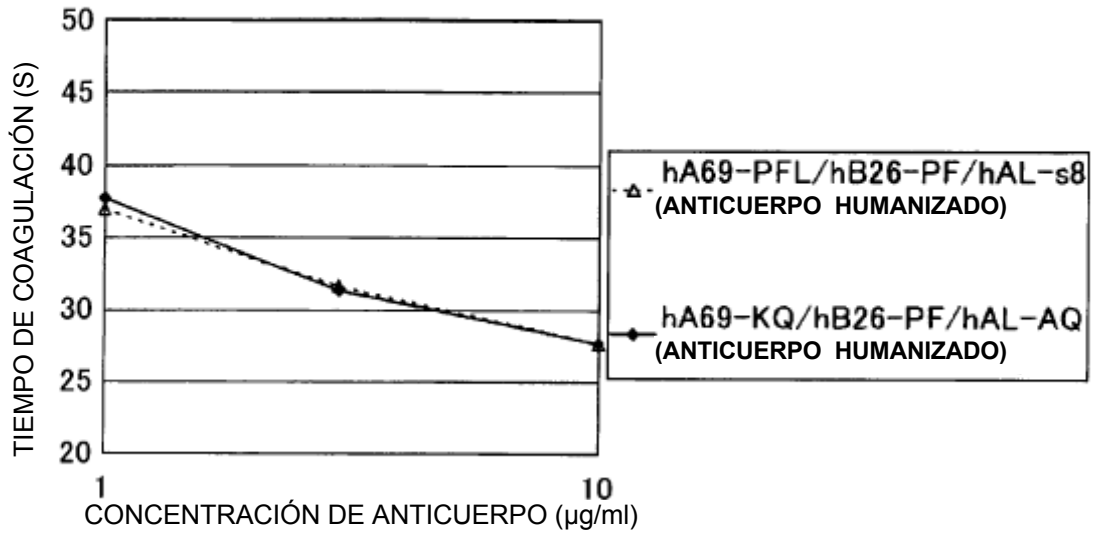


FIG. 15

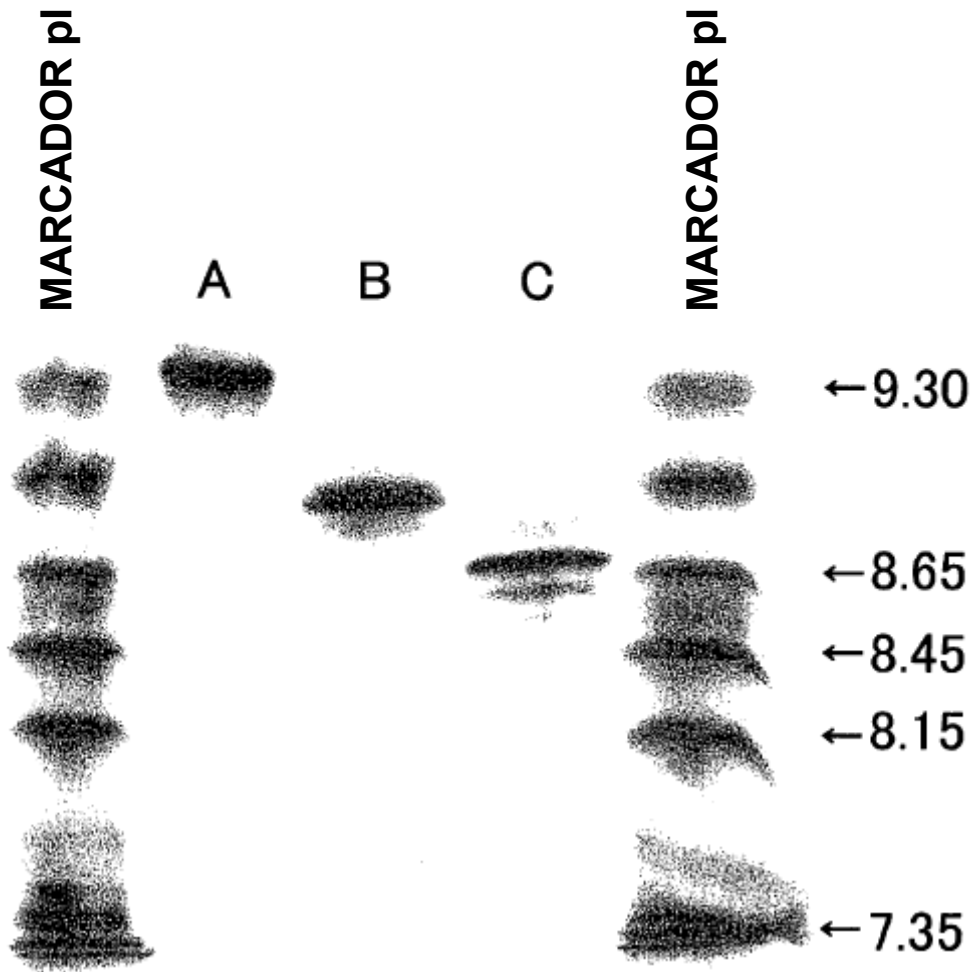


FIG. 16

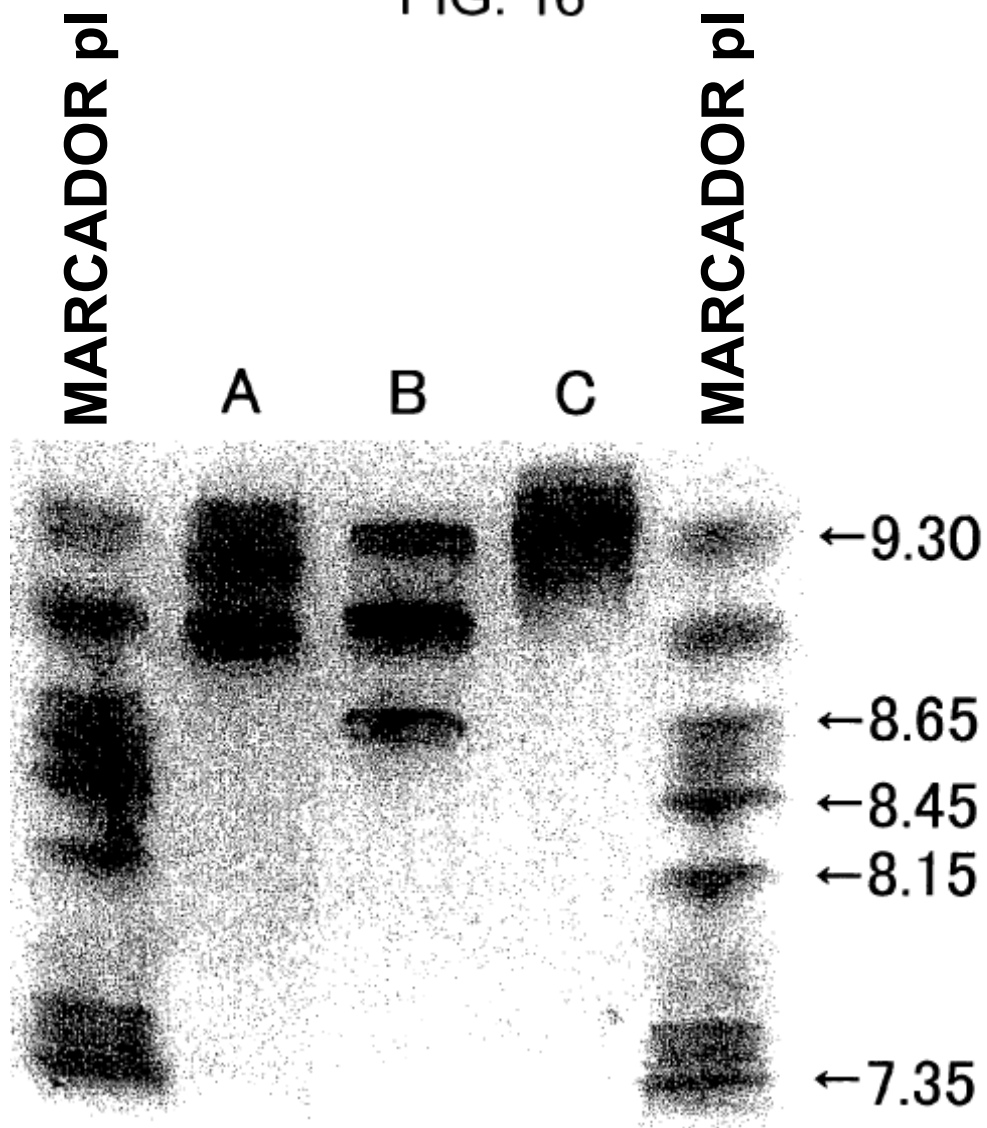


FIG. 17

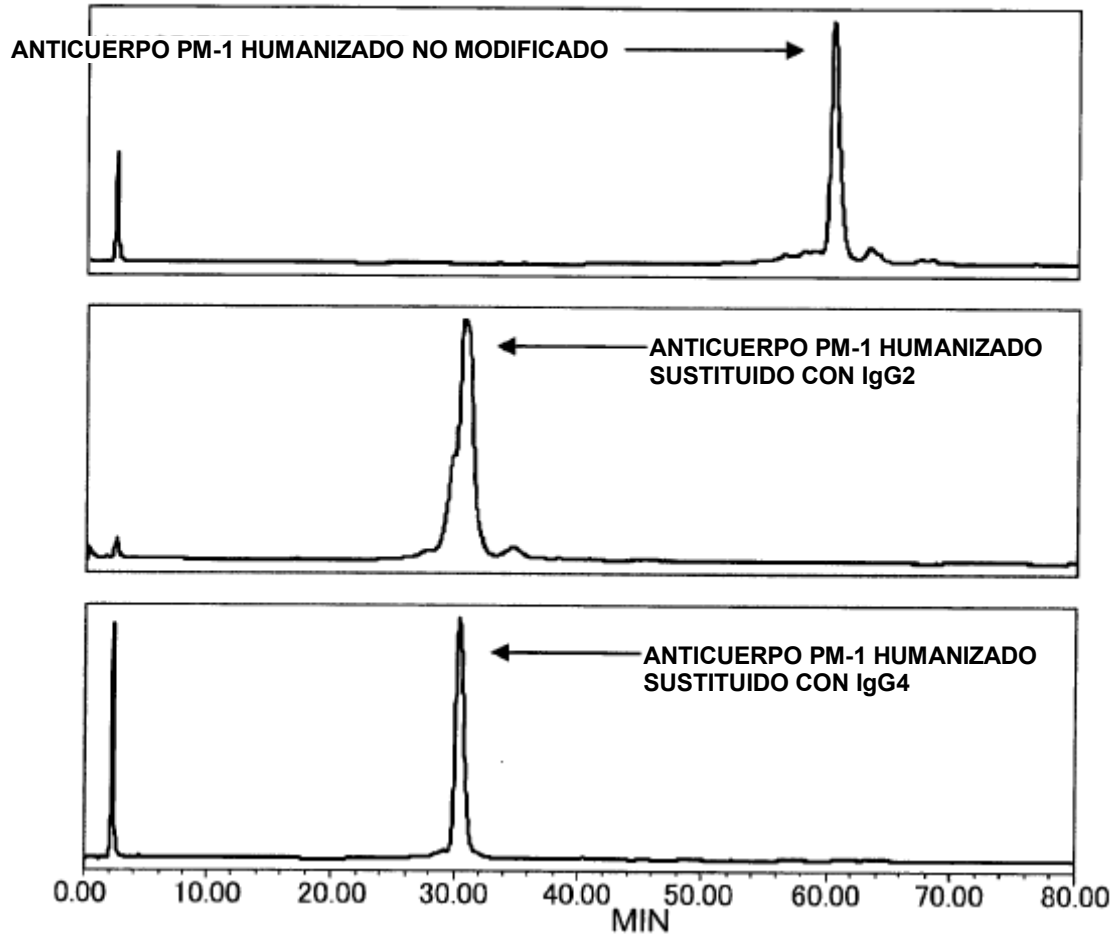


FIG. 18

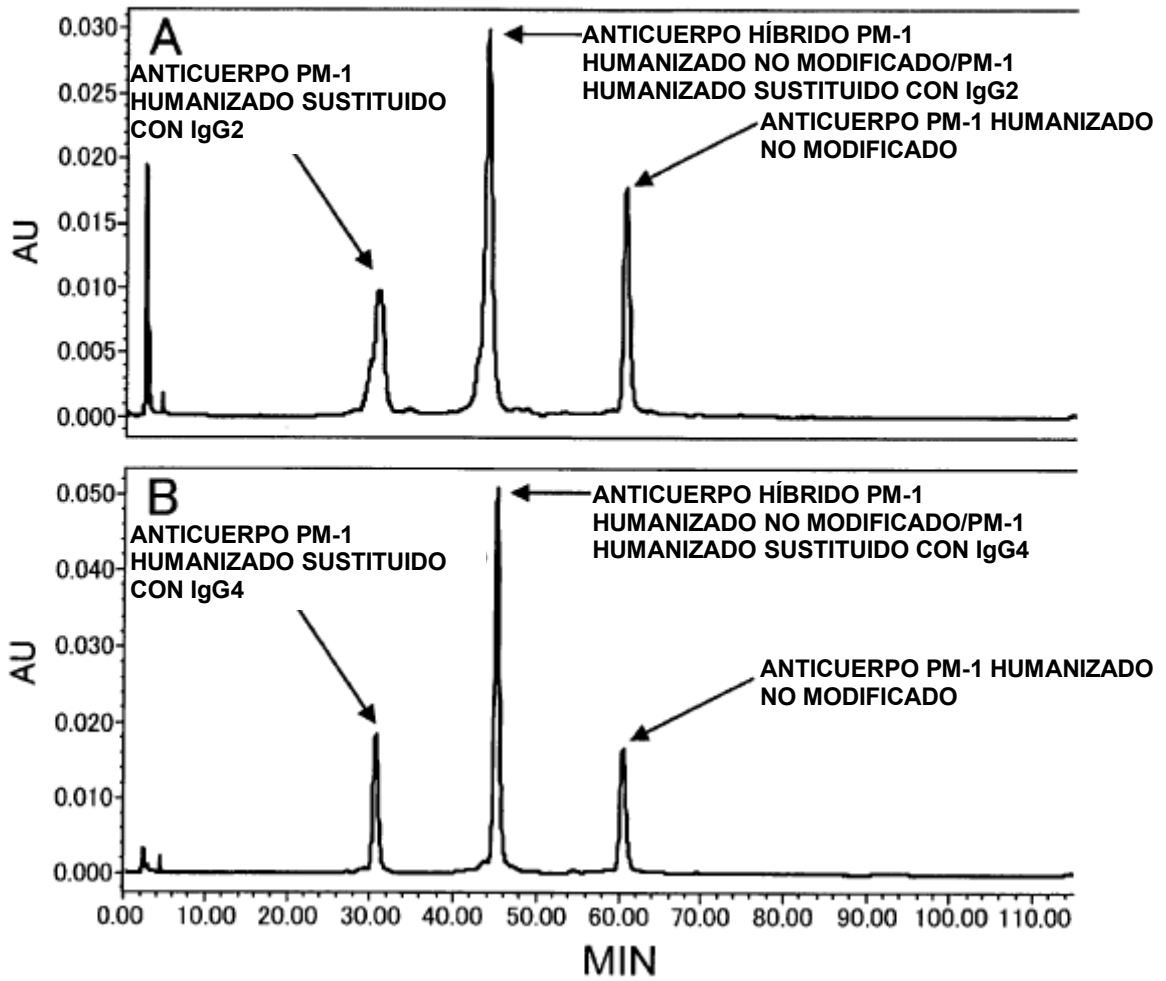


FIG. 19

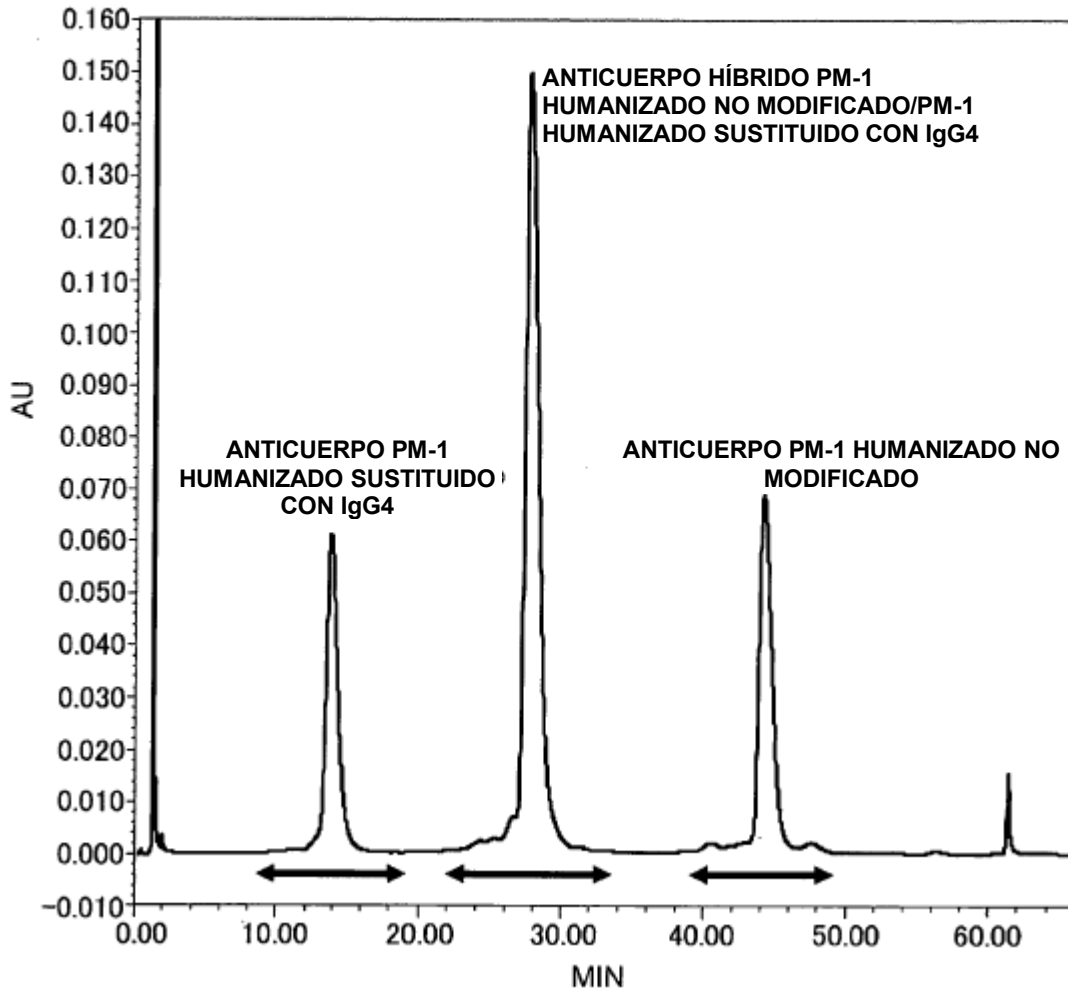


FIG. 20

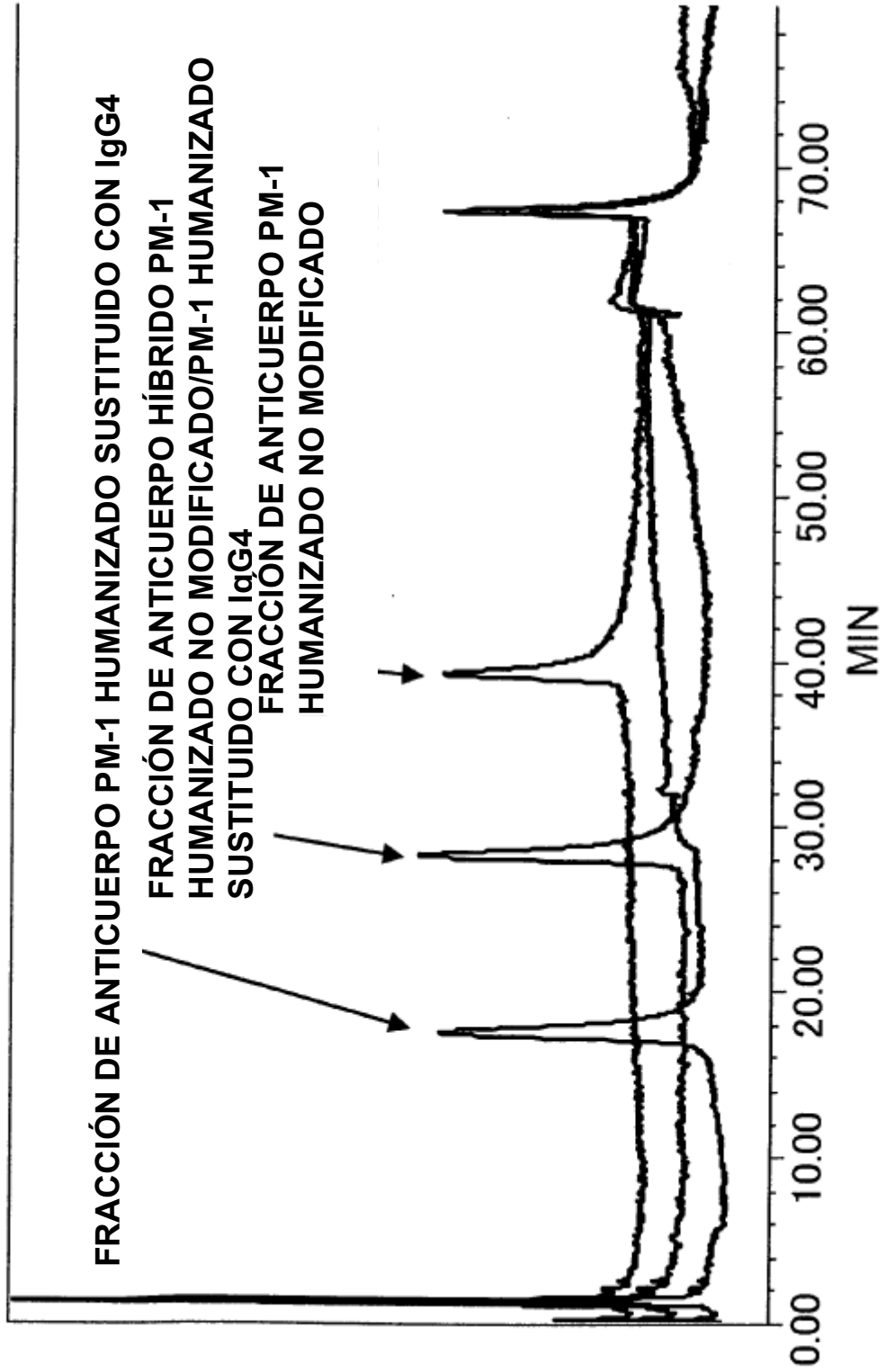


FIG. 21

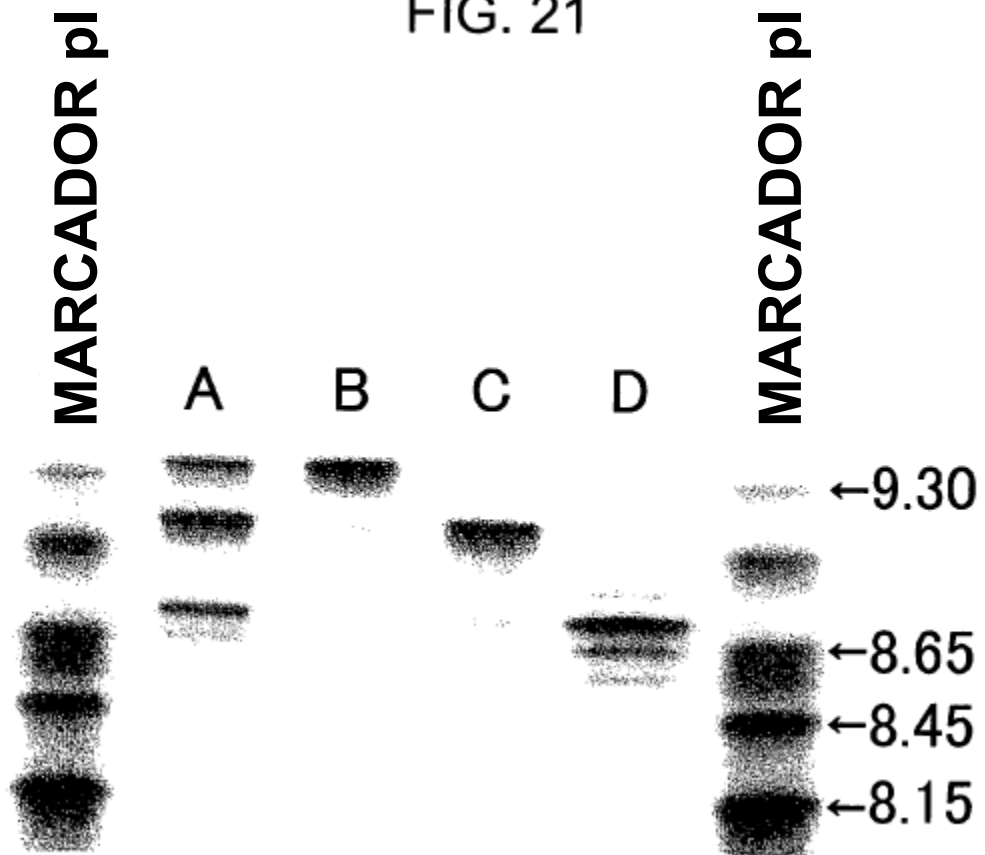


FIG. 22

