

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 682 081**

51 Int. Cl.:

C07K 16/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.10.2012 PCT/US2012/059810**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.04.2013 WO13055958**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.10.2012 E 12778018 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018 EP 2766397**

54 Título: **Ensamblaje mejorado de anticuerpos biespecíficos**

30 Prioridad:

**11.10.2011 US 201161545863 P
12.10.2011 US 201161546503 P
16.11.2011 US 201161560704 P
27.07.2012 US 201261676837 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.09.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**GIESE, GLEN;
PERSSON, JOSEFINE;
WILLIAMS, AMBROSE;
LIM, AMY y
SCHEER, JUSTIN**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 682 081 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

Ensamblaje mejorado de anticuerpos biespecíficos

5 **Campo técnico**

Esta divulgación se refiere a composiciones y procedimientos mejorados de ensamblaje de proteínas heteromultiméricas tales como anticuerpos biespecíficos.

10 **Antecedentes**

Los anticuerpos monoclonales del tipo IgG contienen dos brazos de unión a antígeno idénticos y un dominio constante (Fc). Los anticuerpos con una especificidad diferente en sus brazos de unión normalmente no se producen en la naturaleza y, por lo tanto, se han de elaborar con la ayuda de ingeniería química (por ejemplo, reticulación química, etc.), ADN recombinante y/o tecnología de fusión celular.

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

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

Otras moléculas multiespecíficas se han analizado en otra parte. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a: Fisher *et al.*, *Pathobiology* (2007) 74:3-14 (revisión de diversos formatos biespecíficos); patente de EE. UU. n.º 6.660.843, expedida el 9 de diciembre de 2003 para Feige *et al.* (peptidocuerpos, del inglés "*peptibodies*"); publicación de patente de EE. UU. n.º 2002-004587 publicada el 10 de enero de 2002 (anticuerpos multiespecíficos); patente de EE. UU. n.º 7612181 expedida el 3 de noviembre de 2009 para Wu *et al.* (formato de dominio variable doble); patente de EE. UU. n.º 6.534.628, Nord K *et al.*, *Prot Eng* (1995) 8:601-608, Nord K *et al.*, *Nat Biotech* (1997) 15:772-777, y Grönwall *et al.*, *Biotechnol Appl Biochem.* (2008) Jun; 50(Pt 2):97-112 (affibodies); Martens *et al.*, *Clin Cancer Res* (2006), 12: 6144-6152 y Jin *et al.*, *Cancer Res* (2008) 68(11):4360-4368 (anticuerpos de un brazo); Bostrom *et al.*, *Science* (2009) 323:1610-1614 (Fab de doble acción, también conocidos como anticuerpos de valencia mixta). Otros formatos son conocidos por los expertos en la técnica.

La fabricación de material de calidad clínica sigue siendo un desafío para los anticuerpos en general y en especial para las moléculas multiespecíficas descritas anteriormente. Como se indica anteriormente, existen muchas vías para la producción de moléculas con brazos de unión mixtos, es decir, brazos de unión que no son idénticos entre sí. Pero cada uno de estos procedimientos tiene sus inconvenientes.

La reticulación química es laboriosa ya que puede que sea necesario que las especies relevantes se purifiquen a partir de homodímeros y otros subproductos indeseables. Además, las etapas de modificación química pueden alterar la integridad de las proteínas dando lugar por tanto a una mala estabilidad. Por tanto, este procedimiento a menudo es ineficaz y puede dar lugar a una pérdida de actividad del anticuerpo.

La tecnología de fusión celular (por ejemplo, hibridomas híbridos) expresa dos cadenas pesadas y dos ligeras que se ensamblan aleatoriamente dando lugar a la generación de 10 combinaciones de anticuerpos. Los anticuerpos heteromultiméricos deseados solo son una pequeña fracción de los anticuerpos así producidos. La purificación de las proteínas heteromultiméricas deseadas reduce drásticamente los rendimientos de producción e incrementa los costes de fabricación.

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

También se han usado técnicas de ADN recombinante para generar anticuerpos biespecíficos de "botón en ojal" (del inglés "*knob-into-hole*"). Véase la solicitud de patente de EE. UU. 20030078385 (Arathoon *et al.* - Genentech). Una limitación de esta estrategia es que las cadenas ligeras de los dos anticuerpos originales tienen que ser idénticas para evitar el emparejamiento incorrecto y la formación de moléculas no deseadas y/o inactivas cuando se expresan en la misma célula.

Además, una de las circunstancias limitantes durante la hibridación y purificación es la eficacia de la oxidorreducción. Típicamente, el heterodímero oxidado solo constituye un 70-80 % de la proteína después de esta etapa (BioAnalyzer y EM-TOF). El 20-30 % restante del anticuerpo es dimérico y carece de unión covalente (SEC-LLS). Esto se puede eliminar pero tiene un impacto significativo en los rendimientos globales.

El documento WO2007/147901A1 divulga un procedimiento para producir anticuerpos biespecíficos que comprenden sustituciones en la(s) región/regiones constante(s) por lo que las cuatro cadenas expresadas por separado del anticuerpo se asocian y se repliegan mezclando los polipéptidos en una solución que comprende glutatión oxidado (GSSG).

Por tanto, sigue existiendo la necesidad de mejorar el rendimiento global en la producción de anticuerpos, en especial heterodímeros. En el presente documento se describen procedimientos que pueden mejorar el rendimiento global de anticuerpos biespecíficos, heterodímeros y similares. Estos y otros aspectos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción de la invención proporcionada en el presente documento.

Sumario de la invención

La producción de proteínas heteromultiméricas ensambladas a partir de dos o más polipéptidos que contienen bisagras, por ejemplo, anticuerpos multiespecíficos a partir de dos o más semianticuerpos (del inglés, *half-antibodies*), usando técnicas actuales tiene inconvenientes que incluyen la producción de una mezcla de productos, rendimiento reducido y disminución/eliminación de la función efectora entre otros. Además, a menudo se producen agregación y precipitación durante la preparación de cada polipéptido que contiene bisagra y durante el ensamblaje o hibridación de los heteromultímeros. La agregación y precipitación pueden reducir en gran medida el rendimiento del heteromultímero deseado. Por tanto, es deseable producir proteínas heteromultiméricas de manera más eficaz y a niveles mayores.

En el presente documento se divulgan procesos/procedimientos de producción eficaces para la producción económica de proteínas heteromultiméricas, por ejemplo, anticuerpos multiespecíficos, usando o modulando uno o más de los siguientes, incluyendo, sin limitación: un estabilizante, un solubilizante, una condición reductora, pH seleccionado y temperatura seleccionada, etc. Los procedimientos inventivos descritos en el presente documento disminuyeron la pérdida de proteína para la precipitación y/o agregación y mejoraron el rendimiento global de la producción de proteínas heteromultiméricas, tal como la producción de anticuerpos biespecíficos.

La materia objeto de la invención se establece en las reivindicaciones adjuntas.

En un aspecto, se proporciona un procedimiento de producción de un anticuerpo biespecífico, comprendiendo dicho procedimiento:

- a. proporcionar un primer semianticuerpo a pH 5-9, en presencia de un primer solubilizante, en el que el primer semianticuerpo comprende un dominio de heteromultimerización;
- b. proporcionar un segundo semianticuerpo a 5-9 en presencia de un segundo solubilizante, en el que el segundo semianticuerpo comprende un dominio de heteromultimerización;
- c. mezclar el primer y segundo semianticuerpos en una condición reductora para formar una mezcla de ensamblaje, en la que se añade un reductor a la mezcla en un exceso molar de 50-400x con respecto a la cantidad total de los semianticuerpos, en la que el reductor es GSH; e
- d. incubar la mezcla de ensamblaje para formar o producir un anticuerpo biespecífico que comprende el primer y segundo semianticuerpos, en el que el primer semianticuerpo interacciona con el segundo semianticuerpo en el dominio de heteromultimerización.

En determinados modos de realización de este aspecto, la etapa a y/o etapa b está precedida por la etapa de purificar el primer y/o el segundo semianticuerpo. En determinados modos de realización particulares, el primer y/o segundo semianticuerpo se purifica con proteína A.

En un aspecto de la divulgación, se proporciona un procedimiento de producción de un heteromultímero, comprendiendo dicho procedimiento proporcionar una mezcla que contiene arginina de polipéptidos que contienen bisagras, teniendo dicha mezcla un pH de entre 4 y 9, preferentemente 5-9, añadir un reductor débil e incubar en

condiciones para producir un heteromultímero.

En otro aspecto de la divulgación, se proporciona un procedimiento de producción de una proteína heteromultimérica, comprendiendo dicho procedimiento:

- 5 a. obtener un primer polipéptido que contiene bisagra purificado con proteína A;
- b. obtener un segundo polipéptido que contiene bisagra purificado con proteína A;
- 10 c. ajustar el pH de cada semianticuerpo a entre 4 y 9;
- d. mezclar el primer y segundo polipéptido que contiene bisagra para obtener una mezcla de ensamblaje,
- 15 e. agregar un exceso molar de un reductor débil a la mezcla de ensamblaje; e
- f. incubar la mezcla de ensamblaje para formar una proteína heteromultimérica que comprende el primer y segundo polipéptido que contiene bisagra.

En otro aspecto de la divulgación, se proporciona un procedimiento de producción de una proteína heteromultimérica, comprendiendo dicho procedimiento:

- a. obtener un primer polipéptido que contiene bisagra purificado con proteína A;
- 25 b. obtener un segundo polipéptido que contiene bisagra purificado con proteína A;
- c. ajustar el pH de cada polipéptido que contiene bisagra a entre 4 y 9 en presencia de L-arginina;
- d. mezclar el primer y segundo polipéptido que contiene bisagra para obtener un conjunto de polipéptidos que contienen bisagras mixto, e
- 30 e. incubar para formar una proteína heteromultimérica que comprende el primer y segundo polipéptido que contiene bisagra.

En determinados modos de realización de este aspecto, el conjunto de polipéptidos que contienen bisagras mixto se incuba en una condición reductora. En determinados modos de realización, el polipéptido que contiene bisagra comprende un semianticuerpo, una inmunoadhesina o un fragmento funcional del mismo. En determinados otros modos de realización, la arginina está presente a una concentración de 20 mM-1 M, de 20 mM a 200 mM o de 50 mM a 200 mM. En determinados otros modos de realización, se añade PVP a la etapa d o etapa e. En determinados modos de realización, el pH se ajusta después de mezclar.

Los presentes solicitantes descubrieron inesperadamente que un mantenimiento de pH intermedio de un polipéptido que contiene bisagra, tal como un semianticuerpo, puede promover el cambio de conformación que potencia el posterior ensamblaje de los polipéptidos que contienen bisagras. En determinados modos de realización, el pH intermedio está entre 5 y 9, o entre 5 y 9, 5 y 8, 5,5 y 8, 5,5 y 9, 5,7 y 8, 5,7 y 9, 6 y 8, 6 y 9, 7 y 8, 7,5 y 8,5, o 7 y 8,5. Se puede añadir un solubilizante para evitar o minimizar la precipitación inducida por pH del polipéptido que contiene bisagra. En determinados modos de realización particulares, se añade el solubilizante antes del mantenimiento de pH intermedio. En determinados modos de realización, el primer solubilizante y segundo solubilizante se selecciona cada uno del grupo que consiste en arginina, histidina y sacarosa, preferentemente arginina y/o histidina. En determinados otros modos de realización, la arginina es una sal de arginina y/o histidina es una sal de histidina. En determinados otros modos de realización, la arginina es un derivado de arginina y/o histidina es un derivado de histidina. En determinados otros modos de realización, la arginina o histidina es L-arginina o L-histidina. En determinados otros modos de realización, la arginina o histidina es arginina HCl o histidina HCl. En determinados otros modos de realización, la arginina o histidina es fosfato de arginina o fosfato de histidina. En determinados modos de realización, el primer y segundo solubilizantes son diferentes; mientras que en otros modos de realización, el primer y segundo solubilizantes son iguales. En determinados modos de realización preferentes, tanto el primer solubilizante como el segundo solubilizante comprenden arginina. Aún en otros modos de realización, la arginina está presente a una concentración de entre 20 mM a 1 M, de 20 mM a menos de 1 M, de 20 mM a 100 mM, de 20 mM a 200 mM, de 20 mM a 300 mM, de 20 mM a 400 mM, de 50 mM a 100 mM, de 50 mM a 150 mM, de 50 mM a 200 mM, de 50 mM a 250 mM o de 50 mM a 300 mM, preferentemente de 20 mM a 200 mM. Aún en otros modos de realización, el solubilizante comprende un derivado de arginina que incluye, sin limitación, acetilarginina. En otros modos de realización, tanto el primer solubilizante como el segundo solubilizante comprenden histidina presente a una concentración de entre 20 mM a 1 M, de 20 mM a menos de 1 M, de 20 mM a menos de 500 mM, de 20 mM a 100 mM, de 20 mM a 200 mM, de 20 mM a 300 mM, de 20 mM a 400 mM, de 50 mM a 100 mM, de 50 mM a 150 mM, de 50 mM a 200 mM, de 50 mM a 250 mM, de 50 mM a 300 mM, de 50 mM a 400 mM, de 50 mM a 500 mM, o de 50 mM a 600 mM. En determinados modos de realización preferentes, se añade el solubilizante a una concentración de 50 mM. En determinados otros modos de realización, se añade el solubilizante a una concentración de 200 mM. En

determinados modos de realización particulares, se añade arginina o histidina a una concentración de 20 mM, 50 mM, 100 mM o 200 mM. En determinados otros modos de realización particulares, el primer y/o segundo polipéptidos que contienen bisagras se proporcionan en presencia tanto de arginina como de histidina. En otros modos de realización, la arginina e histidina están presentes cada una a una concentración de 20 mM a 1 M, de 20 mM a menos de 1 M, de 20 mM a 100 mM, de 20 mM a 200 mM, de 20 mM a 300 mM, de 20 mM a 400 mM, de 50 mM a 100 mM, de 50 mM a 150 mM, de 50 mM a 200 mM, de 50 mM a 250 mM, o de 50 mM a 300 mM, preferentemente de 50 mM a 200 mM.

En determinados otros modos de realización, el primer y segundo polipéptidos que contienen bisagras se mezclan después de que se ajuste el pH en el primer polipéptido que contiene bisagra y el segundo polipéptido que contiene bisagra por separado. En determinados modos de realización, se añade un solubilizante antes del ajuste de pH.

En determinados modos de realización, el primer polipéptido que contiene bisagra y el segundo polipéptido que contiene bisagra se purifican por separado antes de mezclar; mientras que en otros modos de realización, el primer polipéptido que contiene bisagra y el segundo polipéptido que contiene bisagra se purifican conjuntamente después de mezclar. El polipéptido que contiene bisagra comprende un semianticuerpo. En determinados modos de realización, la proteína heteromultimérica ensamblada se puede someter a purificación adicional.

Se puede usar cualquier procedimiento adecuado para la purificación incluyendo, sin limitación, purificación por cromatografía con proteína A, cromatografía con proteína G, cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), fraccionamiento en columna de inmunoafinidad, precipitación con etanol, cromatografía de fase inversa en sílice o en una resina de intercambio iónico tal como DEAE, cromatografía de exclusión, SDS-PAGE, precipitación con sulfato de amonio y filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75 y otros procedimientos de purificación similares, y combinaciones de los mismos.

En determinados modos de realización, el polipéptido que contiene bisagra, que es un semianticuerpo, se purifica por cromatografía con proteína A o proteína G. En otro modo de realización, el primer y segundo polipéptidos que contienen bisagras se mezclan antes de la purificación con proteína A y se purifican conjuntamente sobre proteína A. En otros modos de realización, el pH se ajusta antes de mezclar los polipéptidos purificados con proteína A. En determinados modos de realización, se añade un solubilizante antes del ajuste de pH.

En determinados otros modos de realización, el polipéptido que contiene bisagra se purifica por HIC o una columna de intercambio iónico. Está dentro de la capacidad de un experto en la técnica seleccionar procedimientos de purificación adecuados. Por ejemplo, el polipéptido que contiene bisagra se puede purificar por una columna con proteína A seguido de una columna de intercambio iónico; el polipéptido que contiene bisagra también se puede purificar por una columna con proteína A seguido de una columna de filtración en gel y/o HIC. En otros ejemplos, el polipéptido que contiene bisagra se puede purificar por una o más columnas de intercambio iónico antes de la purificación por una columna con proteína A. En determinados modos de realización, los tampones de lavado y/o elución usados durante cualquiera de las etapas de purificación de los polipéptidos que contienen bisagras no contienen arginina y/o histidina.

Aún en otros modos de realización, el semianticuerpo eluido de la matriz de proteína A u otra matriz de columna a pH ácido se ajusta a un pH intermedio. Este ajuste de pH posterior (también denominado mantenimiento de pH intermedio) puede provocar la precipitación del polipéptido que contiene bisagra, tal como un semianticuerpo y, por tanto, dar lugar a un rendimiento reducido de la proteína heteromultimérica ensamblada. Por tanto, en determinados modos de realización, el semianticuerpo eluido de la columna con proteína A o proteína G a pH ácido se proporciona en presencia de un solubilizante antes del ajuste de pH. En la circunstancia en la que la etapa de ajuste de pH no sea necesaria, en determinados modos de realización se añade preferentemente un solubilizante al polipéptido que contiene bisagra purificado para evitar o reducir la precipitación y/o agregación.

Además del mantenimiento de pH intermedio, los presentes solicitantes descubrieron inesperadamente que el calentamiento puede potenciar el cambio de conformación y/o ensamblaje de los polipéptidos que contienen bisagras, tales como semianticuerpos. En consecuencia, en determinados modos de realización, una, más o todas las etapas a-d de los procedimientos inventivos se calientan a una temperatura de entre 15 °C y 39 °C, 15 °C y 42 °C, 18 °C y 37 °C, 20 °C y 42 °C, 20 °C y 25 °C, 25 °C y 42 °C, 25 °C y 35 °C, 25 °C y 39 °C, 30 °C y 35 °C, 32 °C y 35 °C o 32 °C y 37 °C, preferentemente 35 °C y 37 °C, durante al menos 30 minutos. En determinados modos de realización, el tiempo de incubación es de hasta 72 horas, en especial a temperatura ambiente. En algunos modos de realización, el tiempo de incubación es de 3 horas a 35 °C. En determinados otros modos de realización, la temperatura es de o aproximadamente 30 °C, 35 °C o 37 °C.

El calentamiento, sin embargo, también puede incrementar la agregación y/o precipitación. En consecuencia, en determinados modos de realización particulares, se añade un solubilizante al semianticuerpo eluido de una columna con proteína A o proteína G antes del calentamiento.

El primer y/o segundo polipéptido que contiene bisagra comprende un semianticuerpo. En determinados modos de realización, el semianticuerpo es un semianticuerpo IgG. En determinados modos de realización particulares, el semianticuerpo IgG es del isotipo IgG1, IgG4 o IgG2. En determinados modos de realización ventajosos, el péptido

señal de la molécula de inmunoglobulina se retiene para facilitar la secreción del semianticuerpo, en especial cuando se produce en células de mamífero. En determinados modos de realización, el procedimiento inventivo comprende proporcionar un primer y un segundo semianticuerpo, a pH 5-9 en presencia de arginina a una concentración de aproximadamente 50 mM, y de forma alternativa o adicional histidina a una concentración de aproximadamente 200 mM. En determinados modos de realización, el primer y/o el segundo semianticuerpo comprende cada uno un dominio de unión a antígeno específico para un antígeno diferente o un epítipo diferente en el mismo antígeno y el anticuerpo completo ensamblado es un anticuerpo biespecífico. En determinados otros modos de realización, el primer y segundo semianticuerpos son del mismo isotipo; mientras que en otros modos de realización, el primer y el segundo semianticuerpo son de isotipos diferentes.

El semianticuerpo puede comprender un dominio V_L , un dominio V_H , un dominio bisagra, un dominio CH_2 y/o un dominio CH_3 . El semianticuerpo también puede ser un polipéptido monocatenario que comprende además un anclaje, en el que dicho polipéptido monocatenario comprende dominios situados entre sí en un sentido de N terminal a C terminal como sigue: V_L -anclaje- V_H -bisagra- CH_2 - CH_3 . En determinados otros modos de realización, el semianticuerpo comprende además un dominio C_L y un dominio CH_1 ; y en otros modos de realización, el semianticuerpo puede ser un polipéptido monocatenario que comprende además un anclaje, en el que dicho polipéptido monocatenario comprende dominios situados entre sí en un sentido de N terminal a C terminal como sigue: V_L - C_L -anclaje- V_H - CH_1 -bisagra- CH_2 - CH_3 .

El anclaje puede comprender uno o más residuos de glicina (G) y serina (S). En otros modos de realización, el anclaje comprende repeticiones de GGS. El anclaje, por ejemplo, tiene entre 15 y 50 aminoácidos de longitud. En un modo de realización particular, el anclaje tiene entre 20 y 32 aminoácidos de longitud, por ejemplo, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 o 32 aminoácidos de longitud. En determinados modos de realización, el anclaje es escindible. En otros modos de realización, el anclaje puede ser o no escindible de la proteína. En determinados modos de realización preferentes, el anclaje es escindible en dos sitios en o cerca del extremo N y C del anclaje por la misma enzima. En un modo de realización, el anclaje comprende el sitio de escisión para proteasas tales como furina. En otro modo de realización, el anclaje se escinde por furina en el sitio de escisión RXRXRR (SEQ ID NO:1), en la que X es cualquier aminoácido. En algunos modos de realización, el primer polipéptido que contiene bisagra es un semianticuerpo y el segundo polipéptido que contiene bisagra es un semianticuerpo monocatenario.

En otro modo de realización, la invención proporciona una proteína que comprende un anclaje y un complejo de componente Fc, en la que el anclaje puede ser o no escindible de la proteína.

De acuerdo con la presente invención, el primer y segundo polipéptidos que contienen bisagras comprenden un dominio de heteromultimerización. El dominio de heteromultimerización puede ser una mutación de botón en ojal, cremalleras de leucina, electrostático y similares. El primer polipéptido que contiene bisagra puede comprender un botón y el segundo polipéptido que contiene bisagra puede comprender un ojal. En determinados modos de realización, el polipéptido que contiene bisagra comprende un semianticuerpo, y el primer semianticuerpo comprende un botón y el segundo semianticuerpo comprende un ojal.

En algunos modos de realización, los procedimientos comprenden añadir arginina hasta una concentración final de entre 20 mM a 1 M antes de ajustar el pH. En algunos modos de realización, se añade la arginina hasta una concentración final de entre 50 mM-600 mM. En algunos modos de realización, se añade la arginina hasta una concentración final de entre 50 mM-100 mM.

En determinados modos de realización, el procedimiento incluye incubar cada conjunto de proteína A y polipéptidos que contienen bisagras a un pH de entre 5 y 8 antes de mezclar el primer y segundo semianticuerpos.

En algunos modos de realización, los procedimientos descritos en el presente documento comprenden incubar el conjunto de semianticuerpos mixto o de polipéptidos que contienen bisagras mixtos a una temperatura de entre 15 °C y 39 °C, preferentemente entre 18 °C-37 °C, más preferentemente entre 20 °C-25 °C, más preferentemente entre 32 °C-37 °C, durante al menos 30 minutos.

Los polipéptidos que contienen bisagras se pueden producir, por ejemplo, por una célula bacteriana, una célula de levadura, un baculovirus en una célula de insecto o una célula de mamífero. En determinados modos de realización, el polipéptido que contiene bisagra se produce por una célula de bacteria, en particular *E. coli*. En determinados otros modos de realización particulares, el polipéptido que contiene bisagra se produce por una célula de mamífero, en particular una célula CHO. En determinados modos de realización particulares, el polipéptido que contiene bisagra comprende un semianticuerpo.

Los polipéptidos que contienen bisagras pueden interactuar para formar un dímero o multímero a través del dominio de heterodimerización. En determinados modos de realización, la interacción entre el primer y segundo polipéptidos que contienen bisagras en la interfaz de los dominios de heterodimerización es una interacción de protuberancia en cavidad, una interacción hidrófoba y/o una interacción electrostática. En determinados otros modos de realización, el dominio de heteromultimerización comprende un botón (por ejemplo, protuberancia), un ojal (por ejemplo, cavidad), una cremallera de leucina, una superhélice, o un residuo aminoacídico polar que puede formar una interacción

- electrostática, o combinaciones de los mismos. En determinados modos de realización, el primer polipéptido que contiene bisagra comprende un botón, y el segundo polipéptido que contiene bisagra comprende un ojal. En determinados otros modos de realización, la interacción implica tanto una interacción hidrófoba como una interacción electrostática. En determinados modos de realización ejemplares, el dominio de heteromultimerización de cada uno del primer y segundo polipéptidos que contienen bisagras comprende un botón o bien un ojal y un residuo aminoacídico que puede formar una interacción electrostática. Se entiende por un experto en la técnica que el dominio de heterodimerización puede comprender más de una forma de interacción, por ejemplo, interacción de botón y ojal (K&H) e hidrófoba, K&H y cremallera de leucina, etc. En determinados modos de realización, el polipéptido que contiene bisagra comprende además un anclaje. En determinados modos de realización particulares, el polipéptido que contiene bisagra comprende un semianticuerpo.
- En determinados modos de realización particulares, la mezcla de ensamblaje está presente en una condición reductora, preferentemente una condición reductora débil, que tiene un potencial de oxidación de entre -50 a -600 mV, de -100 a -600 mV, de -200 a -600 mV, de -100 a -500 mV, de -150 a -300 mV, más preferentemente de entre -300 a -500 mV, lo más preferentemente de aproximadamente -400 mV, en condiciones que promueven el ensamblaje de las proteínas heteromultiméricas tales como cuando el pH está entre 7 y 9, y la temperatura está entre 15 °C y 39 °C. De acuerdo con un aspecto de la invención, se añade un reductor a la etapa c para preparar una condición reductora deseada durante el ensamblaje. El reductor es glutatión (GSH).
- En determinados otros modos de realización, se añade el reductor a la mezcla de ensamblaje en un exceso molar de 50-200X, o 50-400X, preferentemente 100-300X, y más preferentemente 200X, con respecto a la cantidad total de los polipéptidos que contienen bisagras. En determinados modos de realización, la mezcla de ensamblaje tiene un pH de entre 7 y 9, preferentemente de pH 8,5. El polipéptido que contiene bisagra es un semianticuerpo.
- En algunos modos de realización, se añade el reductor al primer y segundo polipéptidos que contienen bisagras antes de mezclar. Preferentemente, la adición es de menos de 1 hora, más preferentemente menos de 15 minutos, lo más preferentemente menos de 5 minutos, antes de mezclar.
- En determinados modos de realización, el procedimiento comprende además añadir un estabilizante a la reacción en una o más de las etapas, incluyendo, sin limitación, la etapa de mantenimiento de pH intermedio y la etapa de ensamblaje en presencia o ausencia de calentamiento. Por ejemplo, se puede añadir un estabilizante al polipéptido que contiene bisagra para evitar o reducir la agregación. En otros ejemplos, se puede añadir un estabilizante a la mezcla de ensamblaje para evitar o reducir la agregación durante el ensamblaje de una proteína heteromultimérica. En determinados modos de realización particulares, el polipéptido que contiene bisagra comprende un semianticuerpo.
- En determinados modos de realización particulares, el estabilizante se selecciona del grupo que consiste en arginina, histidina y polivinilpirrolidona (PVP). En determinados modos de realización, la arginina o histidina es una sal de arginina o sal de histidina. En determinados otros modos de realización, la arginina o histidina es un derivado de arginina o derivado de histidina. En determinados otros modos de realización, la arginina o histidina es arginina HCl o histidina HCl. En determinados modos de realización, la arginina no es fosfato de arginina.
- En determinados otros modos de realización, el procedimiento comprende además la etapa de incubar la mezcla de ensamblaje en presencia de PVP. En modos de realización relacionados, se añade la PVP hasta un 40 % (p/v). En determinados otros modos de realización, la PVP está presente en la mezcla de ensamblaje a una concentración de un 2 %-6 % (p/v), 10 %-20 %, 2 %-10 %, 1 %, 1,3 %, 1,7 %, 2 %, 2,3 %, 2,7 %, 3 %, 3,3 %, 3,7 % o 4 %, preferentemente un 0,1 %-10 %, más preferentemente un 2 %-6 %, y lo más preferentemente un 4 %. En determinados modos de realización, la PVP no es más de 100 KD, no más de 30 KD, y preferentemente 10 KD. En determinados otros modos de realización, la PVP está presente en menos de un 10 % (p/v), o menos de un 5 % (p/v).
- En algunos modos de realización, el estabilizante es arginina presente a una concentración de entre 20 mM a 1 M, de 20 mM a menos de 1 M, de 20 mM a 100 mM, de 20 mM a 200 mM, de 20 mM a 300 mM, de 20 mM a 400 mM, de 20 mM a 50 mM, de 50 mM a 100 mM, de 50 mM a 150 mM, de 50 mM a 200 mM, de 50 mM a 250 mM o de 50 mM a 300 mM. En otros modos de realización, el estabilizante es histidina presente a una concentración de entre 20 mM a 1 M, de 20 mM a menos de 1 M, de 20 mM a 100 mM, de 20 mM a 200 mM, de 20 mM a 300 mM, de 20 mM a 400 mM, de 20 mM a 50 mM, de 50 mM a 100 mM, de 50 mM a 150 mM, de 50 mM a 200 mM, de 50 mM a 250 mM o de 50 mM a 300 mM. En determinados modos de realización preferentes, se añade la arginina o histidina a una concentración de 50 mM o 200 mM. En determinados otros modos de realización, se añade la arginina y/o histidina a una concentración de 20 mM a 200 mM, de 20 mM a 100 mM, de 50 mM a 200 mM o de 50 mM a 100 mM. El polipéptido que contiene bisagra comprende un semianticuerpo.
- Aún en otro aspecto de la divulgación, la invención proporciona una célula huésped que expresa un polipéptido que contiene bisagra. En determinados modos de realización, el polipéptido que contiene bisagra comprende un semianticuerpo.
- En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento de producción de un anticuerpo biespecífico, que comprende las etapas de (a) cultivar una primera célula huésped genomanipulada para expresar un primer

semianticuerpo específico para un primer antígeno o un primer epítipo de un antígeno; (b) cultivar una segunda célula huésped genomanipulada para expresar un segundo semianticuerpo específico para un segundo antígeno o un segundo epítipo del mismo antígeno; (c) obtener el primer semianticuerpo del cultivo de la etapa a a pH entre 4-9, preferentemente 5-9, en presencia de un primer solubilizante; (d) obtener el segundo semianticuerpo del cultivo de la etapa b a pH entre 4-9, preferentemente 5-9, en presencia de un segundo solubilizante; (e) mezclar el primer y segundo semianticuerpos en una condición reductora para formar una mezcla de ensamblaje; y (f) incubar la mezcla de ensamblaje para formar un anticuerpo biespecífico que comprende el primer y segundo semianticuerpos.

En algunos modos de realización, la primera célula huésped y la segunda célula huésped se cultivan en cultivos separados, y el primer semianticuerpo y el segundo semianticuerpo se purifican por separado de los cultivos de la primera y segunda células huésped antes de mezclar. En determinados modos de realización, la primera y segunda células huésped se cultivan en cultivos separados, los cultivos se combinan, las células se sedimentan, opcionalmente se homogeneizan y/o se lisan, y el primer y segundo semianticuerpos se purifican conjuntamente por cualquier procedimiento adecuado. En determinados modos de realización, el primer y segundo semianticuerpos se purifican conjuntamente por purificación con proteína A. En otros modos de realización, la primera y segunda células huésped se cultivan conjuntamente en un cultivo mixto y el primer y segundo semianticuerpos se purifican conjuntamente.

La célula huésped puede ser, por ejemplo, una célula bacteriana, una célula de levadura, una célula vegetal, una célula de insecto o una célula de mamífero. En determinados modos de realización particulares, el polipéptido que contiene bisagra o semianticuerpo se produce por una célula de mamífero, tal como una célula CHO. En determinados otros modos de realización, la célula huésped es una célula de bacteria, en particular de *E. coli*.

En determinados modos de realización adicionales, los procedimientos inventivos comprenden además la etapa de recuperar la proteína heteromultimérica o anticuerpo biespecífico formado en la etapa (d). La proteína heteromultimérica ensamblada se puede purificar adicionalmente por procedimientos descritos a lo largo de la solicitud o procedimientos adecuados conocidos en la técnica.

En otro aspecto, la divulgación proporciona composiciones que comprenden un polipéptido que contiene bisagra y un solubilizante, en las que el pH de la composición está entre pH 4-pH 9, preferentemente entre pH 5-9. En determinados modos de realización, el pH de la composición es de al menos pH 5, al menos pH 5,5, al menos pH 5,7, mayor que pH 5, mayor que pH 5,5, mayor que pH 5,7, entre 5 y 9, 5 y 8, 5,5 y 8, 5,5 y 9, 5,7 y 8, 5,7 y 9, 6 y 8, 6 y 9, 7 y 8, 7,5 y 8,5, o 7 y 8,5. En determinados modos de realización, el solubilizante se selecciona del grupo que consiste en arginina, histidina y sacarosa, preferentemente arginina y/o histidina. En determinados otros modos de realización, la arginina es una sal de arginina y/o histidina es una sal de histidina. En determinados otros modos de realización, la arginina es un derivado de arginina y/o histidina es un derivado de histidina. En determinados otros modos de realización, la arginina o histidina es L-arginina o L-histidina. En determinados otros modos de realización, la arginina o histidina es arginina HCl o histidina HCl.

En determinados modos de realización particulares, el solubilizante es arginina o histidina. En determinados otros modos de realización, la arginina o histidina está presente a una concentración de 20 mM, 50 mM, 200 mM, 400 mM, entre 20 mM y 1 M, entre 20 mM a menos de 1 M, 20 mM y 200 mM, de 20 mM a 400 mM, de 20 mM a 100 mM, de 50 mM a 100 mM, de 50 mM a 200 mM, de 50 mM a 300 mM o de 50 mM a 400 mM. En determinados modos de realización particulares, la composición que comprende tanto arginina como histidina se presenta cada una a una concentración de 20 mM, 50 mM, 200 mM, 400 mM, entre 20 mM a 1 M, entre 20 mM a menos de 1 M, 20 mM y 200 mM, de 20 mM a 400 mM, de 20 mM a 100 mM, de 50 mM a 100 mM, de 50 mM a 200 mM, de 50 mM a 300 mM o de 50 mM a 400 mM. En determinados otros modos de realización, la composición no comprende guanidina HCl o urea. En determinados modos de realización, la composición comprende de forma alternativa o adicional un estabilizante.

En determinados modos de realización particulares, el polipéptido que contiene bisagra comprende un semianticuerpo. En determinados otros modos de realización particulares, la composición comprende solo un tipo de polipéptido que contiene una bisagra o semianticuerpo. En determinados modos de realización, la composición comprende solo un tipo de semianticuerpo que es un semianticuerpo de botón. En determinados otros modos de realización, la composición comprende solo un tipo de semianticuerpo que es un semianticuerpo de ojal.

En determinados modos de realización particulares, la composición comprende además un segundo polipéptido que contiene bisagra, en la que el primer polipéptido que contiene bisagra comprende un botón y el segundo polipéptido que contiene bisagra comprende un ojal. En determinados modos de realización, el polipéptido que contiene bisagra comprende un semianticuerpo. En determinados modos de realización particulares, el polipéptido que contiene bisagra es un semianticuerpo. En determinados otros modos de realización, el semianticuerpo es del isotipo IgG1, IgG2 o IgG4.

Todos los modos de realización divulgados en el presente documento se pueden combinar a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. Además, cualquier y cada modo de realización descrito anteriormente se aplica a cualquier y cada aspecto de la invención, a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo.

Otros objetivos, rasgos distintivos y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

5 La **figura 1A** ilustra un semianticuerpo completamente oxidado. No se muestra el "botón" u "ojal" u otros dominios de heterodimerización. El semianticuerpo representado en esta figura es un isotipo IgG1. Un experto en la técnica apreciará que los otros isotipos de inmunoglobulinas se pueden prever como semianticuerpos con los correspondientes enlaces inter e intracatenarios. En un anticuerpo intacto, las cisteínas de bisagra formarán enlaces disulfuro intercatenarios.

10 La **figura 1B** ilustra un anticuerpo biespecífico de longitud completa con un dominio de heteromultimerización. No se representan los enlaces disulfuro entre cadenas pesadas en la región bisagra. El dominio de heteromultimerización mostrado es el formato de botón en ojal.

15 La **figura 1C** es una representación en dibujo de un anticuerpo biespecífico que comprende un dominio de heteromultimerización (botón en ojal), un anclaje escindible de furina y un enlace disulfuro adicional opcional (S354). También se muestran los enlaces disulfuro entre cadenas pesadas en la región bisagra. Los sitios de escisión de furina se indican por los triángulos. Aunque el anclaje escindible de furina se muestra en el semianticuerpo que comprende el botón, también se puede utilizar en el semianticuerpo de ojal o en los semianticuerpos tanto de botón como de ojal.

20 Las **figuras 2A-B** muestran cromatogramas de exclusión por tamaño compuestos que demuestran los efectos del pH sobre el cambio de conformación de los semianticuerpos. La **figura 2A** muestra que el pH elevado indujo el cambio de conformación del semianticuerpo de ojal dando como resultado un radio hidrodinámico mayor. Dicho cambio de conformación potenció la heterodimerización durante el ensamblaje. La **figura 2B** muestra que el pH elevado promovió la formación del homodímero de semianticuerpo de botón no covalente. Dicho cambio de conformación favoreció la formación biespecífica durante el ensamblaje. Se hace referencia al ejemplo 2.

25 Las **figuras 3A-3B** representan los resultados que muestran que un solubilizante tal como clorhidrato de arginina (**figuras 3A y B**) o de histidina (**figura 3B**) redujo la precipitación inducida por pH intermedio de semianticuerpos de botón.

30 Las **figuras 4A-B** muestran cromatogramas compuestos que demuestran el efecto de un reductor tal como glutatión sobre la agregación y el ensamblaje de anticuerpos biespecíficos. Se añade glutatión en un exceso molar de 2-200X. Se hace referencia al ejemplo 3.

35 La **figura 5A** es un gráfico que ilustra el efecto de la temperatura sobre la tasa de formación de anticuerpos biespecíficos de IgG1 (ensamblaje). La **figura 5B** muestra que un incremento en la temperatura promovió el ensamblaje del anticuerpo IgG1 biespecífico de botón en ojal en presencia de un exceso molar de 200x de glutatión con o sin mantenimiento de pH como se analiza por cromatografía de fase inversa. La figura 5B también ilustra que la optimización del mantenimiento de pH de los conjuntos de semianticuerpos para impulsar los cambios de conformación antes del ensamblaje mejoró la tasa y la eficacia del ensamblaje. Se hace referencia al ejemplo 4.

40 La **figura 6A** ilustra el efecto de un estabilizante tal como PVP sobre la estabilización del anticuerpo biespecífico formado y la reducción en la formación de agregados.

45 La **figura 6B** muestra que PVP e histidina a temperatura elevada promovieron el ensamblaje del anticuerpo IgG4 biespecífico de botón en ojal como se analizó por cromatografía de fase inversa. Curva inferior: ensamblaje a temperatura ambiente con proporción 300x glutatión:Ab pH = 8,5, arginina ~400 mM; curva superior: ensamblaje calentado con proporción 200x glutatión:Ab, pH = 8,0, PVP al 4 %, arginina 50 mM, histidina 100 mM a 35 °C.

50 La **figura 6C** demuestra que PVP redujo la agregación del anticuerpo biespecífico de IgG4 de botón en ojal durante el ensamblaje calentado a 37 °C y pH 8 durante 6 horas. Se hace referencia al ejemplo 5.

55 La **figura 7** ilustra que la histidina redujo la agregación inducida por calor de los semianticuerpos de ojal IgG4 a 37 °C y pH 8 durante 3 horas.

Descripción detallada

60 La invención se describirá ahora en detalle a modo de referencia usando solo las siguientes definiciones y ejemplos. Las reivindicaciones definen la materia para la que se busca protección, cualquier afirmación que vaya más allá de lo que se define en las reivindicaciones se proporciona solo como información.

65 A menos que se defina de otro modo en el presente documento, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto en la técnica a la que

pertenece la presente invención. Singleton, *et al.*, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 2.^a Ed., John Wiley and Sons, New York (1994), y Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology, Harper Perennial, NY (1991) le proporcionan a un experto un diccionario general de muchos de los términos usados en la presente invención. Aunque cualquier procedimiento y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento se puede usar en la práctica o prueba de la presente invención, se describen los procedimientos y materiales preferentes. Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. A menos que se indique de otro modo, los ácidos nucleicos se escriben de izquierda a derecha en una orientación de 5' a 3'; las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en la orientación de amino a carboxilo, respectivamente. Los profesionales sanitarios se dirigen en particular a Sambrook *et al.*, 1989, y Ausubel FM *et al.*, 1993, para consultar definiciones y términos de la técnica. Se debe entender que la presente invención no está limitada a la metodología, protocolos y reactivos particulares descritos, ya que estos pueden variar.

Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo.

A menos que se indique de otro modo, los ácidos nucleicos se escriben de izquierda a derecha en una orientación de 5' a 3'; las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en la orientación de amino a carboxilo, respectivamente.

Como se usa en el presente documento, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. Por ejemplo, la referencia a "una célula huésped" quiere decir una o más células huésped.

Los títulos proporcionados en el presente documento no son limitaciones de los diversos aspectos o modos de realización de la invención que se pueden tener por referencia a la memoria descriptiva como un todo. En consecuencia, los términos definidos inmediatamente a continuación se definen más completamente por referencia a la memoria descriptiva como un todo.

Todos los modos de realización divulgados en el presente documento se pueden combinar a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. Además, cualquier y cada modo de realización descrito a continuación se aplica a cualquier y cada aspecto de la invención, a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo.

I. Definiciones

La presente invención proporciona procedimientos de producción de una proteína heteromultimérica que comprende un primer polipéptido que contiene bisagra y un segundo polipéptido que contiene bisagra. El término "polipéptido que contiene bisagra" como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido que contiene al menos una región bisagra. En determinados modos de realización, la región bisagra conecta múltiples dominios, por ejemplo, un dominio de unión y un dominio efector, y proporciona cierta flexibilidad estructural al polipéptido para la dimerización o multimerización. Como ejemplo, el dominio de unión puede ser un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo o un dominio de unión a ligando de un receptor, y el dominio efector puede ser un componente Fc de un anticuerpo. En determinados modos de realización, el primer polipéptido que contiene bisagra es diferente del segundo polipéptido que contiene bisagra, y el dímero o multímero resultante es un heterodímero o heteromultímero. En determinados modos de realización particulares, el primer polipéptido que contiene bisagra y el segundo polipéptido que contiene bisagra se unen a dos epítopos diferentes en la misma proteína diana. En determinados otros modos de realización, el primer polipéptido que contiene bisagra tiene una especificidad de unión a diana diferente de la del segundo polipéptido que contiene bisagra y el heterodímero o heteromultímero resultante se une a dos o más proteínas diana diferentes. En determinados modos de realización, el polipéptido que contiene bisagra comprende un dominio de heterodimerización natural o bien genomanipulado. En determinados modos de realización particulares, el polipéptido que contiene bisagra comprende uno o más residuos de cisteína en la región bisagra que puede formar uno o más enlaces disulfuro con otro polipéptido que contiene bisagra.

Un polipéptido que contiene bisagra incluye, sin limitación, un semianticuerpo, una inmunoadhesina y fragmento funcional del mismo. El término "fragmento funcional" como se usa en el presente documento se refiere a un fragmento, es decir, menos de la longitud completa, del polipéptido que contiene bisagra, que todavía mantiene la función deseada, por ejemplo, manteniendo la actividad de unión a antígeno o diana, la actividad efectora de Fc y/o capacidad de dimerización/multimerización. En determinados modos de realización particulares, el primer polipéptido que contiene bisagra y el segundo polipéptido que contiene bisagra es cada uno un semianticuerpo con especificidad de unión a antígeno diferente, y el dímero o multímero resultante es un anticuerpo biespecífico o multiespecífico. En determinados modos de realización, la proteína heteromultimérica resultante comprende un semianticuerpo y una inmunoadhesina.

El término "anticuerpo multiespecífico" se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente un anticuerpo que tiene especificidad poliepitópica. Dichos anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero no se limitan a, un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada (V_H) y un dominio variable de cadena ligera (V_L), donde la unidad V_HV_L tiene especificidad poliepitópica, anticuerpos que tienen dos o más dominios V_L y V_H uniéndose cada unidad V_HV_L a un epítipo diferente, anticuerpos que tienen dos o más dominios variables únicos uniéndose cada dominio

variable único a un epítipo diferente, anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpo tales como Fab, Fv, dsFv, scFv, diacuerpos, diacuerpos biespecíficos y triacuerpos, fragmentos de anticuerpo que se han unido de forma covalente o no covalente. "Especificidad poliepitópica" se refiere a la capacidad de unirse específicamente a dos o más epítipos diferentes en la(s) misma(s) o diferente(s) diana(s). "Monoespecífico" se refiere a la capacidad de unirse solo a un epítipo. De acuerdo con un modo de realización, el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo IgG que se une a cada epítipo con una afinidad de 5 μ M a 0,001 pM, de 3 μ M a 0,001 pM, de 1 μ M a 0,001 pM, de 0,5 μ M a 0,001 pM o de 0,1 μ M a 0,001 pM.

Una unidad de anticuerpo tetracatenaria básica natural es una glucoproteína heterotetramérica compuesta de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas (un anticuerpo IgM consiste en 5 de las unidades heterotetrámeras básicas junto con un polipéptido adicional denominado cadena J, y por lo tanto contiene 10 sitios de unión a antígeno, mientras que los anticuerpos IgA secretados se pueden polimerizar para formar ensamblajes polivalentes que comprenden 2-5 de las unidades tetracatenarias básicas junto con la cadena J). En el caso de las IgG, la unidad tetracatenaria es, en general, de aproximadamente 150.000 daltons. Cada cadena L se une a una cadena H por un enlace disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H se unen entre sí por uno o más enlaces disulfuro dependiendo del isotipo de la cadena H. Cada cadena H y L también tiene puentes disulfuro intracatenarios regularmente espaciados. Cada cadena H tiene, en el extremo N, un dominio variable (V_H) seguido de tres dominios constantes (C_H) para cada una de las cadenas α y γ , y cuatro dominios C_H para los isotipos μ y ϵ . Cada cadena L tiene, en el extremo N, un dominio variable (V_L) seguido de un dominio constante (C_L) en el extremo C. El V_L se alinea con el V_H y el C_L se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada (C_{H1}). Se cree que residuos aminoacídicos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de la cadena ligera y de la cadena pesada. El emparejamiento de un V_H y un V_L conjuntamente forma un sitio de unión a antígeno individual. Para la estructura y propiedades de las diferentes clases de anticuerpos, véanse, por ejemplo, Basic and Clinical Immunology, 8.^a edición, Daniel P. Stites, Abba I. Terr y Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, página 71 y capítulo 6.

La cadena L de cualquier especie de vertebrado se puede asignar a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa y lambda, en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas (C_H), las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases o isotipos. Existen cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, que tienen cadenas pesadas designadas como α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las clases γ y α se dividen además en subclases en base a diferencias relativamente menores en la secuencia y función C_H , por ejemplo, los seres humanos expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2.

El término "variable" se refiere al hecho de que determinados segmentos de los dominios variables difieren ampliamente en su secuencia de un anticuerpo a otro. El dominio V media en la unión a antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente a lo largo de los 110 aminoácidos de los dominios variables. En cambio, las regiones V consisten en tramos relativamente invariables denominados regiones estructurales (FR) de 15-30 aminoácidos separados por regiones más cortas de variabilidad extrema denominadas "regiones hipervariables" que tienen cada una 9-12 aminoácidos de longitud. Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera naturales comprenden cada uno cuatro FR, adoptando en gran medida una configuración de lámina beta, conectadas por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan y, en algunos casos, forman parte de la estructura de lámina beta. Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

El término "región hipervariable", "HVR" o "HV", cuando se usa en el presente documento, se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son de secuencia hipervariable y/o forman bucles estructuralmente definidos. En general, los anticuerpos comprenden seis HVR; tres en el V_H (H1, H2, H3) y tres en el V_L (L1, L2, L3). En anticuerpos naturales, H3 y L3 presentan la mayor diversidad de las seis HVR, y se cree que H3 en particular desempeña un papel exclusivo al conferir una especificidad precisa a los anticuerpos. Véanse, por ejemplo, Xu *et al.*, *Immunity* 13:37-45 (2000); Johnson y Wu, en *Methods in Molecular Biology* 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003). De hecho, los anticuerpos de camélido naturales que consisten en una cadena pesada solo son funcionales y estables en ausencia de cadena ligera. Véanse, por ejemplo, Hamers-Casterman *et al.*, *Nature* 363:446-448 (1993); Sheriff *et al.*, *Nature Struct. Biol.* 3:733-736 (1996).

Varias delineaciones de HVR están en uso y se engloban en el presente documento. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de Kabat se basan en la variabilidad de secuencia y son las usadas más comúnmente (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Chothia se refiere en cambio a la localización de los bucles estructurales (Chothia y Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Las HVR de AbM representan un término medio entre las HVR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y se usan por el programa informático de modelado de anticuerpos AbM de Oxford

Molecular. Las HVR de "contacto" se basan en un análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles. Los residuos de cada una de estas HVR se indican a continuación.

Bucle	Kabat	AbM	Chothia	Contacto
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
	(Numeración de Kabat)			
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
	(Numeración de Chothia)			
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

- 5 Las HVR pueden comprender "HVR extendidas" como sigue: 24-36 o 24-34 (L1), 46-56 o 50-56 (L2) y 89-97 o 89-96 (L3) en el VL y 26-35 (H1), 50-65 o 49-65 (H2) y 93-102, 94-102, o 95-102 (H3) en el VH. Los residuos del dominio variable se enumeran de acuerdo con Kabat *et al.*, *supra*, para cada una de estas definiciones.

- 10 Las "regiones estructurales" (FR) son los residuos del dominio variable distintos de los residuos de las CDR. Cada dominio variable tiene típicamente cuatro FR identificadas como FR1, FR2, FR3 y FR4. Si las CDR se definen de acuerdo con Kabat, los residuos de FR de la cadena ligera se sitúan aproximadamente en los residuos 1-23 (LCFR1), 35-49 (LCFR2), 57-88 (LCFR3) y 98-107 (LCFR4) y los residuos de FR de la cadena pesada se sitúan aproximadamente en los residuos 1-30 (HCFR1), 36-49 (HCFR2), 66-94 (HCFR3) y 103-113 (HCFR4) de la cadena pesada. Si las CDR comprenden residuos aminoácidos de bucles hipervariables, los residuos de FR de la cadena ligera se sitúan aproximadamente en los residuos 1-25 (LCFR1), 33-49 (LCFR2), 53-90 (LCFR3) y 97-107 (LCFR4) de la cadena ligera y los residuos de FR de la cadena pesada se sitúan aproximadamente en los residuos 1-25 (HCFR1), 33-52 (HCFR2), 56-95 (HCFR3) y 102-113 (HCFR4) de la cadena pesada. En algunos casos, cuando la CDR comprende aminoácidos tanto de una CDR como se define por Kabat como los de un bucle hipervariable, los residuos de FR se ajustarán en consecuencia. Por ejemplo, cuando CDRH1 incluye los aminoácidos H26-H35, los residuos de FR1 de la cadena pesada están en las posiciones 1-25 y los residuos de FR2 están en las posiciones 36-49.

- 25 Un "marco de consenso humano" es un marco que representa los residuos aminoácidos que aparecen más comúnmente en una selección de secuencias estructurales de VL o VH de inmunoglobulina humana. En general, la selección de secuencias de VL o VH de inmunoglobulina humana es de un subgrupo de secuencias de dominio variable. En general, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat. En un modo de realización, para el VL, el subgrupo es un subgrupo kappa I como en Kabat. En un modo de realización, para el VH, el subgrupo es un subgrupo III como en Kabat.

- 30 Un ejemplo de un anticuerpo "intacto" es uno que comprende un sitio de unión a antígeno así como un CL y al menos dominios constantes de la cadena pesada, CH1, CH2 y CH3. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia natural (por ejemplo, dominios constantes de secuencia natural humana) o una variante de secuencia de aminoácidos de los mismos.

- 35 Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, preferentemente la región de unión a antígeno o una región variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos (Db); diacuerpos en tándem (taDb), anticuerpos lineales (por ejemplo, patente de EE. UU. n.º 5.641.870, ejemplo 2, Zapata *et al.*, Protein Eng. 8(10):1057-1062 (1995)); anticuerpos de un brazo, anticuerpos de dominio variable único, minicuerpos, moléculas de anticuerpo monocatenarias; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, incluyendo, pero sin limitarse a, Db-Fc, taDb-Fc, taDb-CH3 y (scFV)₄-Fc).

- 45 El término "semianticuerpo" (del inglés, "*half-antibody*") como se usa en el presente documento se refiere a una cadena pesada de inmunoglobulina asociada con una cadena ligera de inmunoglobulina. Un semianticuerpo ejemplar se representa en la **figura 1A**. Un experto en la técnica apreciará fácilmente que un semianticuerpo puede englobar un fragmento del mismo y también puede tener un dominio de unión a antígeno que consiste en un dominio variable único, por ejemplo, que se origina a partir de un camélido.

- 50 Los presentes inventores descubrieron inesperadamente que la optimización o ajuste de pH de semianticuerpos eluidos de una columna con proteína A u otra matriz a pH bajo indujo un cambio de conformación de los polipéptidos que contienen bisagras tales como semianticuerpos. La optimización de pH a un pH intermedio, a veces denominado mantenimiento de pH o mantenimiento de pH intermedio a lo largo de esta divulgación, puede provocar la precipitación o agregación de los semianticuerpos. Por tanto, en determinados modos de realización, el procedimiento de producción de una proteína heteromultimérica comprende la etapa de proporcionar un primer o segundo polipéptido

que contiene bisagra a pH 5-9 en presencia de un primer o un segundo solubilizante, respectivamente.

Un solubilizante como se usa en el presente documento se define como un reactivo que evita o reduce la precipitación de un polipéptido que contiene bisagra, tal como un semianticuerpo. El solubilizante adecuado incluye, sin limitación, arginina e histidina, o una sal o derivado de las mismas, y sacarosa. En determinados modos de realización, el solubilizante es arginina y/o histidina. En determinados modos de realización, el solubilizante evita o reduce la precipitación inducida por el mantenimiento de pH intermedio y/o calentamiento. En determinados modos de realización particulares, se añade un solubilizante antes del mantenimiento de pH intermedio (es decir, antes de ajustar a pH intermedio), y/o calentamiento. En determinados modos de realización, la arginina o histidina es una sal de arginina o sal de histidina. En determinados otros modos de realización, la arginina o histidina es un derivado de arginina o derivado de histidina. La reducción de la precipitación puede dar lugar a un incremento en el rendimiento del producto final ensamblado deseado.

Se han usado imidazol y guanidina para solubilizar proteína para la preparación y purificación de proteínas generales. Sin embargo, inesperadamente se descubrió que el imidazol y la guanidina solos, sin estar en el contexto de histidina o arginina, respectivamente, eran insuficientes para mejorar el rendimiento global de la proteína heteromultimérica ensamblada como se describe en el presente documento, tal como el anticuerpo biespecífico. En determinados modos de realización, imidazol y guanosina pueden desnaturar las proteínas.

De manera similar, los detergentes tales como guanidina HCl y urea se usan comúnmente para reducir la agregación/precipitación en general, pero pueden desnaturar completamente la proteína. Por tanto, en determinados modos de realización, el solubilizante evita o reduce la precipitación sin desnaturar la proteína de interés. Por tanto, en determinados modos de realización particulares, el solubilizante no es guanidina HCl, guanidina, imidazol o urea. Y en determinados otros modos de realización, las composiciones de la invención no comprenden guanidina HCl o urea. En determinados otros modos de realización, el solubilizante no es Tween o PEG.

Además, se puede añadir un estabilizante, por ejemplo, durante un mantenimiento de pH intermedio de cada semianticuerpo o durante el ensamblaje en o justo después de mezclar los polipéptidos que contienen bisagras o semianticuerpos. Se puede añadir un estabilizante a la reacción de una o más o todas las etapas de los procedimientos inventivos para evitar o reducir la agregación de los polipéptidos que contienen bisagras o semianticuerpos, antes, durante y/o después del ensamblaje.

Los agregados se pueden detectar como especies de alto peso molecular y, en el contexto de semianticuerpos, especies de alto peso molecular con un peso molecular mayor que 150 kDa. Los agregados se pueden detectar y cuantificar, por ejemplo, por cromatografía de exclusión por tamaño u otros procedimientos adecuados. En determinados modos de realización, los agregados detectados por la cromatografía de exclusión por tamaño pueden pasar a través de un filtro estéril de 0,2 μm . Las proteínas precipitadas, por otra parte, pueden estar compuestas de proteínas desnaturadas o proteínas agregadas que pueden formar un complejo muy grande. Se han sometido a prueba varios reactivos y se determinó que eran ineficaces o no adecuados para su uso como estabilizantes, por ejemplo, imidazol, ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS), ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), ciclodextrina, CuSO_4 y NaOAc. Por tanto, en determinados modos de realización, el estabilizante no incluye sales inorgánicas o metales de transición. El estabilizante adecuado incluye, sin limitación, PVP, histidina y arginina. La reducción de la agregación puede dar lugar a un incremento en el rendimiento del producto final ensamblado deseado.

La PVP es un polímero no cargado soluble en agua con un grupo pirrolidona. En determinados modos de realización, otros polímeros polares no cargados, otros reactivos o compuestos, en especial compuestos con estructura y propiedades similares a los estabilizantes adecuados descritos en el presente documento pueden ser estabilizantes adecuados para su uso en la invención. Está dentro de la capacidad de un experto en la técnica determinar un estabilizante adecuado analizando el efecto del compuesto sobre los niveles de agregación por procedimientos conocidos en la técnica, incluyendo los procedimientos proporcionados en el presente documento.

Un reactivo se puede caracterizar tanto como solubilizante como estabilizante. Por ejemplo, se puede usar arginina como solubilizante para reducir la precipitación de semianticuerpos durante el mantenimiento de pH intermedio y/o calentamiento, así como estabilizante para reducir la agregación durante la etapa de ensamblaje. De forma similar, se puede usar histidina como solubilizante para reducir la precipitación, así como un estabilizante para reducir la agregación de los semianticuerpos, durante el mantenimiento de pH intermedio y/o calentamiento. Sin limitarse a ningún mecanismo particular, en determinados modos de realización, tanto un solubilizante como un estabilizante pueden funcionar evitando la interacción de parches hidrófobos en las superficies de las proteínas que pueden dar lugar a agregación. En otros modos de realización, tanto un solubilizante como un estabilizante pueden funcionar formando clatratos para evitar la interacción indeseable de proteínas.

El término "semianticuerpo monocatenario" como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido monocatenario que comprende un dominio VL, opcionalmente un dominio CL, un anclaje, un dominio VH, opcionalmente un dominio CH1, un dominio bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3, en el que dichos dominios se sitúan entre sí en un sentido de N terminal a C terminal como sigue: VL-anclaje-VH-bisagra-CH2-CH3 o VL-CL-anclaje-

VH-CH1-bisagra-CH2-CH3.

La expresión "anticuerpos de dominio único" (sdAb) o "anticuerpos de dominio variable único (SVD)" se refiere en general a anticuerpos en los que un dominio variable único (VH o VL) puede conferir unión a antígeno. En otras palabras, el dominio variable único no necesita interactuar con otro dominio variable para reconocer el antígeno diana. Ejemplos de anticuerpos de dominio único incluyen los derivados de camélidos (llamas y camellos) y peces cartilaginosos (por ejemplo, tiburones nodriza) y los derivados de procedimientos recombinantes de anticuerpos humanos y murinos (Nature (1989) 341:544-546; Dev Comp Immunol (2006) 30:43-56; Trend Biochem Sci (2001) 26:230-235; Trends Biotechnol (2003):21:484-490; documento WO 2005/035572; documento WO 03/035694; Febs Lett (1994) 339:285-290; documento WO 00/29004; documento WO 02/051870).

La expresión "anticuerpos lineales" se refiere en general a los anticuerpos descritos en Zapata *et al.*, Protein Eng., 8(10):1057-1062 (1995). En resumen, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos Fd en tándem (V_H-C_{H1}-V_H-C_{H1}) que, conjuntamente con los polipéptidos de cadena ligera complementaria, forman un par de regiones de unión a antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o mono-específicos.

El término tecnología "botón en ojal" o "KnH" como se menciona en el presente documento se refiere a la tecnología que dirige el emparejamiento de dos polipéptidos conjuntamente *in vitro* o *in vivo* introduciendo una protuberancia (botón) en un polipéptido y una cavidad (ojal) en el otro polipéptido en una interfaz en la que interactúan. Por ejemplo, se han introducido KnH en las interfaces de unión a Fc:Fc, interfaces CL:CH1 o interfaces VH/VL de anticuerpos (por ejemplo, documentos US2007/0178552, WO 96/027011, WO 98/050431 y Zhu *et al.* (1997) Protein Science 6:781-788). Esto es especialmente útil para impulsar el emparejamiento de dos cadenas pesadas diferentes conjuntamente durante la fabricación de anticuerpos multiespecíficos. Por ejemplo, los anticuerpos multiespecíficos que tienen KnH en sus regiones Fc pueden comprender además dominios variables únicos unidos a cada región Fc, o comprender además diferentes dominios variables de la cadena pesada que se emparejan con dominios variables de la cadena ligera similares o diferentes. La tecnología KnH también se puede usar para emparejar dos dominios extracelulares receptores diferentes conjuntamente o cualquier otra secuencia polipeptídica que comprenda diferentes secuencias de reconocimiento diana (por ejemplo, incluyendo affibodies, peptidocuerpos y otras fusiones Fc).

La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab", y un fragmento "Fc" residual, una designación que refleja la capacidad de cristalizar fácilmente. El fragmento Fab consiste en una cadena L entera junto con el dominio de la región variable de la cadena H (V_H) y el primer dominio constante de una cadena pesada (C_{H1}). El tratamiento con pepsina de un anticuerpo proporciona un fragmento F(ab')₂ grande único que corresponde aproximadamente a dos fragmentos Fab unidos por enlaces disulfuro que tienen actividad de unión a antígeno divalente y todavía puede reticular el antígeno. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por tener pocos residuos adicionales en el extremo carboxiterminal del dominio C_{H1} incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para un Fab' en el que el/los residuo(s) de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También son conocidos otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

El fragmento Fc comprende las porciones carboxiterminales de ambas cadenas H mantenidas juntas por disulfuros. Las funciones efectoras de anticuerpos se determinan por secuencias en la región Fc; esta región también es la parte reconocida por los receptores Fc (FcR) encontrados en determinados tipos de células.

"Fv" consiste en un dímero de un dominio de región variable de una cadena pesada y una cadena ligera en estrecha asociación no covalente. Del plegamiento de estos dos dominios emanan seis bucles hipervariables (3 bucles cada uno de la cadena H y L) que contribuyen a los residuos aminoacídicos para la unión a antígeno y confieren al anticuerpo especificidad de unión a antígeno. Sin embargo, incluso un dominio variable único (o la mitad de un Fv que comprende solo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque a menudo con una afinidad menor que el sitio de unión completo.

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

El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpo pequeños preparados construyendo fragmentos sFv (véase el párrafo anterior) con conectores cortos (de aproximadamente 5-10 residuos) entre los dominios V_H y V_L de modo que se logra el emparejamiento intercatenario pero no intracatenario de los dominios V, dando como resultado un fragmento bivalente, es decir, un fragmento que tiene dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos biespecíficos son heterodímeros de dos fragmentos sFv de "entrecruzamiento" en los que los dominios V_H y V_L de los dos anticuerpos están presentes en diferentes cadenas polipeptídicas. Los diacuerpos se describen más completamente, por ejemplo, en el documento EP 404.097; documento WO 93/11161; y Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA

90:6444-6448 (1993).

El término "anticuerpo de un brazo" o "anticuerpos de un brazo" se refiere a un anticuerpo que comprende (1) un dominio variable unido por un enlace peptídico a un polipéptido que comprende un dominio CH2, un dominio CH3 o un dominio CH2-CH3 y (2) un segundo dominio CH2, CH3 o CH2-CH3, en el que un dominio variable no se une por un enlace peptídico a un polipéptido que comprende el segundo dominio CH2, CH3 o CH2-CH3. En un modo de realización, el anticuerpo de un brazo comprende 3 polipéptidos (1) un primer polipéptido que comprende un dominio variable (por ejemplo, VH), CH1, CH2 y CH3, (2) un segundo polipéptido que comprende un dominio variable (por ejemplo, VL) y un dominio CL, y (3) un tercer polipéptido que comprende un dominio CH2 y CH3. En un modo de realización, el tercer polipéptido no comprende un dominio variable. En otro modo de realización, el anticuerpo de un brazo tiene una región bisagra parcial que contiene los dos residuos de cisteína que forman enlaces disulfuro que unen las cadenas pesadas constantes. En un modo de realización, los dominios variables del anticuerpo de un brazo forman una región de unión a antígeno. En otro modo de realización, un dominio variable del anticuerpo de un brazo es un dominio variable único, en el que cada dominio variable único es una región de unión a antígeno.

Los anticuerpos de la invención pueden ser anticuerpos "quiméricos" en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico a u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (patente de EE. UU. n.º 4.816.567; y Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en el presente documento incluyen anticuerpos primatizados que comprenden secuencias de unión a antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, cercopitécidos, simios superiores, etc.) y secuencias de la región constante humana.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, roedores) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada del anticuerpo no humano. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano, que tiene la especificidad, afinidad y capacidad de anticuerpo deseadas. En algunos casos, los residuos de la región estructural (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se hacen para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véanse Jones *et al.*, Nature 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992).

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

El término "heteromultímero" o "heteromultimérico" como se usa en el presente documento describe dos o más polipéptidos que interactúan entre sí por un enlace no peptídico covalente (por ejemplo, enlace disulfuro) y/o una interacción no covalente (por ejemplo, enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos, fuerzas de Van der Waals e interacciones hidrófobas), en los que al menos dos de las moléculas tienen secuencias diferentes entre sí.

Como se usa en el presente documento, "dominio de heteromultimerización" se refiere a alteraciones o adiciones a una molécula biológica para promover la formación de heteromultímeros e impedir la formación de homomultímeros. Cualquier dominio de heterodimerización que tenga una preferencia fuerte para formar heterodímeros sobre homodímeros está dentro del alcance de la invención. Los ejemplos ilustrativos incluyen pero no se limitan a, por ejemplo, la solicitud de patente de EE. UU. 20030078385 (Arathoon *et al.* - Genentech; que describe botón en ojales); documento WO2007147901 (Kjærgaard *et al.* - Novo Nordisk; que describe interacciones iónicas); documento WO 2009089004 (Kannan *et al.* - Amgen; que describe efectos de conducción electrostática); documento WO 2010/034605 (Christensen *et al.* - Genentech; que describe superhélices). Véanse también, por ejemplo, Pack, P. & Plueckthun, A., Biochemistry 31, 1579-1584 (1992) que describe la cremallera de leucina o Pack *et al.*, Bio/Technology 11, 1271-1277 (1993) que describe el motivo de hélice-giro-hélice. La frase "dominio de heteromultimerización" y "dominio de heterodimerización" se usan de manera intercambiable en el presente documento. En determinados modos de realización, el polipéptido que contiene bisagra comprende uno o más dominios de heterodimerización.

Como se usa en el presente documento, el término "inmuno adhesina" designa moléculas que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una "adhesina") con las funciones efectoras de los dominios constantes de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmuno adhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con una especificidad de unión deseada, secuencia de aminoácidos que es distinta del sitio de reconocimiento y unión a antígeno de un anticuerpo (es decir, es "heteróloga" en comparación con una región constante de un anticuerpo), y una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina (por ejemplo, secuencia de CH2 y/o CH3 de una IgG). Las secuencias de adhesina ejemplares incluyen secuencias de aminoácidos contiguas que comprenden una porción de un receptor o un ligando que se une a una proteína de interés. Las secuencias de adhesinas también pueden ser secuencias que se unen a una proteína de interés, pero no son secuencias de receptor o ligando (por ejemplo, secuencias de adhesina en peptidocitos). Dichas secuencias polipeptídicas se pueden seleccionar o identificar por diversos procedimientos, incluyen técnicas de presentación en fagos y procedimientos de clasificación de alto rendimiento. La secuencia del dominio constante de inmunoglobulina en la inmuno adhesina se puede obtener a partir de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3 o IgG-4, IgA (incluyendo IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD o IgM.

Un anticuerpo de la presente invención "que se une a" un antígeno de interés es uno que se une al antígeno con afinidad suficiente de modo que el anticuerpo es útil como agente diagnóstico y/o terapéutico para seleccionar una proteína o una célula o tejido que expresa el antígeno, y no reacciona de forma cruzada significativamente con otras proteínas. En dichos modos de realización, el grado de unión del anticuerpo a una proteína "no diana" será de menos de aproximadamente un 10 % de la unión del anticuerpo a su proteína diana particular, como se determina por análisis de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) o radioinmunoprecipitación (RIA) o ELISA. Con respecto a la unión de un anticuerpo a una molécula diana, el término "unión específica" o "se une específicamente a" o es "específico para" un polipéptido particular o un epítipo en una diana polipeptídica particular quiere decir la unión que es mensurablemente diferente de una interacción inespecífica (por ejemplo, una interacción inespecífica se puede unir a seroalbúmina bovina o caseína). La unión específica se puede medir, por ejemplo, determinando la unión de una molécula en comparación con la unión de una molécula de control. Por ejemplo, la unión específica se puede determinar por competencia con una molécula de control que es similar a la diana, por ejemplo, un exceso de diana no marcada. En este caso, la unión específica se indica si la unión de la diana marcada a una sonda se inhibe de forma competitiva por un exceso de diana no marcada. El término "unión específica" o "se une específicamente a" o "es específico para" un polipéptido particular o un epítipo de una diana polipeptídica particular, como se usa en el presente documento, se puede presentar, por ejemplo, por una molécula que tiene una K_d para la diana de al menos aproximadamente 200 nM, de forma alternativa al menos aproximadamente 150 nM, de forma alternativa al menos aproximadamente 100 nM, de forma alternativa al menos aproximadamente 60 nM, de forma alternativa al menos aproximadamente 50 nM, de forma alternativa al menos aproximadamente 40 nM, de forma alternativa al menos aproximadamente 30 nM, de forma alternativa al menos aproximadamente 20 nM, de forma alternativa al menos aproximadamente 10 nM, de forma alternativa al menos aproximadamente 8 nM, de forma alternativa al menos aproximadamente 6 nM, de forma alternativa al menos aproximadamente 4 nM, de forma alternativa al menos aproximadamente 2 nM, de forma alternativa al menos aproximadamente 1 nM o mayor. En un modo de realización, el término "unión específica" se refiere a la unión donde una molécula se une a un polipéptido particular o epítipo en un polipéptido particular sin unirse sustancialmente a ningún otro polipéptido o epítipo de polipéptido.

"Afinidad de unión" se refiere en general a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique de otro modo, como se usa en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañero Y se puede representar en general por la constante de disociación (K_d). Por ejemplo, la K_d puede ser de aproximadamente 200 nM, 150 nM, 100 nM, 60 nM, 50 nM, 40 nM, 30 nM, 20 nM, 10 nM, 8 nM, 6 nM, 4 nM, 2 nM, 1 nM, o más fuerte. La afinidad se puede medir por procedimientos comunes conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. Los anticuerpos de baja afinidad en general se unen al antígeno lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad en general se unen al antígeno más rápidamente y tienden a permanecer unidos más tiempo. Una variedad de procedimientos de medición de la afinidad de unión son conocidos en la técnica, cualquiera de los que se puede usar para los propósitos de la presente invención.

En un modo de realización, la " K_d " o "valor de K_d " de acuerdo con la presente invención se mide usando ensayos de resonancia de plasmón superficial usando un BIAcore™-2000 o un BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con chips de CM5 de antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (UR). En resumen, se activan chips de biosensor de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore, Inc.) con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se diluye el antígeno con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, en 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de la inyección a un caudal de 5 µl/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos sin reaccionar. Para las mediciones cinéticas, se inyectan diluciones en serie de dos veces de Fab (por ejemplo, de 0,78 nM a 500 nM) en PBS con Tween 20 al 0,05 % (PBST) a 25 °C a un caudal de aproximadamente 25 µl/min. Se calculan las velocidades de asociación (k_{as}) y velocidades de disociación (k_{dis}) usando un modelo de Langmuir de unión uno a uno sencillo (programa informático de evaluación de BIAcore versión 3.2) ajustando simultáneamente el sensograma de asociación y

disociación. La constante de disociación en equilibrio (K_d) se calcula como la proporción k_{dis}/k_{as} . Véase, por ejemplo, Chen *et al.*, J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999). Si la velocidad de asociación excede de $10^6 M^{-1}s^{-1}$ por el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, entonces la velocidad de asociación se puede determinar usando una técnica de extinción fluorescente que mide el incremento o disminución en la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda 16 nm) a 25 °C de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno como se mide en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con interrupción de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-Aminco serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

Una "velocidad de asociación" o " k_{as} " de acuerdo con la presente invención también se puede determinar con la misma técnica de resonancia de plasmón superficial descrita anteriormente usando un BIAcore™-2000 o un BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con chips de CM5 de antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (UR). En resumen, se activan chips de biosensor de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore, Inc.) con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se diluye el antígeno con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, en 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de la inyección a un caudal de 5 µl/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos sin reaccionar. Para las mediciones cinéticas, se inyectan diluciones en serie de dos veces de Fab (por ejemplo, de 0,78 nM a 500 nM) en PBS con Tween 20 al 0,05 % (PBST) a 25 °C a un caudal de aproximadamente 25 µl/min. Se calculan las velocidades de asociación (k_{as}) y velocidades de disociación (k_{dis}) usando un modelo de Langmuir de unión uno a uno sencillo (programa informático de evaluación de BIAcore versión 3.2) ajustando simultáneamente el sensorograma de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (K_d) se calcula como la proporción k_{dis}/k_{as} . Véase, por ejemplo, Chen *et al.*, J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999). Sin embargo, si la velocidad de asociación excede de $10^6 M^{-1}s^{-1}$ por el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, entonces la velocidad de asociación se determina preferentemente usando una técnica de extinción fluorescente que mide el incremento o disminución en la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda 16 nm) a 25 °C de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno como se mide en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con interrupción de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-Aminco serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

"Biológicamente activo" y "actividad biológica" y "características biológicas" con respecto a un polipéptido de la presente invención, tal como un anticuerpo, fragmento o derivado del mismo, quiere decir que tiene la capacidad de unirse a una molécula biológica, excepto cuando se especifica de otro modo.

"Peptidocuerpo" o "peptidocuerpos" se refiere a una fusión de péptidos generados aleatoriamente con un dominio Fc. Véase la patente de EE. UU. n.º 6.660.843, expedida el 9 de diciembre de 2003 para Feige *et al.* Incluyen uno o más péptidos unidos al extremo N, extremo C, cadenas laterales de aminoácidos o a más de uno de estos sitios. La tecnología de los peptidocuerpos permite el diseño de agentes terapéuticos que incorporan péptidos que seleccionan uno o más ligandos o receptores, péptidos de asentamiento en tumor, péptidos de transporte en membrana y similares. Se ha demostrado que la tecnología de los peptidocuerpos es útil en el diseño de varias de dichas moléculas, incluyendo péptidos lineales y restringidos por disulfuros, "multímeros peptídicos en tándem" (es decir, más de un péptido en una única cadena de un dominio Fc). Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.660.843; solicitud de patente de EE. UU. n.º 2003/0195156, publicada el 16 de octubre de 2003 (correspondiente al documento WO 02/092620, publicado el 21 de noviembre de 2002); solicitud de patente de EE. UU. n.º 2003/0176352, publicada el 18 de septiembre de 2003 (correspondiente al documento WO 03/031589, publicado el 17 de abril de 2003); documento de EE. UU. n.º serie 09/422,838, presentado el 22 de octubre de 1999 (correspondiente al documento WO 00/24770, publicado el 4 de mayo de 2000); solicitud de patente de EE. UU. n.º 2003/0229023, publicada el 11 de diciembre de 2003; documento WO 03/057134, publicado el 17 de julio de 2003; solicitud de patente de EE. UU. n.º 2003/0236193, publicada el 25 de diciembre de 2003 (correspondiente al documento PCT/US04/010989, presentado el 8 de abril de 2004); documento de EE. UU. n.º serie 10/666,480, presentado el 18 de septiembre de 2003 (correspondiente al documento WO 04/026329, publicado el 1 de abril de 2004).

"Affibodies" o "affibody" se refiere al uso de una proteína unida por enlace peptídico a una región Fc, en el que la proteína se usa como andamio para proporcionar una superficie de unión para una molécula diana. La proteína a menudo es una proteína natural tal como la proteína A estafilocócica o el dominio B de unión a IgG, o la proteína Z derivada de la misma (véase Nilsson *et al.* (1987), Prot Eng 1, 107-133, y la patente de EE. UU. n.º 5.143.844) o un fragmento o derivado de la misma. Por ejemplo, se pueden crear affibodies a partir de variantes de proteínas Z que tienen afinidad de unión alterada para molécula(s) diana, en las que un segmento de la proteína Z se ha mutado por mutagénesis aleatoria para crear una colección de variantes que se puede unir a una molécula diana. Los ejemplos de affibodies incluyen la patente de EE. UU. n.º 6.534.628, Nord K *et al.*, Prot Eng 8:601-608 (1995) y Nord K *et al.*, Nat Biotech 15:772-777 (1997). Biotechnol Appl Biochem. 2008 Jun; 50(Pt 2):97-112.

Heteromultímero o complejo "aislado" quiere decir un heteromultímero o complejo que se ha separado y/o recuperado de un componente de su entorno de cultivo celular natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que podrían interferir con los usos diagnósticos o terapéuticos del heteromultímero, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En modos de realización preferentes, el heteromultímero

se purificará (1) hasta más de un 95 % en peso de proteína como se determina por el procedimiento de Lowry, y lo más preferentemente más de un 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos N terminal o interna por el uso de un secuenciador de vaso giratorio o (3) hasta homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando tinción con azul de Coomassie o, preferentemente, plata.

Los heteromultímeros de la presente invención se purifican en general hasta una homogeneidad sustancial. Las expresiones "sustancialmente homogénea", "forma sustancialmente homogénea" y "homogeneidad sustancial" se usan para indicar que el producto está sustancialmente desprovisto de subproductos originados a partir de combinaciones de polipéptidos indeseados (por ejemplo, homomultímeros).

Expresada en términos de pureza, homogeneidad sustancial quiere decir que la cantidad de subproductos no excede de un 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % en peso o es de menos de un 1 % en peso. En un modo de realización, el subproducto está por debajo de un 5 %.

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

"Aislado", cuando se usa para describir los diversos anticuerpos divulgados en el presente documento, quiere decir un anticuerpo que se ha identificado y separado y/o recuperado de una célula o cultivo celular a partir del que se expresó. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que podrían interferir típicamente con los usos diagnósticos o terapéuticos del polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En modos de realización preferentes, el anticuerpo se purificará (1) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos N terminal o interna por el uso de un secuenciador de vaso giratorio, o (2) hasta homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones no reductoras o reductoras usando tinción con azul de Coomassie o, preferentemente, plata. El anticuerpo aislado incluye anticuerpos *in situ* dentro de células recombinantes, debido a que al menos un componente del entorno natural del polipéptido no estará presente. De manera ordinaria, sin embargo, el polipéptido aislado se preparará por al menos una etapa de purificación.

Por "unido" o "uniones" como se usa en el presente documento se quiere decir una unión por enlace peptídico directo entre una primera y segunda secuencia de aminoácidos o una unión que implica una tercera secuencia de aminoácidos que se enlaza peptídicamente a y entre la primera y segunda secuencias de aminoácidos. Por ejemplo, un péptido conector enlazado al extremo C terminal de una secuencia de aminoácidos y al extremo N terminal de la otra secuencia de aminoácidos.

Por "conector" como se usa en el presente documento se quiere decir una secuencia de aminoácidos de dos o más aminoácidos de longitud. El conector puede consistir en aminoácidos neutros polares o no polares. Un conector puede ser, por ejemplo, de 2 a 100 aminoácidos de longitud, tal como entre 2 y 50 aminoácidos de longitud, por ejemplo, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 aminoácidos de longitud. Un conector puede ser "escindible", por ejemplo, por autoescisión o escisión enzimática o química. Los sitios de escisión en las secuencias de aminoácidos y las enzimas y productos químicos que escinden en dichos sitios son bien conocidos en la técnica y también se describen en el presente documento.

Por "anclaje" como se usa en el presente documento se quiere decir un conector aminoacídico que une otras dos secuencias de aminoácidos. Un anclaje como se describe en el presente documento puede unir el extremo N de un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina con el extremo C de un dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina. En modos de realización particulares, un anclaje tiene entre aproximadamente 15 y 50 aminoácidos de longitud, por ejemplo, entre 20 y 26 aminoácidos de longitud (por ejemplo, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o 26 aminoácidos de longitud). Un anclaje puede ser "escindible", por ejemplo, por autoescisión, o escisión enzimática o química usando procedimientos y reactivos estándar en la técnica. En determinados modos de realización particulares, el anclaje comprende las repeticiones Gly-Gly-Ser.

La escisión enzimática de un "conector" o un "anclaje" puede implicar el uso de una endopeptidasa tal como, por ejemplo, Lys-C, Asp-N, Arg-C, V8, Glu-C, quimotripsina, tripsina, pepsina, papaína, trombina, genenasa, factor Xa, TEV (cisteína proteasa del virus del grabado del tabaco), enterocinasa, C3 RVH (proteasa C3 del rinovirus humano), cininogenasa, así como proproteína convertasas tipo subtilisina (por ejemplo, furina (PC1), PC2 o PC3) o N-arginina dibásica convertasa. La escisión química puede implicar el uso de, por ejemplo, hidroxilamina, N-clorosuccinimida, N-bromosuccinimida o bromuro de cianógeno.

Un "sitio de escisión de endopeptidasa Lys-C" como se usa en el presente documento es un residuo de lisina en una secuencia de aminoácidos que se puede escindir en el lado C terminal por endopeptidasa Lys-C. La endopeptidasa Lys-C escinde en el lado C terminal de un residuo de lisina. En determinados modos de realización, el semianticuerpo comprende además una mutación K222A en la región bisagra para retirar el sitio de escisión de endopeptidasa Lys-C endógeno para conservar la estructura del semianticuerpo o el anticuerpo biespecífico ensamblado tras la escisión del anclaje por la endopeptidasa Lys-C.

"Región bisagra" se define en general como una extensión de Glu216 a Pro230 de la IgG1 humana (Burton, Molec. Immunol.22:161-206 (1985)). Las regiones bisagra de otros isotipos de IgG se pueden alinear con la secuencia de IgG1 colocando el primer y último residuos de cisteína formando enlaces S-S entre cadenas pesadas en las mismas posiciones.

5 La "región bisagra inferior" de una región Fc se define normalmente como el tramo de residuos inmediatamente C terminal a la región bisagra, es decir, los residuos de 233 a 239 de la región Fc. Antes de la presente invención, la unión de FcγR se atribuía en general a residuos aminoacídicos en la región bisagra inferior de una región Fc de IgG.

10 El "dominio CH2" de una región Fc de IgG humana normalmente se extiende desde aproximadamente los residuos 231 a aproximadamente 340 de la IgG. El dominio CH2 es único porque no está estrechamente emparejado con otro dominio. Más bien, dos cadenas de carbohidratos ramificadas unidas a N se interponen entre los dos dominios CH2 de una molécula de IgG natural intacta. Se ha especulado que el carbohidrato puede proporcionar un sustituto para el emparejamiento dominio-dominio y ayudar a estabilizar el dominio CH2. Burton, Molec. Immunol.22:161-206 (1985).

15 El "dominio CH3" comprende el tramo de residuos C terminal a un dominio CH2 en una región Fc (es decir, de aproximadamente el residuo aminoacídico 341 a aproximadamente el residuo aminoacídico 447 de una IgG).

20 El término "región Fc" en el presente documento se usa para definir una región C terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, incluyendo regiones Fc de secuencia natural y regiones Fc variantes. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, la región Fc de la cadena pesada de IgG humana se define normalmente para que se extienda de un residuo aminoacídico en la posición Cys226, o de Pro230, al extremo carboxiterminal de la misma. La lisina C terminal (residuo 447 de acuerdo con el sistema de numeración EU) de la región Fc se puede retirar, por ejemplo, durante la producción o purificación del anticuerpo, o genomaniplando de forma recombinante el ácido nucleico que codifica una cadena pesada del anticuerpo. En consecuencia, una composición de anticuerpos intactos puede comprender poblaciones de anticuerpos con todos los residuos K447 retirados, poblaciones de anticuerpos sin residuos K447 retirados y poblaciones de anticuerpos que tienen una mezcla de anticuerpos con y sin el residuo K447.

30 Una "región Fc funcional" posee una "función efectora" de una región Fc de secuencia natural. Las "funciones efectoras" ejemplares incluyen la unión a C1q; CDC; unión al receptor Fc; ADCC; fagocitosis; regulación por disminución de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B, BCR), etc. Dichas funciones efectoras requieren en general que la región Fc se combine con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable de anticuerpo) y se pueden evaluar usando diversos ensayos como se divulga, por ejemplo, en las definiciones en el presente documento.

35 Una "región Fc de secuencia natural" comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc encontrada en la naturaleza. Las regiones Fc humanas de secuencia natural incluyen una región Fc de IgG1 humana de secuencia natural (alotipos A y distinto de A), región Fc de IgG2 humana de secuencia natural, región Fc de IgG3 humana de secuencia natural y región Fc de IgG4 humana de secuencia natural, así como variantes naturales de las mismas.

40 Una "región Fc variante" comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una región Fc de secuencia natural en virtud de al menos una modificación aminoacídica, preferentemente una o más sustituciones aminoacídicas. Preferentemente, la región Fc variante tiene al menos una sustitución aminoacídica en comparación con una región Fc de secuencia natural o con la región Fc de un polipéptido original, por ejemplo de aproximadamente una a aproximadamente diez sustituciones aminoacídicas y, preferentemente, de aproximadamente una a aproximadamente cinco sustituciones aminoacídicas en una región Fc de secuencia natural o en la región Fc del polipéptido original. La región Fc variante en el presente documento poseerá preferentemente una homología de al menos aproximadamente un 80 % con una región Fc de secuencia natural y/o con una región Fc de un polipéptido original y, lo más preferentemente, una homología de al menos aproximadamente un 90 % con la misma, más preferentemente una homología de al menos aproximadamente un 95 % con la misma.

45 "Complejo Fc" como se usa en el presente documento se refiere a dos dominios CH2 de una región Fc que interaccionan entre sí y/o dos dominios CH3 de una región Fc que interaccionan entre sí, en los que los dominios CH2 y/o los dominios CH3 interaccionan a través de enlaces y/o fuerzas (por ejemplo, fuerzas de van der Waals, hidrófobas, hidrófilas) que no son enlaces peptídicos.

50 "Componente Fc" como se usa en el presente documento se refiere a una región bisagra, un dominio CH2 o un dominio CH3 de una región Fc.

55 "Componente CH de Fc" o "FcCH" como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido que comprende un dominio CH2, un dominio CH3, o dominios CH2 y CH3 de una región Fc.

60 Las "funciones efectoras" de anticuerpo se refieren a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia natural o región Fc variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo, y varían de acuerdo con

el isotipo de anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento; unión al receptor Fc; citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación por disminución de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B) y activación de linfocitos B.

En la presente invención, "una condición reductora" se define en base al potencial de oxidorreducción en una reacción (por ejemplo, en una mezcla de ensamblaje) para querer decir que el potencial de oxidorreducción de la reacción es negativo (-). El potencial de oxidorreducción de la reacción en condiciones reductoras está preferentemente entre aproximadamente -50 a -600 mV, de -100 a -600 mV, de -200 a -600 mV, de -100 a -500 mV, de -150 a -300 mV, más preferentemente entre aproximadamente -300 a -500 mV, lo más preferentemente de aproximadamente -400 mV.

Se puede usar cualquier procedimiento adecuado para preparar una condición reductora deseada. Por ejemplo, se puede preparar una condición reductora deseada añadiendo un reductor/agente reductor a la reacción (tal como una mezcla de ensamblaje de la invención). Los reductores adecuados incluyen, sin limitación, ditioneitol (DTT), *tris*-(2-carboxietil)fosfina (TCEP), ácido tioglicólico, ácido ascórbico, ácido tiolacético, glutatión (GSH), beta-mercaptoetilamina, cisteína/cistina, GSH/disulfuro de glutatión (GSSG), cisteamina/cistamina, glicilcisteína y beta-mercaptoetanol, preferentemente GSH. En determinados modos de realización particulares, el reductor es un reductor débil que incluye, sin limitación, GSH, beta-mercaptoetilamina, cisteína/cistina, GSH/GSSG, cisteamina/cistamina, glicilcisteína y beta-mercaptoetanol, preferentemente GSH. En determinados modos de realización preferentes, el reductor es GSH. Está dentro de la capacidad de un experto en la técnica seleccionar reductores adecuados a concentraciones adecuadas y en condiciones experimentales adecuadas para lograr en una reacción la condición reductora deseada. Por ejemplo, L-glutatión reducido 10 mM en una solución con una concentración de proteína de anticuerpo biespecífica de 10 g/l a 20 °C dará como resultado un potencial de oxidorreducción inicial de aproximadamente -400 mV. Un experto en la técnica puede usar cualquier procedimiento adecuado para medir el potencial de oxidorreducción en una reacción dada.

La condición reductora de la reacción se puede estimar y medir usando cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, la condición reductora se puede medir usando un indicador de resazurina (decoloración de azul a incoloro en condiciones reductoras). Para una medición más precisa, se puede usar un potenciómetro de oxidorreducción (tal como un electrodo ORP fabricado por BROADLEY JAMES®).

De forma alternativa, se puede preparar una condición reductora retirando gases disueltos, en especial oxígeno disuelto, a presión reducida de aproximadamente 10 mmHg o menos, preferentemente de aproximadamente 5 mmHg o menos, más preferentemente de aproximadamente 3 mmHg o menos, durante aproximadamente de 1 a 60 minutos, preferentemente durante aproximadamente de 5 a 40 minutos.

En la presente invención, se prefiere que las condiciones reductoras se mantengan desde inmediatamente después de mezclar el primer y segundo polipéptidos que contienen bisagras (tales como semianticuerpos) a lo largo de la etapa de ensamblaje. En determinados modos de realización, la reacción o la mezcla de ensamblaje se mantiene en condiciones reductoras preferentemente durante aproximadamente un 50 % o más, más preferentemente durante aproximadamente un 70 % o más, aún más preferentemente durante aproximadamente un 90 % o más del tiempo de reacción. Es particularmente preferente que el potencial de oxidorreducción del medio de reacción se mantenga de aproximadamente -200 a -600 mV, más preferentemente entre -300 a -500 mV, lo más preferentemente de aproximadamente -400 mV, durante aproximadamente un 50 % o más, más preferentemente durante aproximadamente un 70 % o más, aún más preferentemente durante aproximadamente un 90 % o más del tiempo de reacción.

En determinados modos de realización particulares, la condición reductora es una condición reductora débil. El término "reductor débil" o "condición reductora débil" como se usa en el presente documento se refiere a un agente reductor o una condición reductora preparada por el agente reductor que tiene un potencial de oxidación negativo a 25 °C. El potencial de oxidación del reductor está preferentemente entre -50 a -600 mV, de -100 a -600 mV, de -200 a -600 mV, de -100 a -500 mV, de -150 a -300 mV, más preferentemente entre aproximadamente -300 a -500 mV, lo más preferentemente de aproximadamente -400 mV, cuando el pH está entre 7 y 9, y la temperatura está entre 15 °C y 39 °C. Un experto en la técnica podrá seleccionar reductores adecuados para preparar una condición reductora deseada. El investigador experto reconocerá que un reductor fuerte, es decir, uno que tiene un potencial de oxidación más negativo que los reductores mencionados anteriormente para la misma concentración, pH y temperatura, se puede usar a una concentración más baja. En un modo de realización preferente, las proteínas podrán formar enlaces disulfuro en presencia del reductor cuando se incuban en las condiciones citadas anteriormente. Los ejemplos de un reductor débil incluyen, sin limitación, glutatión, beta-mercaptoetilamina, cistina/cisteína, GSH/GSSG, cisteamina/cistamina, glicilcisteína y beta-mercaptoetanol. En determinados modos de realización, se puede usar un potencial de oxidación similar al de la proporción molar 200X de GSH:anticuerpo como punto de referencia para una condición reductora débil en la que se puede esperar un ensamblaje eficaz usando otros reductores.

Una "mezcla de ensamblaje" es una solución que comprende un primer polipéptido que contiene bisagra, un segundo polipéptido que contiene bisagra. En determinados modos de realización, la mezcla de ensamblaje está presente en una condición reductora. En algunos modos de realización, la mezcla de ensamblaje está presente en una condición

reductora débil. En determinados otros modos de realización, la mezcla de ensamblaje comprende además un reductor débil. El potencial de oxidación de la mezcla de ensamblaje está entre -50 a -600 mV, de -100 a -600 mV, de -200 a -600 mV, de -100 a -500 mV, de -150 a -300 mV, más preferentemente entre aproximadamente -300 a -500 mV, lo más preferentemente de aproximadamente -400 mV, cuando el pH está entre 7 y 9, y la temperatura está entre 15 °C y 39 °C.

Los reactivos comercialmente disponibles a los que se hace referencia en los ejemplos se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante, a menos que se indique de otro modo. La fuente de las células identificadas en los siguientes ejemplos, y en toda la memoria descriptiva, por números de acceso ATCC es la American Type Culture Collection, Manassas, VA. A menos que se indique de otro modo, la presente invención usa procedimientos estándar de tecnología de ADN recombinante, tales como los descritos anteriormente en el presente documento y en los siguientes libros de texto: Sambrook *et al.*, *supra*; Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology* (Green Publishing Associates and Wiley Interscience, NY, 1989); Innis *et al.*, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, Inc., NY, 1990); Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, 1988); Gait, *Oligonucleotide Synthesis* (IRL Press, Oxford, 1984); Freshney, *Animal Cell Culture*, 1987; Coligan *et al.*, *Current Protocols in Immunology*, 1991.

En toda esta memoria descriptiva y las reivindicaciones, el término "comprender", o variaciones tales como "comprende" o "comprendiendo", se entenderá que implican la inclusión de un número entero o grupo de números enteros establecido, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o grupo de enteros.

II. Construcción de proteínas heteromultiméricas

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

Dominios de heteromultimerización

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

Botones en ojales

El uso de botones en ojales como procedimiento de producción de anticuerpos multiespecíficos es bien conocido en la técnica. Véase la patente de EE. UU. n.º 5.731.168 concedida el 24 de marzo de 1998 cedida a Genentech, publicación PCT n.º WO2009089004 publicada el 16 de julio de 2009 y cedida a Amgen, y publicación de patente de EE. UU. n.º 20090182127 publicada el 16 de julio de 2009 y cedida a Novo Nordisk A/S. Véase también Marvin y Zhu, *Acta Pharmacologica Sincia* (2005) 26(6):649-658 y Kontermann (2005) *Acta Pharmacol. Sin.*, 26:1-9. Aquí se proporciona un breve análisis.

Una "protuberancia" se refiere a al menos una cadena lateral de aminoácidos que se proyecta desde la interfaz de un primer polipéptido y es, por lo tanto, posicionable en una cavidad compensatoria en la interfaz adyacente (es decir, la interfaz de un segundo polipéptido) para estabilizar el heteromultímero y, de este modo, favorecer la formación de heteromultímeros sobre la formación de homomultímeros, por ejemplo. La protuberancia puede existir en la interfaz original o se puede introducir sintéticamente (por ejemplo, alterando el ácido nucleico que codifica la interfaz). Normalmente, el ácido nucleico que codifica la interfaz del primer polipéptido se altera para codificar la protuberancia. Para lograr esto, el ácido nucleico que codifica al menos un residuo aminoacídico "original" en la interfaz del primer polipéptido se reemplaza por el ácido nucleico que codifica al menos un residuo aminoacídico "importado" que tiene un volumen de cadena lateral mayor que el residuo aminoacídico original. Se apreciará que puede haber más de un residuo original y su correspondiente residuo importado. El límite superior para el número de residuos originales que se reemplazan es el número total de residuos en la interfaz del primer polipéptido. Los volúmenes de cadena lateral de los diversos residuos amino se muestran en la siguiente tabla.

TABLA 1

Propiedades de residuos aminoacídicos

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

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

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

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

15 Los residuos importados preferentes para la formación de una protuberancia son en general residuos aminoacídicos naturales y se seleccionan preferentemente de arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W). Los más preferentes son triptófano y tirosina. En un modo de realización, el residuo original para la formación de la protuberancia tiene un volumen de cadena lateral pequeño, tal como alanina, asparagina, ácido aspártico, glicina, serina, treonina o valina. Las sustituciones aminoacídicas ejemplares en el dominio CH3 para formar la protuberancia incluyen, sin limitación, la sustitución T366W.

Una "cavidad" se refiere a al menos una cadena lateral de aminoácidos que se retrae de la interfaz de un segundo polipéptido y, por lo tanto, aloja una protuberancia correspondiente en la interfaz adyacente de un primer polipéptido. La cavidad puede existir en la interfaz original o se puede introducir sintéticamente (por ejemplo, alterando el ácido nucleico que codifica la interfaz). Normalmente, el ácido nucleico que codifica la interfaz del segundo polipéptido se altera para codificar la cavidad. Para lograr esto, el ácido nucleico que codifica al menos un residuo aminoacídico "original" en la interfaz del segundo polipéptido se reemplaza por el ADN que codifica al menos un residuo aminoacídico "importado" que tiene un volumen de cadena lateral menor que el residuo aminoacídico original. Se apreciará que puede haber más de un residuo original y su correspondiente residuo importado. El límite superior para el número de residuos originales que se reemplazan es el número total de residuos en la interfaz del segundo polipéptido. Los volúmenes de cadena lateral de los diversos residuos amino se muestran en la tabla 1 anterior. Los residuos importados preferentes para la formación de una cavidad son normalmente residuos aminoacídicos naturales y se seleccionan preferentemente de alanina (A), serina (S), treonina (T) y valina (V). Los más preferentes son serina, alanina o treonina. En un modo de realización, el residuo original para la formación de la cavidad tiene un volumen de cadena lateral grande, tal como tirosina, arginina, fenilalanina o triptófano. Las sustituciones aminoacídicas ejemplares en el dominio CH3 para generar la cavidad incluyen, sin limitación, las sustituciones T366S, L368A, Y407A, Y407T e Y407V. En determinados modos de realización, el semianticuerpo de botón comprende la sustitución T366W, y el semianticuerpo de ojal comprende las sustituciones T366S/L368A/Y407V.

Un residuo aminoacídico "original" es uno que se reemplaza por un residuo "importado" que puede tener un volumen de cadena lateral menor o mayor que el residuo original. El residuo aminoacídico importado puede ser un residuo aminoacídico natural o no natural, pero preferentemente es el primero. Los residuos aminoacídicos "naturales" son los residuos codificados por el código genético y enumerados en la tabla 1 anterior. Por residuo aminoacídico "no natural" se quiere decir un residuo que no se codifica por el código genético, pero que puede unir de forma covalente residuo(s) aminoacídico(s) adyacente(s) en la cadena polipeptídica. Ejemplos de residuos aminoacídicos no naturales son norleucina, ornitina, norvalina, homoserina y otros análogos de residuos aminoacídicos tales como los descritos en Ellman *et al.*, *Meth. Enzym.* 202:301-336 (1991), por ejemplo. Para generar dichos residuos aminoacídicos no naturales, se pueden usar los procedimientos de Noren *et al.* *Science* 244: 182 (1989) y Ellman *et al.*, *supra*. En resumen, esto implica activar químicamente un ARNt supresor con un residuo aminoacídico no natural seguido de transcripción y traducción *in vitro* del ARN. El procedimiento de la presente invención implica reemplazar al menos un residuo aminoacídico original, pero se puede reemplazar más de un residuo original. Normalmente, no más de los residuos totales en la interfaz del primer o segundo polipéptido comprenderán residuos aminoacídicos originales que se reemplazan. Típicamente, los residuos originales para reemplazo están "enterrados". Por "enterrado" se quiere decir que el residuo es esencialmente inaccesible para el disolvente. En general, el residuo importado no es cisteína para evitar la posible oxidación o emparejamiento incorrecto de enlaces disulfuro.

La protuberancia es "posicionable" en la cavidad, lo que quiere decir que la localización espacial de la protuberancia y la cavidad en la interfaz de un primer polipéptido y segundo polipéptido respectivamente y los tamaños de la protuberancia y la cavidad son tales que la protuberancia se puede localizar en la cavidad sin perturbar significativamente la asociación normal del primer y segundo polipéptidos en la interfaz. Puesto que las protuberancias tales como Tyr, Phe y Trp típicamente no se extienden perpendicularmente desde el eje de la interfaz y tienen conformaciones preferentes, la alineación de una protuberancia con una cavidad correspondiente se basa en modelar el par protuberancia/cavidad en base a una estructura tridimensional tal como la obtenida por cristalografía de rayos X o resonancia magnética nuclear (RMN). Esto se puede lograr usando técnicas ampliamente aceptadas en la técnica.

Por "ácido nucleico original o molde" se quiere decir el ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés que se puede "alterar" (es decir, genomanipular o mutar) para codificar una protuberancia o cavidad. El ácido nucleico original o de partida puede ser un ácido nucleico natural o puede comprender un ácido nucleico que se ha sometido a alteración previa (por ejemplo, un fragmento de anticuerpo humanizado). Por "alterar" el ácido nucleico se quiere decir que el ácido nucleico original se muta insertando, eliminando o reemplazando al menos un codón que codifica un residuo aminoacídico de interés. Normalmente, un codón que codifica un residuo original se reemplaza por un codón que codifica un residuo importado. Las técnicas para modificar genéticamente un ADN de esta manera se han revisado en Mutagenesis: a Practical Approach, M.J. McPherson, Ed., IRL Press, Oxford, UK. (1991), e incluyen mutagénesis dirigida a sitio, mutagénesis por inserción de casete y mutagénesis por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), por ejemplo. Al mutar un ácido nucleico original/molde, se altera por tanto de forma correspondiente un polipéptido original/molde codificado por el ácido nucleico original/molde.

La protuberancia o cavidad se puede "introducir" en la interfaz de un primer o segundo polipéptido por medios sintéticos, por ejemplo, por técnicas recombinantes, síntesis de péptidos *in vitro*, las técnicas para introducir residuos aminoacídicos no naturales previamente descritos, por acoplamiento enzimático o químico de péptidos o alguna combinación de estas técnicas. En consecuencia, la protuberancia o cavidad que se "introduce" es "no natural", lo que quiere decir que no existe en la naturaleza o en el polipéptido original (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal humanizado).

En general, el residuo aminoacídico importado para formar la protuberancia tiene un número relativamente pequeño de "rotámeros" (por ejemplo, aproximadamente 3-6). Un "rotámero" es una conformación energéticamente favorable

de una cadena lateral de aminoácidos. El número de rotámeros de los diversos residuos aminoacídicos se revisa en Ponders y Richards, *J. Mol. Biol.* 193: 775-791 (1987).

III. Vectores, células huésped y procedimientos recombinantes

Para la producción recombinante de una proteína heteromultimérica (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico) de la invención, el ácido nucleico que la codifica se aísla y se inserta en un vector replicable para clonación adicional (amplificación del ADN) o para expresión. El ADN que codifica el anticuerpo se puede aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que se pueden unir específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo). Están disponibles muchos vectores. La elección del vector depende en parte de la célula huésped que se va a usar. En general, las células huésped preferentes son de origen procariota o bien eucariota (en general de mamífero, pero incluyendo también de hongos (por ejemplo, levadura), de insecto, vegetal y células nucleadas de otros organismos multicelulares). Se apreciará que se pueden usar regiones constantes de cualquier isotipo para este propósito, incluyendo las regiones constantes de IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, y que dichas regiones constantes se pueden obtener a partir de cualquier especie humana o animal. En determinados modos de realización, la región constante es de IgG, en particular IgG1, IgG2 o IgG4.

Una célula huésped se genomanipula de modo que exprese un polipéptido que contiene bisagra que comprende un dominio de heterodimerización en el que la célula huésped no expresa un polipéptido que contiene bisagra que comprende un segundo dominio de heterodimerización.

a. Generación de proteínas heteromultiméricas usando células huésped procariotas

i. Construcción de vectores

Las secuencias de polinucleótidos que codifican los componentes polipeptídicos de las proteínas heteromultiméricas (por ejemplo, un anticuerpo) de la invención se pueden obtener usando técnicas recombinantes estándar. Las secuencias de polinucleótidos deseadas se pueden aislar y secuenciar de, por ejemplo, células productoras de anticuerpos tales como células de hibridoma. De forma alternativa, se pueden sintetizar polinucleótidos usando un sintetizador de nucleótidos o técnicas de PCR. Una vez obtenidas, las secuencias que codifican los polipéptidos se insertan en un vector recombinante que puede replicar y expresar polinucleótidos heterógenos en huéspedes procariotas. Se pueden usar muchos vectores que están disponibles y son conocidos en la técnica para el propósito de la presente invención. La selección de un vector apropiado dependerá principalmente del tamaño de los ácidos nucleicos que se van a insertar en el vector y la célula huésped particular que se va a transformar con el vector. Cada vector contiene diversos componentes, dependiendo de su función (amplificación o expresión de polinucleótido heterógeno, o ambas) y de su compatibilidad con la célula huésped particular en la que reside. Los componentes del vector en general incluyen, pero no se limitan a: un origen de replicación, un gen marcador de selección, un promotor, un sitio de unión a ribosoma (RBS), una secuencia señal, la inserción de ácido nucleico heterógeno y una secuencia de terminación de la transcripción.

En general, se usan los vectores plasmídicos que contienen las secuencias del replicón y de control que se derivan de especies compatibles con la célula huésped en conexión con estos huéspedes. El vector porta de manera ordinaria un sitio de replicación, así como secuencias de marcaje que pueden proporcionar una selección fenotípica en las células transformadas. Por ejemplo, *E. coli* se transforma típicamente usando pBR322, un plásmido derivado de una especie de *E. coli*. pBR322 contiene genes que codifican resistencia a ampicilina (Amp) y tetraciclina (Tet) y, por tanto, proporciona medios fáciles para identificar células transformadas. pBR322, sus derivados u otros plásmidos microbianos o bacteriófagos también pueden contener, o modificarse para contener, promotores que se pueden usar por el organismo microbiano para la expresión de proteínas endógenas. Los ejemplos de derivados de pBR322 usados para la expresión de anticuerpos particulares se describen en detalle en Carter *et al.*, patente de EE. UU. n.º 5.648.237.

Además, se pueden usar vectores de fagos que contienen las secuencias del replicón y de control que son compatibles con el microorganismo huésped como vectores de transformación en conexión con estos huéspedes. Por ejemplo, se puede utilizar un bacteriófago tal como λ GEM.TM.-11 en la preparación de un vector recombinante que se puede usar para transformar células huésped susceptibles tales como *E. coli* LE392.

El vector de expresión de la invención puede comprender dos o más pares de promotor-cistrón, que codifican cada uno de los componentes polipeptídicos. Un promotor es una secuencia reguladora no traducida localizada en dirección 5' con respecto a un cistrón que modula su expresión. Típicamente, los promotores procariotas se dividen en dos clases, inducibles y constitutivos. Un promotor inducible es un promotor que inicia un incremento en los niveles de transcripción del cistrón bajo su control en respuesta a cambios en la condición de cultivo, por ejemplo, la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura.

Un gran número de promotores reconocidos por una variedad de células huésped potenciales son bien conocidos. El promotor seleccionado se puede unir de forma funcional al ADN cistrón que codifica, por ejemplo, la cadena ligera o pesada retirando el promotor del ADN fuente por medio de la digestión con enzimas de restricción e insertando la

secuencia del promotor aislado en el vector de la invención. Se puede usar tanto la secuencia del promotor natural como muchos promotores heterógenos para dirigir la amplificación y/o expresión de los genes diana. En algunos modos de realización, se utilizan promotores heterógenos, ya que en general permiten una mayor transcripción y mayores rendimientos del gen diana expresado en comparación con el promotor del polipéptido diana natural.

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

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

En otro aspecto, la producción de las inmunoglobulinas de acuerdo con la invención se puede producir en el citoplasma de la célula huésped y, por lo tanto, no requiere la presencia de secuencias señal de secreción en cada cistrón. A este respecto, las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina se expresan, se pliegan y se ensamblan para formar inmunoglobulinas funcionales en el citoplasma. Determinadas cepas huésped (por ejemplo, las cepas *E. coli* trxB⁻) proporcionan condiciones de citoplasma que son favorables para la formación de enlaces disulfuro, permitiendo de este modo el plegamiento y ensamblaje apropiados de las subunidades proteicas expresadas. Véase Proba y Pluckthun *Gene*, 159:203 (1995).

Las células huésped procariotas adecuadas para expresar proteínas heteromultiméricas (por ejemplo, anticuerpos) de la invención incluyen *Archaeobacteria* y *Eubacteria*, tales como organismos gramnegativos o grampositivos. Los ejemplos de bacterias útiles incluyen *Escherichia* (por ejemplo, *E. coli*), *Bacilli* (por ejemplo, *B. subtilis*), *Enterobacteria*, especie *Pseudomonas* (por ejemplo, *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescans*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla* o *Paracoccus*. En un modo de realización, se usan células gramnegativas. En un modo de realización, se usan células de *E. coli* como huéspedes para la invención. Los ejemplos de cepas de *E. coli* incluyen la cepa W3110 (Bachmann, *Cellular and Molecular Biology*, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219; n.º depósito ATCC 27325) y derivados de la misma, incluyendo la cepa 33D3 que tiene el genotipo W3110 Δ fhuA (Δ tonA) ptr3 lac lq lacL8 Δ ompT Δ (nmpc-fepE) degP41 kan^R (patente de EE. UU. n.º 5.639.635). También son adecuadas otras cepas y derivados de las mismas, tales como *E. coli* 294 (ATCC 31446), *E. coli* B, *E. coli* 1776 (ATCC 31537) y *E. coli* RV308 (ATCC 31608). En un modo de realización, *E. coli* Δ lpp encuentra un uso particular. Estos ejemplos son ilustrativos en lugar de limitantes. Los procedimientos para construir derivados de cualquiera de las bacterias mencionadas anteriormente que tienen genotipos definidos son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Bass *et al.*, *Proteins*, 8:309-314 (1990). En general, es necesario seleccionar las bacterias apropiadas teniendo en cuenta la replicabilidad del replicón en las células de una bacteria. Por ejemplo, se pueden usar de forma adecuada las especies *E. coli*, *Serratia* o *Salmonella* como huésped cuando se usan plásmidos bien conocidos tales como pBR322, pBR325, pACYC177 o pKN410 para administrar el replicón. Típicamente, la célula huésped debe secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas y se pueden incorporar de forma deseable inhibidores de proteasas adicionales en el cultivo celular.

ii. Producción de polipéptidos

Las células huésped se transforman con los vectores de expresión descritos anteriormente y se cultivan en medios de nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

Transformación quiere decir introducir ADN en el huésped procariota de modo que el ADN sea replicable, como elemento extracromosómico o bien como integrante cromosómico. Dependiendo de la célula huésped usada, la transformación se realiza usando técnicas estándar apropiadas para dichas células. El tratamiento con calcio que emplea cloruro de calcio se usa en general para células bacterianas que contienen barreras de pared celular sustanciales. Otro procedimiento para la transformación emplea polietilenglicol/DMSO. Aún otra técnica usada comúnmente es la electroporación.

Las células procariotas usadas para producir los polipéptidos de la invención se cultivan en medios conocidos en la

técnica y adecuados para el cultivo de las células huésped seleccionadas. Los ejemplos de medios adecuados incluyen caldo Luria (LB) más los complementos de nutrientes necesarios. En algunos modos de realización, los medios también contienen un agente de selección, elegido en base a la construcción del vector de expresión, para permitir selectivamente el crecimiento de células procariotas que contienen el vector de expresión. Por ejemplo, se añade ampicilina a los medios para el crecimiento de células que expresan el gen resistente a ampicilina.

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

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

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

En un modo de realización, la primera y segunda células huésped que contienen bisagras se cultivan por separado y los polipéptidos expresados de la presente invención se secretan y se recuperan del periplasma de las células huésped por separado. En un segundo modo de realización, la primera y segunda células huésped que contienen bisagras se cultivan por separado y antes del aislamiento de los polipéptidos que contienen bisagras, los dos cultivos de células huésped se mezclan conjuntamente y las células se sedimentan. En un tercer modo de realización, la primera y segunda células huésped que contienen bisagras se cultivan por separado, se centrifugan y se resuspenden por separado y a continuación se mezclan conjuntamente antes del aislamiento de los polipéptidos que contienen bisagras. En un cuarto modo de realización, la primera y segunda células huésped que contienen bisagras se cultivan conjuntamente en el mismo recipiente de cultivo. La recuperación de proteínas típicamente implica romper la membrana celular del microorganismo, en general por medios tales como choque osmótico, sonicación o lisis. Una vez que se rompen las células, se pueden retirar los restos celulares o células enteras por centrifugación o filtración. Las proteínas se pueden purificar adicionalmente, por ejemplo, por cromatografía en resina de afinidad. De forma alternativa, las proteínas se pueden transportar o secretar en los medios de cultivo y aislarse en los mismos. Las proteínas recombinantes expresadas con una marca de secuencia exógena (o marca de epítipo) pueden facilitar la etapa de purificación. La técnica de clonación y purificación de proteínas que contienen una marca de secuencia exógena (incluyendo, sin limitación, la marca His y la marca GST) es bien conocida en la técnica. Las células se pueden retirar del cultivo y filtrar y concentrar el sobrenadante del cultivo para purificación adicional de las proteínas producidas. Los polipéptidos expresados se pueden aislar e identificar adicionalmente usando procedimientos comúnmente conocidos, tales como electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y ensayo de inmunoelectrotransferencia. Los polipéptidos aislados se usarán para producir las proteínas heteromultiméricas.

En un aspecto de la invención, la producción de proteína heteromultimérica (por ejemplo, anticuerpo) se lleva a cabo en gran cantidad por un proceso de fermentación. Diversos procedimientos de fermentación discontinua a gran escala están disponibles para la producción de proteínas recombinantes. Las fermentaciones a gran escala tienen al menos 1000 litros de capacidad, preferentemente de aproximadamente 1000 a 100 000 litros de capacidad. Estos fermentadores usan impulsores con agitador para distribuir oxígeno y nutrientes, en especial glucosa (la fuente de carbono/energía preferente). La fermentación a pequeña escala se refiere en general a la fermentación en un fermentador que no tiene más de aproximadamente 100 litros de capacidad volumétrica, y que puede variar de aproximadamente 1 litro a aproximadamente 100 litros.

En un proceso de fermentación, la inducción de la expresión de proteína típicamente se inicia después de que se hayan cultivado las células en condiciones adecuadas hasta una densidad deseada, por ejemplo, una DO_{550} de aproximadamente 180-220, periodo en el que las células están en la fase estacionaria temprana. Se puede usar una variedad de inductores, de acuerdo con la construcción de vector empleada, como es conocido en la técnica y se describe anteriormente. Las células se pueden cultivar durante periodos más cortos antes de la inducción. Las células se inducen normalmente durante aproximadamente 12-50 horas, aunque se puede usar un tiempo de inducción más largo o más corto.

Para mejorar el rendimiento de producción y la calidad de los polipéptidos de la invención, se pueden modificar diversas condiciones de fermentación. Por ejemplo, para mejorar el ensamblaje y plegamiento apropiados de las proteínas heteromultiméricas secretadas (por ejemplo, anticuerpos), se pueden usar vectores adicionales que

sobreexpresan proteínas chaperonas, tales como proteínas Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD y/o DsbG) o FkpA (una peptidilprolil-cis,trans-isomerasa con actividad chaperona) para cotransformar las células procariotas huésped. Se ha demostrado que las proteínas chaperonas facilitan el plegamiento apropiado y la solubilidad de proteínas heterógenas producidas en células huésped bacterianas. Chen *et al.* (1999) *J Bio Chem* 274:19601-19605; Georgiou *et al.*, patente de EE. UU. n.º 6.083.715; Georgiou *et al.*, patente de EE. UU. n.º 6.027.888; Bothmann y Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17100-17105; Ramm y Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17106-17113; Arie *et al.* (2001) *Mol. Microbiol.* 39:199-210.

Para minimizar la proteólisis de proteínas heterógenas expresadas (en especial las que son proteolíticamente sensibles), se pueden usar determinadas cepas huésped carentes de enzimas proteolíticas para la presente invención. Por ejemplo, se pueden modificar cepas de células huésped para efectuar una mutación/mutaciones genética(s) en los genes que codifican proteasas bacterianas conocidas, tales como proteasa III, OmpT, DegP, Tsp, proteasa I, proteasa Mi, proteasa V, proteasa VI y combinaciones de las mismas. Algunas cepas carentes de proteasas de *E. coli* están disponibles y se describen, por ejemplo, en Joly *et al.* (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:2773-2777; Georgiou *et al.*, patente de EE. UU. n.º 5.264.365; Georgiou *et al.*, patente de EE. UU. n.º 5.508.192; Hara *et al.*, *Microbial Drug Resistance*, 2:63-72 (1996).

En un modo de realización, se usan cepas de *E. coli* carentes de enzimas proteolíticas y transformadas con plásmidos que sobreexpresan una o más proteínas chaperonas como células huésped en el sistema de expresión de la invención. En un segundo modo de realización, la cepa de *E. coli* carece de una lipoproteína de la membrana externa (Δ lpp).

iii. Purificación de proteínas heteromultiméricas

En un modo de realización, la proteína heteromultimérica producida en el presente documento se purifica adicionalmente para obtener preparaciones que son sustancialmente homogéneas para ensayos y usos adicionales. Se pueden emplear procedimientos de purificación de proteínas estándar conocidos en la técnica. Los siguientes procedimientos son ejemplares de procedimientos de purificación adecuados: fraccionamiento en inmunoafinidad o columnas de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice o en una resina de intercambio iónico tal como DEAE, cromatofoque, SDS-PAGE, precipitación con sulfato de amonio y filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75.

En un aspecto, se usa proteína A inmovilizada en una fase sólida para la purificación por inmunoafinidad de, por ejemplo, los productos de semianticuerpo o de anticuerpo de longitud completa de la invención. La proteína A es una proteína de la pared celular de 41 kD de *Staphylococcus aureus* que se une con una alta afinidad a la región Fc de los anticuerpos. Lindmark *et al.* (1983) *J. Immunol. Meth.* 62:1-13. La fase sólida en la que se inmoviliza la proteína A es preferentemente una columna que comprende una superficie de vidrio o sílice, más preferentemente una columna de vidrio de poro controlado o una columna de ácido silícico. En algunas aplicaciones, la columna se ha recubierto con un reactivo, tal como glicerol, en un intento de evitar la adherencia inespecífica de contaminantes.

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

b. Generación de proteínas heteromultiméricas usando células huésped eucariotas:

Los componentes del vector en general incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

i. Componente de secuencia señal

Un vector para su uso en una célula huésped eucariota también puede contener una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína madura o polipéptido de interés. La secuencia señal heterógena seleccionada preferentemente es una que se reconoce y se procesa (es decir, se escinde por una peptidasa señal) por la célula huésped. En la expresión de células de mamífero, están disponibles secuencias señal de mamífero así como secuencias líder secretoras víricas, por ejemplo, la señal gD del herpes simple. El ADN para dicha región de precursor se fija en el marco de lectura al ADN que codifica la(s) proteína(s) heteromultimérica(s) deseada(s) (por ejemplo, anticuerpos).

ii. Origen de la replicación

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

iii. Componente del gen de selección

Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también denominado un marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan carencias auxotróficas, cuando sea pertinente, o (c) administran nutrientes críticos no disponibles en medios complejos.

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

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

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

De forma alternativa, se pueden seleccionar células huésped (en particular huéspedes naturales que contienen DHFR endógena) transformadas o cotransformadas con secuencias de ADN que codifican un anticuerpo, proteína DHFR natural y otro marcador seleccionable tal como aminoglucósido 3'-fosfotransferasa (APH) por crecimiento celular en medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable tal como un antibiótico aminoglucosídico, por ejemplo, canamicina, neomicina o G418. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.965.199.

iv. Componente de promotor

Los vectores de expresión y clonación normalmente contienen un promotor que se reconoce por el organismo huésped y se une de forma funcional al ácido nucleico de polipéptido(s) que contiene(n) bisagra(s) deseado(s) (por ejemplo, anticuerpo). Las secuencias de promotor son conocidas para eucariotas. Prácticamente todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente de 25 a 30 bases en dirección 5' del sitio donde se inicia la transcripción. Otra secuencia encontrada de 70 a 80 bases en dirección 5' del inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT, donde N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucariotas hay una secuencia AATAAA que puede ser la secuencia señal para la adición de la cola poli A en el extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan de forma adecuada en vectores de expresión eucariotas.

La transcripción de polipéptido(s) que contiene(n) bisagra(s) deseado(s) (por ejemplo, semianticuerpo) de vectores en células huésped de mamífero se controla, por ejemplo, por promotores obtenidos de genomas de virus tales como, por ejemplo, polioma virus, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y virus de simio 40 (SV40), de promotores de mamífero heterógenos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, o de promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células huésped.

Los promotores tempranos y tardíos del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación vírico de SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción de HindIII E. Un sistema para expresar ADN en huéspedes mamíferos usando el virus del papiloma bovino como vector se divulga en la patente de EE. UU. n.º 4.419.446. Una modificación de este sistema se describe en la patente de EE. UU. n.º 4.601.978. Véase también Reyes *et al.*, *Nature* 297:598-601 (1982) sobre la expresión del ADNc de β-interferón humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina cinasa del virus del herpes simple. De forma alternativa, se puede usar la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous como promotor.

v. Componente de elemento potenciador

La transcripción de ADN que codifica el/los polipéptido(s) que contiene(n) bisagra(s) deseado(s) (por ejemplo, anticuerpo) por eucariotas superiores se puede incrementar insertando una secuencia potenciadora en el vector. Ahora son conocidas muchas secuencias potenciadoras de genes de mamíferos (por ejemplo, genes de globina, elastasa, albúmina, α-fetoproteína e insulina). Además, uno puede usar un potenciador de un virus de célula eucariota. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el promotor/potenciador temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, *Nature* 297:17-18 (1982) para una descripción de los elementos para potenciar la activación de promotores eucariotas. El potenciador se puede empalmar en el vector en una posición 5' o 3' a la secuencia que codifica el polipéptido de anticuerpo, siempre que se logre la potenciación,

pero en general se localiza en un sitio 5' del promotor.

vi. Componente de terminación de la transcripción

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

vii. Selección y transformación de células huésped

15 Las células huésped adecuadas para la clonación o expresión del ADN en los vectores de la presente invención incluyen células eucariotas superiores descritas en el presente documento, incluyendo células huésped de vertebrado. La propagación de células de vertebrado en cultivo (cultivo tisular) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Los ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *et al.*, *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/DHFR (CHO, Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980));
20 células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA, ATCC CCL 2); células renales caninas (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

25 Las células huésped se transforman con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente para la producción de polipéptido(s) que contiene(n) bisagra(s) deseado(s) (por ejemplo, anticuerpo) y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.
30

viii. Cultivo de las células huésped

35 Las células huésped usadas para producir un polipéptido(s) que contiene(n) bisagra(s) deseado(s) (por ejemplo, anticuerpo) de la presente invención se pueden cultivar en una variedad de medios. Los medios comercialmente disponibles tales como F10 de Ham (Sigma), medio esencial mínimo (MEM, Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Sigma) son adecuados para cultivar las células huésped. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham *et al.*, *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes *et al.*, *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), patentes de EE. UU. n.ºs 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; documento WO 90/03430; documento WO 87/00195; o patente de EE. UU. re. 30.985 se pueden usar como medios de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios se puede complementar según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMYCIN™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos presentes normalmente en concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. Cualquier otro complemento necesario también se puede incluir en concentraciones apropiadas que serían conocidas por los expertos en la técnica. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son las usadas previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión, y serán evidentes para el experto en la técnica.
50

ix. Purificación de proteínas heteromultiméricas

55 Cuando se usan técnicas recombinantes, los polipéptidos que contienen bisagras se pueden producir intracelularmente, o secretarse directamente en el medio. Si el polipéptido que contiene bisagra se produce intracelularmente, como primera etapa, los restos de partículas, células huésped o bien fragmentos lisados, se retiran, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Cuando el polipéptido que contiene bisagra se secreta en el medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión en general se concentran en primer lugar usando un filtro de concentración de proteína comercialmente disponible, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes accidentales.
60

65 La composición heteromultimérica preparada a partir de las células se puede purificar usando, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, de interacción hidrófoba, cromatografía con hidroxipatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferente. También se contemplan combinaciones de las técnicas mencionadas anteriormente. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y del isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el

anticuerpo. Se puede usar proteína A para purificar anticuerpos que se basan en cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ humanas (Lindmark *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humana (Guss *et al.*, *EMBO J.* 5:1567-1575 (1986)). La matriz a la que se une el ligando de afinidad es muy a menudo agarosa, pero están disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables tales como vidrio de poro controlado o poli(estirenodivinil)benceno permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que los que se pueden lograr con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio C_{H3} , la resina Bakerbond ABX™ (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas tales como el fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, la precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina-SEPHAROSE™, cromatografía en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna con poli(ácido aspártico)), cromatografía de exclusión, SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio también están disponibles dependiendo del anticuerpo que se va a recuperar.

Después de cualquier etapa de purificación preliminar, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y contaminantes se puede someter a cromatografía de interacción hidrófoba a pH bajo usando un tampón de elución a un pH de entre aproximadamente 2,5-4,5, realizada preferentemente a concentraciones de sal bajas (por ejemplo, sal de aproximadamente 0-0,25 M). La producción de las proteínas heteromultiméricas puede comprender de forma alternativa o adicional (para cualquiera de los procedimientos particulares anteriores) dializar una solución que comprende una mezcla de los polipéptidos.

x. Producción de anticuerpos usando baculovirus

El baculovirus recombinante se puede generar cotransfectando un plásmido que codifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo y ADN de virus BaculoGold™ (Pharming) en una célula de insecto tal como una célula de *Spodoptera frugiperda* (por ejemplo, células Sf9, ATCC CRL 1711) o una célula D2 de *Drosophila melanogaster* usando, por ejemplo, lipofectina (comercialmente disponible de GIBCO-BRL). En un ejemplo particular, una secuencia de anticuerpo se fusiona en dirección 5' de una marca de epítipo contenida dentro de un vector de expresión de baculovirus. Dichas marcas de epítipo incluyen marcas poli-His. Se puede emplear una variedad de plásmidos, incluyendo plásmidos derivados de plásmidos comercialmente disponibles tales como pVL1393 (Novagen) o pAcGP67B (Pharming). En resumen, la secuencia que codifica un anticuerpo o un fragmento del mismo se puede amplificar por PCR con cebadores complementarios a las regiones 5' y 3'. El cebador en 5' puede incorporar sitios de enzimas de restricción flanqueantes (seleccionados). A continuación, se puede digerir el producto con las enzimas de restricción seleccionadas y subclonarse en el vector de expresión.

Después de la transfección con el vector de expresión, las células huésped (por ejemplo, células Sf9) se incuban durante 4-5 días a 28 °C y el virus liberado se recoge y se usa para amplificaciones adicionales. La infección vírica y la expresión de proteína se pueden realizar como se describe, por ejemplo, por O'Reilly *et al.* (Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual. Oxford: Oxford University Press (1994)).

A continuación, se puede purificar el anticuerpo marcado con poli-His expresado, por ejemplo, por cromatografía de afinidad con quelato de Ni^{2+} como sigue. Se pueden preparar extractos a partir de células Sf9 infectadas con virus recombinante como se describe por Rupert *et al.* (Nature 362:175-179 (1993)). En resumen, se lavan las células Sf9, se resuspenden en tampón de sonicación (25 ml de HEPES, pH 7,9; $MgCl_2$ 12,5 mM; EDTA 0,1 mM, glicerol al 10 %, NP-40 al 0,1 %, KCl 0,4 M) y se someten a sonicación dos veces durante 20 segundos sobre hielo. Se aclaran los productos sonicados por centrifugación y se diluye el sobrenadante 50 veces en tampón de carga (fosfato 50 mM, NaCl 300 mM, glicerol al 10 %, pH 7,8) y se filtra a través de un filtro de 0,45 μm . Se prepara una columna de Ni^{2+} -NTA-agarosa (comercialmente disponible de Qiagen) con un volumen de lecho de 5 ml, se lava con 25 ml de agua, y se equilibra con 25 ml de tampón de carga. El extracto celular filtrado se carga en la columna a 0,5 ml por minuto. Se lava la columna hasta el valor de referencia A280 con tampón de carga, punto en el que se inicia la recogida de fracciones. A continuación, se lava la columna con un tampón de lavado secundario (fosfato 50 mM, NaCl 300 mM, glicerol al 10 %, pH 6,0), que eluye la proteína unida inespecíficamente. Después de alcanzar de nuevo el valor de referencia A280, se desarrolla la columna con un gradiente de imidazol de 0 a 500 mM en el tampón de lavado secundario. Se recogen fracciones de 1 ml y se analizan por SDS-PAGE y tinción con plata o inmunoelectrotransferencia con conjugado Ni^{2+} -NTA con fosfatasa alcalina (Qiagen). Las fracciones que contienen el anticuerpo marcado con His10 eluido se agrupan y se dializan frente a tampón de carga.

De forma alternativa, se puede realizar la purificación del anticuerpo usando técnicas de cromatografía conocidas, incluyendo, por ejemplo, cromatografía en columna con proteína A o proteína G. En un modo de realización, se puede recuperar el anticuerpo de interés de la fase sólida de la columna por elución en una solución que contiene un agente caotrópico o un detergente suave. Los agentes caotrópicos y detergentes suaves ejemplares incluyen, pero no se limitan a, Guanidina-HCl, urea, perclorato de litio, arginina, histidina, SDS (dodecilsulfato de sodio), Tween, Triton y NP-40, de los que todos están comercialmente disponibles.

IV. Moléculas diana

Los ejemplos de moléculas que se pueden seleccionar por una proteína heteromultimérica de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, proteínas séricas solubles y sus receptores y otras proteínas unidas a la membrana (por

ejemplo, adhesinas). Véase el documento WO2011/133886.

En otro modo de realización, la proteína heteromultimérica de la invención puede unir una, dos o más citocinas, proteínas relacionadas con citocinas, y receptores de citocinas seleccionados del grupo que consiste en BMP1, BMP2, BMP3B (GDF10), BMP4, BMP6, BMP8, CSF1 (M-CSF), CSF2 (GM-CSF), CSF3 (G-CSF), EPO, FGF1 (aFGF), FGF2 (bFGF), FGF3 (int-2), FGF4 (HST), FGF5, FGF6 (HST-2), FGF7 (KGF), FGF9, FGF10, FGF11, FGF12, FGF12B, FGF14, FGF16, FGF17, FGF19, FGF20, FGF21, FGF23, IGF1, IGF2, IFNA1, IFNA2, IFNA4, IFNA5, IFNA6, IFNA7, IFNB1, IFNG, IFNW1, FELI, FELI (EPSELON), FELI (ZETA), IL1A, IL1B, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL11, IL12A, IL12B, IL13, IL14, IL15, IL16, IL17, IL17B, IL18, IL19, IL20, IL22, IL23, IL24, IL25, IL26, IL27, IL28A, IL28B, IL29, IL30, PDGFA, PDGFB, TGFA, TGFB1, TGFB2, TGFB3, LTA (TNF-b), LTB, TNF (TNF-a), TNFSF4 (ligando OX40), TNFSF5 (ligando CD40), TNFSF6 (FasL), TNFSF7 (ligando CD27), TNFSF8 (ligando CD30), TNFSF9 (ligando 4-1 BB), TNFSF10 (TRAIL), TNFSF11 (TRANCE), TNFSF12 (APO3L), TNFSF13 (April), TNFSF13B, TNFSF14 (HVEM-L), TNFSF15 (VEGI), TNFSF18, HGF (VEGFD), VEGF, VEGFB, VEGFC, ILIR1, IL1 R2, IL1 RL1, IL1RL2, IL2RA, IL2RB, IL2RG, IL3RA, IL4R, IL5RA, IL6R, IL7R, IL8RA, IL8RB, IL9R, IL10RA, IL10RB, IL11RA, IL12RB1, IL12RB2, IL13RA1, IL13RA2, IL15RA, IL17R, IL18R1, IL20RA, IL21 R, IL22R, IL1 HY1, IL1 RAP, IL1 RAPL1, IL1 RAPL2, IL1 RN, IL6ST, IL18BP, IL18RAP, IL22RA2, AIFI, HGF, LEP (leptina), PTN y THPO.

En otro modo de realización una molécula diana es una quimiocina, receptor de quimiocina o una proteína relacionada con quimiocina seleccionada del grupo que consiste en CCL1 (I-309), CCL2 (MOP-1/MCAF), CCL3 (MIP-1a), CCL4 (MIP-1b), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL8 (mcp-2), CCLH (eotaxina), CCL13 (MCP-4), CCL15 (MIP-1d), CCL16 (HCC-4), CCL17 (TARC), CCL18 (PARC), CCL19 (MDP-3b), CCL20 (MIP-3a), CCL21 (SLC/exodus-2), CCL22 (MDC/STC-1), CCL23 (MPIF-1), CCL24 (MPIF-2/eotaxina-2), CCL25 (TECK), CCL26 (eotaxina-3), CCL27 (CTACK/ILC), CCL28, CXCL1 (GRO1), CXCL2 (GRO2), CXCL3 (GRO3), CXCL5 (ENA-78), CXCL6 (GCP-2), CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP 10), CXCL11 (I-TAC), CXCL12 (SDFI), CXCL13, CXCL14, CXCL16, PF4 (CXCL4), PPBP (CXCL7), CX3CL1 (SCYDI), SCYE1, XCL1 (linfotactina), XCL2 (SCM-1b), BLRI (MDR15), CCBP2 (D6/JAB61), CCR1 (CKR1/HM145), CCR2 (mcp-IRB/RA), CCR3 (CKR3/CMKBR3), CCR4, CCR5 (CMKBR5/ChemR13), CCR6 (CMKBR6/CKR-L3/STRL22/DRY6), CCR7 (CKR7/EBI1), CCR8 (CMKBR8/TERI/CKR-LI), CCR9 (GPR-9-6), CCRL1 (VSHKI), CCRL2 (L-CCR), XCR1 (GPR5/CCXCR1), CMKLR1, CMKOR1 (RDCI), CX3CR1 (V28), CXCR4, GPR2 (CCRIO), GPR31, GPR81 (FKSG80), CXCR3 (GPR9/CKR-L2), CXCR6 (TYMSTR /STRL33/Bonzo), HM74, IL8RA (IL8Ra), IL8RB (IL8Rb), LTB4R (GPR16), TCPIO, CKLFSF2, CKLFSF3, CKLFSF4, CKLFSF5, CKLFSF6, CKLFSF7, CKLFSF8, BDNF, C5R1, CSF3, GRCCIO (CIO), EPO, FY (DARC), GDF5, HDFIA, DL8, PRL, RGS3, RGS13, SDF2, SLIT2, TLR2, TLR4, TREM1, TREM2 y VHL.

En otro modo de realización, las proteínas heteromultiméricas de la invención pueden unir una o más dianas seleccionadas del grupo que consiste en ABCFI; ACVR1; ACVR1B; ACVR2; ACVR2B; ACVR1LI; AD0RA2A; Aggrecan; AGR2; AICDA; AIFI; AIGI; AKAPI; AKAP2; AMH; AMHR2; ANGPT1; ANGPT2; ANGPTL3; ANGPTL4; ANPEP; APC; APOC1; AR; AZGPI (cinc-a-glucoproteína); B7.1; B7.2; BAD; BAFF (BLys); BAGI; BAH; BCL2; BCL6; BDNF; BLNK; BLRI (MDR15); BMPI; BMP2; BMP3B (GDFIO); BMP4; BMP6; BMP8; BMPRIA; BMPRII; BMPRII; BMPRII; BPAGI (plectina); BRCAL; C19orf10 (IL27w); C3; C4A; C5; C5R1; CANTI; CASP1; CASP4; CAVI; CCBP2 (D6/JAB61); CCLI (1-309); CCLII (eotaxina); CCL13 (MCP-4); CCL15 (MIP-1d); CCL16 (HCC-4); CCL17 (TARC); CCL18 (PARC); CCL19 (MIP-3b); CCL2 (MCP-1); MCAF; CCL20 (MIP-3a); CCL21 (MTP-2); SLC; exodus-2; CCL22 (MDC/STC-1); CCL23 (MPIF-1); CCL24 (MPIF-2/eotaxina-2); CCL25 (TECK); CCL26 (eotaxina-3); CCL27 (CTACK/ILC); CCL28; CCL3 (MTP-1a); CCL4 (MDP-1b); CCL5 (RANTES); CCL7 (MCP-3); CCL8 (mcp-2); CCNA1; CCNA2; CCND1; CCNE1; CCNE2; CCRI (CKR1/HM145); CCR2 (mcp-IRB/RA); CCR3 (CKR3/CMKBR3); CCR4; CCR5 (CMKBR5/ChemR13); CCR6 (CMKBR6/CKR-L3/STRL22/DRY6); CCR7 (CKR7/EBI1); CCR8 (CMKBR8/TERI/CKR-LI); CCR9 (GPR-9-6); CCRL1 (VSHKI); CCRL2 (L-CCR); CD164; CD19; CDIC; CD20; CD200; CD22; CD24; CD28; CD3; CD37; CD38; CD3E; CD3G; CD3Z; CD4; CD40; CD40L; CD44; CD45RB; CD52; CD69; CD72; CD74; CD79A; CD79B; CD8; CD80; CD81; CD83; CD86; CDHI (E-caderina); CDH10; CDH12; CDH13; CDH18; CDH19; CDH20; CDH5; CDH7; CDH8; CDH9; CDK2; CDK3; CDK4; CDK5; CDK6; CDK7; CDK9; CDKNIA (p21Wap1/Cipl); CDKNIB (p27Kipl); CDKNIC; CDKN2A (P16INK4a); CDKN2B; CDKN2C; CDKN3; CEBPB; CER1; CHGA; CHGB; quitinasas; CHST10; CKLFSF2; CKLFSF3; CKLFSF4; CKLFSF5; CKLFSF6; CKLFSF7; CKLFSF8; CLDN3; CLDN7 (claudina-7); CLN3; CLU (clusterina); CMKLR1; CMKOR1 (RDCI); CNRI; COL18A1; COL1A1; COL4A3; COL6A1; CR2; CRP; CSFI (M-CSF); CSF2 (GM-CSF); CSF3 (G-CSF); CTLA4; CTNNA1 (b-catenina); CTSB (cathepsina B); CX3CL1 (SCYDI); CX3CR1 (V28); CXCL1 (GRO1); CXCL10 (IP-10); CXCL11 (I-TAC / IP-9); CXCL12 (SDFI); CXCL13; CXCL14; CXCL16; CXCL2 (GRO2); CXCL3 (GRO3); CXCL5 (ENA-78 / LIX); CXCL6 (GCP-2); CXCL9 (MIG); CXCR3 (GPR9/CKR-L2); CXCR4; CXCR6 (TYMSTR /STRL33 / Bonzo); CYB5; CYCI; CYSLTRI; DAB2IP; DES; DKFZp451 J01 18; DNCLI; DPP4; E2F1; ECGFI; EDGI; EFNA1; EFNA3; EFNB2; EGF; EGFR; ELAC2; ENG; ENO1; ENO2; ENO3; EPHB4; EPO; ERBB2 (Her-2); EREG; ERK8; ESRI; ESR2; F3 (TF); FADD; FasL; FASN; FCERIA; FCER2; FCGR3A; FGF; FGF1 (aFGF); FGF10; FGF11; FGF12; FGF12B; FGF13; FGF14; FGF16; FGF17; FGF18; FGF19; FGF2 (bFGF); FGF20; FGF21; FGF22; FGF23; FGF3 (int-2); FGF4 (HST); FGF5; FGF6 (HST-2); FGF7 (KGF); FGF8; FGF9; FGFR3; FIGF (VEGFD); FELI (EPSILON); FIL1 (ZETA); FLJ12584; FLJ25530; FLRT1 (fibronectina); FLTI; FOS; FOSL1 (FRA-1); FY (DARC); GABRP (GABAa); GAGEBI; GAGECI; GALNAC4S-6ST; GATA3; GDF5; GF11; GGT1; GM-CSF; GNAS1; GNRHI; GPR2 (CCRIO); GPR31; GPR44; GPR81 (FKSG80); GRCCIO (CIO); GRP; GSN (gelsolina); GSTPI; HAVCR2; HDAC2; HDAC4; HDAC5; HDAC7A; HDAC9; HGF; HIFIA; HDPI; histamina y receptores de histamina; HLA-A; HLA-DRA; HM74; HMOXI; HUMCYT2A; ICEBERG; ICOSL; ID2; IFN-a; IFNA1; IFNA2; IFNA4; IFNA5; IFNA6; IFNA7; IFNB1; IFNgamma; DFNWI; IGBPI; IGFI; IGFIR; IGF2; IGF2BP2; IGF2BP3; IGF2BP6; IL-1; IL10; IL10RA; IL10RB; IL11; IL11RA; IL-12; IL12A;

5 IL12B; IL12RB1; IL12RB2; IL13; IL13RA1; IL13RA2; IL14; IL15; IL15RA; IL16; IL17; IL17B; IL17C; IL17R; IL18;
 IL18BP; IL18R1; IL18RAP; IL19; IL1A; IL1 B; IL1F10; IL1 F5; IL1 F6; IL1 F7; IL1 F8; IL1 F9; IL1 HY1; IL1 RI; IL1 R2;
 IL1 RAP; IL1 RAPL1; IL1 RAPL2; IL1 RL1; IL1 RL2, IL1RN; IL2; IL20; IL20RA; IL21 R; IL22; IL22R; IL22RA2; IL23;
 10 IL24; IL25; IL26; IL27; IL28A; IL28B; IL29; IL2RA; IL2RB; IL2RG; IL3; IL30; IL3RA; IL4; IL4R; IL5; IL5RA; IL6; IL6R;
 IL6ST (glucoproteína 130); EL7; EL7R; EL8; IL8RA; DL8RB; IL8RB; DL9; DL9R; DLK; INHA; INHBA; INSL3; INSL4;
 IRAKI; ERAK2; ITGAI; ITGA2; ITGA3; ITGA6 (a6 integrina); ITGAV; ITGB3; ITGB4 (b4 integrina); JAG1; JAK1; JAK3;
 JUN; K6HF; KAI1; KDR; KITLG; KLF5 (GC Box BP); KLF6; KLK10; KLK12; KLK13; KLK14; KLK15; KLK3; KLK4; KLK5;
 KLK6; KLK9; KRT1; KRT19 (queratina 19); KRT2A; KHTHB6 (queratina H específica de cabello); LAMAS; LEP
 (leptina); Lingo-p75; Lingo-Troy; LPS; LTA (TNF-b); LTB; LTB4R (GPR16); LTB4R2; LTBR; MACMARCKS; MAG o
 15 Omgp; MAP2K7 (c-Jun); MDK; MIB1; midquina; MEF; MIP-2; MKI67; (Ki-67); MMP2; MMP9; MS4A1; MSMB; MT3
 (metalotionectina-III); MTSSI; MUC1 (mucina); MYC; MYD88; NCK2; neurocano; NFKB1; NFKB2; NGFB (NGF);
 NGFR; NgR-Lingo; NgR-Nogo66 (Nogo); NgR-p75; NgR-Troy; NMEI (NM23A); NOX5; NPPB; NROB1; NR0B2; NR1D1;
 NR1 D2; NR1 H2; NR1 H3; NR1 H4; NR1 I2; NR1 I3; NR2C1; NR2C2; NR2E1; NR2E3; NR2F1; NR2F6; NR3C1;
 20 NR3C2; NR4A1; NR4A2; NR4A3; NR5A1; NR5A2; NR6A1; NRPI; NRP2; NT5E; NTN4; ODZI; OPBDI; P2RX7;
 PAP; PART1; PATE; PAWR; PCA3; PCNA; PDGFA; PDGFB; PECAMI; PF4 (CXCL4); PGF; PGR; fosfacán; PIAS2;
 PIK3CG; PLAU (uPA); PLG; PLXDCI; PPBP (CXCL7); PPID; PRI; PRKCQ; PRKDI; PRL; PROC; PROK2; PSAP;
 PSCA; PTAFR; PTEN; PTGS2 (COX-2); PTN; RAC2 (p21 Rac2); RARB; RGS1; RGS13; RGS3; RNFIIO (ZNF144);
 ROBO2; S100A2; SCGB1 D2 (lipofilina B); SCGB2A1 (mamaglobina 2); SCGB2A2 (mamaglobina 1); SCYE1 (citocina
 25 activadora de monocitos endoteliales); SDF2; SERPINA1; SERPINA3; SERP1 NB5 (maspina); SERPINE1 (PAI-I);
 SERPDMF1; SHBG; SLA2; SLC2A2; SLC33A1; SLC43A1; SLIT2; SPPI; SPRRIB (Sprl); ST6GAL1; STABI; STAT6;
 STEAP; STEAP2; TB4R2; TBX21; TCPIO; TDGFI; TEK; TGFA; TGFBI; TGFBIII; TGFBI; TGFBI; TGFBI; TGFBI;
 TGFBR2; TGFBR3; TH1L; THBS1 (trombospondina-1); THBS2; THBS4; THPO; TIE (Tie-1); TMP3; factor tisular;
 TLR10; TLR2; TLR3; TLR4; TLR5; TLR6; TLR7; TLR8; TLR9; TNF; TNF-a; TNFAEP2 (B94); TNFAIP3; TNFRSFIIA;
 TNFRSFIA; TNFRSFIB; TNFRSF21; TNFRSF5; TNFRSF6 (Fas); TNFRSF7; TNFRSF8; TNFRSF9; TNFSF10
 30 (TRAIL); TNFSF11 (TRANCE); TNFSF12 (APO3L); TNFSF13 (April); TNFSF13B; TNFSF14 (HVEM-L); TNFSF15
 (VEG1); TNFSF18; TNFSF4 (ligando OX40); TNFSF5 (ligando CD40); TNFSF6 (FasL); TNFSF7 (ligando CD27);
 TNFSF8 (ligando CD30); TNFSF9 (ligando 4-1 BB); TOLLIP; receptores tipo Toll; TOP2A (topoisomerasa Ea); TP53;
 TPM1; TPM2; TRADD; TRAF1; TRAF2; TRAF3; TRAF4; TRAF5; TRAF6; TREM1; TREM2; TRPC6; TSLP; TWEAK;
 VEGF; VEGFB; VEGFC; versicano; VHL C5; VLA-4; XCLI (linfotactina); XCL2 (SCM-Ib); XCRI(GPR5 / CCXCR1); YYY;
 y ZFPM2.

35 Las moléculas diana moleculares preferentes para anticuerpos englobados por la presente invención incluyen
 proteínas CD tales como los miembros CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, CD20, CD34; CD64, CD200 de la familia del
 receptor ErbB tales como el receptor de EGF, receptor HER2, HER3 o HER4; moléculas de adhesión celular tales
 como LFA-1, Mad, p150.95, VLA-4, ICAM-1, VCAM, integrina alfa4/beta7 e integrina alfav/beta7 incluyendo
 subunidades alfa o bien beta de las mismas (por ejemplo, anticuerpos anti-CD11a, anti-CD18 o anti-CD11b); factores
 de crecimiento tales como VEGF-A, VEGF-C; factor tisular (TF); interferón alfa (alfalFN); TNFalfa, una interleucina, tal
 como IL-1 beta, IL-3, IL-4, IL-5, IL-8, IL-9, IL-13, IL17A/F, IL-18, IL-13Ralfa1, IL13Ralfa2, IL-4R, IL-5R, IL-9R, IgE;
 40 antígenos del grupo sanguíneo; receptor flk2/flt3; receptor de obesidad (OB); receptor mpl; CTLA-4; RANKL, RANK,
 proteína F de VRS, proteína C, etc.

45 En un modo de realización, las proteínas heteromultiméricas de la presente invención se unen a proteína relacionada
 con receptor de lipoproteína de baja densidad (LRP)-1 o LRP-8 o receptor de transferrina, y al menos una diana
 seleccionada del grupo que consiste en 1) beta-secretasa (BACE1 o BACE2), 2) alfa-secretasa, 3) gamma-secretasa,
 4) tau-secretasa, 5) proteína precursora amiloide (APP), 6) receptor de muerte 6 (DR6), 7) péptido beta-amiloide, 8)
 alfa-sinucleína, 9) Parkin, 10) Huntingtin, 11) p75 NTR, y 12) caspasa-6.

50 En un modo de realización, las proteínas heteromultiméricas de la presente invención se unen a al menos dos
 moléculas diana seleccionadas del grupo que consiste en: IL-1 alfa y IL-1 beta, IL-12 y IL-18; IL-13 y IL-9; IL-13 y IL-
 4; IL-13 y IL-5; IL-5 y IL-4; IL-13 y IL-1 beta; IL-13 y IL-25; IL-13 y TARO; IL-13 y MDC; IL-13 y MEF; IL-13 y TGF-3;
 IL-13 y agonista de LHR; IL-12 y TWEAK, IL-13 y CL25; IL-13 y SPRR2a; IL-13 y SPRR2b; IL-13 y ADAM8, IL-13 y
 PED2, IL17A y IL17F, CD3 y CD19, CD138 y CD20; CD138 y CD40; CD19 y CD20; CD20 y CD3; CD38 y CD138;
 CD38 y CD20; CD38 y CD40; CD40 y CD20; CD-8 y IL-6; CD20 y BR3, TNFalfa y TGF-beta, TNFalfa y IL-1 beta;
 TNFalfa y IL-2, TNF alfa y IL-3, TNFalfa y IL-4, TNFalfa y IL-5, TNFalfa y IL6, TNFalfa y IL8, TNFalfa y IL-9, TNFalfa y
 55 IL-10, TNFalfa y IL-11, TNFalfa y IL-12, TNFalfa y IL-13, TNFalfa y IL-14, TNFalfa y IL-15, TNFalfa y IL-16, TNFalfa y
 IL-17, TNFalfa y IL-18, TNFalfa y IL-19, TNFalfa y IL-20, TNFalfa y IL-23, TNFalfa y IFNalfa, TNFalfa y CD4, TNFalfa
 y VEGF, TNFalfa y MIF, TNFalfa y ICAM-1, TNFalfa y PGE4, TNFalfa y PEG2, TNFalfa y ligando RANK; TNFalfa y
 Te38; TNFalfa y BAFF; TNFalfa y CD22; TNFalfa y CTLA-4; TNFalfa y GP130; TNFalfa y IL-12p40; VEGF y HER2,
 VEGF-A y HER2, VEGF-A y PDGF, HER1 y HER2, VEGF-A y VEGF-C, VEGF-C y VEGF-D, HER2 y DR5, VEGF y IL-
 60 8, VEGF y MET, VEGFR y receptor MET, VEGFR y EGFR, HER2 y CD64, HER2 y CD3, HER2 y CD16, HER2 y
 HER3; EGFR(HER1) y HER2, EGFR y HER3, EGFR y HER4, IL-13 y CD40L, IL4 y CD40L, TNFR1 y IL-1 R, TNFR1
 y IL-6R y TNFR1 y IL-18R, EpCAM y CD3, MAPG y CD28, EGFR y CD64, CSPGs y RGM A; CTLA-4 y BTN02; IGF1
 y IGF2; IGF1/2 y Erb2B; MAG y RGM A; NgR y RGM A; NogoA y RGM A; OMGp y RGM A; PDL-1 y CTLA-4; y RGM
 65 A y RGM B.

Se pueden usar antígenos o fragmentos de los mismos solubles, opcionalmente conjugados con otras moléculas,

como inmunógenos para generar anticuerpos. Para moléculas transmembranarias, tales como receptores, se pueden usar fragmentos de estos (por ejemplo, el dominio extracelular de un receptor) como inmunógeno. De forma alternativa, se pueden usar células que expresan la molécula transmembranaria como inmunógeno. Se pueden derivar dichas células de una fuente natural (por ejemplo, líneas celulares de cáncer) o pueden ser células que se han transformado por técnicas recombinantes para expresar la molécula transmembranaria. Otros antígenos y formas de los mismos útiles para preparar anticuerpos serán evidentes para los expertos en la técnica.

V. Modos de realización

La invención proporciona modos de realización adicionales como se describe a continuación. En un primer modo de realización, se proporciona un procedimiento de producción de una proteína heteromultimérica, comprendiendo dicho procedimiento: obtener un primer polipéptido que contiene bisagra purificado con proteína A; obtener un segundo polipéptido que contiene bisagra purificado con proteína A; ajustar el pH de cada semianticuerpo a entre 4 y 9; mezclar el primer y segundo polipéptido que contiene bisagra para obtener un conjunto de polipéptidos que contienen bisagras mixto; añadir un exceso molar de un reductor débil al conjunto de polipéptidos que contienen bisagras mixto; e incubar el conjunto de polipéptidos que contienen bisagras mixto con el reductor débil para formar una proteína heteromultimérica que comprende el primer y segundo polipéptido que contiene bisagra.

En un segundo modo de realización y de acuerdo con el primer modo de realización, el primer y segundo polipéptidos que contienen bisagras se pueden seleccionar de un semianticuerpo, inmunoadhesina y fragmentos de los mismos. En un tercer modo de realización y de acuerdo con el primer modo de realización, el primer polipéptido que contiene bisagra es un semianticuerpo. En un cuarto modo de realización y de acuerdo con el primer modo de realización, el segundo polipéptido que contiene bisagra es un componente Fc. En un quinto modo de realización y de acuerdo con el tercer modo de realización, el semianticuerpo comprende un dominio VL, un dominio CL, un dominio VH, un dominio CH1, un dominio bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. En un sexto modo de realización y de acuerdo con el quinto modo de realización, el semianticuerpo es una única cadena polipeptídica que comprende además un anclaje en el que dichos dominios se sitúan entre sí en un sentido de N terminal a C terminal como sigue: VL-CL-anclaje-VH-CH1-bisagra-CH2-CH3. En un séptimo modo de realización y de acuerdo con el primer modo de realización, el primer y segundo polipéptidos que contienen bisagras se mezclan antes de la purificación de proteína A y se purifican conjuntamente sobre proteína A. En un octavo modo de realización y de acuerdo con el primer modo de realización, el primer y segundo polipéptidos que contienen bisagras comprenden un dominio de heteromultimerización. En un noveno modo de realización y de acuerdo con el octavo modo de realización, el dominio de heteromultimerización se selecciona de una mutación de botón en ojal, cremalleras de leucina, electrostático, etc. En un décimo modo de realización y de acuerdo con el noveno modo de realización, el primer polipéptido que contiene bisagra comprende un botón y el segundo polipéptido que contiene bisagra comprende un ojal. En un decimoprimer modo de realización y de acuerdo con el primer modo de realización, el pH se ajusta después de mezclar. En un decimosegundo modo de realización y de acuerdo con el primer o decimoprimer modo de realización, el procedimiento comprende además añadir L-arginina hasta una concentración final de entre 20 mM a 1 M antes de ajustar el pH. En un decimotercer modo de realización y de acuerdo con el primer modo de realización, el procedimiento comprende además incubar el conjunto mixto a una temperatura de entre 15 °C y 39 °C durante al menos 30 minutos. En un decimocuarto modo de realización y de acuerdo con el primer modo de realización, la mezcla de ensamblaje tiene un potencial de oxidación de entre -200 a -600 mV, más preferentemente de entre -300 a -500 mV, lo más preferentemente de aproximadamente -400 mV. En un decimoquinto modo de realización y de acuerdo con el primer modo de realización, el reductor débil se selecciona de GSH, beta-mercaptoetilamina, cisteína/cisteína, GSH/GSSG, cisteamina/cistamina, glicilcisteína y beta-mercaptoetanol. En un decimosexto modo de realización y de acuerdo con el primer modo de realización, el reductor débil se añade en un exceso molar de 50-600. En un decimoséptimo modo de realización y de acuerdo con el primer modo de realización, se añade el reductor débil antes de mezclar. En un decimooctavo modo de realización y de acuerdo con el decimoséptimo modo de realización, la adición se realiza menos de una hora antes de mezclar. En un decimonoveno modo de realización y de acuerdo con el primer modo de realización, la etapa de incubar la mezcla de ensamblaje se realiza a una temperatura de entre 15 °C y 39 °C en presencia de polivinilpirrolidona (PVP). En un vigésimo modo de realización y de acuerdo con el decimonoveno modo de realización, la histidina se añade antes de, simultáneamente con o después de la PVP. En un 21º modo de realización y de acuerdo con el decimonoveno modo de realización, la PVP se añade hasta un 40 % (p/v).

En un 22.º modo de realización, la invención proporciona un procedimiento de producción de un anticuerpo biespecífico, comprendiendo dicho procedimiento:

- a. obtener un primer semianticuerpo purificado con proteína A;
- b. obtener un segundo semianticuerpo purificado con proteína A;
- c. añadir una solución de L-arginina a cada semianticuerpo;
- d. ajustar el pH de cada semianticuerpo a entre 4 y 9;
- e. mezclar los conjuntos de primer y segundo semianticuerpos para obtener un conjunto de semianticuerpos mixto,

- f. añadir un exceso molar de un reductor débil al conjunto de semianticuerpos mixto;
- g. incubar el conjunto de semianticuerpos mixto a una temperatura de entre 15 °C y 39 °C en presencia de PVP,
- 5 por lo que se produce un anticuerpo biespecífico que comprende el primer y segundo semianticuerpo.

En un 23.º modo de realización, la invención proporciona un procedimiento de producción de un heteromultímero, comprendiendo dicho procedimiento: (a) proporcionar una mezcla que contiene L-arginina de al menos dos polipéptidos que contienen bisagras diferentes, en la que dicha mezcla tiene un pH de entre 7 y 9, (b) añadir un exceso molar de un reductor débil y (c) incubar la mezcla en condiciones en las que se produce un heteromultímero.

En un 24.º modo de realización y de acuerdo con el 22.º modo de realización, el primer semianticuerpo es un polipéptido monocatenario que comprende (a) una cadena ligera de longitud completa que comprende un dominio VL y un dominio CL; (b) un anclaje, (c) una cadena pesada de longitud completa que comprende un dominio VH, dominio CH1, una bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3; comprendiendo dicho polipéptido dominios de las cadenas ligera y pesada situados entre sí en un sentido de N terminal a C terminal como sigue: VL-CL-CL/VH anclaje-VH-CH1-bisagra-CH2-CH3. En un 25.º modo de realización y de acuerdo con el 24.º modo de realización, el polipéptido monocatenario comprende además un dominio de heteromultimerización. En un 26.º modo de realización y de acuerdo con el 25.º modo de realización, el dominio de heteromultimerización es un ojal (por ejemplo, cavidad) o bien un botón (por ejemplo, protuberancia). En un 27.º modo de realización y de acuerdo con el 26.º modo de realización, el segundo semianticuerpo comprende un ojal cuando el primer semianticuerpo comprende un botón. En un 28.º modo de realización y de acuerdo con el 26.º modo de realización, el segundo semianticuerpo comprende un botón cuando el primer semianticuerpo comprende un ojal. En un 29.º modo de realización y de acuerdo con el 24.º modo de realización, el anclaje comprende repeticiones GGS. En un 30.º modo de realización y de acuerdo con el 24.º modo de realización, el anclaje es de 15-50 aminoácidos.

En un 31.º modo de realización, la invención proporciona un procedimiento de producción de una proteína heteromultimérica, comprendiendo dicho procedimiento: (a) obtener un primer polipéptido que contiene bisagra purificado con proteína A; (b) obtener un segundo polipéptido que contiene bisagra purificado con proteína A; (c) ajustar el pH de cada polipéptido que contiene bisagra a entre 4 y 9 en presencia de L-arginina; (d) mezclar el primer y segundo polipéptido que contiene bisagra para obtener un conjunto de semianticuerpos mixto, e incubar para formar una proteína heteromultimérica que comprende el primer y segundo polipéptido que contiene bisagra.

En un 32.º modo de realización y de acuerdo con el 31.º modo de realización, al menos uno de los semianticuerpos es un polipéptido monocatenario que comprende: (a) una cadena ligera de longitud completa que comprende un dominio VL y un dominio CL; (b) un anclaje; (c) una cadena pesada de longitud completa que comprende un dominio VH, dominio CH1, una bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3.

En un 33.º modo de realización y de acuerdo con el primer modo de realización, el primer polipéptido que contiene bisagra es un polipéptido monocatenario que comprende dominios de las cadenas ligera y pesada situados entre sí en un sentido de N terminal a C terminal como sigue: VL-CL-VH-CH1-bisagra-CH2-CH3. En un 34.º modo de realización y de acuerdo con el 33.º modo de realización, la única cadena polipeptídica comprende además un anclaje en el que dichos dominios se sitúan entre sí en un sentido de N terminal a C terminal como sigue: VL-CL-anclaje-VH-CH1-bisagra-CH2-CH3.

En un 35.º modo de realización, la invención proporciona un procedimiento de producción de un heteromultímero, comprendiendo dicho procedimiento proporcionar una L-arginina que contiene una mezcla de polipéptidos que contienen bisagras, teniendo dicha mezcla un pH de entre 4 y 9, añadir un reductor débil e incubar en condiciones para producir un heteromultímero.

En un 36.º modo de realización, la invención proporciona una célula huésped que se ha genomanipulado para expresar un semianticuerpo en el que dicho semianticuerpo es un polipéptido monocatenario que comprende un anclaje, un dominio VL, un dominio CL, un dominio VH, un dominio CH1, un dominio bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3 en el que dichos dominios se sitúan entre sí en un sentido de N terminal a C terminal como sigue: VL-CL-anclaje-VH-CH1-bisagra-CH2-CH3. En un 37.º modo de realización y de acuerdo con el 36.º modo de realización, la única cadena polipeptídica comprende además un dominio de heterodimerización. En un 38.º modo de realización y de acuerdo con el 36.º o el 37.º modo de realización, la célula huésped se selecciona de células procariontas, células eucariotas, células de mamífero o células vegetales. En un 39.º modo de realización y de acuerdo con el 38.º modo de realización, la célula huésped es una célula procarionta. En un 40.º modo de realización y de acuerdo con el 39.º modo de realización, la célula procarionta es una célula de *E. coli*. En un 41.º modo de realización y de acuerdo con el 40.º modo de realización, la célula de *E. coli* carece de lpp. En un 42.º modo de realización y de acuerdo con el 38.º modo de realización, la célula huésped es una célula de mamífero. En un 43.º modo de realización y de acuerdo con el 41.º modo de realización, la célula de mamífero es una célula CHO. En un 44.º modo de realización y de acuerdo con el 36.º o el 37.º modo de realización, la célula huésped comprende un vector que codifica el semianticuerpo monocatenario. En un 45.º modo de realización y de acuerdo con el 36.º o el 37.º modo de realización, el

semianticuerpo comprende además un dominio de heterodimerización. En un 46.^o modo de realización y de acuerdo con el 45.^o modo de realización, el dominio de heterodimerización se selecciona de un botón, un ojal, uno o más aminoácidos cargados dentro de la interfaz que son electrostáticamente desfavorables a la formación de homodímeros pero electrostáticamente favorables a la formación de heterodímeros, uno o más aminoácidos se alteran para potenciar las interacciones iónicas intramoleculares, una superhélice y una cremallera de leucina.

En un 47.^o modo de realización, la invención proporciona una mezcla de células huésped que comprenden una primera célula huésped genomanipulada para expresar un primer semianticuerpo monocatenario y una segunda célula huésped genomanipulada para expresar un componente Fc. En un 48.^o modo de realización y de acuerdo con el 36.^o modo de realización, el semianticuerpo producido por una célula huésped comprende un dominio de heterodimerización.

En la divulgación experimental que sigue, se aplican las siguientes abreviaturas: eq (equivalentes); M (Molar); μ M (micromolar); N (normal); mol (moles); mmol (milimoles); μ mol (micromoles); nmol (nanomoles); g (gramos); mg (miligramos); kg (kilogramos); μ g (microgramos); l (litros); ml (mililitros); μ l (microlitros); cm (centímetros); mm (milímetros); μ m (micrómetros); nm (nanómetros); $^{\circ}$ C (grados centígrados); h (horas); min (minutos); s (segundos); ms (milisegundos).

Ejemplos

La presente invención se describe en mayor detalle en los siguientes ejemplos que de ningún modo pretenden limitar el alcance de la invención como se reivindica. Las figuras adjuntas se deben considerar como partes integrales de la memoria descriptiva y la descripción de la invención.

Ejemplo 1: expresión y purificación

Este ejemplo ilustra la expresión y purificación de semianticuerpos.

Se pueden encontrar procedimientos ejemplares de construcción y expresión de semianticuerpos en *E. coli*, por ejemplo, en la solicitud pendiente de trámite de EE. UU. 2011/0287009. Está dentro de la capacidad de un experto en la técnica modificar y ajustar las condiciones de cultivo y expresión.

Expresión de semianticuerpos en células de E. coli

Construcción de plásmidos de expresión

Se clonaron ambas secuencias codificadoras de ADN de cadena pesada y ligera en un plásmido de expresión que contenía elementos promotores separados para cada una de las secuencias y resistencia a antibióticos para la selección de células bacterianas que contienen el plásmido de expresión. Las construcciones de vector también codifican la señal de secreción de enterotoxina II termoestable (STII) (Picken *et al.*, 1983, Infect. Immun. 42:269-275, y Lee *et al.*, 1983, Infect. Immun. 42:264-268) para la exportación de los polipéptidos de anticuerpo en el espacio periplásmico de la célula bacteriana. Se controla la transcripción de cada cadena por el promotor phoA (Kikuchi *et al.*, 1981, Nucleic Acids Res., 9:5671-5678) y se proporciona el control traduccional por las variantes de secuencia de señal STII previamente descritas de fuerza traduccional relativa medida, que contienen cambios de codón inactivo en la región de inicio de la traducción (TIR) (Simmons y Yansura, 1996, Nature Biotechnol. 14:629-634 y Simmons *et al.*, 2002, J. Immunol. Methods, 263:133-147).

Cada semianticuerpo tuvo un botón (protuberancia) o bien un ojal (cavidad) genomanipulado en la cadena pesada como se describe en la patente de EE. UU. n.^o 7.642.228. En resumen, en primer lugar se generó un mutante de botón de CH3. A continuación se creó una colección de mutantes de ojal de CH3 aleatorizando los residuos 366, 368 y 407 que están en proximidad con el botón en el dominio CH3 asociado. En los siguientes ejemplos, la mutación de botón fue T366W, y el ojal tuvo las mutaciones T366S, L368A e Y407V en una cadena principal de IgG1 o IgG4. Se pueden realizar mutaciones equivalentes en otros isotipos de inmunoglobulinas por un experto en la técnica. Además, el experto en la técnica apreciará fácilmente que es preferente que los dos semianticuerpos usados para el compuesto biespecífico sean del mismo isotipo.

Expresión y purificación

Se generaron semianticuerpos que contenían las mutaciones de botón o bien de ojal en cultivos separados expresando las construcciones de las cadenas pesada y ligera en una célula huésped bacteriana, por ejemplo, *E. coli*. Se introdujeron los plásmidos de expresión en las cepas huésped de *E. coli* 33D3 (Ridgway *et al.* (1999) 59 (11): 2718) o 64B4 (W3110.DELTA.fhuA .DELTA.phoA ilvG+.DELTA.prc spr43H1 .DELTA.degP .DELTA.manA lacl.sup.q .DELTA.ompT) y se seleccionaron los transformantes en placas LB que contenían carbenicilina. A continuación se usaron los transformantes para inocular un cultivo iniciador de LB que contenía carbenicilina, y se cultivó esto durante la noche con agitación a 30 $^{\circ}$ C. Se diluyó el cultivo iniciador 100X en un medio limitante de fosfato C.R.A.P. (Simmons *et al.*, 2002, J. Immunol. Methods, 263:133-147) que contenía carbenicilina, y se cultivó el cultivo durante 24 horas con

agitación a 30 °C. Se centrifugaron los cultivos y se congelaron los sedimentos celulares hasta el inicio de la purificación de anticuerpos. Se descongelaron los sedimentos y se resuspendieron en un tampón de extracción que contenía Tris-base 25 mM ajustado a pH 7,5 con ácido clorhídrico, NaCl 125 mM y EDTA 5 mM (TEB o tampón de extracción Tris) con una proporción de volumen con respecto a peso de 100 ml de TEB por 5 gramos de sedimento celular, y se extrajeron rompiendo las células usando microfluidos haciendo pasar la mezcla resuspendida a través de un microfluidizador modelo 110F de Microfluidics Corporation (Newton, Mass.) tres veces. A continuación, se aclaró el extracto de células bacterianas por centrifugación durante 20 minutos a 15 000Xg y se recogió el sobrenadante y se filtró a través de un filtro de acetato de 0,22 micrómetros antes de la purificación.

Se purificó cada semianticuerpo por separado por cromatografía de afinidad con proteína A. Se cargaron los extractos de células aclaradas del semianticuerpo del botón en una columna HiTrap MABSELECT SURE™ de 1 ml de GE Healthcare (Piscataway, NJ) a 2 ml/min. Después de cargar, se lavó la columna con 10 volúmenes de columna (VC) de citrato de sodio 40 mM, pH 6,0, cloruro de sodio 125 mM y EDTA 5 mM seguido de 5 volúmenes de columna de citrato de sodio 20 mM a pH 6,0 para facilitar la captura por la columna de intercambio catiónico. Se eluyeron los semianticuerpos capturados por afinidad con 10 volúmenes de columna (VC) de ácido acético 0,2 mM (pH 2-3).

Expresión de semianticuerpos en células CHO

Construcción de plásmidos de expresión

Ambos ADNc de cadena pesada y de cadena ligera estuvieron bajo el control del promotor y potenciador del gen temprano inmediato de citomegalovirus (CMV). Cada sitio de inicio transcripcional de CMV está seguido de secuencias donantes yceptoras de empalme, que definen intrones que se retiran de los transcritos finales (Lucas *et al.*, High-level production of recombinant proteins in CHO cells using a dicistronic DHFR intron expression vector. Nucl. Acid Res. (1996) 24:1774-9). Se usó la enzima glutamina sintetasa (GS) como marcador de selección para el desarrollo de una línea celular estable (Sanders *et al.*, Amplification and cloning of the Chinese hamster glutamine synthetase gene. The EMBO J (1984) 3:65-71) y estuvo bajo el control del promotor y potenciador temprano SV40.

Cultivo celular

Se cultivaron células CHO en un medio a base de DMEM/-F12 patentado en recipientes con matraces agitados a 37 °C y CO₂ al 5 %. Se pasaron las células con una densidad de siembra de 3x10⁵/ml, de cada tres a cuatro días.

Transfección estable

Se transfectaron células CHO usando lipofectamina 2000 CD de acuerdo con la recomendación del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se centrifugaron las células transfectadas y se sembraron en medio selectivo (sin glutamina) a base de DMEM/F-12 con diversas concentraciones de metionina sulfoximina (MSX). Aproximadamente tres semanas después de la siembra, se escogieron colonias individuales en placas de 96 pocillos. Se evaluaron las colonias escogidas para determinar la producción de anticuerpos tomando el sobrenadante para análisis ELISA. Se ampliaron los clones superiores y se evaluaron en base a los valores de anticuerpos, el metabolismo favorable (principalmente consumo de lactato) y los atributos de calidad de producto aceptable.

Expresión:

Se expresó cada semianticuerpo en células CHO. Se cultivaron cultivos de 2 l y se recogieron.

Purificación de semianticuerpos

Se capturó cada semianticuerpo en una columna MABSELECT SURE™. A continuación se lavó la columna con 4 volúmenes de columna (VC) de los siguientes tampones: un tampón de equilibrio que consistía en TRIS 50 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM y un tampón de lavado que consistía en fosfato de potasio 0,4 M, pH 7,0. Se eluyó cada brazo en acetato de sodio 0,15 M a pH 2,9.

Los procedimientos descritos anteriormente de expresión y purificación de semianticuerpos son en general aplicables a IgG de diferentes isotipos.

Ejemplo 2: solubilizante y mantenimiento de pH

El siguiente ejemplo detalla cómo la incubación de semianticuerpos a un pH intermedio impulsó el cambio de conformación e incrementó la eficacia de ensamblaje, y cómo la adición de un solubilizante tal como arginina e histidina redujo la precipitación inducida por pH intermedio de los semianticuerpos.

Los conjuntos de semianticuerpos y proteína A son intrínsecamente inestables debido a la superficie interna expuesta de los dominios CH2 y CH3 que es probable que contenga parches hidrófobos que normalmente están en la superficie expuesta sin disolvente de un anticuerpo. Por tanto, cuando se ajusta a un pH mayor que 4, los conjuntos de

semianticuerpos y proteína A tienden a precipitar. Los presentes inventores descubrieron que con una concentración mínima de L-arginina presente (en determinados ejemplos ≥ 50 mM), el semianticuerpo se estabilizó y permaneció en solución tras el ajuste de pH. Esta adición de un solubilizante tal como arginina mantuvo el semianticuerpo en solución, redujo la turbidez tras el ajuste de pH e incrementó el rendimiento de ensamblaje biespecífico. Véase la **figura 3**. La arginina también protegió a los semianticuerpos biespecíficos y biespecíficos purificados de la formación de agregación durante la congelación. Un efecto reductor de la precipitación similar también se observó en la histidina.

Se usó la proteína recuperada de las columnas con proteína A en el ejemplo 1 como material de partida para este ejemplo.

Se añadió L-arginina (1 M, pH 9) a la proteína purificada con proteína A hasta una concentración final de 50-600 mM. Posteriormente se valoró la solución a un pH mayor usando Tris-Base 1,5 M, pH 11, según sea necesario. La etapa de elevación a pH intermedio después de la elución ácida de la columna con proteína A se denomina mantenimiento de pH intermedio.

Debido a las mutaciones de botón y ojal en el dominio CH3, los anticuerpos biespecíficos tienen diferentes grados de flexibilidad en comparación con los anticuerpos estándar. Como resultado de esta flexibilidad única y las superficies internas expuestas de los dominios CH2 y CH3, los semianticuerpos parecían experimentar cambios conformacionales tras el ajuste de pH. Véase la **figura 2**.

En este experimento, los botones se sometieron a un cambio de monómero a homodímero unido de forma no covalente cuando se ajustó el pH a un pH mayor que 4. Véase la **figura 2B**. Los ojales se sometieron a un cambio de conformación de un radio hidrodinámico menor a un radio hidrodinámico mayor en base al tiempo de retención de cromatografía de exclusión por tamaño. El cambio se comenzó a producir a pH 5 y a $\text{pH} \geq 7$ se impulsó el cambio a su finalización. Véase la **figura 2A**.

Se realizó una cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para la determinación de la agregación y del estado oligomérico de los anticuerpos por cromatografía HPLC. En resumen, se aplicaron anticuerpos purificados con proteína A a una columna TSKgel SW2000 de Tosoh en un sistema HPLC 1200 de Agilent. Se eluyó la proteína (semianticuerpo IgG1 producido en *E. coli*) con K_3PO_4 0,2 M, KCl 0,25 M pH 6,2 a un caudal de 0,5 ml/min. Se cuantificó la proteína eluida por absorbancia UV e integración de áreas de picos. Véanse las **figuras 2A y B**. Este cambio puede representar un intermedio de plegamiento que se indujo por el cambio de pH debido a la mayor flexibilidad del semianticuerpo, en especial los semianticuerpos de botón y ojal con mutaciones en el dominio CH3.

Sin embargo, el mantenimiento de pH intermedio puede dar como resultado la precipitación de semianticuerpos. Como se muestra en la **figura 3A**, la presencia de arginina redujo la turbidez inducida por el pH de los semianticuerpos de botón IgG1 purificados con proteína A. En este experimento, se usó arginina 1 M para valorar el pH en los conjuntos de proteína A y semianticuerpos IgG1 producidos por *E. coli*. La concentración de arginina final fue de aproximadamente 50 mM cuando se valoró el pH a 5,5, de aproximadamente 200 mM a pH 7,5, y de aproximadamente 400 mM a pH 8,5 (véase la **figura 3A**). La presencia de arginina también mejoró el rendimiento de ensamblaje del anticuerpo biespecífico de botón en ojal en un 15 % (datos no mostrados).

De forma similar, la histidina pudo reducir la turbidez inducida por pH debido a la precipitación. Se purificó un semianticuerpo IgG1 de "botón" a partir de homogeneizado de *E. coli* en una columna MABSELECT SURE™, dando como resultado un conjunto de proteína A con una concentración de semianticuerpo de 12 g/l. Se añadió un cuarto de volumen de clorhidrato de arginina o clorhidrato de histidina a una concentración de aditivo final de 200 mM, con un volumen equivalente de agua purificada añadida para el control sin "nada". Se incrementó el pH de la muestra usando hidróxido de sodio concentrado (solución de NaOH al 50 % p/v, o 19,1 N) añadido gota a gota, y se registraron los puntos de datos. Se midió el pH usando una microsonda Orion Ross 81-03. Se midió la turbidez de la solución usando un turbidímetro de laboratorio Hach 2100.

Los datos en la **figura 3B** mostraron que tanto arginina (200 mM) como histidina (200 mM) redujeron la precipitación inducida por pH en IgG1 aislada de *E. coli*. En resumen, el pH intermedio indujo el cambio de conformación de semianticuerpo a favor del ensamblaje biespecífico, y un solubilizante añadido a la etapa de mantenimiento de pH intermedio redujo la precipitación inducida por pH.

Ejemplo 3: reducción

El siguiente ejemplo detalla cómo el uso de una condición reductora disminuye la agregación dando como resultado más formación del heteromultímero deseado, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico. Por ejemplo, el glutatión añadido a una mezcla de ensamblaje crea una condición débilmente reductora que es ventajosa para el ensamblaje biespecífico de botón en ojal. Otros reductores en una clase similar tal como BMEA (beta-mercaptoetilamina) pueden tener un efecto similar.

La agregación se puede producir durante el ensamblaje de los semianticuerpos de botón y ojal para formar los compuestos biespecíficos. El incremento en los niveles de glutatión minimiza la cantidad de agregación durante el

ensamblaje. Por el contrario, los reductores fuertes tales como DTT a altas concentraciones a veces pueden incrementar la agregación. Sin limitarse a mecanismos específicos, en lugar de reducir los enlaces disulfuro permanentemente, parece que el glutatión reordena los disulfuros que actúan como catalizadores para una formación de disulfuros apropiada. Con los ensamblajes de glutatión, no se requiere un intercambio de tampón para formar los disulfuros de la región bisagra en el producto biespecífico de interés, como se requiere para la reoxidación cuando se usa un reductor fuerte. Tampoco se requiere la adición de un reoxidante químico cuando se usa un reductor débil tal como glutatión.

Las concentraciones de glutatión se pueden expresar en términos de molaridad o en términos de proporción molar con respecto a la cantidad de los polipéptidos que contienen bisagras o semianticuerpos presentes en la mezcla de ensamblaje. Usando una proporción molar diana del reductor se controla la concentración de proteína en la mezcla de ensamblaje; esto evita el exceso de reducción o el defecto de reducción como resultado de las concentraciones de proteína variables.

En este ejemplo, se añadió glutatión a los semianticuerpos mixtos con un exceso molar de 2 a 200x. Se incubaron las muestras a temperatura ambiente durante 46 horas. En la RP-HPLC (cromatografía de líquidos de alto rendimiento de fase inversa), se diluyeron todas las muestras con ácido trifluoroacético al 0,1 % hasta una concentración máxima de 1,0 mg/ml. Se determinó la concentración de proteína por mediciones fotométricas a 280 nm. Se inyectaron cuatro muestras de ácido trifluoroacético al 0,1 % antes del análisis de muestra. Esto garantizó que la columna se equilibrara completamente. Se aplicaron semianticuerpos IgG1 producidos por *E. coli* purificados con proteína A a un R2/20 de Poros de 2,1 mmD x 20 mmL en un sistema HPLC 1200 de Agilent. Se eluyó la proteína con un gradiente lineal de tampón A al 38-49 % a ácido trifluoroacético al 0,09 % acetonitrilo al 80 % (tampón B) en 20 minutos a un caudal de 0,5 ml/min. Se cuantificó la proteína eluida por absorbancia UV e integración de áreas de picos. Como se muestra en la figura 4A, el nivel de formación biespecífica se incrementó con un incremento de la proporción molar de glutatión:Ab. Véase la **figura 4A**.

Se realizó una cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para la determinación de la agregación y del estado oligomérico de los anticuerpos. En resumen, se aplicaron semianticuerpos IgG1 producidos por *E. coli* purificados con proteína A a una columna TSKgel SW2000 de Tosoh en un sistema HPLC 1200 de Agilent. Se eluyó la proteína con K₃PO₄ 0,2 M, KCl 0,25 M, pH 6,2 a un caudal de 0,5 ml/min. Se cuantificó la proteína eluida por absorbancia UV e integración de áreas de picos. Se confirmó que el pico de 150 kD observado se debía a la formación de anticuerpo biespecífico. Véase la **figura 4B**.

Como se puede observar, hay un desplazamiento en los picos de los monómeros no deseados (es decir, semianticuerpos, botón o bien ojal) y homodímeros al heteromultímero, es decir, un anticuerpo biespecífico (**figura 4A y B**). En resumen, los datos muestran que el incremento en la proporción molar de glutatión con respecto a semianticuerpos redujo la agregación y mejoró la formación biespecífica (**figura 4B**).

Ejemplo 4: temperatura

Este ejemplo ilustra el efecto de la temperatura sobre la estabilidad de los semianticuerpos y el ensamblaje del heteromultímero.

La temperatura de la solución de los semianticuerpos tuvo un impacto drástico sobre la tasa de ensamblaje. Un ejemplo de ensamblaje potenciado de semianticuerpos IgG1 producidos por *E. coli* a mayor temperatura se muestra en la **figura 5A**.

Otro ejemplo que muestra el efecto de la temperatura sobre el ensamblaje biespecífico se muestra en la **figura 5B**. En este experimento, se produjeron dos semianticuerpos IgG1 en *E. coli* y se purificaron sobre proteína A como se describe en el ejemplo 1. Se combinaron los semianticuerpos y se dividieron en cuatro alícuotas para someter a prueba el ensamblaje biespecífico en diferentes condiciones con o sin calentamiento y/o mantenimiento de pH intermedio.

Como se muestra en la **figura 5B**, un exceso molar de 200 de glutatión en condiciones variables potenció la tasa de formación de anticuerpos IgG1 biespecíficos. Las condiciones de control (temperatura ambiente, aproximadamente 20 °C, se mantuvo el semianticuerpo a pH 4, sin mantenimiento de pH intermedio), permitieron el ensamblaje del compuesto biespecífico aunque a una tasa más lenta. El mantenimiento de los semianticuerpos purificados con proteína A a un pH intermedio (pH 5 para semianticuerpo de botón, pH 7 para semianticuerpo de ojal) durante 16 horas a temperatura ambiente mejoró la tasa de formación de anticuerpo biespecífico sin pasar a una temperatura mayor (la mezcla de ensamblaje estaba a pH 8,5 en el "pH optimizado" en la **fig. 5B**). El incremento en la temperatura a 37 °C sin una etapa de mantenimiento de pH intermedio incrementó la tasa de ensamblaje de anticuerpos biespecíficos sobre el control y fue más rápido con respecto a una etapa de mantenimiento de pH y al ensamblaje realizado a temperatura ambiente. Sin embargo, la mayor tasa de ensamblaje se observó cuando los semianticuerpos purificados con proteína A se mantuvieron a un pH intermedio (como anteriormente), se ensamblaron a continuación a pH 8,5 a temperatura elevada (es decir, 37 °C). En esta condición, se logró aproximadamente un 80 % de ensamblaje biespecífico solo en aproximadamente 6 horas (**figura 5B**). En resumen, se incrementó la tasa de ensamblaje global por calentamiento, y el mantenimiento de pH y el calentamiento tuvieron un efecto sinérgico en el ensamblaje.

También se observó el ensamblaje potenciado por calor en el anticuerpo biespecífico de IgG4. Los resultados de la **figura 6B** muestran que, en presencia de PVP e histidina, los semianticuerpos IgG4 calentados producidos por cultivo de *E. coli* alcanzaron resultados de ensamblaje similares al ensamblaje de los semianticuerpos IgG1 producidos por *E. coli*. Se analizó la cantidad de compuesto biespecífico usando HPLC de fase inversa como se describe anteriormente. Tomados conjuntamente, los datos muestran que el calentamiento facilitó la formación biespecífica.

Ejemplo 5: estabilizantes

El siguiente ejemplo detalla cómo los estabilizantes pueden reducir la agregación como resultado del calentamiento y/o pH elevado durante el ensamblaje y/o el mantenimiento de pH intermedio.

La polivinilpirrolidona (PVP) es un polímero no cargado soluble en agua con un grupo pirrolidona. La PVP redujo la agregación durante el ensamblaje calentado. Sin limitarse a mecanismos específicos, la PVP puede actuar para estabilizar un intermedio de plegamiento del compuesto biespecífico o proteger los semianticuerpos de la agregación probablemente interaccionando con los parches hidrófobos del compuesto biespecífico.

Se analizó el efecto de PVP sobre la formación de agregados usando SEC en las condiciones como se describen en el ejemplo 3. La adición de PVP minimizó las especies de alto peso molecular (HMWS) presentes en el conjunto ensamblado a un 12 % de HMWS con PVP al 4 % (p/v) en comparación con un 4 % de NMWS sin añadir PVP. Véase la **figura 6A**. Todas las muestras fueron IgG1 producidas por *E. coli* calentadas en presencia de arginina 200 mM.

A continuación, se sometió a prueba el ensamblaje del anticuerpo biespecífico de IgG4. Como se muestra en la **figura 6B**, el ensamblaje calentado en presencia de PVP e histidina mejoró en gran medida el ensamblaje biespecífico de IgG4 producida por *E. coli* a niveles similares al ensamblaje calentado de IgG1 producida por *E. coli* mostrados en la figura 5A. La arginina estuvo presente tanto en la muestra calentada como en la muestra a temperatura ambiente como un solubilizante y un valorante de pH. Además de PVP, se añadió otro estabilizante de histidina antes de la etapa de mantenimiento de pH intermedio calentado para estabilizar el semianticuerpo durante esta etapa. Los resultados muestran que tanto PVP como histidina mejoraron el ensamblaje biespecífico de IgG4 a niveles similares al ensamblaje biespecífico de IgG1 (compárense las figuras 6B con 5B).

La **figura 6C** presenta otro ejemplo en el que la PVP minimizó la formación de HMWS durante el ensamblaje calentado de un anticuerpo biespecífico de IgG4.

El calentamiento de los conjuntos de semianticuerpos y proteína A aceleró los cambios de conformación de los semianticuerpos tras la incubación a un pH intermedio. Pero el calentamiento puede provocar agregación, en especial para el ensamblaje de anticuerpos biespecíficos de botón y ojal IgG4 a partir de semianticuerpos IgG4 producidos en *E. coli*. Por tanto, se añadieron solubilizante y/o estabilizantes adicionales cuando se calentaron los semianticuerpos IgG4 durante el ensamblaje.

Se detectó un cambio de conformación del semianticuerpo de ojal IgG4 de *E. coli* después de 48 horas de incubación a temperatura ambiente. Cuando se incubaron los semianticuerpos de ojal IgG4 a 37 °C, se detectó un cambio de conformación en aproximadamente tres horas (datos no mostrados). Sin embargo, el calentamiento dio lugar a un incremento en la agregación como se determina por SEC. Véase la **figura 7**, panel izquierdo. En este experimento, se añadió histidina durante la etapa de mantenimiento de pH intermedio calentado para someter a prueba su efecto sobre la reducción de la agregación de semianticuerpos. Como se muestra en la **figura 7**, la presencia de histidina durante el calentamiento minimizó el nivel de agregación de un 11 % de especies de alto peso molecular (HMWS, sin histidina) a un 6 % de HMWS (histidina 200 mM), sin afectar el cambio de conformación de los semianticuerpos. Los resultados muestran, por tanto, que un estabilizante redujo la formación de agregados tanto durante el ensamblaje de anticuerpos biespecíficos como en el mantenimiento de pH intermedio de los semianticuerpos.

Ejemplo 6 - Ensamblaje

Este ejemplo proporciona protocolos para dos isotipos de inmunoglobulina ejemplares, es decir, IgG1 e IgG4. Los semianticuerpos se produjeron en una de dos células huésped diferentes, es decir, *E. coli* o CHO. Se entiende que los procedimientos descritos en el presente documento se pueden aplicar a otros isotipos de anticuerpos producidos en la misma u otras fuentes. Está dentro de la capacidad de un experto en la técnica modificar los protocolos para experimentación rutinaria en base al conocimiento de la técnica y las enseñanzas divulgadas en la presente solicitud.

Además, se entiende que la formación de un anticuerpo que comprende un semianticuerpo producido en una primera célula huésped (por ejemplo, CHO) se puede ensamblar con un semianticuerpo complementario producido en una segunda célula huésped (por ejemplo, *E. coli*) (datos no mostrados). Por tanto, por ejemplo, un semianticuerpo de botón producido en CHO se puede ensamblar con un semianticuerpo de ojal producido en *E. coli* o viceversa.

Los cuatro procedimientos de ensamblaje descritos en este ejemplo dieron como resultado ensamblajes que se estabilizaron después de 4 horas y produjeron menos de un 10 % de agregados y una agregación mínima durante el

ensamblaje.

A. IgG1 de *E. coli*:

5 Cambio de conformación de semianticuerpos: Si los conjuntos de proteína A estaban a un pH de menos de 7, el pH de ambos conjuntos de semianticuerpos se ajustó a pH 7 usando arginina 1 M (pH 9), y ambos conjuntos se incubaron a 37 °C durante 3 horas. De forma alternativa, se incubaron los conjuntos a temperatura ambiente durante 48 horas. Si los conjuntos ya estaban a pH 7 durante 48 horas o más, se omite esta etapa. Se cuantificó la cantidad de arginina añadida para obtener la solución a pH 7.

10 Se combinaron los conjuntos (todavía calientes) y se ajustó el pH a pH 8,5 usando arginina 1 M (pH 9). Se cuantificó la cantidad de arginina añadida en esta fase.

15 Se añadió arginina 2 M (pH 8,5) hasta que la concentración final de arginina fue de 0,5 M.

Se añadió glutatión reducido (GSH) 200 mM en arginina 0,5 M (pH final 8,5) hasta que la proporción GSH:Ab fue de 200X (por ejemplo, se añaden 6,88 µl de la solución de glutatión por cada mg de semianticuerpo).

20 Se incubó la solución de semianticuerpo y glutatión a 37 °C durante 4 horas para permitir que los semianticuerpos se ensamblaran en un anticuerpo biespecífico.

B. IgG1 de CHO:

25 Se ensambla como se describe anteriormente para *E. coli*. Puede que no sea necesario elevar el pH a pH 7 o superior para el mantenimiento de pH intermedio. El tiempo de ensamblaje después de la adición de glutatión puede alcanzar la finalización después de 2 horas.

C. IgG4 de CHO:

30 Se ensambla en las mismas condiciones que anteriormente (IgG1 de CHO). Puede que no sean necesarias la histidina y PVP.

D. IgG4 de *E. coli*:

35 El ensamblaje de IgG4 de *E. coli* usando los protocolos anteriores dio como resultado niveles de agregados altos, es decir, ~35 %. Esto necesitó modificaciones de las condiciones de ensamblaje:

40 Se determinó que la composición del conjunto de proteína A que contenía histidina 0,2 M y arginina 50 mM proporcionó resultados aceptables (datos no mostrados). Por tanto, se investigaron varias formas de proporcionar el resultado final y se determinaron para proporcionar resultados aceptables.

45 Un primer procedimiento usó elución alterada (pH 3) y tampones de lavado (pH 7) durante la purificación con proteína A para contener His 0,2 M y Arg 50 mM. Esto dio como resultado el conjunto de proteína A final que contenía His 0,2 M y Arg 50 mM, pH 4, que a continuación se valoró a pH 8 usando Tris-base 1,5 M (pH 11).

Un segundo procedimiento alternativo utilizó una solución 0,8 M de histidina HCl (que tiene una solubilidad de 0,8 M). Se añadió un tercio de volumen de histidina HCl al/a los conjunto(s) de proteína A para alcanzar una concentración final de His 0,2 M. A continuación se añadió 1/40^o de volumen de Arg 2 M.

50 Un tercer procedimiento alternativo fue el intercambio de tampón de los conjuntos de proteína A en un tampón con His 0,2 M y Arg 50 mM (preferentemente a pH 8).

Un procedimiento alternativo final fue añadir histidina directamente al/a los conjunto(s) de proteína A (31,03 g/l), a continuación añadir 1/40^o de volumen de Arg 2 M.

55 Se añadió un cuarto de volumen de una solución al 20 % p/v de Spectrum PVP K-15 en histidina 0,2 M y Arg 50 mM al/a los conjunto(s) de proteína A.

60 Se observó que la PVP también minimizó la agregación durante el ensamblaje de IgG1 en condiciones de glutatión bajas.

Cambio de conformación de semianticuerpos: Se ajustó el pH del/de los conjunto(s) de proteína A a pH 8,0 usando Tris-Base 1,5 M con histidina 0,2 M y Arg 50 mM y PVP K-15 al 4 % (pH 11) y se incubó a 37 °C durante 3 horas. De forma alternativa, se pudo/pudieron incubar el/los conjunto(s) a temperatura ambiente durante 48 horas.

65 Se añadió glutatión reducido (GSH) 200 mM en histidina 0,2 M, PVP al 4 %, arginina 50 mM; pH final 8,0, hasta que

la proporción GSH:Ab fue de 200X (por ejemplo, se añaden 6,88 µl de la solución de glutatión por cada mg de semianticuerpo). Si no se habían combinado los conjuntos de semianticuerpos, se combinaron en este punto.

5 Los semianticuerpos agrupados se incubaron a 37 °C durante 4 horas para permitir la formación del anticuerpo biespecífico. En este punto, el porcentaje de anticuerpo biespecífico se ha estabilizado.

Una vez que se ha estabilizado la cantidad de anticuerpo biespecífico, se puede almacenar la solución a temperatura baja o ajustarse a un pH menor para el procesamiento en etapas de cromatografía posteriores.

10 Los procedimientos divulgados en el presente documento encuentran uso en la fabricación de proteínas terapéuticas tales como anticuerpos biespecíficos.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> GENENTECH, INC. *ET AL.*

5 <120> ENSAMBLAJE MEJORADO DE ANTICUERPOS BIESPECÍFICOS

<130> P4764R1-WO

10 <150> 61/676837
<151> 27-07-2012

<150> 61/560704
<151> 16-11-2011

15 <150> 61/546503
<151> 12-10-2011

<150> 61/545863
<151> 11-10-2011

20 <160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

25 <210> 1
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Secuencia sintética

<220>
<221> MISC_FEATURE
35 <222> (2)..(2)
<223> X es cualquier residuo aminoacídico

<220>
<221> MISC_FEATURE
40 <222> (4)..(4)
<223> X es cualquier residuo aminoacídico

<400> 1

45 **Arg Xaa Arg Xaa Arg Arg**
1 5

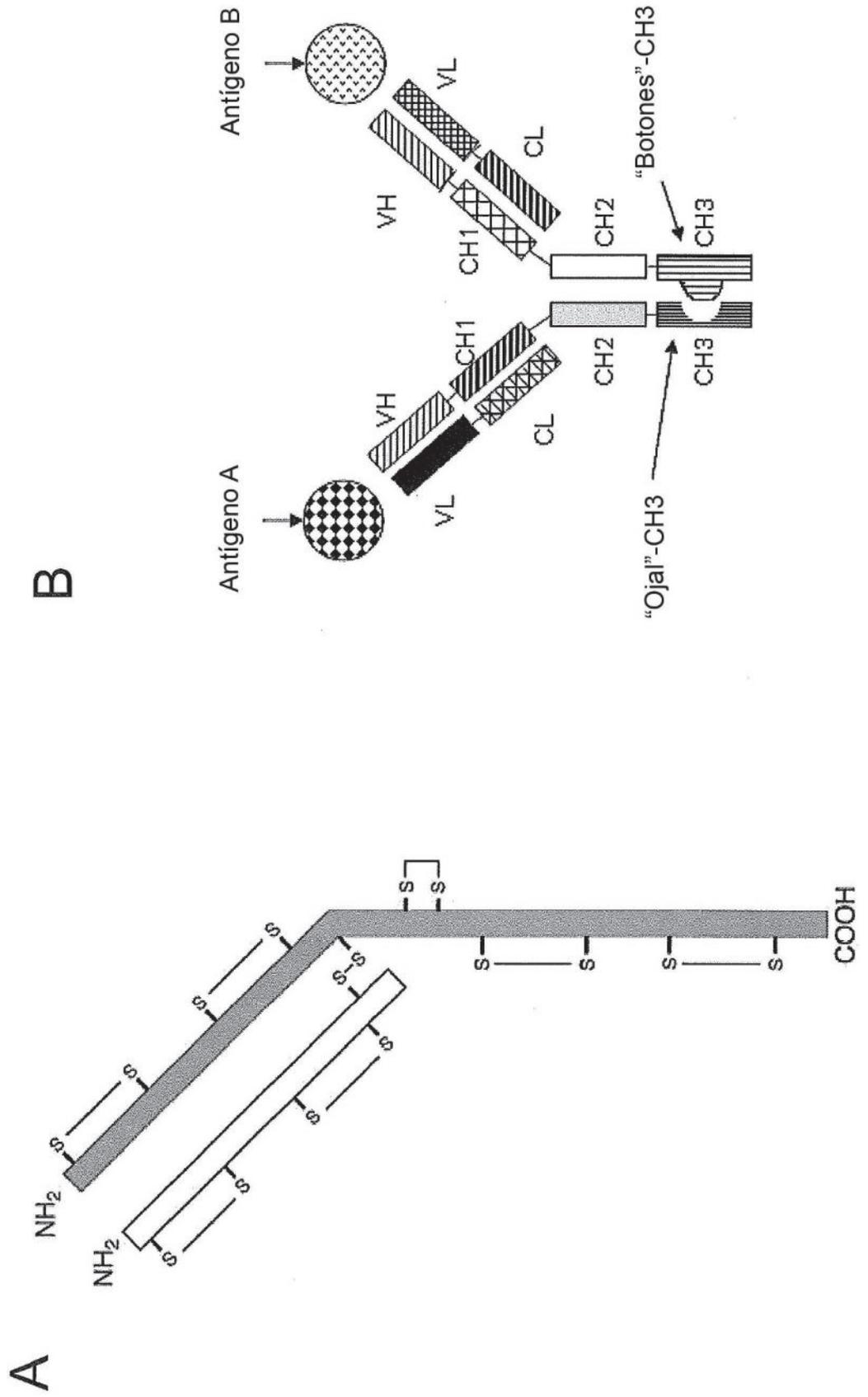
REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción de un anticuerpo biespecífico que comprende las etapas de
 - 5 a. proporcionar un primer semianticuerpo a pH 5-9 en presencia de un primer solubilizante, en el que el primer semianticuerpo comprende un dominio de heteromultimerización;
 - b. proporcionar un segundo semianticuerpo a pH 5-9 en presencia de un segundo solubilizante, en el que el segundo semianticuerpo comprende un dominio de heteromultimerización;
 - 10 c. mezclar el primer y segundo semianticuerpos para formar una mezcla de ensamblaje en una condición reductora, en la que se añade un reductor a la mezcla en un exceso molar de 50-400x con respecto a la cantidad total de los semianticuerpos, en la que el reductor es GSH; e
 - 15 d. incubar la mezcla de ensamblaje para formar un anticuerpo biespecífico que comprende el primer y segundo semianticuerpos, en el que el primer semianticuerpo interacciona con el segundo semianticuerpo en el dominio de heteromultimerización.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el primer solubilizante y segundo solubilizante se seleccionan del grupo que consiste en arginina, histidina y sacarosa, preferentemente del grupo que consiste en arginina e histidina.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que el primer solubilizante y el segundo solubilizante son el mismo.
- 25 4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 2-3, en el que la arginina es una sal de arginina o un derivado de arginina y/o la histidina es una sal de histidina o un derivado de histidina.
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en el que la arginina es arginina HCl y/o la histidina es histidina HCl.
- 30 6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 2-5, en el que la arginina o histidina está presente a una concentración de entre 20 mM y 200 mM, preferentemente a una concentración de entre 50 mM y 200 mM.
- 35 7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 2-6, en el que el solubilizante es arginina.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 2-6, en el que el primer semianticuerpo de la etapa a y/o el segundo semianticuerpo de la etapa b está en presencia tanto de arginina como de histidina.
- 40 9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que la arginina e histidina están presentes cada una a una concentración de entre 50 mM y 200 mM.
10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el primer semianticuerpo y el segundo semianticuerpo se purifican antes de mezclar.
- 45 11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el primer semianticuerpo y el segundo semianticuerpo se purifican conjuntamente.
- 50 12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que la etapa a está precedida por la etapa de purificar el primer semianticuerpo y/o la etapa b está precedida por la etapa de purificar el segundo semianticuerpo.
13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que el primer y segundo semianticuerpos se producen por una célula bacteriana, una célula de levadura, un baculovirus, o una célula de mamífero.
- 55 14. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que el primer y segundo semianticuerpos se producen por una célula de mamífero, preferentemente por una célula CHO.
- 60 15. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en el que el semianticuerpo es un semianticuerpo IgG, preferentemente del isotipo IgG1, IgG2 o IgG4.
16. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en el que el semianticuerpo comprende un dominio VL, un dominio VH, un dominio bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3.
- 65 17. El procedimiento de la reivindicación 16, en el que el semianticuerpo comprende un polipéptido monocatenario

que comprende además un anclaje, y en el que dicho polipéptido monocatenario comprende dominios situados entre sí en un sentido de N terminal a C terminal como sigue: VL-anclaje-VH-bisagra-CH2-CH3.

- 5 18. El procedimiento de la reivindicación 16, en el que el semianticuerpo comprende además un dominio CL y un dominio CH1.
- 10 19. El procedimiento de la reivindicación 18, en el que el semianticuerpo comprende un polipéptido monocatenario que comprende además un anclaje, y en el que dicho polipéptido monocatenario comprende dominios situados entre sí en un sentido de N terminal a C terminal como sigue: VL-CL-anclaje-VH-CH1-bisagra-CH2-CH3.
- 15 20. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-19, en el que una o más etapas de a-d se calientan a una temperatura de entre 25 °C y 42 °C, preferentemente a una temperatura de entre 35 °C y 37 °C.
- 20 21. El procedimiento de la reivindicación 20, en el que el primer semianticuerpo de la etapa a y el segundo semianticuerpo de la etapa b se calientan.
- 25 22. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 20-21, en el que la mezcla de ensamblaje de la etapa d se calienta.
- 30 23. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 20-22, en el que todas las etapas a-d se calientan.
- 35 24. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-23, en el que la condición reductora tiene un potencial de oxidación de entre -200 a -600 mV, más preferentemente de entre -300 a -500 mV, lo más preferentemente de aproximadamente -400 mV.
- 40 25. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-24, en el que el reductor se añade en un exceso molar de 50-200X a la mezcla de ensamblaje.
- 45 26. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-24, en el que el reductor se añade en un exceso molar de 100-300X a la mezcla de ensamblaje.
- 50 27. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-24, en el que el reductor se añade en un exceso molar de 200X a la mezcla de ensamblaje.
- 55 28. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-27, en el que la interacción entre el primer y segundo semianticuerpos es una interacción hidrófoba y/o una interacción electrostática.
- 60 29. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-27, en el que el dominio de heteromultimerización comprende uno o más de un botón (por ejemplo, protuberancia), un ojal (por ejemplo, cavidad) una cremallera de leucina, una superhélice, o un residuo aminoacídico polar que puede formar una interacción electrostática.
30. El procedimiento de la reivindicación 29, en el que el dominio de heteromultimerización del primer semianticuerpo comprende un botón y el dominio de heteromultimerización del segundo semianticuerpo comprende un ojal.
31. El procedimiento de la reivindicación 30, en el que el semianticuerpo de botón comprende una sustitución T366W, y el semianticuerpo de ojal comprende las sustituciones T366S/L368A/Y407V.
32. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-31, que comprende además añadir un estabilizante en una o más de las etapas a-d.
33. El procedimiento de la reivindicación 32, en el que el estabilizante se añade a la etapa c o etapa d y en el que el estabilizante es arginina y/o PVP.
34. El procedimiento de la reivindicación 32, en el que el estabilizante se añade a la etapa a o etapa b y en el que el estabilizante es arginina y/o histidina.
35. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-34, que comprende además la etapa de recuperar el anticuerpo biespecífico después de la etapa d.

Figura 1



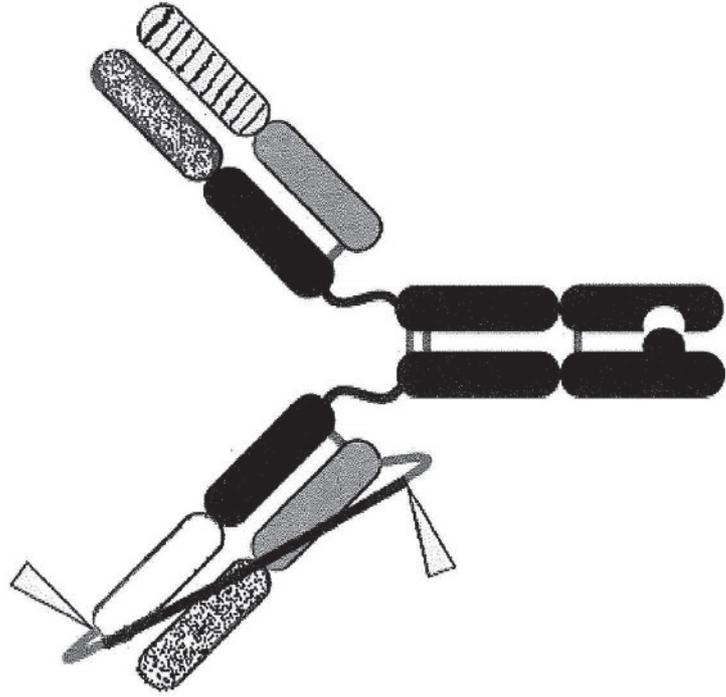


Figura 1C

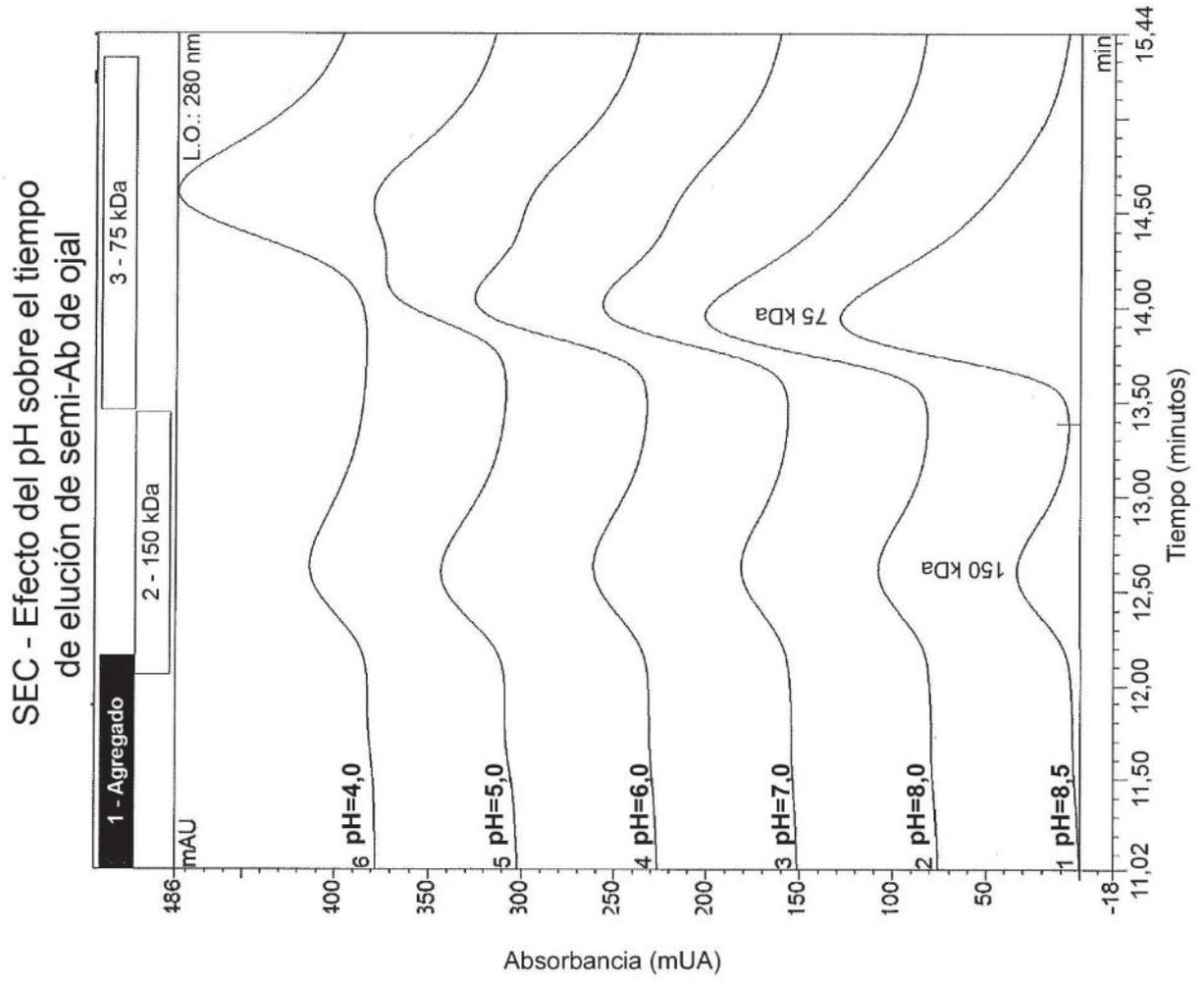


Figura 2A

SEC - Efecto del pH sobre el tiempo de elución de semi-Ab de botón

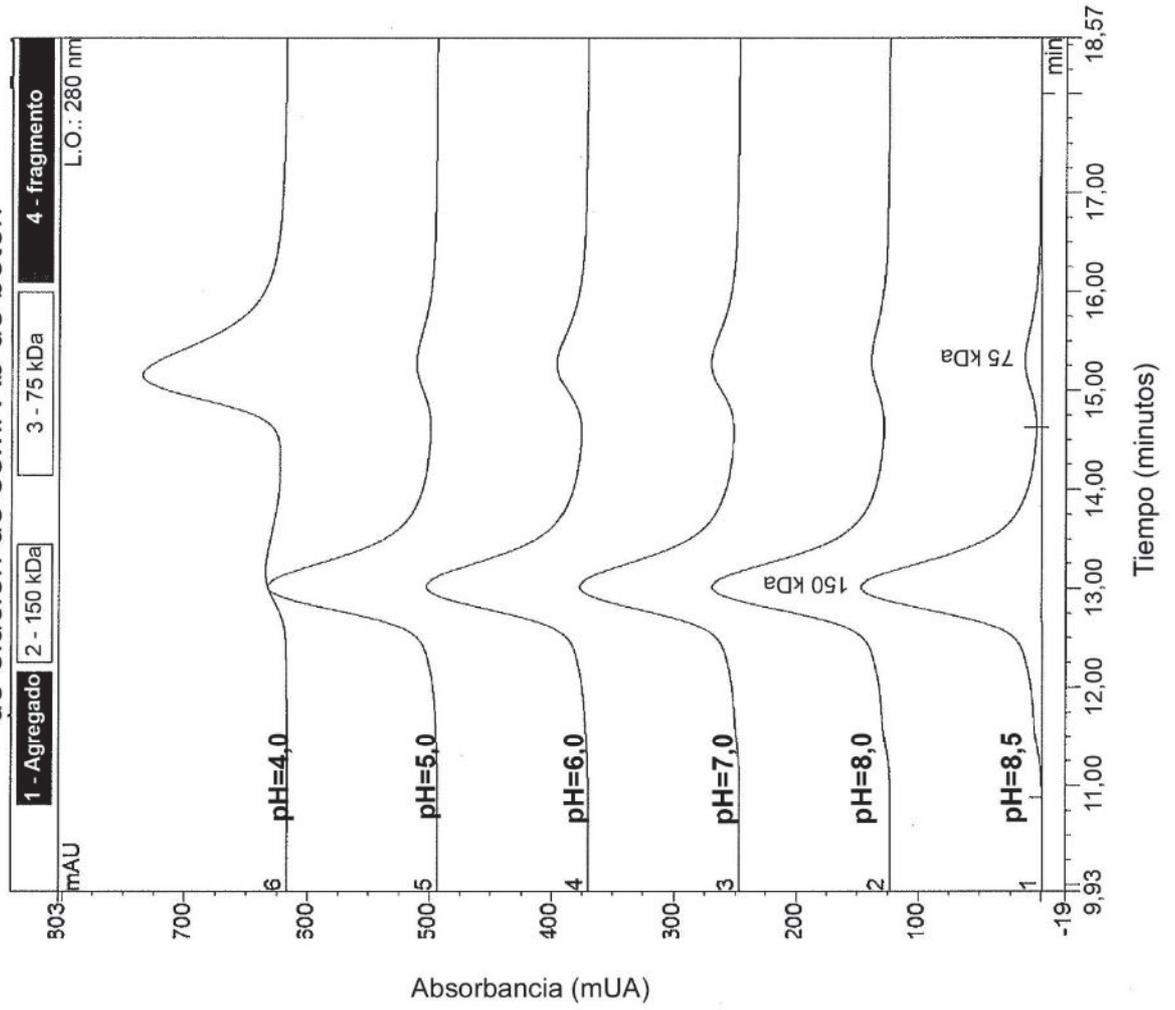


Figura 2B

Figura 3A

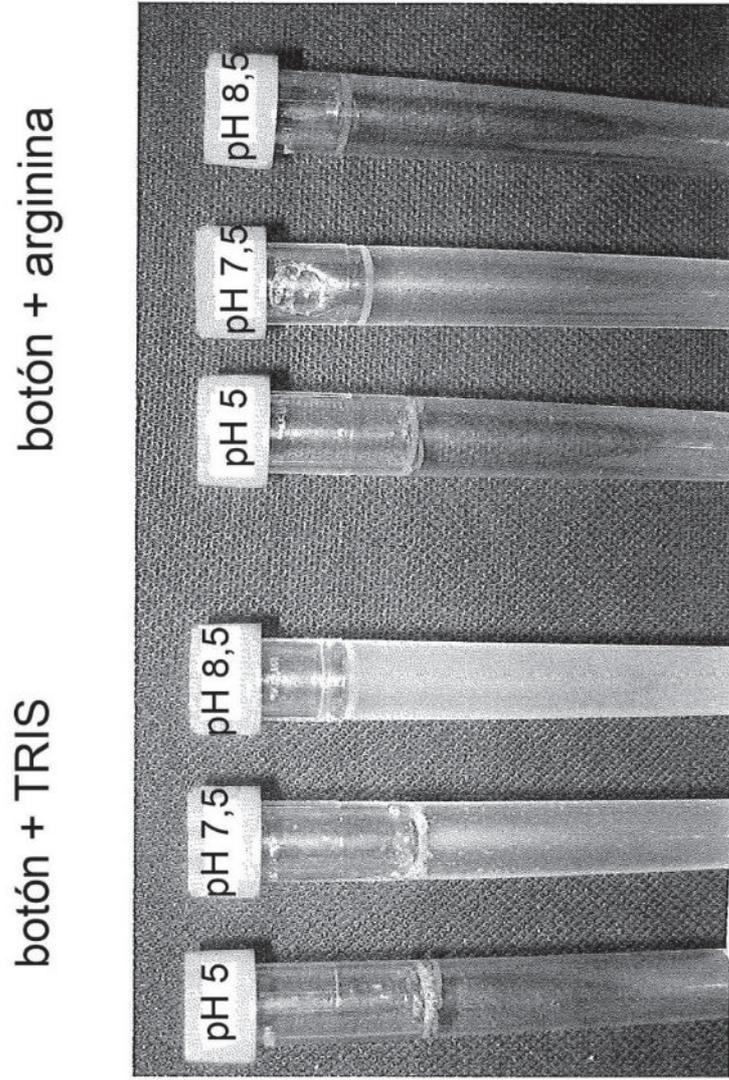


Figura 3B

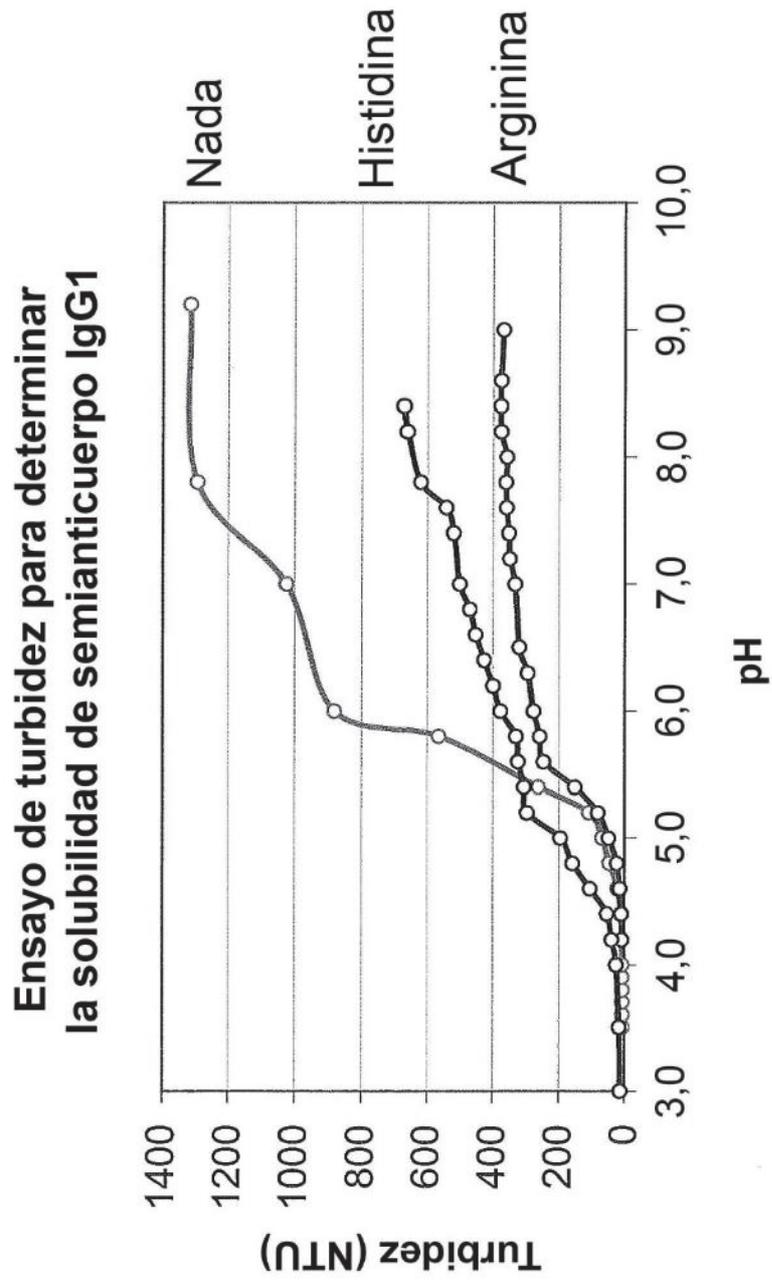


Figura 4A

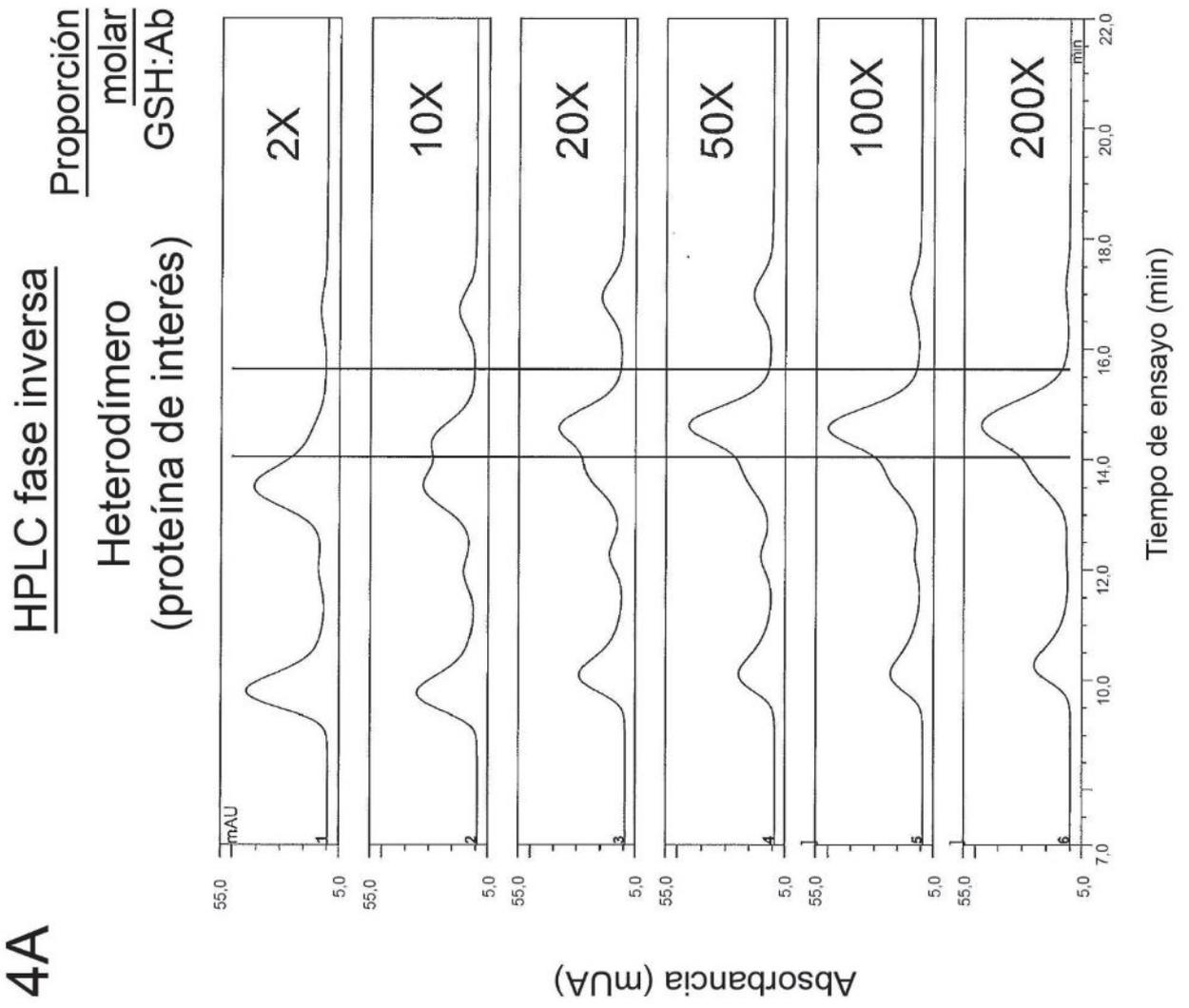


Figura 4B

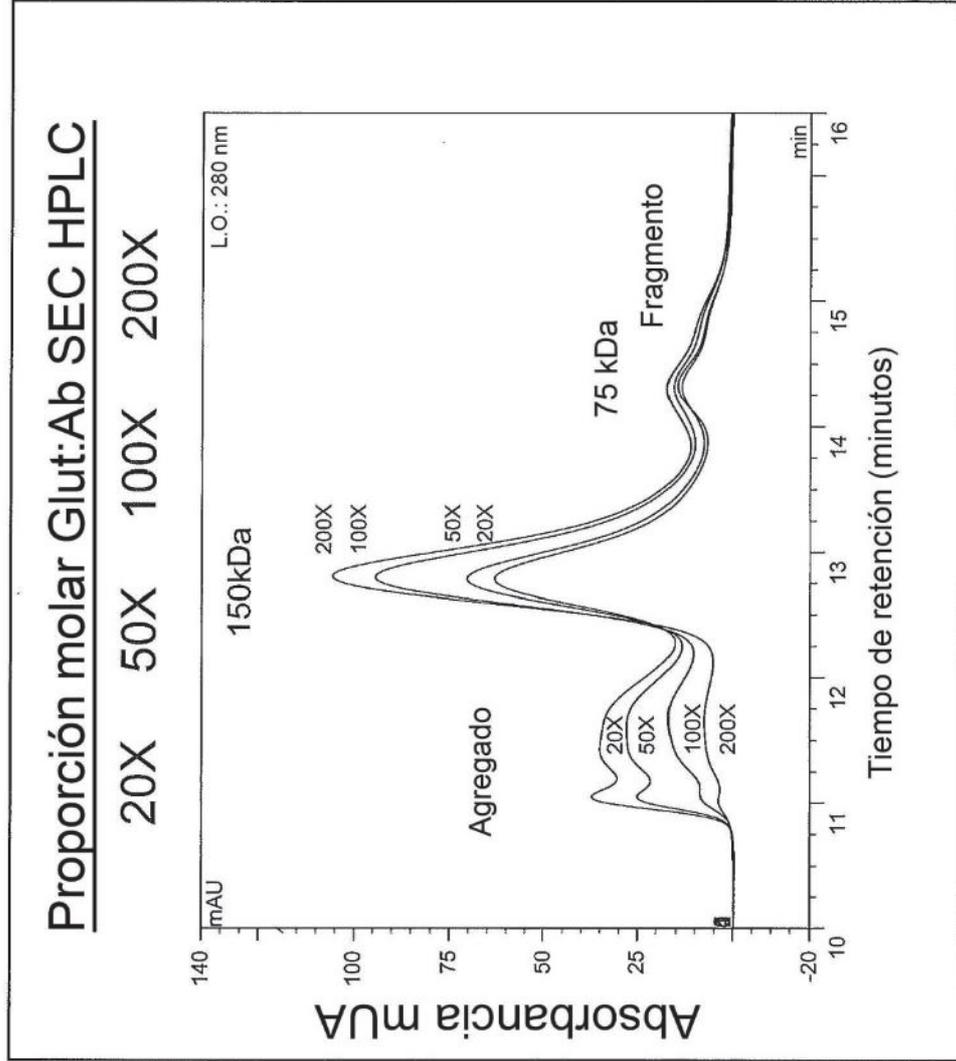


Figura 5A

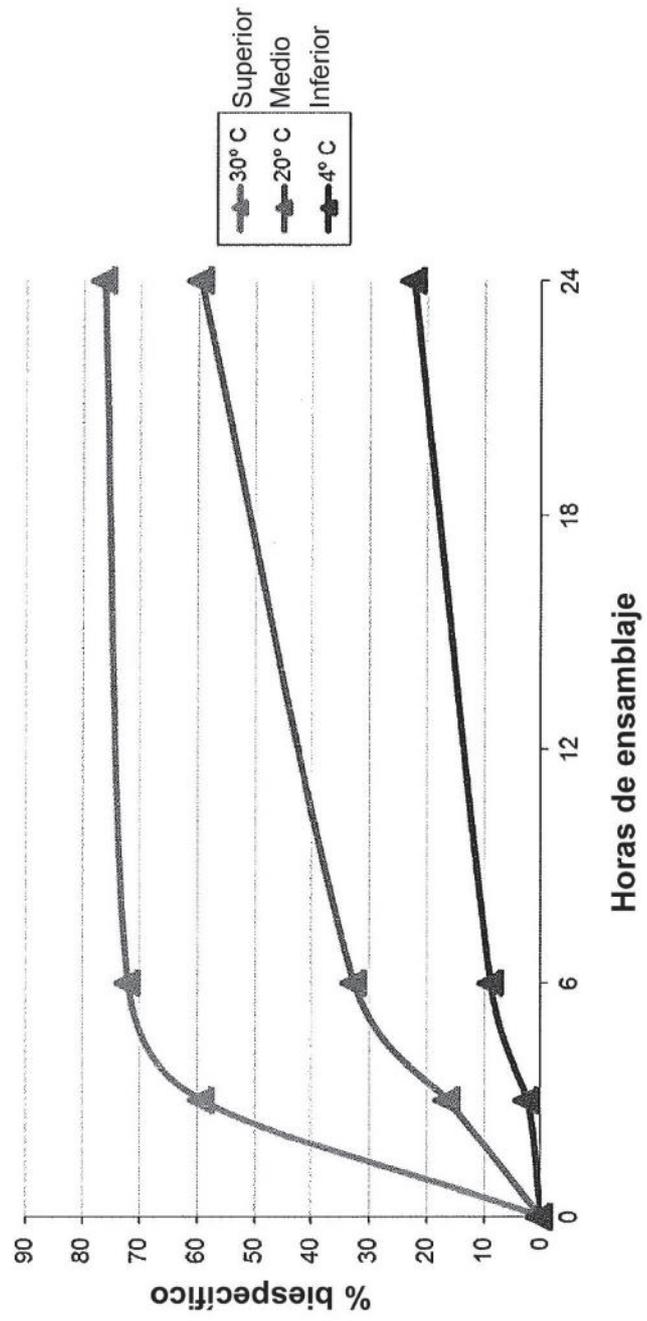


Figura 5B

Evolución temporal de ensamblaje en HPLC de fase inversa

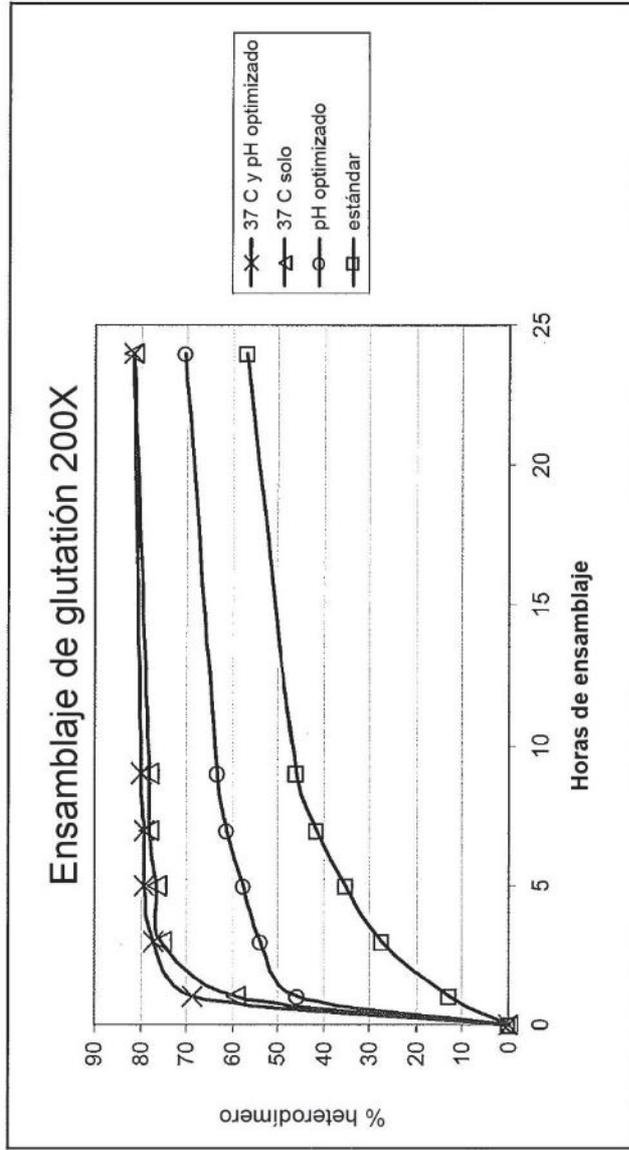


Figura 6A SEC HPLC: efecto de la concentración de PVP

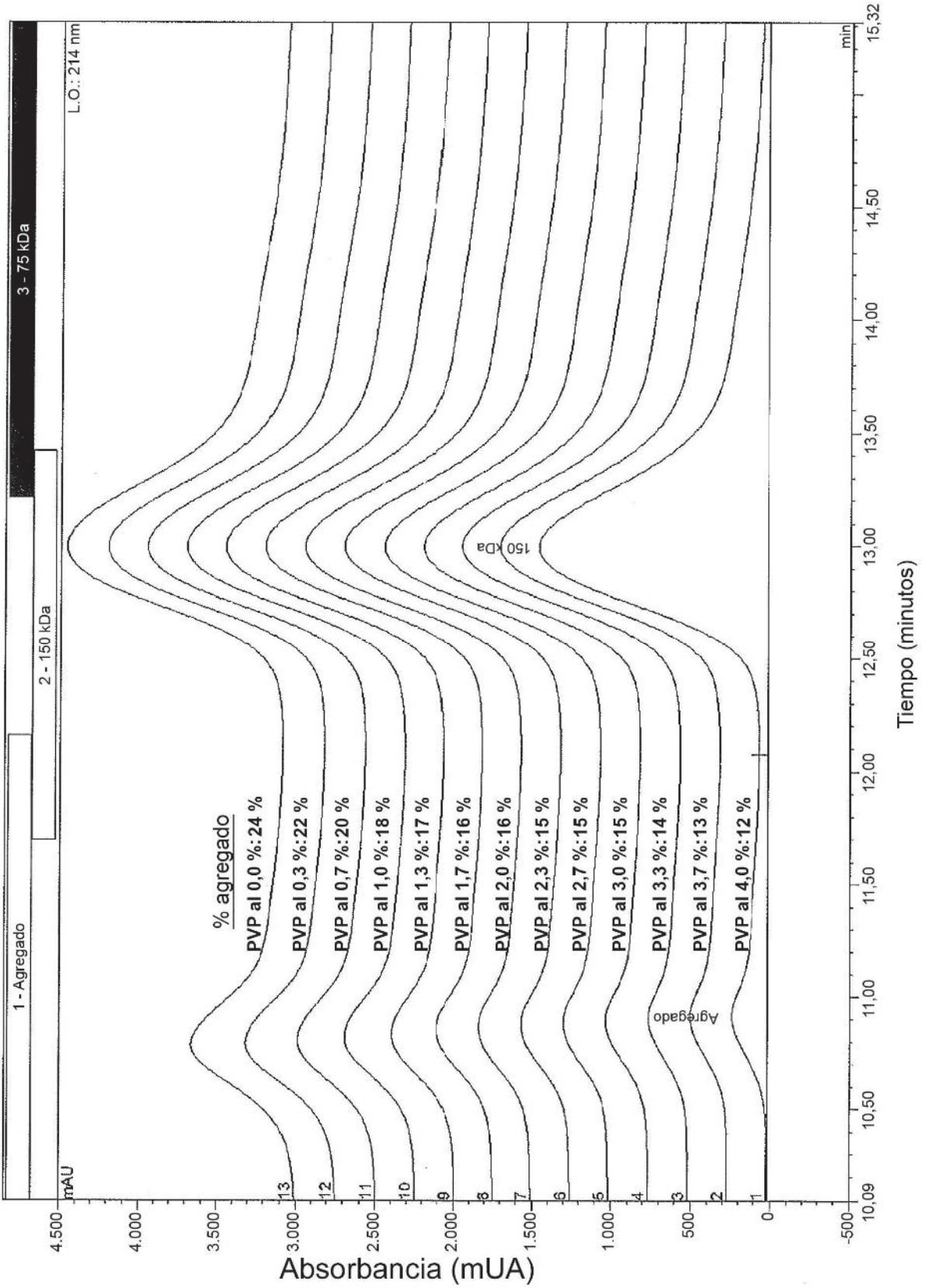


Figura 6B

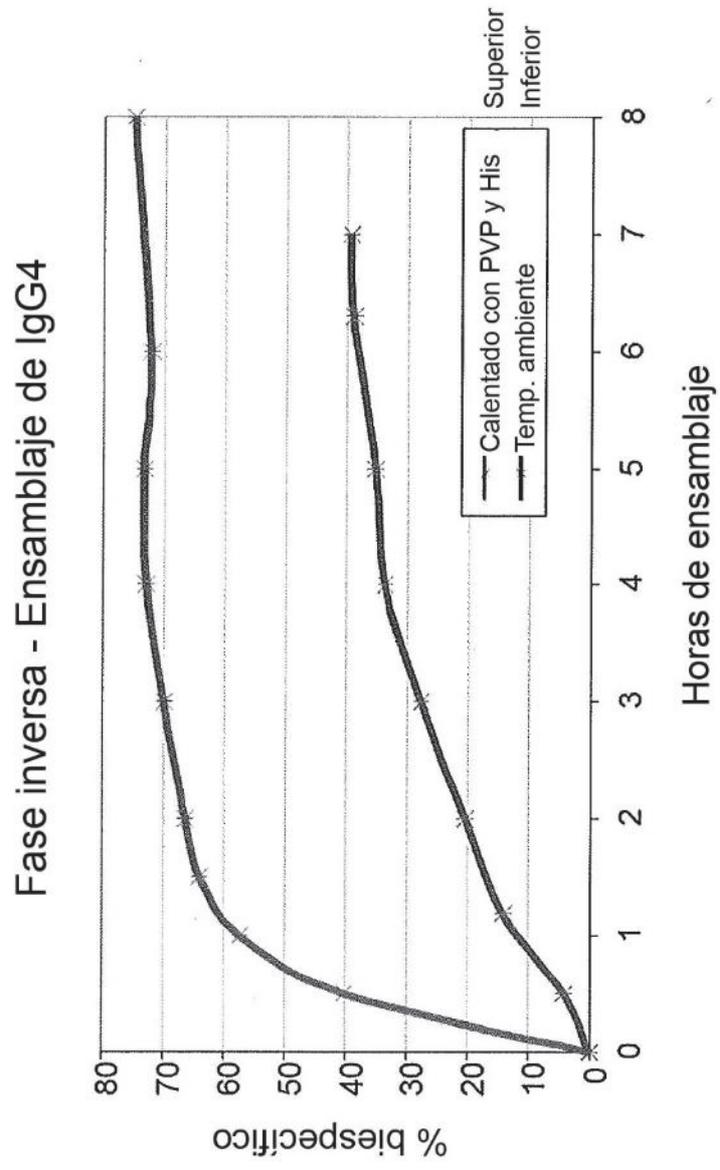


Figura 6C

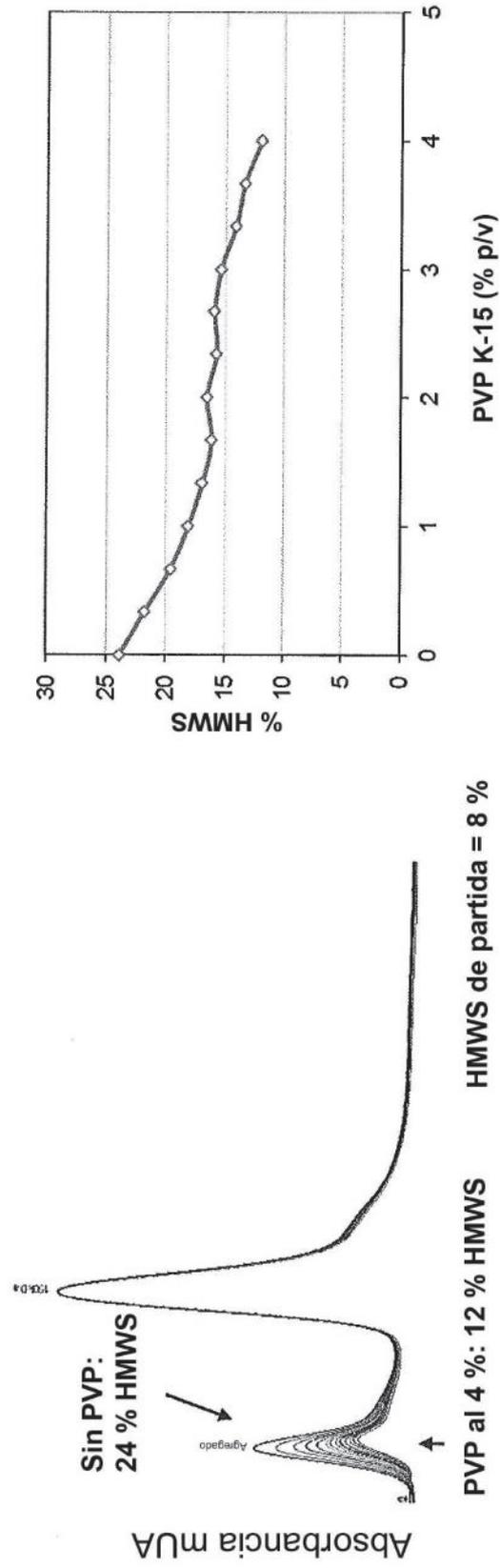


Figura 7

