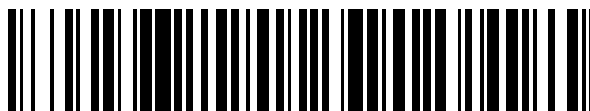


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 301**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2013 PCT/IB2013/000902**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.09.2013 WO13136186**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2013 E 13739281 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2019 EP 2825559**

54 Título: **Anticuerpos biespecíficos fácilmente aislados con formato de inmunoglobulina nativa**

30 Prioridad:

13.03.2012 US 201261610141 P

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

23.10.2019

73 Titular/es:

**NOVIMMUNE SA (100.0%)
14 ch. Des Aulx, Plan-Les-Ouates
1228 Geneva, CH**

72 Inventor/es:

**FISCHER, NICOLAS;
MAGISTRELLI, GIOVANNI;
ROUSSEAU, FRANÇOIS;
MASTERNAK, KRZYSZTOF y
MALINGE, PAULINE**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 728 301 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos biespecíficos fácilmente aislados con formato de inmunoglobulina nativa

5 Solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. 61/610,141, presentada el 13 de marzo de 2012.

10 Campo de la invención

La invención se refiere a proteínas de unión a antígeno o anticuerpos que tienen heterodímeros de cadenas pesadas, es decir, dos cadenas pesadas de inmunoglobulina que difieren en al menos un aminoácido que permite el aislamiento de la proteína de unión a antígeno en base a una afinidad diferencial de una cadena pesada de inmunoglobulina y una cadena pesada de inmunoglobulina modificada o mutada hacia un reactivo de afinidad. La invención también se refiere a proteínas de unión a antígeno o anticuerpos que tienen heterodímeros de cadenas pesadas, es decir, dos cadenas pesadas de inmunoglobulina que difieren en al menos dos aminoácidos que permiten el aislamiento de la proteína de unión a antígeno en base a una afinidad diferencial de una cadena pesada de inmunoglobulina y una cadena pesada de inmunoglobulina modificada o mutada hacia un reactivo de afinidad. La invención también se refiere a proteínas de unión a antígeno (incluidos los anticuerpos biespecíficos) que tienen regiones IgG CH1 con diferentes afinidades con respecto al reactivo de afinidad que permite el aislamiento rápido mediante la unión diferencial de las regiones de IgG a este reactivo de afinidad.

25 Antecedentes de la invención

Los anticuerpos son moléculas multifuncionales que llevan una especificidad de unión única para un antígeno objetivo o múltiples objetivos y que tienen la capacidad de interactuar con el sistema inmunitario a través de mecanismos que son dependientes de los antígenos. Muchas de las terapias biológicas utilizadas actualmente para el cáncer son anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos que generalmente se sobre expresan en la célula neoplásica objetivo. Cuando dichos anticuerpos se unen a las células tumorales, pueden desencadenar citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Desafortunadamente, las células neoplásicas a menudo desarrollan mecanismos para suprimir estas respuestas inmunitarias normales. Además, dirigir o neutralizar una sola proteína no siempre es suficiente para lograr la eficacia en ciertas enfermedades, lo que limita el uso terapéutico de los anticuerpos monoclonales. Es cada vez más claro que en varias indicaciones neutralizar un componente de un sistema biológico no es suficiente para lograr la eficacia

De acuerdo con, sigue existiendo la necesidad de un formato de anticuerpo biespecífico, en particular para aplicaciones terapéuticas, que minimice algunas o todas las desventajas mencionadas anteriormente.

40 Resumen de la invención

La invención se basa, al menos en parte, en el empleo de dos secuencias de dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina CH1 que difieren en al menos un aminoácido en una proteína de unión a antígeno biespecífica y forman un heterodímero. La diferencia de aminoácidos da como resultado una capacidad mejorada para aislar rápida y efectivamente la proteína heteromérica de los homodímeros, debido a que la diferencia da como resultado una capacidad diferencial de las secuencias del dominio CH1 para unirse al reactivo de afinidad IgG-CH1 CaptureSelect® (BAC BV). En un aspecto, se proporciona una proteína de unión a antígeno, que comprende un primer y un segundo polipéptido, comprendiendo el primer polipéptido, desde el terminal N hasta el terminal C, una primera región de unión a antígeno que se une selectivamente a un primer antígeno, seguido de una región constante que comprende una primera región CH1 de una IgG humana seleccionada de IgG1 (SEQ ID NO: 1), IgG2 (SEQ ID NO: 2), IgG3 (SEQ ID NO: 3), IgG4 (SEQ ID NO: 4), y una combinación de las mismas; y, un segundo polipéptido que comprende, desde el terminal N hasta el terminal C, una segunda región de unión a antígeno que se une selectivamente a un segundo antígeno, seguido de una región constante que comprende una segunda región CH1 de una IgG humana seleccionada de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 y una combinación de los mismos, en el que la segunda región CH1 comprende una modificación que reduce o elimina la unión del segundo dominio CH1 al reactivo de afinidad IgG-CH1 CaptureSelect®.

La invención también se basa al menos en parte en el empleo de dos secuencias de dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina CH1 que difieren en al menos dos aminoácidos en una proteína de unión a antígeno biespecífica y forman un heterodímero. La diferencia de dos aminoácidos resulta en una capacidad mejorada para aislar rápida y efectivamente la proteína heteromérica de los homodímeros, debido a que la diferencia resulta en una capacidad diferencial de las secuencias del dominio CH1 para unirse al reactivo de afinidad IgG-CH1 CaptureSelect® (BAC BV). En un aspecto, se proporciona una proteína de unión a antígeno, que comprende un primer y un segundo polipéptido, el primer polipéptido comprende, desde el terminal N hasta el terminal C, una primera región de unión a antígeno que se une selectivamente a un primer antígeno, seguido de una región constante que comprende una primera región CH1 de una IgG humana seleccionada de IgG1 (SEQ ID NO: 1), IgG2 (SEQ ID NO: 2), IgG3 (SEQ ID NO: 3), IgG4 (SEQ ID NO: 4), y una combinación de los mismos; y, un segundo polipéptido que comprende, desde el

- terminal N hasta el terminal C, una segunda región de unión a antígeno que se une selectivamente a un segundo antígeno, seguido de una región constante que comprende una segunda región CH1 de una IgG humana seleccionada de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 y una combinación de los mismos, en el que la segunda región CH1 comprende una modificación que reduce o elimina la unión del segundo dominio CH1 al reactivo de afinidad IgG-CH1 CaptureSelect®.
- 5 En una realización, la segunda región CH1 comprende mutaciones que modifican los residuos S40 y T47, de acuerdo con el sistema de numeración de exones IMGT (IMGT®, el sistema internacional de información ImMunoGeneTics®).
- 10 En algunas realizaciones, la segunda región CH1 comprende las modificaciones S40T y T47S. Como se usa en este documento, una mutación "S40T" es una en la que el residuo de tipo silvestre, la serina, en la posición 40 se reemplaza con una treonina (es decir, mutación S → T en el residuo 40). Del mismo modo, como se usa en este documento, una mutación "T47S" es una en la que el residuo de tipo silvestre, treonina, en la posición 40 se reemplaza con una serina (es decir, mutación T → S en el residuo 47).
- 15 En realizaciones específicas, la segunda región CH1 se selecciona de la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 17 y la SEQ ID NO: 18.
- En una realización, la segunda región CH1 es o deriva de una IgG1 humana modificada (SEQ ID NO: 15).
- 20 En una realización, la segunda región CH1 se deriva o se deriva de una IgG2 humana modificada (SEQ ID NO: 16).
- En una realización, la segunda región CH1 es de una IgG3 humana modificada (SEQ ID NO: 17).
- En una realización, la segunda región CH1 es de una IgG4 humana modificada (SEQ ID NO: 18).
- 25 En una realización, el dominio CH1 es un dominio quimérico que comprende secuencias de dos o más de IgG1 humana, IgG2 humana, IgG3 humana e IgG4 humana.
- 30 En una realización, el dominio CH1 es de IgG1 humana, IgG2 humana, IgG3 humana o IgG4 humana, y la proteína de unión a antígeno comprende además un dominio CH2 y un dominio CH3, en donde el dominio CH2 y el dominio CH3 son seleccionados independientemente del grupo que consiste en un dominio CH2 o CH3 IgG1 humano, un dominio CH2 o CH3 IgG2 humano, un dominio CH2 o CH3 IgG3 humano, un dominio CH2 o CH3 IgG4 humano.
- 35 En una realización, la proteína de unión a antígeno comprende además una cadena ligera de inmunoglobulina.
- En otra realización, la cadena ligera de inmunoglobulina se selecciona de una cadena ligera kappa humana y lambda humana.
- 40 En una realización, la primera y la segunda regiones de unión a antígeno comprenden cada una al menos una región determinante de complementariedad (CDR). En otra realización, la primera y la segunda regiones de unión a antígeno comprenden cada una al menos dos CDR. En otra realización, la primera y la segunda regiones de unión a antígeno comprenden cada una tres CDR. En una realización específica, las CDR son de una cadena pesada de inmunoglobulina. En otra realización específica, la cadena pesada es una cadena pesada humana.
- 45 En una realización, la primera región de unión a antígeno comprende un primer dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina, y la segunda región de unión a antígeno comprende un segundo dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina.
- 50 En una realización, el primer y el segundo dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina comprenden independientemente una CDR humana, una CDR de ratón, una CDR de rata, una CDR de conejo, una CDR de mono, una CDR de chimpancé, una CDR sintética y/o Una CDR humanizada. En una realización, la CDR es humana y está mutada somáticamente.
- 55 En una realización, el primer y el segundo dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina comprenden una región marco humana (FR). En una realización, la FR humana es una FR humana somática mutada.
- En una realización, la primera y/o la segunda regiones de unión a antígeno se obtienen mediante el tamizaje de una biblioteca de fagos que comprende regiones variables de anticuerpo para la reactividad frente a un antígeno de interés.
- 60 En otra realización, la primera y/o la segunda regiones de unión a antígeno se obtienen inmunizando un animal no humano tal como un ratón, una rata, un conejo, un mono o un mono con un antígeno de interés e identificación de una secuencia de ácido nucleico de región variable de anticuerpo que codifica una región variable específica para el antígeno de interés.
- 65 En otra realización específica, uno o más genes de región variable de inmunoglobulina humana están presentes en el animal no humano de manera extracromosómica, como un reemplazo en un locus de inmunoglobulina endógeno, o

como un transgén integrado al azar en el genoma del animal no humano. En una realización, la primera y/o la segunda región de unión a antígeno se obtienen a partir de una hibridoma o un cuadroma, en otra realización a partir del tamizaje de células inmunitarias de un animal no humano inmunizado usando clasificación celular.

5 En una realización, la proteína de unión a antígeno es un anticuerpo biespecífico. En una realización, el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo biespecífico completamente humano y tiene una afinidad por cada epítipo, independientemente, en el rango micromolar, nanomolar o picomolar.

10 En una realización, la proteína de unión a antígeno es no inmunogénica o sustancialmente no inmunogénica en un ser humano. En una realización específica, la proteína de unión a antígeno carece de un epítipo de células T humano no nativo. En una realización, la modificación de la región CH1 es no inmunogénica o sustancialmente no inmunogénica en un ser humano.

15 En una realización, la proteína de unión a antígeno comprende una cadena pesada, en la que la cadena pesada no es inmunogénica o sustancialmente no inmunogénica en un ser humano.

20 En una realización, la cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos que no contiene un epítipo de células T no nativo. En una realización, la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos cuya proteólisis no puede formar una secuencia de aminoácidos de aproximadamente 9 aminoácidos que es inmunogénica en un ser humano. En una realización específica, el ser humano es un ser humano tratado con la proteína de unión a antígeno. En una realización, la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos cuya proteólisis no puede formar una secuencia de aminoácidos de aproximadamente 13 a aproximadamente 17 aminoácidos que es inmunogénica en un ser humano. En una realización específica, el ser humano es un ser humano tratado con la proteína de unión a antígeno.

25 En un aspecto, se divulgan en este documento anticuerpos multiespecíficos aislados que tienen más de una especificidad de unión a antígeno, en el que el anticuerpo multiespecífico incluye al menos (i) un primer polipéptido que comprende una primera región variable que se une a un primer epítipo y una región constante de inmunoglobulina que comprende una primera región CH1 de una IgG humana seleccionada entre IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, y (ii) un segundo polipéptido que comprende una segunda región que se une a un segundo epítipo y una región constante de inmunoglobulina que comprende una segunda región CH1 de una IgG humana seleccionada de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, en el que el primer y segundo epítopos son epítopos diferentes, y en el que al menos una de las regiones CH1 primera y segunda comprende una modificación que reduce o elimina la unión del segundo dominio CH1 al reactivo de afinidad IgG-CH1 CaptureSelect®, o cualquier reactivo de afinidad que se dirija al dominio humano de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 CH1.

30 También se divulgan proteínas de unión a antígeno biespecíficas heterodiméricas que incluyen (a) un primer polipéptido que comprende, desde el terminal N hasta el terminal C, una primera región de unión al epítipo que se une selectivamente a un primer epítipo y una región constante de inmunoglobulina que comprende una primera región CH1 de una IgG humana seleccionada entre IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4; y, b) un segundo polipéptido que comprende, desde el terminal N hasta el terminal C, una segunda región de unión a epítipo que se une selectivamente a un segundo epítipo y una región constante de inmunoglobulina que comprende una segunda región CH1 de una IgG humana seleccionada de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, en el que la segunda región CH1 comprende una modificación que reduce o elimina la unión del segundo dominio CH1 al reactivo de afinidad IgG-CH1 CaptureSelect®, o cualquier reactivo de afinidad dirigido al IgG1 humano, IgG2, IgG3 e IgG4 CH1.

35 En algunas realizaciones de los anticuerpos multiespecíficos, por ejemplo, las proteínas de unión a antígeno biespecíficas heterodiméricas, el primer polipéptido y el segundo polipéptido comprenden cadenas pesadas de IgG humana o derivan de cadenas pesadas de IgG humana. En algunas realizaciones, los anticuerpos multiespecíficos, por ejemplo, proteínas de unión a antígeno biespecíficas heterodiméricas, también incluyen una cadena ligera de inmunoglobulina. En algunas realizaciones de los anticuerpos multiespecíficos, por ejemplo, proteínas de unión a antígeno biespecíficas heterodiméricas, la cadena ligera de inmunoglobulina es una cadena ligera de inmunoglobulina humana o se deriva de una cadena ligera de inmunoglobulina humana. En algunas realizaciones de los anticuerpos multiespecíficos, por ejemplo, las proteínas de unión a antígeno biespecíficas heterodiméricas, el primer y el segundo polipéptidos son cada uno cadenas pesadas de IgG1 humanas o se derivan de cadenas pesadas de IgG1 humanas. En algunas realizaciones de los anticuerpos multiespecíficos, por ejemplo, proteínas de unión a antígeno biespecíficas heterodiméricas, la segunda región CH1 comprende la modificación. En algunas realizaciones de los anticuerpos multiespecíficos, por ejemplo, proteínas heterodiméricas de unión al antígeno biespecíficas, la modificación en el segundo dominio CH1 incluye una modificación S40 de mutación en el sistema de numeración de exones IMGT, una modificación T47 de mutación en el sistema de numeración de exones IMGT o una combinación de ellas. En algunas realizaciones de los anticuerpos multiespecíficos, por ejemplo, proteínas de unión a antígeno biespecíficas heterodiméricas, la modificación en el segundo dominio CH1 comprende una mutación S40T en el sistema de numeración de exones IMGT, una mutación T47S en el sistema de numeración de exones IMGT o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones de los anticuerpos multiespecíficos, por ejemplo, proteínas de unión a antígeno biespecíficas heterodiméricas, el primer dominio CH1 del anticuerpo biespecífico, el segundo dominio CH1

o ambos, el primer y el segundo dominio CH1 no son inmunogénicos o sustancialmente no inmunogénicos en un humano

5 En un aspecto, se proporciona un método para producir un anticuerpo biespecífico, que comprende: obtener una secuencia de ácido nucleico que codifica una primera cadena pesada de inmunoglobulina que comprende un primer dominio variable que reconoce un primer epítipo, en el que la primera cadena pesada de inmunoglobulina comprende un dominio constante de isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4; obtener una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica una segunda cadena pesada de inmunoglobulina que comprende un segundo dominio variable que reconoce un segundo epítipo, en el que la segunda cadena pesada de inmunoglobulina comprende un dominio constante de isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, o un dominio constante de isotipo quimérico del mismo que comprende una modificación en su dominio CH1 que erradica o reduce la unión al reactivo de afinidad IgG-CH1 CaptureSelect®; obteniendo una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica una inmunoglobulina una cadena ligera que se empareja con la primera y la segunda cadena pesada de inmunoglobulina; la introducción de la primera, segunda y tercera secuencia de ácido nucleico en una célula de mamífero; permitiendo que la célula exprese una inmunoglobulina, y aislando la inmunoglobulina mediante el reactivo de afinidad IgG-CH1 CaptureSelect®.

15 En una realización, la célula se selecciona de un CHO, COS, 293, HeLa y una célula retiniana que expresa una secuencia de ácido nucleico viral (por ejemplo, una célula PERC.6™).

20 En un aspecto, se proporciona un método para producir un anticuerpo biespecífico, que comprende una etapa de aislamiento de una célula alterada o una mezcla de anticuerpos, un anticuerpo biespecífico que tiene dominios CH1 IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 modificados diferencialmente, en el que los diferentes los dominios CH1 modificados no son inmunogénicos o sustancialmente no inmunogénicos en un ser humano, y en el que la modificación produce un anticuerpo biespecífico con cadenas pesadas heterodiméricas cuyos monómeros tienen una afinidad diferencial por un reactivo de afinidad, y el anticuerpo biespecífico se aísla de la célula alterada o la mezcla utilizando un reactivo de afinidad.

25 En una realización, el anticuerpo biespecífico heterodimérico se puede purificar preferentemente en un intervalo de pH específico y concentración de sal. En esta realización, el anticuerpo biespecífico heterodimérico está compuesto por dos cadenas pesadas diferentes, una modificada en las posiciones 40 y 47 (numeración IMGT®), o en las posiciones 40, 45 y 47 (numeración IMGT®), en su dominio CH1; y el otro carece de modificación en las posiciones 40 y 47 (numeración IMGT®), o en las posiciones 40, 45 y 47 (numeración IMGT®), en su dominio CH1.

30 En un aspecto, la invención proporciona métodos para producir anticuerpos multiespecíficos, por ejemplo, proteínas de unión a antígeno biespecíficas heterodiméricas, mediante (a) la obtención de una secuencia de ácido nucleico que codifica una primera cadena pesada de inmunoglobulina que comprende un primer dominio variable que reconoce un primer epítipo, en el que la primera cadena pesada de inmunoglobulina comprende un dominio constante de isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4; (b) obtener una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica una segunda cadena pesada de inmunoglobulina que comprende un segundo dominio variable que reconoce un segundo epítipo, en el que la segunda cadena pesada de inmunoglobulina comprende un dominio constante de isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 que comprende una modificación en su dominio CH1 que erradica o reduce la unión al reactivo de afinidad de CaptureSelect® IgG-CH1, o cualquier reactivo de afinidad que se dirija al dominio humano de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4; (c) obtener una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera de inmunoglobulina que se empareja con la primera y la segunda cadena pesada de inmunoglobulina; (d) introducción de la primera, segunda y tercera secuencia de ácido nucleico en una célula de mamífero; (e) permitir que la célula exprese un anticuerpo biespecífico; y (f) aislar el anticuerpo biespecífico en función de la capacidad del anticuerpo biespecífico para unirse al reactivo de afinidad IgG-CH1 CaptureSelect®, o cualquier reactivo de afinidad que se dirija al dominio humano IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4

35 En algunas realizaciones, la modificación en el segundo dominio CH1 comprende una mutación S40T en el sistema de numeración de exones IMGT, una mutación T47S en el sistema de numeración de exones IMGT o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el primer dominio CH1 del anticuerpo biespecífico, el segundo dominio CH1 o ambos, el primer y el segundo dominio CH1, no son inmunogénicos o son sustancialmente no inmunogénicos en un ser humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo biespecífico se aísla en un soporte sólido que comprende un reactivo de afinidad IgG-CH1 CaptureSelect®, o cualquier reactivo de afinidad que se dirija a los dominios humanos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En algunas realizaciones, el soporte sólido comprende una columna de afinidad IgG-CH1 CaptureSelect®, o cualquier reactivo de afinidad dirigido a los dominios CH1 de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanos, y el anticuerpo biespecífico se aísla empleando un gradiente de pH. En algunas realizaciones, el gradiente de pH es un gradiente de pasos que comprende uno o más pasos de pH entre pH 3 y pH 5.

40 En un aspecto, la invención proporciona métodos para aislar un anticuerpo biespecífico aislado de una célula alterada o una mezcla de anticuerpos un anticuerpo biespecífico que tiene dominios CH1 IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 modificados diferencialmente, en el que los dominios CH1 modificados diferencialmente son no inmunogénicos o sustancialmente no inmunogénicos en un ser humano, y en el que la modificación da como resultado un anticuerpo biespecífico con una región constante de cadena pesada heterodimérica cuyos monómeros tienen una afinidad diferencial por el reactivo de afinidad IgG-CH1 CaptureSelect®, o cualquier reactivo de afinidad dirigido al dominio CH1 humano IgG1,

IgG2, IgG3 e IgG4, y el anticuerpo biespecífico se aísla de la célula alterada o de la mezcla en función de su afinidad por el reactivo de afinidad IgG-CH1 CaptureSelect®, o cualquier reactivo de afinidad dirigido al dominio CH1 humano IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

5 En algunas realizaciones, un monómero de la región constante de la cadena pesada heterodimérica es una IgG1 humana y el otro monómero de la región constante de la cadena pesada heterodimérica es una IgG1 humana modificada que comprende una modificación seleccionada del grupo que consiste en una mutación S40T en el sistema de numeración de exones IMGT, una mutación T47S en el sistema de numeración de exones IMGT o una combinación de ellos. En algunas realizaciones, la primera cadena pesada de inmunoglobulina comprende una mutación o modificación que altera sus propiedades de unión a una resina de cromatografía de afinidad. En algunas realizaciones, la primera cadena pesada de inmunoglobulina comprende una mutación que altera sus propiedades de unión a la Proteína A. En algunas realizaciones, la primera cadena pesada de inmunoglobulina comprende una mutación H435R que altera sus propiedades de unión a la Proteína A.

15 Cualquiera de las realizaciones y aspectos descritos en el presente documento se pueden usar conjuntamente entre sí, a menos que se indique lo contrario o sea evidente a partir del contexto. Otras realizaciones resultarán evidentes para los expertos en la materia a partir de una revisión de la siguiente descripción.

20 Breve descripción de las figuras

La figura 1 es una tabla que muestra la especificidad del reactivo de afinidad IgG-CH1 CaptureSelect® para anticuerpos purificados conocidos de diferentes especies e isotipos diferentes.

25 La figura 2 es una ilustración que muestra la alineación de secuencias de los dominios CH1 de las siguientes especies e isotipos: IGHG1 humano (H-IGHG1, SEQ ID NO: 1), IGHG2 humano (H-IGHG2, SEQ ID NO: 2), IGHG3 humano (H-IGHG3, SEQ ID NO: 3), IGHG4 humano (H-IGHG4, SEQ ID NO: 4), IGHG de hámster (Ha-IGHG, SEQ ID NO: 5), IGHG1 de ratón (MIGHG1, SEQ ID NO: 6), IGHG2A de ratón (MIGHG2A, SEQ ID NO: 7), IGHG2B de ratón (MIGHG2B, SEQ ID NO: 8), IGHG2C de ratón (MIGHG2C, SEQ ID NO: 9), IGHG3 de ratón (M-IGHG3, SEQ ID NO 10), IGHG1 de rata (R-IGHG1, SEQ ID NO: 11), IGHG2A de rata (R-IGHG2A, SEQ ID NO: 12), IGHG2B de rata (R-IGHG2B, SEQ ID NO: 13) e IGHG2C de rata (R-IGHG2C, SEQ ID NO: 14).

La figura 3 es una ilustración que muestra un ejemplo de un anticuerpo biespecífico que tiene un dominio CH1 de tipo silvestre con un residuo de serina en la posición 40 (40S) y un residuo de treonina en la posición 47 (47T).

35 La figura 4 es una tabla que muestra las mutaciones del dominio CH1 probadas en los ejemplos que se proporcionan a continuación.

40 La figura 5 es una ilustración que representa la alineación de secuencia del dominio CH1 de H-IGHG1 (SEQ ID No: 1) y el dominio CH1 de H-IGHG1 M2 (SEQ ID No: 15), donde el mutante H-IGHG1 M2 es una variante de La secuencia H-IGHG1 que tiene una treonina en la posición 40 (también denominada en este documento como una mutación S40T) y una serina en la posición 47 (también denominada en este documento como una mutación T47S).

La figura 6 es un gráfico que representa la cantidad de anticuerpos purificados obtenidos después de la purificación en una columna de afinidad de Proteína A o en una columna de afinidad de IgG-CH1 CaptureSelect®.

45 La figura 7 es un gráfico que representa el porcentaje de recuperación de anticuerpos purificados utilizando una columna de afinidad de Proteína A en comparación con la recuperación de anticuerpos purificados utilizando una columna de afinidad IgG-CH1 CaptureSelect®.

50 La figura 8 es una ilustración que muestra la alineación de la secuencia del dominio CH1 de H-IGHG1 (SEQ ID No: 1) y el dominio CH1 de H-IGHG1 M2 (SEQ ID No: 15); el dominio CH-H-IGHG2 (SEQ ID No: 2) y el dominio CH-H-IGHG2 M2 (SEQ ID No: 16), donde el mutante H-IGHG2 M2 es una variante de la secuencia H-IGHG2 que tiene una treonina en la posición 40 (también referido aquí como una mutación S40T) y una serina en la posición 47 (también referido aquí como una mutación T47S); el dominio CH-H-IGHG3 (SEQ ID No: 3) y el dominio CH-H-IGHG3 M2 (SEQ ID No: 17), donde el mutante H-IGHG3 M2 es una variante de la secuencia H-IGHG3 que tiene una treonina en la posición 40 (también referido aquí como una mutación S40T) y una serina en la posición 47 (también referido aquí como una mutación T47S); y el dominio CH1 H-IGHG4 (SEQ ID No: 4) y el dominio CH1 H-IGHG4 M2 (SEQ ID No: 18), donde el mutante H-IGHG4 M2 es una variante de la secuencia H-IGHG4 que tiene una treonina en la posición 40 (también denominada aquí como una mutación S40T) y una serina en la posición 47 (también denominada aquí como una mutación T47S).

55 La figura 9 es una ilustración que muestra un posible formato de anticuerpo biespecífico purificado por dos pasos de afinidad. Este anticuerpo tiene una cadena ligera común y dos cadenas pesadas diferentes. Se han introducido mutaciones en estas dos cadenas pesadas diferentes. Una de las cadenas pesadas tiene mutaciones S40T y T47S en su dominio CH1 que anulan la unión al reactivo de afinidad IgG-CH1 CaptureSelect®, mientras que la otra cadena

tiene una mutación H435R en su dominio CH3 que anula la unión a la proteína A. Se indican las posiciones que se mutaron.

La figura 10 es una ilustración que representa la estrategia de purificación asimétrica utilizada para aislar el anticuerpo biespecífico de la mezcla de anticuerpos generados en la expresión en una sola célula de dos cadenas pesadas y una cadena ligera. El anticuerpo monoespecífico que lleva el H435R en ambas cadenas pesadas no se une a la resina de la Proteína A y se pierde en el flujo. El segundo anticuerpo monoespecífico que lleva las mutaciones S40T y T47S en ambas cadenas pesadas no se une al reactivo de afinidad IgG-CH1 CaptureSelect® y se pierde en el flujo. El anticuerpo biespecífico se recupera en la etapa de elución final.

La figura 11 es un gráfico que representa los resultados de unión de anticuerpos contra CD3 obtenidos por ELISA. El formato ELISA se describe mediante un diseño preliminar en el panel derecho.

La figura 12 es un gráfico que representa los resultados de unión de anticuerpos frente a IL-17 obtenidos por ELISA. El formato ELISA se describe mediante un diseño preliminar en el panel derecho.

La figura 13 es una gráfica que representa los resultados del compromiso de anticuerpos contra CD3 e IL-17 obtenidos por ELISA. El formato ELISA se describe mediante un diseño preliminar en el panel derecho.

La figura 14 es un gráfico que muestra sensogramas obtenidos en un instrumento Biacore 2000 para la interacción entre el ligando biotinilado de CaptureSelect® IgG-CH1 inmovilizado en un chip CM5 recubierto con estreptavidina, con diferentes IgG que tienen dominios CH1 no modificados o modificados. El hIgG1 mutado lleva las mutaciones descritas en la figura 4.

Descripción detallada

Con el fin de superar las limitaciones de las terapias de anticuerpos monoclonales y monovalentes que solo pueden dirigirse a un único antígeno o para superar las limitaciones de las combinaciones de terapias de anticuerpos monovalentes, se han realizado esfuerzos intensos para la selección de antígenos múltiples utilizando formatos de anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos son ventajosos ya que permiten la selección múltiple, aumentan el potencial terapéutico, abordan la redundancia de los sistemas biológicos y proporcionan nuevos mecanismos de acción a través de capacidades como la reorientación y/o una mayor especificidad. A medida que las dianas terapéuticas únicas validadas se agotan cada vez más, las combinaciones permitidas por los anticuerpos biespecíficos proporcionan un universo nuevo y expansivo de objetivos para agentes terapéuticos y aplicaciones.

En los últimos años, se han realizado esfuerzos para desarrollar anticuerpos como agentes terapéuticos que tengan más de una especificidad de unión a antígeno, por ejemplo, anticuerpos biespecíficos. En el caso de terapias contra el cáncer, los formatos multiespecíficos podrían permitir la posibilidad de usar, por ejemplo, una especificidad para dirigir la molécula a un antígeno de células tumorales, y la otra especificidad para desencadenar una respuesta que normalmente no está disponible para el sistema inmunitario. Los anticuerpos biespecíficos también pueden encontrar uso como ligandos sustitutos para los sistemas de receptores heterodiméricos de dos componentes que normalmente son activados por su ligando natural cuando se une y une a ambos componentes.

Se han desarrollado numerosos formatos en la técnica para abordar las oportunidades terapéuticas proporcionadas por moléculas con múltiples especificidades de unión. Idealmente, tales moléculas deberían ser proteínas de buen comportamiento que sean fáciles de producir y purificar, y que posean propiedades favorables in vivo. por ejemplo, farmacocinética apropiada para un propósito previsto, inmunogenicidad mínima y, si es deseable, funciones efectoras de anticuerpos convencionales.

La forma más directa de producir un anticuerpo biespecífico (que expresa dos anticuerpos distintos en una sola célula) da lugar a múltiples especies, porque las cadenas pesadas respectivas forman homo y heterodímeros, pero solo se desean los heterodímeros. Además, las cadenas ligeras y pesadas pueden emparejarse inadecuadamente. A continuación, se describen varios ejemplos de formatos que intentan abordar estos problemas de diferentes maneras.

Un formato, utilizado para las moléculas Acopladoras de células T biespecíficas (BiTE) (véase, por ejemplo, Wolf, E. et al. (2005) Drug Discovery Today 10: 1237-1244)), se basa en módulos de fragmentos variables de cadena única (scFv). Un scFv consiste en las regiones variables de la cadena ligera y pesada de un anticuerpo fusionadas a través de un ligador flexible, que generalmente se puede plegar de manera apropiada y las regiones pueden unirse al antígeno relacionado. Un BiTE concatena dos scFv de diferentes especificidades en tándem en una sola cadena. Esta configuración excluye la producción de moléculas con dos copias de la misma región variable de cadena pesada. Además, la configuración del enlazador está diseñada para garantizar el correcto emparejamiento de las respectivas cadenas ligeras y pesadas.

El formato BiTE tiene varias desventajas. Primero, las moléculas scFv son notorias por su tendencia a agregarse. Y aunque la inmunogenicidad de los enlazadores scFv es supuestamente baja, no se puede descartar la posibilidad de generar anticuerpos contra un BiTE. La ausencia de una porción de Fc en el formato BiTE también hace que su vida

media en el suero sea muy corta, y esto requiere la complicación de administraciones repetidas frecuentes o infusión continua a través de una bomba. Finalmente, la ausencia de un Fc también implica la ausencia de funciones efectoras mediadas por Fc, lo que puede ser beneficioso en algunas circunstancias.

5 Un segundo formato es un híbrido de un ratón y un anticuerpo monoclonal de rata, y se basa en una modificación de la cromatografía de afinidad de proteína A convencional (véase, por ejemplo, Lindhofer, H. et al. (1995) J. Immunol. 155: 219-225)). En este formato, un IgG2a de ratón y un anticuerpo IgG2b de rata se producen juntos en la misma célula (por ejemplo, ya sea como una fusión de cuádrima de dos hibridomas, o en células CHO modificadas por ingeniería genética). Debido a que las cadenas ligeras de cada anticuerpo se asocian preferentemente con las cadenas pesadas de sus especies afines, solo se pueden ensamblar tres especies distintas de anticuerpos: los dos anticuerpos parentales y un heterodímero de los dos anticuerpos que comprenden un par de cadenas pesada/ligera de cada uno, Asociarse a través de sus porciones Fc. El heterodímero deseado puede purificarse fácilmente a partir de esta mezcla porque sus propiedades de unión a la proteína A son diferentes de las de los anticuerpos parentales: la IgG2b de rata no se une a la proteína A, mientras que la IgG2a de ratón sí lo hace. En consecuencia, el heterodímero de rata de ratón se une a la proteína A pero se eluye a un pH más alto que el homodímero de IgG2a de ratón, y esto hace posible la purificación selectiva del heterodímero biespecífico. Al igual que con el formato BITE, este formato híbrido tiene dos sitios de unión a antígeno monovalentes.

20 La desventaja del híbrido ratón/rata es que debido a que no es humano, es probable que provoque una respuesta inmunitaria en el paciente, lo que podría tener efectos secundarios perjudiciales y/o neutralizar el agente terapéutico.

25 En función del concepto descrito anteriormente, es decir, la unión diferencial de una molécula heterodimérica a la proteína A, otros formatos que se basan en la modificación de la región Fc responsable de la unión a la proteína A se han descrito en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. No. 20100331527A1. Una limitación de la ingeniería de la región Fc de un anticuerpo es que las mutaciones introducidas podrían afectar la interacción con los receptores Fc y, por lo tanto, las funciones mediadas por Fc. En particular, la interacción FcRn es crucial para la larga vida media de los anticuerpos y este sitio de interacción está ubicado cerca del sitio de unión de la proteína A.

30 Otro formato, denominado "botones en ojales", se ha discutido en la técnica anterior como potencialmente útil para la producción de anticuerpos biespecíficos (Patente de EE. UU. No. 7,183,076). En esta estrategia, las partes Fc de dos anticuerpos están diseñadas para dar a uno un "botón" que sobresale, y al otro un "ojal" complementario. Cuando se producen en la misma célula, se dice que las cadenas pesadas forman preferentemente heterodímeros en lugar de homodímeros. por asociación de los "mandos" diseñados con los "ojales" diseñados. Los problemas para el correcto emparejamiento de cadenas ligeras y pesadas se abordan mediante la selección de anticuerpos que tienen diferentes especificidades pero que emplean cadenas ligeras idénticas.

35 La desventaja de este formato es que la estrategia de "botones en ojales" puede dar como resultado la producción de una cantidad significativa de homodímeros indeseables, por lo que se requieren etapas de purificación adicionales. Esta dificultad se ve agravada por el hecho de que las especies contaminantes son casi idénticas a las especies deseadas en muchas de sus propiedades. Las formas de ingeniería también pueden ser potencialmente inmunogénicas, ya que las mutaciones que producen las "botones" y los "ojales" introducen secuencias extrañas.

40 El enfoque para generar anticuerpos biespecíficos descritos en este documento supera las desventajas de otros, no implica mutagénesis de la región Fc, sino que se basa en modificaciones del dominio CH1 que alteran su capacidad de unión a un medio de cromatografía de afinidad específico de CH1. No se sabe que la región CH1 de los anticuerpos esté involucrada en interacciones con receptores u otras proteínas y, por lo tanto, las funciones efectoras y las propiedades farmacocinéticas del formato biespecífico de la invención permanecen inalteradas. Un beneficio adicional de algunas de las mutaciones del dominio CH1 descritas en este documento es que incluso los cambios muy conservadores (es decir, la serina a treonina y la treonina a serina) pueden abolir la unión a los medios de cromatografía específicos de CH1. Aunque estas mutaciones conservadoras representan cambios preferidos, los expertos en la técnica apreciarán que también se pueden aplicar mutaciones menos conservadoras para este enfoque.

45 La presente invención permite la purificación de la especie de anticuerpo biespecífico que contiene solo un dominio CH1 no modificado a partir de anticuerpos mono-específicos. Esto se puede lograr coexpresando en una sola célula dos cadenas pesadas de anticuerpos diferentes y una cadena ligera de anticuerpos. Las dos cadenas pesadas, cuando se combinan con la cadena ligera común, median la unión específica contra dos antígenos diferentes. Una de las dos cadenas pesadas contiene un dominio CH1 modificado que evita su unión a los medios de cromatografía específicos de CH1. La coexpresión de las tres cadenas lleva a la producción de una mezcla de tres anticuerpos: un anticuerpo mono-específico homodimérico con dos dominios CH1 no modificados, un anticuerpo mono-específico homodimérico con dos dominios CH1 modificados y un anticuerpo biespecífico heterodimérico con un dominio CH1 modificado y un dominio CH1 no modificado. Las propiedades diferenciales de las tres moléculas diferentes pueden explotarse para purificar eficazmente el anticuerpo biespecífico de los mono-específicos.

60 Las modificaciones del dominio CH1 aquí descritas pueden combinarse con otras mutaciones o modificaciones de una porción de un anticuerpo, como el dominio Fc. Tales combinaciones permiten un enfoque de purificación asimétrica de dos pasos que facilita aún más el aislamiento de la molécula biespecífica.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se proporcionan para describir a los expertos en la técnica cómo hacer y usar los métodos y composiciones de la invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su invención. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.) pero se deben tener en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio, la temperatura está en grados Centígrados y la presión está en o cerca de la presión atmosférica.

Ejemplo 1. El reactivo de afinidad IgG-CH1 CaptureSelect® se une específicamente a las IgG de humano y de hámster

Se llevaron a cabo experimentos de unión con anticuerpos purificados conocidos de diferentes especies y diferentes isotipos para probar la especificidad del reactivo de afinidad IgG-CH1 CaptureSelect®. Estos experimentos revelaron que solo las IgG humanas y de hámster podían retenerse en la resina de afinidad IgG-CH1 CaptureSelect®, mientras que las IgG de ratón y rata de diferentes isotipos no podían unirse a este reactivo de afinidad (Figura 1).

Ejemplo 2. Identificación de los determinantes de secuencia responsables de la unión de IgG al reactivo de afinidad IgG-CH1 CaptureSelect®

Se llevó a cabo alineación de secuencias de isotipos humano (IGHG1 SEQ ID NO: 1, IGHG2 SEQ ID NO: 2, IGHG3 SEQ ID NO: 3, IGHG4 SEQ ID NO: 4), de hámster (IGHG SEQ ID NO: 5), de ratón (IGHG1 SEQ ID NO: 6, IGHG2A SEQ ID NO: 7, IGHG2B SEQ ID NO: 8, IGHG2C SEQ ID NO: 9, IGHG3 SEQ ID No 10) y de rata (IGHG1 SEQ ID NO: 11, IGHG2A SEQ ID NO: 12, IGHG2B SEQ ID NO: 13, IGHG2C SEQ ID NO: 14) (Fig. 2). Se identificaron dos residuos conservados en CH1 humano y de hámster, pero no en secuencias de rata y ratón: 40S y 47T. Sus exposiciones al solvente también se determinaron en la estructura del anticuerpo, lo que indica que estos residuos son altamente accesibles. Otro residuo 45A está ubicado en la vecindad de 40S y 47T, está bien expuesto al solvente y se conserva parcialmente en las diferentes especies (Figura 3).

Ejemplo 3. Modificación del dominio CH1 humano para alterar la unión a medios de cromatografía de afinidad CH1

La modificación de IGHG1 humano se introdujo en el dominio CH1 mediante mutagénesis dirigida al sitio como mutaciones simples (S40T o T47S) dobles (S40T, T47S) o triples (S40T, A45S, T47S) y se denominaron M2ST, M2TS, M2 y M3, respectivamente (Figuras 4, 5 y 8). Estos diferentes mutantes se expresaron adicionalmente en 293 células usando procedimientos estándar de transfección de células de mamíferos y se purificaron del sobrenadante como se describe a continuación.

Purificación de IgG-CH1 CaptureSelect® y de la proteína A y de IgG1 modificada diferencialmente: IgG1 monomérica modificada diferencialmente (ref. por ejemplo WT, M2ST, M2TS, M2 y M3) se expresaron en 293 células. Los sobrenadantes celulares se recogieron y se dividieron en dos. Los anticuerpos se purificaron luego en las columnas de afinidad IgG-CH1 CaptureSelect® o Proteína A. Se determinó la cantidad de anticuerpos purificados obtenidos después de la purificación (Figura 6). También se calculó el porcentaje de recuperación de anticuerpos entre columnas de afinidad IgG-CH1 CaptureSelect® y la proteína A (Figura 7). Este porcentaje indicó que las mutaciones individuales M2ST y M2TS redujeron la unión del anticuerpo a la columna de afinidad IgG-CH1 CaptureSelect® pero no lo anularon. Las recuperaciones de M2 y M3 de los mutantes dobles y triples en la columna de afinidad IgG-CH1 CaptureSelect® fueron extremadamente bajas, lo que indica que la doble mutación de S40T, T47S fue suficiente para anular la unión de IGHG1 a este reactivo de afinidad.

Ejemplo 4. Generación y purificación de un anticuerpo biespecífico anti-IL17 X anti-CD3

Se encontró que dos anticuerpos conocidos del isotipo IgG1 humano, uno contra la IL-17 y uno contra la proteína CD3, tenían cadenas ligeras que diferían en un solo aminoácido. Los experimentos de coexpresión revelaron que la cadena ligera del anticuerpo anti-IL-17 podría reemplazarse con la cadena ligera del anticuerpo anti-CD3 y aun así mantener una unión de alta afinidad a IL-17, lo que hace posible producir un anticuerpo biespecífico. utilizando la cadena pesada anti-IL17, la cadena pesada anti-CD3 y la misma cadena ligera. De acuerdo con lo anterior, la cadena pesada del anticuerpo anti-IL17 se modificó a la forma M2 (es decir, las modificaciones CH1 S40T y T47S, por numeración de exones IMGT®).

Además, para facilitar la purificación del anticuerpo biespecífico, se introdujo la mutación H435R en el dominio CH3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-CD3 para interrumpir la unión al reactivo de afinidad de la proteína A (Figura 9). Basado en el artículo de Natsume et al. (Cancer Res 2008; 68: 3863-38 72) que diseñaron la parte C-terminal del dominio CH3 de la región IgG3-Fc para introducir la unión de IgG3 a la proteína A, los residuos C-terminales del dominio CH3 de IgG3 se introdujeron en humanos IgG1. Solo dos residuos difieren entre IgG1 e IgG3 en este parte del dominio CH3, que corresponde a los residuos His435 y Tyr436 (que son residuos Arg y Phe en IgG3, respectivamente). Después de la mutagénesis dirigida, la mutación H435R demostró ser suficiente para anular la unión a la proteína A. Por lo tanto, las cadenas pesadas anti-CD3 y anti-IL-17 se coexpresaron con la misma cadena ligera

5 en las células 293, y el anticuerpo biespecífico se purificó del sobrenadante usando purificación asimétrica. Se realizó una primera purificación con la resina de proteína A para capturar el anticuerpo biespecífico y el anticuerpo monoespecífico anti-IL17. Luego, se usó una segunda purificación con la columna de afinidad IgG-CH1 CaptureSelect® para capturar específicamente el anticuerpo biespecífico (Figura 10). Finalmente, se llevaron a cabo experimentos ELISA para determinar la unión del anticuerpo contra CD3, IL-17 o acoplamiento conjunto tanto de CD3 como de IL-17. Solamente, el anticuerpo biespecífico obtenido por purificación asimétrica fue capaz de enganchar tanto a IL-17 como a CD3 cuando se comparó con los anticuerpos monoespecíficos (Figura 11-13).

10 Ejemplo 5. Unión de anticuerpos que contienen dominios CH1 mutados al ligando de la resina de afinidad IgG-CH1 CaptureSelect® por resonancia de plasmón de superficie

15 La interacción de los dominios CH1 modificados y no modificados que llevan IgG se caracterizó utilizando resonancia de Plasmón de superficie en el instrumento Biacore 2000. El ligando biotinilado de la resina de afinidad IgG-CH1 CaptureSelect® (BAC BV) se inmovilizó en un chip CM5 recubierto con estreptavidina (GE Healthcare). Se inyectaron M2, M3, M2ST e IgG1 no modificada en la superficie y se registró el sensograma (FIG. 14). Se puede observar una interacción clara entre la IgG que contiene un dominio CH1 no modificado y el ligando de la resina de afinidad IgG-CH1 CaptureSelect®, con una velocidad de desactivación muy lenta. En contraste, las mutaciones dobles y triples presentes en M2 y M3 eliminan completamente esta interacción. La mutación única S40T conduce a una inhibición parcial de la interacción.

20 Otras realizaciones

25 Aunque la invención se ha descrito junto con la descripción detallada de la misma, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que se define por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un anticuerpo biespecífico aislado que comprende:

- 5 a) obtener una secuencia de ácido nucleico que codifica una primera cadena pesada de inmunoglobulina que comprende una primera región variable que se une a un primer epítipo, en el que la primera cadena pesada de inmunoglobulina comprende un dominio constante de isotipo IgG1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, un dominio constante de isotipo IgG2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, un dominio constante de isotipo IgG3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, o un dominio constante de isotipo IgG4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4;
- 10 b) obtener una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica una segunda cadena pesada de inmunoglobulina que comprende una segunda región variable que se une a un segundo epítipo, en el que la segunda cadena pesada de inmunoglobulina comprende un dominio constante de isotipos IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 que comprende una modificación en su dominio CH1 que erradica o reduce la unión a un reactivo de afinidad que se dirige al dominio CH1 humano IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, en el que el dominio constante de isotipo IgG1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15, el dominio constante de isotipo IgG2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16, el dominio constante de isotipo IgG3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17, o el dominio constante de isotipo IgG4 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18;
- 15 c) obtener una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera de inmunoglobulina que se empareja con la primera y la segunda cadena pesada de inmunoglobulina;
- 20 d) introducción de la primera, segunda y tercera secuencias de ácido nucleico en una célula de mamífero in vitro;
- 25 e) permitir que la célula exprese un anticuerpo biespecífico; y
- f) aislar el anticuerpo biespecífico en función de la capacidad del anticuerpo biespecífico para unirse al reactivo de afinidad que se dirige a los dominios de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanos.
- 30 2. El método de la reivindicación 1, en el que el primer dominio CH1 del anticuerpo biespecífico, el segundo dominio CH1 o ambos, el primer y el segundo dominio CH1 son no inmunogénicos o sustancialmente no inmunogénicos en un ser humano.
- 35 3. El método de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo biespecífico se aísla en un soporte sólido que comprende un reactivo de afinidad que se dirige al dominio CH1 de las IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas.
4. El método de la reivindicación 3, en el que el soporte sólido comprende un reactivo de afinidad que se dirige al dominio CH1 humano de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, y el anticuerpo biespecífico se aísla empleando un gradiente de pH.
- 40 5. El método de la reivindicación 4, en el que el gradiente de pH es un gradiente escalonado que comprende una o más etapas de pH entre pH 3 y pH 5.
- 45 6. El método de la reivindicación 1, en el que la primera cadena pesada de inmunoglobulina comprende una mutación H435R que altera sus propiedades de unión a la proteína A.
7. Un método para aislar un anticuerpo biespecífico, que comprende aislar de una célula alterada o una mezcla de anticuerpos, un anticuerpo biespecífico que tiene dominios CH1 modificados diferencialmente IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, en donde los dominios CH1 modificados diferencialmente no son inmunogénicos o sustancialmente no inmunogénicos en un ser humano, y en donde la modificación resulta en un anticuerpo biespecífico con una región constante heterodimérica de cadena pesada cuyos monómeros tienen una afinidad diferencial por el reactivo de afinidad que se dirige a los dominios humanos CH1 IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, en el que un monómero del heterodímero pesado la región constante de la cadena es una IgG1 humana y el otro monómero de la región constante de la cadena pesada heterodimérica es una IgG1 humana modificada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15 y el anticuerpo biespecífico se aísla de la célula alterada o la mezcla en función de su afinidad por el reactivo de afinidad que se dirige a los dominios CH1 humanos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.
- 50 8. El método de la reivindicación 7, en el que la primera cadena pesada de inmunoglobulina comprende una mutación H435R que altera sus propiedades de unión a la proteína A.
- 55 60

FIGURA 1

especies	Mab	Isotipo	especificidad
humano	NI 0001	IgG1 humanizado	+++
	NI 0701	IgG1	+++
hámster	HM 79	IgG	+++
ratón	W6-32	IgG2a	-
	IV.3	IgG2b	-
rata	GK 1.5	IgG2b	-
	MAB 35	IgG1	-
	1F7	IgG2a	-
	25F10	IgG1	-

FIGURA 2

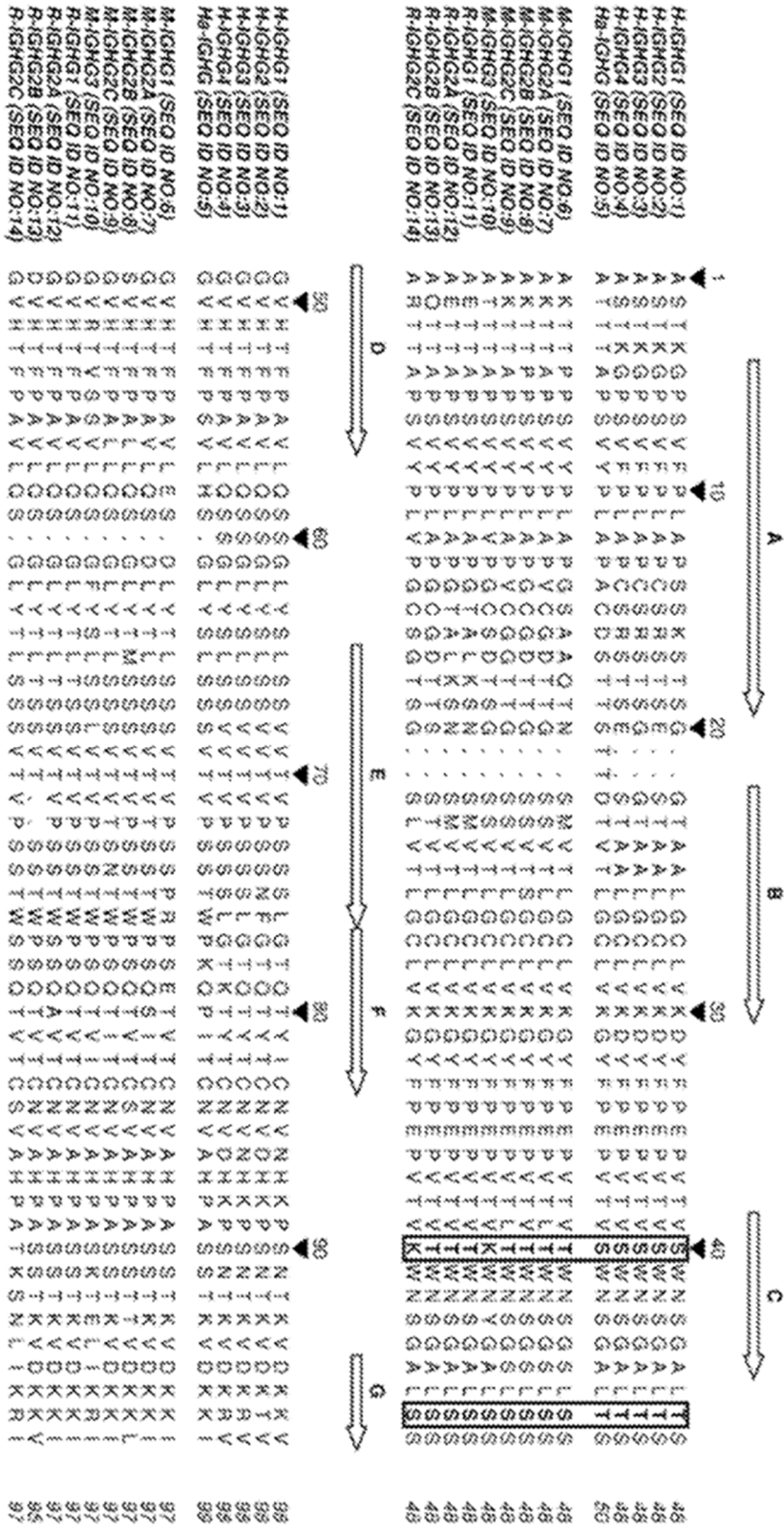


FIGURA 3

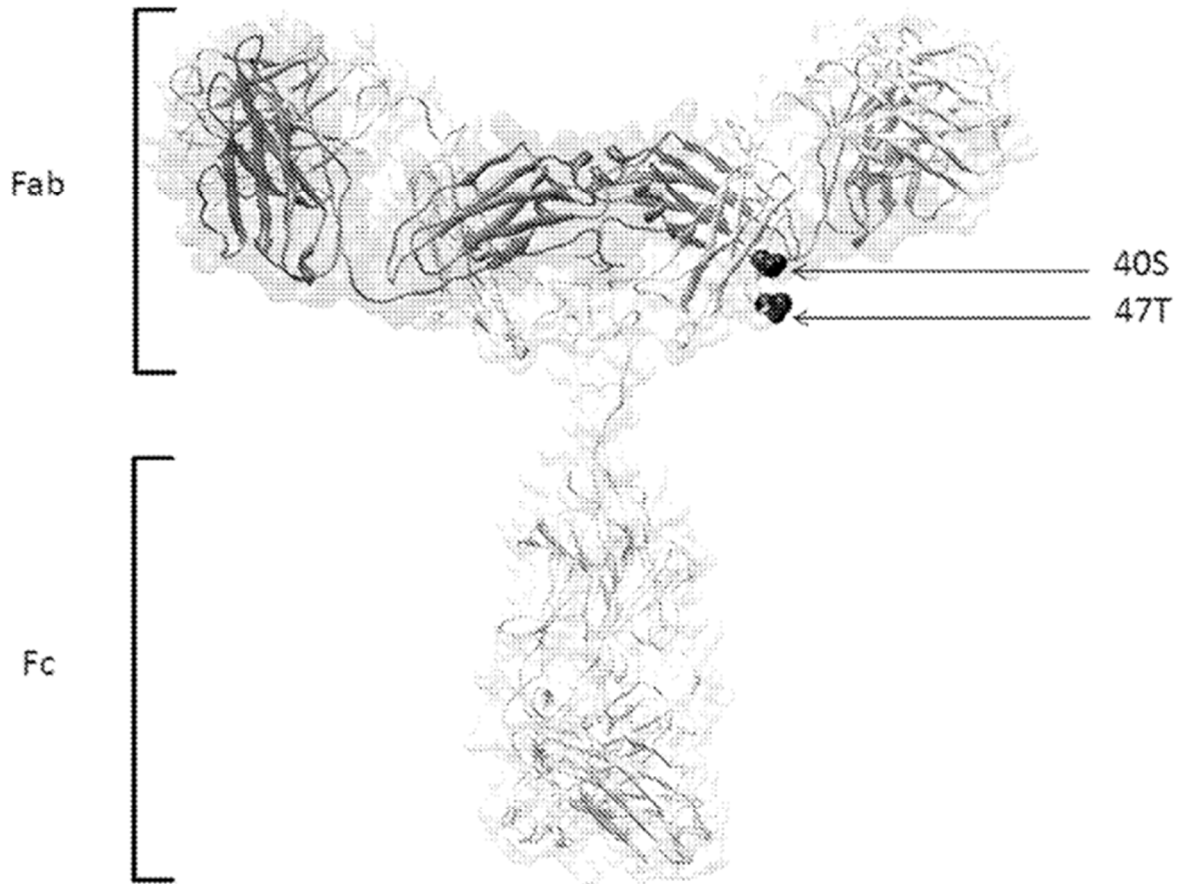


FIGURA 4

Mutante :	Mutación(es)
M2	40 : S-->T 47 : T -->S
M2ST	40 : S-->T
M2TS	47 : T -->S
M3	40 : S-->T 45 : A-->S 47 : T -->S

FIGURA 5

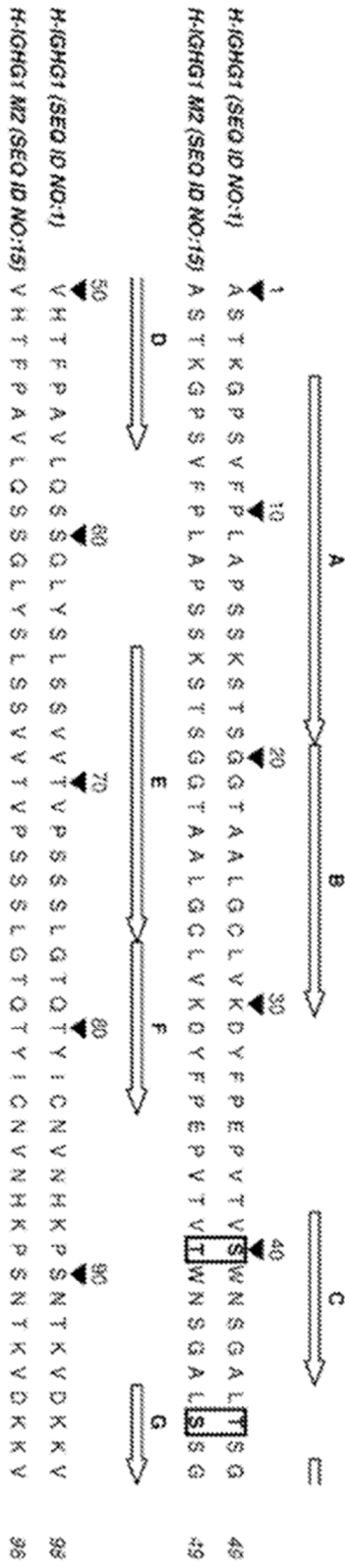


FIGURA 6

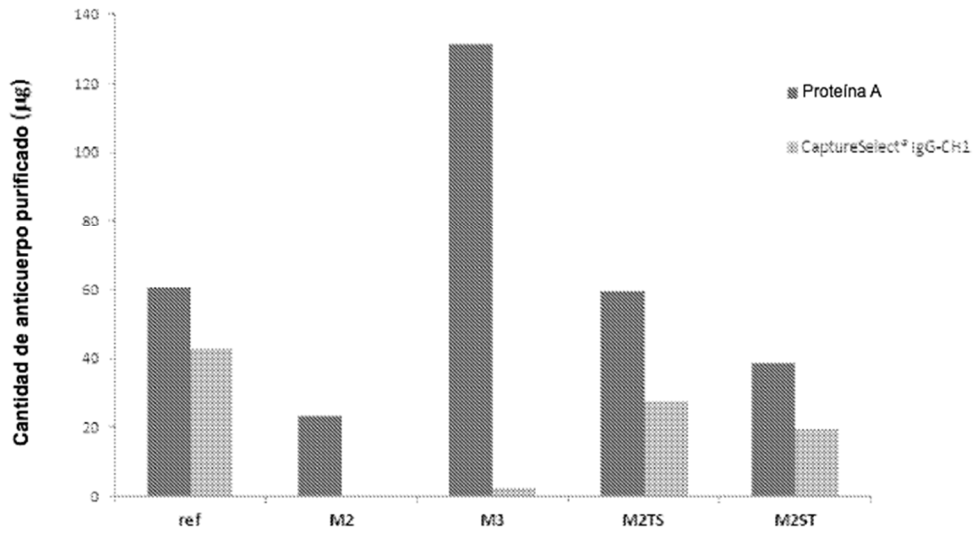


FIGURA 7

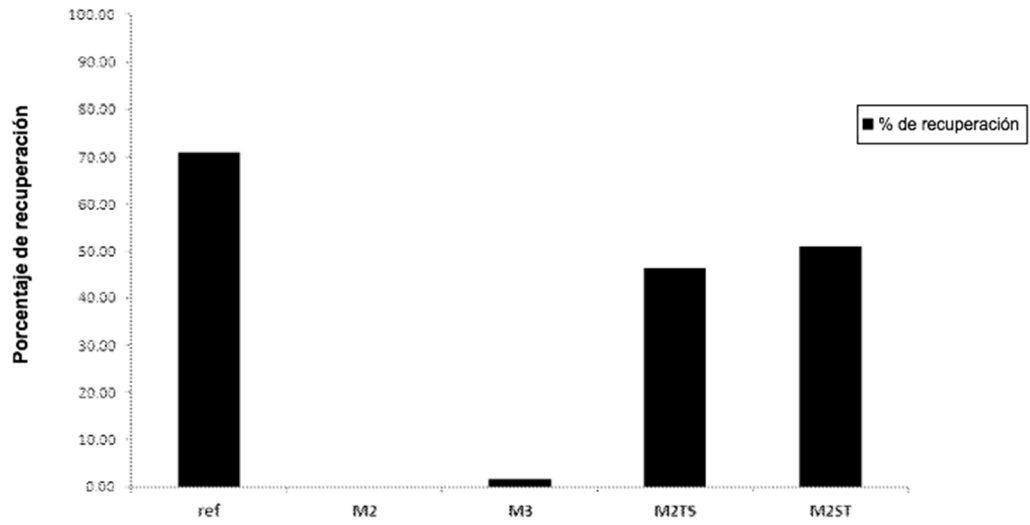


FIGURA 8

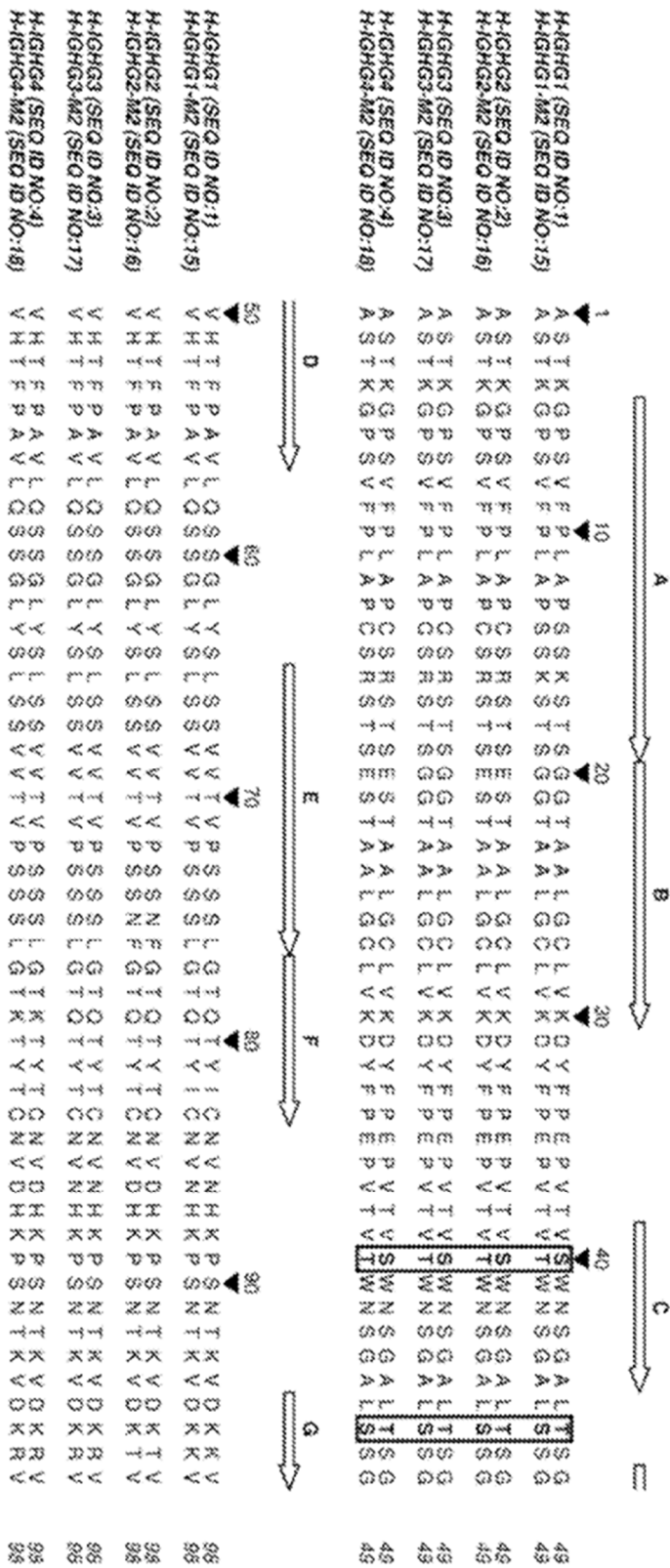


FIGURA 9

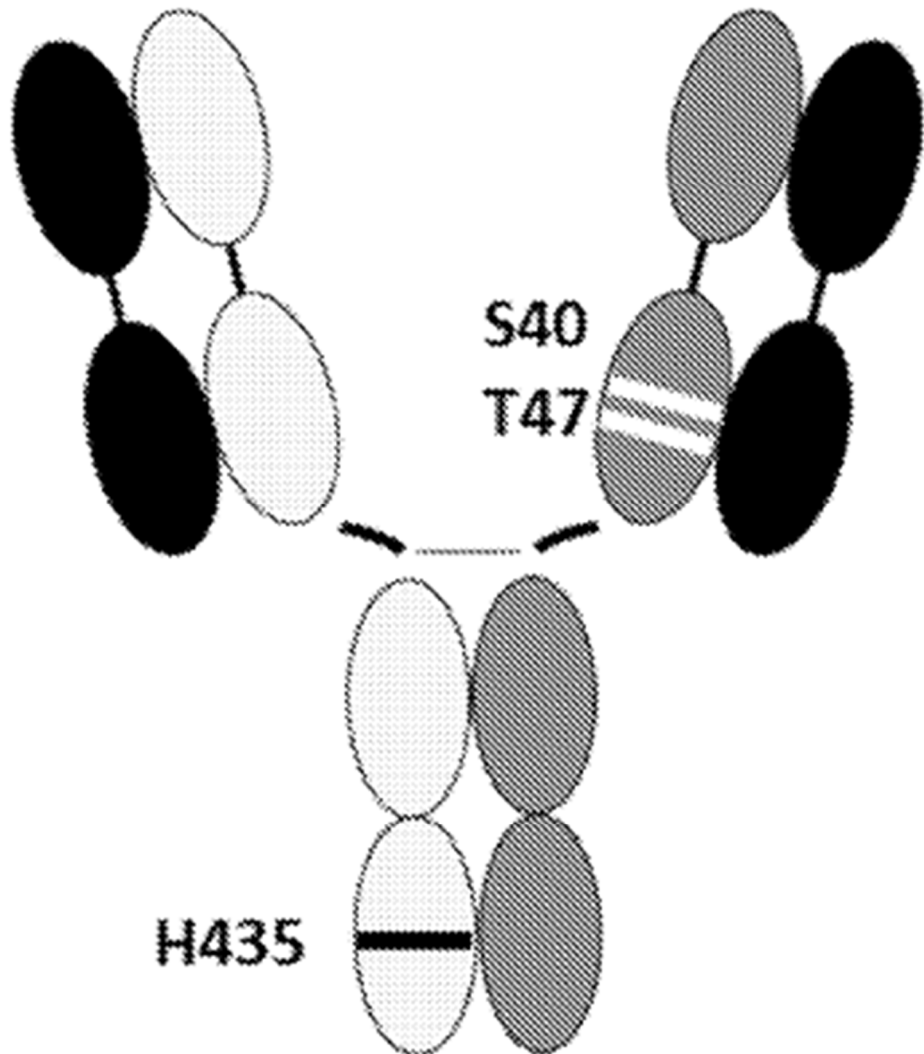


FIGURA 10

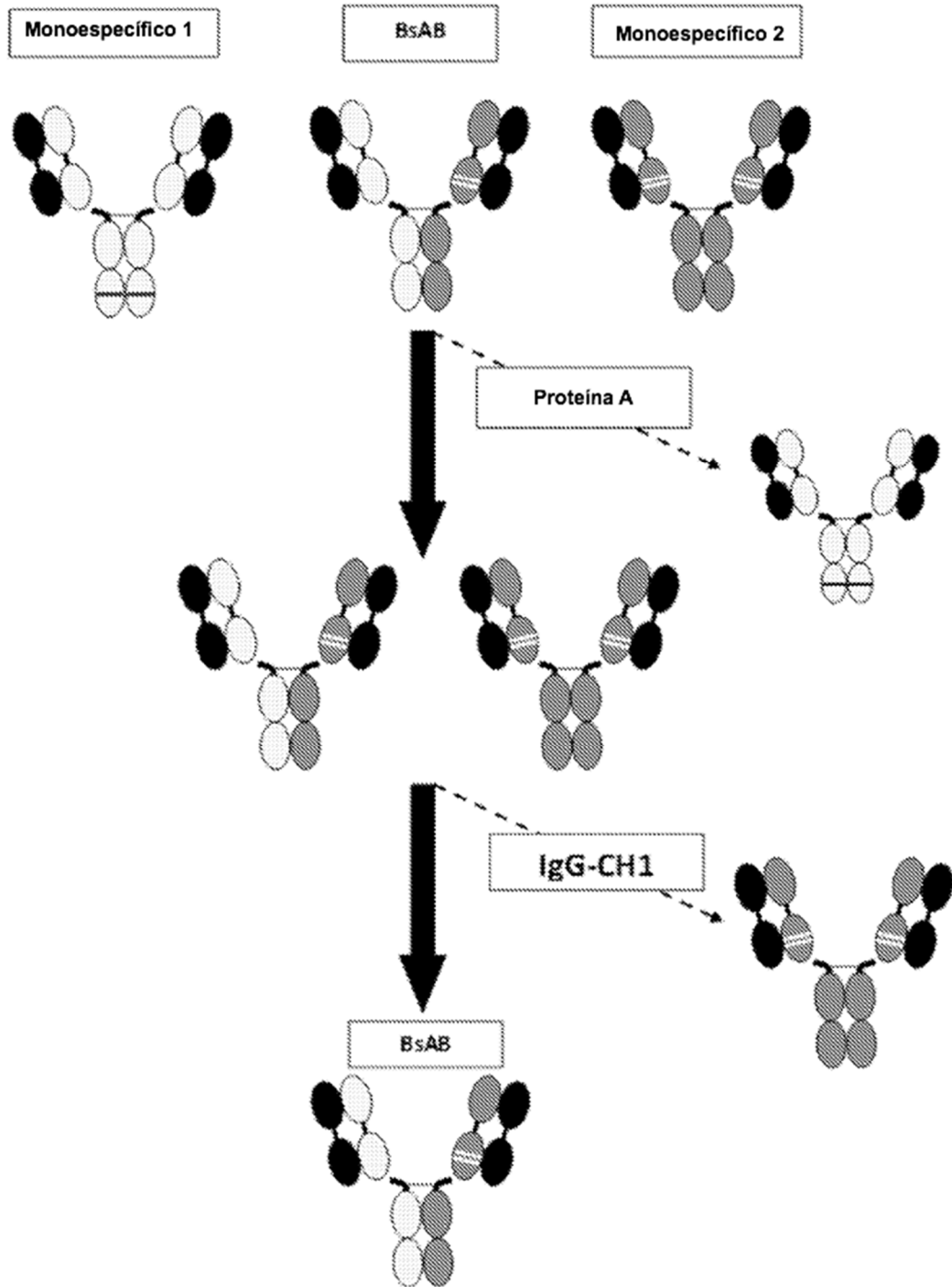


FIGURA 11

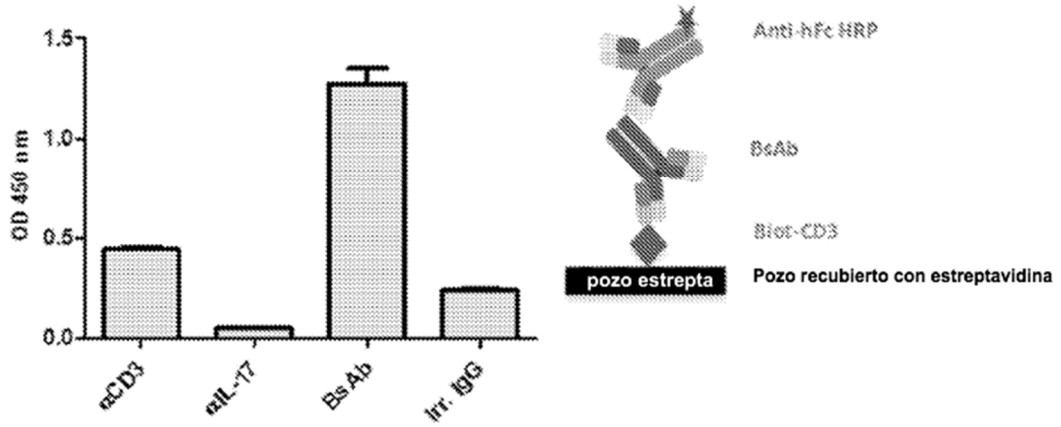


FIGURA 12

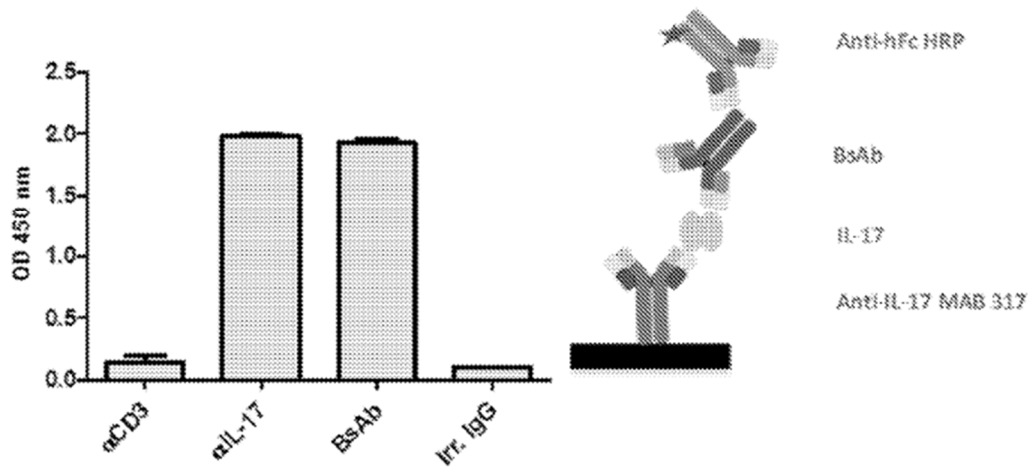


FIGURA 13

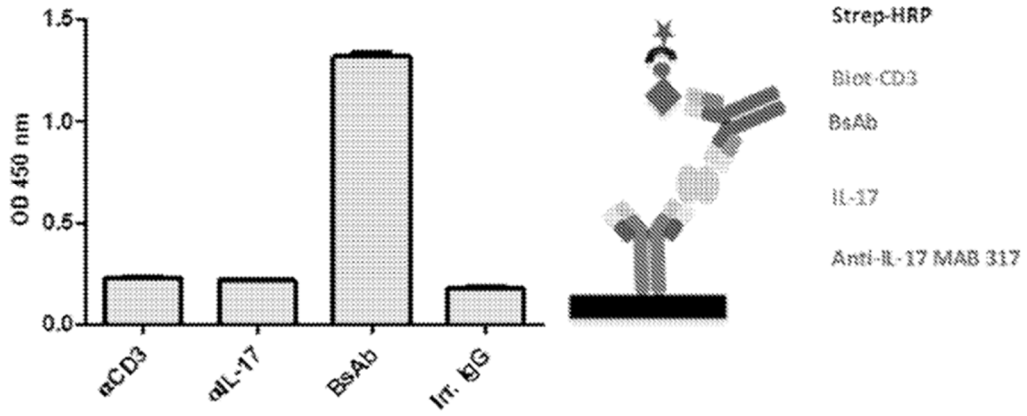


FIGURA 14

