

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 739 808**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.10.2012 PCT/EP2012/071294**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **02.05.2013 WO13060867**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2012 E 12783931 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019 EP 2771364**

(54) Título: **Producción de proteínas heterodiméricas**

(30) Prioridad:

27.10.2011 DK 201100826
27.10.2011 US 201161552272 P

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

04.02.2020

(73) Titular/es:

GENMAB A/S (100.0%)
Kalvebod Brygge 43
1560 Copenhagen V, DK

(72) Inventor/es:

GRAMER, MICHAEL-;
KUNDU, AMITAVA;
VAN DEN BREMER, EWALD T.J.;
VAN KAMPEN, MURIEL;
PRIEM, PATRICK;
LABRIJN, ARAN FRANK;
MEESTERS, JOYCE, I.;
NEIJSEN, JOOST J.;
SCHUURMAN, JANINE;
PARREN, PAUL;
VAN BERKEL, PATRICK;
VOS, WERNER L. y
GERRITSEN, ARNOUT

(74) Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 739 808 T3

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

DESCRIPCIÓN

Producción de proteínas heterodiméricas

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método *in vitro* para la producción de un anticuerpo biespecífico de longitud completa que comprende una primera etapa de incubar los primeros y segundos anticuerpos de longitud completa en condiciones reductoras y una segunda etapa de someter la composición obtenida de la primera etapa a 10 condiciones oxidantes. El método de la presente invención es particularmente adecuado para la producción a gran escala de anticuerpos biespecíficos de longitud completa.

Antecedentes de la invención

15 Los anticuerpos monoclonales se han convertido en los últimos años en moléculas terapéuticas exitosas, En particular para el tratamiento del cáncer. Los anticuerpos biespecíficos pueden además aumentar la potencia y la eficacia de las terapias con anticuerpos monoclonales, por ejemplo, podrían usarse para dirigir un fármaco o compuesto tóxico a las células diana, para redirigir los mecanismos efectores a sitios asociados con enfermedades o para aumentar la especificidad de las células tumorales, por ejemplo, uniéndose a una combinación de moléculas 20 diana que se encuentra exclusivamente en las células tumorales. Adicionalmente, al combinar la especificidad de dos anticuerpos monoclonales en uno, los anticuerpos biespecíficos podrían potencialmente comprometer una mayor variedad de mecanismos de acción c. q.

25 Chames y Baty (2009) Curr Opin Drug Disc Dev 12: 276. han revisado recientemente diferentes formatos y usos de anticuerpos biespecíficos. Uno de los principales obstáculos en el desarrollo de anticuerpos biespecíficos ha sido la dificultad de producir el material en calidad y cantidad suficientes mediante las tecnologías tradicionales, tales como los métodos de hibridoma híbrido y de conjugación química (Marvin y Zhu (2005) Acta Pharmacol Sin 26:649). La coexpresión en una célula huésped de dos anticuerpos, que consiste en diferentes cadenas pesadas y ligeras, conduce a una mezcla de posibles productos de anticuerpos además del anticuerpo biespecífico deseado.

30 Se han descrito varias estrategias para favorecer la formación de un producto heterodimérico, es decir, biespecífico tras la coexpresión de diferentes construcciones de anticuerpos.

35 Lindhofer et al. (1995 J Immunol 155: 219) desvelan el apareamiento preferencial de cadenas pesadas/ligeras con restricción de especie en cuadromas de rata/ratón.

40 Una técnica para la formación de anticuerpos biespecíficos es la estrategia denominada "botón en ojal" (patente de EE. UU. 5.731.168). El documento EP1870459 (Chugai) y el documento WO 2009089004 (Amgen) describen otras estrategias para favorecer la formación de heterodímeros con la coexpresión de diferentes dominios de anticuerpos 45 en una célula huésped. En estos métodos, uno o más restos que forman el dominio constante de cadena pesada 3 (CH3), las interfaces CH3-CH3 en ambos dominios CH3 se reemplazan con un aminoácido cargado, de modo que la formación de homodímeros es desfavorable electrostáticamente y la heterodimerización es electrostáticamente favorable. El documento WO2007110205 (Merck) describe otra estrategia más, en la que las diferencias entre los dominios CH3 de IgA e IgG se explotan para promover la heterodimerización.

45 Dall'Acqua et al. (1998 Biochemistry 37: 9266) identificaron cinco restos de aminoácidos energéticamente clave (366, 368, 405, 407 y 409) que están implicados en el contacto CH3-CH3 en la interfaz de un homodímero CH3.

50 El documento WO 2008119353 (Genmab) describe un método *ex vivo* para la generación de un anticuerpo.

55 El documento WO 11/131746 (Genmab) desvela proteínas que contienen Fc de anticuerpos heterodiméricos y métodos para su producción.

60 La presente invención se refiere a un método para la producción de anticuerpos biespecíficos de longitud completa, tales como anticuerpos biespecíficos IgG1 estables, en el que dicho método es particularmente adecuado para la producción a gran escala de anticuerpos biespecíficos de longitud completa estables en los que los enlaces disulfuro se reoxidan. Mediante la introducción de mutaciones asimétricas en los dominios CH3 de los homodímeros, la reacción de intercambio del brazo Fab puede ser forzada a ser direccional debido a la complementariedad de los dominios CH3 y, por lo tanto, producir anticuerpos biespecíficos de longitud completa altamente estables.

Sumario de la invención

65 La presente invención se refiere a un método *in vitro* para la producción de un anticuerpo biespecífico de longitud completa que comprende las siguientes etapas:

- a) incubar un primer anticuerpo de longitud completa con un segundo anticuerpo de longitud completa en

condiciones reductoras suficientes para permitir la reducción de los enlaces disulfuro intracatenarios en la región bisagra, y en el que la región CH3 de dicho primer anticuerpo de longitud completa es la primera región CH3 y tiene un Arg en la posición 409, y la región CH3 de dicho segundo anticuerpo de longitud completa es una segunda región CH3 y tiene:

- 5 (i) un Asp, Glu, Gly, Asn, Arg, Ser, Thr, Val o Trp en la posición 368
 (ii) una Phe, His, Lys, Arg o Tyr en la posición 399;
 10 (iii) una Gly, Leu, Met o Trp en la posición 407 y una Lys en la posición 409, y en el que la primera CH3 tiene además un Tyr en la posición 407; o
 15 (iv) un aminoácido distinto de Phe, Arg o Gly en la posición 405 y tiene una Lys en la posición 409, y en el que la primera CH3 tiene además una Phe en la posición 405,

15 de tal manera que las secuencias de dichas primera y segunda regiones CH3 son diferentes y tales que la interacción heterodimérica entre dichas primera y segunda regiones CH3 es más fuerte que cada una de las interacciones homodiméricas de dichas primera y segunda regiones CH3, en el que las posiciones de los aminoácidos están numeradas de acuerdo con el índice de la UE como se describe en Kabat, en el que dichos primer y segundo anticuerpos de longitud completa se unen a diferentes epítopos, en el que dichos primeros y segundos anticuerpos de longitud completa:

- 20 1) cada uno tiene una región Fc con una secuencia de aminoácidos que es de un isotipo IgG1;
 25 2) cada uno tiene una región Fc con una secuencia de aminoácidos que es de un isotipo IgG2;
 30 3) cada uno tiene una región Fc con una secuencia de aminoácidos que es de un isotipo IgG3; o
 35 4) cada uno tiene una región Fc con una secuencia de aminoácidos que es de un isotipo IgG4; y
 40 en el que dicho primer y segundo anticuerpos son anticuerpos humanizados o en el que dicho primer y segundo anticuerpos comprenden cada uno una cadena pesada de longitud completa de un anticuerpo humano; y además en el que la etapa a) comprende la incubación durante al menos 90 minutos a una temperatura de al menos 20 °C en presencia de 2-mercaptopropionilamina a una concentración de al menos 25 mM;

- 35 b) someter al menos 10 ml de la composición obtenida de la etapa a) en condiciones oxidantes suficientes para permitir la oxidación de las cisteínas en el anticuerpo biespecífico de longitud completa a enlaces disulfuro intracatenarios y
 40 c) obtener el anticuerpo biespecífico de longitud completa.

En cualquiera de los métodos *in vitro* de la invención, la etapa a) puede comprender añadir un agente quelante de metal, tal como EDTA, EGTA o ácido cítrico.

- 45 En cualquiera de los métodos *in vitro* de la invención, la etapa a) se puede realizar en condiciones reductoras con un potencial redox entre -150 y -600 mV, tal como entre -350 y -450 mV.

50 En cualquiera de los métodos *in vitro* de la invención, el primer y segundo anticuerpos de longitud completa pueden estar en un tampón, que comprende en el intervalo de 1-100 mM fosfato, tal como fosfato 1-50 mM o en el intervalo de 1-25 mM o en el intervalo de 5-20 mM. El tampón puede tener un pH en el intervalo de 4,5-8,5, tal como en el intervalo de 6,5 a 7,5.

55 En cualquiera de los métodos *in vitro* de la invención, el tampón se puede seleccionar del grupo que consiste en a) fosfato de sodio 8,1 mM (Na₂HPO₄·7H₂O), fosfato potásico (KH₂PO₄) 1,5 mM, cloruro sódico (NaCl) 138 mM, cloruro de potasio (KCl) 2,7 mM, pH 5,0; b) fosfato de sodio 8,1 mM (Na₂HPO₄·7H₂O), fosfato potásico (KH₂PO₄) 1,5 mM, cloruro sódico (NaCl) 138 mM, cloruro potásico (KCl) 2,7 mM, pH 7,0; 3) Tris-HCl 20 mM, pH 7,8

En cualquiera de los métodos *in vitro* de la invención, la etapa b) puede comprender un pH en el intervalo de 6-8,5.

- 60 En cualquiera de los métodos *in vitro* de la invención, la etapa b) puede comprender un potencial redox de al menos -300 mV.

En cualquiera de los métodos *in vitro* de la invención, las condiciones oxidantes en la etapa b) pueden comprender la presencia de al menos 0,05 mM de oxígeno.

- 65 En cualquiera de los métodos *in vitro* de la invención, las condiciones oxidantes en la etapa b) pueden comprender la

adicción de oxígeno, en el que la adición de oxígeno se realiza mediante los métodos que comprenden: mecánicamente, por ejemplo, mediante agitación, remoción, aumentando la presión o creando flujo o rociando con oxígeno o aire.

5 En cualquiera de los métodos *in vitro* de la invención, las condiciones oxidantes en la etapa b) comprenden un agente oxidante, tal como, por ejemplo, ácido deshidroascórbico (dhAA).

10 En cualquiera de los métodos *in vitro* de la invención, la etapa b) puede comprender someter la composición obtenida de la etapa a) a cromatografía, tal como, por ejemplo, cromatografía en columna o a filtración, preferentemente diafiltración, tal como filtración de flujo tangencial (TFF) o filtración de flujo normal (NFF).

15 En cualquiera de los métodos *in vitro* de la invención, la diafiltración se puede realizar haciendo circular la composición a través de un cartucho de fibra hueca que comprende un valor de corte en el intervalo de 10-50 kDa, y con un área de superficie en el intervalo de 0,05-1 m² con una presión de entrada del cartucho en el intervalo de 70-280 kPa, hasta que hayan tenido lugar de uno a siete volúmenes de intercambio de tampones.

20 En cualquiera de los métodos *in vitro* de la invención, la concentración de anticuerpo biespecífico de longitud completa en la composición obtenida de la etapa a) puede estar en el intervalo de 1-100 g/l.

25 En cualquiera de los métodos *in vitro* de la invención, las condiciones oxidantes en la etapa b) comprenden añadir un ion metálico, preferentemente, un ion metálico seleccionado del grupo que consiste en: cobre, manganeso, magnesio, hierro, níquel y cobalto, en el que la concentración del ion metálico está, preferentemente, en el intervalo de 0,1 a 100 µM.

30 En cualquiera de los métodos *in vitro* de la invención, la proporción de primer a segundo anticuerpo de longitud completa en la etapa a) puede estar en el intervalo de 1:1,01 a 1:2.

35 En cualquiera de los métodos *in vitro* de la invención, el primer anticuerpo de longitud completa o el segundo anticuerpo de longitud completa pueden no ser capaces de unirse a la proteína A y/o la proteína G.

40 En cualquiera de los métodos *in vitro* de la invención, el primer y segundo anticuerpos de longitud completa pueden comprender diferentes cadenas ligeras.

45 En cualquiera de los métodos *in vitro* de la invención, la concentración total del primer anticuerpo de longitud completa y el segundo anticuerpo de longitud completa en la etapa a) es de al menos 0,25 mg/ml.

50 En cualquiera de los métodos *in vitro* de la invención, dicho primer anticuerpo de longitud completa puede comprender un Phe en la posición 405 y un Arg en la posición 409 y dicho segundo anticuerpo de longitud completa puede comprender un Leu en la posición 405 y un Lys en la posición 409.

Breve descripción de los dibujos

55 **Figura 1: Generación de anticuerpos biespecíficos por intercambio entre especies del brazo Fab.** La generación de anticuerpos biespecíficos después del intercambio del brazo Fab *in vitro* inducido por GSH entre los anticuerpos IgG4 anti-EGFR (2F8) y CD20 (7D8) indicados se determinó mediante un ELISA. Se analizó una serie de concentraciones (anticuerpo total) de 0-1 µg/ml en el ELISA. La unión biespecífica fue mayor después del intercambio del brazo Fab entre los anticuerpos IgG4 de rhesus (Rh) y humanos (Hu) que entre dos anticuerpos de la misma especie.

60 **Figura 2: Alineación de las secuencias de aminoácidos de la bisagra central (es decir, la secuencia CPPC en IgG1 humana que incluye los dos restos de cisteína que forman potencialmente los enlaces disulfuro de los enlaces disulfuro dentro de la cadena pesada y los correspondientes restos en otros isotipos de mono rhesus y ser humano) y la interfaz CH3-CH3 de los isotipos de anticuerpos de ser humano y rhesus.**

65 **Figura 3: Generación de anticuerpos biespecíficos utilizando IgG1 humana mutante comprometida para el intercambio del brazo Fab.** La generación de anticuerpos biespecíficos mediante el intercambio del brazo Fab *in vitro* inducido por GSH entre el anticuerpo IgG4 CD20 (7D8) humano y los anticuerpos IgG1 EGFR (2F8) humanos indicados se determinó mediante un ELISA. El gráfico presentado muestra números promedio de tres experimentos de intercambio del brazo Fab independientes, en el que se utilizó una concentración de anticuerpo total de 1 µg/ml para el ELISA. La unión biespecífica fue mayor después del intercambio del brazo Fab entre IgG1-2F8-CPSC-ITL e IgG4-7D8 que entre dos anticuerpos IgG4. La combinación IgG4-7D8 con IgG1-2F8, IgG1-2F8-CPSC o IgG1-2F8-ITL no dio como resultado anticuerpos biespecíficos en las condiciones utilizadas.

70 **Figura 4: Generación de anticuerpos biespecíficos mediante el intercambio *in vivo* de brazo Fab de anticuerpos IgG4 humanos e IgG1 mutantes.** La generación de anticuerpos biespecíficos mediante el intercambio *in vivo* del brazo Fab en ratones inmunodeficientes entre IgG4 CD20 (7D8) humano y los anticuerpos mutantes de EGFR (2F8) IgG1 e IgG4 humanos indicados se determinó mediante un ELISA. El gráfico presentado muestra números promedio (n = 4). La reactividad biespecífica se presenta como la concentración de

anticuerpos biespecíficos en relación con la concentración total de IgG (porcentaje). La IgG4 humana con una bisagra estabilizada (CPPC) o mutación R409K en el dominio CH3 no puede participar en el intercambio del brazo Fab. La IgG1 con una secuencia de CPSC en la bisagra y una mutación K409R en el dominio CH3 se activa para el intercambio del brazo Fab. (*) Unión biespecífica para las mezclas que contienen IgG1-2F8, IgG4-2F8-CPPC o IgG4-2F8-R409K estuvo por debajo del límite de detección y, por lo tanto, se estableció arbitrariamente en cero.

Figura 5: Generación de anticuerpos biespecíficos utilizando 2-mercaptopropionato de etilo HCl-(2-MEA) inducida por el intercambio del brazo Fab entre los anticuerpos humanos IgG1 e IgG4. La generación de anticuerpos biespecíficos después del intercambio del brazo Fab *in vitro* inducido por 2-MEA entre los anticuerpos humanos indicados de EGFR (2F8) y CD20 (7D8) se determinó mediante un ELISA. Se ensayó una serie de concentraciones de 2-MEA 0-40 mM. El gráfico presentado muestra el resultado del ELISA en el que se utilizó una concentración total de anticuerpos de 20 µg/ml. 2-MEA indujo con eficiencia el intercambio del brazo Fab, también entre anticuerpos que contienen una bisagra estabilizada (CPPC). Respecto a los dominios CH3, una combinación de IgG4 humana x IgG1 humana con la mutación triple T350I-K370T-F405L, dio lugar a niveles más altos de reactividad biespecífica en comparación con dos anticuerpos IgG4 de tipo salvaje.

Figura 6: Generación de anticuerpos biespecíficos utilizando el intercambio del brazo Fab inducido por 2-MEA entre los anticuerpos IgG1 e IgG4 humanos.

La generación de anticuerpos biespecíficos después del intercambio del brazo Fab *in vitro* inducido por 2-MEA entre los anticuerpos EGFR (2F8) y CD20 (7D8) humanos se determinaron mediante espectrometría de masas para todas las muestras de la serie de concentración de 2-MEA 0-40 mM.

(A) Se muestran ejemplos representativos de los perfiles de espectrometría de masas para muestras de reacciones de intercambio del brazo Fab entre IgG1 -2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC con 2-MEA 0 mM, 7 mM y 40 mM. (B) Despues de la cuantificación de los datos de espectrometría de masas, el porcentaje de anticuerpo biespecífico se calculó y se representó frente a la concentración de 2-MEA en la reacción de intercambio del brazo Fab. IgG4-2F8 x IgG4-7D8 dio como resultado un máximo de aproximadamente 50 % de anticuerpo biespecífico. IgG1 -2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC dio como resultado un máximo de aproximadamente un 95 % de anticuerpo biespecífico.

Figura 7: Análisis de estabilidad de anticuerpos biespecíficos heterodiméricos obtenidos por intercambio del brazo Fab inducido por 2-MEA. La estabilidad de las muestras biespecíficas generadas por el intercambio del brazo Fab inducido por 2-MEA combinando IgG1 -2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC (A) o IgG4-2F8 x IgG4-7D8 (B) se probó mediante la medición de la unión biespecífica de EGFR/CD20 en un ELISA después de una reacción de intercambio del brazo Fab inducido por GSH en presencia de las concentraciones indicadas de IgG4 irrelevante. La unión biespecífica se presenta en relación con la unión biespecífica del material de partida (control), que se fijó en 100 %. (A) Se conservó la unión biespecífica del producto biespecífico inducido por 2-MEA derivado de IgG1 -2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC, lo que indica un producto estable que no participó en el intercambio del brazo Fab en condiciones de GSH. (B) La unión a EGFR/CD20 biespecífica del producto biespecífico inducido por 2-MEA derivado de IgG4-2F8 x IgG4-7D8 se redujo, lo que indica que el producto participó en el intercambio del brazo Fab con la IgG4 irrelevante en condiciones de GSH.

Figura 8: Velocidad de aclaramiento plasmático de un anticuerpo biespecífico heterodimérico generado por el intercambio del brazo Fab inducido por 2-MEA. Se injectó a tres grupos de ratones (3 ratones por grupo) los anticuerpos indicados: (1) 100 µg de anticuerpo biespecífico, generado mediante intercambio del brazo Fab inducido por 2-MEA *in vitro* entre IgG1 -2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC; (2) 100 µg de anticuerpo biespecífico + 1.000 µg de IgG4 irrelevante; (3) 50 µg de IgG1 -2F8-ITL + 50 µg de IgG4-7D8-CPPC. (A) Concentraciones totales de anticuerpos en el tiempo, determinado mediante ELISA. Las curvas de las concentraciones plasmáticas totales de anticuerpos fueron las mismas para todos los anticuerpos. (B) Concentración de anticuerpos biespecíficos determinada mediante un ELISA. La biespecificidad del anticuerpo injectado fue la misma con y sin la adición de un exceso de IgG4 irrelevante. (*) La unión biespecífica para la mezcla de IgG1 -2F8-ITL + IgG4-7D8-CPPC estuvo por debajo del límite de detección y, por lo tanto, los símbolos correspondientes no se pudieron representar en este gráfico. Se muestran los valores medios de dos experimentos ELISA.

Figura 9: Pureza del anticuerpo biespecífico generado por el intercambio del brazo Fab entre IgG1-2F8 e IgG4-7D8-CPPC humanas. (A) La reducción de SDS-PAGE (a) muestra bandas de las cadenas pesada y ligera tanto para la muestra biespecífica como para la muestra de control de IgG1. El SDS-PAGE no reductor (b) muestra IgG intacta. (B) Los resultados máximos del análisis de HP-SEC muestran que > 98 % de la muestra biespecífica es homogénea y prácticamente no se detectaron agregados de anticuerpos. (C) La espectrometría de masas muestra que el intercambio del brazo Fab dio como resultado un producto biespecífico de aproximadamente el 100 %.

Figura 10: Comparación entre triple mutante (ITL), dobles mutante (IT, IL, TL) e IgG1-2F8 humana mutante única (L) en la generación de anticuerpos biespecíficos por intercambio del brazo Fab con IgG4-7D8 humana. La generación de anticuerpos biespecíficos después del intercambio del brazo Fab *in vitro* inducido por 2-MEA entre los mutantes triple y doble de IgG1-2F8 humanos y la IgG4-7D8 de tipo salvaje con una bisagra CPSC (A) o una IgG4-7D8-CPPC mutante con una bisagra estabilizada (B) o el mutante único IgG1-2F8-F405L e IgG4-7D8 con una CPSC de tipo salvaje o una bisagra de CPPC estabilizada (C), se determinó mediante un ELISA. Se analizó una serie de concentración (anticuerpo total) de 0-20 µg/ml o 0-10 µg/ml en el ELISA para los experimentos, incluyendo los mutantes dobles y simples, respectivamente. Las combinaciones de IgG4 con los mutantes dobles IgG1 -2F8-IL y -TL dan como resultado una unión biespecífica de EGFR/CD20 similar a la triple

mutante IgG1-ITL. Las combinaciones con la IgG 1-2F8-ITL no dan como resultado un producto biespecífico. Las combinaciones de IgG4 de tipo salvaje e IgG4 con una bisagra estabilizada con el mutante único IgG1-2F8-F405L dan como resultado una unión biespecífica a EGFR/CD20.

Figura 11: Generación de anticuerpos biespecíficos utilizando intercambio del brazo Fab inducido por 2-MEA a diferentes temperaturas. La generación de anticuerpos biespecíficos mediante la combinación de los anticuerpos EGFR (2F8) y CD20 (7D8) humanos indicados en las reacciones de intercambio del brazo Fab *in vitro* inducido por 2-MEA a 0 °C, 20 °C y 37 °C se siguió en el tiempo mediante un ELISA. La inducción de la unión biespecífica fue más eficiente a 37 °C, y más lenta a 20 °C. A 0 °C, no se midió ninguna generación de unión biespecífica.

Figura 12: Generación de anticuerpos biespecíficos por intercambio del brazo Fab *in vitro* inducido por diferentes agentes reductores. Se utilizó un ELISA para medir la generación de anticuerpos biespecíficos mediante la combinación de IgG 1-2F8-ITL humana e IgG4-7D8-CPPC en una reacción de reducción con series de concentración de los agentes reductores indicados. La unión biespecífica se midió después de las reacciones con DTT (máximo obtenido a DTT 2,5 mM) y 2-MEA (máximo obtenido a 2-MEA 25 mM), pero no con GSH. (*) Se excluyeron los datos para concentraciones de GSH > 10 mM debido a la formación de agregados de anticuerpos.

Figura 13: Intercambio del brazo Fab inducido por 2-MEA entre los mutantes IgG1-2F8-ITL e IgG1-7D8-K409X. La generación de anticuerpos biespecíficos después del intercambio del brazo Fab *in vitro* inducido por 2-MEA entre IgG 1-2F8-ITL y los mutantes de IgG1-7D8-K409X indicados se determinó mediante un ELISA. **(A)** Se analizó una serie de concentraciones (anticuerpo total) de 0-20 µg/ml. El control positivo es un lote purificado de anticuerpo biespecífico, derivado de IgG 1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC. **(B)** El intercambio se presenta como una unión biespecífica a 20 µg/ml en relación con el control positivo (barra negra). Las barras gris oscuro representan la unión biespecífica entre la IgG4 control (IgG4-7D8 x IgG4-2F8), el control negativo (IgG1-2F8 x IgG1-7D8-K409R) y entre IgG 1-2F8-ITL e IgG4-7D8-CPPC. Las barras de color gris claro representan los resultados de las reacciones de intercambio del brazo Fab realizadas simultáneamente entre los mutantes de IgG1-7D8-K409X indicados e IgG 1-2F8-ITL.

Figura 14: La desglicosilación de anticuerpos no afecta a la generación de anticuerpos biespecíficos por el intercambio del brazo Fab inducido por 2-MEA. La generación de anticuerpos biespecíficos después del intercambio del brazo Fab *in vitro* inducido por 2-MEA entre los anticuerpos EGFR (2F8) y CD20 (7D8) indicados se determinó mediante un ELISA. El intercambio con los anticuerpos 7D8 se comparó con sus variantes desglicosiladas enzimáticamente. Se analizó una serie de concentraciones (anticuerpo total) de 0-20 µg/ml en el ELISA. Las reacciones de intercambio del brazo Fab que implican anticuerpos desglicosilados (desglic) mostraron curvas de unión biespecífica idénticas a las variantes glicosiladas de las que derivaron.

Figura 15: La capacidad para participar en el intercambio del brazo Fab se correlaciona con la fuerza de la interacción CH3-CH3. (A), (B) y (C) Generación de anticuerpos biespecíficos por intercambio del brazo Fab inducido por GSH entre las construcciones IgG1-2F8 e IgG1-7D8 (A) o IgG4-2F8 e IgG4-7D8 (B y C) con las mutaciones indicadas, presentada como unión biespecífica en un ELISA a lo largo del tiempo. La biespecificidad se presenta en relación con la IgG4-2F8 x IgG4-7D8 control después de 24 horas. **(D) y (E)** Relación entre la K_D aparente (Tabla 2) y la generación de anticuerpos biespecíficos después de 24 horas (Figuras 15A/B/C) para moléculas basadas en IgG1 (D) o basadas en IgG4 (E).

Figura 16: Alineación de secuencia del anticuerpo anti-EGFr 2F8 en una estructura de IgG1, IgG4 e IgG3 (parcial). Se representa la numeración de aminoácidos según Kabat y según el índice de la UE (ambos descritos en Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). 2F8-G1 se da en la SEQ ID NO: 10, 2F8-G3 (parcialmente) se da en la SEQ ID NO: 11 y 2F8-G4 se da en la SEQ ID NO: 12.

Figura 17: Generación de anticuerpos biespecíficos por intercambio del brazo Fab *in vitro* inducido por diferentes agentes reductores. Se utilizó un ELISA para medir la generación de anticuerpos biespecíficos combinando IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R humanas en una reacción de reducción con series de concentración de los agentes reductores indicados. Los valores de OD medidos se normalizaron con respecto a la señal de una muestra de control biespecífica derivada del intercambio del brazo Fab inducido por 2-MEA entre IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC, que se fijó en 100 %. La unión biespecífica máxima se midió después de las reacciones con DTT en el intervalo de concentración de 0,5-50 mM, 2-MEA en el intervalo de concentración de 25-50 mM y tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) en el intervalo de concentración de 0,5-5,0 mM, pero no con GSH. (*) Los datos para la concentración de GSH ≥ 25 mM se excluyeron debido a la formación de agregados de anticuerpos.

Figura 18: Generación de anticuerpos biespecíficos mediante el intercambio del brazo Fab inducido por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R humanas.

(A) La generación de anticuerpos biespecíficos después del intercambio del brazo Fab *in vitro* inducido por 2-MEA se determinó mediante un ELISA. El gráfico presentado muestra el resultado del ELISA en el que se utilizó una concentración total de anticuerpos de 20 µg/ml. 2-MEA indujo eficazmente el intercambio del brazo Fab entre IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R humanas. **(B)** La generación de anticuerpos biespecíficos después del intercambio del brazo Fab *in vitro* inducido por 2-MEA se determinó mediante espectrometría de masas para todas las muestras de la serie de concentración de 2-MEA 0-40 mM. Después de la cuantificación de los datos de espectrometría de masas, el porcentaje de anticuerpo biespecífico se calculó y se representó frente a la concentración de 2-MEA en la reacción de intercambio del brazo Fab. El intercambio del brazo Fab entre IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R dio como resultado ~ 100 % de anticuerpo biespecífico a la concentración más

alta de 2-MEA analizada, confirmando los datos de ELISA.

Figura 19: Pureza del anticuerpo biespecífico generado por el intercambio del brazo Fab entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R humanas. La espectrometría de masas muestra que el intercambio del brazo Fab dio como resultado un producto biespecífico de aproximadamente el 100 %.

Figura 20: Aclaramiento plasmático de un anticuerpo biespecífico generado por el intercambio del brazo Fab inducido por 2-MEA. A dos grupos de ratones (3 ratones por grupo) se inyectaron los anticuerpos indicados: (1) 100 µg de anticuerpo biespecífico, generado por el intercambio del brazo Fab *in vitro* inducido por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R; (2) 100 µg de anticuerpo biespecífico + 1.000 µg de IgG4 irrelevante (10 x IgG4). **(A)** Concentraciones totales de anticuerpos en el tiempo, determinado mediante ELISA. Las curvas de las concentraciones plasmáticas totales de anticuerpos fueron las mismas para todos los anticuerpos. **(B)** Concentración de anticuerpos biespecíficos determinada mediante un ELISA. La biespecificidad del anticuerpo inyectado fue la misma con y sin la adición de un exceso de IgG4 irrelevante.

Figura 21: Destrucción celular mediada por CDC de células que expresan CD20 por un anticuerpo biespecífico generado por intercambio del brazo Fab inducido por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R. Se usaron series de concentración de los anticuerpos indicados para probar su capacidad para mediar CDC en células Daudi **(A)** y Raji **(B)**. Ambas líneas celulares expresan CD20, pero no EGFR. La introducción del K409R en IgG1-7D8 no influyó en su capacidad para inducir CDC. El anticuerpo biespecífico derivado del intercambio del brazo Fab inducido por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R todavía era capaz de inducir CDC.

Figura 22: Destrucción celular mediada por ADCC de células que expresan EGFR por un anticuerpo biespecífico generado por intercambio del brazo Fab inducido por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R. Se usaron series de concentración de los anticuerpos indicados para probar su capacidad para mediar ADCC en células A431. IgG1-7D8 no puede unirse a las células A431 negativas para CD20 y, en consecuencia, no indujo ADCC. El anticuerpo IgG1-2F8 indujo ADCC, también después de la introducción de las mutaciones F405L en el dominio CH3. La función efectora de ADCC de IgG1-2F8-F405L se mantuvo en el formato biespecífico obtenido por intercambio del brazo Fab entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R.

Figura 23: Intercambio del brazo Fab inducido por 2-MEA entre mutantes IgG1-2F8-F405X e IgG1-7D8-K409R. La generación de anticuerpos biespecíficos después del intercambio del brazo Fab *in vitro* inducido por 2-MEA entre los mutantes IgG1-2F8-F405X e IgG1-7D8-K409R se determinó mediante un ELISA. **(A)** Se analizó una serie de concentración (anticuerpo total) de 0-20 µg/ml en el ELISA. El control positivo es un lote purificado de anticuerpo biespecífico, derivado de IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R. **(B)** El intercambio se presenta como unión biespecífica a una concentración de anticuerpo de 20 µg/ml en relación con el control positivo (barra negra). Las barras de color gris oscuro representan la unión biespecífica entre la IgG4 control (IgG4-7D8 x IgG4-2F8) y el control negativo (IgG1-2F8 x IgG1-7D8-K409R). Las barras de color gris claro representan los resultados de las reacciones de intercambio del brazo Fab realizadas simultáneamente entre los mutantes IgG1-2F8-F405X indicados y IgG1-7D8-K409R o los controles.

Figura 24: Intercambio del brazo Fab inducido por 2-MEA entre mutantes IgG1-2F8-Y407X e IgG1-7D8-K409R. La generación de anticuerpos biespecíficos después del intercambio del brazo Fab *in vitro* inducido por 2-MEA entre los mutantes IgG1-2F8-Y407X e IgG1-7D8-K409R se determinó mediante un ELISA. **(A)** Se analizó una serie de concentración (anticuerpo total) de 0-20 µg/ml en el ELISA. El control positivo es un lote purificado de anticuerpo biespecífico, derivado de IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R. **(B)** El intercambio se presenta como unión biespecífica a una concentración de anticuerpo de 20 µg/ml en relación con el control positivo (barra negra). Las barras gris oscuro representan la unión biespecífica para la IgG4 control (IgG4-7D8 x IgG4-2F8) y el control negativo (IgG1-2F8 x IgG1-7D8-K409R). Las barras gris claro representan los resultados de las reacciones de intercambio del brazo Fab realizadas simultáneamente entre los mutantes IgG1-2F8-Y407X e IgG1-7D8-K409R indicados o los controles.

Figura 25: Análisis del anticuerpo biespecífico generado por el intercambio del brazo Fab inducido por 2-MEA mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras (Figura 25 (A)) y reductoras (Figura 25 (B)).

Figura 26: Perfiles de HP-SEC del material de partida homodimérico IgG1-2F8-F405L (Figura 26 (B)), el material de partida homodimérico IgG1-7D8-K409R (Figura 26 (A)), la mezcla (1:1) de ambos homodímeros (Figura 26 (C)) y el producto biespecífico generado por el intercambio del brazo Fab inducido por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R (Figura 26 (D)).

Figura 27: Espectrometría de masas (ESI-MS) del material de partida homodimérico IgG1-2F8-F405L (Figura 27 (B)), el material de partida homodimérico IgG1-7D8-K409R (Figura 27 (A)), la mezcla (1:1) de ambos homodímeros (Figura 27 (C)) y el producto biespecífico generado por el intercambio del brazo Fab inducido por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R (Figura 27 (D)).

Figura 28: Perfiles de isoelectrofoque capilar (IEF) del material de partida homodimérico IgG1-2F8-F405L (Figura 28 (A)), el material de partida homodimérico IgG1-7D8-K409R (Figura 28 (B)), la mezcla (1:1) de ambos homodímeros (Figura 28 (C)) y el producto biespecífico generado por el intercambio del brazo Fab inducido por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R (Figura 28 (D)).

Figura 29: Perfiles HPLC-CIEF del material de partida homodimérico IgG1-2F8-F405L (Figura 29 (A)), el material de partida homodimérico IgG1-7D8-K409R (Figura 29 (B)), la mezcla (1:1) de ambos homodímeros (Figura 29 (C)) y el producto biespecífico generado por el intercambio del brazo Fab inducido por 2-MEA entre IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R (Figura 29 (D)).

Figura 30: Reacción de intercambio de los homodímeros IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R según se monitorizó mediante el intercambio de cationes de cromatografía líquida de alta presión (HPLC-CIEF) después

de la inyección en diferentes momentos.

Figura 31: Homodímeros residuales después de la reacción de intercambio según lo detectado con el método CIEX (indicado por flechas).

Figura 32: Influencia de las concentraciones de IgG, concentraciones de 2-MEA, temperaturas de incubación y tiempos de incubación en la generación de anticuerpos biespecíficos, según lo determinado mediante un ELISA.

Figura 33: Generación de anticuerpos biespecíficos a diversas concentraciones de IgG, concentraciones de 2-MEA, temperaturas y tiempos de incubación según lo determinado mediante un ELISA y en comparación con el control que se estableció arbitrariamente al 100 %. **Figura 34:** Generación de anticuerpos biespecíficos a diversas concentraciones de IgG, concentraciones de 2-MEA, temperaturas y tiempos de incubación analizado mediante HPLC-CIEX.

Figura 35: La generación de anticuerpos biespecíficos después del intercambio del brazo Fab *in vitro* inducido por 2-MEA entre los mutantes de IgG1-2F8-L368X indicados y la IgG1-7D8-K409R se determinó mediante un ELISA utilizando una serie de concentración (anticuerpo total) de 0-20 µg/ml (Figura 35 (A)). El control positivo es un lote purificado de anticuerpo biespecífico, derivado de IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R. La Figura 35(B) muestra la unión biespecífica a 20 µg/ml en relación con el control positivo (barra negra). Las barras gris oscuro representan la unión biespecífica de la IgG4 control (IgG4-7D8 x IgG4-2F8) y el control negativo (IgG 1-2F8 x IgG 1-7D8-K409R). Las barras gris claro representan los resultados de las reacciones de intercambio del brazo Fab realizadas de forma simultánea entre los mutantes IgG1-2F8-L368X indicados e IgG1-7D8-K409R.

Figura 36: La generación de anticuerpos biespecíficos después del intercambio del brazo Fab *in vitro* inducido por 2-MEA entre los mutantes de IgG1-2F8-K370X indicados y la IgG1-7D8-K409R se determinó mediante un ELISA utilizando una serie de concentración (anticuerpo total) de 0-20 µg/ml (Figura 36 (A)). El control positivo es un lote purificado de anticuerpo biespecífico, derivado de IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R. La Figura 36(B) muestra la unión biespecífica a 20 µg/ml en relación con el control positivo (barra negra). Las barras gris oscuro representan la unión biespecífica de la IgG4 control (IgG4-7D8 x IgG4-2F8) y el control negativo (IgG 1-2F8 x IgG 1-7D8-K409R). Las barras gris claro representan los resultados de las reacciones de intercambio del brazo Fab realizadas simultáneamente entre los mutantes IgG1-2F8-D370X indicados e IgG1-7D8-K409R.

Figura 37: La generación de anticuerpos biespecíficos después del intercambio del brazo Fab *in vitro* inducido por 2-MEA entre los mutantes de IgG1-2F8-D399X indicados y la IgG1-7D8-K409R se determinó mediante un ELISA utilizando una serie de concentración (anticuerpo total) de 0-20 µg/ml (Figura 37 (A)). La Figura 37(B) muestra la unión biespecífica a una concentración de anticuerpo de 20 µg/ml en relación con el control positivo (barra negra). Las barras gris oscuro representan la unión biespecífica de la IgG4 control (IgG4-7D8 x IgG4-2F8) y el control negativo (IgG1-2F8 x IgG1-7D8-K409R). Las barras gris claro representan los resultados de las reacciones de intercambio del brazo Fab realizadas simultáneamente entre los mutantes IgG1-2F8-D399X indicados e IgG1-7D8-K409R.

Figura 38: La generación de anticuerpos biespecíficos después del intercambio del brazo Fab *in vitro* inducido por 2-MEA entre los mutantes de IgG1-2F8-T366X indicados y la IgG1-7D8-K409R se determinó mediante un ELISA utilizando una serie de concentración (anticuerpo total) de 0-20 µg/ml (Figura 38 (A)). La Figura 38(B) muestra la unión biespecífica a una concentración de anticuerpo de 20 µg/ml en relación con el control positivo (barra negra). Las barras gris oscuro representan la unión biespecífica de la IgG4 control (IgG4-7D8 x IgG4-2F8) y el control negativo (IgG1-2F8 x IgG1-7D8-K409R). Las barras gris claro representan los resultados de las reacciones de intercambio del brazo Fab realizadas simultáneamente entre los mutantes IgG1-2F8-T366X indicados e IgG1-7D8-K409R.

Figura 39: Intercambio del brazo Fab inducido por 2-MEA entre cuatro combinaciones diferentes de mutantes IgG1 (como se indica) a 15 °C después de 0, 30, 60, 105 y 200 minutos de incubación según lo determinado mediante ELISA de tipo sándwich.

Figura 40: Intercambio del brazo Fab inducido por 2-MEA entre diferentes combinaciones de mutantes de IgG 1 después de la incubación del anticuerpo a 15 °C durante 90 minutos, según lo determinado mediante ELISA de tipo sándwich.

Figura 41: Los anticuerpos biespecíficos se analizaron mediante CIEX analítico y el porcentaje de heterodímeros formados a lo largo del tiempo en los diferentes tampones (como se indica en la leyenda) se calculó de la siguiente manera: Heterodímero (%) = 100 % - [área máxima % de IgG1-2F8-F405L + área máxima % de IgG1-7D8-K409R].

Figura 42: El lote de 40 ml de anticuerpos biespecíficos producido con una mezcla que contiene 10 mg/ml de cada anticuerpo se analizó mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras (A, C) y reductoras (B, D), después del almacenamiento a 0 °C, O/N (A, B) o a 4 °C durante seis días (C, D). El carril 1 de cada gel contiene el marcador de PM, el carril 2 contiene el control interno del ensayo de IgG 1. A, B: carril 3: lote de 40 ml de biespecíficos producidos con una mezcla que contiene 10 mg/ml de cada anticuerpo; C, D: carril 4: lote de 40 ml producido con una mezcla que contiene 10 mg/ml de cada anticuerpo.

Para condiciones no reductoras, se indican diferentes combinaciones de cadena pesada (H) y cadena ligera (L): 148 kDa (LHHL), 125 kDa (HHL), 99 kDa (HH), 67 kDa (HL), 51 kDa (H) y 25 kDa (L).

Figura 43: Potencial redox y saturación de oxígeno durante la reducción y oxidación del anticuerpo IgG1 anti-CD38. El potencial redox y la saturación de oxígeno durante la fase de reducción y oxidación se siguieron utilizando una sonda redox y una sonda de oxígeno disuelto (OD). El eje y izquierdo y la línea continua muestran el potencial redox; el eje y derecho y la línea discontinua muestran la saturación de oxígeno medida en la solución durante las diferentes fases del proceso, como indican las flechas.

Figura 44: Análisis HP-SEC durante la reducción y oxidación del anticuerpo anti-CD38. Las muestras

5 tomadas durante la reducción y oxidación del anticuerpo anti-CD38 se analizaron mediante HP-SEC. Muestra 2 (S0002): anticuerpo anti-CD38 después del intercambio de tampón del tampón de formulación a PBS; muestra 3 a 8: anticuerpo anti-CD38 durante la fase de reducción (tiempos de incubación: 1, 2, 3, 4, 4½, 5 h); muestra 9 a 12: anticuerpo anti-CD38 durante el proceso de diafiltración (muestras a 1, 2, 3, 4 h); muestra 13: anticuerpo anti-CD38 después de la incubación O/N; muestra 14: anticuerpo anti-CD38 después de la adición de CuSO₄ a la solución. A efectos de comparación, los perfiles HP-SEC de 2-MEA solo y 2-MEA con 2-yodoacetamida (IAA) se muestran en negrita. Los picos en 7,715 y 9,193 representan IgG1 dimérica y monomérica. La naturaleza del pico en 11,073 no se conoce.

10 **Figura 45: Análisis SDS-PAGE durante la reducción y oxidación de anticuerpos anti-CD38.** Las muestras tomadas durante la reducción y oxidación del anticuerpo anti-CD38 se analizaron mediante análisis SDS-PAGE no reducido. Carril 1: anticuerpo anti-CD38 en tampón de formulación; carril 2: anticuerpo anti-CD38 después del intercambio de tampón a PBS; carril 3 a 8: anticuerpo anti-CD38 durante la fase de reducción (tiempos de incubación indicados encima de la figura); carril 9 a 12: anticuerpo anti-CD38 durante el proceso de diafiltración; carril 13: anticuerpo anti-CD38 después de la incubación O/N; carril 14: anticuerpo anti-CD38 después de la adición de CuSO₄ a la solución.

15 **Figura 46: Análisis ESI-MS durante la reducción y oxidación del anticuerpo anti-CD38.** Las muestras tomadas durante la reducción y reoxidación del anticuerpo anti-CD38 se inactivaron y analizaron mediante análisis ESI-MS. Muestra 1 (S0001): anticuerpo anti-CD38 en tampón de formulación; muestra 2: anticuerpo anti-CD38 después del intercambio de tampón a PBS; muestra 3 a 8: anticuerpo anti-CD38 durante la fase de reducción (tiempos de incubación: 1, 2, 3, 4, 4½, 5 h); muestra 9 a 12: anticuerpo anti-CD38 durante el proceso de diafiltración (muestras a 1, 2, 3, 4 h); muestra 13: anticuerpo anti-CD38 después de la incubación O/N; muestra 14: anticuerpo anti-CD38 después de la adición de CuSO₄ a la solución. Se debe tener en cuenta que la LC-MS facilita el proceso de reoxidación ya sea mediante la eliminación del reductor en el sistema LC o durante el proceso de electropulverización donde la muestra se expone al aire, es decir, oxígeno. Las muestras pueden perder moléculas reductoras unidas covalentemente que no se han protegido mediante IAA durante la etapa de inactivación. Por tanto, la IgG reoxidada covalentemente intacta se sobreestima mediante ESI-MS en comparación con el SDS-PAGE. Se indican diferentes combinaciones de cadena pesada (H) y cadena ligera (L): LHHL, HHL, HH, HL, H y L. Los detalles de masa solo se dan para la cadena ligera (L) en la figura; + 2-MEA = + 75 Da; + 2-yodoacetamida = + 57 Da.

20 **Figura 47:** Potencial redox y saturación de oxígeno durante la reducción y oxidación del anticuerpo IgG1 anti-CD38- diafiltración más rápida y segunda etapa de diafiltración. El potencial redox y la saturación de oxígeno durante la fase de reducción y oxidación se siguieron utilizando una sonda redox y una sonda de oxígeno disuelto (OD). El eje y izquierdo y la línea continua muestran el potencial redox; el eje y derecho y la línea discontinua muestran la saturación de oxígeno medida en la solución durante las diferentes fases del proceso, como indican las flechas.

25 **Figura 48: Análisis HP-SEC durante la reducción y oxidación del anticuerpo anti-CD38 - diafiltración más rápida y segunda etapa de diafiltración.** Las muestras tomadas durante la reducción y oxidación del anticuerpo anti-CD38 se analizaron mediante HP-SEC. Muestra 1 (S0001): anticuerpo anti-CD38 en tampón de formulación, muestra 2: anticuerpo anti-CD38 después del intercambio de tampón del tampón de formulación a PBS; muestra 3 a 9: anticuerpo anti-CD38 durante la fase de reducción (tiempos de incubación 5, 10, 15, 30 y 60 min, y 2 y 3 h); muestra 10 a 15: anticuerpo anti-CD38 durante el proceso de diafiltración (muestras después de 10, 20, 30, 40, 50 y 60 min); muestra 16 a 18: anticuerpo anti-CD38 1, 2 y 25 horas después de la diafiltración; muestra 19: anticuerpo anti-CD38 1 hora después de la segunda diafiltración.

30 **Figura 49: Análisis SDS-PAGE durante la reducción y oxidación del anticuerpo anti-CD38 - diafiltración más rápida y segunda etapa de diafiltración.** Las muestras tomadas durante la reducción y oxidación del anticuerpo anti-CD38 se analizaron mediante análisis SDS-PAGE no reducido. Carril 1: anticuerpo anti-CD38 en tampón de formulación; carril 2: anticuerpo anti-CD38 después del intercambio de tampón a PBS; carril 3 a 9: anticuerpo anti-CD38 durante la fase de reducción (tiempos de incubación 5, 10, 15, 30 y 60 min, y 2 y 3 h); carril 10 a 15: anticuerpo anti-CD38 durante el proceso de diafiltración (muestras después de 10, 20, 30, 40, 50 y 60 min); carril 16 a 18: anticuerpo anti-CD38 1, 2 y 25 horas después de la diafiltración; carril 19: anticuerpo anti-CD38 1 hora después de la segunda diafiltración.

35 **Figura 50: Potencial redox y saturación de oxígeno durante la reducción y oxidación del anticuerpo IgG1 anti-CD38- diafiltración más rápida y menor concentración de 2-MEA.** El potencial redox y la saturación de oxígeno durante la fase de reducción y oxidación se siguieron utilizando una sonda redox y una sonda de oxígeno disuelto (OD). El eje y izquierdo y la línea continua muestran el potencial redox; el eje y derecho y la línea discontinua muestran la saturación de oxígeno medida en la solución durante las diferentes fases del proceso, como indican las flechas.

40 **Figura 51: Análisis HP-SEC durante la reducción y oxidación del anticuerpo anti-CD38 - diafiltración más rápida y menor concentración de 2-MEA.** Las muestras tomadas durante la reducción y oxidación del anticuerpo anti-CD38 se analizaron mediante HP-SEC. Muestra 1 (S0001): anticuerpo anti-CD38 en tampón de formulación; muestra 2: anticuerpo anti-CD38 después del intercambio de tampón del tampón de formulación a PBS; muestra 3 a 6: anticuerpo anti-CD38 durante la fase de reducción (tiempos de incubación: 20 y 60 min, y 3 y 4 horas); muestra 7 a 10: anticuerpo anti-CD38 durante el proceso de diafiltración (muestras después de 10, 20, 40 y 60 min); muestra 11 a 14: anticuerpo anti-CD38 1, 2, 3 y 24 horas después de la finalización de la diafiltración.

45 **Figura 52: Análisis SDS-PAGE durante la reducción y oxidación del anticuerpo anti-CD38 - diafiltración**

más rápida y menor concentración de 2-MEA. Las muestras tomadas durante la reducción y oxidación del anticuerpo anti-CD38 se analizaron mediante análisis SDS-PAGE no reducido. Carril 1: anticuerpo anti-CD38 en tampón de formulación; carril 2: anticuerpo anti-CD38 después del intercambio de tampón del tampón de formulación a PBS; carril 3 a 6: anticuerpo anti-CD38 durante la fase de reducción (tiempos de incubación: 20 y 60 min, y 3 y 4 horas); carril 7 a 10: anticuerpo anti-CD38 durante el proceso de diafiltración (muestras después de 10, 20, 40 y 60 min); carril 11 a 14: anticuerpo anti-CD38 1, 2, 3 y 24 horas después de la finalización de la diafiltración.

Figura 53: Potencial redox y saturación de oxígeno durante la reducción y oxidación del anticuerpo IgG1 anti-CD38: diafiltración más rápida y presencia de EDTA durante la fase de reducción. (A) Se siguieron el potencial redox y la saturación de oxígeno durante la fase de reducción y oxidación utilizando una sonda redox y una sonda de oxígeno disuelto (OD). El eje y izquierdo y la línea continua muestran el potencial redox; el eje y derecho y la línea discontinua muestran la saturación de oxígeno medida en la solución durante las diferentes fases del proceso, como indican las flechas. (B) Comparación del descenso de OD en presencia y ausencia de EDTA (tomada del ejemplo 46 [sin EDTA] y 47 [con EDTA]).

Figura 54: Análisis SDS-PAGE durante la reducción y oxidación del anticuerpo anti-CD38 - diafiltración más rápida y presencia de EDTA durante la fase de reducción. Las muestras tomadas durante la reducción y oxidación del anticuerpo anti-CD38 se analizaron mediante análisis SDS-PAGE no reducido. Carril 1: anticuerpo anti-CD38 en tampón de formulación; carril 2: anticuerpo anti-CD38 después del intercambio de tampón del tampón de formulación a PBS; carril 3 a 7: anticuerpo anti-CD38 durante la fase de reducción (tiempos de incubación: 10 min y 1, 2, 3 y 4 horas); carril 8 a 11: anticuerpo anti-CD38 durante el proceso de diafiltración (muestras a los 10, 30, 40 y 60 minutos después de comenzar la diafiltración); carril 12 a 14: anticuerpo anti-CD38 1 y 24 horas y 6 días después de la finalización de la diafiltración.

Figura 55: Potencial redox y saturación de oxígeno durante la reducción y oxidación del anticuerpo IgG1 anti-CD38: diafiltración más rápida y presencia de N₂ después de la fase de reducción. El potencial redox y la saturación de oxígeno durante la fase de reducción y oxidación se siguieron utilizando una sonda redox y una sonda de oxígeno disuelto (OD). El eje y izquierdo y la línea continua muestran el potencial redox; el eje y derecho y la línea discontinua muestran la saturación de oxígeno medida en la solución durante las diferentes fases del proceso, como indican las flechas.

Figura 56: Análisis SDS-PAGE durante la reducción y oxidación del anticuerpo anti-CD38: diafiltración más rápida y presencia de N₂ después de la fase de reducción. Las muestras tomadas durante la reducción y oxidación del anticuerpo anti-CD38 se analizaron mediante análisis SDS-PAGE no reducido. Carril 1: anticuerpo anti-CD38 en tampón de formulación; carril 2: anticuerpo anti-CD38 después del intercambio de tampón del tampón de formulación a PBS; carril 3 a 7: anticuerpo anti-CD38 durante la fase de reducción (tiempos de incubación: 10 min y 1, 2, 3 y 4 horas); carril 8 a 10: anticuerpo anti-CD38 durante el proceso de diafiltración (muestras 10, 30 y 60 minutos después del inicio de la diafiltración); carril 11: anticuerpo anti-CD38 24 horas después de la finalización de la diafiltración; carriles 12 y 13: anticuerpo anti-CD38 1 y 24 horas después de detener la aireación con nitrógeno e iniciar la aireación con oxígeno.

Figura 57: Potencial redox y saturación de oxígeno durante la reducción y oxidación del anticuerpo IgG1 anti-CD38: diafiltración más rápida y presencia de EDTA después de la fase de reducción. El potencial redox y la saturación de oxígeno durante la fase de reducción y oxidación se siguieron utilizando una sonda redox y una sonda de oxígeno disuelto (OD). El eje y izquierdo y la línea continua muestran el potencial redox; el eje y derecho y la línea discontinua muestran la saturación de oxígeno medida en la solución durante las diferentes fases del proceso, como indican las flechas.

Figura 58: Análisis SDS-PAGE durante la reducción y oxidación del anticuerpo anti-CD38 - diafiltración más rápida y presencia de EDTA después de la fase de reducción. Las muestras tomadas durante la reducción y oxidación del anticuerpo anti-CD38 se analizaron mediante análisis SDS-PAGE no reducido. Carril 1: anticuerpo anti-CD38 en tampón de formulación; carril 2: anticuerpo anti-CD38 después del intercambio de tampón del tampón de formulación a PBS; carril 3 a 6: anticuerpo anti-CD38 durante la fase de reducción (tiempos de incubación: 10 min y 2, 3 y 4 horas); carril 7 a 9: anticuerpo anti-CD38 durante el proceso de diafiltración (muestras 10, 30 y 60 minutos después del inicio de la diafiltración); carril 10: anticuerpo anti-CD38 24 horas después de la finalización de la diafiltración; carril 11: anticuerpo anti-CD38 30 min después de la adición de sulfato de cobre.

Figura 59: Potencial redox y saturación de oxígeno durante la reducción y oxidación del anticuerpo IgG1 anti-CD38: diafiltración más rápida y presencia de sulfato de cobre después de la fase de reducción. El potencial redox y la saturación de oxígeno durante la fase de reducción y oxidación se siguieron utilizando una sonda redox y una sonda de oxígeno disuelto (OD). El eje y izquierdo y la línea continua muestran el potencial redox; el eje y derecho y la línea discontinua muestran la saturación de oxígeno medida en la solución durante las diferentes fases del proceso, como indican las flechas.

Figura 60: Análisis SDS-PAGE durante la reducción y oxidación del anticuerpo anti-CD38: diafiltración más rápida y presencia de sulfato de cobre después de la fase de reducción. Las muestras tomadas durante la reducción y oxidación del anticuerpo anti-CD38 se analizaron mediante análisis SDS-PAGE no reducido. Carril 1: anticuerpo anti-CD38 en tampón de formulación; carril 2: anticuerpo anti-CD38 después del intercambio de tampón del tampón de formulación a PBS; carril 3 a 7: anticuerpo anti-CD38 durante la fase de reducción (tiempos de incubación: 10 min y 1, 2, 3 y 4 horas); carriles 8 y 9: anticuerpo anti-CD38 durante el proceso de diafiltración (muestras 10 y 60 minutos después del inicio de la diafiltración); carril 10: anticuerpo anti-CD38 24 horas después de la finalización de la diafiltración; carril M: marcador del PM.

5 **Figura 61: Análisis SDS-PAGE durante el proceso de reoxidación.** Se tomaron muestras después de diferentes tiempos de incubación en PBS que contenían EDTA o Cu²⁺ y se analizaron mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras (A, C) y reductoras (B, D). Carril 1: IgG1, control interno del ensayo, carril 2: muestra de 0 h, carril 3: muestra de 1 h, carril 4: muestra de 2 h, carril 5: muestra de 3 h, carril 6: muestra de 4 h, carril 7: muestra de 24 h, carril 8: marcador del PM.

10 **Figura 62:** Cantidad relativa de combinaciones de cadena pesada-cadena ligera después de diferentes tiempos de incubación en presencia de Cu²⁺. Las especies moleculares individuales se cuantificaron mediante densitometría a partir de los geles de SDS-PAGE. La intensidad total de todas las bandas escaneadas se estableció en 100 %.

15 **Figura 63: Recorrido del flujo del reactor, lista de materiales y proceso.** La ruta del flujo se desinfectó utilizando NaOH 0,2 N y se aclaró con WFI. La mañana de la reacción de intercambio, se añadió al sistema la cantidad apropiada de PBS desde la bolsa de almacenamiento. Los homodímeros se añadieron por alimentación por gravedad y el sistema circuló a 7 LPM para mezclar los contenidos. La reacción se inició mediante la adición por gravedad de la solución madre 2-MEA. Las válvulas de permeado se cerraron y la bomba de alimentación se ajustó a 30 RPM (7 LPM) para el proceso de reducción. Después de cinco horas, las válvulas de permeado se abrieron y la velocidad de la bomba se incrementó para cumplir con una presión de alimentación objetivo de 70 kPa para la diafiltración. Para la condición de 1 g/l, la bomba se ajustó a 165 RPM (31 LPM). Para la condición de 20 g/l, la bomba se ajustó a 140 RPM (26 LPM). La ruta de adición de PBS se abrió y la velocidad de la bomba de diafiltración se controló para mantener un peso constante en la bolsa del reactor. Este procedimiento dio como resultado una tasa de diafiltración de 250 l/h para la condición de 1 g/l y 125 l/h para la condición de 20 g/l. Una vez que se recogió el volumen de diafiltración objetivo en la bolsa de restos de 500 l, se cerraron las válvulas de permeado y se detuvo la bomba de diafiltración. La bomba de alimentación se devolvió a 30 RPM (7 LPM) de circulación durante el tiempo de oxidación. Después de la incubación O/N, se realizó una segunda diafiltración (tres diavolúmenes para la condición 1 g/l y 4 diavolúmenes para la condición 20 g/l). Todos los procesos se llevaron a cabo a temperatura ambiente (22-25 °C). Las muestras se extrajeron directamente de la bolsa o de la válvula 1 (Fig. 1). Lista de materiales

- 30 1) ½ "válvula de diafragma en T de estática cero de ½", SED, 316L SS
 2) bolsa de 50 l, Sartorius Stedim, modelo FFB207004, en Wave Mixer de 50 l, modelo EHT rev A
 3) Escala de doble haz, Intercomp, modelo TB830
 4) tubo ID de ½", silicona curada al platino, Masterflex 96410-82
 5) tubería ID de 3/8", silicona curada al platino, Tygon 3350
 6) Abrazadera de pinza del tubo
 7) Manguera ID de alta presión de 1", silicona reforzada curada al platino, terminales 316L SS TC, Page International, modelo SWPV
 8) manómetro 0-30 psig, Anderson, modelo EM066010041025A
 9) Unión en T de calibre 1", 316L SS
 10) Unión en T de calibre ½ ", 316L SS
 11) Reductor de TC de ½ "1", 316L SS
 40 12) Bomba peristáltica de alimentación, Watson Marlow, modelo 720 DUN/RE, Elemento de tubos Stasure, modelo 960.0254. PFT, 0-33 LPM
 13) Sensor y transmisor de oxígeno disuelto, Metter-Toledo, modelo 4100e e Inpro 6800/12/120 (sensor)
 14) Sensor y transmisor redox, Mettler Toledo, modelo 2100e y 3250SG (sensor)
 15) Celda de flujo de Wedgewood 1", 316L SS
 45 16) Unión en T de calibre ½ ", Kynar, Cole-Parmer modelo EW-30703-78
 17) válvula de diafragma de ½ ", SED, 316L SS
 18) Soporte de membrana de UF Millipore con inserciones de polipropileno desechables Pall y membrana Pall Omega 30KD PES, modelo OS030F26
 19) Conector macho de Kleenpak HT, Pall, modelo KPCHT02M6
 50 20) Conector hembra Kleenpak HT, Pall, modelo KPCHT02F6
 21) Bomba peristáltica de diafiltro, Watson Marlow, modelo 620 Di/R, Elemento de tubos Stasure, modelo 960.0170. PFT, 0-9 LPM
 22) filtro de 0,2 micrómetro, Pall, modelo KA3NFP1
 55 23) Bolsa de 500 l, Sartorius Stedim, modelo FXB211905
 24) bolsa de 200 l, Sartorius Stedim, modelo PDL200LWS
 25) bolsa de 20 l, Sartorius Stedim, modelo FFB208721
 26) bolsa de 5 l, Sartorius Stedim, modelo FFB208723

60 *Todas las juntas TC fueron de silicona curada con platino.

60 *Todas las bolsas Sartorius Stedim de 5/20/50 l utilizan una película multicapa con contacto de producto de EVA (acetato de etileno vinilo) y capas de barrera de gas EVOH (alcohol etilenvinílico).

65 *Todas las bolsas Sartorius Stedim de 200/500 l utilizan una película multicapa con contacto de producto de ULDPE (polietileno de densidad ultra baja) y capas de barrera de gas EVOH.

65 **Figura 64: Perfiles CIEX del producto inicial y final de las tres condiciones diferentes.**

Figura 65: Análisis SDS-PAGE reducido (izquierda) y no reducido (derecha) de los productos iniciales y

finales. Carril 1: Control de ensayo de IgG1-b12. Carril 2: IgG1-F405L-2F8 inicial. Carril 3: IgG1-K409R-7D8 inicial. Carril 4: carrera final de 25 l a 1 g/l. Carril 5: carrera final de 25 l a 20 g/l.

Figura 66: Oxígeno disuelto y potencial redox durante la reducción y reoxidación. La saturación de oxígeno y el potencial redox durante la reducción y reoxidación de IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R (mezcla 1:1) se siguieron utilizando una sonda redox y una sonda de OD. La línea discontinua horizontal muestra el valor inicial de OD y redox. La adición de 2-MEA (indicada por la flecha) coincidió con un gran descenso de OD y redox al comienzo de la carrera. Las líneas discontinuas verticales muestran el inicio y el final de la diafiltración.

Figura 67: Perfil de pH durante la reducción y reoxidación. El pH durante la reducción y la reoxidación de IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R (mezcla 1:1) se midió mediante una sonda de pH. La línea discontinua horizontal muestra el valor de pH inicial. La adición de 2-MEA (indicada por la flecha) coincidió con un descenso grande del pH al comienzo de la carrera. Las líneas discontinuas verticales muestran el inicio y el final de la diafiltración.

Figura 68: Tasa de consumo de oxígeno (OCR [mM/h]), O₂ total consumido (mM) y OD (%) durante la fase de reducción. Se calcularon la tasa de consumo de oxígeno y el O₂ total consumido, se midió el OD. Las líneas de puntos verticales representan el inicio y el final de la reducción.

Figura 69: Análisis SDS-PAGE (no reducido) durante la reducción y la reoxidación. Las muestras tomadas durante la reducción y la reoxidación de IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R (mezcla 1:1) se analizaron mediante análisis SDS-PAGE no reducido. M: Marcador del PM; C: Control de IgG1; carril 1: antes de la adición de 2-MEA; carriles 2, 3, 4 y 5: después de 30 min, 1 hora, 2 horas y 3 horas de reducción, carriles 6, 7, 8, 9 y 10: resultados de la diafiltración después de 1, 2, 3, 5 y 7 l de tampón diafiltrado, carriles 11 y 12: 1 hora de incubación O/N tras la diafiltración. Las masas de los marcadores del peso molecular se indican a la izquierda. Las especies de IgG reducidas/reoxidadas están indicadas por H (cadena pesada) y/o L (cadena ligera) y sus combinaciones.

Figura 70: Perfiles CIEX durante la reducción y reoxidación. Las muestras se tomaron y se congelaron instantáneamente durante la reducción y reoxidación de IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R (mezcla 1:1) en los puntos de tiempo indicados y se analizaron mediante CIEX analítico.

Figura 71: Análisis HP-SEC de la muestra final después de la incubación O/N. La muestra tomada después de la incubación O/N después de la diafiltración se analizó mediante HP-SEC. Los picos en 7,599 y 10,792 representan IgG dimérica y monomérica, respectivamente.

Figura 72: Oxígeno disuelto y potencial redox durante la reducción y reoxidación. La saturación de oxígeno y el potencial redox durante la reducción y reoxidación de IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R (mezcla 1:1) en presencia de EDTA 2 mM se siguieron utilizando una sonda redox y una sonda de OD. La línea discontinua horizontal muestra el valor inicial de ambos, redox y OD. La adición de 2-MEA coincidió (indicada por la flecha) con un gran descenso del OD y el redox al comienzo de la carrera. Las líneas discontinuas verticales muestran el inicio y el final de la diafiltración. El aumento en redox y el descenso en el OD al final de la carrera (t = 24 h) coinciden con la adición de CuSO₄.

Figura 73: Perfil de pH durante la reducción y reoxidación. El pH durante la reducción y reoxidación de IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R (mezcla 1:1) en presencia de EDTA 2 mM usando una sonda de pH. La línea discontinua horizontal muestra el valor de pH inicial. La adición de 2-MEA (indicada por la flecha) coincidió con un descenso grande del pH al comienzo de la carrera. Las líneas discontinuas verticales muestran el inicio y el final de la diafiltración.

Figura 74: Análisis SDS-PAGE durante la reducción y reoxidación. Las muestras tomadas durante la reducción y reoxidación de IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R (mezcla 1:1) en presencia de EDTA 2 mM se analizaron mediante análisis SDS-PAGE no reducido. M: Marcador del PM; C: Control de IgG1; carril 1: antes de la adición de 2-MEA; carriles 2, 3, 4 y 5: después de 30 min, 1 hora, 2 horas y 3 horas de reducción, resultados de la diafiltración de los carriles 6, 7, 8, 9 y 10 después de 1, 2, 3, 5 y 7 l de tampón diafiltrado, carriles 11 y 12: 1 hora de incubación O/N tras la diafiltración, carril 13: 10 min después de la adición de CuSO₄. Las masas de los marcadores del peso molecular se indican a la izquierda. Las especies de IgG reducidas/reoxidadas están indicadas por H (cadena pesada) y/o L (cadena ligera) y sus combinaciones.

Figura 75: Perfiles CIEX durante la reducción y reoxidación. Las muestras tomadas durante la reducción y reoxidación de IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R (mezcla 1:1) en presencia de EDTA 2 mM se analizaron mediante CIEX analítica. Las muestras se tomaron en los puntos de tiempo indicados y se congelaron instantáneamente hasta el análisis CIEX.

Figura 76: Oxígeno disuelto y potencial redox durante la reducción y reoxidación. La saturación de oxígeno y el potencial redox durante la reducción y reoxidación de IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R (mezcla 1:1) se siguieron utilizando una sonda redox y una sonda de OD. La adición de 2-MEA (indicada por la flecha) coincidió con un gran descenso de OD y redox al comienzo de la carrera. La línea discontinua horizontal muestra el valor inicial de ambos, redox y OD. Las líneas discontinuas verticales muestran el inicio y el final de la diafiltración.

Figura 77: Tasa de agitación durante la reducción y reoxidación. La adición de 2-MEA (indicada por la flecha) coincidió con un gran aumento en la tasa de agitación cerca del comienzo de la carrera. Las líneas discontinuas verticales muestran el inicio y el final de la diafiltración.

Figura 78: Perfil de pH durante la reducción y reoxidación. El pH durante la reducción y la reoxidación de IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R (mezcla 1:1) se midió mediante una sonda de pH. La adición de 2-MEA (indicada por la flecha) coincidió con un descenso grande del pH al comienzo de la carrera. Las líneas discontinuas verticales muestran el inicio y el final de la diafiltración.

Figura 79: Análisis SDS-PAGE (no reducido) durante la reducción y la reoxidación. Las muestras tomadas

durante la reducción y la reoxidación de IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R (mezcla 1:1) se analizaron mediante análisis SDS-PAGE no reducido. M: Marcador del PM; C: IgG 1 control; carril 1: antes de la adición de 2-MEA; carriles 2, 3, 4 y 5: después de 30 min, 1 hora, 2 horas y 3 horas de reducción, carriles 6, 7, 8, 9 y 10: resultados de la diafiltración después de 1, 2, 3, 5 y 7 l de tampón diafiltrado, carriles, 11 y 12: 1 hora de incubación O/N tras la diafiltración. Las masas de los marcadores del peso molecular se indican a la izquierda. Las especies de IgG reducidas/reoxidadas están indicadas por H (cadena pesada) y/o L (cadena ligera) y sus combinaciones.

Figura 80: Perfiles CIEX durante la reducción y reoxidación. Las muestras tomadas durante la reducción y la reoxidación de IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R (mezcla 1:1) se analizaron mediante CIEX analítico. Las muestras se tomaron en los puntos de tiempo indicados y se congelaron instantáneamente hasta el análisis CIEX.

Figura 81: Oxígeno disuelto y potencial redox durante la reducción y reoxidación. La saturación de oxígeno y el potencial redox durante la reducción y reoxidación de IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R (mezcla 1:1) se siguieron utilizando una sonda redox y una sonda de OD. La línea discontinua horizontal muestra los valores iniciales tanto para redox como para OD. La adición de 2-MEA (indicada por la flecha) coincidió con un gran descenso de OD y redox al comienzo de la carrera. La línea discontinua horizontal muestra el valor inicial de ambos, redox y OD. Las líneas discontinuas verticales muestran el inicio y el final de la diafiltración.

Figura 82: Tasa de agitación durante la reducción y reoxidación. La adición de 2-MEA (indicada por la flecha) coincidió con un gran aumento en la tasa de agitación cerca del comienzo de la carrera. Las líneas discontinuas verticales muestran el inicio y el final de la diafiltración.

Figura 83: Perfil de pH durante la reducción y reoxidación. El pH durante la reducción y la reoxidación de IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R (mezcla 1:1) se midió mediante una sonda de pH. La línea discontinua horizontal muestra el valor inicial. La adición de 2-MEA (indicada por la flecha) coincidió con un descenso grande del pH al comienzo de la carrera. La línea discontinua horizontal muestra el valor de pH inicial. Las líneas discontinuas verticales muestran el inicio y el final de la diafiltración.

Figura 84: Análisis SDS-PAGE (no reducido) durante la reducción y la reoxidación. Las muestras tomadas durante la reducción y la reoxidación de IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R (mezcla 1:1) se analizaron mediante análisis SDS-PAGE no reducido. M: Marcador del PM; C: Control de IgG1; carril 1: antes de la adición de 2-MEA; carriles 2, 3, 4 y 5: después de 30 min, 1 hora, 2 horas y 3 horas de reducción, carriles 6, 7, 8, 9 y 10: resultados de la diafiltración después de 1, 2, 3, 5 y 7 l de tampón diafiltrado, carriles, 11 y 12: 1 hora de incubación O/N tras la diafiltración. Las masas de los marcadores del peso molecular se indican a la izquierda. Las especies de IgG reducidas/reoxidadas están indicadas por H (cadena pesada) y/o L (cadena ligera) y sus combinaciones.

Figura 85: Perfiles CIEX durante la reducción y reoxidación. Las muestras tomadas durante la reducción y la reoxidación de IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R (mezcla 1:1) se analizaron mediante CIEX analítico. Las muestras se tomaron en los puntos de tiempo indicados y se congelaron instantáneamente hasta el análisis CIEX.

Figura 86: Oxígeno disuelto y potencial redox durante la reducción y reoxidación. La saturación de oxígeno y el potencial redox durante la reducción y reoxidación de IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R (mezcla 1:1) en presencia de nitrógeno se siguieron utilizando una sonda redox y una sonda de OD. La adición de 2-MEA en el momento 0 coincidió con un gran descenso en redox al comienzo de la carrera. Las líneas discontinuas verticales muestran el inicio de la diafiltración, el fin de la diafiltración, el punto de muestra posterior a la diafiltración de 1 hora y el punto de muestra posterior a la diafiltración de 3 horas. El espacio de cabeza se aclaró con aire al final de la diafiltración.

Figura 87: Perfil de pH durante la reducción y reoxidación. El pH durante la reducción y oxidación de IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R (mezcla 1:1) en presencia de nitrógeno se midió mediante una sonda de pH. La línea discontinua horizontal muestra el valor de pH inicial. La adición de 2-MEA a tiempo 0 coincidió con un gran descenso en el pH al comienzo de la carrera. Las líneas discontinuas verticales muestran el inicio y el final de la diafiltración.

Figura 88: Análisis SDS-PAGE (no reducido) durante la reducción y la reoxidación. Las muestras tomadas durante la reducción y la reoxidación de IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R (mezcla 1:1) en presencia de nitrógeno se analizaron mediante análisis SDS-PAGE no reducido. M: Marcador del PM; C: Control de IgG1; carril 1: antes de la adición de 2-MEA; carriles 2, 3, 4 y 5: después de 30 min, 1 hora, 2 horas y 3 horas de reducción, carriles 6, 7, 8, 9 y 10: los resultados de la diafiltración después de 1, 2, 3, 5 y 7 l de tampón diafiltrado, carriles, 11 y 12: 1 y 3 horas después de la diafiltración, carril 13: incubación O/N después de la diafiltración. Las masas de los marcadores del peso molecular se indican a la izquierda. Las especies de IgG reducidas/reoxidadas están indicadas por H (cadena pesada) y/o L (cadena ligera) y sus combinaciones.

Figura 89: Perfiles CIEX durante la reducción y reoxidación. Las muestras tomadas durante la reducción y reoxidación de IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R (mezcla 1:1) en presencia de nitrógeno se analizaron mediante CIEX analítica. Las muestras se tomaron en los puntos de tiempo indicados y se congelaron instantáneamente hasta el análisis CIEX.

Figura 90: Consumo de oxígeno tras la introducción de aire. El gráfico muestra los valores de justo después de la diafiltración, tras la adición de aire. El OD real es el OD medido en el sistema. El DO (sin consumo) es un valor calculado suponiendo que no hay consumo de oxígeno. El O₂ consumido es la cantidad calculada de oxígeno consumido utilizando una k_{la} determinada previamente y suponiendo que la saturación de oxígeno en el sistema es de 0,2 mM.

Figura 91: Oxígeno disuelto y potencial redox durante la reducción y reoxidación. La saturación de oxígeno y el potencial redox durante la reducción y reoxidación de IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R (mezcla 1:1) se siguieron utilizando una sonda redox y una sonda de OD. La línea discontinua horizontal muestra los valores iniciales para redox y el OD. Las líneas discontinuas verticales muestran el inicio y el final de la diafiltración. La adición de 2-MEA coincidió con un gran descenso del OD y redox al comienzo de la carrera. El pH se ajustó a 5,0 justo antes de la diafiltración. El pH se ajustó de nuevo a 7,4 después de la incubación O/N.

Figura 92: Perfil de pH durante la reducción y reoxidación. El pH durante la reducción y la reoxidación de IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R (mezcla 1:1) se midió mediante una sonda de pH. La línea discontinua horizontal muestra el valor inicial. Las líneas discontinuas verticales muestran el inicio y el final de la diafiltración. La adición de 2-MEA coincidió con un descenso en el pH al comienzo de la carrera. El pH se ajustó a 5,0 justo antes de la diafiltración frente al tampón de pH 5,0. El pH se reajustó a 7,4 después de la incubación O/N.

Figura 93: Análisis SDS-PAGE (no reducido) durante la reducción y la reoxidación. Las muestras tomadas durante la reducción y la reoxidación de IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R (mezcla 1:1) se analizaron mediante análisis SDS-PAGE no reducido. M: Marcador del PM; C: IgG 1 control; carril 1: antes de la adición de 2-MEA; carriles 2, 3, 4 y 5: después de 30 min, 1 hora, 2 horas y 3 horas de reducción, carriles 6, 7, 8, 9 y 10: resultados de la diafiltración después de 1, 2, 3, 5 y 7 l de tampón diafiltrado, carriles 11 y 12: 1 hora de incubación O/N tras la diafiltración, carriles 13, 14 y 15: inmediatamente y 1 y 2 horas después de la adición de Tris. Las masas de los marcadores del peso molecular se indican a la izquierda. Las especies de IgG reducidas/reoxidadas están indicadas por H (cadena pesada) y/o L (cadena ligera) y sus combinaciones.

Figura 94: Perfiles CIEX durante la reducción y reoxidación. Las muestras tomadas durante la reducción y la reoxidación de IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R (mezcla 1:1) se analizaron mediante CIEX analítico. Las muestras se tomaron en los puntos de tiempo indicados y se congelaron instantáneamente hasta el análisis CIEX.

Figura 95: Oxígeno disuelto y potencial redox después de la adición de cistamina. La saturación de oxígeno y el potencial redox tras la adición de cistamina a IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R (mezcla 1:1) se siguieron utilizando una sonda redox y una sonda de OD.

Figura 96: Perfiles de CIEX tras la adición de cistamina. Las muestras tomadas tras la adición de cistamina a IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R se analizaron mediante CIEX analítico. Las muestras se tomaron a los puntos de tiempo indicados. **Figura 97: Perfiles de CIEX de reducción usando cisteína 10 mM.** Las muestras se cargaron en la columna cada 55 minutos y se analizaron mediante CIEX analítico. Se muestran los perfiles seleccionados,, se indican los tiempos de incubación.

Figura 98: Perfiles CIEX de reducción a cisteína 25 mM. Las muestras se cargaron en la columna cada 55 minutos y se analizaron mediante CIEX analítico. Se muestran los perfiles seleccionados,, se indican los tiempos de incubación.

Figura 99: Perfiles CIEX de reducción a cisteína 50 mM. Las muestras se cargaron en la columna cada 55 minutos y se analizaron mediante CIEX analítico. Se muestran los perfiles seleccionados,, se indican los tiempos de incubación.

Figura 100: Perfiles CIEX de reducción a cisteína 75 mM. Las muestras se cargaron en la columna cada 55 minutos y se analizaron mediante CIEX analítico. Se muestran los perfiles seleccionados,, se indican los tiempos de incubación.

Figura 101: Perfiles CIEX de reducción a cisteína 100 mM. Las muestras se cargaron en la columna cada 55 minutos y se analizaron mediante CIEX analítico. Se muestran los perfiles seleccionados,, se indican los tiempos de incubación.

Figura 102: Perfil CIEX después de la reducción con cisteína, eliminación de cisteína e incubación. Se muestra el perfil CIEX después de la reducción durante 385 minutos en cisteína 50 mM a 30 °C, seguido de la eliminación de la cisteína mediante una columna de desalinización y la posterior incubación durante 2 horas y 18 horas.

Figura 103: Perfil CIEX de los homodímeros restantes y el anticuerpo biespecífico recién formado después de la elución de la columna reductora inmovilizada. Se añadió una mezcla de homodímeros IgG1-2F8-F405L e IgG1-7D8-K409R a una columna reductora inmovilizada, se incubó y se eluyó. La formación de anticuerpos biespecíficos se analizó mediante CIEX analítica.

Figura 104: Alotipo ELISA para la detección de anticuerpos biespecíficos. Una mezcla de IgG1m (f) - K409R-CD20 e IgG1m(za) -F405L-EGFR se incubó con 2-MEA 25 mM a 37 °C durante 90 minutos. La formación de anticuerpos biespecíficos se midió en un ELISA de tipo sándwich. La densidad óptica a 405 nm se representa en el eje Y como una medida para la formación de anticuerpos IgG1 m(f, za)-CD20xEGFR biespecíficos. Se incluyó un anticuerpo IgG1 m(fa) como control positivo.

Figura 105: Análisis de CIEX después de SNEEP. El análisis de CIEX se realizó después de SNEEP en el que se añadió IgG1-7D8-AAA-K409R en exceso. La cuantificación mostró que había un 11,4 % de IgG1-7D8-AAA-K409R (*), 88,5 % de anticuerpo biespecífico y solo 0,1 % de homodímero IgG1-2F8-F405L (+) presente después de la reacción de intercambio.

Figura 106: Análisis CIEX después de SNEEP. El análisis CIEX se realizó después de SNEEP en el que se utilizó IgG1-2F8-F405R en exceso. La cuantificación mostró que había 0,4 % de IgG1-7D8-K409R (*), 88,4 % de anticuerpo biespecífico y 11,2 % de IgG1-2F8-F405L (+) presente después de la reacción de intercambio.

Figura 107: Análisis CIEX después de SNEEP. Se realizó análisis CIEX después de SNEEP en el que se añadió IgG1-7D8-AAA-K409R en exceso. La cuantificación indicó que había 25,5 % de IgG1-7D8-AAA-K409R (*), 73,3 % de anticuerpo biespecífico y 1,2 % de IgG1-2F8-F405L (+) presente después de la reacción de

intercambio. Obsérvese que el porcentaje de homodímero IgG1-2F8-F405L se redujo aún más en condiciones de intercambio óptimas (Figura 105).

Figura 108: Perfil de la proteína A rápida de cromatografía líquida de proteínas (FPLC). Perfil FPLC de proteína A del anticuerpo biespecífico producido después del intercambio utilizando un exceso del 50 % del homodímero IgG1-7D8-AAA-K409R. En el eje izquierdo se muestra la señal de A_{280} en mAU (trazo negra), en el eje derecho el pH (trazo gris). La espiga entre los dos picos marcados representa una burbuja de aire al inicio del fraccionamiento.

Figura 109: Análisis de CIEX de la fracción de flujo (pico indicado con * en la Figura 108). No se detectaron anticuerpos biespecíficos (tiempo de retención ~ 16,4 minutos) ni IgG1-2F8-F405L (tiempo de retención ~ 19,2 minutos); el pico a los 13,6 minutos corresponde al homodímero IgG1-7D8-AAA-K409R (no unión).

Figura 110: Análisis CIEX del producto eluido (pico indicado con + en la Figura 108). El pico a los 16,4 minutos corresponde al anticuerpo biespecífico, no se detectó ningún pico a 13,6 (IgG1-2F8-F405L) y se detectó un pequeño pico a los 19,2 minutos (IgG1-2F8-F405L) (1,4 %). Esto demostró que se puede usar un SNEEP en combinación con pulido de proteína A para eliminar el homodímero residual.

Figura 111: Cromatograma FPLC de IgG1-b12-F405L e IgG1-058-K409R conjuntamente purificadas con Proteína A. El trazo muestra la señal de A_{280} . La carga se observa como un aumento en la señal de A_{280} después de - 5 ml. El inicio de las etapas de lavado y elución está marcado con una flecha. Se observó un pico de postelución a 100 ml durante la primera etapa de regeneración de bajo pH. Este pico no se analizó, pero indica impurezas de proteínas minoritarias.

Figura 112: Perfil CIEX de IgG1-058-K409R (*) e IgG1-b12-F405L (+) conjuntamente purificadas con Proteína A.

Figura 113: Perfil HP-SEC del anticuerpo biespecífico producido a partir de IgG1-b12-F405L e IgG1-058-K409R conjuntamente purificadas con Proteína A. El pico a los 7,5 minutos (*) corresponde a especies diméricas, el pico a los 9,0 minutos a especies monoméricas (+).

Figura 114: Perfil CIEX del anticuerpo biespecífico producido a partir de IgG1-b12-F405L e IgG1-058-K409R conjuntamente purificadas con Proteína A. El pico a los 26 minutos (*) corresponde al anticuerpo biespecífico; el pico a los 36 minutos corresponde al homodímero IgG1-b12-F405L (+). No se detectó IgG1-058-K409R.

Figura 115: Perfil de FPLC de una mezcla 1:1:1 de anticuerpo biespecífico y homodímeros. Perfil de FPLC de mezcla 1:1:1 de IgG1-7D8-K409R (*), el anticuerpo biespecífico (+) y la IgG1-2F8-F405L (#) se separaron en una columna WCIEX en condiciones casi isocráticas (solo la elución de la IgG1-2F8-F405L se aceleró ligeramente por un gradiente poco profundo).

Figura 116: Resolución calculada. La resolución calculada (R , calculada utilizando la Ecuación 5) se muestra para los tampones de citrato y fosfato. Se encontró una resolución óptima para citrato 20 mM pH 6,4. Se pensó que una resolución de 1,75-2,00 era aceptable para una separación satisfactoria (John W. Dolan, Peak Tailing and Resolution, LC Resources Inc., Walnut Creek, California, EE. UU.).

Figura 117: Perfil de FPLC. Perfil de FPLC del anticuerpo biespecífico IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R (*)enriquecido con un 10 % del homodímero IgG1-2F8-F405L (+) a pH 6,4, citrato 20 mM. La carga fue de 4,4 mg/ml de resina.

Figura 118: Perfil CIEX del anticuerpo biespecífico IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R. Se muestra el perfil CIEX de IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409R indicado por el asterisco (*) en la Figura 117. Los porcentajes del homodímero IgG1-7D8-K409R (*), el anticuerpo biespecífico y el homodímero IgG1-2F8-F405L (+) fueron 4,3, 94,8 y 0,9. El homodímero IgG1-7D8-K409R fue un homodímero residual del lote original que se enriqueció con IgG1-2F8-F405L.

Figura 119: Cromatograma en FPLC. A) Perfil de elución de la proteína A de 20 mg de anticuerpo biespecífico en PBS con 2-MEA 75 mM (volumen total 3 ml). La línea continua es la señal de A_{254} (eje izquierdo), la línea discontinua la señal de A_{280} (eje izquierdo), la línea larga discontinua-de puntos es el pH (valores no mostrados, el pH bajó de 7,4 a 3,0 a ~ 65 ml y está indicado solo como referencia). **B)** PBS con 2-MEA 75 mM (volumen total 3 ml) cargado en proteína A. La línea continua es la señal de A_{254} (eje izquierdo), la línea discontinua la señal de A_{280} (eje izquierdo), la línea larga discontinua-de puntos es el pH (valores no mostrados, el pH bajó de 7,4 a 3,0 a ~ 40 ml y está indicado solo como referencia).

Figura 120: Determinación del punto de ruptura. A) El punto de avance (indicado en la figura con una flecha) se determinó antes (panel izquierdo) y después (panel derecho) de la exposición de la columna de proteína A 2-MEA. Se cargó IgG1-7D8-K409R (5 mg/ml) usando un tiempo de residencia de 1 minuto. Tanto antes como después de la exposición a 2-MEA 75 mM, el punto de ruptura fue de ~ 15 ml, lo que indica que el rendimiento de la columna no se vio muy afectado por la presencia de 2-MEA. Los datos mostrados son valores de A_{280} (mAU). B) Zoom de A) con ambas trazas superpuestas.

Figura 121: Análisis SDS-PAGE reducido de la proteína eluida después de la eliminación de 2-MEA. Los carriles contienen marcador, anticuerpo de control (IgG1-b12), la mezcla de reacción biespecífica en presencia de 2-MEA antes de la carga de la columna y producto final después de la eliminación de 2-MEA. No se detectó proteína A, lo que indica que la columna se mantuvo intacta. Las cadenas pesadas y ligeras se indican mediante flechas, el peso molecular esperado de la proteína A (45 kDa) se indica con un asterisco (*).

Figura 122: Perfil CIEX del anticuerpo biespecífico lambda-kappa. El lugar donde se esperaba el anticuerpo BMA 031-K409R que contenía una cadena ligera λ se indica con un signo más (+) y no se detectó ningún pico, el anticuerpo IgG1-2F8-F405L con una cadena ligera κ se indica con un asterisco (*). El anticuerpo biespecífico está en el medio. Los porcentajes de BMA 031-K409R, el anticuerpo biespecífico e IgG1-2F8-F405L fueron 11,2, 88,8

5 y 0, respectivamente.

Figura 123: Datos de A₂₈₀ de anticuerpos biespecíficos (negro), IgG1-7D8-K409R (gris) e IgG1-2F8-F405L (blanco) después del almacenamiento durante diferentes períodos de tiempo y a diferentes temperaturas. Las mediciones de la A₂₈₀ se realizaron en el Nanodrop y los resultados se dan como A₂₈₀ (AU) a una longitud de trayectoria de 1 mm.

Figura 124: SDS-PAGE no reducido de anticuerpo biespecífico (D), IgG1-7D8-K409R (1) e IgG1-2F8-F405L (2) a t = 0 y t = 12 meses a 2 - 8 °C y a 25 °C. C = control interno del ensayo de IgG1.

Figura 125: SDS-PAGE reducido del anticuerpo biespecífico (D), IgG1-7D8-K409R (1) e IgG1-2F8-F405L (2) a t = 0 y t = 12 meses a 2-8 °C y a 25 °C. C = control interno del ensayo de IgG1.

Figura 126: SDS-PAGE no reducido del anticuerpo biespecífico (D), IgG1-7D8-K409R (1) e IgG1-2F8-F405L (2) a t = 0 y t = 3 meses a 40 °C. C = control interno del ensayo de IgG1.

Figura 127: SDS-PAGE reducido del anticuerpo biespecífico (D), IgG1-7D8-K409R (1) e IgG1-2F8-F405L (2) a t = 0 y t = 3 meses a 40 °C. C = control interno del ensayo de IgG1.

Figura 128: Cromatogramas de HP-SEC de anticuerpo biespecífico (continuo), IgG1-7D8-K409R (rayado) e IgG1-2F8-F405L (punteado). Las condiciones de almacenamiento fueron A: t = 0; B: t = 12 meses a 2 - 8 °C; C: t = 12 meses a 25 °C y D: t = 3 meses a 40 °C.

Figura 129: Cromatogramas CIEX de anticuerpo biespecífico (continuo), IgG1-7D8-K409R (rayado) e IgG1-2F8-F405L (punteado). Las condiciones de almacenamiento son A: t = 0; B: t = 12 meses a 2 - 8 °C; C: t = 12 meses a 25 °C. (Nota: la diferencia en el tiempo de retención de los materiales a t = 0 en comparación con t = 12 meses podría deberse a pequeños cambios en la composición del tampón y/o al uso de un lote de columna diferente. El análisis de un control interno de IgG1 en cada carrera también mostró un cambio de +1,64 min a t = 12 meses en comparación con t = 0, no se muestran los datos).

25 Descripción detallada de la invención

Definiciones

El término "inmunoglobulina" se refiere a una clase de glicoproteínas relacionadas estructuralmente que consiste en dos pares de cadenas polipeptídicas, un par de cadenas ligeras (L) de bajo peso molecular y un par de cadenas pesadas (H), las cuatro interconectadas mediante enlaces disulfuro. La estructura de las inmunoglobulinas ha sido bien caracterizada. Véase, por ejemplo, Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2^a ed. Raven Press, N. Y. (1989)). En resumen, cada cadena pesada está compuesta normalmente por una región variable de la cadena pesada (abreviada en el presente documento como VH) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende normalmente tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Las cadenas pesadas están interconectadas a través de enlaces disulfuro en la llamada "región bisagra". Cada cadena ligera está compuesta normalmente por una región variable de la cadena ligera (abreviada en el presente documento como VL) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de cadena ligera comprende normalmente un dominio, CL. Normalmente, la numeración de los restos de aminoácidos en la región constante se realiza de acuerdo con el índice de la UE tal como se describe en Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^a Ed. Public Health 40 Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991). La Figura 16 proporciona una descripción general de la numeración de la UE y Kabat para diferentes formas de isotipo del anticuerpo 2F8 (documento WO 02/100348). Las regiones VH y VL se pueden subdividir adicionalmente en regiones de hipervariabilidad (o regiones hipervariables, que pueden ser hipervariables en secuencia y/o en forma de bucles estructuralmente definidos), también llamadas regiones determinantes de complementariedad (CDR, de sus siglas en inglés), intercaladas con regiones que están 45 más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL está compuesta normalmente de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (véase también Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196, 901 917 (1987)).

50 Cuando se usa en el presente documento, el término "brazo del Fab" se refiere a un par de cadena pesada-cadena ligera de un anticuerpo.

Cuando se usa en el presente documento, el término "región Fc" o "dominio Fc" se refiere a una región de anticuerpo que comprende al menos la región bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3 (véase, por ejemplo, Kabat EA, en el Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, Publicación NIH n.º 91-3242, 55 Edn. 5^a edición 662, 680, 689 (1991). La región Fc puede generarse por digestión de un anticuerpo con papaína, donde la región Fc es el fragmento obtenido de ese modo, que incluye las dos regiones CH2-CH3 de una inmunoglobulina y una región bisagra. El dominio constante de una cadena pesada de anticuerpo define el isotipo del anticuerpo, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgE. El dominio Fc media las funciones efectoras de los anticuerpos con receptores de la superficie celular llamados receptores Fc y proteínas del sistema del complemento.

60 Con el término "región CH2" o "dominio CH2" tal como se usa en el presente documento se pretende hacer referencia a la región CH2 de una inmunoglobulina. Así, por ejemplo, la región CH2 de un anticuerpo IgG1 humano corresponde a los aminoácidos 228-340 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE. Sin embargo, la región CH2 también puede ser cualquiera de los otros isotipos de anticuerpos como se describe en el presente documento.

Con el término "región CH3" o "dominio CH3" tal como se usa en el presente documento se pretende hacer referencia a la región CH3 de una inmunoglobulina. Así, por ejemplo, la región CH3 de un anticuerpo IgG1 humano corresponde a los aminoácidos 341-447 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE. Sin embargo, la región CH3 también puede ser cualquiera de los otros isotipos de anticuerpos como se describe en el presente documento.

5 El término "anticuerpo" (Ab) en el contexto de la presente invención se refiere a una molécula de inmunoglobulina, un fragmento de una molécula de inmunoglobulina o un derivado de cualquiera de ellas, que tiene la capacidad de unirse específicamente a un antígeno en condiciones fisiológicas típicas con una semivida de períodos de tiempo significativos, tal como al menos aproximadamente 30 minutos, al menos aproximadamente 45 minutos, al menos una hora (h), al menos aproximadamente dos horas, al menos aproximadamente cuatro horas, al menos 10 aproximadamente ocho horas, al menos aproximadamente 12 horas (h), aproximadamente 24 horas o más, aproximadamente 48 horas o más, aproximadamente tres, cuatro, cinco, seis, siete o más días, etc. o cualquier otro período relevante definido funcionalmente (como un tiempo suficiente para inducir, promover, potenciar y/o modular una respuesta fisiológica asociada con la unión del anticuerpo al antígeno y/o el tiempo suficiente para que el anticuerpo reclute una actividad efectora). Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de la molécula de inmunoglobulina contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos (Ab) pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del huésped, incluyendo varias células del sistema inmunológico (como las células efectoras) y componentes del sistema del complemento, tal como C1q, el primer componente en la vía clásica de activación del complemento. Un anticuerpo también puede 15 ser un anticuerpo biespecífico, diacuerpo o molécula similar. El término "anticuerpo biespecífico" se refiere a un anticuerpo que tiene especificidades para al menos dos epítopos diferentes, típicamente, los epítopos que no se superponen o un anticuerpo que contiene dos sitios de unión a antígeno distintos. Tal como se ha indicado anteriormente, el término anticuerpo en el presente documento, a menos que se indique lo contrario o sea 20 claramente contradicho por el contexto, incluye fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente al antígeno. Tales fragmentos pueden ser provistos por cualquier técnica conocida, tal como escisión enzimática, síntesis peptídica y técnicas de expresión recombinante. Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo se puede realizar mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa, por ejemplo, fragmentos Fab o F (ab')2. También debe entenderse que el término anticuerpo, a menos que se especifique otra cosa, también incluye anticuerpos policloniales, anticuerpos monoclonales (mAb), polipéptidos 25 similares a anticuerpos, tales como los anticuerpos químéricos y los anticuerpos humanizados. Un anticuerpo tal como se genera puede poseer cualquier isótipo.

30

35 La expresión "anticuerpo de longitud completa" cuando se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que contiene todos los dominios constante y variable de la cadena pesada y ligera que normalmente se encuentran en un anticuerpo de ese isótipo.

Como se usa en el presente documento, "isotipo" se refiere a la clase de inmunoglobulina (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE o IgM) que está codificada por los genes de la región constante de la cadena pesada.

40 La expresión "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes procedentes de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria y de sitio *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*). Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", como se usa en 45 el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que las secuencias CDR procedentes de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado en secuencias marco humanas.

50 Cuando se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo de cadena pesada" se refiere a un anticuerpo que consiste solo en cadenas pesadas y carece de las cadenas ligeras que generalmente se encuentran en los anticuerpos. Los anticuerpos de cadena pesada, que se producen de forma natural en, por ejemplo, camélidos, puede 55 unirse a antígenos a pesar de tener solo dominios VH.

60 El término "epítopo" significa un determinante de proteína capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. Los epítopos generalmente consisten en agrupaciones superficiales de moléculas, tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y usualmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítopos conformacionales y no conformacionales se distinguen porque la unión a los primeros, pero no los últimos, se pierde en presencia de disolventes desnaturalizantes. El epítopo puede 65 comprender restos de aminoácidos implicados directamente en la unión y otros restos de aminoácidos, que no están directamente implicados en la unión, tales como restos de aminoácidos que están bloqueados de manera efectiva por el péptido de unión a antígeno (en otras palabras, el resto de aminoácido está dentro de la huella del péptido de unión a antígeno).

Como se usa en el presente documento, el término "unión" en el contexto de la unión de un anticuerpo a un antígeno predeterminado típicamente es una unión con una afinidad correspondiente a una K_D de aproximadamente 10^{-6} M o menos, por ejemplo, 10^{-7} M o menos, tal como aproximadamente 10^{-8} M o menos, tal como aproximadamente 10^{-9} M o menos, aproximadamente 10^{-10} M o menos o aproximadamente 10^{-11} M o incluso menos cuando se determina, por

ejemplo, mediante tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR) en un instrumento BIACore 3000 que utiliza el antígeno como ligando y el anticuerpo como analito, y en el que el anticuerpo se une al antígeno predeterminado con una afinidad correspondiente a una K_D que es al menos diez veces menor, tal como al menos 100 veces menor, por ejemplo, al menos 1.000 veces menor, tal como al menos 10.000 veces menor, por ejemplo, al 5 menos 100.000 veces menor que su afinidad de unión a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) distinto del antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado. La cantidad con la que la afinidad es menor depende de la K_D del anticuerpo, de modo que cuando la K_D del anticuerpo es muy baja (es decir, el anticuerpo es altamente específico), la cantidad con la cual la afinidad por el antígeno es menor que la afinidad por un antígeno no específico puede ser al menos 10.000 veces. El término " K_D " (M), como se usa en el presente 10 documento, se refiere a la constante de equilibrio de disociación de una interacción particular anticuerpo-antígeno.

Cuando se usa en el presente documento, el término "interacción heterodimérica entre la primera y la segunda 15 regiones CH3" se refiere a la interacción entre la primera región CH3 y la segunda región CH3 en una proteína heterodimérica primera CH3/segunda CH3.

Cuando se usa en el presente documento, la expresión "interacciones homodiméricas de la primera y segunda 20 regiones CH3" se refiere a la interacción entre una primera región CH3 y otra primera región CH3 en una proteína homodimérica primera CH3/primera CH3 y la interacción entre una segunda región CH3 y otra segunda región CH3 en una proteína homodimérica segunda CH3/segunda CH3.

Un "anticuerpo aislado", como se usa en el presente documento, indica que el material se ha eliminado de su 25 ambiente original (por ejemplo, el ambiente natural si se produce de forma natural o la célula huésped si se expresa de forma recombinante). También es ventajoso que los anticuerpos estén en forma purificada. El término "purificado" no requiere pureza absoluta; más bien, se pretende como una definición relativa, lo que indica un aumento de la concentración de anticuerpos en relación con la concentración de contaminantes en una composición en comparación con el material de partida.

La expresión "célula huésped", como se usa en el presente documento, se refiere a una célula en la que se ha 30 introducido un vector de expresión recombinante, por ejemplo, un vector de expresión que codifica un anticuerpo de la invención. Las células huésped recombinantes incluyen, por ejemplo, transfectomas, tales como células CHO, células HEK293, células NS/0 y células linfocitarias.

Cuando se usa en el presente documento, el término "coexpresión" de dos o más construcciones de ácido nucleico, 35 se refiere a la expresión de las dos construcciones en una sola célula huésped.

La expresión "proteína de células tumorales", como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína ubicada en la superficie celular de una célula tumoral.

Como se usa en el presente documento, la expresión "célula efectora" se refiere a una célula inmunitaria que está 40 implicada en la fase efectora de una respuesta inmunitaria, en contraposición con las fases innata y de activación de una respuesta inmunitaria. Las células inmunitarias ejemplares incluyen una célula de origen mieloide o linfoide, por ejemplo, linfocitos (tales como linfocitos B y linfocitos T, incluyendo linfocitos T citolíticos (CTL)), células citolíticas, linfocitos citolíticos naturales, macrófagos, monocitos, eosinófilos, células polimorfonucleares, tales como neutrófilos, 45 granulocitos, mastocitos y basófilos. Algunas células efectoras expresan receptores de Fc específicos y llevan a cabo funciones inmunitarias específicas. En algunas realizaciones, una célula efectora es capaz de inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), tal como una célula asesina natural. En algunas realizaciones, una célula efectora puede fagocitar un antígeno diana o una célula diana.

La expresión "condiciones reductoras" o "ambiente reductor" se refiere a condiciones suficientes para permitir la 50 reducción de los enlaces disulfuro intercatenarios en la región bisagra de un anticuerpo.

La referencia a las posiciones de aminoácidos en la presente invención es, a menos lo contradiga el contexto, de acuerdo con el índice de la UE como se describe en Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991).

55 El término "rpm" o "RPM" se refiere a revoluciones por minuto y puede indicarse como rpm o RPM en el contexto de la presente invención.

El alcance de la invención se define en las reivindicaciones.

60 **Método de la presente invención y divulgación**

La presente divulgación se refiere a un método *in vitro* para la producción de una proteína heterodimérica que comprende las etapas:

65 a) incubar una primera proteína homodimérica con una segunda proteína homodimérica en condiciones

reductoras suficientes para permitir la reducción de los enlaces disulfuro intracatenarios en la región bisagra y en el que dicha primera proteína homodimérica comprende una región Fc de una inmunoglobulina, comprendiendo dicha región Fc una primera región CH3 y dicha segunda proteína homodimérica comprende una región Fc de una inmunoglobulina, comprendiendo dicha región Fc una segunda región CH3 y en la que las secuencias de dichas primera y segunda regiones CH3 son diferentes y son tales que la interacción heterodimérica entre dicha primera y segunda regiones CH3 es más fuerte que cada una de las interacciones homodiméricas de dicha primera y segunda regiones CH3,

5 10 b) someter la composición obtenida de la etapa a) a condiciones oxidantes suficientes para permitir la oxidación de las cisteínas en la proteína heterodimérica a enlaces disulfuro intercatenarios

La etapa a) de la presente divulgación puede comprender, alternativamente, las etapas de:

15 z) proporcionar una primera construcción de ácido nucleico que codifica un primer polipéptido que comprende una primera región Fc de una inmunoglobulina, comprendiendo dicha primera región Fc una primera región CH3,

y) proporcionar una segunda construcción de ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido que comprende una segunda región Fc de una inmunoglobulina, comprendiendo dicha segunda región Fc una primera región CH3,

20 25 en el que las secuencias de dichas primera y segunda regiones CH3 son diferentes y son tales que la interacción heterodimérica entre dichas primera y segunda regiones CH3 es más fuerte que cada una de las interacciones homodiméricas de dichas primera y segunda regiones CH3, y

en el que dicha primera proteína homodimérica tiene un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409 y dicha segunda proteína homodimérica tiene una sustitución de aminoácido en una posición seleccionada del grupo que consiste en: 366, 368, 370, 399, 405 y 407, y/o

30 35 en el que las secuencias de dichas primera y segunda regiones CH3 son tales que las constantes de disociación de las interacciones homodiméricas de cada una de las regiones CH3 están entre 0,01 y 10 micromolar, tal como entre 0,05 y 10 micromolar, más preferentemente entre 0,01 y 5, tal como entre 0,05 y 5 micromolar, aún más preferentemente entre 0,01 y 1 micromolar, tal como entre 0,05 y 1 micromolar, entre 0,01 y 0,5 o entre 0,01 y 0,1 cuando se analiza como se describe en el Ejemplo 21.

z) coexpresar dichas primera y segunda construcciones de ácido nucleico en una célula huésped.

35 En una realización adicional, la etapa z) comprende además coexpresar una o más construcciones de ácido nucleico que codifican una cadena ligera en dicha célula huésped.

40 El método de la presente divulgación es particularmente adecuado cuando se producen volúmenes más grandes de proteína heterodimérica.

Por lo tanto, en una realización particular, la etapa b) puede comprender:

b) someter al menos 10 ml de la composición obtenida de la etapa a) a condiciones oxidantes suficientes para permitir la oxidación de las cisteínas en la proteína heterodimérica a enlaces disulfuro intercatenarios.

45 En una realización, el método de la presente divulgación comprende además una etapa de obtención de la proteína heterodimérica, por ejemplo, el método de la presente divulgación puede comprender una etapa c):

c) obtener la proteína heterodimérica.

50 En una realización adicional, la etapa a) de la presente divulgación puede comprender las etapas de:

i) proporcionar una primera proteína homodimérica que comprende una región Fc de una inmunoglobulina, comprendiendo dicha primera región Fc una primera región CH3,

55 ii) proporcionar una segunda proteína homodimérica que comprende una región Fc de una inmunoglobulina, comprendiendo dicha región Fc una segunda región CH3, en la que las secuencias de dichas primera y segunda regiones CH3 son diferentes y son tales que la interacción heterodimérica entre dichas primera y segunda regiones CH3 es más fuerte que cada una de las interacciones homodiméricas de dichas primera y segunda regiones CH3,

60 iii) incubar dicha primera proteína junto con dicha segunda proteína en condiciones reductoras suficientes para permitir la reducción de los enlaces disulfuro intercatenarios en la región bisagra.

65 La primera y segunda proteínas homodiméricas se pueden producir y/o purificar juntas o por separado. Por ejemplo, si la primera y la segunda proteína homodimérica se producen por expresión en una célula huésped, la primera y la segunda proteína homodimérica se pueden producir en el mismo recipiente de reacción, por ejemplo, el mismo

- biorreactor. Si la primera y la segunda proteína homodimérica se producen en el mismo recipiente de reacción, dicha primera y segunda proteína homodimérica se pueden producir en la misma célula huésped o en diferentes células huésped. Como alternativa, la primera y la segunda proteína homodimérica se pueden producir en dos recipientes de reacción separados, por ejemplo, en dos biorreactores separados. Si la primera y segunda proteínas homodiméricas se producen en diferentes células huésped, dichas células huésped pueden derivar de la misma o de diferentes tipos de células. La producción en el mismo recipiente de reacción puede ser ventajosa por razones de coste o tiempo o para aprovechar las enzimas redox, tales como la tiorredoxina citosólica 1 y 2 (TXN1 y TXN2), liberada por las células huésped que expresan la primera y/o la segunda proteína homodimérica, que puede, en ciertas condiciones, por ejemplo, mediante lisis de un alto número de células viables de modo que las enzimas y los cofactores requeridos para la reducción se liberen combinados con una concentración de oxígeno muy baja, catalizar la reducción de los enlaces disulfuro intercatenarios en la región bisagra de la primera y la segunda proteína homodimérica y, de ese modo, facilitar el intercambio de cadenas pesadas en el biorreactor o en la siguiente etapa de recolección (Kao et al., 2010, Biotechnol. Bioeng. 107; 622-632). Por lo tanto, en una realización adicional, la etapa a) de la presente invención puede realizarse en el mismo recipiente de reacción que la producción de la primera y/o la segunda proteína homodimérica. En una realización adicional, la etapa b) también puede realizarse en el mismo recipiente de reacción que la etapa a) o en el mismo recipiente de reacción que la etapa a) y la producción de la primera y/o la segunda proteína homodimérica. En este caso, el oxígeno y los iones metálicos divalentes ya presentes en la reacción también pueden estimular el proceso de reoxidación de la etapa b).
- Otras condiciones para la producción de la primera y/o la segunda proteína homodimérica incluyen cualquiera de las descritas en relación con la etapa a). La producción de la primera y segunda proteína homodimérica en lotes separados puede ser ventajosa desde un punto de vista de control (más fácil de reproducir y/o determinar la calidad de cada homodímero) o si se utiliza uno de los homodímeros para crear múltiples anticuerpos biespecíficos diferentes al combinarlo con un número de otros homodímeros diferentes.
- En una realización adicional, la primera y/o la segunda proteína homodimérica se pueden purificar antes de la incubación en la etapa a). Los métodos para la purificación de proteínas homodiméricas incluyen, entre otros, cromatografía de proteína A y proteína G (u otras formas de cromatografía de afinidad), cromatografía de afinidad basada en, por ejemplo, anticuerpos de unión a antígeno o antiidiotípicos, intercambio iónico, interacciones hidrófobas, kappa o lambda determinadas, tioafinidad y cromatografía de hidroxiapatita y otras resinas de modo mixto. Otros métodos de purificación incluyen, pero sin limitaciones, precipitación con, por ejemplo, sales o polietilenglicol para obtener proteína purificada. También se contempla la combinación de diferentes métodos de purificación.
- Si la primera y la segunda proteínas homodiméricas se producen por separado, la primera y la segunda proteínas homodiméricas también se pueden purificar por separado.
- En una realización alternativa, si la primera y la segunda proteína homodimérica se producen por separado, pueden purificarse juntas, por ejemplo, mediante purificación de la proteína A. La purificación de la primera y la segunda proteína homodimérica juntas puede proporcionar cierta eficiencia operativa y/o económica.
- Si la primera y la segunda proteínas homodiméricas se producen juntas, la primera y la segunda proteínas homodiméricas también se pueden purificar juntas por ejemplo, por ejemplo, mediante purificación de la proteína A.
- Mediante la purificación de la primera y/o la segunda proteínas homodiméricas antes de la etapa a) puede ser posible eliminar componentes que pueden afectar a la velocidad o extensión de una o más etapas del método; tal como el proceso de reducción y/o intercambio de la etapa a) y/o el proceso de oxidación de la etapa b), o que puede afectar adicional o alternativamente a la calidad de la proteína heterodimérica. Tal como se ha descrito anteriormente, la primera y la segunda proteína homodimérica se pueden producir por separado o juntas. Así, si la primera y la segunda proteínas homodiméricas se producen juntas, dicha primera y segunda proteína homodimérica pueden, en particular, purificarse juntas. Si la primera y la segunda proteína homodimérica se producen por separado, la primera y/o la segunda proteína homodimérica pueden purificarse por separado o juntas, por ejemplo, combinando la primera y la segunda proteína homodimérica y posteriormente purificándolas.
- En una realización adicional, la primera y/o la segunda proteína homodimérica pueden estar presentes en una solución o tampón. Si, por ejemplo, este tampón no es óptimo para el rendimiento del proceso de reducción e intercambio que tiene lugar en la etapa a), el tampón puede ser reemplazado con otra solución o tampón. Por lo tanto, en una realización adicional, el método de la presente divulgación puede comprender además una etapa de sustitución de la solución o tampón en la que la primera y/o segunda proteína homodimérica está en otra solución o tampón antes de la etapa a).
- En una realización adicional, la proteína heterodimérica se puede purificar. Los métodos para la purificación de la proteína heterodimérica pueden incluir, pero sin limitación, cualquiera de los descritos en el presente documento. Los métodos relevantes para la purificación de la proteína heterodimérica incluyen, pero sin limitaciones, cromatografía de proteína A y proteína G (u otras formas de cromatografía de afinidad), cromatografía de afinidad basada en, por ejemplo, anticuerpos de unión a antígeno o antiidiotípicos, intercambio iónico, interacciones

hidrófobas, kappa o lambda determinadas, tioafinidad y cromatografía de hidroxiapatita y otras resinas de modo mixto. Otros métodos utilizan la precipitación con, por ejemplo, sales o polietilenglicol en lugar de cromatografía para obtener proteína purificada.

- 5 Por lo tanto, el método de la presente divulgación puede comprender además una etapa de purificación de la proteína heterodimérica. Al purificar la proteína heterodimérica es posible eliminar el exceso de reactivos, tales como el agente reductor, y las impurezas. La purificación de la proteína heterodimérica también puede incluir la eliminación de la primera y/o segunda proteína homodimérica residual. Como se describe a continuación, el exceso de la primera o la segunda proteína homodimérica se puede usar en la etapa a) para facilitar la eliminación de la primera y/o la segunda proteína homodimérica residual.
- 10

La etapa de purificar la proteína heterodimérica puede estar entre las etapas a) y b), pero, para la mayoría de los fines, puede ser típicamente después de la etapa b).

- 15 Si la primera o segunda proteína homodimérica ha sido modificada, por ejemplo, la primera o segunda región CH3 ha sido modificada, para reducir o eliminar la unión de la proteína A o la proteína G, la proteína heterodimérica de la presente invención se puede purificar en particular mediante cromatografía de la proteína A o proteína G. También se pueden utilizar otros métodos de purificación, por ejemplo, en combinación con cromatografía de proteína A y/o proteína G, tales otros métodos incluyen, pero sin limitaciones, otras formas de cromatografía de afinidad, cromatografía de afinidad basada en, por ejemplo, anticuerpos de unión a antígeno o antiidiotípicos, kappa o lambda determinadas, tioafinidad, intercambio iónico, interacciones hidrófobas, cromatografía de hidroxiapatita y otras resinas de modo mixto. Otros métodos utilizan la precipitación con, por ejemplo, sales o polietilenglicol en lugar de cromatografía para obtener proteína purificada.
- 20
- 25 La proteína heterodimérica puede, mediante la purificación o después de la purificación, formularse de manera adecuada para el almacenamiento de la proteína heterodimérica, por ejemplo, condiciones que aseguran la estabilidad de la proteína heterodimérica. Para anticuerpos heterodiméricos, tal formulación puede ser típicamente una solución o un tampón. Como alternativa, la proteína heterodimérica se puede liofilizar.
- 30 El equipo adecuado para el procedimiento del método de la presente invención es bien conocido por los expertos en la técnica. La expresión de anticuerpos homodiméricos por una célula huésped, por ejemplo, puede realizarse típicamente en un recipiente de reacción, tal como un biorreactor. Las etapas reductores y oxidantes a) y b) pueden, tal como se ha descrito anteriormente, tienen lugar en el mismo biorreactor que la expresión de la primera y/o la segunda proteína homodimérica o pueden tener lugar en un recipiente del reactor separado. De forma análoga, las etapas de reducción y oxidación a) y b) también pueden tener lugar en el mismo recipiente de reacción o pueden realizarse en recipientes reactores separados. Si las etapas de reducción y oxidación a) y b) tienen lugar en el mismo recipiente de reacción, las condiciones pueden cambiarse de la etapa a) a la etapa b) como se describe en el presente documento. El recipiente de reacción y los tubos del proceso de soporte pueden ser desechables o reutilizables y están hechos de materiales estándar (plástico, vidrio, acero inoxidable etc.). El recipiente de reacción
- 35
- 40 puede estar equipado con mezcla, rociado, gasificación del espacio de cabeza, control de temperatura y/o monitorizarse con sondas para medir la temperatura, el peso/volumen, el pH, el oxígeno disuelto (OD) y el potencial redox. Todas estas técnicas son comunes dentro de las operaciones unitarias estándar de una planta de fabricación y son bien conocidas por los expertos en la materia.
- 45 Las etapas individuales del método de la presente invención pueden realizarse como se describe en el presente documento.

En una realización, el método de la presente divulgación es un método extracelular. Como se ha descrito anteriormente, la producción de la primera y la segunda proteína homodimérica puede realizarse adecuadamente mediante expresión en una célula huésped. Por lo tanto, las etapas a), b) y c) pueden realizarse en una realización particular extracelularmente. En una realización adicional, la etapa a), la etapa b), la etapa c) y cualquier etapa entre cualquiera de las etapas a), b) y c) y cualquier etapa posterior también se pueden realizar de manera extracelular.

Primera y segunda proteína homodimérica

55 El método de la presente divulgación se puede usar de muchas maneras para generar combinaciones deseadas de proteínas heterodiméricas y es particularmente adecuado para la producción a gran escala de anticuerpos biespecíficos. Además de poder combinar anticuerpos dirigidos a diferentes antígenos para obtener una unión selectiva, se puede utilizar para cambiar una propiedad deseada, por ejemplo, para aumentar la CDC, mediante la combinación de dos anticuerpos diferentes dirigidos al mismo antígeno. Adicionalmente, se puede usar para eliminar la actividad agonista parcial de un anticuerpo antagonista o convertir un anticuerpo agonista en un anticuerpo antagonista haciendo un anticuerpo asimétrico del mismo con un anticuerpo irrelevante (inactivo).

65 En una realización, las proteínas homodiméricas se seleccionan del grupo que consiste en (i) una región Fc, (ii) un anticuerpo, (iii) una proteína de fusión que comprende una región Fc, tal como una región Fc fusionada a un receptor, citocina u hormona, y (iv) una región Fc conjugada con un profármaco, péptido, fármaco o una toxina.

- En algunas realizaciones, dicha primera y/o segunda proteína homodimérica comprenden, además de la región Fc, una o más o todas las otras regiones de un anticuerpo, es decir, una región CH1, una región VH, una región CL y/o una región VL. Por lo tanto, en una realización, dicha primera proteína homodimérica es un anticuerpo de longitud completa. En otra realización, dicha segunda proteína homodimérica es un anticuerpo de longitud completa.
- En una realización importante, dichas primera y segunda proteínas homodiméricas son ambas anticuerpos, preferentemente anticuerpos de longitud completa, y se unen a diferentes epítopos. En dicha realización, la proteína heterodimérica que se genera es un anticuerpo biespecífico. Dichos epítopos pueden localizarse en diferentes 10 antígenos o en el mismo antígeno.
- En otras realizaciones, sin embargo, solo una de las proteínas homodiméricas es un anticuerpo de longitud completa y la otra proteína homodimérica no es un anticuerpo de longitud completa, sino, por ejemplo, una región Fc, expresada junto con otra secuencia de proteínas o péptidos como un receptor, citocina u hormona o conjugada a un 15 profármaco, péptido, fármaco o una toxina. Si la primera y/o segunda proteína homodimérica es un anticuerpo, por ejemplo, anticuerpo de longitud completa, puede, en una realización, conjugarse con un profármaco, péptido, un fármaco o una toxina o contiene un grupo aceptor para el mismo. En una realización adicional, ninguna de las 20 proteínas homodiméricas es un anticuerpo de longitud completa. Por ejemplo, ambas proteínas homodiméricas pueden ser regiones Fc que se fusionan con otra secuencia de proteína o péptido como un receptor, citocina u hormona o conjugada a un profármaco, péptido, fármaco o una toxina. Esto puede usarse, por ejemplo, para producir una proteína heterodimérica que está conjugada a dos compuestos diferentes; por ejemplo, profármacos, péptidos, fármacos o toxinas, utilizando una primera y segunda proteína homodimérica en el método de la presente divulgación que se conjugan con dos compuestos diferentes; por ejemplo, profármacos, péptidos, fármacos o 25 toxinas. Esto también puede ser relevante en caso de que el proceso o la química de adición de un fármaco no sea compatible con añadir el otro fármaco, por tanto, el proceso de añadir cada uno de los dos fármacos a la primera y la segunda proteína homodimérica, respectivamente, se puede realizar por separado y antes del método de la presente divulgación.
- En una realización, la región Fc de la primera proteína homodimérica es similar o idéntica a una región Fc derivada de, o es de, un isotipo seleccionado del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 (con al menos la excepción de la o las mutaciones indicadas en el presente documento) y la región Fc de la segunda proteína homodimérica es similar o idéntica a una región Fc derivada de, o es de, un isotipo seleccionado del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 (con al menos la excepción de la o las mutaciones indicadas en el presente documento). En una 30 realización preferida, las regiones Fc de dicha primera y de dicha segunda proteína homodimérica son similares o idénticas a una región Fc derivada de, o es de, el isotipo IgG1 (con al menos la excepción de la o las mutaciones indicadas en el presente documento). En otra realización preferida, una de las regiones Fc de dichas proteínas homodiméricas es similar o idéntica a una región Fc derivada de, o es de, el isotipo IgG1 y el otro es similar o idéntico a una región Fc derivada, o es de, el isotipo IgG4 (con al menos la excepción de la o las mutaciones indicadas en el presente documento). En la última realización, la proteína heterodimérica resultante comprende una 35 región Fc de una IgG1 y una región Fc de una IgG4 y, por lo tanto, puede tener interesantes propiedades intermedias con respecto a la activación de las funciones efectoras. Se puede obtener un producto similar si dicha primera y/o dicha segunda proteína homodimérica comprende una mutación eliminando el sitio del aceptor para la glicosilación ligada a Asn o se manipula de otro modo para cambiar las propiedades de glicosilación.
- En una realización adicional, una o ambas de las proteínas homodiméricas se han modificado con glucosa para reducir la fucosa y así mejorar la ADCC, por ejemplo, por adición de compuestos a los medios de cultivo durante la proteína homodimérica, por ejemplo, anticuerpo, producción como se describe en el documento US2009317869 o como se describe en van Berkel et al. (2010) Biotechnol. Bioeng. 105:350 o usando células defectivas en FUT8, por ejemplo, como se describe en Yamane-Ohnuki et al (2004) Biotechnol. Bioeng 87: 614. La ADCC puede optimizarse 40 alternativamente usando el método descrito por Umaña et al. (1999) Nature Biotechnol 17: 176. Como alternativa, la primera y/o la segunda proteína homodimérica se pueden expresar en una célula huésped que no añade fucosa, por ejemplo, Biowa/KHK.
- En una realización adicional, una o ambas proteínas homodiméricas se han diseñado o modificado para mejorar la 45 activación del complemento, por ejemplo, como se describe en Natsume et al. (2009) Cancer Sci. 100: 2411.
- En una realización adicional, una o ambas proteínas homodiméricas se han diseñado para reducir o aumentar la unión al receptor Fc neonatal (FcRn) para manipular la semivida en suero de la proteína heterodimérica.
- En una realización adicional, una de las proteínas de partida homodiméricas se ha diseñado o modificado para que 50 no se una a la Proteína A o la Proteína G, o combinaciones de Proteína A y G, permitiendo así la separación de la proteína heterodimérica de dicha proteína de partida homodimérica pasando el producto sobre una columna de Proteína A o Proteína G. Esto puede ser útil en particular para realizaciones en las que se usa un exceso de una proteína homodimérica en relación con la otra proteína homodimérica como material de partida. En dichas 55 realizaciones, puede ser útil diseñar o modificar el sitio de unión a la Proteína A o la Proteína G de la proteína homodimérica que se utilizará en exceso para que se interrumpa su capacidad de unirse a dichas resinas. Este tipo

- de modificación incluye, pero sin limitaciones, las modificaciones en el dominio CH3 que se desvelan en el documento WO 2010/151792, incorporada por referencia en el presente documento. Por lo tanto, la primera o segunda proteína homodimérica de la presente divulgación puede comprender una o más de las modificaciones en el dominio CH3 descritas en el documento WO 2010/151792 que reduce o elimina la unión de la IgG a la proteína A.
- 5 Así, en una realización particular, la primera o la segunda proteína homodimérica de la presente divulgación puede comprender una modificación seleccionada del grupo que consiste en, pero sin limitaciones, a) 435R y b) 435R y 436F. En otra realización, la primera o segunda proteína homodimérica puede comprender las siguientes mutaciones: I253A, H310A y H435A (AAA), lo que también elimina la unión a la proteína A. Tras la reacción de heterodimerización, la proteína heterodimérica se puede separar luego de un excedente de proteína homodimérica
- 10 no intercambiada mediante el paso sobre una columna de proteína A. Si la proteína G se utiliza para la purificación de la proteína heterodimérica, la primera o segunda proteína homodimérica de la presente divulgación puede comprender una modificación seleccionada del grupo que consiste en, pero sin limitación, I253, S254, H433 y N434 (Sloan, D., et al., *Prot. Sci.* 1999; 8: 1643-1648; Sauer-Eriksson, E., et al., *Structure* 1995; 3:265-278). Tras la reacción de heterodimerización, la proteína heterodimérica se puede separar luego de un excedente de proteína homodimérica
- 15 no intercambiada mediante el paso sobre una columna de proteína G. Otros métodos de purificación incluyen cualquiera de los descritos en el presente documento. Por lo tanto, en una realización, la primera y la segunda proteínas homodiméricas pueden comprender diferentes cadenas ligeras, tales como las cadenas ligeras kappa y lambda, o la primera y segunda proteínas homodiméricas pueden ser de diferentes alotipos, tal como se describe en el presente documento.
- 20 En una realización adicional, una de las proteínas homodiméricas es (1) una región Fc o (2) un anticuerpo de longitud completa que reconoce un epítopo no relevante.
- 25 Las regiones variables a usar para el material de partida homodimérico de la presente invención pueden, por ejemplo, producirse mediante el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., *Nature* 256, 495 (1975), o pueden producirse por métodos de ADN recombinante. Las regiones variables también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos en fagos usando las técnicas descritas en, por ejemplo, Clackson et al., *Nature* 352, 624 628 (1991) y Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222, 581 597 (1991). Las regiones variables se pueden obtener de cualquier fuente adecuada. Por lo tanto, por ejemplo, pueden obtenerse regiones variables a partir de anticuerpos
- 30 monoclonales de hibridomas preparados a partir de linfocitos B esplénicos murinos obtenidos de ratones inmunizados con un antígeno de interés, por ejemplo, en forma de células que expresan el antígeno en la superficie o un ácido nucleico que codifica un antígeno de interés. Las regiones variables también pueden obtenerse a partir de anticuerpos monoclonales de hibridomas derivados de células que expresan anticuerpos de seres humanos inmunizados o de mamíferos no humanos, tales como ratas, perros, primates, etc.
- 35 La primera y/o la segunda proteína homodimérica pueden ser, por ejemplo, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado. En otra realización, una o ambas proteínas de partida homodiméricas, excepto para cualquier mutación especificada, es un anticuerpo humano. Los anticuerpos monoclonales humanos pueden generarse utilizando ratones transgénicos o transcromosómicos, por ejemplo, ratones HuMAb o ratones TC que llevan un minicromosoma
- 40 que codifica el repertorio completo o partes de las cadenas pesadas y ligeras humanas. El ratón HuMAb contiene un minilocus del gen de inmunoglobulina humana que codifica secuencias de inmunoglobulina de la cadena pesada (μ e y) y la cadena ligera k no reordenadas, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los loci endógenos de las cadenas μ y k (Lonberg, N. et al., *Nature* 368, 856 859 (1994)). En consecuencia, los ratones exhiben una expresión reducida de las cadenas ligeras k o IgM del ratón y los transgenes de las cadenas ligera y pesada humanos introducidos experimentan un cambio de clase y mutación somática para generar IgG humana de alta afinidad, anticuerpos monoclonales k en respuesta a la inmunización (Lonberg, N. et al. (1994), citado anteriormente; revisado en Lonberg, N. *Handbook of Experimental Pharmacology* 113, 49 101 (1994), Lonberg, N. y Huszar, D., *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13 65 93 (1995) y Harding, F. y Lonberg, N. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 764 536 546 (1995)). La preparación de ratones HuMAb se describe con detalle en Taylor, L. et al., *Nucleic Acids Research* 20, 6287 6295 (1992), Chen, J. et al., *International Immunology* 5, 647 656 (1993), Tuailon et al., *J. Immunol.* 152, 2912 2920 (1994), Taylor, L. et al., *International Immunology* 6, 579 591 (1994), Fishwild, D. et al., *Nature Biotechnology* 14, 845 851 (1996). Véase también los documentos US 5.545.806, US 5 569 825, US 5 625 126, US 5 633 425, US 5 789 650, US 5 877 397, US 5 661 016, US 5 814 318, US 5 874 299, US 5 770 429, US 5 545 807, Documento WO 98/24884, Documento WO 94/25585, Documento WO 93/1227, Documento WO 92/22645, WO 92/03918 y WO 01/09187. Los esplenocitos de estos ratones transgénicos se pueden usar para generar hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales humanos de acuerdo con técnicas bien conocidas.
- 45 Adicionalmente, los anticuerpos humanos de la presente divulgación o los anticuerpos de la presente divulgación de otras especies pueden identificarse mediante tecnologías de tipo de clonación directa o expresión, incluyendo, sin limitación, clonación o expresión fagos, expresión retroviral, expresión en ribosomas, expresión en mamíferos y otras técnicas, utilizando técnicas bien conocidas en la técnica y las moléculas resultantes pueden someterse a una maduración adicional, tal como maduración de la afinidad, ya que dichas técnicas son bien conocidas en la materia.
- 50 En una realización adicional de la divulgación, el anticuerpo o una parte del mismo, por ejemplo, una o más CDR, deriva de una especie en la familia Camelidae, véase el documento WO2010001251 o de una especie de pez cartilaginoso, tal como el tiburón nodriza o es un anticuerpo o dominio de cadena pesada.

- En una realización del método de la divulgación, dichas primera y segunda proteínas homodiméricas en la etapa a) o proporcionadas en la etapa a) se purifican. Los métodos para la purificación de los homodímeros pueden ser cualquiera de los descritos en el presente documento, por ejemplo, cualquiera de los descritos a continuación.
- 5 En una realización, la primera y/o la segunda proteína homodimérica se conjugan con un fármaco, un profármaco o una toxina o contiene un grupo acceptor para el mismo. Dicho grupo acceptor puede, por ejemplo, un aminoácido no natural. En una realización particular, la primera y la segunda proteína homodimérica pueden conjugarse con diferentes compuestos o contener modificaciones diferentes, resultando así en la producción de una proteína heterodimérica que comprende ambos compuestos o modificaciones.
- 10 Como se ha descrito anteriormente, las secuencias de la primera y segunda regiones CH3 de las proteínas de partida homodiméricas son diferentes y son tales que la interacción heterodimérica entre dichas primera y segunda regiones CH3 es más fuerte que cada una de las interacciones homodiméricas de dichas primera y segunda regiones CH3.
- 15 En una realización, el aumento de la fuerza de la interacción heterodimérica en comparación con cada una de las interacciones homodiméricas se debe a modificaciones de CH3 distintas de la introducción de enlaces covalentes, restos de cisteína o restos cargados.
- 20 En la mayoría de las realizaciones, el producto de la divulgación, la proteína heterodimérica, es altamente estable y no experimenta intercambio del brazo Fab en condiciones de reducción moderada *in vitro* o, de manera importante, *in vivo* tras la administración a un ser humano o animal. Por lo tanto, en una realización, la interacción heterodimérica entre dichas proteínas primera y segunda en la proteína heterodimérica resultante es tal que no puede producirse un intercambio del brazo Fab a GSH 0,5 mM en las condiciones descritas en el Ejemplo 13.
- 25 En otra realización, la interacción heterodimérica entre dichas proteínas primera y segunda en la proteína heterodimérica resultante es tal que no se produce un intercambio del brazo Fab *in vivo* en ratones en las condiciones descritas en el Ejemplo 14.
- 30 En otra realización, la interacción heterodimérica entre dichas primera y segunda proteínas en la proteína heterodimérica resultante es más de dos veces más fuerte, tal como más de tres veces más fuerte, por ejemplo, más de cinco veces más fuerte que la más fuerte de las dos interacciones homodiméricas, por ejemplo, cuando se determina como se describe en el Ejemplo 30.
- 35 En una realización adicional, las secuencias de dichas primera y segunda regiones CH3 son tales que la constante de disociación de la interacción heterodimérica entre dichas proteínas primera y segunda en la proteína heterodimérica resultante es inferior a 0,05 micromolar (μ M) cuando se analiza como se describe en el Ejemplo 30.
- 40 En una realización adicional, las secuencias de dichas primera y segunda regiones CH3 son tales que las constantes de disociación de ambas interacciones homodiméricas están por encima de 0,01 μ M, tal como por encima de 0,05 μ M, preferentemente entre 0,01 y 10 μ M, tal como entre 0,05 y 10 μ M, más preferentemente entre 0,01 y 5 μ M, tal como entre 0,05 y 5 μ M, aún más preferentemente entre 0,01 y 1 μ M, tal como entre 0,05 y 1 μ M, o entre 0,01 y 0,5 μ M o entre 0,01 y 0,1 μ M cuando se analiza como se describe en el Ejemplo 21. Las realizaciones en las que las proteínas de partida homodiméricas son relativamente estables pueden tener la ventaja de que es más fácil producir una gran cantidad de proteína de partida y, por ejemplo, evitar la agregación o el plegado incorrecto.
- 45 En algunas realizaciones, se puede obtener una proteína heterodimérica estable con alto rendimiento usando el método de la divulgación en base a dos proteínas de partida homodiméricas que contienen solo unas pocas, mutaciones asimétricas bastante conservadoras en las regiones CH3.
- 50 Por lo tanto, en una realización, las secuencias de dichas primera y segunda regiones CH3 contienen sustituciones de aminoácidos en posiciones no idénticas.
- 55 Los sustituyentes de aminoácidos pueden ser aminoácidos naturales o aminoácidos no naturales. Ejemplos de aminoácidos no naturales se desvelan en, por ejemplo, en Xie J y Schultz P. G., Current Opinion in Chemical Biology (2005), 9: 548-554 y Wang Q. et al., Chemistry & Biology (2009), 16: 323-336.
- 60 En una realización, los aminoácidos son aminoácidos naturales.
- 65 En una realización, dicha primera proteína homodimérica no tiene más de una sustitución de aminoácidos en la región CH3 y la segunda proteína homodimérica no tiene más de una sustitución de aminoácidos en la región CH3 en relación con las regiones CH3 de tipo salvaje, por ejemplo, IgG humana, tal como IgG1 humana.
- 66 En una realización, la primera proteína homodimérica tiene una sustitución de aminoácidos en una posición seleccionada del grupo que consiste en: 366, 368, 370, 399, 405, 407 y 409, y dicha segunda proteína homodimérica

tiene una sustitución de aminoácido en una posición seleccionada del grupo que consiste en: 366, 368, 370, 399, 405, 407 y 409, y en la que dicha primera proteína homodimérica y dicha segunda proteína homodimérica no están sustituidas en las mismas posiciones.

- 5 En una realización, la primera proteína homodimérica tiene una sustitución de aminoácido en la posición 366 y dicha segunda proteína homodimérica tiene una sustitución de aminoácido en una posición seleccionada del grupo que consiste en: 368, 370, 399, 405, 407 y 409. En una realización, el aminoácido en la posición 366 se selecciona de Arg, Lys, Asn, Gin, Tyr, Glu y Gly.
- 10 En una realización, la primera proteína homodimérica tiene una sustitución de aminoácido en la posición 368 y dicha segunda proteína homodimérica tiene una sustitución de aminoácido en una posición seleccionada del grupo que consiste en: 366, 370, 399, 405, 407 y 409.
- 15 En una realización, la primera proteína homodimérica tiene una sustitución de aminoácido en la posición 370 y dicha segunda proteína homodimérica tiene una sustitución de aminoácido en una posición seleccionada del grupo que consiste en: 366, 368, 399, 405, 407 y 409.
- 20 En una realización, la primera proteína homodimérica tiene una sustitución de aminoácido en la posición 399 y dicha segunda proteína homodimérica tiene una sustitución de aminoácido en una posición seleccionada del grupo que consiste en: 366, 368, 370, 405, 407 y 409.
- 25 En una realización, la primera proteína homodimérica tiene una sustitución de aminoácido en la posición 405 y dicha segunda proteína homodimérica tiene una sustitución de aminoácido en una posición seleccionada del grupo que consiste en: 366, 368, 370, 399, 407 y 409.
- 30 En una realización, la primera proteína homodimérica tiene una sustitución de aminoácido en la posición 409 y dicha segunda proteína homodimérica tiene una sustitución de aminoácido en una posición seleccionada del grupo que consiste en: 366, 368, 370, 399, 405 y 407.
- 35 En consecuencia, en una realización, las secuencias de dichas primera y segunda regiones CH3 contienen mutaciones asimétricas, es decir, mutaciones en diferentes posiciones en las dos regiones CH3, por ejemplo, una mutación en la posición 405 en una de las regiones CH3 y una mutación en la posición 409 en la otra región CH3.
- 40 En una realización, la primera o la segunda proteína homodimérica tiene un amino distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409. En una realización adicional, la primera o segunda proteína homodimérica tiene un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Asn, Gin, Arg, Ser, Thr, Val, Trp y Tyr en la posición 409. En una realización adicional más, la primera o la segunda proteína homodimérica tiene un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Arg, Gly, His, Val e Ile en la posición 409. En una realización adicional más, la primera o la segunda proteína homodimérica tiene un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Arg, His, Ile y Val en la posición 409. En una realización adicional más, la primera o la segunda proteína homodimérica tiene una Arg en la posición 409.
- 45 En una realización, la primera o la segunda proteína homodimérica tiene un aminoácido distinto de Phe en la posición 405. En una realización adicional, la primera o la segunda proteína homodimérica tiene un aminoácido distinto de Phe, Arg o Gly en la posición 405. En una realización adicional más, la primera o la segunda proteína homodimérica tiene un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gin, Arg, Ser, Thr, Val, Trp y Tyr en la posición 405. En una realización adicional más, la primera o la segunda proteína homodimérica tiene una Leu en la posición 405.
- 50 En una realización, la primera o segunda proteína homodimérica tiene un aminoácido distinto de Lys, Arg, Ser, Thr o Trp en la posición 366. En una realización adicional, la primera o la segunda proteína homodimérica tiene un aminoácido distinto de Phe, Gly, Ile, Lys, Leu, Met, Arg, Ser, Thr, Trp o Tyr en la posición 366. En una realización adicional más, la primera o la segunda proteína homodimérica tiene un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ile y Val en la posición 366.
- 55 En una realización, la primera o la segunda proteína homodimérica tiene un aminoácido distinto de Phe, Leu o Met en la posición 368. En una realización adicional, la primera o la segunda proteína homodimérica tiene un aminoácido distinto de Phe, Leu, Lys o Met en la posición 368. En una realización adicional más, la primera o la segunda proteína homodimérica tiene un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Asn, Gin, Arg, Ser, Thr, Val y Trp en la posición 368. En una realización adicional más, la primera o la segunda proteína homodimérica tiene un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asp y Glu en la posición 368.

En una realización, la primera proteína homodimérica tiene un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409 y dicha segunda proteína homodimérica tiene una sustitución de aminoácido en una posición seleccionada del grupo que consiste en: 366, 368, 370, 399, 405 y 407.

- 5 En una de dichas realizaciones, dicha primera proteína homodimérica tiene un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409 y dicha segunda proteína homodimérica tiene un aminoácido distinto de Phe en la posición 405. En una realización adicional del presente documento, dicha primera proteína homodimérica tiene un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409 y dicha segunda proteína homodimérica tiene un aminoácido distinto de Phe, Arg o Gly en la posición 405. En una realización adicional, dicha primera proteína homodimérica tiene un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Asn, Gin, Arg, Ser, Thr, Val, Trp y Tyr en la posición 409 y dicha segunda proteína homodimérica tiene un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gin, Arg, Ser, Thr, Val, Trp y Tyr en la posición 405. En una realización adicional más, la primera proteína homodimérica tiene un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Arg, Gly, His, Val e Ile en la posición 409 y dicha segunda proteína homodimérica tiene Leu en la posición 405. En una realización adicional más, la primera proteína homodimérica tiene un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Arg, His, Ile y Val en la posición 409 y dicha segunda proteína homodimérica tiene Leu en la posición 405. En una realización adicional más, dicha primera proteína homodimérica tiene Arg en la posición 409 y dicha segunda proteína homodimérica tiene Leu en la posición 405.
- 10 20 En una realización, la primera proteína homodimérica tiene un aminoácido distinto de Lys, Arg, Ser, Thr o Trp en la posición 366 y la segunda proteína homodimérica tiene un aminoácido distinto de Phe en la posición 405. En una realización adicional, la primera proteína homodimérica tiene un aminoácido distinto de Phe, Gly, Ile, Lys, Leu, Met, Arg, Ser, Thr, Trp o Tyr en la posición 366 y dicha segunda proteína homodimérica tiene un aminoácido distinto de Phe, Arg o Gly en la posición 405. En una realización adicional más, dicha primera proteína homodimérica tiene un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ile y Val en la posición 366 y la segunda proteína homodimérica tiene un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp y Tyr en la posición 405. En una realización adicional más, dicha primera proteína homodimérica tiene un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ile y Val en la posición 366 y la segunda proteína homodimérica tiene Leu en la posición 405.
- 15 30 35 En otra realización, dicha primera proteína homodimérica comprende una Phe en la posición 405 y un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409 y dicha segunda proteína homodimérica comprende un aminoácido distinto de Phe en la posición 405 y una Lys en la posición 409. En una realización adicional del presente documento, dicha primera proteína homodimérica comprende una Phe en la posición 405 y un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409 y dicha segunda proteína homodimérica comprende un aminoácido distinto de Phe, Arg o Gly en la posición 405 y una Lys en la posición 409.
- 40 45 En otra realización, dicha primera proteína homodimérica comprende una Phe en la posición 405 y un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409 y dicha segunda proteína homodimérica comprende una Leu en la posición 405 y una Lys en la posición 409. En una realización adicional del presente documento, dicha primera proteína homodimérica comprende una Phe en la posición 405 y una Arg en la posición 409 y dicha segunda proteína homodimérica comprende un aminoácido distinto de Phe, Arg o Gly en la posición 405 y una Lys en la posición 409.
- 50 55 60 En otra realización, dicha primera proteína homodimérica comprende Phe en la posición 405 y una Arg en la posición 409 y dicha segunda proteína homodimérica comprende una Leu en la posición 405 y una Lys en la posición 409. En una realización adicional, dicha primera proteína homodimérica comprende un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409 y dicha segunda proteína homodimérica comprende una Lys en la posición 409, una Thr en la posición 370 y una Leu en la posición 405. En una realización adicional, dicha primera proteína homodimérica comprende una Arg en la posición 409 y dicha segunda proteína homodimérica comprende una Lys en la posición 409, una Thr en la posición 370 y una Leu en la posición 405. En una realización adicional más, dicha primera proteína homodimérica comprende una Lys en la posición 370, una Phe en la posición 405 y una Arg en la posición 409 y dicha segunda proteína homodimérica comprende una Lys en la posición 409, una Thr en la posición 370 y una Leu en la posición 405. En otra realización, dicha primera proteína homodimérica comprende un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409 y dicha segunda proteína homodimérica comprende una Lys en la posición 409 y: a) una Ile en la posición 350 y una Leu en la posición 405 o b) una Thr en la posición 370 y una Leu en la posición 405. En otra realización, dicha primera proteína homodimérica comprende un Arg en la posición 409 y dicha segunda proteína homodimérica comprende una Lys en la posición 409 y: a) una Ile en la posición 350 y una Leu en la posición 405.

posición 405 o b) una Thr en la posición 370 y una Leu en la posición 405.

En otra realización, dicha primera proteína homodimérica comprende una Thr en la posición 350, una Lys en la posición 370, una Phe en la posición 405 y una Arg en la posición 409 y dicha segunda proteína homodimérica comprende una Lys en la posición 409 y: a) una Ile en la posición 350 y una Leu en la posición 405 o b) una Thr en la posición 370 y una Leu en la posición 405.

En otra realización, dicha primera proteína homodimérica comprende una Thr en la posición 350, una Lys en la posición 370, una Phe en la posición 405 y una Arg en la posición 409 y dicha segunda proteína homodimérica comprende una Ile en la posición 350, una Thr en la posición 370, una Leu en la posición 405 y una Lys en la posición 409.

En otra realización, dicha primera proteína homodimérica tiene un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409 y dicha segunda proteína homodimérica tiene un aminoácido distinto de Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser o Thr en la posición 407.

En otra realización, dicha primera proteína homodimérica tiene un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409 y dicha segunda proteína homodimérica tiene una Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val o Trp en la posición 407.

En otra realización, dicha primera proteína homodimérica tiene un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409 y dicha segunda proteína homodimérica tiene una Gly, Leu, Met, Asn o Trp en la posición 407.

En otra realización, dicha primera proteína homodimérica tiene una Tyr en la posición 407 y un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409 y dicha segunda proteína homodimérica tiene un aminoácido distinto de Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser o Thr en la posición 407 y una Lys en la posición 409.

En otra realización, dicha primera proteína homodimérica tiene una Tyr en la posición 407 y un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409 y dicha segunda proteína homodimérica tiene una Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val o Trp en la posición 407 y una Lys en la posición 409.

En otra realización, dicha primera proteína homodimérica tiene una Tyr en la posición 407 y un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409 y dicha segunda proteína homodimérica tiene una Gly, Leu, Met, Asn o Trp en la posición 407 y una Lys en la posición 409.

En otra realización, dicha primera proteína homodimérica tiene una Tyr en la posición 407 y una Arg en la posición 409 y dicha segunda proteína homodimérica tiene un aminoácido distinto de Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser o Thr en la posición 407 y una Lys en la posición 409.

En otra realización, dicha primera proteína homodimérica tiene una Tyr en la posición 407 y una Arg en la posición 409 y dicha segunda proteína homodimérica tiene una Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val o Trp en la posición 407 y una Lys en la posición 409.

En otra realización, dicha primera proteína homodimérica tiene una Tyr en la posición 407 y una Arg en la posición 409 y dicha segunda proteína homodimérica tiene una Gly, Leu, Met, Asn o Trp en la posición 407 y una Lys en la posición 409.

En otra realización, dicha primera proteína homodimérica tiene un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409, y la segunda proteína homodimérica tiene un aminoácido distinto de Lys, Arg, Ser, Thr o Trp en la posición 366. En una realización adicional, dicha primera proteína homodimérica tiene un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409 y la segunda proteína homodimérica tiene un aminoácido distinto de Phe, Gly, Ile, Lys, Leu, Met, Arg, Ser, Thr, Trp o Tyr en la posición 366.

En una realización, la primera proteína homodimérica tiene un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409 y la segunda proteína homodimérica tiene un aminoácido distinto de Phe, Leu o Met en la posición 368. En una realización adicional, la primera proteína homodimérica tiene un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409 y la segunda proteína homodimérica tiene un aminoácido distinto de Phe, Leu, Lys o Met en la posición 368. Incluso en una realización adicional, la primera proteína homodimérica tiene un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp y Tyr en la posición 409 y dicha segunda proteína homodimérica tiene un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val y Trp en la posición 368.

En una realización adicional más, la primera proteína homodimérica tiene un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Arg, Gly, His, Val e Ile en la posición 409, y dicha segunda proteína homodimérica tiene un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val y Trp en la posición 368. En una realización adicional más, la primera proteína homodimérica tiene un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Arg, His, Val e Ile en la posición 409 y dicha segunda proteína homodimérica tiene un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asp, Glu

en la posición 368. En una realización adicional más, dicha primera proteína homodimérica tiene Arg en la posición 409 y dicha segunda proteína homodimérica tiene un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asp y Glu en la posición 368.

5 En una realización, la primera proteína homodimérica tiene un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409 y la segunda proteína homodimérica tiene

(i) un aminoácido distinto de Phe, Leu y Met en la posición 368 o

10 (ii) un Trp en la posición 370 o

(iii) un aminoácido distinto de Asp, Cys, Pro, Glu o Gln en la posición 399.

15 En una realización, la primera proteína homodimérica tiene una Arg, Ala, His o Gly en la posición 409 y la segunda proteína homodimérica tiene

(i) una Lys, Gln, Ala, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Asn, Arg, Ser, Thr, Val o Trp en la posición 368, o

(ii) un Trp en la posición 370 o

20 (iii) una Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Asn, Ser, Thr, Trp, Phe, His, Lys, Arg o Tyr en la posición 399.

En una realización, la primera proteína homodimérica tiene una Arg en la posición 409 y la segunda proteína homodimérica tiene

25 (i) un Asp, Glu, Gly, Asn, Arg, Ser, Thr, Val o Trp en la posición 368, o

(ii) un Trp en la posición 370 o

30 (iii) una Phe, His, Lys, Arg o Tyr en la posición 399.

Además de las sustituciones de aminoácidos especificadas anteriormente, dichas primera y segunda proteínas homodiméricas pueden contener otras sustituciones, delecciones o inserciones de aminoácidos con respecto a las secuencias Fc de tipo salvaje, por ejemplo IgG humana.

35 En una realización adicional, dichas primera y segunda regiones CH3, excepto por las mutaciones especificadas, comprenden la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:1 (IgG1m(a)):

SEQ ID NO 1:

40

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK

En una realización adicional, dichas primera y segunda regiones CH3, excepto por las mutaciones especificadas, comprenden la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2 (IgG1m(f)):

45

SEQ ID NO 2:

GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK

50 En una realización adicional, dichas primera y segunda regiones CH3, excepto por las mutaciones especificadas, comprenden la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 3 (IgG1m(ax)):

SEQ ID NO 3:

55

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVHEGLHNHYTQKSLSLSPGK

La producción de proteínas heterodiméricas por la presente divulgación comprende que la interacción

heterodimérica entre la región CH3 de la primera y la segunda proteína homodimérica es más fuerte que cada una de las interacciones homodiméricas entre dicha primera y segunda región CH3. Este efecto puede, en particular, tal como se ha descrito anteriormente, obtenerse con los ejemplos mencionados anteriormente de modificaciones de CH3 de la primera y/o la segunda proteína homodimérica. Sin embargo, se prevé que la primera y/o segunda 5 proteínas homodiméricas que comprenden otras mutaciones distintas de las descritas en el presente documento también se pueden usar en un método de la presente invención. Por ejemplo, la primera y la segunda proteínas homodiméricas pueden ser un anticuerpo de rata y un anticuerpo de ratón, según lo descrito por Lindhofer et al. (1995) J Immunol 155: 219 (véase anteriormente) o los denominados anticuerpos variantes de botón en ojal, como 10 se describe en la patente de Estados Unidos 5-731.168 (véase anteriormente). Por lo tanto, en una realización de la presente divulgación, la primera y la segunda proteína homodimérica de la presente divulgación pueden comprender las modificaciones simples o dobles de botón en ojal descritas en el documento US 5.731.168.

El método de la presente invención también se puede usar para producir anticuerpos biespecíficos como se describe 15 en el documento WO2011/143545.

Otro ejemplo adecuado de primera y segunda proteínas homodiméricas útiles en la presente divulgación incluye 20 aquellas que se basan en interacciones electrostáticas entre la región CH3 de la primera y la segunda proteína homodimérica, como los desvelados en el documento WO 2009/089004. Esta técnica también puede denominarse dirección electrostática.

En algunos casos, sin embargo, las últimas proteínas de partida homodiméricas pueden ser más difíciles de 25 producir, debido a las interacciones homodiméricas CH3-CH3 demasiado débiles. Por lo tanto, las variantes descritas en el presente documento que tienen mutaciones en una o más de las posiciones 366, 368, 370, 399, 405, 407 y 409 pueden ser preferidas. Las variantes descritas en el presente documento que tienen mutaciones en una o más de las posiciones 350, 370, 405 y 409, pueden ser preferentes.

La secuencia de la región bisagra de las proteínas de partida homodiméricas puede variar. Sin embargo, la proteína 30 heterodimérica resultante puede ser más estable en algunas circunstancias si la región bisagra no es similar a IgG4, y, preferentemente, es similar a IgG1.

Por lo tanto, en una realización, ni dicha primera ni dicha segunda proteína homodimérica comprende una secuencia 35 Cys-Pro-Ser-Cys en la región bisagra (núcleo).

En una realización adicional, tanto dicha primera como dicha segunda proteína homodimérica comprenden una secuencia Cys-Pro-Pro-Cys en la región bisagra (núcleo).

En muchas realizaciones en las que la primera y dicha segunda proteína homodimérica son anticuerpos, dichos 40 anticuerpos comprenden además una cadena ligera. Como se ha explicado anteriormente, dichas cadenas ligeras pueden ser diferentes, por ejemplo, difieren en la secuencia y cada uno forma un dominio funcional de unión a antígeno con solo una de las cadenas pesadas. En otra realización, sin embargo, dichas primera y segunda proteínas homodiméricas son anticuerpos de cadena pesada, que no necesitan una cadena ligera para la unión al antígeno, véase, por ejemplo, Hamers-Casterman (1993) Nature 363: 446.

Etapa a)

Tal como se ha descrito anteriormente, la etapa a) del método de la presente divulgación comprende incubar dicha primera proteína homodimérica junto con dicha segunda proteína homodimérica en condiciones reductoras suficientes para permitir la reducción de los enlaces disulfuro intercatenarios en la región bisagra. El término "suficiente" en el contexto de "condiciones reductoras suficientes para permitir la reducción de los enlaces disulfuro 45 intercatenarios en la región bisagra" puede ser, en particular, en términos de permitir que se produzca la reacción de intercambio del brazo Fab. Por lo tanto, en una realización particular, las "condiciones reductoras suficientes para permitir la reducción de los enlaces disulfuro intercatenarios en la región bisagra" son condiciones que resultan en la producción de más del 50 % de proteína heterodimérica, tal como más de 60 % de proteína heterodimérica o más 50 del 70 % de proteína heterodimérica o más del 80 % de proteína heterodimérica o más del 90 % de proteína heterodimérica o más del 95 % de proteína heterodimérica o más del 99 % de proteína heterodimérica o más del 99,5 % de proteína heterodimérica, tal como 100 % de proteína heterodimérica. El porcentaje de proteína 55 heterodimérica está en este contexto en relación con la cantidad total de la primera proteína homodimérica, segunda proteína homodimérica y proteína heterodimérica. La cantidad o porcentaje de proteína heterodimérica se puede medir, por ejemplo, mediante CIEK como se describe en los ejemplos del presente documento.

En el contexto de la presente invención, la referencia a "condiciones reductoras de la etapa a)" se refiere a "condiciones reductoras suficientes para permitir la reducción de los enlaces disulfuro intercatenarios en la región bisagra". En el presente documento se dan ejemplos de condiciones adecuadas. Los requisitos mínimos para la 60 reducción de los enlaces disulfuro intercatenarios en la región bisagra pueden diferir, dependiendo de las proteínas de partida homodiméricas, en particular, dependiendo de la secuencia exacta en la región de bisagra. Sin desear quedarse ligado a teoría alguna, los restos de cisteína en la región bisagra pueden, después de la reducción de los 65

enlaces disulfuro, unirse, por ejemplo, al agente reductor, tales como 2-MEA o forman enlaces disulfuro intracatenarios o reaccionan con restos de cisteína no unidos.

5 La formación de una proteína heterodimérica en la etapa a) se basa en la reducción de los enlaces disulfuro en la
región bisagra de la primera y segunda proteínas homodiméricas y un intercambio de las regiones Fc de dichas
primera y segunda proteínas homodiméricas.

10 Por lo tanto, las condiciones reductoras de la etapa a) pueden además permitir el intercambio de las regiones Fc de
la primera y segunda proteínas homodiméricas, produciendo así una proteína heterodimérica. El intercambio de las
regiones Fc de dos primeras o dos segundas proteínas homodiméricas también puede tener lugar en la etapa a) que
dará lugar a la formación de una primera o segunda proteínas homodiméricas. La interacción heterodimérica entre
15 las regiones CH3 de la primera y la segunda proteínas homodiméricas es más fuerte que cada una de las
interacciones homodiméricas de dichas regiones CH3. Sin estar limitado por ninguna teoría, el intercambio de las
regiones Fc de la proteína heterodimérica puede verse desfavorecido en comparación con el intercambio de las
20 regiones Fc de la primera y segunda proteínas homodiméricas. Por lo tanto, la etapa a) generalmente puede resultar
en la producción de más proteína heterodimérica que la primera y la segunda proteínas homodiméricas. Por lo tanto,
en general, el método de la presente invención da como resultado más del 50 %, tal como más del 60 % o más del
25 70 % o más del 80 % o más del 90 % o más del 95 % o más del 99 %, del producto obtenido, es decir, la cantidad
total de primera y segunda proteínas homodiméricas y la proteína heterodimérica, siendo la proteína heterodimérica.

La primera y la segunda proteínas homodiméricas se pueden producir juntas o por separado, como también se ha
descrito anteriormente. Si la primera y la segunda proteínas homodiméricas se producen juntas, la etapa a) puede
tener lugar en el mismo recipiente, por ejemplo, un biorreactor, como producción de la primera y segunda proteínas
25 homodiméricas. Los métodos para la producción de la primera y segunda proteínas homodiméricas, tales como
anticuerpos, son bien conocidos por los expertos en la materia.

La concentración de la primera proteína homodimérica y la segunda proteína homodimérica en la etapa a) no tiene
que ser la misma. En principio, no hay limitación con respecto a la concentración de la primera y la segunda
30 proteínas homodiméricas, pero para la mayoría de los fines prácticos, la concentración de cada una de la primera y
la segunda proteínas homodiméricas en la etapa a) pueden estar típicamente en el intervalo de 0,1 mg/ml a 100
mg/ml, tal como en el intervalo de 0,5-100 mg/ml o en el intervalo de 1-75 mg/ml o en el intervalo de 1-50 mg/ml. La
concentración total de la primera y la segunda proteínas homodiméricas en la etapa a) puede ser de al menos 0,25
35 mg/ml. El límite superior se debe principalmente a que a concentraciones superiores a 200 mg/ml, las proteínas
pueden ser tan viscosas que son difíciles de manejar, se puede alcanzar el límite de solubilidad o la tasa de
agregación de proteínas es demasiado alta. Por lo tanto, la concentración total de la primera y la segunda proteínas
homodiméricas en la etapa a) puede estar típicamente en el intervalo de 0,2 mg/ml a 200 mg/ml, tal como en el
intervalo de 0,5-100 mg/ml o en el intervalo de 1-50 mg/ml.

En una realización de la presente divulgación, se puede usar un exceso de la primera o la segunda proteína
40 homodimérica en la etapa a) del método. Esto puede ser particularmente relevante si, por ejemplo, la primera
proteína homodimérica tiene un fuerte impacto en la seguridad o eficacia del producto o es más difícil de separar de
la proteína heterodimérica que la segunda proteína homodimérica, o viceversa, o para simplificar o facilitar la
purificación de la proteína heterodimérica producida por el método. El uso de un exceso de una de las proteínas
45 homodiméricas; es decir, la primera o la segunda proteína homodimérica, puede facilitar la purificación posterior de
la proteína heterodimérica como se describe en el presente documento, porque impulsará el proceso de intercambio
en la etapa a) más cerca de la finalización con respecto a la proteína insuficiente. Así, como la primera o la segunda
proteína homodimérica se convierte en una limitación, la mayor parte se usará en la etapa a) y la purificación
50 subsiguiente residirá principalmente en la separación de la proteína heterodimérica de la proteína homodimérica
utilizada en exceso, en lugar de a partir de la primera y la segunda proteína homodimérica. Por lo tanto, el uso de un
exceso de la primera o la segunda proteína homodimérica en la etapa a) se puede combinar, en particular, con el
uso de una primera y segunda proteínas homodiméricas que comprenden diferencias que facilitan la purificación.
55 Tales diferencias incluyen las descritas en el presente documento, por ejemplo, que no se unen a la proteína A o
proteína G, diferentes cadenas ligeras y/o diferentes alotipos. El uso de cantidades no equimolares de la primera y la
segunda proteína homodimérica se puede conocer como proceso de intercambio no equimolar dirigido (SNEEP) y
puede realizarse, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 64 del presente documento.

Por lo tanto, en una realización, la proporción entre la primera y la segunda proteína homodimérica en la etapa a)
puede ser diferente de 1:1, por ejemplo, la proporción entre la primera y la segunda proteína homodimérica puede
60 tener una proporción en el intervalo de 1:1,03 a 1:2; tal como en el intervalo de 1:1,05 a 1:1,5 o en el intervalo de
1:1,1 a 1:1,5 o en el intervalo de 1:1,1 a 1:1,4; o en el intervalo de 1:1,15 a 1:1,35 o en el intervalo de 1:1,2 a 1:1,3.

Por lo tanto, en una realización, la primera y la segunda proteína homodimérica pueden usarse en la etapa a) con un
exceso de 5 %-60 % de la primera o la segunda proteína homodimérica, tal como un exceso de 15 %-55 % de la
65 primera o la segunda proteína homodimérica, por ejemplo, un exceso de 20 %-55% de la primera o segunda
proteína homodimérica, o un exceso de 30-50 % de la primera o segunda proteína homodimérica o, en particular, un
exceso de 15 %-35 % de la primera o la segunda proteína homodimérica, tal como un exceso de 20 %-30 % de la

primera o segunda proteína homodimérica.

- La primera y la segunda proteínas homodiméricas en la etapa a) pueden estar presentes, en particular, en una solución, tal como en un tampón. Por lo tanto, en una realización, la etapa a) se realiza en una solución, tal como en un tampón. La solución puede ser, en particular, una solución acuosa. Un tampón adecuado puede ser uno que soporte el proceso de reducción e intercambio y que no afecte a la primera y segunda proteínas homodiméricas o a la heterodimérica de forma adverso, por ejemplo, un tampón en el que la primera y la segunda proteínas homodiméricas y la proteína heterodimérica son estables. El tampón utilizado en la etapa a) puede ser el mismo que el tampón en el que la primera y/o la segunda proteínas homodiméricas están presentes como resultado de la etapa de procesamiento anterior para minimizar la manipulación del proceso. Como alternativa, podría ser un tampón diferente para permitir condiciones estandarizadas o una reducción óptima. Por ejemplo, la primera y/o la segunda proteína homodimérica se pueden haber purificado antes de la etapa a) y el tampón o la solución se pueden haber cambiado durante la purificación.
- Los ejemplos de tampones adecuados para la etapa a) incluyen, pero sin limitación, PBS (solución salina tamponada con fosfato), DPBS (solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco), PBS Braun (ejemplo 44), tampón de citrato, tampón acetato, tampón de histidina, tampón de fosfato o tampón de Tris. Los ejemplos específicos de tales tampones incluyen los descritos en los ejemplos de la presente invención. Como también se muestra en el ejemplo 43, la elección del tampón puede afectar a la cinética de formación de la proteína heterodimérica. Por lo tanto, en una realización particular, se puede usar un tampón de Tris o de fosfato en la etapa a) de la presente invención. El tampón usado en la etapa a) puede ser, por ejemplo, el tampón de Tris o de fosfato descrito en el Ejemplo 43 en el presente documento o puede ser el tampón PBS descrito en el Ejemplo 53 en el presente documento.
- En una realización, el tampón en la etapa a) puede comprender en el intervalo 1-100 mM del tampón, tal como 1-50 mM del tampón o en el intervalo de 1-25 mM o en el intervalo de 5-20 mM.
- En una realización, el tampón en la etapa a) puede comprender en el intervalo de 1-100 mM de fosfato, tal como fosfato 1-50 mM o en el intervalo de 1-25 mM o en el intervalo de 5-20 mM.
- El pH de las condiciones reductoras de la etapa a) puede estar en el intervalo de pH 3-10, tal como a pH 4-9 o en el intervalo de pH 4,5-8,5. Como se ve en el ejemplo 43, el valor del pH puede afectar a la cinética para la formación de la proteína heterodimérica. Por lo tanto, en una realización particular, el pH de las condiciones reductoras en la etapa a) puede estar en el intervalo de pH 5-8, tal como entre pH 6-8 o entre pH 6,5-7,5, por ejemplo, el pH puede ser, en particular, de aproximadamente 5,5, o 6, o 6,5, o 7, o 7,5, o 7,8 u 8.
- Los ejemplos de tampones adecuados incluyen los del Ejemplo 43, en particular los seleccionados del grupo que consiste en 1) 1 x solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS): fosfato de sodio 8,1 mM ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), fosfato potásico (KH_2PO_4) 1,5 mM, cloruro sódico (NaCl) 138 mM, cloruro de potasio (KCl) 2,7 mM, pH 5,0; 2) 1 x DPBS a pH 7,0; 3) Tris-HCl 20 mM, pH 7,8
- En una realización alternativa, el tampón en la etapa a) puede seleccionarse del grupo que consiste en, pero sin limitaciones; a) fosfato sódico 10 mM, fosfato potásico 2 mM, NaCl 137 mM, pH 5,0; b) fosfato sódico 10 mM, fosfato potásico 2 mM, NaCl 137 mM, pH 7,0; c) citrato de sodio 20 mM, pH 4,9; d) citrato de sodio 20 mM, pH 6,0; y e) Tris-HCl 20 mM, NaCl 20 mM, pH 7,8.
- En una realización, las condiciones reductoras en la etapa a) comprenden un agente reductor, por ejemplo, un agente reductor sulfhidrilo. Los términos "agente reductor" y "reductor" se pueden usar de manera intercambiable en el contexto de la presente invención. Normalmente, las condiciones reductoras en la etapa a) comprenden añadir un agente reductor, por ejemplo, un agente reductor sulfhidrilo. El agente reductor puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en, pero sin limitación: 2-mercptoetilamina (2-MEA), ditioltreitol (DTT), ditioeritritol (DTE), glutatión, tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), L-cisteína, D-cisteína, beta-mercptoetanol y derivados químicos de los mismos, preferentemente un agente reductor seleccionado del grupo que consiste en: 2-mercptoetilamina, ditioltreitol, L-cisteína, D-cisteína y tris(2-carboxietil)fosfina. Por lo tanto, el agente reductor puede seleccionarse en una realización del grupo que consiste en: 2-mercptoetilamina (2-MEA), un derivado químico de 2-mercptoetilamina (2-MEA), L-cisteína y D-cisteína. Más en particular, el agente reductor es 2-mercptoetilamina (2-MEA) o L-cisteína, o D-cisteína. El agente reductor 2-mercptoetilamina tiene otros nombres químicos, tales como 2-MEA y cisteamina, y dichos términos pueden usarse indistintamente en el contexto de la presente invención. El término 2-MEA también se usa para describir 2-mercptoetilamina-HCl, que, por ejemplo, se usa en los ejemplos de la presente invención.
- La elección del agente reductor, su concentración y el tiempo de incubación de la etapa a) deben ser tales que los enlaces disulfuro intercatenarios en la región bisagra se reduzcan y el intercambio de las regiones Fc de la primera y la segunda proteína homodimérica sea posible. Sin embargo, al mismo tiempo puede ser una ventaja evitar el uso de condiciones demasiado duras, tales como concentraciones demasiado altas del agente reductor o tiempos de incubación demasiado largos, por ejemplo, ya que puede ser innecesario y las condiciones demasiado duras pueden dañar la primera y/o la segunda proteína homodimérica o la proteína heterodimérica. Las condiciones óptimas

pueden verse afectadas por diferentes parámetros, tal como la temperatura, el pH, la concentración de oxígeno disuelto, las concentraciones de homodímero, la elección del tampón, los oligoelementos y los quelantes, y la elección y concentración del agente reductor.

- 5 Una concentración adecuada del agente reductor puede estar en el intervalo de 0,1 mM a 1 M. Si el agente reductor es 2-MEA, la concentración puede estar, típicamente, en el intervalo de 10-500 mM, tal como en el intervalo de 25-500 mM o en el intervalo de 40-350 mM o en el intervalo de 10-100 mM, por ejemplo, en el intervalo de 25-100 mM o en el intervalo de 10-75 mM, por ejemplo, en el intervalo de 25-75 mM o en el intervalo de 10-60 mM, por ejemplo, en el intervalo de 25-60 mM o en el intervalo de 10-50 mM, por ejemplo, en el intervalo de 25-50 mM, tal como de 10 aproximadamente 10 mM o aproximadamente 25 mM o aproximadamente 30 mM, o aproximadamente 40 mM o 15 aproximadamente 50 mM. Si el agente reductor es L-cisteína o D-cisteína, la concentración puede estar típicamente en el intervalo de 10-500 mM, tal como en el intervalo de 10-400 mM o en el intervalo de 10-300 mM o en el intervalo de 10-200 mM o en el intervalo de 20-150 mM o en el intervalo de 20-125 mM o en el intervalo de 25-100 mM, tal como 20 aproximadamente 25 mM o aproximadamente 50 mM o aproximadamente 75 mM o aproximadamente 100 mM.

En una realización adicional, la etapa a) comprende la incubación durante al menos 15 minutos, tal como al menos 20 minutos o al menos 30 minutos, o al menos 60 minutos o al menos 90 minutos, tal como durante de 15 minutos a 10 horas o durante de 15 minutos a 6 horas o durante de 15 minutos a 5 horas o durante de 15 minutos a 4,5 horas o durante de 15 minutos a 4 horas o durante de 30 minutos a 10 horas o durante de 30 minutos a 6 horas, o durante de 30 minutos a 5 horas o durante de 30 minutos a 4,5 horas, o durante de 320 minutos a 4 horas, o durante de 90 minutos a 10 horas, o durante de 90 minutos a 6 horas, o durante de 90 minutos a 5 horas, o durante de 90 minutos a 4,5 horas, o durante de 90 minutos a 4 horas, tal como durante 2-5 horas o durante 2-4,5 horas o durante 2-4 horas o durante 3-5 horas o durante 3-4,5 horas o durante 3-4 horas o durante 3,5-5 horas o durante 3,5-4,5 horas, 25 por ejemplo, durante aproximadamente 2 horas, 3 horas, 4 horas o 5 horas. Como se muestra en el ejemplo 45 y el ejemplo 53, la reducción de los enlaces disulfuro intercatenarios en la región bisagra y el intercambio de las regiones Fc de la primera y la segunda proteína homodimérica para producir la proteína heterodimérica se completaron en las condiciones dadas en un plazo de 4 horas.

30 La temperatura óptima de la etapa a) puede depender de la elección del agente reductor. Normalmente, la temperatura puede estar en el intervalo de 2-45 °C, tal como en el intervalo de 2-10 °C o en el intervalo de 15-45 °C o en el intervalo de 20-40 °C o en el intervalo de 20-30 °C, o en el intervalo de 30-40 °C o en el intervalo de 22-39 °C, tal como en el intervalo de 21-26 °C, o en el intervalo de 22-25 °C, tal como a aproximadamente 25 °C o 35 aproximadamente 37 °C. En una realización, la etapa a) comprende la incubación durante al menos 30 minutos a una temperatura de al menos 20 °C en presencia de al menos 25 mM de un agente reductor seleccionado del grupo que consiste en 2-mercaptopropilamina, L-cisteína y D-cisteína. En una realización, las condiciones reductoras que permiten el intercambio controlado del brazo Fab, es decir, la reducción de los enlaces disulfuro intercatenarios en la región bisagra de la primera y segunda proteínas homodiméricas y el intercambio posterior de las regiones Fc de la primera y la segunda proteínas homodiméricas, se describen en términos del potencial redox requerido. El triptóptido 40 glutatión (GSH) es el principal tiol de bajo peso molecular en las células y controla el estado redox del tiol-disulfuro, que es esencial para la señalización redox normal *in vivo*. La dinámica del equilibrio redox celular se logra mediante el mantenimiento del estado de tiol a disulfuro de GSH reducido y su forma oxidada GSSG. Los valores para el potencial de reducción se pueden medir como en Rost y Rapoport, *Nature* 201: 185 (1964) y Aslund et al., *J. Biol. Chem.* 272: 30780-30786 (1997). El potencial redox E_h , que tiene en cuenta la estequiometría de dos GSH oxidados 45 por GSSG es una medida cuantitativa para el estado redox. El E_h se calcula mediante la ecuación de Nernst (Ecuación 1): $E_h = E_0 + (RT/nF)\ln ([GSSG\ (ox)]/[GSH\ (red)])^2$. E_0 es el potencial estándar para la pareja redox a pH definido, R es la constante de los gases, T es la temperatura absoluta, F es la constante de Faraday y n es el número de electrones transferidos. Las estimaciones *in vivo* para el E_h para la pareja GSH/GSSG están en el intervalo de -260 a -200 mV (Aw, T., *News Physiol. Sci.* 18: 201-204 (2003)). Las células diferenciadas 50 terminalmente mantienen así un $E+$ en el orden de -200 mV, mientras que las células en proliferación activa mantienen un $E+$ más reducido de aproximadamente -260 mV.

El potencial redox estándar para DTT es de -330 mV (Cleland et al. *Biochemistry* 3:480-482 (1964)). Se ha demostrado que el TCEP reduce el DTT en solución y, por lo tanto, tiene un potencial redox más negativo que DTT. 55 El valor exacto sin embargo no se ha notificado. Las condiciones de reducción adecuadas para la etapa a) de la presente invención pueden, por lo tanto, describirse en términos de un potencial redox requerido E_h , que está óptimamente por debajo del valor que se alcanza en condiciones normales de plasma *in vivo* y que está por encima del potencial redox que reduce los enlaces disulfuro del anticuerpo fuera de los localizados en la región bisagra e implicados en la formación de enlaces disulfuro intercatenarios o implicados en enlaces disulfuro entre la cadena ligera y la cadena pesada.

Por lo tanto, en una o en otra realización, la etapa a) se realiza en condiciones reductoras con un potencial redox que varía por debajo de -50 mV, tal como por debajo de -150 mV, preferentemente entre -150 y -600 mV, tal como entre -200 y -500 mV, más preferentemente entre -250 y -450 mV, tal como entre -250 y -400 mV, incluso más preferentemente entre -350 y -450 mV.

En una o más realizaciones, la etapa a) comprende la incubación durante al menos 30 minutos, por ejemplo, 90 minutos, a una temperatura de al menos 20 °C en presencia de al menos 25 mM de 2-mercaptopropilamina o en presencia de al menos 0,5 mM de ditiotreitol o en presencia de al menos 25 mM de L o D cisteína.

- 5 En una o más realizaciones, la etapa a) comprende la incubación durante al menos 30 minutos, por ejemplo, 90 minutos, a una temperatura de al menos 20 °C, a un pH de 5 a 8, tal como a pH 7,0 o a pH 7,4, en presencia de al menos 25 mM de 2-mercaptopropilamina o en presencia de al menos 0,5 mM de ditiotreitol o en presencia de al menos 25 mM de L o D-cisteína.
- 10 En otra o en una realización más, la etapa a) comprende la incubación durante al menos 30 minutos, por ejemplo, 90 minutos, a una temperatura de al menos 20 °C en presencia de al menos 25 mM de 2-mercaptopropilamina, o en presencia de al menos 25 mM de L o D-cisteína. La incubación se puede realizar a un pH de 6 a 8, tal como a pH 7-8.
- 15 En una realización adicional, la etapa a) comprende la incubación durante 4-6 horas a una temperatura de 20-30 °C en presencia de 2-mercaptopropilamina 25-75 mM o en presencia de L- o D-cisteína 25-100 mM. La incubación se puede realizar a un pH de 6 a 8, tal como a pH 7-8.
- En una realización adicional más, la etapa a) comprende la incubación durante 5 horas a una temperatura de 25 °C en presencia de 2-mercaptopropilamina 50 mM o en presencia de L- o D-cisteína 25-100 mM. La incubación se puede realizar a un pH de 6 a 8, tal como a pH 7-8.
- 20 En una o en otra realización, la etapa a) comprende añadir un agente quelante de metales, tal como EDTA, EGTA o ácido cítrico. Los inventores de la presente invención han demostrado que cuando se usa 2-MEA como agente reductor en la etapa a) de la presente invención, añadir o incluir EDTA en la etapa a) disminuye la velocidad de autoxidación de 2-MEA en esta etapa como se observa por una menor tasa de oxidación (véanse, por ejemplo, los ejemplos 47 y 54). Sin quedar limitado a teoría alguna, esto puede deberse a que los iones metálicos presentes en la etapa a) están quelados por EDTA, lo que, por tanto, puede disminuir la autoxidación de 2-MEA por los iones metálicos. En general, la autoxidación de un agente reductor consume el agente reductor, lo que da como resultado una concentración efectivamente más baja del agente reductor. De este modo, al añadir un agente quelante de metales, la tasa de reducción de los enlaces disulfuro intercatenarios en la región bisagra puede aumentar y/o puede ser necesario menos agente reductor para reducir los enlaces disulfuro intercatenarios en la región bisagra. Los iones metálicos pueden por ejemplo, estar presentes en las soluciones o tampones utilizados en la reacción y/o pueden salirse del equipo utilizado para la reacción.
- 25 35 Los ejemplos de agentes quelantes de metales adecuados que se pueden añadir o incluir en la etapa a) incluyen, pero sin limitación, EDTA, EGTA y ácido cítrico.
- 40 La concentración del agente quelante de metales depende de la concentración de iones metálicos en la composición en la etapa a), que puede, por ejemplo, estar afectada por los componentes utilizados en la etapa a). Sin embargo, las concentraciones relevantes de EDTA o EGTA pueden estar en el intervalo de 0,01 mM a 10 mM, tal como en el intervalo de 0,1 mM a 10 mM, tal como en el intervalo de 0,5 mM a 5 mM o en el intervalo de 1 mM a 5 mM, tal como aproximadamente 1 mM o aproximadamente 2 mM o aproximadamente 3 mM o aproximadamente 4 mM o aproximadamente 5 mM.
- 45 50 La concentración de oxígeno, por ejemplo, oxígeno disuelto, en la etapa a) también puede afectar a la reducción de los enlaces disulfuro intercatenarios y/o el intercambio de las regiones Fc de la primera y la segunda proteínas homodiméricas. Por lo tanto, en una realización adicional, las condiciones reductoras en la etapa a) comprenden reducir la cantidad de oxígeno, por ejemplo, oxígeno disuelto, presente en la etapa a), por ejemplo, la cantidad de oxígeno disuelto en la composición de la etapa a).
- 55 60 La presencia de oxígeno o la cantidad de oxígeno, por ejemplo, oxígeno disuelto u oxidante, en la composición en la etapa a) puede verse afectada por diferentes factores, tal como la presencia de diferentes compuestos o efectos mecánicos que pueden reducir o aumentar la transferencia de oxígeno del aire a la solución. Por lo tanto, en una realización adicional, la etapa a) de la presente invención comprende limitar la velocidad de mezcla, limitar el rociado de oxígeno, minimizar la transferencia de oxígeno desde el espacio de la cabeza o cualquier combinación de estos. En una realización, la velocidad de mezcla puede ser, por ejemplo, entre 50-200 rpm, tal como entre 75-150 rpm o entre 75-125 rpm, por ejemplo, de aproximadamente 100 rpm. La tasa de gasificación del espacio de cabeza puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 5-25 ml/min, por ejemplo, en el intervalo de 10-20 ml/min, por ejemplo, aproximadamente 15 ml/min.

La tasa de transferencia de oxígeno se puede determinar con la siguiente ecuación 2:

$$OTR = k_{la} \times \ln(DO^* - DO) \times s,$$

65 en el que,

OTR = tasa de transferencia de oxígeno (mM/h)
 kla = coeficiente de transferencia de oxígeno (1/hora)
 5 DO* = concentración de OD en el equilibrio (nitrógeno = 0 %, aire= 100 %, oxígeno= 500 %)
 DO = concentración real de oxígeno disuelto
 s = solubilidad de oxígeno (aproximadamente 0,2 mM/100 %)

El intervalo óptimo de la tasa de transferencia de oxígeno depende del tipo y la concentración del agente reductor.

10 En el ejemplo 57, se utilizó nitrógeno como gas y el OD del sistema se llevó al 0 % antes de la reacción de intercambio. De acuerdo con la ecuación 2 con $OD^* = 0$ y $OD = 0$, $OTR = 0$ mM/h. Esta condición dio lugar a un intercambio adecuado.

15 En el ejemplo 53, se utilizó aire en la fase gaseosa, entonces $OD^* = 100$ %. El kla para el ejemplo 53 (agitación a 100 RPM) fue de 0,76/h. El OD del sistema cayó del valor de saturación del 100 % a un valor de estado estable del 0,2 %. La tasa de transferencia de oxígeno de esta condición de acuerdo con la ecuación 2 es, por tanto, de 0,15 mM/h. Esta condición dio lugar a un intercambio adecuado.

20 En el ejemplo 55, se utilizó aire en la fase gaseosa, entonces $OD^* = 100$ %. El kla para el ejemplo 55 (agitación a 400 RPM) fue de 4,0/h. El OD del sistema cayó del valor de saturación del 100 % a un valor de estado estable del 3 %. La tasa de transferencia de oxígeno de esta condición de acuerdo con la ecuación 2 es, por tanto, de 0,78 mM/h. Esta condición resultó en una reducción incompleta y una baja conversión en un producto heterodimérico.

25 Estos resultados demuestran que una OTR de 0-0,15 mM/h proporciona resultados adecuados, mientras que en la OTR de 0,78 mM/h o superior proporciona resultados subóptimos, cuando se usó 2-MEA 50 mM como agente reductor.

30 Si se usa aire para la transferencia de oxígeno, el coeficiente de transferencia de oxígeno (kla) en la etapa a) puede ser menor que, por ejemplo, 3/hora, tal como menor que 2/hora o menor que 1/hora o menor que 0,90/hora o menor que 0,80/hora, por ejemplo, menor que 0,76/hora, tal como aproximadamente 0,76/hora.

Otra forma de limitar o purgar la cantidad de oxígeno disuelto en la composición en la etapa a), incluye la adición de un gas inerte, tal como nitrógeno a la etapa a) para desplazar el oxígeno de la composición.

35 Por lo tanto, en una realización adicional, las condiciones reductoras en la etapa a) comprenden desplazar, purgar o reemplazar el oxígeno disuelto en la composición de la etapa a) con un gas inerte, por ejemplo, nitrógeno. Esto se puede lograr, por ejemplo, a través del gas de espacio de cabeza con nitrógeno y/o la purga con suficiente agitación.

40 El progreso de la reducción de los enlaces disulfuro en la región bisagra de la primera y la segunda proteínas homodiméricas puede seguirse controlando el potencial redox y/o controlando la concentración de oxígeno disuelto. Un experto en la técnica conoce bien los medios para dicho control e incluyen, por ejemplo, diferentes tipos de sondas, tal como cualquiera de las descritas o utilizadas en el presente documento.

45 En una realización alternativa, la etapa a) puede realizarse pasando la primera y la segunda proteínas heterodiméricas sobre un material que comprende un agente reductor. Un ejemplo de tal método puede ser una columna que comprende un agente reductor, por ejemplo, una columna reductora inmovilizada que comprende, por ejemplo, un agente reductor descrito en el presente documento, tal como la descrita en el Ejemplo 61.

50 La proteína heterodimérica puede obtenerse de este modo a partir del material, por ejemplo, eluyendo de la columna. La proteína heterodimérica obtenida por este método puede no comprender o comprender solo cantidades traza del agente reductor, ya que este está unido al material, por ejemplo, en la columna. La temperatura, la concentración de oxígeno disuelto, la concentración de la primera y segunda proteínas homodiméricas, el potencial redox y el pH pueden ser similares a los descritos anteriormente.

55 Etapa b)

El método de la presente divulgación comprende además una etapa de:

b) someter la composición obtenida de la etapa a) a condiciones oxidantes suficientes para permitir la oxidación de las cisteínas en la proteína heterodimérica a enlaces disulfuro intercatenarios.

60 En una realización particular, la etapa b) de la presente divulgación comprende:

b) someter al menos 10 ml de la composición obtenida de la etapa a) a condiciones oxidantes suficientes para permitir la oxidación de las cisteínas en la proteína heterodimérica a enlaces disulfuro intercatenarios.

65 Las condiciones reductoras de la etapa a) causan la reducción de los enlaces disulfuro intercatenarios en la región bisagra de la primera y la segunda proteína homodimérica. Además de los enlaces disulfuro intercatenarios en la

región bisagra, también puede haber otros enlaces disulfuro en la primera y/o segunda proteína homodimérica, tal como un enlace disulfuro entre la cadena pesada y ligera de un anticuerpo o enlaces disulfuro intracatenarios. Las condiciones reductoras de la etapa a) también pueden causar la reducción de tales otros enlaces disulfuro inter o intracatenarios en la primera y/o la segunda proteína homodimérica.

- 5 Después del intercambio de las regiones Fc de la primera y la segunda proteínas homodiméricas en la etapa a), puede ser ventajoso si los enlaces disulfuro en la región bisagra entre la primera y la segunda región Fc de la proteína heterodimérica y, opcionalmente, otros enlaces disulfuro, se vuelven a formar. De este modo, se produce una proteína heterodimérica que comprende al menos enlaces disulfuro en la región bisagra y, opcionalmente, 10 también otros enlaces disulfuro en lugares similares a los de la primera y/o la segunda proteínas homodiméricas. La presencia de tales enlaces disulfuro aumenta la estabilidad de la proteína heterodimérica.

15 El ejemplo 41 muestra que después del intercambio de tampón de un anticuerpo biespecífico producido de acuerdo con la etapa a) de la presente invención, el anticuerpo biespecífico solo se reoxidó parcialmente. Por lo tanto, el ejemplo 41 indica que las condiciones de la etapa a) en ese ejemplo no fueron suficientes para la reoxidación de los enlaces disulfuro en la región bisagra del anticuerpo biespecífico. Adicionalmente, el ejemplo 48 y el ejemplo 57 también muestran que cuando la concentración de oxígeno disuelto se reduce reemplazándolo por la adición de nitrógeno, se inhibe la reoxidación de las cisteínas en un anticuerpo en los enlaces disulfuro. Para la oxidación de cisteínas a enlaces disulfuro, dos cisteínas deben estar lo suficientemente cerca una de la otra. El proceso de la 20 presente divulgación generalmente da como resultado una recombinación natural de la proteína heterodimérica. Por lo tanto, las cisteínas en, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico producido por el presente método puede posicionarse generalmente como en el primer y segundo anticuerpos (primera y segunda proteínas homodiméricas), de modo que los enlaces disulfuro presentes en los anticuerpos también se forman en el anticuerpo biespecífico. En el contexto de la presente invención, la referencia a "condiciones oxidantes de la etapa b)" se refiere a "condiciones 25 oxidantes suficientes para permitir la oxidación de cisteínas en la proteína heterodimérica a enlaces disulfuro intercatenarios". En una realización adicional, las condiciones oxidantes en la etapa b) son suficientes para la formación de todos los enlaces disulfuro relevantes en la proteína heterodimérica; por ejemplo, ambos enlaces disulfuro intercatenarios e intracatenarios.

- 30 En el contexto de la presente invención, las condiciones suficientes para permitir la oxidación de las cisteínas en la proteína heterodimérica para los enlaces disulfuro intercatenario significa que al menos el 80 %, tal como al menos el 85 % o al menos el 90 % o al menos el 95 % o al menos el 99 % o el 100 % de los enlaces disulfuro intercatenarios. Como se describe en otra parte en el presente documento, la proteína heterodimérica puede comprender restos de cisteína capaces de formar enlaces disulfuro tanto intercatenarios como intracatenarios. El 35 marco de tiempo relevante para la oxidación de las cisteínas a enlaces disulfuro depende de, por ejemplo, las condiciones de fabricación, y puede ser típicamente en un plazo de 48 horas, tal como en un plazo de 24 horas, o en un plazo de 15 horas o en un plazo de 10 horas o en un plazo de 5 horas o en un plazo de 4 horas o en un plazo de 3 horas o en un plazo de 2 horas.
- 40 Para los fines de producción industrial, aumentando la velocidad de producción, sin afectar negativamente al producto, generalmente se reconoce como una ventaja. Los ejemplos 55 y 56 indican que al aumentar la cantidad de oxígeno aumenta la velocidad de reoxidación de los enlaces disulfuro. Esto puede ser particularmente relevante para la producción de grandes volúmenes de proteína heterodimérica. Por lo tanto, el método de la presente divulgación comprende una etapa b) someter al menos 10 ml de la composición obtenida de la etapa a) a condiciones oxidantes 45 suficientes para permitir la oxidación de cisteínas en la proteína heterodimérica a enlaces disulfuro intercatenarios.

50 En una realización adicional, el volumen de la composición obtenida de la etapa a) que se usa en la etapa b) puede ser de al menos 15 ml, tal como al menos 20 ml o al menos 25 ml o al menos 30 ml o al menos 40 ml o al menos 50 ml o al menos 75 ml o al menos 100 ml o al menos 125 ml o al menos 150 ml o al menos 200 ml o al menos 250 ml o al menos 300 ml o al menos 350 ml o al menos 400 ml o al menos 450 ml o al menos 500 ml o al menos 550 ml o al menos 600 ml o al menos 650 ml o al menos 700 ml o al menos 750 ml o al menos 800 ml o al menos 850 ml o al menos 900 ml o al menos 950 ml o al menos 1 l o al menos 2 l o al menos 3 l o al menos 4 l o al menos 5 l o al menos 10 l. En principio, no existe un límite superior, especialmente si el proceso se ejecuta como un proceso continuo. Sin embargo, para muchas condiciones de proceso, un recipiente de reactor adecuado para este tipo de 55 producción puede tener un tamaño de 1 l a 10.000 l.

60 En una o más realizaciones, la concentración de la proteína heterodimérica en la composición obtenida en la etapa a), por ejemplo, que se utiliza en la etapa b), puede ser de al menos 0,1 mg/ml, tal como al menos 0,2 mg/ml o al menos 0,3 mg/ml o al menos 0,4 mg/ml o al menos 0,5 mg/ml o al menos 0,75 mg/ml o al menos 1 mg/ml o al menos 1,5 mg/ml o al menos 2 mg/ml o al menos 3 mg/ml o al menos 4 mg/ml o al menos 5 mg/ml o al menos 10 mg/ml o al menos 15 mg/ml o al menos 16 mg/ml o al menos 20 mg/ml. El límite superior para la concentración de la proteína heterodimérica puede estar entre 100-200 mg/ml, tal como aproximadamente 100 mg/ml o aproximadamente 150 mg/ml o aproximadamente 200 mg/ml. Por lo tanto, la concentración de la proteína heterodimérica en la composición obtenida de la etapa a) puede estar en el intervalo de 0,1-200 g/l, tal como en el intervalo de 1-100 g/l. La presente divulgación no se limita a concentraciones particulares de proteína heterodimérica, sin embargo, cuando la 65 concentración de proteína (ya sea la primera o la segunda proteínas homodiméricas o la proteína heterodimérica) es

demasiado alta, la composición puede volverse inestable o demasiado viscosa, lo que hace difícil trabajar con ellas y/o se pueden formar agregados de proteínas. En contraste, concentraciones demasiado bajas de proteína heterodimérica pueden no ser económicamente factibles.

5 La cantidad de oxígeno necesaria, por ejemplo, suministrándolo en la etapa b), para obtener condiciones oxidantes suficientes para permitir la oxidación de las cisteínas en la proteína heterodimérica a enlaces disulfuro intercatenarios depende de diferentes factores. Tales factores incluyen, por ejemplo, el volumen de la composición obtenida de la etapa a), la concentración de la proteína heterodimérica, el número de enlaces disulfuro que requieren oxidación y la concentración de oxígeno en la composición obtenida en la etapa a), que puede depender de, por ejemplo, la solubilidad del oxígeno en el tampón, que puede depender de la solución específica o tampón, el pH, la fuerza iónica, la temperatura, la presión y la concentración de oxígeno ambiental. Someter la composición obtenida de la etapa a) a las condiciones oxidantes de la etapa b) de la presente divulgación puede aumentar la velocidad de oxidación de las cisteínas en la proteína heterodimérica a enlaces disulfuro intercatenarios. Generalmente, la cantidad de oxígeno en la etapa b) que es suficiente o necesaria para la oxidación de las cisteínas en la proteína heterodimérica a enlaces disulfuro intercatenarios puede ser o es de aproximadamente 0,5 mol de oxígeno (O_2) por mol de enlace disulfuro, por ejemplo, en el intervalo de 0,25-0,75 mol de oxígeno (O_2) por mol de enlace disulfuro, tal como 0,3-0,7 mol de oxígeno (O_2) por mol de enlace disulfuro. Esto corresponde a un mol de oxígeno (O_2) por dos moles de cisteínas, tal como en el intervalo de 0,6-1,4 moles de oxígeno (O_2) por dos moles de cisteínas. Por lo tanto, en una realización, las "condiciones oxidantes" en la etapa b) comprenden 0,3-0,7 moles de oxígeno por mol de enlace disulfuro, tal como 0,5 moles de oxígeno presente por mol de enlace disulfuro o en el intervalo de 0,6-1,4 moles de oxígeno por dos moles de cisteínas, por ejemplo, 1 mol de oxígeno por dos moles de cisteínas.

Por lo tanto, la concentración relevante de oxígeno para obtener dicha relación entre el oxígeno y los enlaces disulfuro o cisteínas depende de la concentración de proteína heterodimérica en la composición obtenida en la etapa a).

En una realización, las condiciones oxidantes en la etapa b) pueden comprender una concentración de oxígeno de al menos 0,05 mM, tal como oxígeno de al menos 0,075 mM u oxígeno de al menos 0,1 mM u oxígeno de al menos 0,125 mM u oxígeno de al menos 0,15 mM u oxígeno de al menos 0,175 mM u oxígeno de al menos 0,2 mM.

30 La solubilidad molecular del oxígeno es 0,206 mM en agua de mar, a 1 atm, 25 °C. Sin embargo, en las condiciones del presente método, por ejemplo, los tampones, la temperatura etc., la concentración de oxígeno en la composición obtenida de la etapa a) puede ser inferior a 0,2 mM.

35 Dado que la solubilidad del oxígeno depende de la presión parcial del oxígeno en la fase gaseosa, se puede obtener una mayor transferencia de oxígeno aumentando la presión del aire en el sistema. Por ejemplo, un aumento de dos veces en la presión da como resultado un aumento de dos veces en la concentración de oxígeno disuelto en equilibrio y una mayor tasa de transferencia de oxígeno. Como alternativa, la presión parcial de oxígeno en la fase gaseosa puede aumentarse utilizando oxígeno en lugar de aire. Dado que el aire contiene aproximadamente 21 % 40 de oxígeno, el uso de oxígeno puro proporciona una concentración aproximadamente cinco veces mayor de oxígeno disuelto en equilibrio y una mayor tasa de transferencia de oxígeno. La presión y el oxígeno puro se pueden combinar para aumentar aún más la solubilidad del oxígeno y la tasa de transferencia.

45 En una realización, las condiciones oxidantes en la etapa b) comprenden saturar la composición obtenida de la etapa a) con oxígeno.

La composición obtenida de la etapa a) generalmente comprende bajas cantidades de oxígeno, para asegurar una reducción adecuada de los enlaces disulfuro intercatenarios en la región bisagra. Por lo tanto, puede ser necesario suministrar oxígeno en la etapa b) del método de la presente invención.

50 En una realización, la primera y la segunda proteínas homodiméricas pueden, tal como se ha descrito anteriormente, estar presentes en una solución, tal como en un tampón. Por lo tanto, la composición obtenida de la etapa a) puede ser en una realización particular una solución, por ejemplo, un tampón. En esta realización es la cantidad de oxígeno disuelto en la solución, es decir, la concentración de oxígeno disuelto, lo cual es importante para la oxidación de las cisteínas en la proteína heterodimérica.

55 Así, en una realización, "las condiciones oxidantes de la etapa b)" se refieren a controlar el nivel de oxígeno disuelto, que puede, por ejemplo, comprender aumentar la cantidad o concentración de oxígeno disuelto en la composición obtenida en la etapa a).

60 Se pueden usar diferentes medios para obtener o crear las condiciones oxidantes de la etapa b) en el método de la presente invención e incluyen, pero sin limitación, los descritos en el presente documento.

65 En una realización, las condiciones oxidantes de la etapa b) de la presente invención comprenden la adición de oxígeno. La expresión "añadir oxígeno" debe, en el contexto de la presente invención, entenderse que aumenta la cantidad de oxígeno, por ejemplo, oxígeno disuelto, en la composición obtenida de la etapa a), de modo que sea

suficiente para permitir la oxidación de las cisteínas en la proteína heterodimérica a enlaces disulfuro intercatenarios. Los medios o métodos para añadir oxígeno incluyen, pero sin limitación, medios mecánicos, cambiando la solución o el tampón de la composición obtenida en la etapa a) a una solución de tampón que comprende una mayor cantidad de oxígeno, tal como uno de los tampones usados para la diafiltración descritos en el presente documento, diluir la

5 solución o tampón de la composición obtenida de la etapa a) con una solución o tampón que comprende suficiente oxígeno, añadir compuestos capaces de generar oxígeno, aumentar la presión o añadir directamente o incluir oxígeno, por ejemplo, gas oxígeno. También se pueden usar combinaciones de tales métodos.

10 La cantidad o concentración de oxígeno en la etapa b) se puede medir, por ejemplo, de forma continua, para asegurar que haya suficiente oxígeno en todo momento durante la etapa b). Los métodos o equipos para medir el oxígeno son bien conocidos por los expertos en la técnica y pueden incluir, por ejemplo, cualquiera de los descritos en el presente documento, tal como las sondas descritas en el Ejemplo 44.

15 Se puede añadir oxígeno a la etapa b), por ejemplo, rociando con oxígeno o aire o aumentando la presión. Otro método puede ser aumentar la transferencia de oxígeno de los alrededores, por ejemplo, aire. Esto se puede hacer, por ejemplo, por medios mecánicos, por ejemplo, mediante agitación, agitación, aumentando la presión o creando flujo. Por ejemplo, si la composición en la etapa b) está presente en un recipiente, tal como un vaso, el oxígeno puede, por ejemplo, transferirse a la composición de la etapa b) desde, por ejemplo, un espacio de cabeza, o se pueden aplicar medios para agitar o agitar la composición de la etapa b). Controlando la velocidad de agitación o 20 remoción de la composición en la etapa b), se puede controlar la tasa de transferencia de oxígeno del ambiente, es decir, cuanto mayor sea la velocidad de agitación o remoción, o el flujo, más oxígeno se puede transferir a la composición obtenida en la etapa a). También se pueden aplicar medios para aumentar la presión. La adición de oxígeno a la etapa b) también se puede realizar mediante una combinación de diferentes medios, por ejemplo, la agitación y/o remoción se pueden combinar con la inyección y/o el aumento de la presión de la composición en la 25 etapa b) con oxígeno o aire.

En otra realización, las condiciones oxidantes en la etapa b) de la presente invención comprenden un agente oxidante. El agente oxidante es, preferentemente, uno que es capaz de asegurar la oxidación de los enlaces disulfuro intercatenarios en la proteína heterodimérica, pero al mismo tiempo evita la oxidación de otras partes de la 30 proteína heterodimérica, tales como aminoácidos como metionina y triptófano, que se sabe que son sensibles a la oxidación. Un ejemplo de un agente oxidante adecuado es el ácido deshidroascórbico (dhAA). Si se usa dhAA para oxidar un agente reductor presente en la etapa a), las concentraciones típicas de dhAA pueden estar en el intervalo de 1-2 veces la concentración del agente reductor, por ejemplo, en el intervalo de 50-100 mM. Si el agente reductor 35 presente en la etapa a) se elimina antes de añadir dhAA, la cantidad de agente oxidante suficiente para permitir la oxidación de las cisteínas en la proteína heterodimérica a enlaces disulfuro intercatenarios puede ser menor, tal como en el intervalo de 0,01-1 mM, por ejemplo, 0,1-1 mM. Si un agente oxidante, tal como dhAA se añade en la etapa b) de la presente invención, puede eliminarse posteriormente utilizando técnicas estándar de filtración y/o cromatografía.

40 Se pueden utilizar diferentes medios o métodos para añadir o aumentar el oxígeno en la etapa b) en combinación.

Por ejemplo, independientemente de cómo se añada el oxígeno, por ejemplo, por rociado con oxígeno, remoción, agitando o creando flujo, puede, en una realización, combinarse con la adición de un agente oxidante.

45 En una realización de la presente invención, las condiciones reductoras de la etapa a) comprenden un agente reductor, que también puede estar presente en la composición obtenida de la etapa a) y, por lo tanto, sometida a las condiciones oxidantes en la etapa b). La presencia de un agente reductor en la etapa b) puede ser perjudicial para las condiciones oxidantes de la etapa b). Por lo tanto, en una realización, la proteína heterodimérica se puede separar del agente reductor. Como se describe a continuación, los inventores de la presente invención han 50 descubierto que ciertos métodos para separar el agente reductor de la proteína heterodimérica dan como resultado o crean condiciones oxidantes suficientes para permitir la oxidación de las cisteínas en la proteína heterodimérica a enlaces disulfuro intercatenarios.

55 Eliminar el agente reductor o separar la proteína heterodimérica del agente reductor, puede no ser necesariamente suficiente, dependiendo del método, para permitir la oxidación de las cisteínas en la proteína heterodimérica en enlaces disulfuro intercatenarios, especialmente no cuando grandes cantidades de proteína heterodimérica, es decir, altas concentraciones y/o altos volúmenes de proteína heterodimérica, se producen en la etapa a) (véanse, por ejemplo, los ejemplos 41, 52 y 53). Sin embargo, puede ser ventajoso por otras razones separar la proteína heterodimérica del agente reductor y el método de la presente divulgación puede, por lo tanto, comprender además 60 una etapa de separación de la proteína heterodimérica del agente reductor. Las realizaciones para separar el agente reductor de la proteína heterodimérica se describen adicionalmente a continuación.

Otro método para disminuir la cantidad de agente reductor en la composición obtenida de la etapa a) es aumentar el volumen de dicha composición, disminuyendo así la concentración del agente reductor en la composición obtenida de la etapa a). Por tanto, en una realización adicional, el volumen de la composición obtenida de la etapa a) se puede aumentar, por ejemplo, añadiendo el mismo tampón que el tampón de composición obtenido en la etapa a)

con la excepción de que no contiene el agente reductor de la etapa a) o añadiendo un tampón diferente del tampón de la composición obtenida en la etapa a), que no contiene el agente reductor de la etapa a). El aumento del volumen de la composición obtenida de la etapa a) se puede usar en combinación con otras realizaciones descritas en el presente documento, incluyendo métodos para separar el agente reductor y la proteína heterodimérica.

- 5 La adición de oxígeno y/o un agente oxidante a la composición en la etapa b), tal como se ha descrito anteriormente, puede ser suficiente para permitir la oxidación de las cisteínas en la proteína heterodimérica a enlaces disulfuro intercatenarios. Adicionalmente, si la etapa a) comprende un agente reductor, estas condiciones también pueden ser suficientes para la oxidación del agente reductor, de modo que no puede reducir más los enlaces disulfuro intercatenarios de la proteína heterodimérica. Por lo tanto, en una realización adicional, las condiciones oxidantes de la etapa b) son suficientes para permitir la oxidación del agente reductor de la etapa a). Por ejemplo, si se usa 2-MEA como agente reductor en la etapa a), las condiciones oxidantes de la etapa b) pueden ser tales que 2-MEA se autoxide, de modo que no puede reducir ningún enlace disulfuro (véase, por ejemplo, el Ejemplo 59). Independientemente de si el agente reductor está oxidado o no, puede ser relevante separar posteriormente la proteína heterodimérica del agente reductor. Por tanto, en una realización adicional, el método de la presente divulgación también puede incluir la separación de la proteína heterodimérica y el agente reductor. Los métodos para separar la proteína heterodimérica del agente reductor incluyen cualquiera de los descritos en el presente documento, por ejemplo, más adelante. La separación de la proteína heterodimérica y el agente reductor puede ser parte de la etapa b) o puede ser una etapa separada.
- 10 20 Por lo tanto, en una realización, la etapa b) comprende añadir oxígeno o un agente oxidante y, opcionalmente, separar posteriormente la proteína heterodimérica del agente reductor. La separación de la proteína heterodimérica del agente reductor también se puede realizar como una etapa separada, después de la etapa b).
- 15 25 Añadir oxígeno y/o un agente oxidante en la etapa b) también puede dar como resultado la oxidación del agente reductor, mientras que las cisteínas en la proteína heterodimérica no están completamente oxidadas a enlaces disulfuro. En este caso, la proteína heterodimérica se puede separar del agente reductor y, después, las cisteínas de la proteína heterodimérica se pueden oxidar para formar enlaces disulfuro intercatenarios, por ejemplo, tal como se ha descrito anteriormente, añadiendo oxígeno y/o un agente oxidante. Así, la etapa b) puede, en una realización, 30 comprender someter la composición obtenida de la etapa a) a condiciones oxidantes suficientes para oxidar el agente reductor, separar la proteína heterodimérica del agente reductor y someter la proteína heterodimérica a condiciones suficientes para permitir la oxidación de las cisteínas en la proteína heterodimérica a enlaces disulfuro intercatenarios. La oxidación del agente reductor y las cisteínas en la proteína heterodimérica a enlaces disulfuro intercatenarios se puede hacer o realizar de manera similar, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente 35 añadiendo oxígeno y/o un agente oxidante. Sin embargo, puede haber algunas diferencias con respecto a la cantidad de oxígeno necesaria, los tiempos de incubación, etc. para la oxidación del agente reductor y la oxidación de las cisteínas en la proteína heterodimérica a enlaces disulfuro intercatenarios. Los métodos para separar la proteína heterodimérica del agente reductor incluyen, pero sin limitación, cualquiera de los descritos a continuación, por ejemplo, diálisis, precipitación, cromatografía o filtración. Por tanto, en una realización, la etapa b) puede 40 comprender someter la composición obtenida de la etapa a) a cromatografía, por ejemplo, cromatografía en columna o filtración, por ejemplo, diafiltración, tal como filtración de flujo tangencial o filtración de flujo normal. Los métodos para realizar la cromatografía o filtración incluyen, pero sin limitación, cualquiera de los descritos a continuación.
- 45 50 En otra realización, las condiciones oxidantes de la etapa b) pueden ser tales que las cisteínas de la proteína heterodimérica se oxiden a enlaces disulfuro intercatenarios simultáneamente con la separación de la proteína heterodimérica y el agente reductor. En este caso, la etapa b) de la presente divulgación puede comprender añadir oxígeno y/o un agente oxidante, tal como se ha descrito anteriormente, simultáneamente con la separación de la proteína heterodimérica y el agente reductor. Por tanto, en una realización, el método o las condiciones para separar la proteína heterodimérica del agente reductor pueden conducir a la oxidación de las cisteínas en la proteína heterodimérica o permitir que se formen enlaces disulfuro intercatenarios. Así, la etapa b) puede, en una realización, comprender la separación de la proteína heterodimérica y el agente reductor. Los métodos para separar la proteína heterodimérica del agente reductor incluyen, pero sin limitación, cualquiera de los descritos a continuación, por ejemplo, diálisis, precipitación, cromatografía o filtración. Por tanto, en una realización, la etapa b) puede 55 comprender someter la composición obtenida de la etapa a) a cromatografía, por ejemplo, cromatografía en columna o filtración, por ejemplo, diafiltración, tal como filtración de flujo tangencial o filtración de flujo normal. Los métodos para realizar la cromatografía o filtración incluyen, pero sin limitación, cualquiera de los descritos a continuación.
- 60 65 En otra realización más, el método de la presente divulgación puede comprender separar la proteína heterodimérica del agente reductor y, posteriormente, someter la proteína heterodimérica a condiciones oxidantes suficientes para permitir la oxidación de las cisteínas a enlaces disulfuro intercatenarios en la proteína heterodimérica. En esta realización, la etapa de separar la proteína heterodimérica del agente reductor puede considerarse como una etapa separada antes de la etapa b) o puede considerarse como parte de la etapa b). Los métodos para separar la proteína heterodimérica del agente reductor incluyen, pero sin limitación, cualquiera de los descritos a continuación, por ejemplo, diálisis, precipitación, cromatografía o filtración. Las condiciones oxidantes suficientes para permitir la oxidación de las cisteínas a enlaces disulfuro intercatenarios en la proteína heterodimérica se pueden obtener tal como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, añadiendo oxígeno y/o un agente oxidante a la composición que

comprende la proteína heterodimérica.

Los métodos para separar la proteína heterodimérica del agente reductor pueden, en principio, ser cualquier método que conduzca o sea capaz de separar los dos sin dañar la proteína heterodimérica. Dichos métodos incluyen, pero sin limitación, diálisis, precipitación, cromatografía o filtración. La separación de la proteína heterodimérica y el agente reductor se puede realizar como un proceso continuo o se puede realizar como un proceso discontinuo.

- 5 La composición obtenida de la etapa a) que comprende la proteína heterodimérica puede ser, en particular, una solución, tal como en un tampón. La separación de la proteína heterodimérica del agente reductor también se puede 10 hacer intercambiando el tampón o la solución de la composición obtenida en la etapa a), con otro tampón o solución sin el agente reductor. Con la excepción de la presencia del agente reductor, el tampón o la solución se pueden 15 intercambiar por el mismo tampón o solución que la composición obtenida en la etapa a) o se puede cambiar por otro tampón o solución, tal como un tampón o solución adecuados para las etapas posteriores o para una formulación final de la proteína heterodimérica. La solución o tampón, a la que se intercambia la solución o el 20 tampón de la composición obtenida en la etapa a), puede, en una realización, comprender también oxígeno, por ejemplo, oxígeno disuelto o un agente oxidante. Por tanto, el intercambio o dilución de la solución o tampón de la 25 composición obtenida en la etapa a), en la etapa b), puede crear "condiciones oxidantes suficientes para permitir la oxidación de las cisteínas en la proteína heterodimérica a enlaces disulfuro intercatenarios". Las condiciones oxidantes de la etapa b) se pueden obtener, como se ha descrito anteriormente, por diferentes medios; por ejemplo, 30 añadiendo oxígeno o un agente oxidante, eliminando el agente reductor (separación de la proteína heterodimérica y el agente reductor), medios mecánicos, por ejemplo, cromatografía o método de filtración, y/o por intercambio del 35 tampón o solución de la composición obtenida de la etapa a) a un tampón o solución que comprende una mayor cantidad de oxígeno o un agente oxidante. En este contexto, debe entenderse que "cantidades más altas de oxígeno" se comparan con la cantidad de oxígeno presente en el tampón o solución de la composición obtenida en la etapa a). El intercambio del tampón o la solución de la composición obtenida de la etapa a) se puede realizar, por ejemplo, mediante cromatografía o filtración. Por lo tanto, en una realización, el método de la presente invención comprende una etapa de intercambio de la solución, por ejemplo, tampón, de la composición obtenida de la etapa a) mediante cromatografía o filtración.
- 30 El intercambio de la solución o el tampón de la composición obtenida en la etapa a) puede por ejemplo, realizarse con al menos 3 (tres) volúmenes del tampón o solución sin el agente reductor. En principio, no hay límite superior para el número de volúmenes que se pueden intercambiar, pero, para la mayoría de los fines prácticos, se pueden 35 intercambiar 3-12 volúmenes de tampón o solución, tal como en el intervalo de 4-11 volúmenes o en el intervalo de 4-10 volúmenes o en el intervalo de 5-10 volúmenes, por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 volúmenes pueden ser suficientes para reducir la concentración del agente reductor adecuadamente o para eliminar el agente reductor de la composición obtenida en la etapa a).

- 40 La separación de la proteína heterodimérica y el agente reductor por cromatografía o filtración puede implicar un intercambio de la solución o tampón, es decir, un intercambio de tampón o solución como se ha descrito anteriormente.

- 45 Un ejemplo adecuado de un método de cromatografía para separar la proteína heterodimérica y el agente reductor puede ser, en una realización particular, un método de cromatografía basado en la unión y elución. La expresión "unir y eluir" o "unión y elución" se basa en la unión del agente reductor o la proteína heterodimérica a un material de cromatografía, mientras que el otro componente no se une. El componente que no se une al material de cromatografía puede recogerse en las etapas de flujo y lavado, mientras que el material unido puede recogerse por separado después de cambiar las condiciones del tampón para eluir el componente de la columna. Existen diferentes métodos de cromatografía y el más adecuado depende de la elección del agente reductor y la proteína heterodimérica. Ejemplos adecuados incluyen, pero sin limitación, cromatografía de proteína A y proteína G (u otras 50 formas de cromatografía de afinidad), cromatografía de afinidad basada en, por ejemplo, anticuerpos de unión a antígeno o antiidiotípicos, kappa o lambda determinadas, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de modo mixto, por ejemplo, cromatografía de afinidad de metales inmovilizados, de hidroxiapatita intercambio iónico, interacciones hidrófobas, y cromatografía de adsorción tiofílica.
- 55 En una realización, la cromatografía puede ser cromatografía en columna. La cromatografía puede, tal como se ha descrito anteriormente, implicar un intercambio del tampón o solución de la composición obtenida de la etapa a) con otro tampón o solución sin un agente reductor. Esto puede implicar, por ejemplo, en el intervalo de 3-12 volúmenes de intercambio de tampón o solución. Los métodos de cromatografía se realizan a menudo como procesos discontinuos, de esta manera, si la proteína heterodimérica y el agente reductor se separan por cromatografía, en 60 una realización puede realizarse como un proceso discontinuo.

- 65 Tal como se ha descrito anteriormente, la proteína heterodimérica y el agente reductor también se pueden separar por filtración. Un ejemplo adecuado de un método de filtración es la diafiltración. Los inventores de la presente invención han descubierto que las condiciones de diafiltración pueden ser suficientes para permitir la oxidación de las cisteínas en la proteína heterodimérica a enlaces disulfuro intercatenarios incluso cuando se utilizan grandes volúmenes de la composición obtenida en la etapa a) (véase, por ejemplo, el ejemplo 41). Por lo tanto, la

- separación de la proteína heterodimérica y el agente reductor por diafiltración se puede realizar simultáneamente con la oxidación de las cisteínas en la proteína heterodimérica a enlaces disulfuro intercatenarios. De este modo, la etapa b) de la presente invención puede comprender en una realización particular la diafiltración de la composición obtenida de la etapa a). La diafiltración puede implicar al menos tres volúmenes de intercambio de tampón o solución, como se ha descrito anteriormente. Los métodos de diafiltración incluyen filtración de flujo tangencial (TFF) y filtración de flujo normal (NFF), ambos de los cuales pueden usarse en el método de la presente invención. Tanto la TFF como la NFF se pueden realizar como procesos continuos o como procesos discontinuos. Por lo tanto, en una realización, la etapa b) de la presente invención comprende someter la composición obtenida de la etapa a) a uno de los siguientes métodos: TFF continua, TFF discontinua, NFF continua o NFF discontinua.
- Los expertos en la técnica conocen diferentes métodos de diafiltración. Para los fines de la presente invención, la diafiltración puede, por ejemplo, realizarse con una membrana que tenga un valor de corte en el intervalo de 10-50 kDa, por ejemplo, 20-40 kDa, tal como aproximadamente 30 kDa. La membrana puede estar hecha, por ejemplo, de un material tal como poliétersulfona (PES), poliétersulfona modificada (mPES), celulosa regenerada (RC), triacetato de celulosa (CTA), difluoruro de polivinilideno hidrofilizado (PVDF), nitrocelulosa o nylon. La configuración de la membrana puede, por ejemplo, ser fibra hueca, hoja plana o en espiral.
- En una realización, un cartucho hueco, tal como un cartucho de fibra, puede usarse para la diafiltración. El área de superficie de un cartucho hueco afecta a la velocidad de diafiltración, es decir, cuanto mayor sea el área de superficie, mayor será la velocidad de diafiltración. La velocidad de diafiltración puede medirse, por ejemplo, como l/hora. El área de superficie puede estar en el intervalo de 0,05-1 m², por ejemplo, en el intervalo de 0,05-0,5 m², tal como aproximadamente 0,1 m² o aproximadamente 0,16 m², o aproximadamente 0,4 m².
- La presión de entrada del cartucho puede estar en el intervalo de 10-40 psig (70-280 kPa), preferentemente en el intervalo de 20-30 psig (140-210 kPa).
- El término "psig" se refiere a libras por pulgada cuadrada por encima de la presión atmosférica y la correlación con la unidad Pa (Pascal) es 101.325 Pa = 14,7 psig.
- El término "PSI" se refiere a libras por pulgada cuadrada.
- La diafiltración se puede realizar durante el período de tiempo necesario para realizar un número relevante de volúmenes de intercambio de tampón/solución. Un período de tiempo adecuado depende, por ejemplo, en la superficie de la membrana, el tipo de membrana, la concentración de proteína heterodimérica, la presión del sistema, la tasa de circulación, la geometría del cartucho de filtro, la temperatura, la viscosidad de la solución, el volumen que se va a filtrar, la cantidad de suciedad del filtro causada por la solución, en el proceso de diafiltración. Normalmente, la diafiltración puede realizarse entre 30 minutos y 20 horas.
- En una realización, la diafiltración se puede realizar haciendo circular la composición a través de un cartucho de fibra hueca que comprende un valor de corte en el intervalo de 10-50 kDa y con un área de superficie en el intervalo de 0,05-1 m² con una presión de entrada del cartucho en el intervalo de 70-280 kPa, hasta de se ha producido un intercambio de uno a siete, tal como de tres a siete o de cinco a siete o siete volúmenes de tampón.
- En una realización, la diafiltración puede realizarse haciendo circular la composición a través de un cartucho de fibra hueca de poliétersulfona modificada de 30 kDa con un área de superficie de 0,1 m² con una presión de entrada del cartucho de 25 PSI (170 kPa), lo que da como resultado un flujo de permeado de 25 ml/min, hasta que se ha producido un intercambio de cinco a siete, tal como siete (7) volúmenes de tampón.
- En una realización, la diafiltración puede realizarse haciendo circular la composición a través de un cartucho de fibra hueca de poliétersulfona modificada de 30 kDa con un área de superficie de 0,4 m² con una presión de entrada del cartucho de 25 PSI (170 kPa), lo que da como resultado un flujo de permeado de 100 ml/min, hasta que se ha producido un intercambio de cinco a siete, tal como siete (7) volúmenes de tampón.
- En una realización, la diafiltración puede realizarse haciendo circular la composición a través de un cartucho de fibra hueca de poliétersulfona modificada de 30 kDa con un área de superficie de 0,16 m² con una presión de entrada del cartucho de 25 PSI (170 kPa), lo que da como resultado un flujo de permeado de 100 ml/min, hasta que se ha producido un intercambio de cinco a siete, tal como siete (7) volúmenes de tampón.
- Realizar la filtración como un proceso continuo generalmente comprende añadir un tampón o una solución al sistema a la misma velocidad que al eliminar el permeado, de este modo, se mantiene constante la cantidad de solución/tampón en el sistema. Por lo tanto, en el contexto de la presente invención, esto significaría que en la etapa b) se añade tampón/solución a la composición obtenida de la etapa a) a la misma velocidad que el permeado, se elimina. La proteína heterodimérica se puede recoger de la fracción retenida. Realizar cromatografía o filtración como procesos discontinuos en el método de la presente divulgación, puede, por otra parte, implicar típicamente concentrar la proteína heterodimérica presente en la composición obtenida de la etapa a) mientras se elimina la solución de la composición obtenida de la etapa a). Como alternativa, la composición obtenida de la etapa a) que

comprende la proteína heterodimérica puede diluirse y posteriormente concentrarse por cromatografía o filtración. La proteína heterodimérica concentrada puede, si el proceso se realiza más de una vez, diluirse posteriormente en tampón o solución nuevamente antes de repetir la etapa de cromatografía o filtración.

5 En una realización, la composición obtenida de la etapa a) se puede diluir antes de separar el agente reductor y la proteína heterodimérica.

10 En una realización que separa la proteína heterodimérica y el agente reductor por cromatografía o filtración, por ejemplo, la diafiltración se puede realizar una vez.

15 En algunas realizaciones, la separación de la proteína heterodimérica y el agente reductor por cromatografía o filtración puede repetirse dos o más veces, por ejemplo, con una etapa diferente entremedias. Por lo tanto, en una realización, el método de la presente divulgación puede comprender las etapas I)-III). En una realización particular, la etapa b) de la presente divulgación puede comprender las etapas I)- III):

15 III) separar la proteína heterodimérica y el agente reductor de la composición obtenida en la etapa a),
 II) incubar la composición obtenida de la etapa I) que comprende la proteína heterodimérica,
 III) separar la proteína heterodimérica y el agente reductor de la composición obtenida en la etapa II).

20 La separación de la proteína heterodimérica y el agente reductor puede no estar completa en la etapa I), por lo tanto, la composición que comprende la proteína heterodimérica obtenida de la etapa I) todavía puede comprender un agente reductor.

25 La separación de la proteína heterodimérica y el agente reductor en la etapa I) y III) puede realizarse mediante un método descrito en el presente documento, tal y como se ha descrito con anterioridad. En particular, se puede realizar mediante diafiltración. Las condiciones de cromatografía y filtración descritas anteriormente también se aplican a la etapa I) y III). La incubación de la proteína heterodimérica obtenida de la etapa I) en la etapa II) puede por ejemplo, realizarse durante un período de 1 hora a 10 días o de 1 hora a 5 días o de 1 hora a 3 días o de 1 hora a 48 horas, tal como un período de 5-24 horas u 8-18 horas y a una temperatura en el intervalo de 10-45 °C, por 30 ejemplo, en el intervalo de 15-40 °C o en el intervalo de 15-35 °C o en el intervalo de 20-40 °C o en el intervalo de 20-35 °C. En una realización adicional, la incubación de la proteína heterodimérica obtenida de la etapa I) en la etapa II) se puede realizar durante un período de 1 a 24 horas y a una temperatura en el intervalo de 15-40 °C.

35 En una realización adicional, la etapa I) puede comprender diafiltración de la composición obtenida de la etapa a). Por lo tanto, en una realización adicional, las etapas I), II) y III) pueden comprender:

40 I) diafiltración de la composición obtenida en la etapa a)
 II) incubación de la fracción retenida obtenida de la etapa I)
 III) diafiltración de la composición obtenida de la etapa II).

45 En una realización adicional, la diafiltración en las etapas I) y/o III) puede comprender un intercambio de tampón, tal como en el intervalo de 3-12 volúmenes de intercambio de tampón.

45 En una realización adicional más, la etapa II) comprende la incubación a una temperatura en el intervalo de 15-35 °C durante un período de 12-48 horas.

50 Como se muestra en el ejemplo 45, la repetición de la separación de la proteína heterodimérica y el agente reductor puede, en algunas condiciones, por ejemplo, dependiendo de las condiciones reductoras de la etapa a), ayudar a asegurar una reoxidación completa de las cisteínas en la proteína heterodimérica para formar enlaces disulfuro intercatenarios y/o minimizar aún más la cantidad de agente reductor en la composición que comprende la proteína heterodimérica.

55 Los inventores de la presente invención han descubierto además que la presencia de EDTA, un agente quelante de metales (véanse los ejemplos 49), da como resultado una disminución en la tasa de oxidación de las cisteínas en una proteína homodimérica a enlaces disulfuro intercatenarios, en el que la proteína homodimérica se usa como un ejemplo de una proteína heterodimérica. Similar, se vieron observaciones de una proteína heterodimérica (Ejemplo 54). Esto indica que la presencia de un ion metálico en la etapa b) aumenta la velocidad de oxidación de las cisteínas en la proteína heterodimérica a enlaces disulfuro intercatenarios, al menos en comparación con la situación en la que no hay iones metálicos presentes. Por lo tanto, en una realización adicional, la etapa b), por ejemplo, las condiciones oxidantes en la etapa b), puede comprender un ion metálico. El ion metálico se puede añadir a la composición obtenida de la etapa a), en la etapa b) o puede estar presente en la composición obtenida de la etapa a), por ejemplo, por la elección del tampón o solución en la etapa a). Por tanto, en una realización, las condiciones oxidantes en la etapa b) comprenden añadir un ion metálico. Incluso si un ion metálico ya está presente en la composición obtenida en la etapa a), Se pueden añadir iones metálicos adicionales a o durante la etapa b), especialmente si la concentración del ion metálico es tan baja que puede limitar la velocidad para la oxidación de las cisteínas en la proteína heterodimérica a enlaces disulfuro intercatenarios o si está presente un agente quelante de

metales. Ejemplos de iones metálicos adecuados son, en particular, iones de metales de transición divalentes, tal como cobre, por ejemplo, en forma de sulfato de cobre, manganeso, hierro, níquel, magnesio y cobalto. El ion metálico puede estar presente adecuadamente o añadirse a una concentración en el intervalo de 0,01-100 ppm o 0,1-100 μ M. Se puede añadir cobre a la etapa b) como, por ejemplo, sulfato de cobre.

- 5 La adición de un metal de transición divalente, por ejemplo, cobre, por ejemplo, en forma de sulfato de cobre, puede, en particular, añadirse si había un agente quelante de metales presente en la etapa a) del método. El sulfato de cobre puede funcionar como catalizador para la oxidación con oxígeno.
- 10 Los inventores de la presente invención también han descubierto que el potencial redox en la etapa b) afecta, en particular a la tasa, aunque también en cierta medida al rendimiento, de la reoxidación de las cisteínas en la proteína heterodimérica a enlaces disulfuro intercatenarios. Los inventores de la presente invención han descubierto que la reoxidación de los enlaces disulfuro intercatenarios entre las cadenas pesadas comienza a aproximadamente -350 mV, mientras que el de los enlaces intercatenarios entre las cadenas pesada y ligera comienza a aproximadamente -280 mV. La formación completa de todos los enlaces disulfuro en la proteína heterodimérica generalmente se produce cuando el potencial redox es mayor que -50 mV, mientras que para la robustez óptima del proceso, el potencial redox debería ser, preferentemente, de al menos 50 mV. Por tanto, en una realización adicional, el potencial redox en la etapa b) puede ser superior a -300 mV, tal como mayor que -280 mV o mayor que -75 mV o mayor que -50 mV o mayor que 0 mV o mayor que 25 mV o mayor que 50 mV. Para la oxidación de las cisteínas en la proteína heterodimérica a enlaces disulfuro, es el límite inferior del potencial redox lo que es relevante. El límite superior del potencial redox en la etapa b) puede ser aproximadamente 100-300 mV, por ejemplo, 100-200 mV, tal como aproximadamente 100 mV o aproximadamente 200 mV o aproximadamente 250 mV o aproximadamente 300 mV. Por lo tanto, el potencial redox de la etapa b) puede estar en el intervalo de -300 mV a 300 mV o de -300 mV a 200 mV o en el intervalo de -280 mV a 300 mV o de -280 mV a 200 mV o en el intervalo de -75 mV a 300 mV o -75 mV a 200 mV o en el intervalo de -50 mV a 300 mV o -50 mV a 200 mV o en el intervalo de 0 mV a 300 mV o de 0 mV a 200 mV o en el intervalo de 25 mV a 300 mV o de 25 mV a 200 mV o en el intervalo de 50 mV a 300 mV o de 50 mV a 200 mV.
- 15 Los inventores de la presente invención han descubierto además que en la realización en la que la composición obtenida de la etapa a) es una solución, el pH en la etapa b) también afecta a la oxidación de las cisteínas en la proteína heterodimérica a enlaces disulfuro. Por tanto, en una realización adicional, el pH en la etapa b) puede estar en una realización particular en el intervalo de pH 6-8,5, tal como un intervalo de pH 6,5-8 o en el intervalo de pH 6,5-8,5 o en el intervalo de pH 6-8 o un intervalo de pH 6,5-7,5 o un intervalo de pH 7-7,5, por ejemplo, aproximadamente pH 7,4.
- 20 35 Asegurar que el pH de la composición en la etapa b) se encuentre dentro de un cierto intervalo, por ejemplo, pH 6-8,5, puede hacerse, por ejemplo, eligiendo una solución o tampón en la etapa a) con un pH adecuado o añadiendo a la composición en la etapa b) un componente capaz de ajustar el pH, por ejemplo, una solución concentrada de ajuste de pH. Asegurar que el pH de la composición en la etapa b) esté dentro de un intervalo particular, también se puede hacer usando uno de los métodos descritos anteriormente que comprende un intercambio de tampón, para que el tampón o solución a la que se intercambia, comprende un pH dentro del intervalo relevante.
- 25 40 El tampón o solución en la etapa b), por ejemplo, a la que se cambia la composición obtenida en la etapa a), por ejemplo, por diafiltración, puede incluir, pero sin limitación a ninguno de los descritos en el presente documento, tal como cualquiera de los descritos en los ejemplos. Los ejemplos de tales tampones incluyen, por ejemplo, PBS (solución salina tamponada con fosfato), PBS, pH 7,4.
- 45 55 El progreso de la reducción de los enlaces disulfuro intercatenarios en la región bisagra de la primera y la segunda proteína homodimérica se puede seguir monitorizando el potencial redox y/o monitorizando la concentración de oxígeno disuelto. Un experto en la técnica conoce bien los medios para dicho control, e incluyen, por ejemplo, uso de diferentes tipos de sondas, por ejemplo, una de las sondas descritas en el Ejemplo 44.
- 50 En algunas realizaciones, el método de la invención produce un producto de anticuerpo en el que más del 80 %, tal como más del 90 %, por ejemplo más del 95 %, tal como más del 99 % de las moléculas de anticuerpos son los anticuerpos biespecíficos deseados.
- 55 60 El proceso de posproducción descrito en el presente documento es más flexible y más fácil de controlar en comparación con los métodos basados en la coexpresión.
- 65 60 Purificación
- Aunque el método de la presente divulgación a menudo da como resultado un alto rendimiento de proteína heterodimérica, las cantidades residuales de la primera y/o la segunda proteína homodimérica también pueden estar presentes en el producto o composición obtenida por el método de la presente divulgación.
- 65 Adicionalmente, el producto obtenido por el método de la presente invención también puede comprender un agente

reductor y/u otros componentes tales como tampones o sales que estaban presentes durante el método. En ciertos casos, se puede preferir eliminar dichos componentes para que no estén presentes en el producto final.

- 5 Tal como se ha descrito anteriormente, el agente reductor, los componentes del tampón o la sal pueden, en algunas realizaciones, eliminarse en la etapa b) de la presente invención. La eliminación de estos componentes se puede realizar como un método separado del presente método o concomitante con la eliminación del agente reductor, por ejemplo, por cualquiera de los métodos descritos anteriormente, tal como cualquiera de los métodos que implican el intercambio del tampón de la composición obtenida en la etapa a).
- 10 Por tanto, en una realización adicional, el método de la presente divulgación puede comprender además una etapa de purificación de la proteína heterodimérica. La purificación de la proteína heterodimérica puede considerarse como la etapa c) obteniendo la proteína heterodimérica. Por tanto, en una realización, la etapa c) comprende someter la composición obtenida de la etapa b) a un método de purificación.
- 15 Los ejemplos de métodos de purificación adecuados incluyen, pero sin limitación, un método seleccionado del grupo que consiste en cromatografía de proteína A o proteína G (u otras formas de cromatografía de afinidad), cromatografía de afinidad basada en, por ejemplo, anticuerpos de unión a antígeno o antiidiotípicos, intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrofóbica, kappa o lambda determinadas, tioafinidad, cromatografía de modo mixto, por ejemplo, cromatografía de afinidad por metales inmovilizados, hidroxipatita o cromatografía de adsorción tiofílica. Otros métodos de purificación incluyen, pero sin limitaciones, precipitación con, por ejemplo, sales o polietilenglicol para obtener proteína purificada. También se contempla la combinación de diferentes métodos de purificación.
- 20 25 Someter la proteína heterodimérica a una Etapa de purificación, o un método de purificación, se refiere a cualquier tipo de purificación de la proteína heterodimérica; tal como separación de la proteína heterodimérica de las cantidades residuales de la primera y/o la segunda proteína homodimérica o separación de la proteína heterodimérica de otros componentes, por ejemplo, el agente reductor, las sales o tampones u otras impurezas relacionadas con el producto o el proceso.
- 30 35 40 45 50 55 60 65
- La purificación o separación de la proteína heterodimérica a partir de cantidades residuales de la primera y/o segunda proteínas homodiméricas puede complicarse, ya que la proteína heterodimérica es muy similar a la primera y la segunda proteínas homodiméricas. Por lo tanto, la separación de la proteína heterodimérica de las cantidades residuales de la primera y/o la segunda proteínas homodiméricas puede ser más difícil que la separación de la proteína heterodimérica de los otros componentes presentes, por ejemplo, el agente reductor, el tampón o la sal.
- Tal como se describe en otra parte en el presente documento, el método de la presente divulgación se puede realizar de modo que la cantidad de la primera o la segunda proteínas homodiméricas sea limitante con respecto a la formación de la proteína heterodimérica. Un ejemplo de tal método se conoce como proceso de intercambio no equimolar dirigido (SNEEP). Por lo tanto, la primera o la segunda proteína homodimérica pueden estar presentes en la etapa a) en un exceso de la otra proteína homodimérica. La relación de la primera y la segunda proteínas homodiméricas en la etapa a) se puede ajustar en particular, incluyendo un exceso o una cantidad limitada de una proteína homodimérica a la otra, para dar como resultado que la proteína homodimérica limitada se use completamente en la etapa a). Esto da como resultado la producción de una composición, es decir, la composición obtenida de la etapa a), que comprende la proteína heterodimérica junto con cantidades residuales de solo una de la primera y segunda proteínas homodiméricas, en lugar de tanto la primera como la segunda proteína homodimérica. La purificación posterior de la proteína heterodimérica a partir de la proteína homodimérica residual se hace así más fácil, dado que la proteína heterodimérica solo tiene que separarse de la primera o la segunda proteína homodimérica en lugar de las dos.
- Por tanto, en una realización, la primera proteína homodimérica está presente en la etapa a) en exceso de la segunda proteína homodimérica o viceversa. La proporción entre la primera y la segunda proteínas homodiméricas puede ser, en particular, como se describe en el presente documento.
- En una realización adicional, la realización del método con un exceso de la primera o la segunda proteína homodimérica se puede combinar con una etapa de purificación de elución isocrática.
- En una realización, la realización del método con un exceso de la primera o la segunda proteína homodimérica puede combinarse con una etapa de purificación basada en la unión a antígeno o la unión de un anticuerpo antiidiotípico al homodímero que se usó en exceso.
- En una realización, la purificación o separación de la proteína heterodimérica de la primera y/o la segunda proteína homodimérica se puede realizar mediante un método basado en las diferencias en la primera y la segunda proteínas homodiméricas. Tales métodos pueden facilitar la separación de la primera y la segunda proteínas homodiméricas entre sí y, dependiendo del método, también la separación de las proteínas homodiméricas de la proteína heterodimérica. Los ejemplos de dichos métodos de purificación o separación basados en las diferencias en la primera y segunda proteínas homodiméricas incluyen, pero sin limitación, métodos en los que la primera o la

- segunda proteína homodimérica no se unen a la proteína A o la proteína G o en la que la primera y la segunda proteínas homodiméricas comprenden diferentes cadenas ligeras, por ejemplo, las cadenas ligeras kappa y lambda o en las que las regiones Fc de la primera y segunda proteínas homodiméricas comprenden diferentes alotipos. Tales métodos pueden facilitar la separación de la primera o la segunda proteína homodimérica de la proteína heterodimérica. Esto se puede combinar en una realización adicional con una etapa de purificación de elución isocrática.
- 5 En una realización, el método de purificación o separación basado en diferencias en la primera y la segunda proteínas homodiméricas, se puede combinar con el uso de un exceso de la primera o la segunda proteína homodimérica como se ha descrito anteriormente. La posterior purificación o separación de la proteína heterodimérica a partir del homodímero residual puede utilizar las diferencias de la primera y la segunda proteínas homodiméricas, dado que la proteína heterodimérica se diferencia del homodímero residual porque comprende una región Fc del homodímero que se usó en cantidades limitantes.
- 10 15 En una realización, la primera o la segunda proteína homodimérica se pueden haber diseñado o modificado para que no se una a la proteína A o la proteína G o combinaciones de las proteínas A y G. La purificación o separación de la proteína heterodimérica de al menos una de la primera y segunda proteínas homodiméricas se puede realizar luego pasándola sobre una columna de proteína A o de Proteína G, a la que solo la proteína heterodimérica y la proteína homodimérica que no se ha modificado con respecto a la unión a la proteína A o la proteína G se unirá.
- 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 Esto facilita la separación de la proteína homodimérica que no se une a la proteína A o proteína G de la proteína heterodimérica. Si la primera proteína homodimérica no se une a la proteína A y la segunda proteína homodimérica no se une a la proteína G o viceversa; la proteína heterodimérica se puede separar de la primera y la segunda proteínas homodiméricas, pasando la composición que comprende la proteína heterodimérica sobre los materiales de Proteína A y Proteína G. La primera y segunda proteínas homodiméricas se pueden haber modificado para que no se unan a la Proteína A y/o a la Proteína G como se describe en el presente documento. Esto también se puede usar para separar el agente reductor de la proteína heterodimérica. Esto se puede combinar con otros métodos de purificación como se describe en el presente documento.
- Usando una primera o segunda proteína homodimérica en la etapa a) que se ha modificado para no unirse a la proteína A o la proteína G o la proteína A y la proteína G, en particular puede ser útil para realizaciones en las que se usa un exceso de la primera o la segunda proteína homodimérica en relación con la otra proteína homodimérica en la etapa a). En dichas realizaciones, puede ser útil diseñar o modificar el sitio de unión a la Proteína A o la Proteína G de la proteína homodimérica que se utilizará en exceso para que se interrumpa su capacidad de unirse a dichas resinas. Este tipo de modificación incluye, pero sin limitación, las modificaciones en el dominio CH3 que se desvelan en el documento WO 2010/151792, incorporada por referencia en el presente documento. Por lo tanto, la primera o segunda proteína homodimérica de la presente divulgación puede comprender una o más de las modificaciones en el dominio CH3 descritas en el documento WO 2010/151792 que reduce o elimina la unión de la IgG a la proteína A. Por lo tanto, en una realización particular, la primera o segunda proteína homodimérica de la presente divulgación puede comprender una modificación seleccionada del grupo que consiste en, pero sin limitaciones, a) 435R y b) 435R y 436F. Como alternativa, la primera o la segunda proteína homodimérica puede comprender las siguientes mutaciones: I253A, H310A y H435A, lo que elimina la unión a la proteína A. La proteína heterodimérica se puede separar luego de un excedente de proteína homodimérica no intercambiada mediante el paso sobre una columna de proteína A. Esto se puede combinar con otros métodos de purificación como se describe en el presente documento.
- En otra realización, en la que la primera y la segunda proteínas homodiméricas comprenden una cadena ligera, la cadena ligera de la primera y la segunda proteína homodimérica en la etapa a) pueden ser diferentes. Por ejemplo, la primera proteína homodimérica puede comprender una cadena ligera kappa y la segunda proteína homodimérica puede comprender una cadena ligera lambda o viceversa. Materiales o resinas adecuados para cromatografía en columna a los que solo se puede unir una cadena ligera kappa o lambda, se pueden usar después para la purificación o separación de la proteína heterodimérica de la primera y/o la segunda proteínas homodiméricas. Los ejemplos de tales materiales o resinas incluyen, por ejemplo, los medios de afinidad conocidos como KappaSelect y LambdaFabSelect de GE Healthcare Life Sciences. Usando una primera y segunda proteína homodimérica que comprende diferentes cadenas ligeras, por ejemplo, una cadena ligera kappa y lambda, pueden combinarse con el uso de una de las proteínas homodiméricas en exceso en la etapa a). Por ejemplo, la etapa a) se puede realizar con la primera proteína homodimérica que comprende una cadena ligera kappa y la segunda proteína homodimérica que comprende una cadena ligera lambda y con la primera proteína homodimérica presente en exceso de la segunda proteína homodimérica o viceversa con respecto a si es una proteína homodimérica que comprende una cadena ligera kappa o lambda que se utiliza en exceso. Por tanto, a etapa c) puede comprender pasar la proteína heterodimérica sobre una columna a la que solo la cadena ligera lambda es capaz de unirse. La etapa c) da como resultado la separación de la proteína heterodimérica de la primera proteína homodimérica residual que comprende una cadena ligera kappa. De manera similar, la etapa c) puede comprender pasar la proteína heterodimérica sobre una columna a la que solo se une la cadena ligera kappa si el homodímero que comprende la cadena ligera lambda que se usa en exceso en la etapa a). Esto se puede combinar con otros métodos de purificación como se describe en el presente documento.

- Como alternativa, la purificación o separación de la proteína heterodimérica basada en las diferencias en la unión de las cadenas ligeras kappa o lambda a diferentes materiales también se puede realizar sin utilizar una de las proteínas homodiméricas en exceso. En esta realización, la etapa c) puede comprender pasar la proteína heterodimérica sobre un material al que se une la cadena ligera kappa y posteriormente sobre un material al que se une la cadena ligera lambda o viceversa. Como la proteína heterodimérica comprende tanto una cadena ligera kappa como una lambda, mientras que la primera y la segunda proteína homodimérica comprenden una cadena ligera kappa o lambda, la proteína heterodimérica se puede separar de este modo de la primera y la segunda proteínas homodiméricas. Esto se puede combinar con otros métodos de purificación como se describe en el presente documento.
- La purificación de una proteína heterodimérica producida por un método en el que la primera y la segunda proteínas homodiméricas comprenden diferentes cadenas ligeras, por ejemplo, cadenas ligeras kappa y lambda, y en el que una de las proteínas homodiméricas se utiliza en exceso, pasándolo sobre un material al que se une la cadena ligera de la proteína homodimérica utilizada en cantidades no excesivas, puede aplicarse a otros métodos para producir proteínas heterodiméricas distintos de los de la presente divulgación. Por ejemplo, métodos basados en la coexpresión de cadenas pesadas y ligeras en una célula huésped u otros métodos.
- En otra realización, la región constante de la primera y segunda proteínas homodiméricas puede ser de diferentes alotipos. Los alotipos son variaciones en la secuencia de aminoácidos que se encuentran naturalmente en una población. Por ejemplo, se conocen diferentes alotipos de la cadena pesada de IgG1 humana, G1m (f) [también llamado G1m (3)], G1m (z) [también llamado G1m (17)], G1m (a) [también llamado G1m (1)] y G1m (x) [también llamado G1m (2)] (Jefferis, R., mAbs 2009; 1:4, 1-7). Por lo tanto, en una realización, la región constante de la primera y la segunda proteínas homodiméricas pueden ser alotipos diferentes; por ejemplo, pueden ser un isotipo IgG1 y la región constante de la primera proteína homodimérica puede ser, por ejemplo, un alotipo IgG1m(za) [= IgG1m(1, 17)] o IgG1m(zax) [= IgG1m(1, 2, 17)], mientras que la región constante de la segunda proteína homodimérica puede ser, por ejemplo, un alotipo IgG1m(f) [= IgG1m(3)] o IgG1m(fa) [= IgG1m(1, 3)]. De forma análoga, como la realización descrita anteriormente en la que se usan una cadena ligera kappa y lambda, utilizando la primera y la segunda proteínas homodiméricas que comprenden regiones constantes de diferentes alotipos, se puede combinar con el uso de la primera o la segunda proteína homodimérica en exceso en la etapa a). En esta realización, la etapa c) puede comprender así pasar la proteína heterodimérica sobre un material, por ejemplo, perlas recubiertas con un anticuerpo específico de alotipo, a los que se une el alotipo presente en la proteína homodimérica que no se utilizó en exceso. De este modo, la proteína heterodimérica se puede purificar a partir de la proteína homodimérica que se usó en exceso en la etapa a). Esto se puede combinar con otros métodos de purificación como se describe en el presente documento.
- En una realización alternativa, la proporción entre la primera o la segunda proteína homodimérica no se ajustó en la etapa a), por lo tanto, ni la primera ni la segunda proteína homodimérica se usaron completamente en la etapa a), dando como resultado la producción de una composición que comprende tanto la proteína heterodimérica, como la primera y segunda proteínas homodiméricas. En esta realización, la etapa c) puede comprender pasar la proteína heterodimérica sobre un material al que se une uno de los alotipos y posteriormente sobre otro material al que se une el otro alotipo. Esto se puede combinar con otros métodos de purificación como se describe en el presente documento.
- El uso de una primera y segunda proteínas homodiméricas que comprenden regiones Fc de diferentes alotipos combinadas con la separación de la proteína heterodimérica de las proteínas homodiméricas también puede aplicarse a otros métodos de producción de proteínas heterodiméricas distintos del de la presente divulgación. Tales métodos pueden incluir además el uso de la primera o la segunda proteínas homodiméricas en exceso. Los ejemplos de tales métodos incluyen aquellos basados en la coexpresión de la primera y la segunda proteínas homodiméricas en la misma célula huésped.
- Lisina C-terminal
- La eliminación de las lisinas en C-terminal por las carboxipeptidasas de la cadena pesada es una modificación de anticuerpos observada habitualmente, ambos sobre la expresión recombinante de anticuerpos en células de mamífero, así como *in vivo* en suero humano (Cai et al. (2010) Biotechnol. Bioeng. Sep 9). La eliminación es a menudo parcial, lo que da como resultado una población mixta de anticuerpos con cero (K0), una (K1) o dos (K2) lisinas C-terminales. En particular, los hibridomas de linfocitos B producen mezclas de K0, K1 y K2 moléculas (Dick et al. (2008) Biotech. Bioeng. 100: 1132).
- En una realización, la lisina C-terminal de la proteína heterodimérica, por ejemplo, el anticuerpo biespecífico producido por el método de la presente invención, puede eliminarse. La expresión "resto de lisina C-terminal" se refiere al resto de lisina en el extremo C de la región CH3, por ejemplo, el extremo C de la cadena pesada de un anticuerpo, que es la posición 447 en la IgG 1.
- Además de los diversos efectos que puede tener la lisina C-terminal, la eliminación de la lisina C-terminal da como resultado una proteína heterodimérica, por ejemplo, una composición o población que comprende más de una

molécula de la proteína heterodimérica, que es más homogénea con respecto a la presencia de las lisinas C-terminales.

Por lo tanto, en una realización adicional, la primera y/o la segunda proteína homodimérica no contiene una lisina C-terminal.

La lisina C-terminal puede eliminarse mediante ingeniería de la primera y/o la segunda proteína homodimérica para que no contenga una lisina C-terminal o eliminando, por ejemplo, por catálisis enzimática, la lisina C-terminal de la primera y/o la segunda proteína homodimérica o eliminando, tal como por catálisis enzimática, las lisinas C-terminales de la proteína heterodimérica.

Por tanto, en una realización adicional, la primera y/o segunda proteínas homodiméricas se modifican genéticamente para que no contengan la lisina C-terminal, por ejemplo, en la cadena pesada.

En otra realización, el método de la presente invención comprende además una etapa de eliminación de la lisina C-terminal, por ejemplo, de la cadena pesada, por ejemplo, mediante incubación con una carboxipeptidasa.

Si la primera y/o la segunda proteínas homodiméricas están diseñadas para no contener una lisina C-terminal, la primera y/o la segunda proteínas homodiméricas se pueden producir mediante:

- 20 i) proporcionar una construcción de nucleótido que codifica una región Fc de una inmunoglobulina, comprendiendo dicha región Fc una primera región CH3 y/o comprendiendo una región Fc de una inmunoglobulina, comprendiendo dicha región Fc una segunda región CH3, en la que dicha construcción no codifica un resto de lisina en el extremo C de dicha primera y/o segunda región CH3,
 25 ii) expresar dicha construcción de nucleótido en una célula huésped, y
 iii) recuperar dicha primera y/o segunda proteínas homodiméricas de un cultivo celular de dicha célula huésped.

La primera y/o segunda proteínas homodiméricas pueden, en una realización, ser un anticuerpo, que puede, en la mayoría de las realizaciones, también comprender una cadena ligera y, por lo tanto, dicha célula huésped puede expresar además una construcción de codificación de la cadena ligera, ya sea en el mismo o en un vector diferente.

Los métodos para preparar construcciones de nucleótidos son bien conocidos por los expertos en la materia.

30 De forma análoga, los métodos para la expresión de construcciones de nucleótidos en una célula huésped también son bien conocidos por los expertos en la técnica.

35 En una realización adicional del método anterior de la divulgación, la construcción de nucleótidos proporcionada en la etapa i) deriva de o está diseñado basado en, una secuencia de cadena pesada original que tiene un codón para un resto de lisina C-terminal. Por lo tanto, dicha construcción de nucleótidos puede comprender una delección del codón para el resto de lisina C-terminal en comparación con dicha secuencia de cadena pesada original.

40 En otra realización, el resto de lisina C-terminal se puede eliminar de la primera y/o la segunda proteína homodimérica, por ejemplo, por escisión enzimática. Por lo tanto, la lisina C-terminal puede eliminarse de la primera y/o la segunda proteína homodimérica después de producirse. Los métodos para la eliminación enzimática de la lisina C-terminal incluyen, pero sin limitación, someter la primera y/o segunda proteína homodimérica a incubación con una carboxipeptidasa. Por tanto, la etapa de eliminar la lisina C-terminal, por ejemplo, de la cadena pesada, puede realizarse antes de la etapa a). Por lo tanto, el método de la presente invención puede, en una realización, comprender una etapa adicional de someter la primera y/o la segunda proteína homodimérica a una carboxipeptidasa, antes de la etapa a).

45 50 De forma análoga, la lisina C-terminal se puede eliminar de la proteína heterodimérica. Por lo tanto, en una realización, el método de la presente divulgación puede, después de la etapa a), comprender una etapa adicional para someter la proteína heterodimérica a una carboxipeptidasa. Esta etapa puede estar entre las etapas a) y la etapa b) o puede ser después de la etapa b). Por lo tanto, en una realización, la etapa de eliminar la lisina C-terminal, por ejemplo, de la cadena pesada, puede realizarse después de la etapa a). En otra realización, la etapa de eliminar la lisina C-terminal, por ejemplo, de la cadena pesada, Puede realizarse después de la etapa b). En principio, el método de la presente divulgación puede comprender someter la primera y/o la segunda proteínas homodiméricas y la proteína heterodimérica a una carboxipeptidasa. Sin embargo, para la mayoría de los fines, debería ser suficiente incluir una de las etapas mencionadas anteriormente para eliminar las lisinas C-terminales.

55 60 65 Los ejemplos de carboxipeptidasas adecuadas incluyen, pero sin limitación, carboxipeptidasa B o carboxipeptidasa N (Cai et al. Biotechnol. Bioeng. Sep 9 (2010) citada anteriormente). Las condiciones adecuadas para el tratamiento con una carboxipeptidasa son bien conocidas por los expertos en la técnica. Otro método para eliminar las lisinas C-terminales sería expresar la primera y/o la segunda proteínas homodiméricas en una célula huésped que expresa una carboxipeptidasa. Dejar la primera y/o la segunda proteínas homodiméricas en el medio de cultivo de la célula huésped a una temperatura en la que la carboxipeptidasa está activa durante un tiempo suficiente también resultaría en la eliminación de la lisina C-terminal (Luo JL, Ahang J, Ren D, Tsai W-L, Li F (2102) Probing of C-Terminal Lysine

Variation in a Recombinant Monoclonal Antibody Production Using Chinese Hamster Ovary Cells with Chemically Defined Media. Biotechnol. Bioeng. 109: 2306-2315).

Secuencias de ácido nucleico

- 5 En un aspecto adicional, la presente divulgación también se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica una primera o segunda proteína homodimérica de la presente divulgación, en la que dicha primera o segunda proteína homodimérica no comprende la lisina C-terminal. La primera y la segunda proteína homodimérica pueden ser cualquiera de las descritas anteriormente en relación con el método.
- 10 En otro aspecto, la presente divulgación también se refiere a un vector de expresión que codifica una primera o segunda proteína homodimérica de la presente divulgación, en el que dicha primera o segunda proteína homodimérica no comprende la lisina C-terminal.
- 15 En una realización adicional más, la presente divulgación también se refiere a una célula huésped que comprende un vector de expresión que codifica una primera o segunda proteína homodimérica de la presente divulgación, en el que dicha primera o segunda proteína homodimérica no comprende la lisina C-terminal.
- 20 Un vector de expresión en el contexto de la presente divulgación puede ser cualquier vector adecuado, incluyendo vectores de ácido nucleico cromosómicos, no cromosómicos y sintéticos (una secuencia de ácido nucleico que comprende un conjunto adecuado de elementos de control de la expresión). Los ejemplos de tales vectores incluyen derivados de SV40, plásmidos bacterianos, ADN de fago, baculovirus, plásmidos de levadura, vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fago y vectores de ácido nucleico viral (ARN o ADN). En una realización, la secuencia de ácido nucleico que codifica la región Fc de una primera o segunda proteína homodimérica de la presente divulgación, en la que dicha primera o segunda proteína homodimérica no comprenden la lisina C-terminal, puede estar comprendida en un vector de ADN o ARN desnudo, incluyendo, por ejemplo, un elemento de expresión lineal (como se describe en, por ejemplo, Sykes y Johnston, Nat Biotech 17, 355-59 (1997)), un vector de ácido nucleico compactado (como se describe en, por ejemplo, los documentos US 6.077. 835 y/o WO 00/70087), un vector plasmídico, tal como pBR322, pUC 19/18 o pUC 118/119, un vector de ácido nucleico de tamaño mínimo "midge" (como se describe en, por ejemplo, Schakowski et al., Mol Ther 3, 793-800 (2001)) o como una construcción de vector de ácido nucleico precipitado, tal como una construcción precipitada con CaP04 (como se describe en, por ejemplo, el documento WO 00/46147, Benvenisty y Reshef, PNAS USA 83, 9551-55 (1986), Wigler et al., Cell 14, 725 (1978) y Coraro y Pearson, Somatic Cell Genetics 7, 603 (1981)). Dichos vectores de ácido nucleico y el uso de los mismos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, los documentos US 5.589.466 y US 5.973. 972).
- 35 En una realización, el vector es adecuado para la expresión de una célula bacteriana. Los Ejemplos de tales vectores incluyen vectores de expresión tales como BlueScript (Stratagene), vectores pIN (Van Heeke y Schuster, J Biol Chem 264, 5503-5509 (1989), vectores pET (Novagen, Madison WI) y similares).
- 40 Un vector de expresión también puede ser o, como alternativa, un vector adecuado para la expresión en un sistema de levadura. Se puede emplear cualquier vector adecuado para la expresión en un sistema de levadura. Los vectores adecuados incluyen, por ejemplo, vectores que comprenden promotores constitutivos o inducibles, tal como el factor alfa, alcohol oxidasa y PGH (revisado en: F. Ausubel et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley InterScience New York (1987), y Grant et al., Methods in Enzymol 153, 516-544 (1987)).
- 45 Un vector de expresión también puede ser o, como alternativa, un vector adecuado para la expresión en células de mamífero, por ejemplo, un vector que comprende glutamina sintetasa como marcador seleccionable, tales como los vectores descritos en Bebbington (1992) Biotechnology (NY) 10: 169-175.
- 50 Un ácido nucleico y/o vector también puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de secreción/localización, que puede dirigirse a un polipéptido, tal como una cadena polipeptídica naciente, al espacio periplásmico o al medio de cultivo celular. Dichas secuencias son conocidas en la técnica e incluyen péptidos líder o señal de la secreción.
- 55 En un vector de expresión de la divulgación, la secuencia de ácido nucleico que codifica una primera o segunda proteína homodimérica de la presente divulgación, en la que dicha primera o segunda proteína homodimérica no comprende la lisina C-terminal, puede comprender o estar asociada con cualquier promotor adecuado, potenciador, y otros elementos que facilitan la expresión. Los ejemplos de tales elementos incluyen promotores de expresión fuertes (por ejemplo, promotor/potenciador de CMV IE humano así como RSV, SV40, SL3-3, MMTV y promotores de VIH LTR), secuencias de terminación poli (A) efectivas, un origen de replicación para el producto plasmídico en *E. coli*, un gen de resistencia a antibióticos como marcador seleccionable y/o un sitio de clonación conveniente (por ejemplo, un polilienlazador). Los ácidos nucleicos también pueden comprender un promotor inducible en oposición a un promotor constitutivo, tal como CMV IE.
- 60 En una realización, el vector de expresión puede posicionarse y/o administrarse a la célula huésped o al animal
- 65 En una realización, el vector de expresión puede posicionarse y/o administrarse a la célula huésped o al animal

huésped a través de un vector viral.

En todavía un aspecto adicional, la divulgación se refiere a una célula huésped eucariótica o procariota recombinante, tal como un transfectoma, que produce una primera o segunda proteína homodimérica de la presente divulgación, en la que dicha primera o segunda proteína homodimérica no comprende la lisina C-terminal, como se define en el presente documento. Los ejemplos de células huésped incluyen levadura, células bacterianas y de mamífero, tal como células CHO o HEK. Por ejemplo, en una realización, la presente divulgación proporciona una célula que comprende un ácido nucleico integrado de manera estable en el genoma celular que comprende una secuencia que codifica la expresión de la región Fc de una primera o segunda proteína homodimérica de la presente divulgación, en la que dicha primera o segunda proteína homodimérica no comprende la lisina C-terminal. En otra realización, la presente divulgación proporciona una célula que comprende un ácido nucleico no integrado, tal como un plásmido, cósmido, fagemido o elemento de expresión lineal, que comprende una secuencia que codifica la expresión de una primera o segunda proteína homodimérica de la presente divulgación, en la que dicha primera o segunda proteína homodimérica no comprende una lisina C-terminal.

En un aspecto adicional, la divulgación se refiere a un hibridoma que produce una primera o segunda proteína homodimérica de la presente divulgación, en la que dicha primera o segunda proteína homodimérica no comprende una lisina C-terminal. En todavía un aspecto adicional, la divulgación se refiere a una planta o animal transgénico no humano que comprende ácidos nucleicos que codifican una primera o segunda proteína homodimérica de la presente divulgación, en la que dicha primera o segunda proteína homodimérica no comprende una lisina C-terminal, en la que el animal o planta produce una primera o segunda proteína homodimérica de la presente divulgación, en la que dicha primera o segunda proteína homodimérica no comprende una lisina C-terminal.

Proteínas heterodiméricas

La presente divulgación también se refiere a una proteína heterodimérica obtenida por un método de la presente divulgación.

El método de la divulgación permite la formación de moléculas asimétricas, moléculas con diferentes características en cada uno de los brazos Fab o en cada uno de los dominios CH3 o moléculas con distintas modificaciones en todas las moléculas, por ejemplo, moléculas con sustitución(es) de aminoácidos no naturales para la conjugación. Dichas moléculas asimétricas se pueden generar en cualquier combinación adecuada. Esto se ilustra más adelante a continuación con algunos ejemplos no limitativos.

Los anticuerpos biespecíficos se pueden usar para administrar un agente inmunoterapéutico o de imágenes a una célula objetivo de interés, incluyendo, pero sin limitación, una célula tumoral.

En una realización del método de la invención, el primer brazo Fab del anticuerpo biespecífico se une a una célula tumoral, tal como una proteína de superficie de célula tumoral o carbohidrato de superficie de célula tumoral, tal como una de las proteínas de la superficie de la célula tumoral enumeradas en el presente documento y el segundo brazo Fab reconoce una molécula efectora radiactiva que incluye, pero sin limitación, un radiomarcador acoplado o unido (a través de un quelante) a un péptido o hapteno. Un ejemplo de dicho péptido radiomarcado es el ácido dietilentriaminopentaacético marcado con indio (anti-DTPA (In) van Schaijk et al. Clin. Cancer Res. 2005; 11: 7230s-7126s). Otro ejemplo es el uso de partículas coloidales marcadas con hapteno, tales como liposomas, nanopartículas de micelas poliméricas que transportan radionúclidos, tales como, por ejemplo, tecnecio-99 (Jestin et al. Q J Nucl Med Mol Imaging 2007; 51: 51-60).

En otra realización, una molécula citostática alternativa acoplada a hapteno, tal como una toxina, se utiliza como molécula efectora reconocida por el segundo brazo Fab.

En una realización adicional del método de la invención, el primer brazo Fab del anticuerpo biespecífico está glicosilado en la posición N297 (numeración de la UE) y el segundo brazo Fab del anticuerpo biespecífico está aglicosilado (no glicosilado, por ejemplo, mutando N297 a la mutación Q o A o E) (Bolt S et al., Eur J Immunol 1993, 23: 403-411)). La glicosilación asimétrica en la región Fc afecta a la interacción con los receptores Fc y tiene un impacto en el efecto de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos del anticuerpo (Ha et al., Glycobiology 2011, 21(8): 1087-1096), así como la interacción con otras moléculas de la función efectora, tal como C1q.

En otra realización del método de la invención, el primer brazo Fab de la molécula biespecífica interacciona con FcRn, el receptor de Fc neonatal (Roopenian DC, et al. Nat. Rev. Immunol. 2007, 7: 715-725) y el segundo brazo Fab tiene problemas para unirse a FcRn por la mutación del sitio de interacción FcRn en las moléculas, por ejemplo, al hacer una mutación H435A (Shields, R. L., et al, J Biol Chem, 2001, Firman, M., et al, Int Immunol, 2001).

En otra realización, la unión a C1q se mejora o disminuye en uno de los dos brazos Fab de la molécula biespecífica.

En otra realización, la proteína se ha diseñado para mejorar la activación del complemento en uno o ambos de los dos brazos Fab de la molécula.

En otra realización, cada uno de los brazos Fab presentes en la molécula biespecífica deriva de una subclase de IgG diferente.

5 En otra realización, cada uno de los brazos Fab presentes en la molécula biespecífica porta diferentes mutaciones alotípicas (Jefferis y Lefranc, 2009, MABs 1: 332-8).

10 En otra realización, otra categoría de moléculas inmunoterapéuticas asimétricas se genera al reemplazar el Fab de uno de los brazos Fab de la molécula biespecífica por una citocina inmunoactiva, estimulante o inhibidora. Los ejemplos no limitantes de tales citocinas son IL-2, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TNF- α , G-CSF, GM-CSF, IL-10, IL-4, IL-6, IL-13. Como alternativa, En las moléculas se incluye un factor (de crecimiento) o un agente de estimulación o inhibición hormonal.

15 En otra realización, un Fab de uno de los brazos Fab es reemplazado por un péptido lítico, es decir, péptidos que son capaces de lisar células tumorales, bacterias, hongos etc., incluyendo, pero sin limitaciones, péptidos antimicrobianos como magainina, melitina, cecropina, KLAKKLAK y sus variantes (Schweizer et al. Eur. J. Pharmacology 2009; 625: 190-194, Javadpour, J. Med. Chem., 1996, 39: 3107-3113, Marks et al, Cancer Res 2005; 65: 2373-2377, Rege et al, Cancer Res. 2007; 67: 6368-6375) o péptidos líticos catiónicos (tecnología CLYP, documento US2009/0269341).

20 En otra realización, uno o ambos Fab en los brazos Fab son reemplazados por receptores para citocinas y/o factores de crecimiento, creando los llamados receptores señuelo, de los cuales Enbrel® (etanercept) dirigido a TNF- α y VEGF-trap, dirigido a VEGF, son ejemplos muy conocidos. La combinación de estos dos receptores señuelo en una molécula mostró una actividad superior a los receptores señuelo simples (Jung, J. Biol. Chem. 2011; 286: 14410-14418).

25 En otra realización, otra categoría de moléculas inmunoterapéuticas asimétricas se genera por fusión de inmunoactivo, - estimulando o inhibiendo las citocinas al extremo N o al extremo C de uno, o los dos, brazos Fab presentes en las moléculas biespecíficas. Esto puede impactar positivamente en la actividad antitumoral de la molécula biespecífica. Los ejemplos de tales moléculas, aunque no limitados a la lista siguiente, son IL-2 (Fournier et al., 2011, Int. J. Oncology, doi: 10.3892/ijo.2011.976), IFN- α , IFN- β o IFN- γ (Huan et al., 2007; J. Immunol. 179: 6881-6888, Rossie et al., 2009; Blood 114: 3864-3871), TNF- α . Como alternativa, la fusión N-terminal o C-terminal de citocinas, tal como, por ejemplo, G-CSF, GM-CSF, IL-10, IL-4, IL-6 o IL-13 pueden impactar positivamente a la función efectora de la molécula de anticuerpo biespecífico. Como alternativa se incluye un factor de crecimiento o un agente de estimulación o inhibición hormonal en las moléculas en el extremo N o en el extremo C.

30 En otra realización, la fusión N-terminal o C-terminal de un péptido lítico, tal como, por ejemplo, péptidos antimicrobianos como la magainina, melitina, cecropina, KLAKKLAK y sus variantes (Schweizer et al. Eur. J. Pharmacology 2009; 625: 190-194, Javadpour, J. Med. Chem., 1996, 39: 3107-3113, Marks et al, Cancer Res 2005; 65: 2373-2377, Rege et al, Cancer Res. 2007; 67: 6368-6375) o péptidos líticos catiónicos (tecnología CLYP, documento US2009/0269341) en uno o los dos brazos Fab pueden aumentar la actividad de la molécula.

35 En otra realización, otra categoría de moléculas inmunoterapéuticas asimétricas son los anticuerpos monovalentes, moléculas que interaccionan con un brazo Fab al objetivo elegido. En tal molécula, uno de los brazos Fab presentes en la molécula biespecífica se dirige contra la molécula objetivo de elección, el segundo brazo Fab de la molécula no porta un Fab o tiene un Fab que no se une/no funcional, tal como se describe para MetMab (Genentech; documento WO 96/38557). Como alternativa, se pueden generar proteínas de fusión de Fc monoméricas, tales como las descritas para el Factor VIII y IX (Peters et al., Blood 2010; 115: 2057-2064).

40 50 Como alternativa, las combinaciones de cualquiera de las moléculas asimétricas mencionadas anteriormente pueden generarse por el método de la invención.

Una proteína heterodimérica producida por el método de la presente divulgación puede comprender un primer polipéptido que comprende una primera región Fc de una inmunoglobulina, comprendiendo dicha región Fc una primera región CH3 y/o un segundo polipéptido que comprende una segunda región Fc de una inmunoglobulina, comprendiendo dicha segunda región Fc una segunda región CH3, en el que las secuencias de dichas primera y segunda regiones CH3 son diferentes y son tales que la interacción heterodimérica entre dichas primera y segunda regiones CH3 es más fuerte que cada una de las interacciones homodiméricas de dichas primera y segunda regiones CH3, y

60 en el que dicha primera proteína homodimérica tiene un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409 y dicha segunda proteína homodimérica tiene una sustitución de aminoácido en una posición seleccionada del grupo que consiste en: 366, 368, 370, 399, 405 y 407
y/o

65 en el que las secuencias de dichas primera y segunda regiones CH3 son tales que las constantes de disociación de las interacciones homodiméricas de cada una de las regiones CH3 están entre 0,01 y 10 micromolar, tal como entre 0,05 y 10 micromolar, más preferentemente entre 0,01 y 5, tal como entre 0,05 y 5 micromolar, aún más

preferentemente entre 0,01 y 1 micromolar, tal como entre 0,05 y 1 micromolar, entre 0,01 y 0,5 o entre 0,01 y 0,1 cuando se analiza como se describe en el Ejemplo 21.

- 5 En una realización, dicha primera región CH3 tiene un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409 y dicha segunda región CH3 tiene un aminoácido distinto de Phe en la posición 405 y/o
 las secuencias de dichas primera y segunda regiones CH3 son tales que las constantes de disociación de las interacciones homodiméricas de cada una de las regiones CH3 están entre 0,01 y 10 micromolar, tal como entre 0,05 y 10 micromolar, más preferentemente entre 0,01 y 5, tal como entre 0,05 y 5 micromolar, aún más preferentemente entre 0,01 y 1 micromolar, tal como entre 0,05 y 1 micromolar, entre 0,01 y 0,5 o entre 0,01 y 0,1 micromolar, cuando se analiza como se describe en el Ejemplo 21.
- 10 En una realización adicional de la proteína heterodimérica, dicha primera región CH3 tiene un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409 y dicha segunda región CH3 tiene un aminoácido distinto de Phe en la posición 405, tal como otro distinto de Phe, Arg o Gly, en la posición 405
 o
 dicha primera región CH3 tiene un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409 y dicha segunda región CH3 tiene un aminoácido distinto de Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser o Thr en la posición 407.
- 15 En realizaciones adicionales, la proteína heterodimérica de acuerdo con la divulgación comprende cualquiera de las características adicionales descritas anteriormente para los métodos de producción.
- 20 Por lo tanto, en una realización adicional de la proteína heterodimérica de la invención, dicho primer polipéptido es una cadena pesada de longitud completa de un anticuerpo, preferentemente un anticuerpo humano.
- 25 En otra realización de la proteína heterodimérica de la invención, dicho segundo polipéptido es una cadena pesada de longitud completa de un anticuerpo, preferentemente un anticuerpo humano.
- 30 En una realización adicional de la proteína heterodimérica de la invención, dichos primero y segundo polipéptidos son cadenas pesadas de longitud completa de dos anticuerpos, preferentemente ambos anticuerpos humanos que se unen a diferentes epítopos y, por lo tanto, la proteína heterodimérica resultante es un anticuerpo biespecífico. Este anticuerpo biespecífico puede ser un anticuerpo de cadena pesada o un anticuerpo que además de las cadenas pesadas comprende dos cadenas ligeras de longitud completa, que pueden ser iguales o diferentes.
- 35 En una realización adicional de la proteína heterodimérica de la divulgación, la región Fc del primer polipéptido es similar o idéntica a una región Fc derivada de un isotipo seleccionado del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 (excepto por las mutaciones especificadas) y la región Fc del segundo polipéptido es de un isotipo seleccionado del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 (a excepción de las mutaciones especificadas).
- 40 En una realización adicional de la proteína heterodimérica de la divulgación, dicha primera región CH3 comprende una Phe en la posición 405 y un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409 y dicha segunda región CH3 comprende un aminoácido distinto de Phe en la posición 405 y una Lys en la posición 409.
- 45 En una realización adicional de la proteína heterodimérica de la divulgación, dicha primera región CH3 comprende una Phe en la posición 405 y un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409 y dicha segunda región CH3 comprende una Leu en la posición 405 y una Lys en la posición 409.
- 50 En una realización adicional de la proteína heterodimérica de la divulgación, dicha primera región CH3 comprende una Phe en la posición 405 y una Arg en la posición 409 y dicha segunda región CH3 comprende una Leu en la posición 405 y una Lys en la posición 409.
- 55 En una realización adicional de la proteína heterodimérica de la divulgación, dicha primera región CH3 comprende un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409 y dicha segunda región CH3 comprende una Lys en la posición 409 y: a) una Ile en la posición 350 y una Leu en la posición 405 o b) una Thr en la posición 370 y una Leu en la posición 405.
- 60 En una realización adicional de la proteína heterodimérica de la divulgación, dicha primera región CH3 comprende una Arg en la posición 409 y dicha segunda región CH3 comprende una Lys en la posición 409 y: a) una Ile en la posición 350 y una Leu en la posición 405 o b) una Thr en la posición 370 y una Leu en la posición 405.
- 65 En una realización adicional de la proteína heterodimérica de la divulgación, dicha primera región CH3 comprende una Thr en la posición 350, una Lys en la posición 370, una Phe en la posición 405 y una Arg en la posición 409 y dicha segunda región CH3 comprende una Lys en la posición 409 y: a) una Ile en la posición 350 y una Leu en la posición 405 o b) una Thr en la posición 370 y una Leu en la posición 405.

En una realización adicional de la proteína heterodimérica de la divulgación, dicha primera región CH3 comprende una Thr en la posición 350, una Lys en la posición 370, una Phe en la posición 405 y una Arg en la posición 409 y dicha segunda región CH3 comprende una Ile en la posición 350, una Thr en la posición 370, una Leu en la posición 405 y una Lys en la posición 409.

5 En una realización adicional de la proteína heterodimérica de la divulgación, ni dicho primer ni dicho segundo polipéptido comprende una secuencia de Cys-Pro-Ser-Cys en la región bisagra.

10 En una realización adicional de la proteína heterodimérica de la divulgación, tanto dicho primero como dicho segundo polipéptido comprenden una secuencia Cys-Pro-Pro-Cys en la región bisagra.

En una realización adicional de la proteína heterodimérica de la divulgación, dicho primero y/o dicho segundo polipéptido comprende una mutación que elimina el sitio aceptor para la glicosilación unida a Asn.

15 *Antígenos diana*

Como se ha explicado anteriormente, en una realización importante de la invención, la proteína heterodimérica es un anticuerpo biespecífico que comprende dos regiones variables que difieren en la especificidad de unión, es decir, se unen a diferentes epítopos.

20 En principio, cualquier combinación de especificidades es posible. Como se ha mencionado anteriormente, los anticuerpos biespecíficos pueden usarse potencialmente para aumentar aún más la potencia y la eficacia de las terapias con anticuerpos monoclonales. Una posible limitación de un anticuerpo monoespecífico es la falta de especificidad para las células diana deseadas debido a la expresión del antígeno diana en otros tipos de células hacia los que no se desea la unión del anticuerpo. Por ejemplo, un antígeno diana sobreexpresado en células tumorales también puede expresarse en tejidos sanos, lo que podría resultar en efectos secundarios no deseados en el tratamiento con un anticuerpo dirigido contra ese antígeno. Un anticuerpo biespecífico que tenga una especificidad adicional contra una proteína que se expresa exclusivamente en el tipo de célula objetivo podría mejorar potencialmente la unión específica a las células tumorales.

25 30 Por lo tanto, en una realización, las proteínas homodiméricas son ambos anticuerpos, en las que el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo se unen a diferentes epítopos en la misma célula tumoral.

35 En otra realización, las proteínas homodiméricas son ambos anticuerpos, en las que el primer anticuerpo se une a un epítopo en una célula tumoral y el otro anticuerpo es un anticuerpo irrelevante o inactivo sin ninguna actividad de unión *in vivo* relevante para la aplicación pretendida.

40 Por lo tanto, en una realización de la invención, dichos primer y segundo epítopos están ubicados en la misma célula, por ejemplo, una célula tumoral. Los objetivos adecuados en las células tumorales incluyen, pero sin limitación, los siguientes: erbB1 (EGFR), erbB2 (HER2), erbB3, erbB4, MUC-1, CD19, CD20, CD4, CD38, CD138, CXCR5, c-Met, proteína de envoltura HERV, periostina, Bigh3, SPARC, BCR, CD79, CD37, EGFRvIII, L1-CAM, AXL, factor tisular (TF), CD74, EpCAM y MRP3. Las posibles combinaciones de dianas de células tumorales incluyen, pero sin limitación: erbB1 + erbB2, erbB2 + erbB3, erbB1 + erbB3, CD19 + CD20, CD38 + CD34, CD4 + CXCR5, CD38 + RANKL, CD38 + CXCR4, CD20 + CXCR4, CD20 + CCR7, CD20 + CXCR5, CD20 + RANKL, erbB2 + AXL, erbB1 + cMet, erbB2 + c-Met, erbB2 + EpCAM, c-Met + AXL, c-Met + TF, CD38 + CD20, CD38 + CD138.

45 50 En una realización adicional, dichos primer y segundo epítopos pueden ubicarse en el mismo antígeno diana, en el que la ubicación de los dos epítopos en el antígeno diana es tal que la unión de un anticuerpo a un epítopo no interfiere con la unión del anticuerpo al otro epítopo. En una realización adicional del presente documento, dichas primera y segunda proteínas homodiméricas son anticuerpos que se unen a dos epítopos diferentes ubicados en el mismo antígeno diana, pero tienen un modo de acción diferente para matar la célula objetivo, por ejemplo, una célula tumoral. Por ejemplo, en una realización, el antígeno diana es erbB2 (HER2) y el anticuerpo biespecífico combina los sitios de unión al antígeno pertuzumab y trastuzumab. En otra realización, el antígeno diana es erbB1 (EGFr) y el anticuerpo biespecífico combina los sitios de unión al antígeno zalutumumab y nimotuzumab.

55 60 65 Los anticuerpos biespecíficos también se pueden usar como mediadores para redirigir los mecanismos efectores a los tejidos asociados a la enfermedad, por ejemplo, tumores. Por lo tanto, en una realización adicional, dicho primero o dicho segundo epítopo se encuentra en una célula tumoral, tal como una proteína de una célula tumoral o un carbohidrato de una célula tumoral, y el otro epítopo está ubicado en una célula efectora.

En una realización, la célula efectora es un linfocito T.

Los posibles objetivos en las células efectoras incluyen los siguientes: FcyRI (CD64): expresado en monocitos y macrófagos y neutrófilos activados; FcyRIII (CD16): expresado en células asesinas naturales y macrófagos; CD3: expresado en linfocitos T circulantes; CD89: expresado en PMN (neutrófilos polimorfonucleares), eosinófilos, monocitos y macrófagos; CD32a: expresado en macrófagos, neutrófilos, eosinófilos; Fc ϵ RI expresado en basófilos y

5 mastocitos. En una realización, el epítopo se encuentra en CD3 expresado sobre linfocitos T.

6 En otra realización, el primer anticuerpo tiene especificidad de unión para un microorganismo patógeno y el segundo anticuerpo tiene especificidad de unión para una proteína de célula efectora, tales como CD3, CD4, CD8, CD40, CD25, CD28, CD16, CD89, CD32, CD64, Fc ϵ RI o CD1.

7 Adicionalmente, se pueden usar anticuerpos biespecíficos para dirigir un agente quimioterapéutico más 10 específicamente a las células sobre las que debe actuar el agente. Por lo tanto, en una realización, una de las 15 proteínas homodiméricas es un anticuerpo que reconoce una pequeña molécula o péptido o es capaz de formar un enlace covalente con dicha molécula, por ejemplo, de acuerdo con el principio descrito en Rader et al., (2003) PNAS 100: 5396. En una realización adicional del método de la invención, el primer anticuerpo tiene especificidad de unión para (es decir, se une a un epítopo sobre) una célula tumoral o proteína de superficie de célula tumoral, tales como erbB1, erbB2, erbB3, erbB4, EGFR3vIII, CEA, MUC-1, CD19, CD20, CD4, CD38, EpCAM, c-Met, AXL, L1-CAM, factor tisular, CD74 o CXCR5 y el segundo anticuerpo tiene una especificidad de unión para un agente 15 quimioterapéutico, tal como una toxina (incluido un péptido radiomarcado), un radioisotipo, un fármaco o un profármaco que puede estar opcionalmente acoplado o unido a un péptido o hapteno.

20 Los anticuerpos biespecíficos también se pueden usar para atacar una vesícula, por ejemplo, una vesícula densa a los electrones o minicélula que contiene una toxina, fármaco o profármaco a un tumor. Véase, por ejemplo, MacDiarmid et al. (2009) Nature Biotech 27: 643. Las minicélulas son células acromosómicas que son productos de una división celular aberrante que no contienen ADN cromosómico. Por lo tanto, en otra realización, dicho primero o dicho segundo epítopo se encuentra en una célula tumoral, tal como una proteína de una célula tumoral o un carbohidrato de una célula tumoral, y el otro epítopo está ubicado en una vesícula o minicélula densa a los 25 electrones.

25 Adicionalmente, la semivida sérica de un anticuerpo puede alterarse incluyendo en un anticuerpo biespecífico una especificidad de unión para una proteína sérica. Por ejemplo, la semivida sérica puede prolongarse si se incluye en un anticuerpo biespecífico, una especificidad de unión para seroalbúmina. Por lo tanto, en una realización adicional del método de la invención, el primer anticuerpo tiene especificidad de unión para una célula tumoral o proteína 30 celular tumoral, tal como erbB1 (EGFR), erbB2 (HER2), erbB3, erbB4, MUC-1, CD19, CD20, CD4, CD38, CD138, CXCR5, c-Met, proteína de la envoltura HERV, periostina, Bigh3, SPARC, BCR, CD79, CD37, EGFRvIII, L1-CAM, AXL, factor tisular (TF), CD74, EpCAM o MRP3, CEA y el segundo anticuerpo tiene una especificidad de unión para una proteína de la sangre, tal como seroalbúmina. También se puede usar una segunda especificidad de unión para 35 dirigir un anticuerpo a un tejido específico, tal como el sistema nervioso central o el cerebro (a través de la barrera hematoencefálica). Por lo tanto, en una realización adicional del método de la invención, el primer anticuerpo tiene especificidad de unión para un objetivo específico del cerebro, tal como beta-amiloide (por ejemplo, para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer), Her-2 (por ejemplo, para el tratamiento de metástasis de cáncer de mama en el cerebro), EGFR (por ejemplo, para el tratamiento del cáncer cerebral primario), Nogo A (por ejemplo, para el tratamiento de una lesión cerebral), TRAIL (por ejemplo, para el tratamiento del VIH), alfa-sinucleína (por 40 ejemplo, para el tratamiento del Parkinson), Htt (por ejemplo, para el tratamiento de Huntington), un príón (por ejemplo, para el tratamiento de la enfermedad de las vacas locas), una proteína del virus del Nilo Occidental, y el segundo anticuerpo tiene una especificidad de unión para una proteína de la barrera hematoencefálica, tal como el receptor de la transferrina (TfR), receptor de insulina, receptor de melanotransferrina (MTfR), receptor de lactoferrina (LfR), receptor 2 de la apolipoproteína E (ApoER2), proteínas 1 y 2 relacionadas con el receptor de LDL(LRP1 y 45 LRP2), receptor para productos finales de glicosilación avanzada (RAGE), receptor de la toxina diftérica = factor de crecimiento similar al factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (DTR = HB-EGF), gp190 (Abbott et al, Neurobiology of Disease 37 (2010) 13-25).

50 Una especificidad de unión para una proteína de la barrera hematoencefálica también se puede usar para dirigir otra molécula que no es un anticuerpo, a un tejido específico, tal como el sistema nervioso central o el cerebro (a través de la barrera hematoencefálica). Por lo tanto, en una realización adicional, una de las proteínas homodiméricas es un anticuerpo de longitud completa que tiene una especificidad de unión para una proteína de la barrera hematoencefálica (tal como TfR, receptor de insulina, MTfR, LfR, ApoER2, LRP1, LRP2, RAGE, DTR (= HB-EGF) o gp190) y la otra proteína homodimérica es una región Fc unida en el extremo N o C a otra proteína, tal como una 55 citocina, un receptor soluble u otra proteína, por ejemplo, VIP (péptido intestinal vasoactivo), BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro), FGF (factor de crecimiento de fibroblastos), FGF múltiples, EGF (factor de crecimiento epidérmico), PNA (ácido nucleico peptídico), NGF (factor de crecimiento nervioso), neurotrofina (NT)-3, NT-4/5, factor neurotrófico derivado de la glía, factor neurotrófico ciliar, neurturina, neuregulinas, interleucinas, factor de crecimiento transformante (TGF) alfa, TGF-beta, eritropoyetina, factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento derivado de plaquetas, artemina, persefina, netrinas, cardiotrofina-1, factor de células madre, midkine, pleiotrofina, proteínas morfogenéticas óseas, saposinas, semaforinas, factor inhibidor de leucocitos, alfa-L-iduronidasa, iduronato-2-sulfatasa, N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa, arilsulfatasa B, ácido alfa-glucosidasa o esfingomielinasa (Pardridge, Bioparmaceutical drug targeting to the brain, Journal of Drug Targeting 2010, 1-11; Pardridge, Re-engineering Biopharmaceuticals for delivery to brain with molecular Trojan horses. Bioconjugate Chemistry 2008, 19: 1327-1338.

En una realización adicional del método de la invención, el primer anticuerpo tiene especificidad de unión para una célula tumoral o proteína celular tumoral, tales como erbB1, erbB2, erbB3, erbB4, MUC-1, CD19, CD20, CD4 o CXCR5 y el segundo anticuerpo tiene una especificidad de unión para una proteína implicada en coagulación de la sangre, tal como el factor tisular.

- 5 Otras combinaciones de especificidad de unión particularmente interesantes incluyen: CD3 + HER2, CD3 + CD20, IL-12 + IL18, IL-1a + IL-1b, VEGF + EGFR, EpCAM + CD3, GD2 + CD3, GD3 + CD3, HER2 + CD64, EGFR + CD64, CD30 + CD16, NG2 + CD28, HER2 + HER3, CD20 + CD28, HER2 + CD16, Bcl2 + CD3, CD19 + CD3, CEA + CD3, EGFR + CD3, IgE + CD3, EphA2 + CD3, CD33 + CD3, MCSP + CD3, PSMA + CD3, TF + CD3, CD19 + CD16, CD19 + CD16a, CD30 + CD16a, CEA + HSG, CD20 + HSG, MUC1 + HSG, CD20 + CD22, HLA-DR + CD79, PDGFR + VEGF, IL17a + IL23, CD32b + CD25, CD20 + CD38, HER2 + AXL, CD89 + HLA clase II, CD38+CD138, TF + c-Met, Her2 + EpCAM, HER2 + HER2, EGFR + EGFR, EGFR + c-Met, C-Met + brazo no unión y combinaciones de receptores acoplados a proteína G.
- 10 15 En una realización adicional, los anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la invención pueden usarse para eliminar patógenos, autoanticuerpos patógenos o compuestos dañinos, como venenos y toxinas de la circulación, dirigidos a los eritrocitos, esencialmente como se describe en Taylor et al. J. Immunol. 158: 842-850 (1997) y Taylor y Ferguson, J. Hematother. 4: 357-362, 1995. Dicho primer epítopo se encuentra en una proteína de eritrocitos (glóbulos rojos), incluyendo, pero sin limitación, el receptor 1 del complemento de eritrocitos y dicho segundo epítopo se encuentran en el compuesto u organismo que se va a tratar para el aclaramiento.
- 20 25 En una realización adicional, el segundo brazo Fab comprende una proteína de fusión que representa un autoantígeno o un sitio de conjugación para unir un autoantígeno tal como ADNdc. Dirigir los patógenos, autoanticuerpos o compuestos dañinos por los anticuerpos biespecíficos de la invención seguidos de un aclaramiento mediado por eritrocitos pueden tener, por lo tanto, utilidad terapéutica en el tratamiento de diversas enfermedades y síndromes.

Conjugación

- 30 En realizaciones adicionales de la divulgación, la primera y/o la segunda proteínas homodiméricas están unidas a un compuesto seleccionado del grupo que consiste en: una toxina (incluido un radioisótopo) un profármaco o un fármaco. Tal compuesto puede hacer que la destrucción de células diana sea más efectiva, por ejemplo, en la terapia del cáncer. La proteína heterodimérica resultante es, por lo tanto, un inmunoconjungado. El compuesto puede acoplarse alternativamente a la proteína heterodimérica resultante, es decir, después de que haya tenido lugar el intercambio del brazo Fab.

- 35 Por lo tanto, en una realización adicional, el método de la presente divulgación comprende además una etapa de unión o conjugación de la primera y/o la segunda proteína homodimérica con otro compuesto; por ejemplo, una toxina, profármaco o fármaco.
- 40 45 Como alternativa, el método de la presente divulgación comprende además una etapa de unión o conjugación de la proteína heterodimérica a otro compuesto; por ejemplo, una toxina, profármaco o fármaco.

- 50 55 Tal como se describe en otra parte en el presente documento, la primera y la segunda proteína homodimérica pueden conjugarse con diferentes compuestos, dando como resultado así la producción de una proteína heterodimérica que se conjuga con dos compuestos diferentes; por ejemplo, toxina, profármaco y/o fármaco. Esto puede ser particularmente útil si el método para la conjugación del primer compuesto no es compatible con el método para la conjugación del segundo compuesto. Los diferentes compuestos pueden ser, por ejemplo, dos toxinas diferentes, dos profármacos diferentes, dos fármacos diferentes o un compuesto puede ser una toxina, mientras que el otro es un profármaco o un fármaco o un compuesto puede ser un profármaco mientras que el otro es un fármaco. Se puede utilizar cualquier combinación adecuada.

- 60 65 Como alternativa, el método de la presente divulgación comprende combinar la formación de la proteína heterodimérica con la conjugación de la toxina usando oxidación por reducción.
- 70 Los compuestos adecuados para formar inmunoconjungados de la presente divulgación incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiantracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina, antimetabolitos (tales como metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, fludarabina, 5-fluorouracilo, dacarbazine, hidroxiurea, asparaginasa, gemcitabina, cladribina), agentes alquilantes (tales como mecloretamina, tioepa, clorambucilo, melfalán, carbustina (BSNU), lomustina (CCNU), ciclocfosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, dacarbazine (DTIC), procarbazina, mitomicina C, cisplatino y otros derivados del platino, tales como carboplatino), antibióticos (tales como dactinomicina (formalmente actinomicina), bleomicina, daunorubicina (formalmente daunomicina), doxorubicina, idarrubicina, mitramicina, mitomicina, mitoxantrona, plicamicina, antramicina (AMC)), toxina de la difteria y moléculas relacionadas (tal como la cadena A de la difteria y sus fragmentos activos y

moléculas híbridas), toxina de ricina (tal como ricina A o una toxina de cadena de ricina A desglicosilada), toxina del cólera, una toxina de tipo Shiga (SLT-I, SLT-II, SLT-III), toxina LT, toxina C3, toxina Shiga, toxina pertussis, toxina del tétanos, inhibidor de la proteasa Bowman-Birk de soja, exotoxina de *Pseudomonas*, alorina, saporina, modecina, gelanina, la cadena A de abrina, la cadena A de modecina, sarcina alfa, las proteínas de *Aleurites fordii*, las 5 proteínas de diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII y PAPS), el inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Sapaponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina y toxinas de enomicina. Otras moléculas conjugadas adecuadas incluyen ribonucleasa (RNasa), DNasa I, enterotoxina A 10 estafilocócica, proteína antiviral de la hierba carmín, toxina diftérica, endotoxina de *Pseudomonas*, maytansinoides, auristatinas (MMAE, MMAF), caliqueamicinas y análogos de duocarmicina (Ducry y Stump, Bioconjugate Chem. 2010, 21: 5-13), dolostatina-10, dolostatina-15, irinotecán o su metabolito activo SN38, pirrolobenzodiazepinas (PBD).

En una realización adicional de la divulgación, la primera y/o segunda proteína homodimérica está unida a un emisor alfa, incluyendo, pero sin limitaciones, torio 227, radio-223, bismuto-212 y actinio-225.

15 En una realización adicional de la divulgación, la primera y/o segunda proteína homodimérica está unida a un radionúclido emisor de beta, incluyendo, pero sin limitación, yodo-313, itrio-90, flúor-18, renio-186, galio-68, tecnecio-99, indio-111 y luteo-177.

20 En otra realización, el compuesto a conjugar comprende un ácido nucleico o molécula asociada a ácido nucleico. En una de estas facetas de la presente divulgación, el ácido nucleico conjugado es una ribonucleasa citotóxica, un ácido nucleico antisentido, una molécula de ARN inhibidora (por ejemplo, una molécula de ARNsi) o un ácido nucleico inmunoestimulador (por ejemplo, una molécula de ADN que contiene un motivo CpG inmunoestimulador).

25 Se puede emplear cualquier método conocido en la técnica para conjugar, incluyendo los métodos descritos por Hunter et al., *Nature* 144, 945 (1962), David et al., *Biochemistry* 13, 1014 (1974), Pain, et al., *J. Immunol. Meth.* 40, 219 (1981) y Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.* 30, 407 (1982). Los conjugados se pueden producir conjugando químicamente el otro resto al lado N-terminal o al lado C-terminal de la proteína (véase, por ejemplo, *Antibody Engineering Handbook*, editado por Osamu Kanemitsu, publicado por Chijin Shokan (1994)). Tales derivados de 30 anticuerpos conjugados también pueden generarse por conjugación en restos internos o azúcares, cuando sea apropiado. Los agentes pueden estar acoplados directa o indirectamente a una proteína de la presente divulgación. Un ejemplo de acoplamiento indirecto de un segundo agente es el acoplamiento por un resto espaciador. Ducry y Stump (2010) *Bioconjugate Chem.* 21:5 han resumido recientemente las tecnologías de unión para los conjugados de fármacos.

35 Composiciones y usos

Las proteínas heterodiméricas producidas por un método de la presente divulgación se pueden usar en una composición farmacéutica con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

40 Las composiciones farmacéuticas pueden formularse de acuerdo con técnicas convencionales tales como las descritas en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19^a edición, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995. Una composición farmacéutica de la presente divulgación puede por ejemplo, incluir diluyentes, 45 cargas, sales, tampones, detergentes (por ejemplo, un detergente no iónico, tal como Tween-20 o Tween-80), estabilizadores (por ejemplo, azúcares o aminoácidos libres de proteínas), conservantes, fijadores de tejidos, solubilizantes y/u otros materiales adecuados para su inclusión en una composición farmacéutica.

50 Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen todos y cada uno de los disolventes adecuados, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, antioxidantes y agentes retardantes de la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles con un compuesto de la presente divulgación. Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las 55 composiciones farmacéuticas de la presente divulgación incluyen agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, etanol, dextrosa, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol). Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones acuosas estériles o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones estériles inyectables o dispersiones. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos.

60 Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación también pueden comprender antioxidantes farmacéuticamente aceptables, por ejemplo (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato sódico, metabisulfito de sodio, sulfito sódico y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol, y similares; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, y similares.

65 Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación también pueden comprender agentes de isotonicidad,

tales como azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol, glicerol o cloruro de sodio en las composiciones.

Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación también pueden contener uno o más adyuvantes apropiados para la vía de administración elegida, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes dispersantes, conservantes o tampones, que puede aumentar la vida útil o la eficacia de la composición farmacéutica. Los compuestos de la presente divulgación se pueden preparar con vehículos que protegerán el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo

5 implantes, parches transdérmicos y sistemas de suministro microencapsulados. Tales vehículos pueden incluir gelatina, monoestearato de glicerilo, diestearato de glicerilo, polímeros biocompatibles biodegradables, tales como 10 acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico solo o con una cera, u otros materiales bien conocidos en la técnica. Los métodos para la preparación de tales formulaciones son generalmente conocidos por los expertos en la técnica.

15 Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes, por ejemplo como se ha enumerado anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por microfiltración.

20 Los niveles reales de dosificación de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas pueden variarse para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particular, sin que sean tóxicos para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de diversos factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las 25 composiciones particulares de la presente divulgación empleada, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se está empleando, la duración del tratamiento, otros fármacos, los compuestos y/o los materiales usados en combinación con las composiciones en particular empleadas, la edad, el sexo, el peso, la afección, estado de salud general e historial médico previo del paciente que se está tratando, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

30 La composición farmacéutica puede administrarse por cualquier vía y modo adecuados. En una realización, una composición farmacéutica de la presente divulgación se administra por vía parenteral. "Administrado por vía parenteral" como se usa en el presente documento significa modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, por lo general, por inyección, e incluyen inyección epidérmica, intravenosa, intramuscular, intraarterial, 35 intratecal, intracapsular, intraorbitaria, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, intratendinosa, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, intracraneal, intratorácica, epidural e intraesternal e infusión.

35 En una realización, la composición farmacéutica se administra mediante inyección o infusión intravenosa o subcutánea.

40 En un aspecto principal, la divulgación se refiere a una proteína heterodimérica según la divulgación, tal como un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención, para su uso como medicamento. La proteína heterodimérica de la divulgación se puede usar para varios fines. En particular, como se ha explicado anteriormente, las proteínas heterodiméricas de la divulgación se pueden usar para el tratamiento de diversas formas de cáncer, incluyendo el cáncer metastásico y el cáncer refractario.

45 Por lo tanto, en un aspecto, la divulgación se refiere a un método para inhibir el crecimiento y/o la proliferación y/o la destrucción de una célula tumoral que comprende la administración de una proteína heterodimérica según la divulgación como se describe en el presente documento a un individuo que la necesite.

50 En otra realización, las proteínas heterodiméricas de la divulgación se usan para el tratamiento de enfermedades inmunes y autoinmunes, enfermedades inflamatorias, enfermedades infecciosas, enfermedades cardiovasculares, enfermedades del SNC y musculoesqueléticas.

55 Los regímenes de dosificación en los métodos de tratamiento y usos anteriores se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o se puede reducir o aumentar proporcionalmente la dosis según se indique por las exigencias de la situación terapéutica.

60 Las dosis eficientes y los regímenes de dosificación para las proteínas heterodiméricas dependen de la enfermedad o afección a tratar y pueden ser determinadas por los expertos en la materia. Un intervalo de ejemplo no limitante para una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo biespecífico de la presente invención es aproximadamente 0,1-100 mg/kg, tal como aproximadamente 0,1-50 mg/kg, por ejemplo, aproximadamente 0,1-20 mg/kg, tal como aproximadamente 0,1-10 mg/kg, por ejemplo, aproximadamente 0,5, tal como aproximadamente 0,3, aproximadamente 1, aproximadamente 3, aproximadamente 5 o aproximadamente 8 mg/kg.

65 Un médico o veterinario que tenga experiencia en la materia puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o veterinario podría comenzar las dosis de

la proteína heterodimérica empleada en la composición farmacéutica a niveles más bajos que los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosis hasta lograr el efecto deseado. En general, una dosis adecuada de una composición de la presente divulgación será la cantidad del compuesto que sea la dosis más baja eficaz para producir un efecto terapéutico. La administración puede ser, por ejemplo, parenteral, tal como intravenosa, intramuscular o subcutánea.

5 Una proteína heterodimérica de la divulgación también puede administrarse profilácticamente para reducir el riesgo de desarrollar una enfermedad, tal como cáncer, retrasar la aparición de un evento en la progresión de la enfermedad y/o reducir el riesgo de recurrencia cuando una enfermedad, tal como cáncer está en remisión.

10 Proteínas heterodiméricas, tales como anticuerpos biespecíficos de la presente invención, también se pueden administrar en terapia de combinación, es decir, combinadas con otros agentes terapéuticos relevantes para la enfermedad o afección a tratar. En consecuencia, en una realización, el medicamento que contiene proteínas heterodiméricas es para combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales, tal como agentes citotóxicos, 15 quimioterapéuticos o antiangiogénicos. Dicha administración combinada puede ser simultánea, por separado o secuencial. En una realización adicional, la presente divulgación proporciona un método para tratar enfermedades, tal como cáncer, en el que el método comprende la administración a un sujeto que lo necesite de una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína heterodimérica, tal como un anticuerpo biespecífico de la presente invención, en combinación con radioterapia y/o cirugía.

20 Proteínas heterodiméricas, tales como anticuerpos biespecíficos de la presente invención, también se puede utilizar para fines de diagnóstico.

Ejemplos

25 **Ejemplo 1: Vectores de expresión para la expresión de IgG1-2F8 e IgG1-7D8 humanas**

Las regiones codificantes VH y VL de HuMab 2F8 (documento WO 02/100348) y HuMab 7D8 (documento WO 04/035607) se clonaron en el vector de expresión pConGf (que contiene la secuencia genómica de la región 30 constante de alotipo IgG1m (f) humana (Lonza Biologics)) para la producción de la cadena pesada de IgG1 humana y pConKappa (que contiene la región constante de la cadena ligera kappa humana, Lonza Biologics) para la producción de la cadena ligera kappa. Para los anticuerpos IgG4, las regiones VH se insertaron en el vector pTomG4 (que contiene la secuencia genómica de la región constante IgG4 humana en el vector pEE12.4 (Lonza Biologics)). Como alternativa, en construcciones de seguimiento, se utilizaron vectores que contenían las regiones 35 codificantes de la cadena pesada (IgG1 o IgG4) totalmente optimizadas en codones en el vector pEE12.4 o la cadena ligera kappa humana de HuMab 2F8 o HuMab 7D8 en el vector pEE6.4 (Lonza Biologics). Además, la región codificante VH optimizada por codón de HuMab-2F8 junto con la secuencia optimizada por codón de la región constante del alotipo IgG1m (za) humana que contiene la mutación F405L, se clonaron en el vector pcDNA3.3 (Invitrogen), produciendo el vector de expresión p33G1za-2F8-F405L.

40

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para la producción de un anticuerpo biespecífico de longitud completa que comprende las etapas siguientes:

5 a) incubar un primer anticuerpo de longitud completa con un segundo anticuerpo de longitud completa en condiciones reductoras suficientes para permitir la reducción de los enlaces disulfuro intracatenarios en la región bisagra, y en el que la región CH3 de dicho primer anticuerpo de longitud completa es la primera región CH3 y tiene un Arg en la posición 409, y la región CH3 de dicho segundo anticuerpo de longitud completa es una

10 segunda región CH3 y tiene:

(i) un Asp, Glu, Gly, Asn, Arg, Ser, Thr, Val o Trp en la posición 368;
 (ii) una Phe, His, Lys, Arg o Tyr en la posición 399;

15 (iii) una Gly, Leu, Met o Trp en la posición 407 y una Lys en la posición 409, y en el que la primera CH3 tiene además un Tyr en la posición 407; o

(iv) un aminoácido distinto de Phe, Arg o Gly en la posición 405 y tiene una Lys en la posición 409, y en el que la primera CH3 tiene además una Phe en la posición 405,

20 de tal manera que las secuencias de dichas primera y segunda regiones CH3 son diferentes y tales que la interacción heterodimérica entre dichas primera y segunda regiones CH3 es más fuerte que cada una de las interacciones homodiméricas de dichas primera y segunda regiones CH3, en el que las posiciones de los aminoácidos están numeradas de acuerdo con el índice de la UE como se describe en Kabat, en el que dichos primer y segundo anticuerpos de longitud completa se unen a diferentes epítopos, en el que dichos primeros y segundos anticuerpos de longitud completa:

25 1) cada uno tiene una región Fc con una secuencia de aminoácidos que es de un isotipo IgG1;
 2) cada uno tiene una región Fc con una secuencia de aminoácidos que es de un isotipo IgG2;
 3) cada uno tiene una región Fc con una secuencia de aminoácidos que es de un isotipo IgG3; o
 4) cada uno tiene una región Fc con una secuencia de aminoácidos que es de un isotipo IgG4; y

30 en el que dicho primer y segundo anticuerpos son anticuerpos humanizados o en el que dicho primer y segundo anticuerpos comprenden cada uno una cadena pesada de longitud completa de un anticuerpo humano; y además en el que la etapa a) comprende la incubación durante al menos 90 minutos a una temperatura de al menos 20 °C en presencia de 2-mercaptopetilamina a una concentración de al menos 25 mM;

35 b) someter al menos 10 ml de la composición obtenida de la etapa a) en condiciones oxidantes suficientes para permitir la oxidación de las cisteínas en el anticuerpo biespecífico de longitud completa a enlaces disulfuro intracatenarios y
 c) obtener el anticuerpo biespecífico de longitud completa.

40 2. Un método *in vitro* según la reivindicación 1, en el que tanto el primer anticuerpo de longitud completa como el segundo comprenden una secuencia Cys-Pro-Pro-Cys en la región bisagra.

45 3. Un método *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa a) comprende añadir un agente quelante de metales, tal como EDTA, EGTA o ácido cítrico.

4. Un método *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa a) se realiza en condiciones reductoras con un potencial redox entre -150 y -600 mV, tal como entre -350 y -450 mV.

50 5. Un método *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el primer y segundo anticuerpos de longitud completa están en un tampón, que comprende en el intervalo de 1-100 mM fosfato, tal como fosfato 1-50 mM o en el intervalo de 1-25 mM o en el intervalo de 5-20 mM.

6. Un método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el tampón tiene un pH en el intervalo de 4,5-8,5, tal como en el intervalo de 6,5 a 7,5.

55 7. Un método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el tampón se selecciona del grupo que consiste en a) fosfato sódico 8,1 mM ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$), fosfato potásico (KH_2PO_4) 1,5 mM, cloruro sódico ($NaCl$) 138 mM, cloruro de potasio (KCl) 2,7 mM, pH 5,0; b) fosfato de sodio 8,1 mM ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$), fosfato potásico (KH_2PO_4) 1,5 mM, cloruro sódico ($NaCl$) 138 mM, cloruro de potasio (KCl) 2,7 mM, pH 7,0; 3) Tris-HCl 20 mM, pH 7,8.

60 8. Un método *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa b) comprende un pH en el intervalo de 6-8,5.

9. Un método *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa b) comprende un potencial redox de al menos -300 mV.

10. Un método *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las condiciones oxidantes en la etapa b) comprenden la presencia de al menos 0,05 mM de oxígeno.
- 5 11. Un método *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las condiciones oxidantes en la etapa b) comprenden añadir oxígeno, en el que la adición de oxígeno se realiza mediante los métodos que comprenden: mecánicamente, por ejemplo, mediante agitación, remoción, aumentando la presión o creando flujo o rociando con oxígeno o aire.
- 10 12. Un método *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las etapas anteriores, en el que las condiciones oxidantes en la etapa b) comprenden un agente oxidante, tal como, por ejemplo, ácido deshidroascórbico (dhAA).
- 15 13. Un método *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa b) comprende someter la composición obtenida de la etapa a) a cromatografía, tal como, por ejemplo, cromatografía en columna o a filtración, preferentemente diafiltración, tal como filtración de flujo tangencial (TFF) o filtración de flujo normal (NFF).
- 20 14. Un método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 13, en el que la diafiltración se realiza haciendo circular la composición a través de un cartucho de fibra hueca que comprende un valor de corte en el intervalo de 10-50 kDa y con un área de superficie en el intervalo de 0,05-1 m², y con una presión de entrada del cartucho en el intervalo de 70-280 kPa, hasta que hayan tenido lugar de uno a siete volúmenes de intercambio de tampones.
- 25 15. Un método *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la concentración de anticuerpo biespecífico de longitud completa en la composición obtenida de la etapa a) está en el intervalo de 1-100 g/l.
- 30 16. Un método *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las condiciones oxidantes en la etapa b) comprenden añadir un ion metálico, preferentemente, un ion metálico seleccionado del grupo que consiste en: cobre, manganeso, magnesio, hierro, níquel y cobalto, en el que la concentración del ion metálico está, preferentemente, en el intervalo de 0,1 a 100 µM.
- 35 17. Un método *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la relación del primer anticuerpo y el segundo de longitud completa en la etapa a) está en el intervalo de 1:1,01 a 1:2.
- 40 18. Un método *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el primer anticuerpo de longitud completa o el segundo anticuerpo de longitud completa no pueden unirse a la proteína A y/o a la proteína G.
- 45 19. Un método *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el primer y segundo anticuerpos de longitud completa comprenden diferentes cadenas ligeras.
20. Un método *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la concentración total del primer anticuerpo de longitud completa y el segundo anticuerpo de longitud completa en la etapa a) es al menos 0,25 mg/ml.
21. Un método *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho primer anticuerpo de longitud completa comprende una Phe en la posición 405 y Arg en la posición 409 y dicho segundo anticuerpo de longitud completa comprende una Leu en la posición 405 y una Lys en la posición 409.

Figura 1

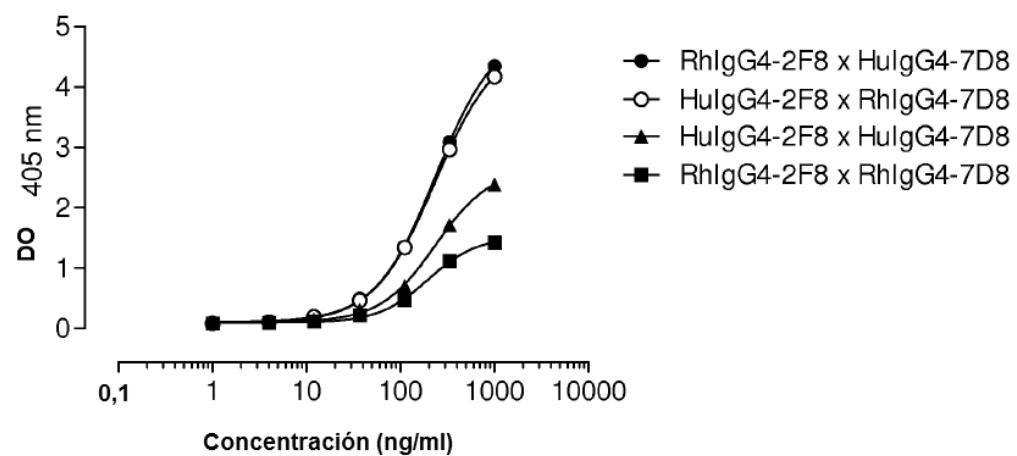


Figura 2

Especie (nombre común)	Isotipo	Posición del aminoácido*																			
		Bisagra central					Interfaz CH3-CH3														
		226	227	228	229	230	347	349	350	351	366	368	370	392	394	395	397	398	405	407	
<i>Homo sapiens</i>	IgG1	C	P	P	C	P	Q	Y	T	L	T	L	K	K	T	P	V	L	D	Y	K
	IgG2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M	-	-	-	-
	IgG3	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	M	-	-	-	-	-
	IgG4	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-
<i>Macaca mulatta</i> (Rhesus Monkey)	IgG1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IgG2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IgG3	-	-	-	-	-	-	-	I	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-
	IgG4 (In)**	-	-	-	-	-	-	-	I	-	-	-	T	-	-	-	-	-	L	-	-
	IgG4 (Ch)***	-	-	A	-	-	-	-	I	-	-	-	T	-	-	-	-	-	L	-	-

*Numeración UE; **In, indio; ***Ch, chino

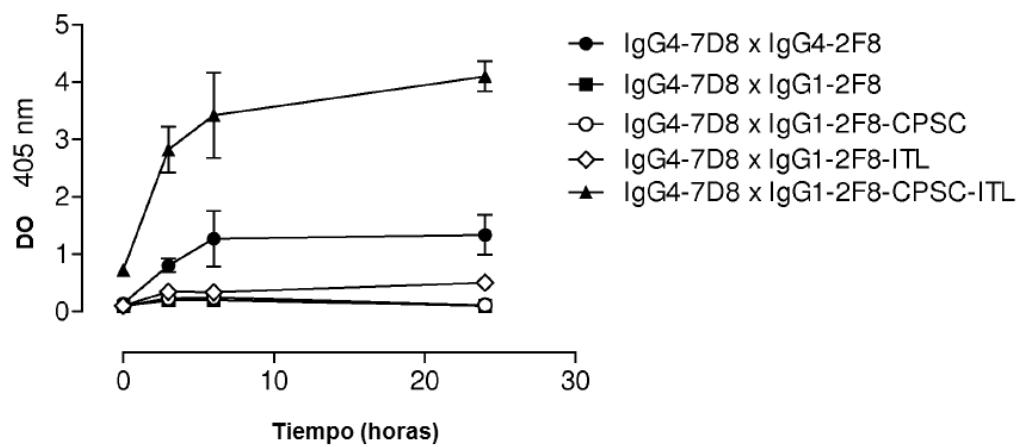
Figura 3

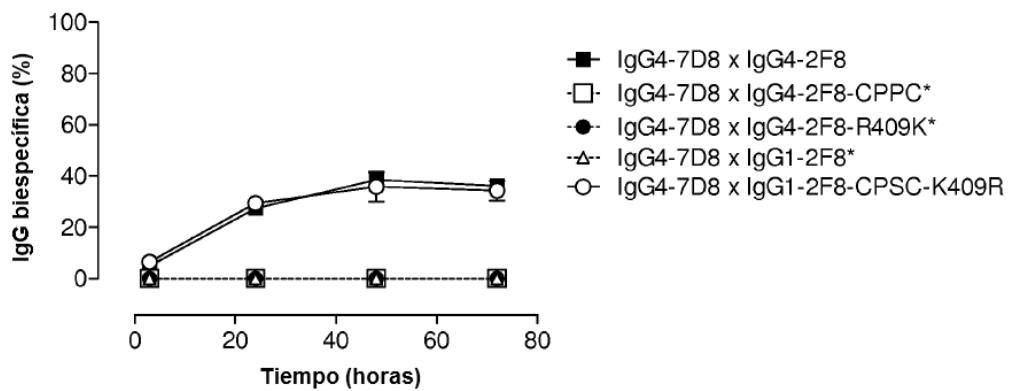
Figura 4

Figura 5

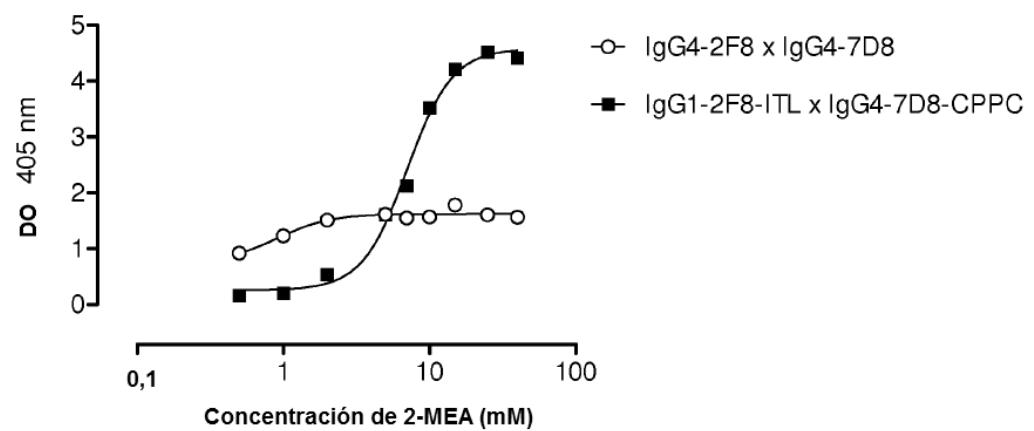
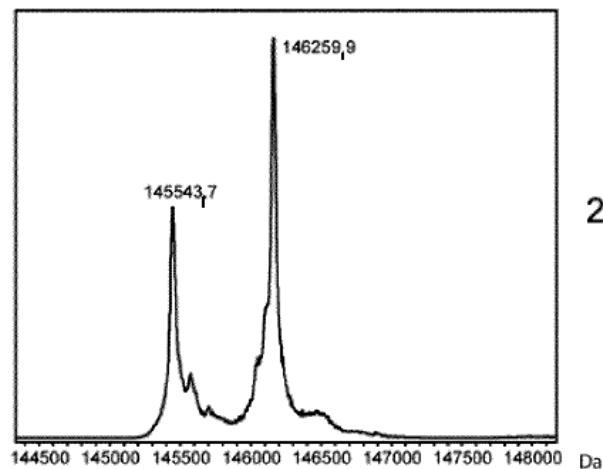


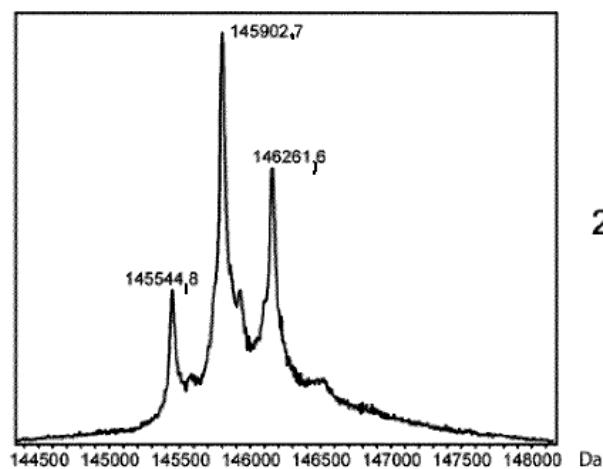
Figura 6

A

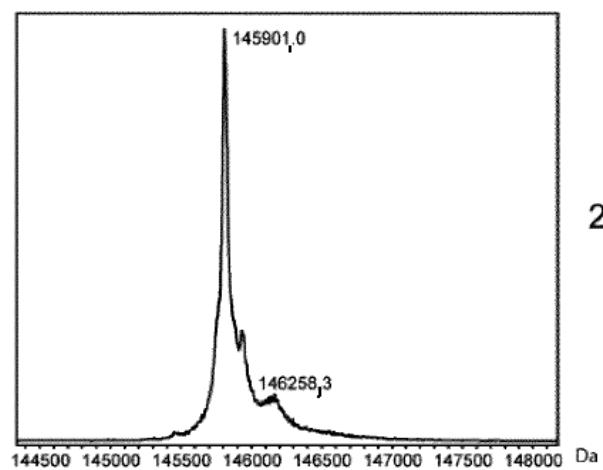
IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC



2-MEA 0 mM



2-MEA 7 mM



2-MEA 40 mM

Figura 6 (continuación)

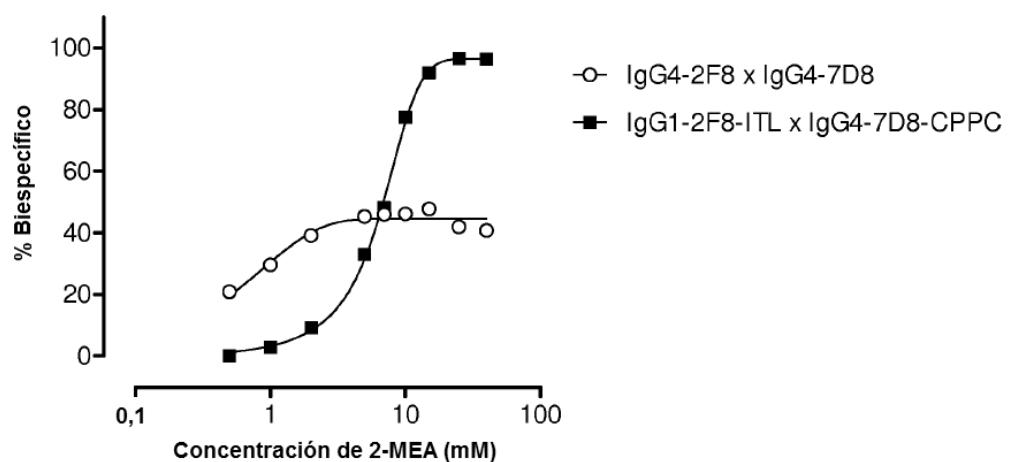
B

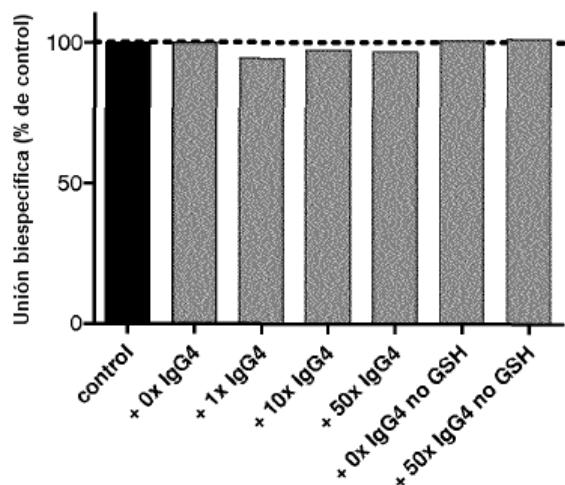
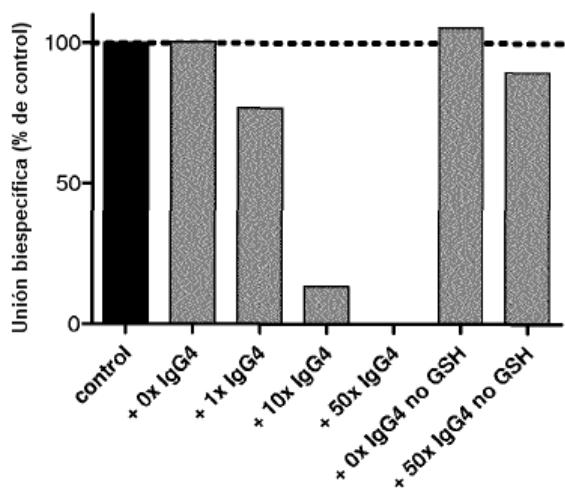
Figura 7**A****IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPC****B****IgG4-2F8 x IgG4-7D8**

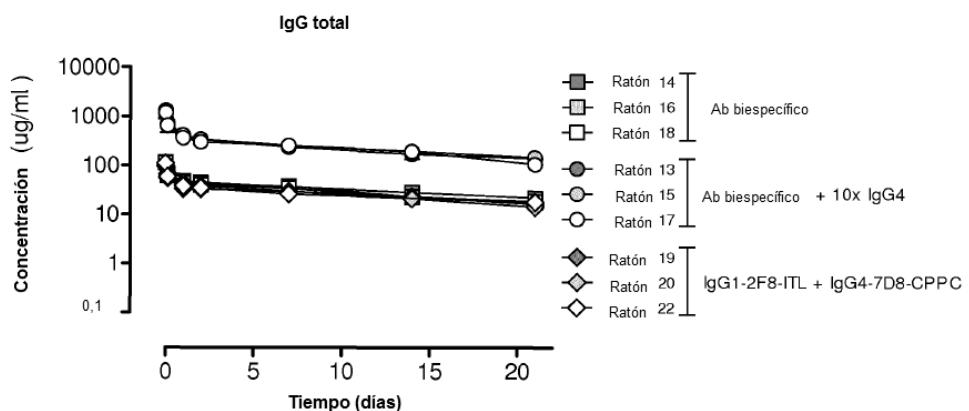
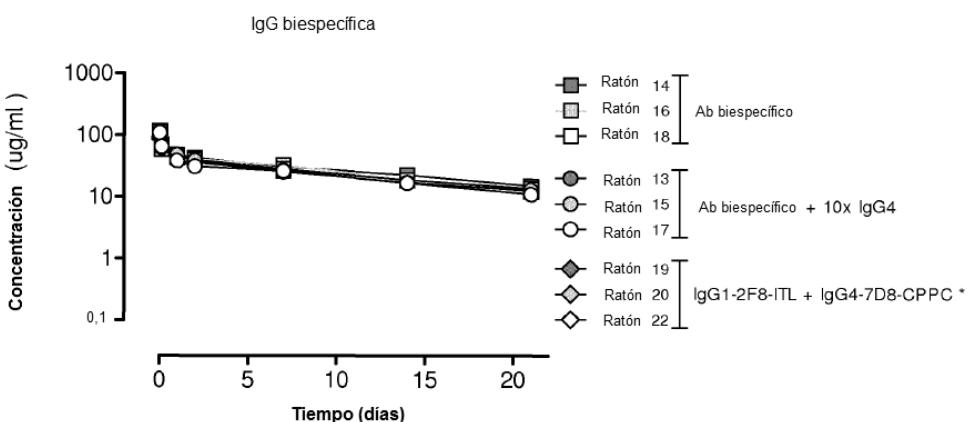
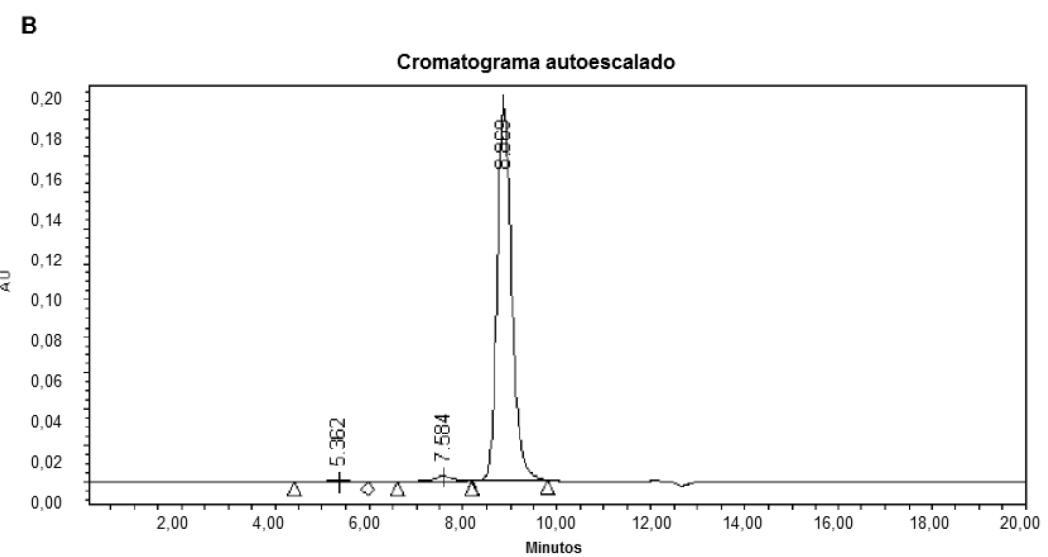
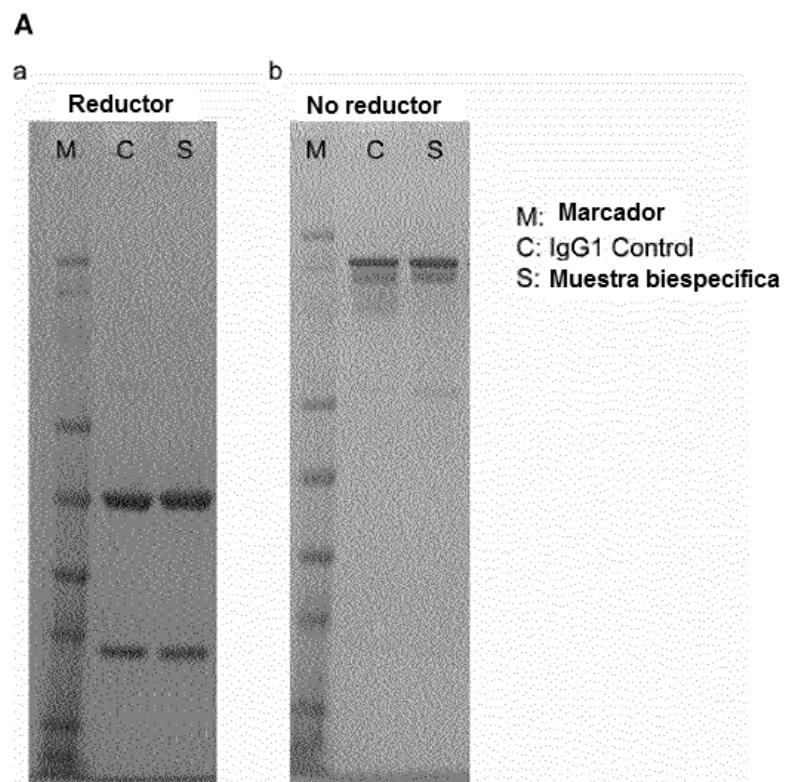
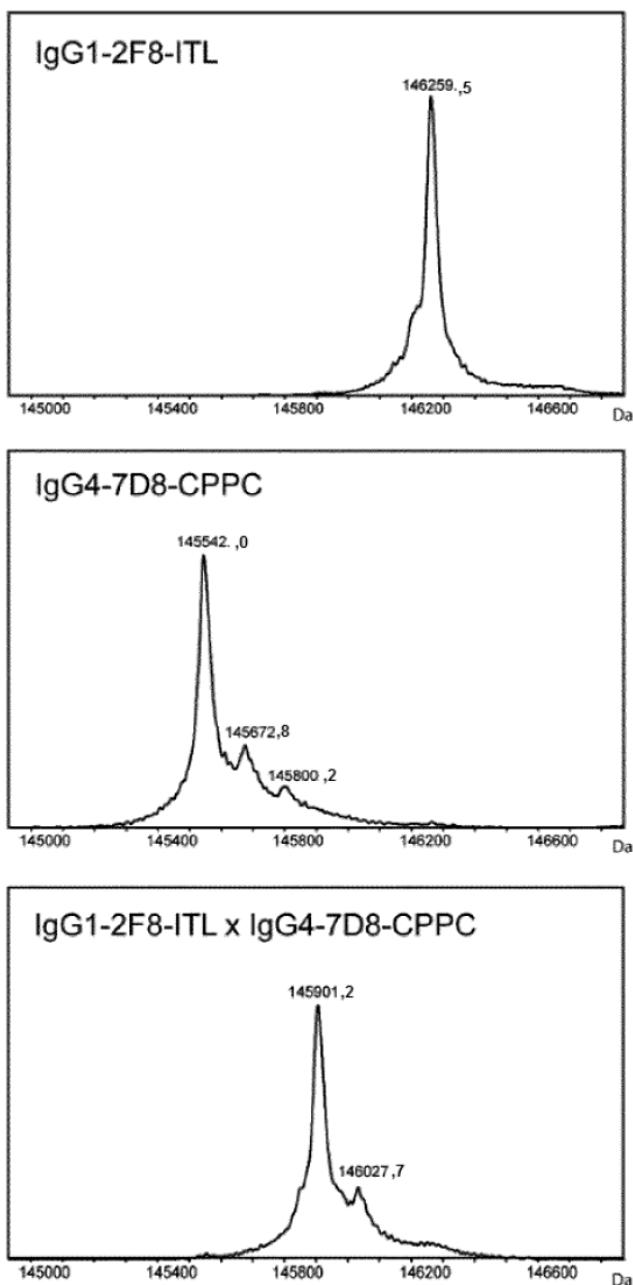
Figura 8**A****B**

Figura 9**Resultados máximos:**

	TR (min)	Área	Altura	% Altura
1	5, 362	18309	448	0, 21
2	7, 584	82197	2876	1, 36
3	8, 869	4431069	207416	98, 42

Figura 9 (continuación)

C



	Medido	Medido	Medido
IgG1-2F8-ITL	146259,5		
IgG4-7D8-CPPC	145542,0	145672,8	145800,2
IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-	145901,2	146027,7	

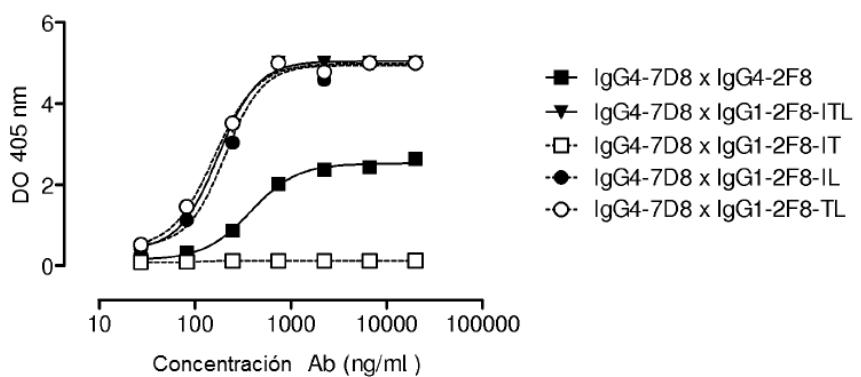
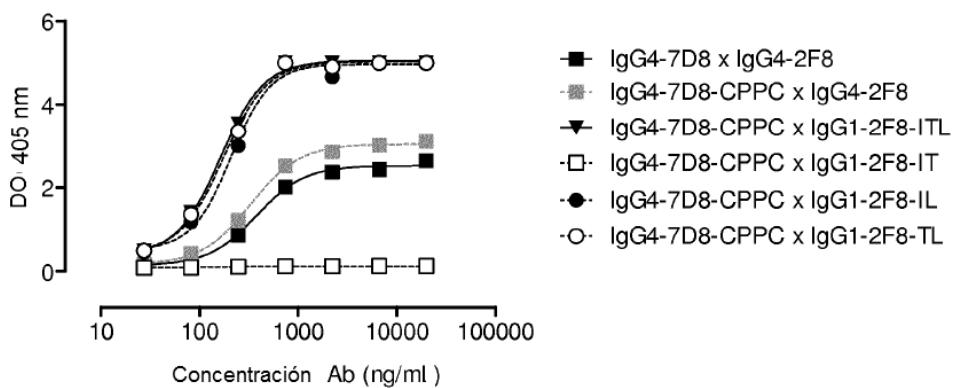
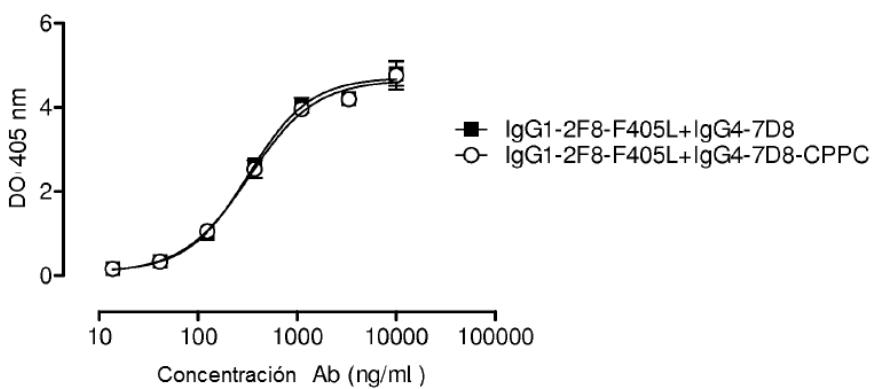
Figura 10**(A)****(B)****(C)**

Figura 11

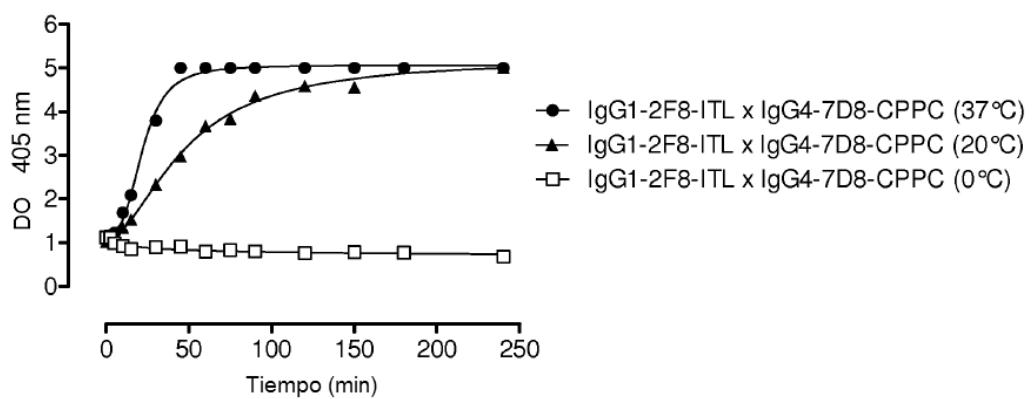


Figura 12

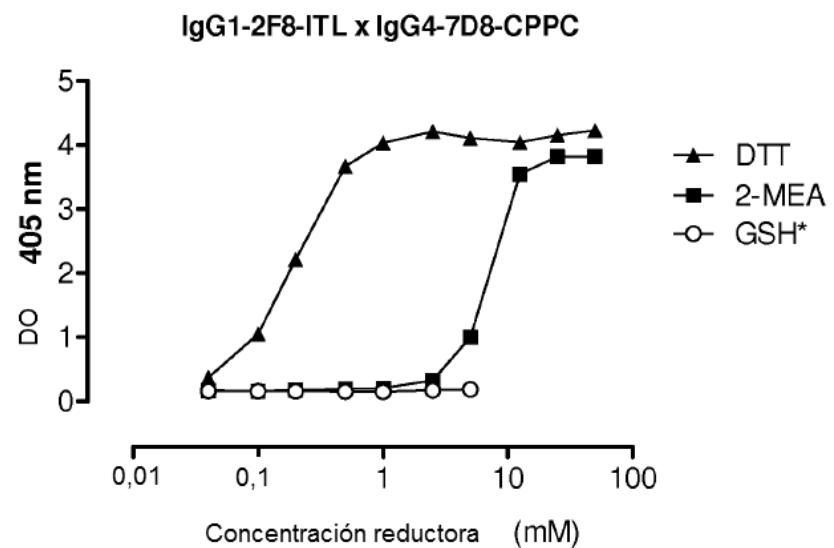


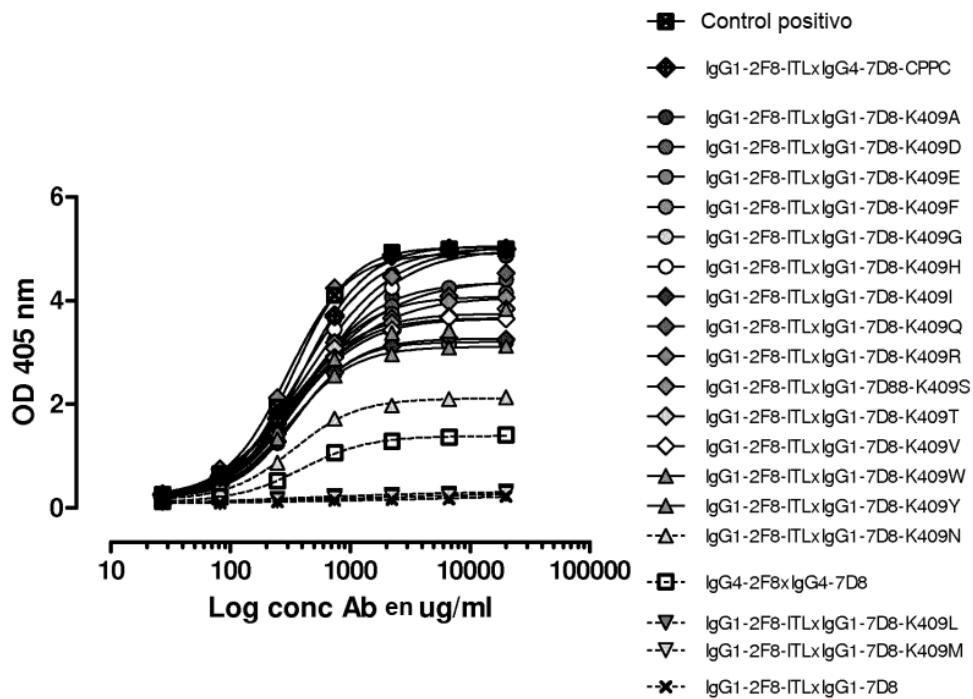
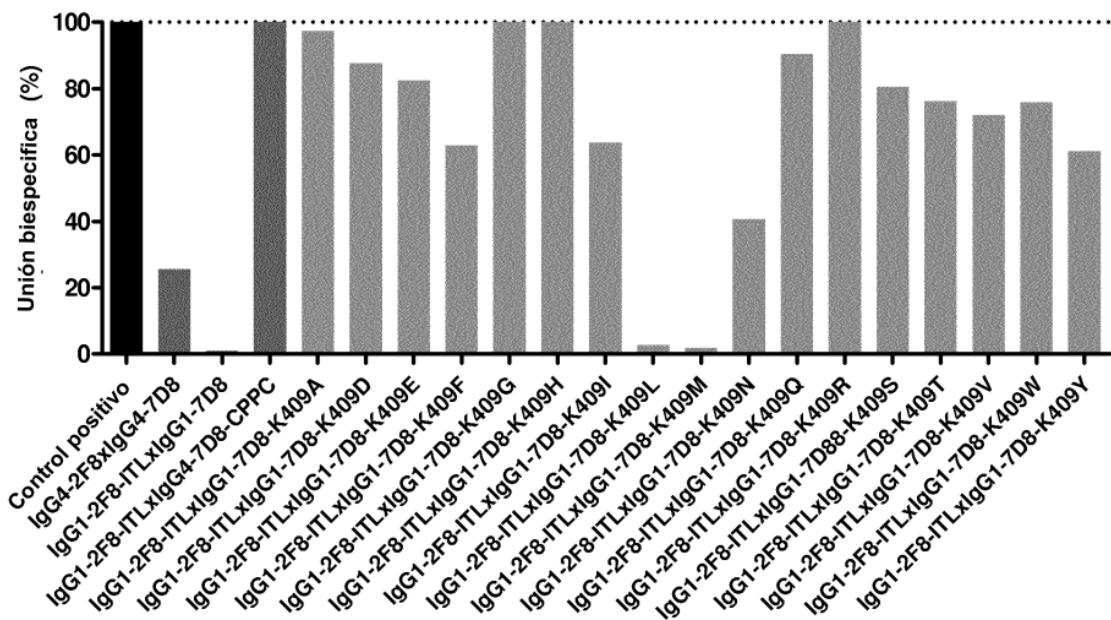
Figura 13**A****B**

Figura 14

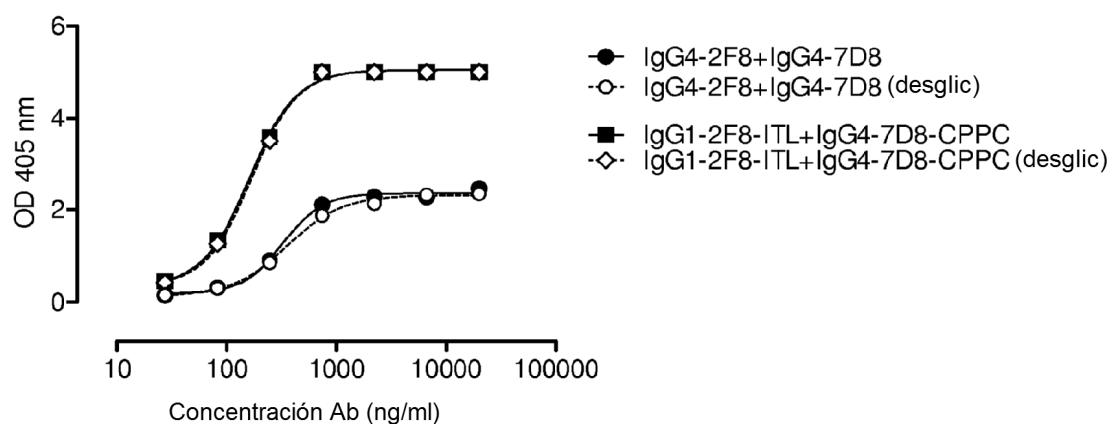


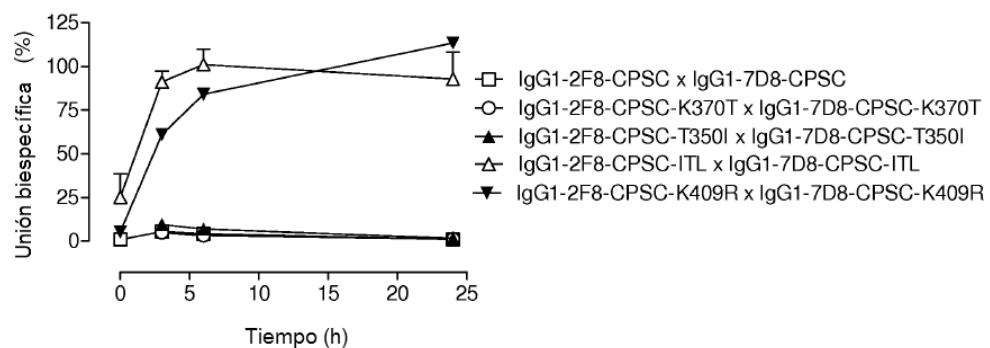
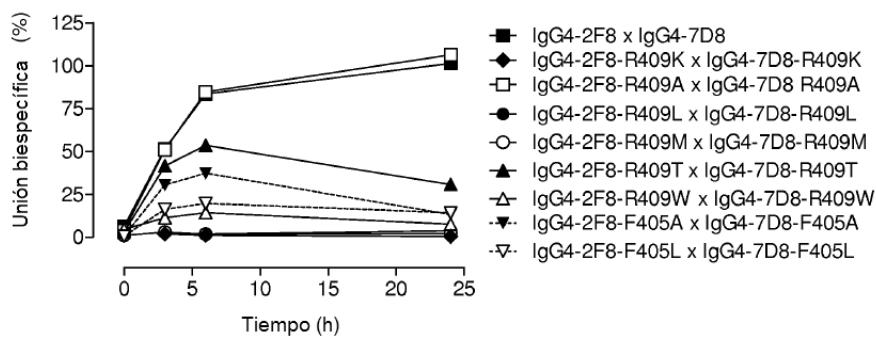
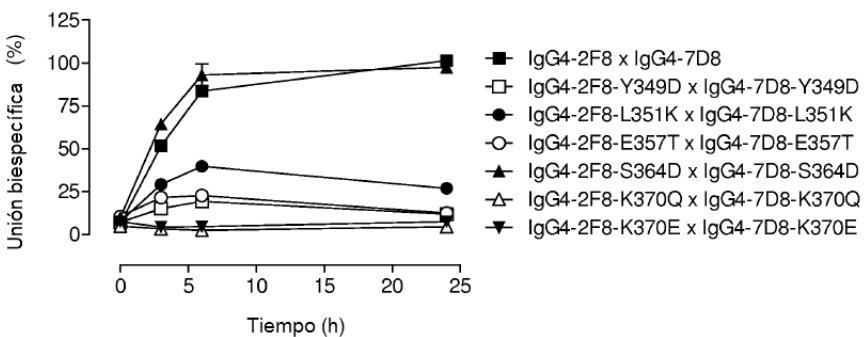
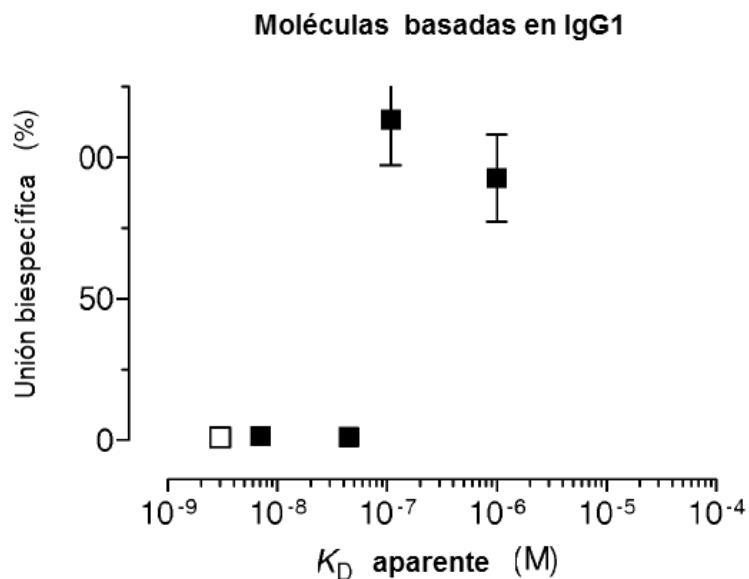
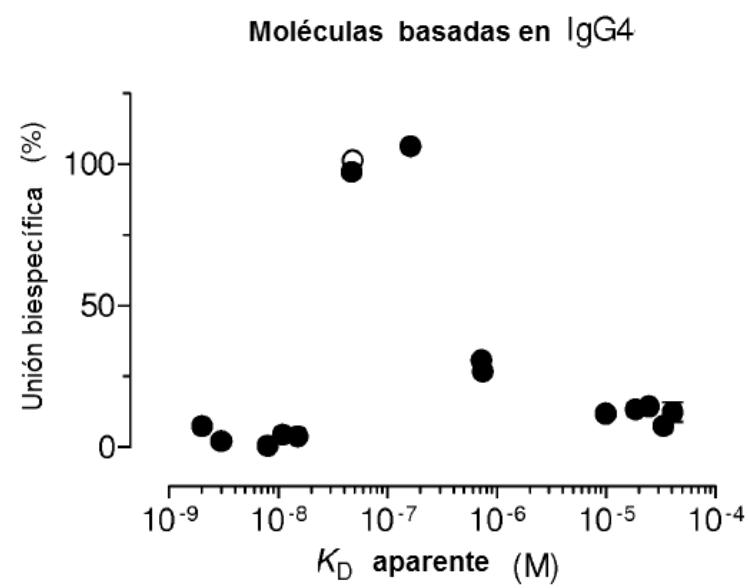
Figura 15**A****B****C**

Figura 15 (continuación)**D****E**

ES 2 739 808 T3

Figura 16

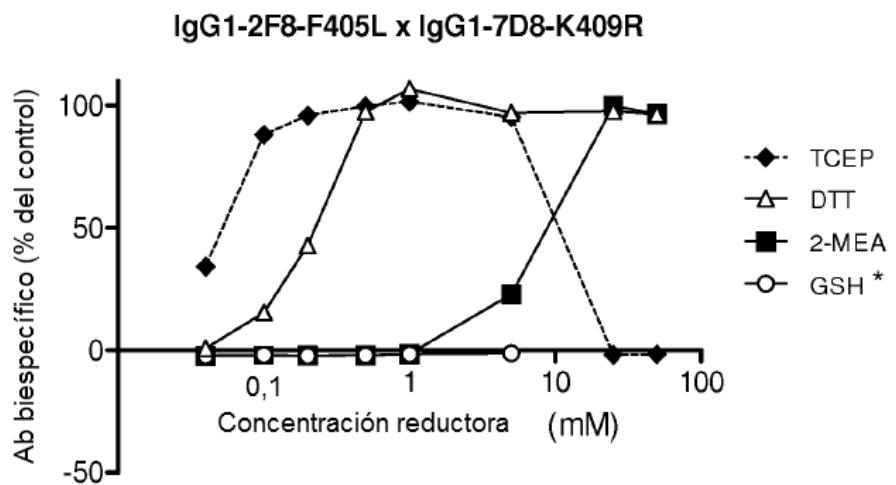
Figura 17

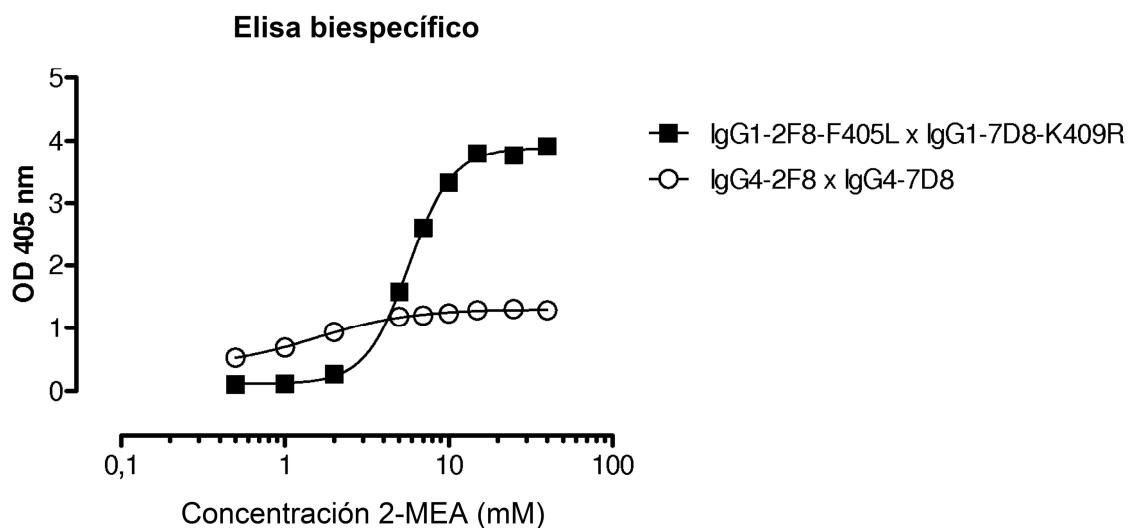
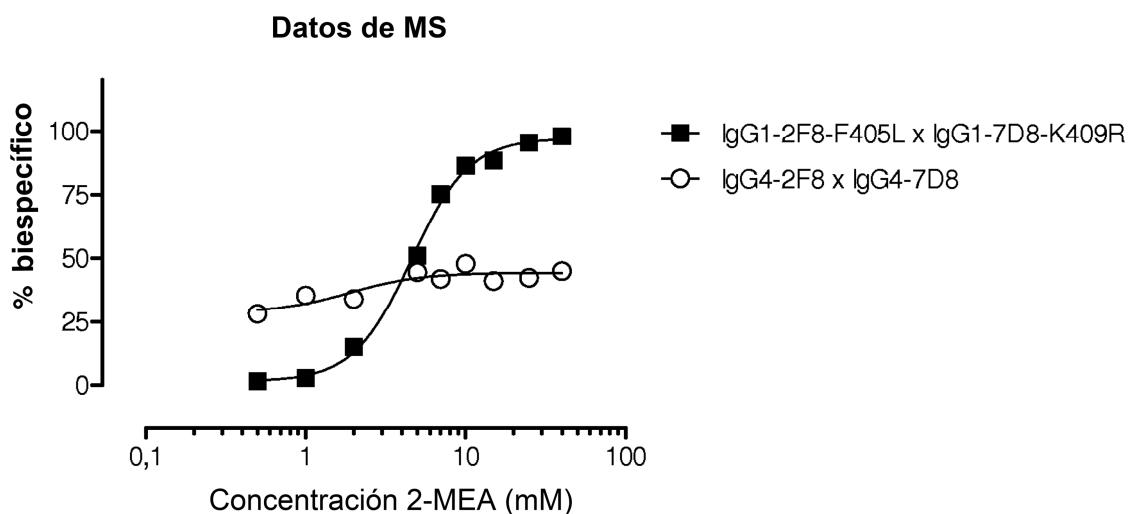
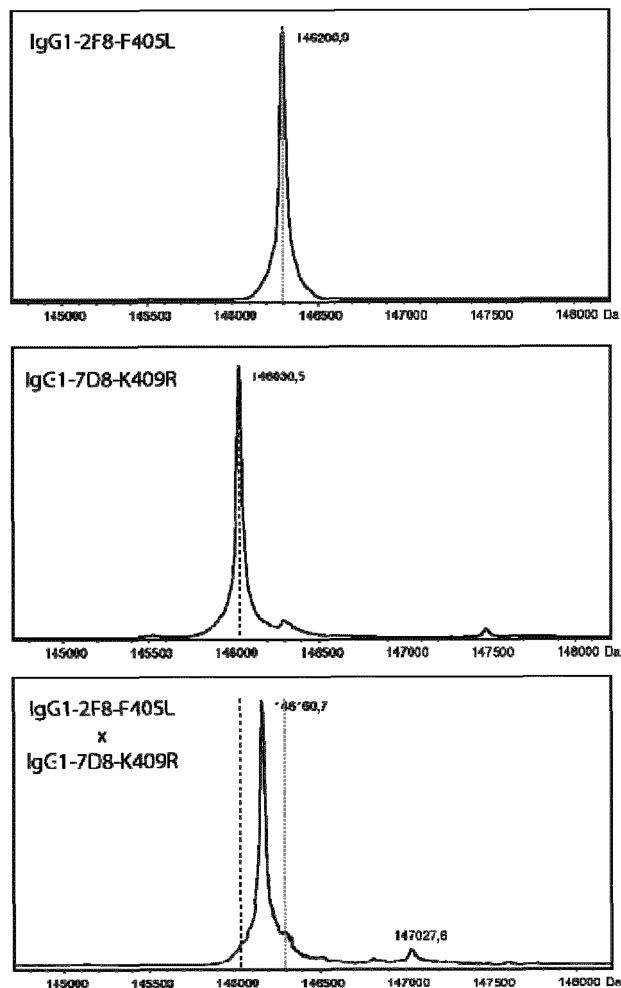
Figura 18**A****B**

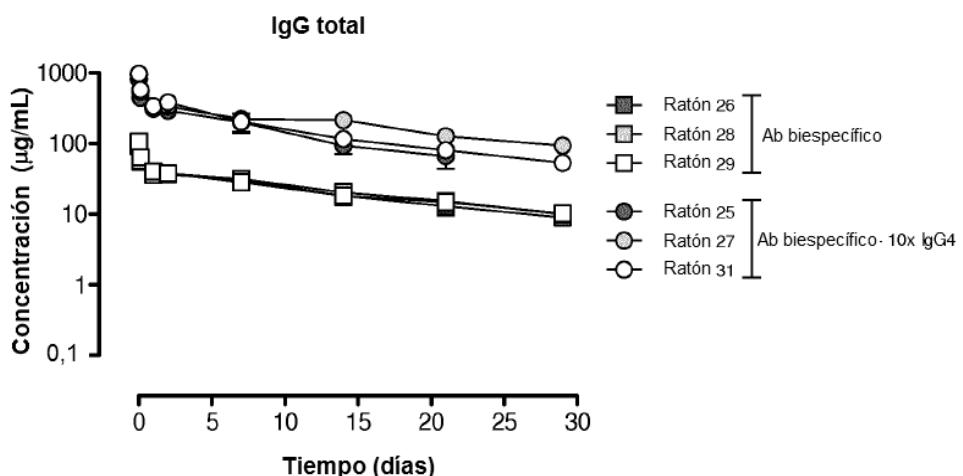
Figura 19



	Medido
IgG1-2F8-F405L	146.290,9
IgG1-7D8-K409R	146.030,5
IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-	146.160,7

Figura 20

A



B

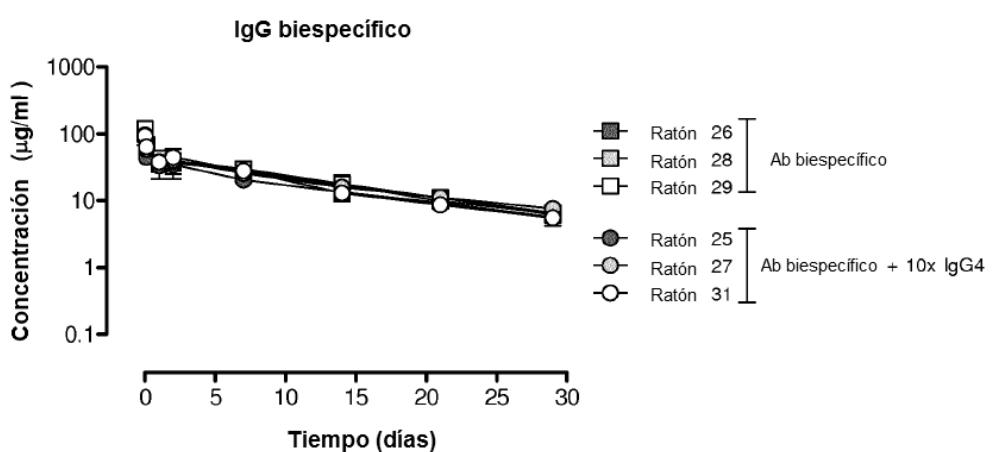


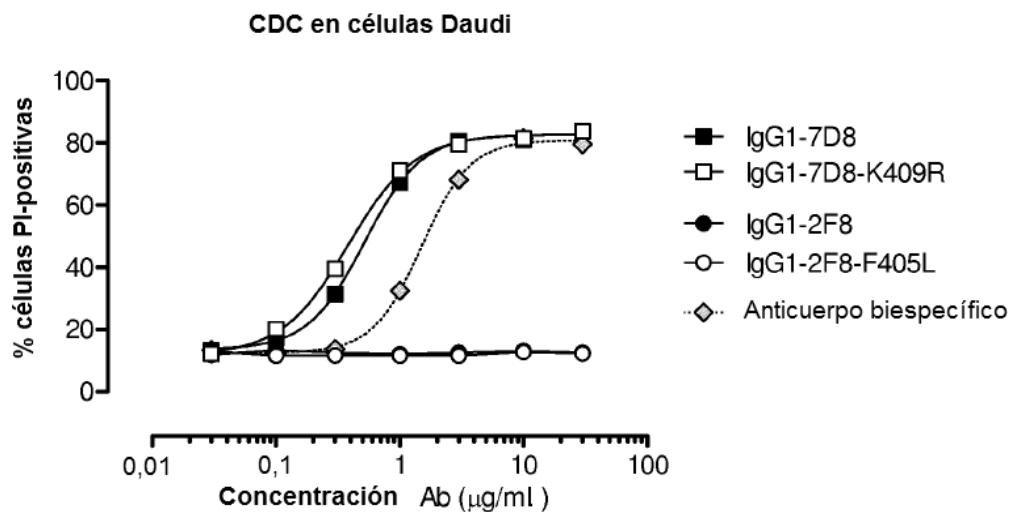
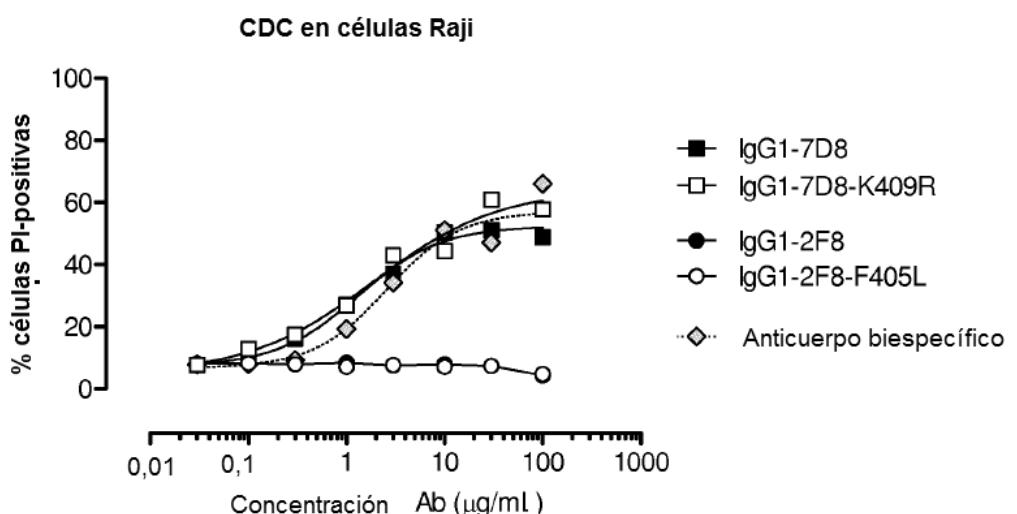
Figura 21**A****B**

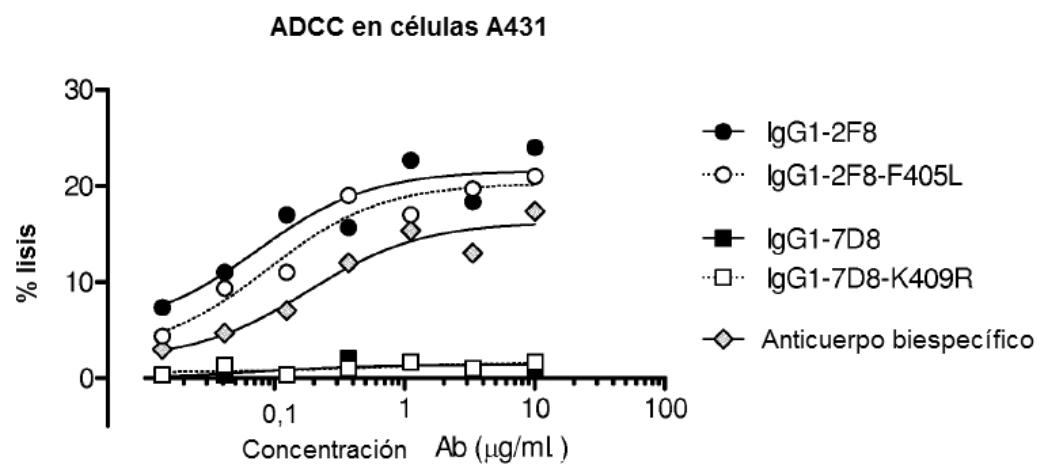
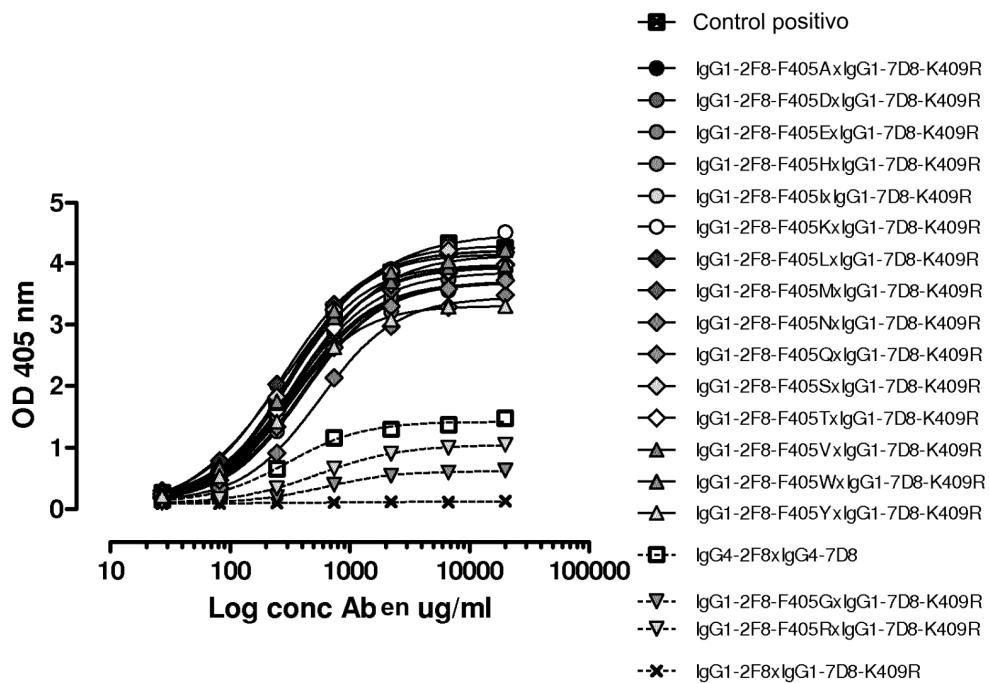
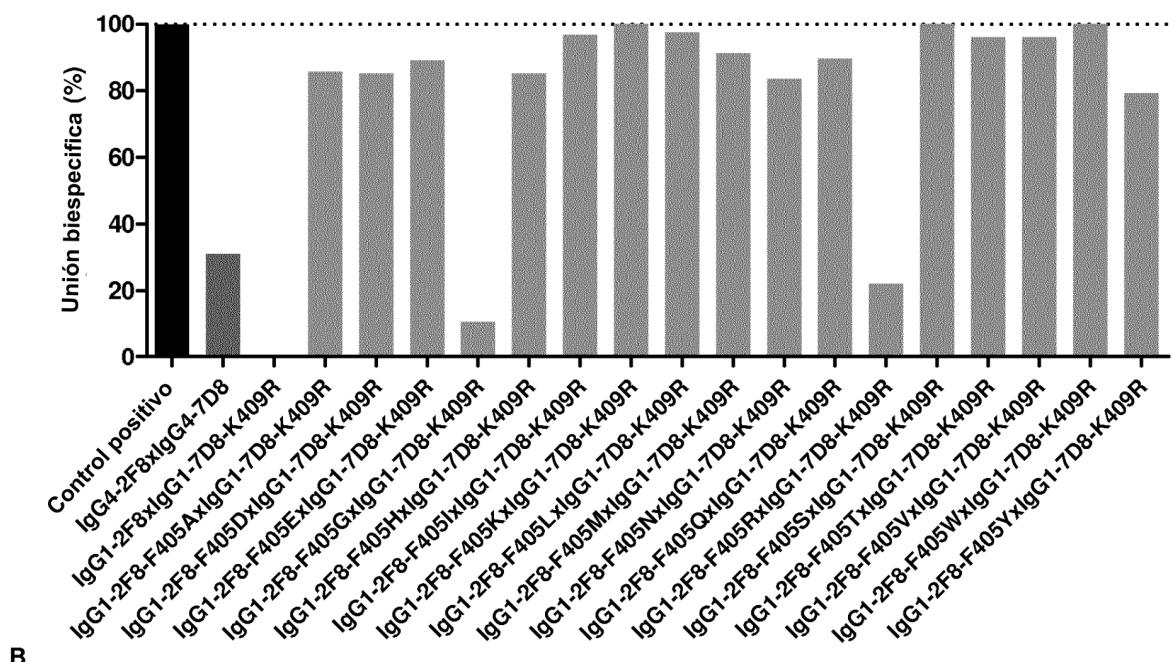
Figura 22

Figura 23

A



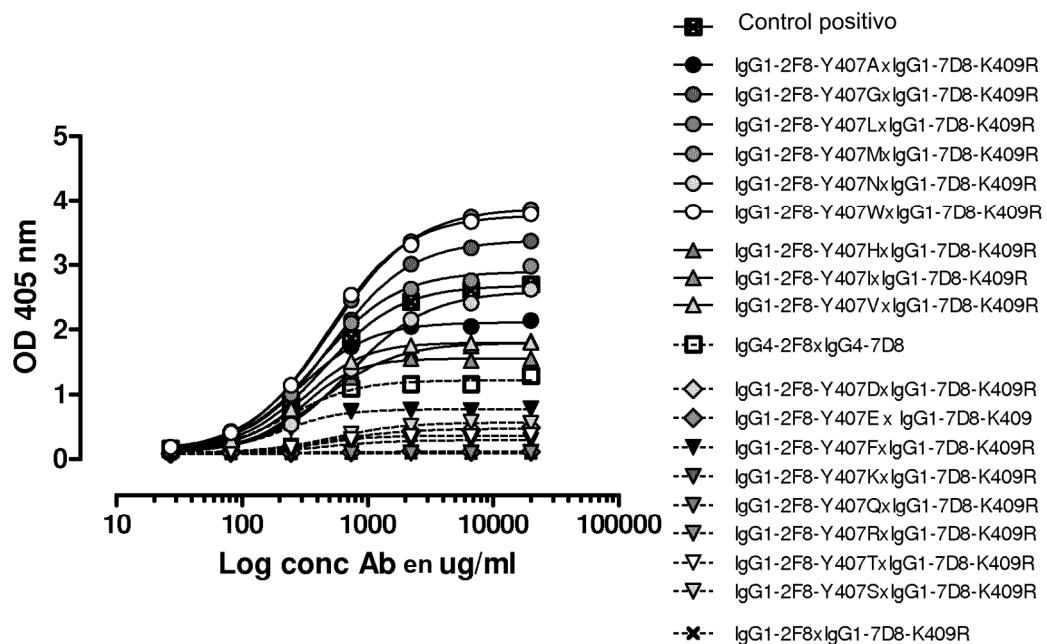
B



B

Figura 24

A



B

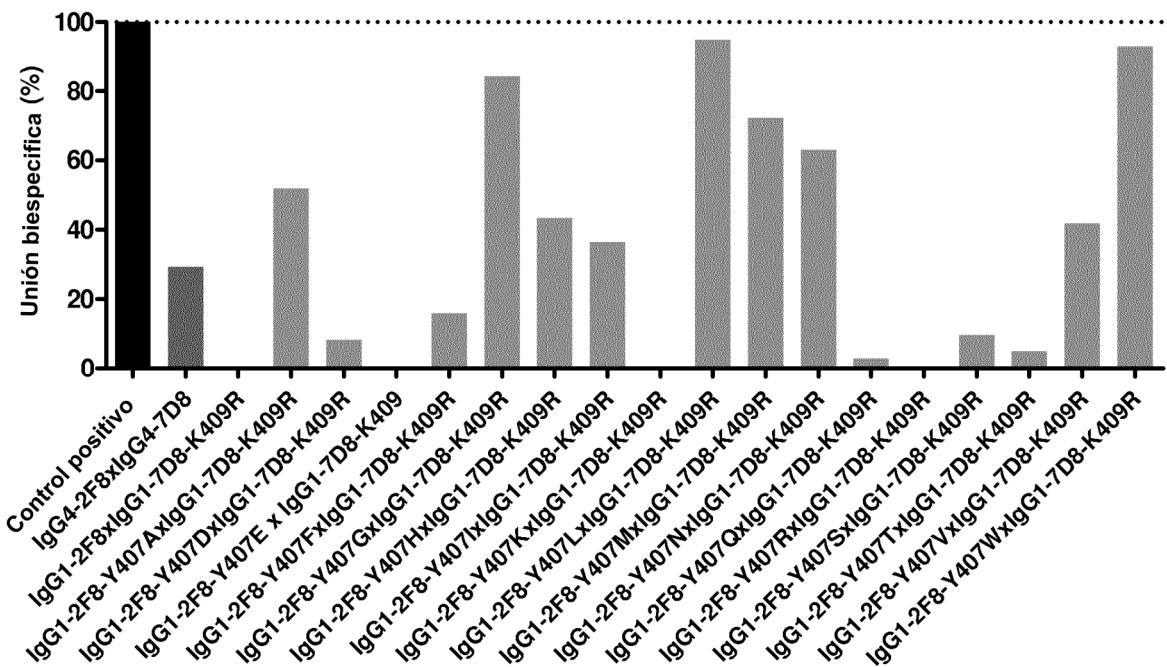


Figura 25

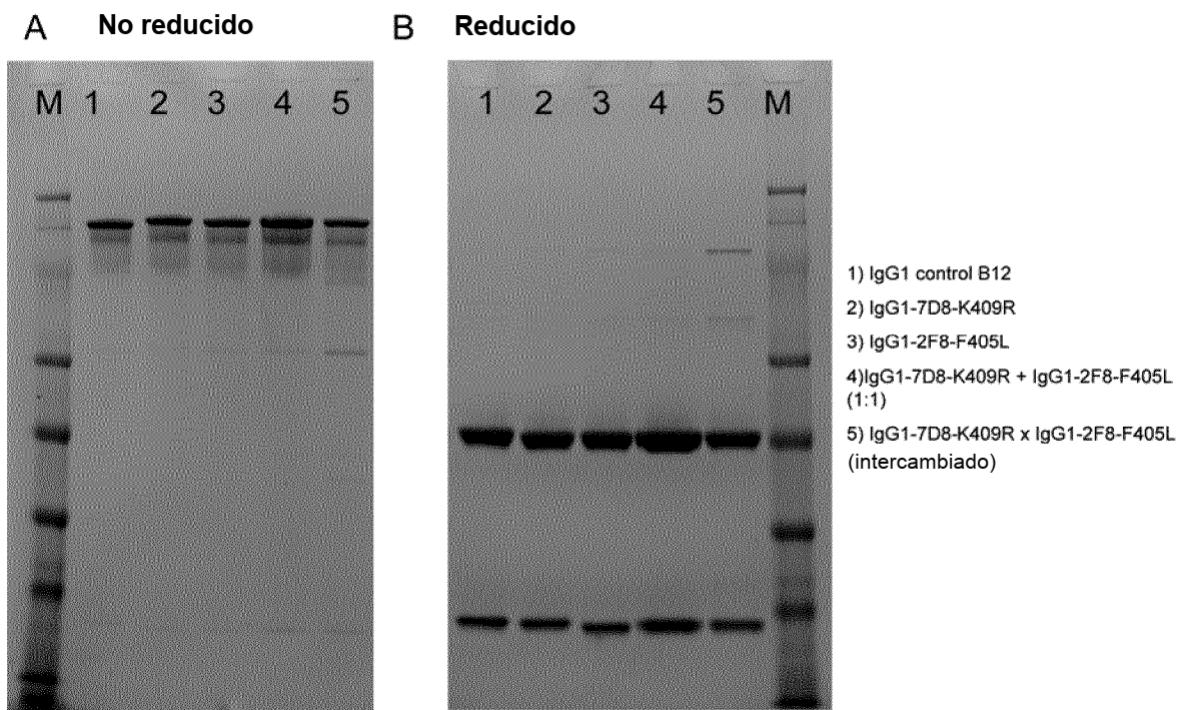


Figura 26

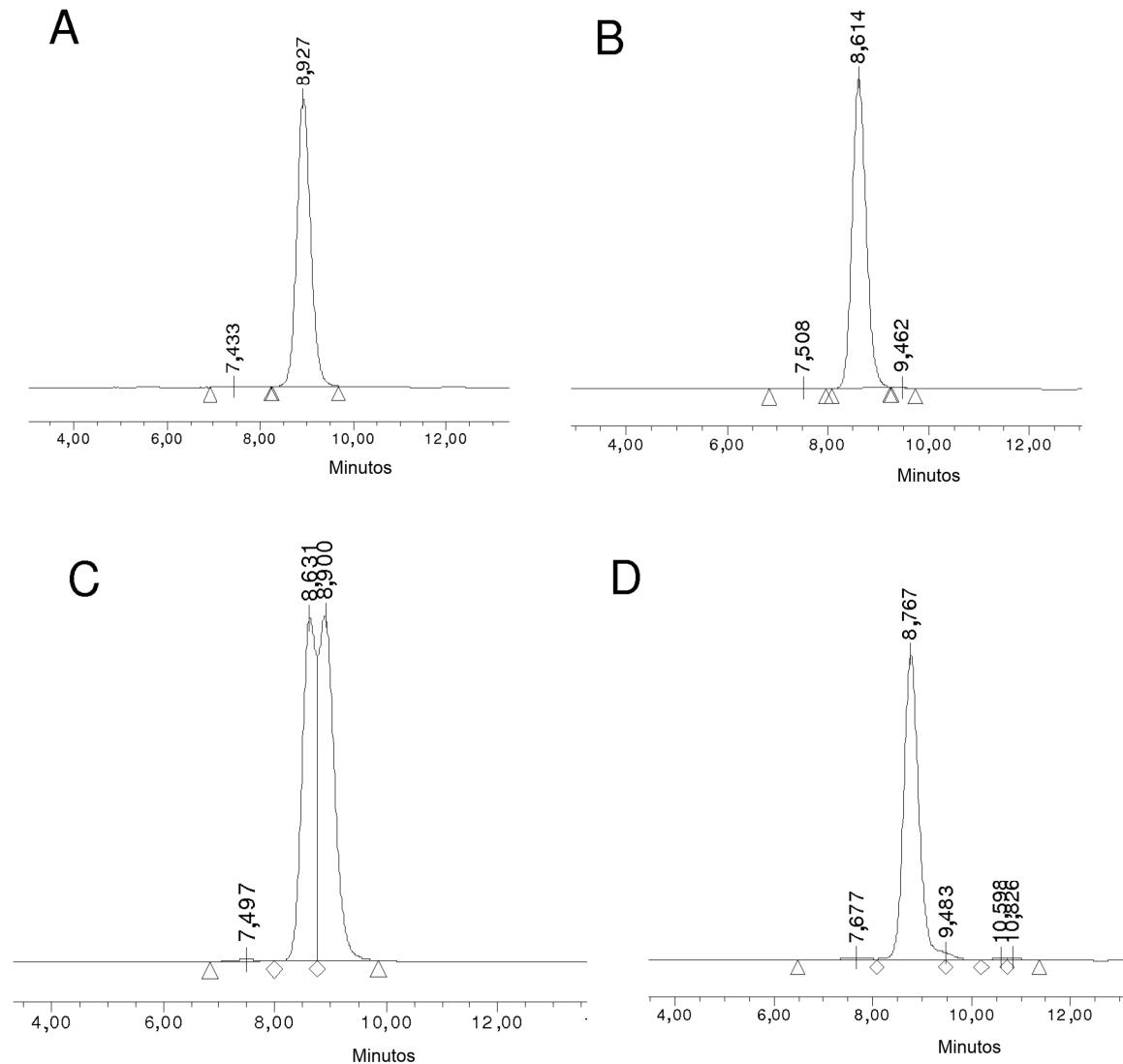


Figura 27

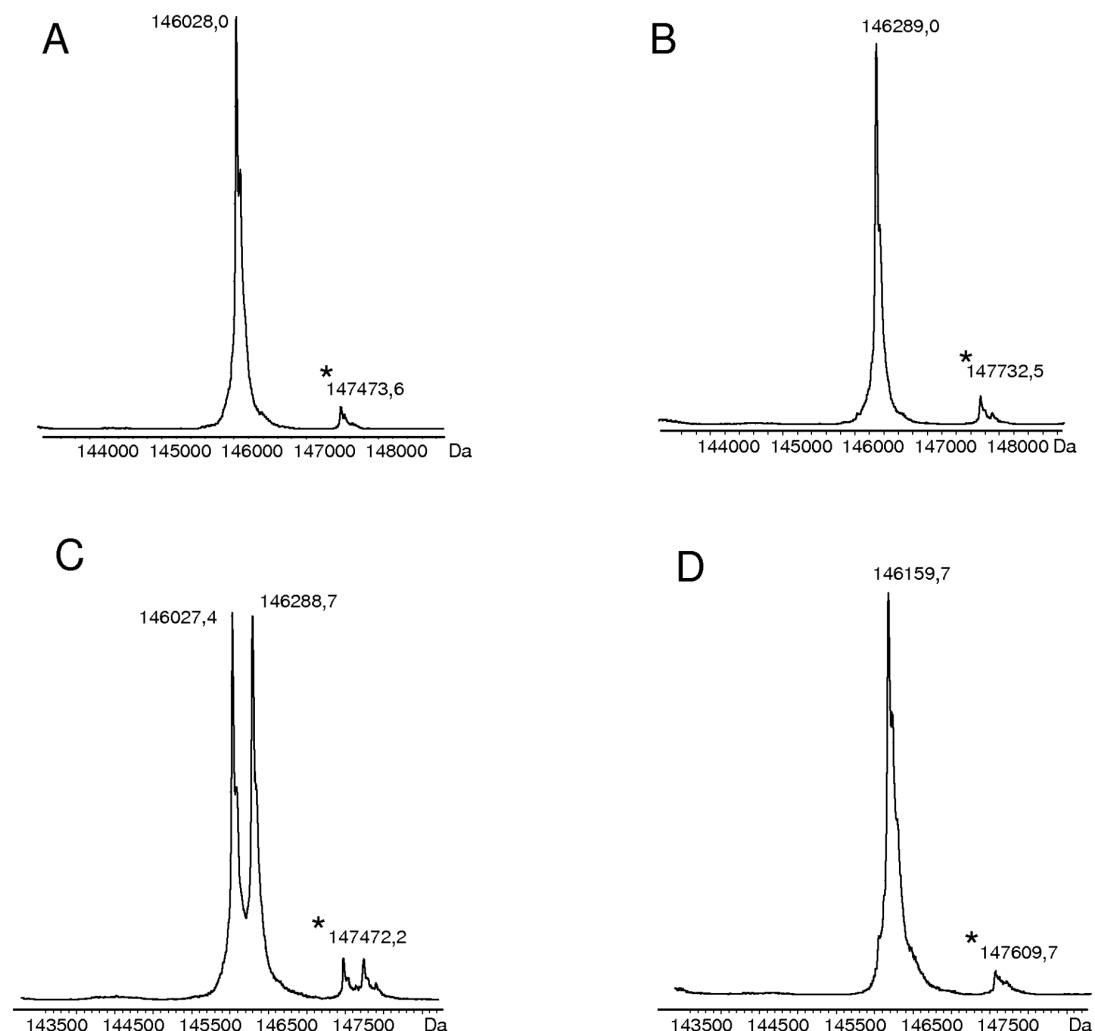
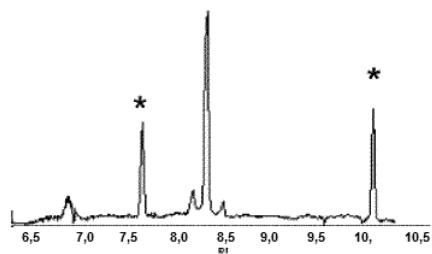
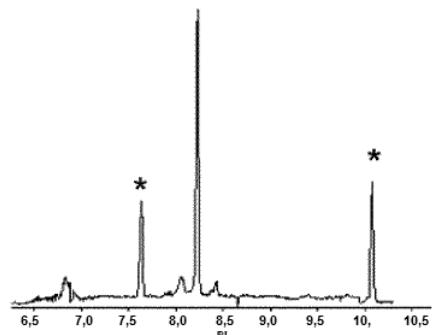


Figura 28

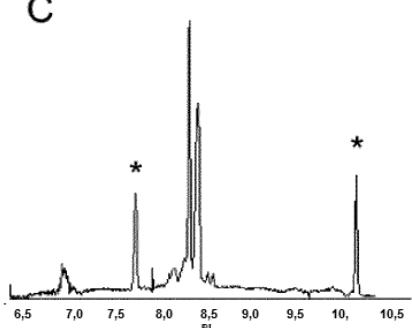
A



B



C



D

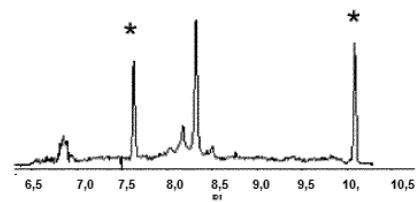


Figura 29

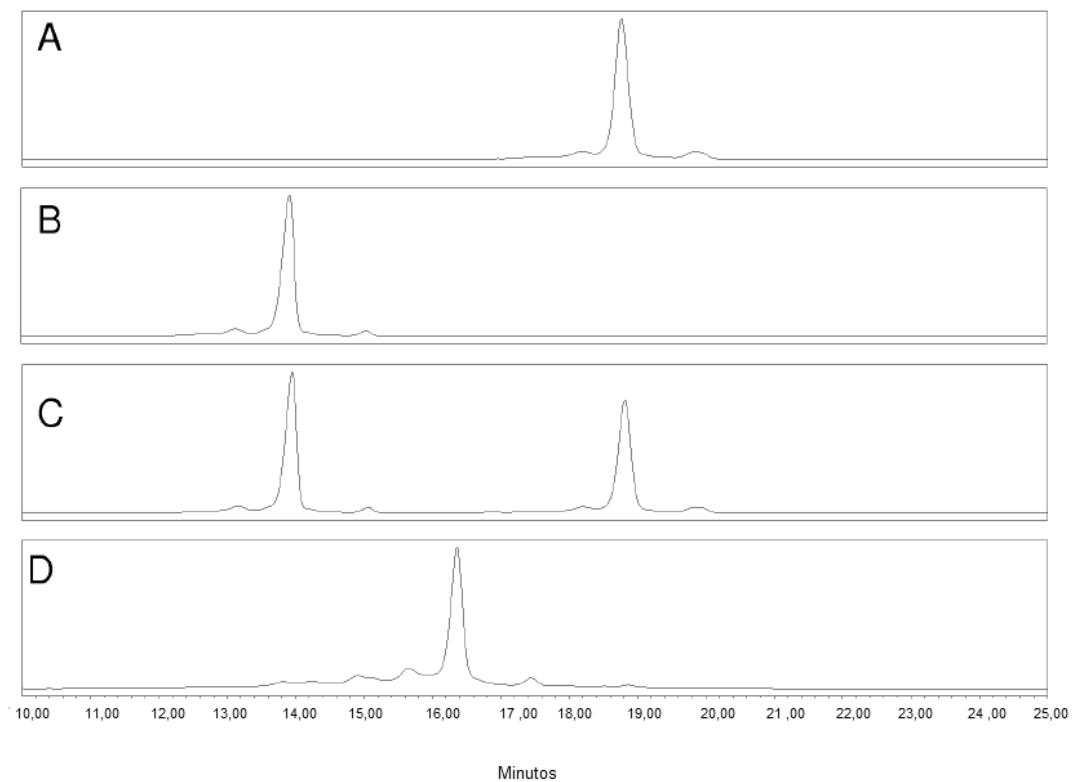


Figura 30

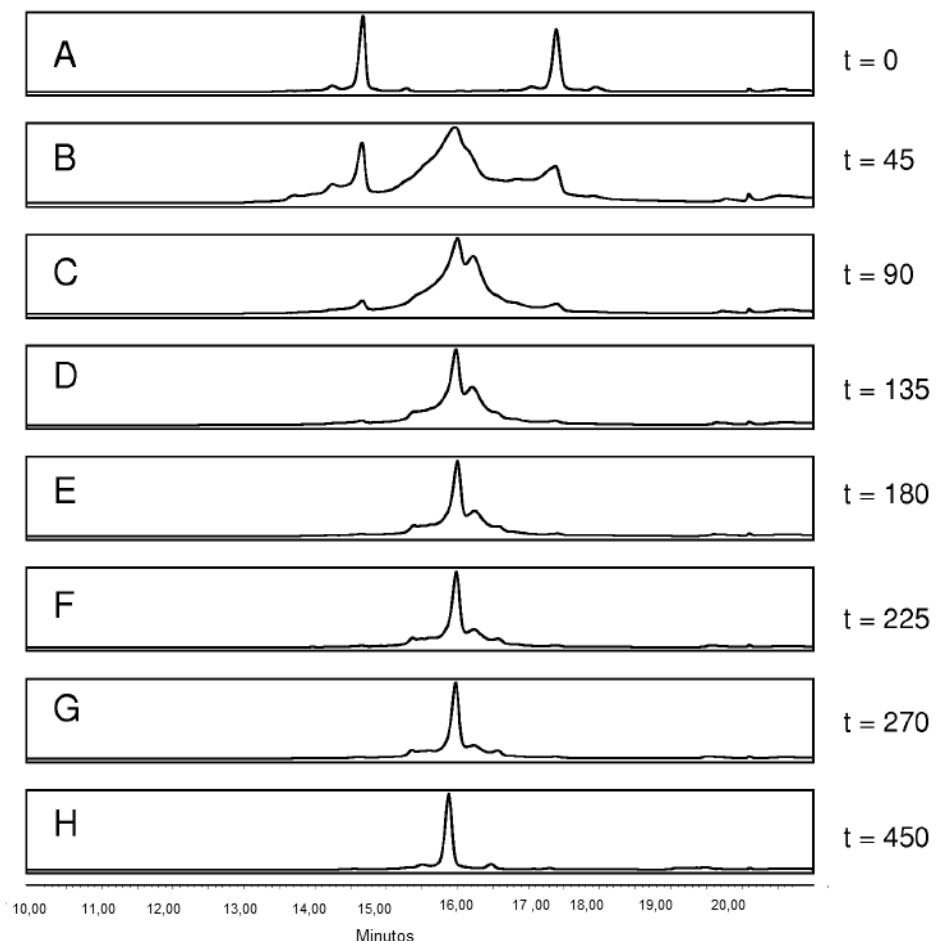


Figura 31

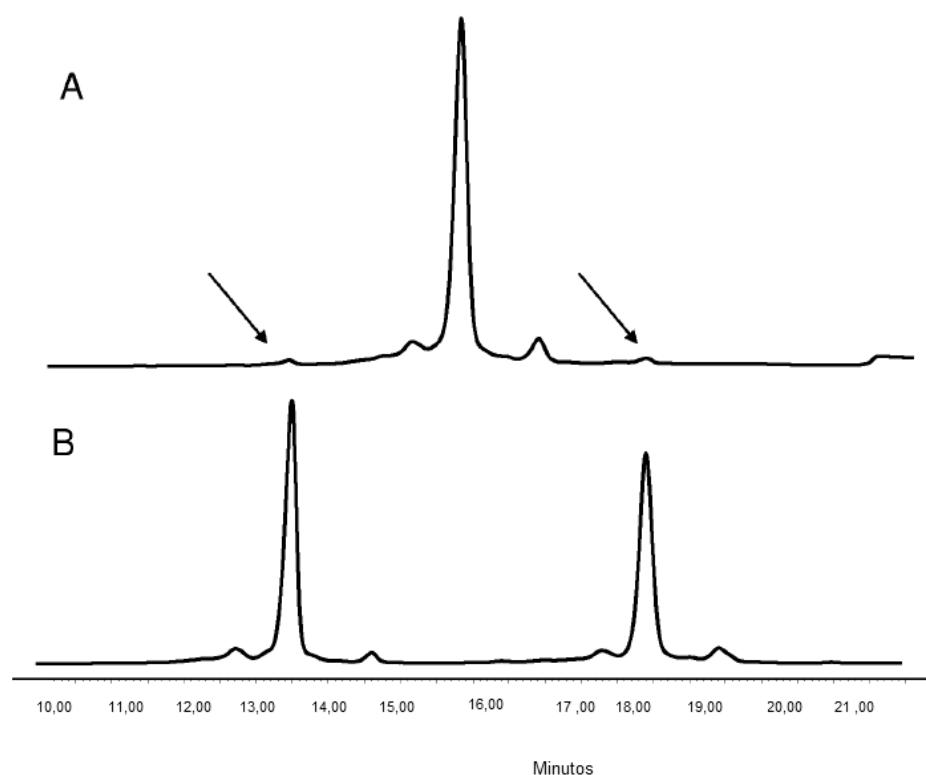
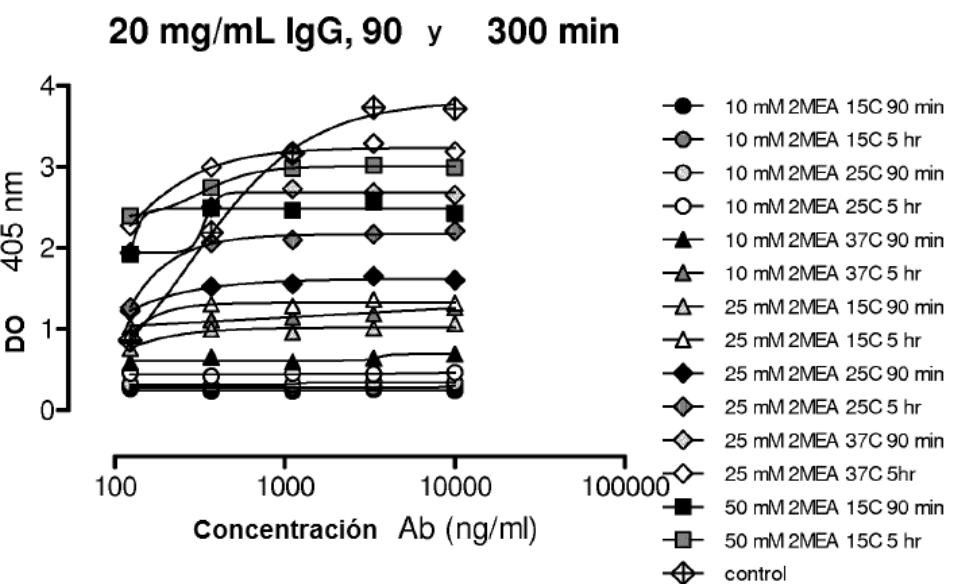


Figura 32

A



B

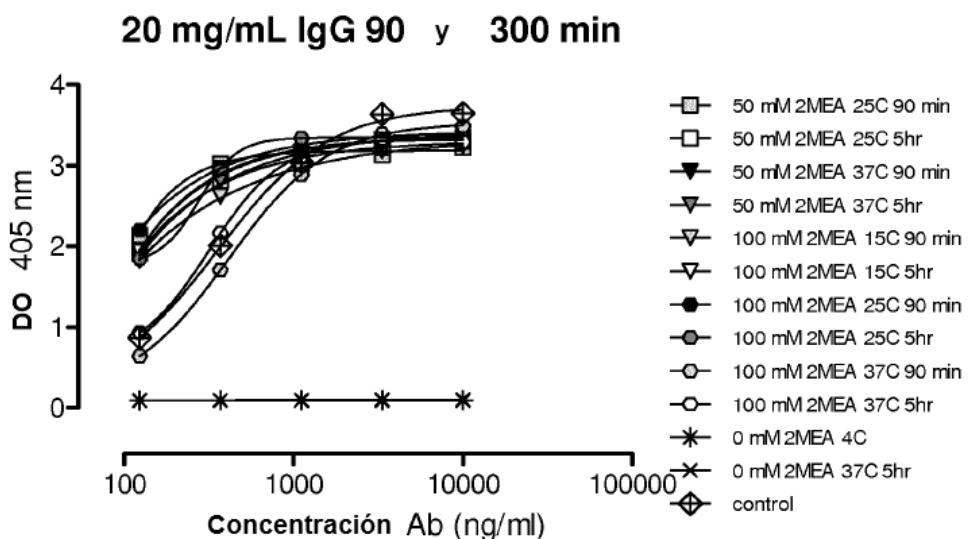
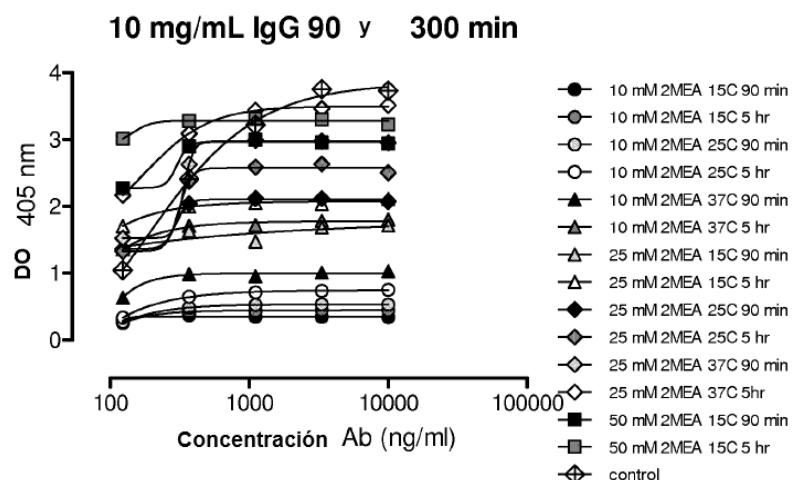


Figura 32 (continuación)

C



D

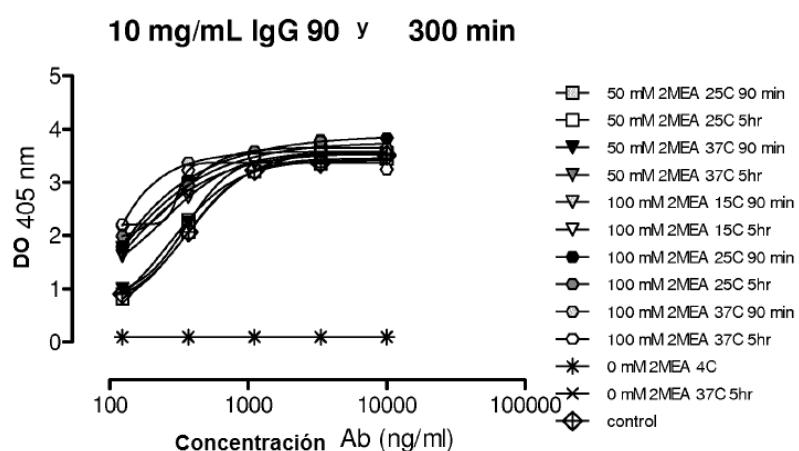
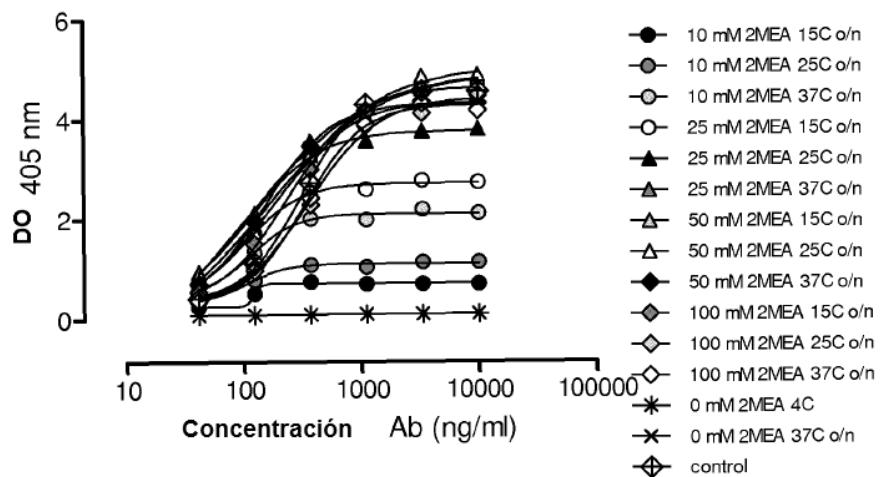


Figura 32 (continuación)

E

20 mg/mL IgG o/n



F

10 mg/mL IgG o/n

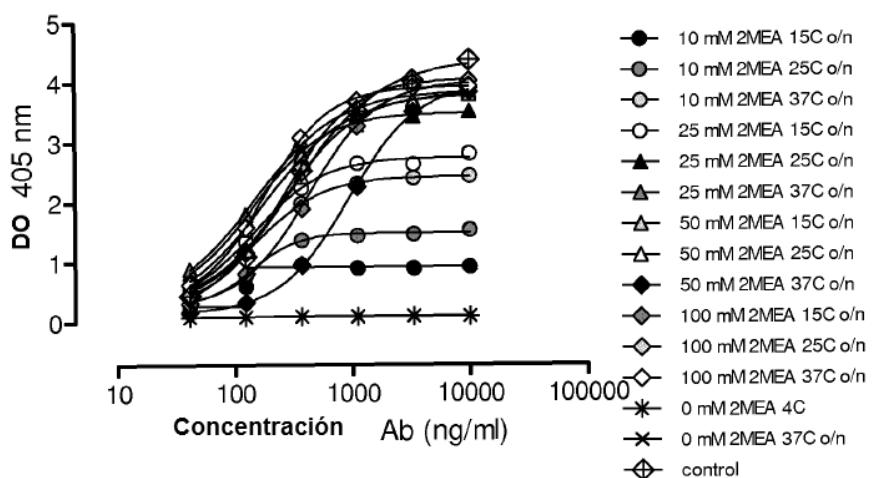
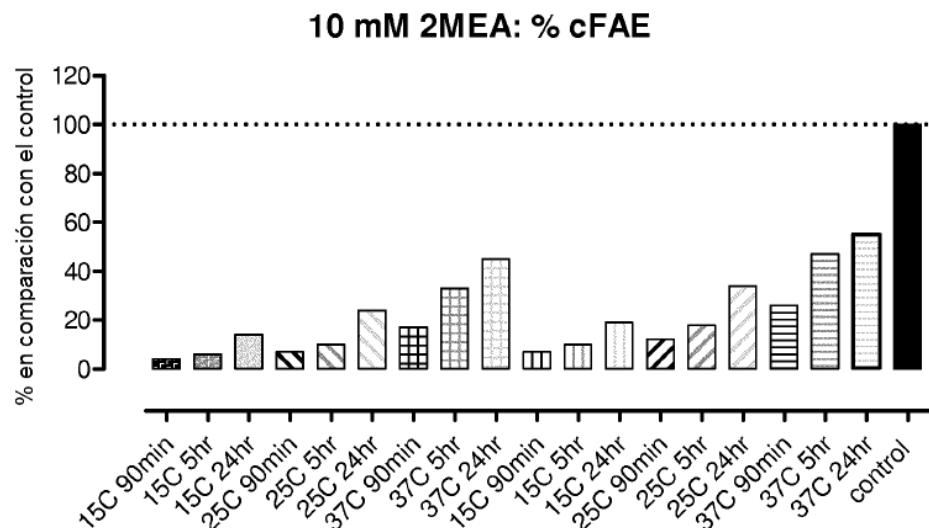


Figura 33

A



B

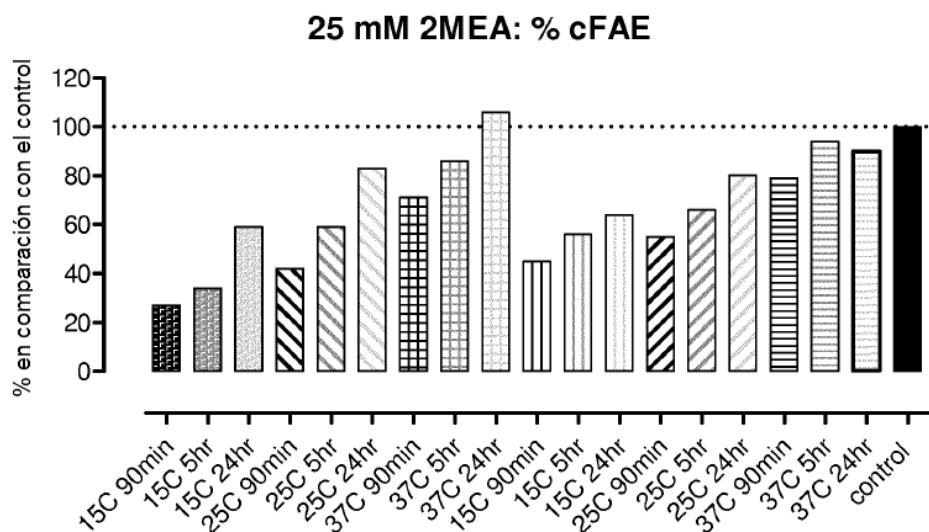
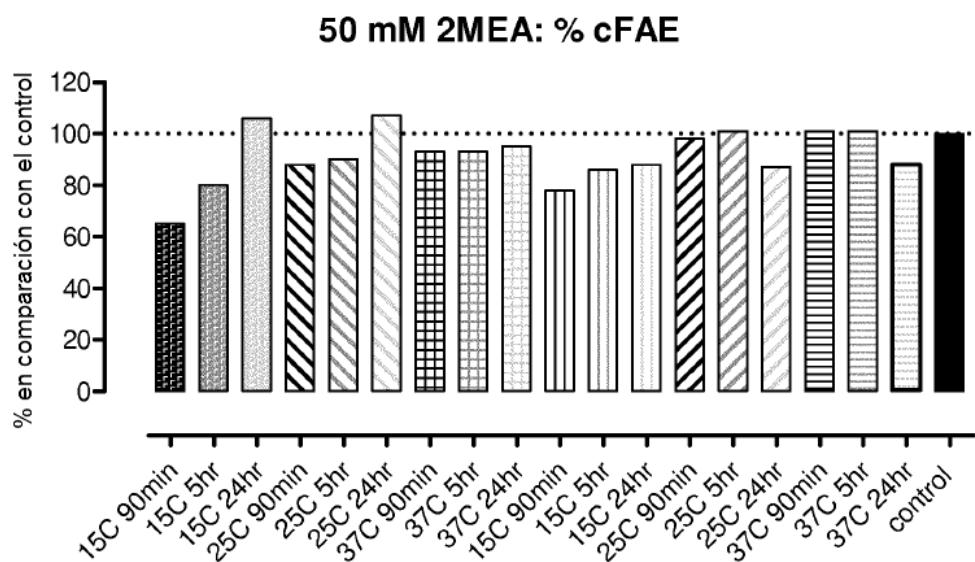


Figura 33 (continuación)

C



D

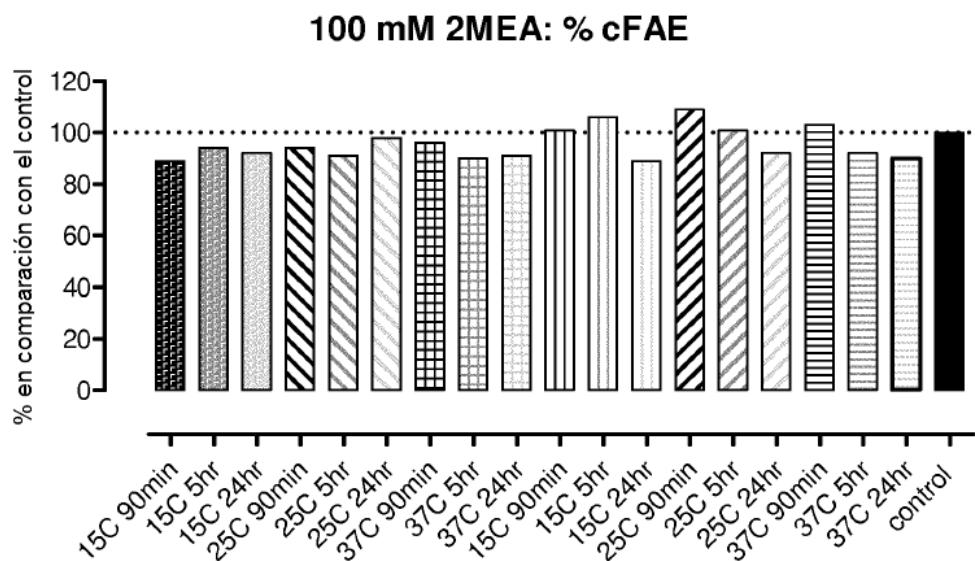


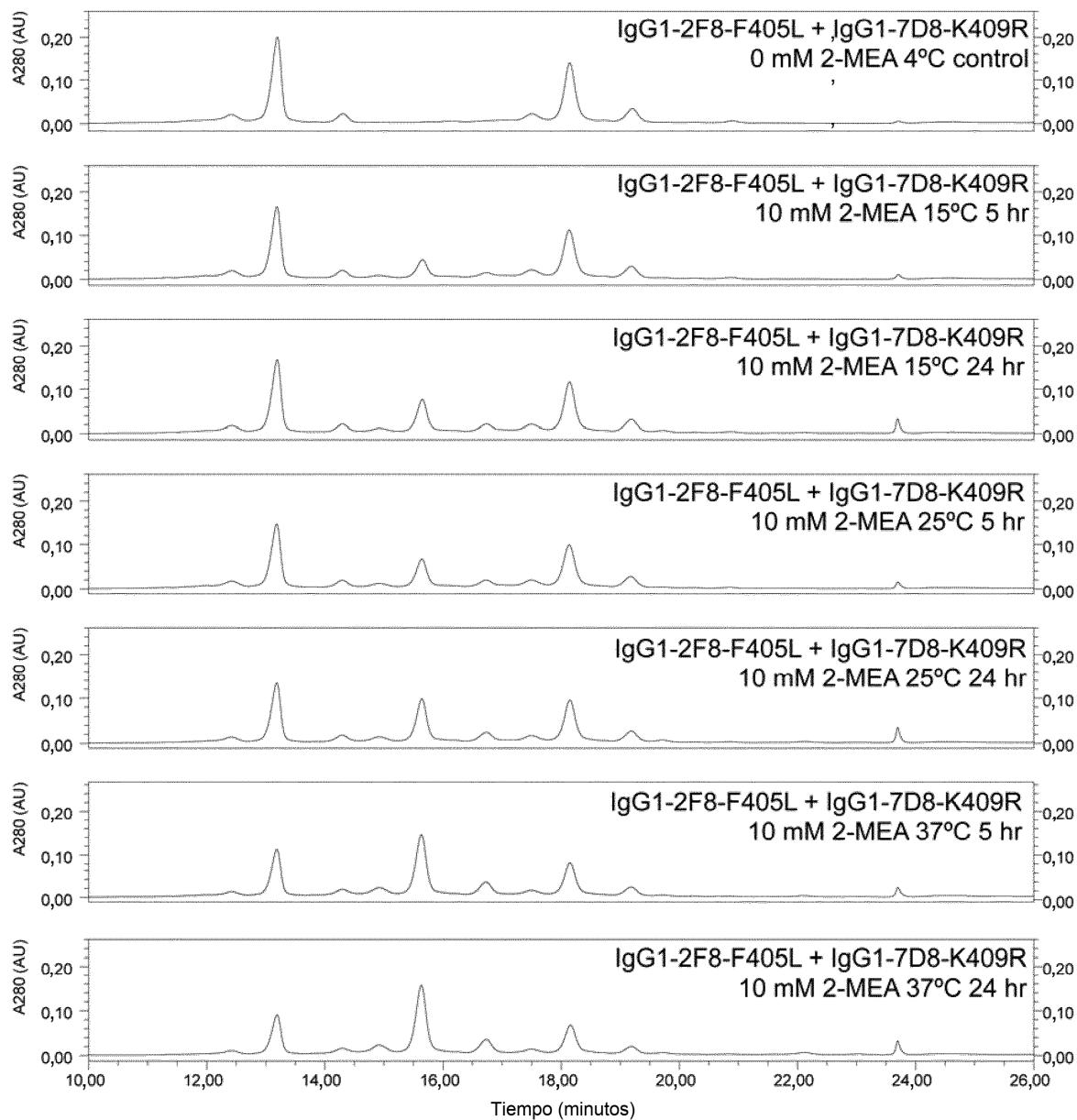
Figura 34**A**

Figura 34 (continuación)

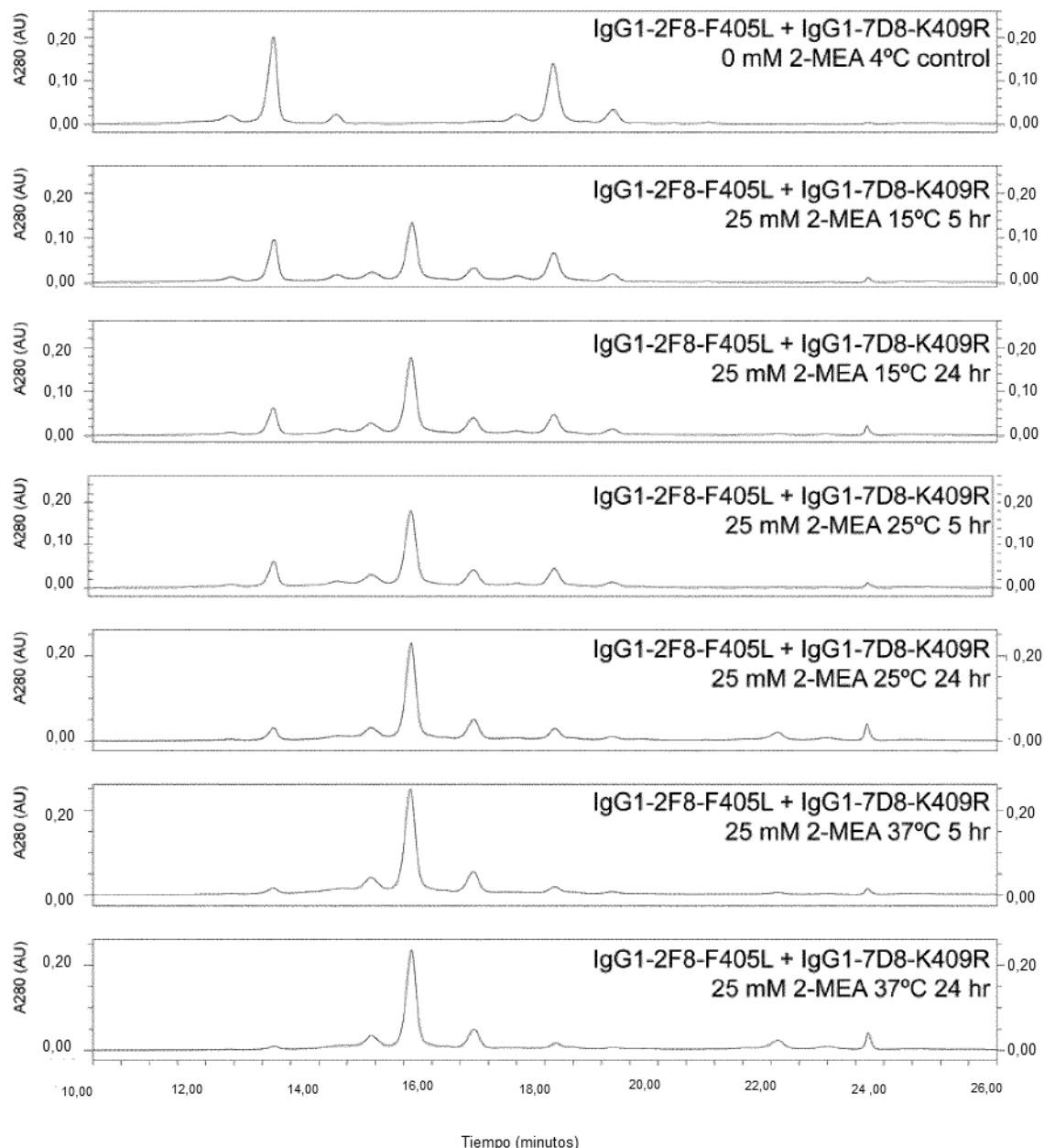
B

Figura 34 (continuación)

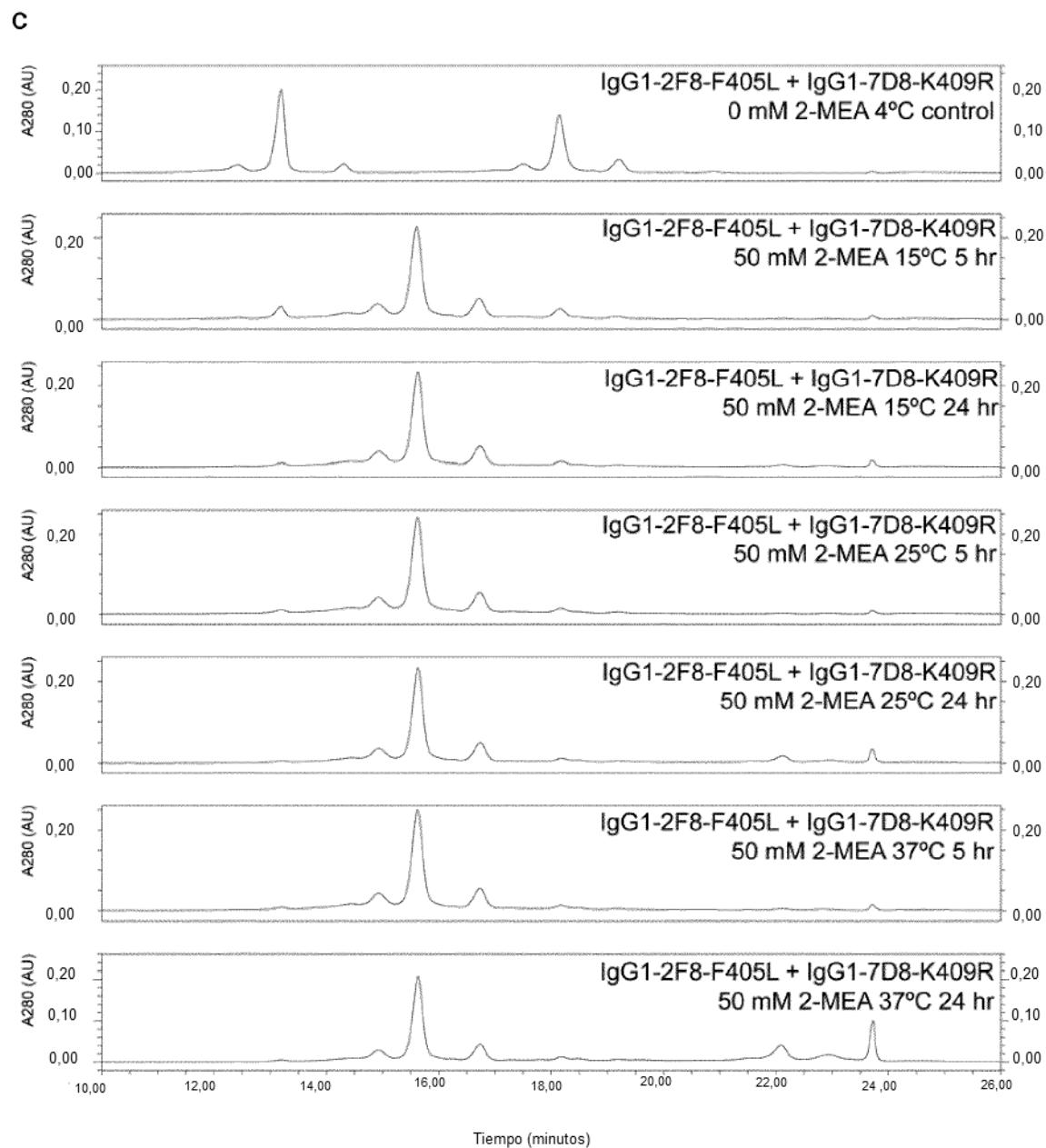


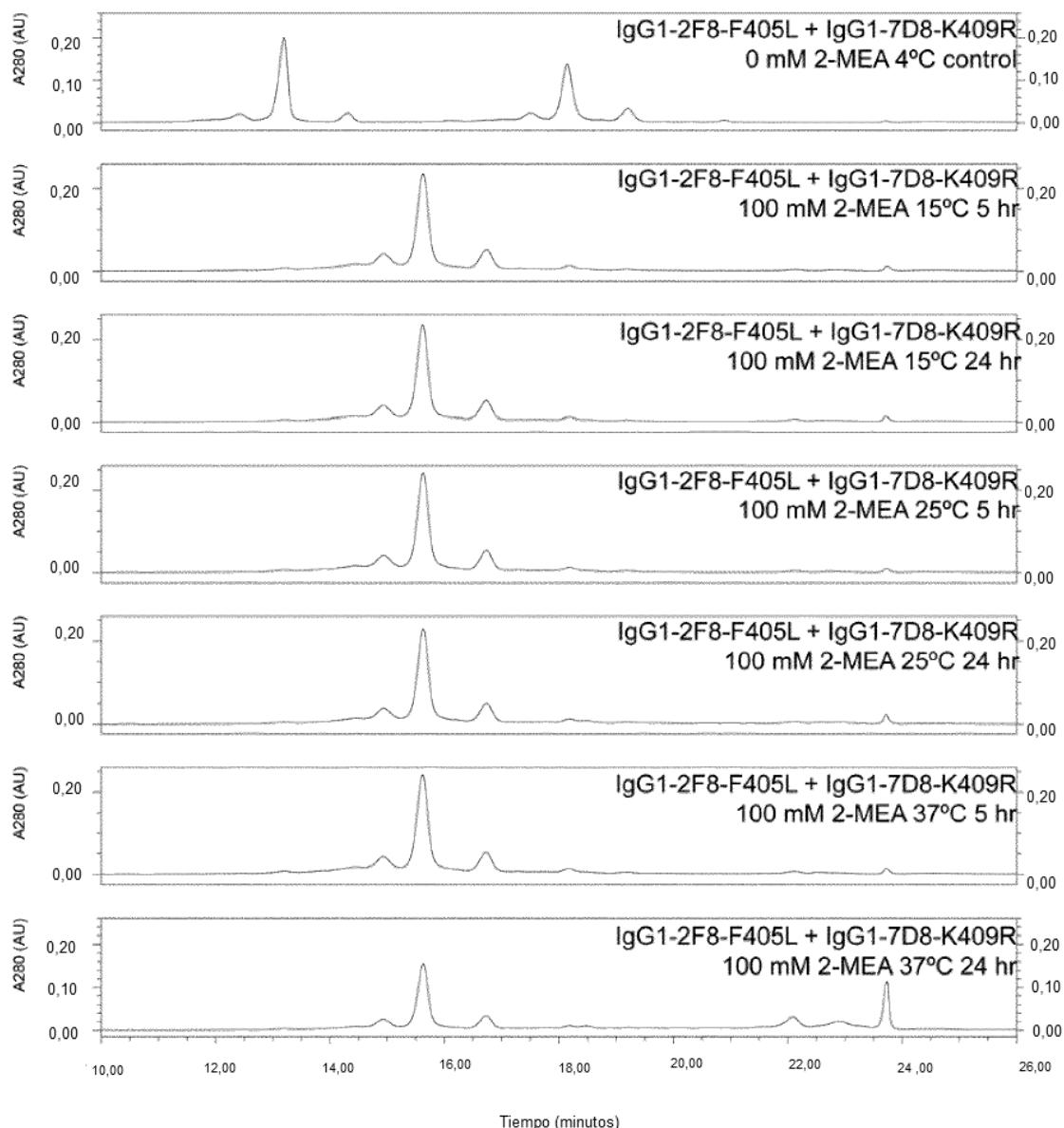
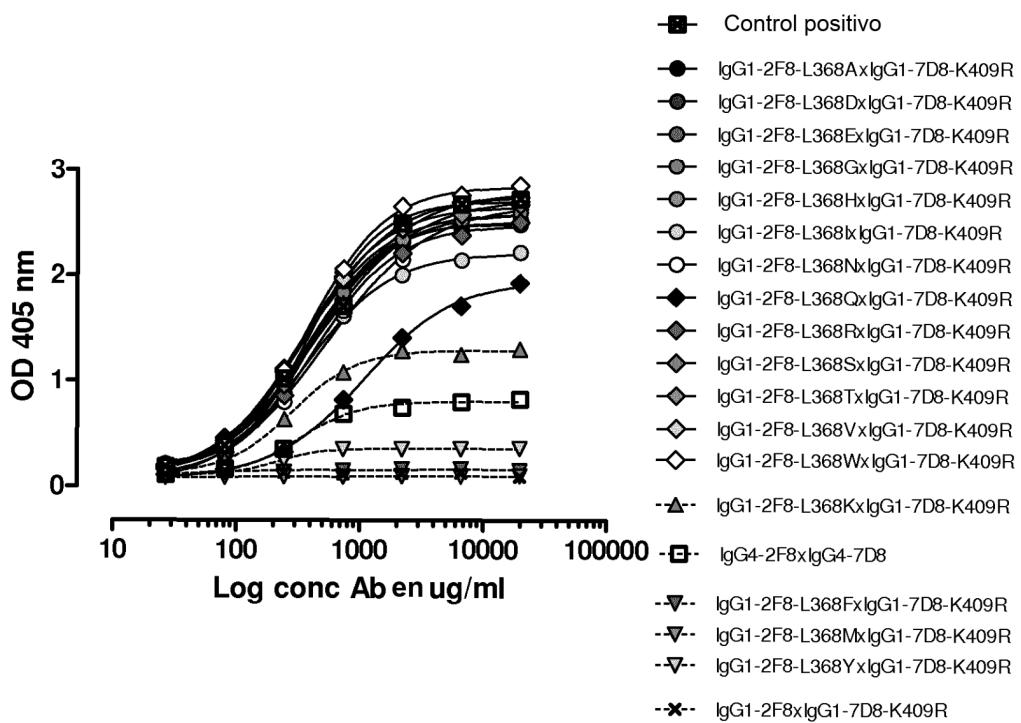
Figura 34 (continuación)**D**

Figura 35

A



B

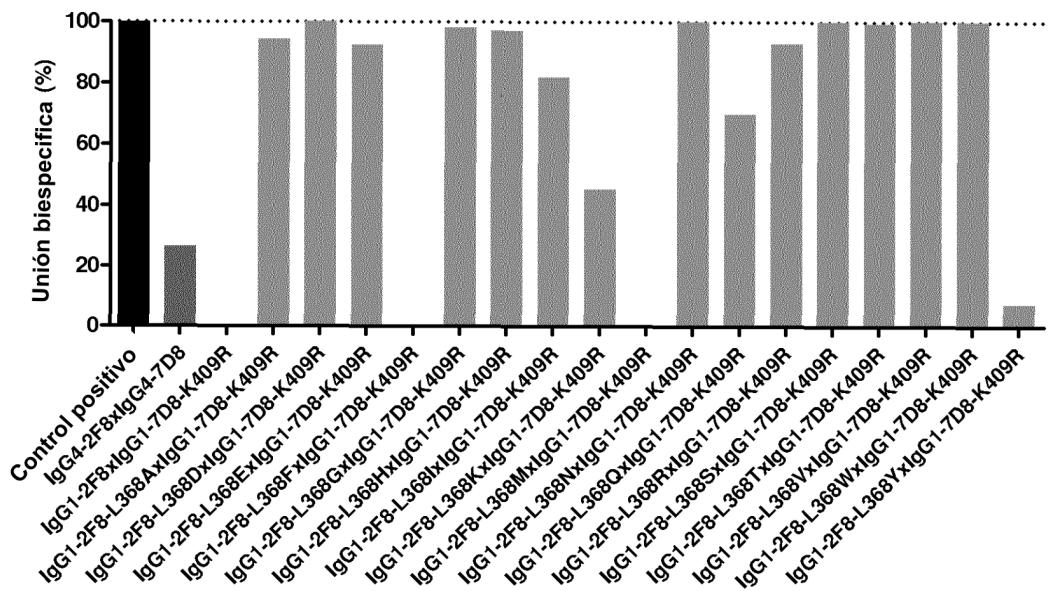


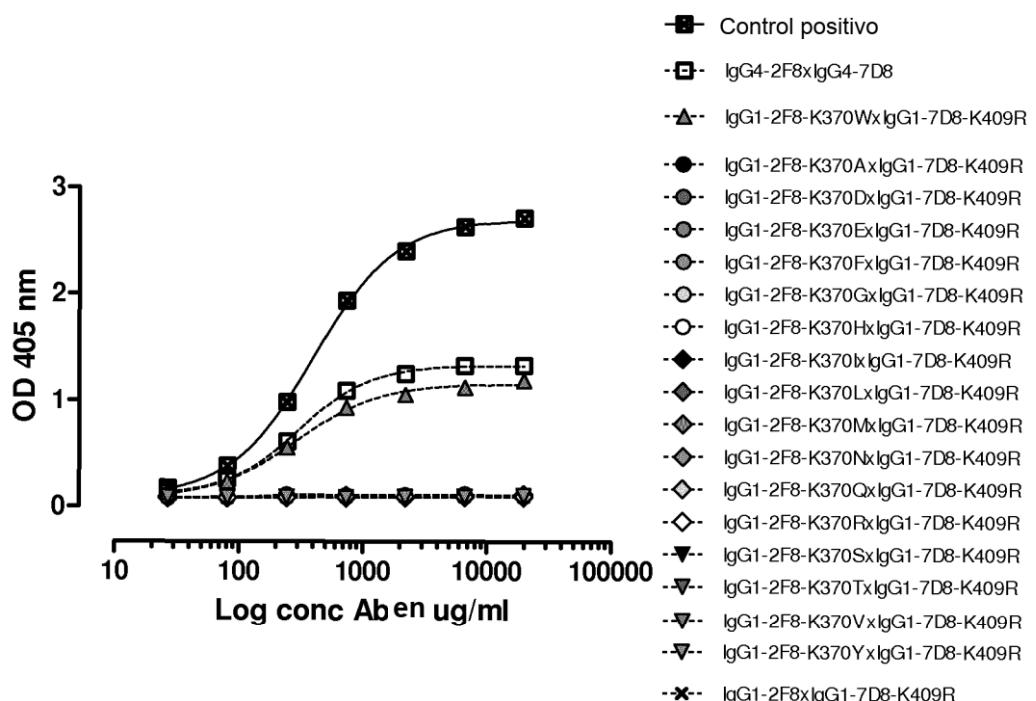
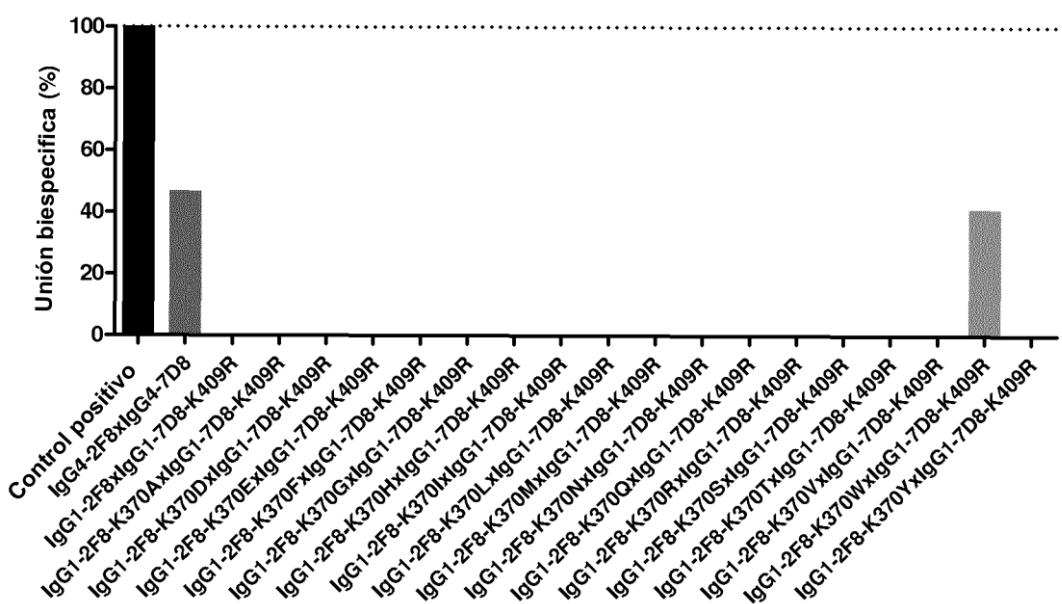
Figura 36**A****B**

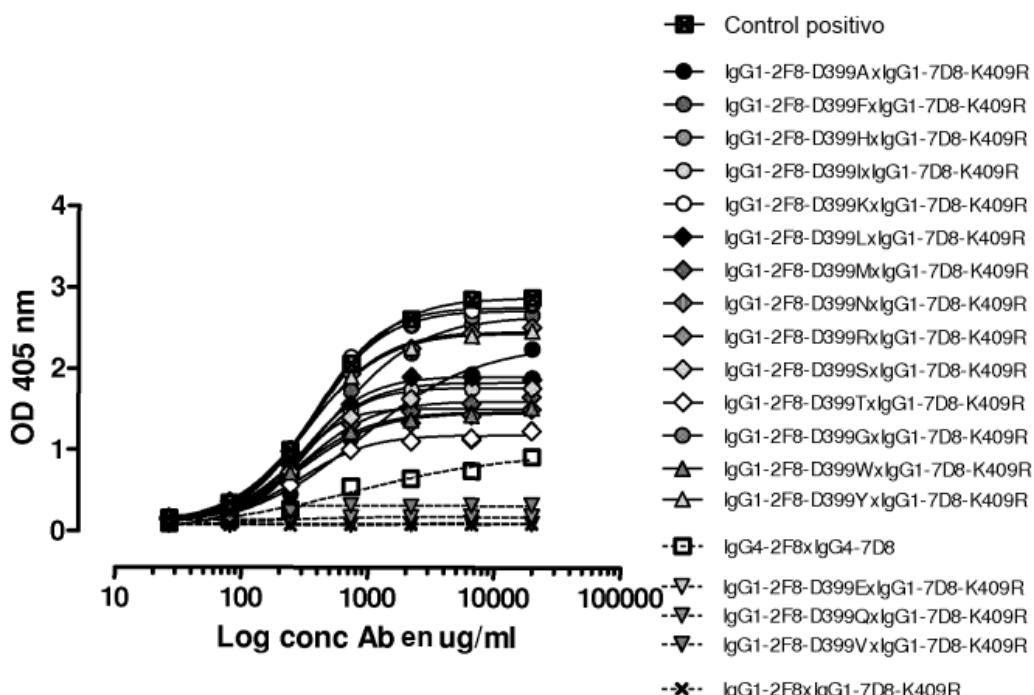
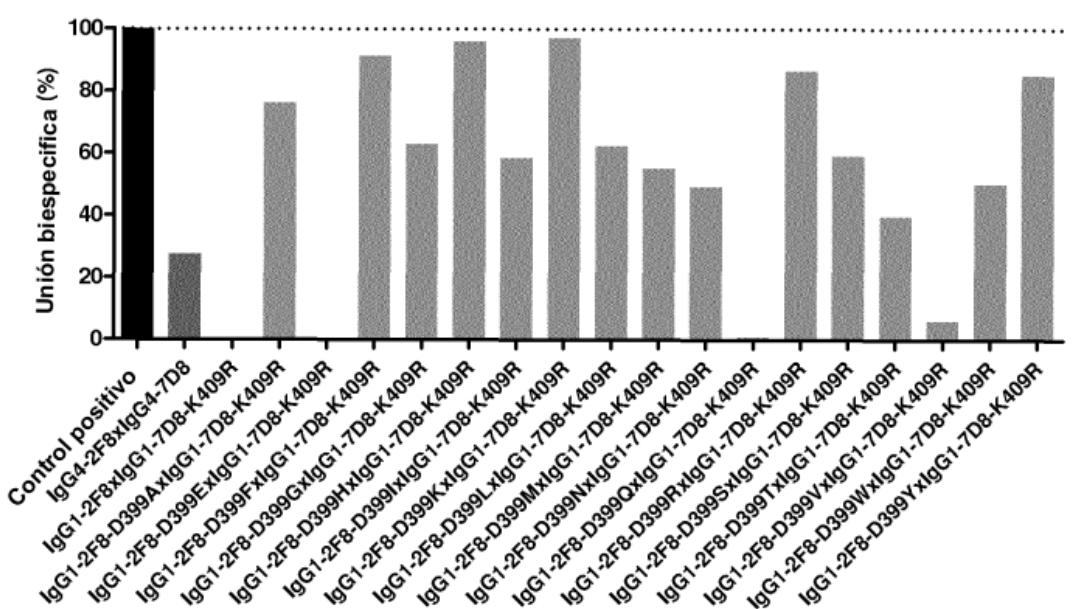
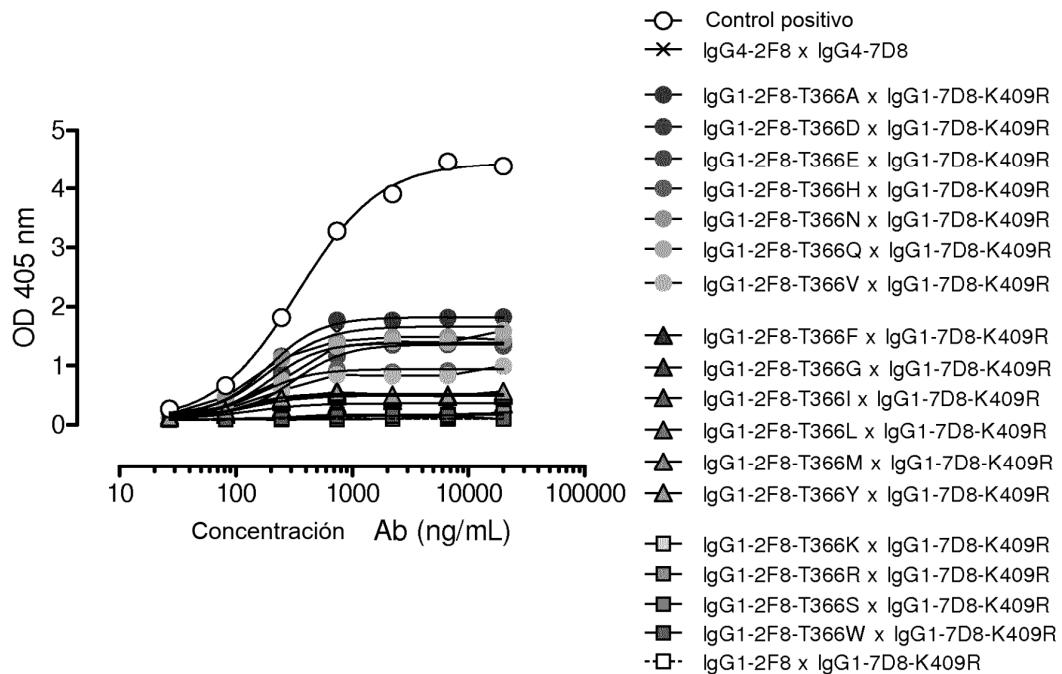
Figura 37**A****B**

Figura 38

A



B

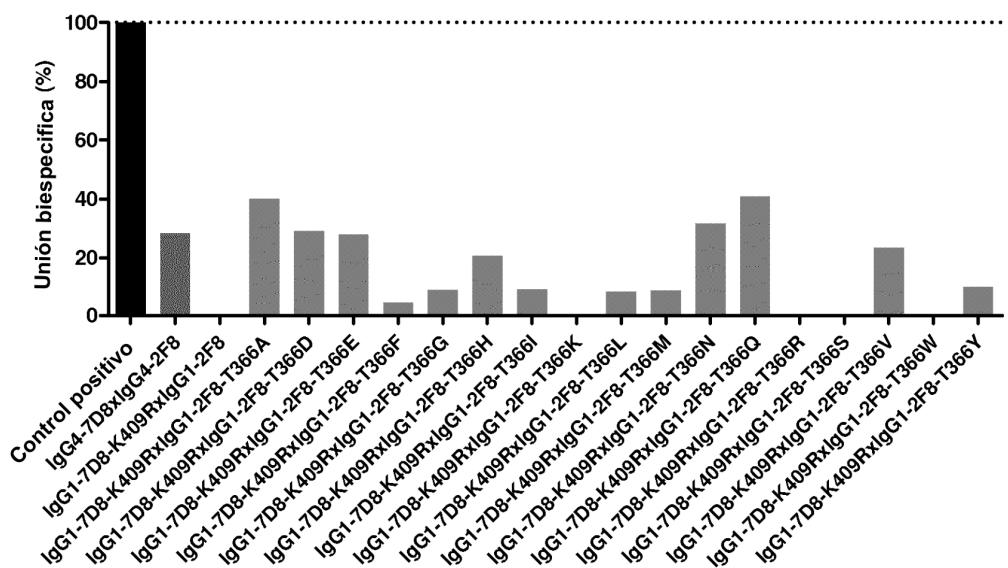


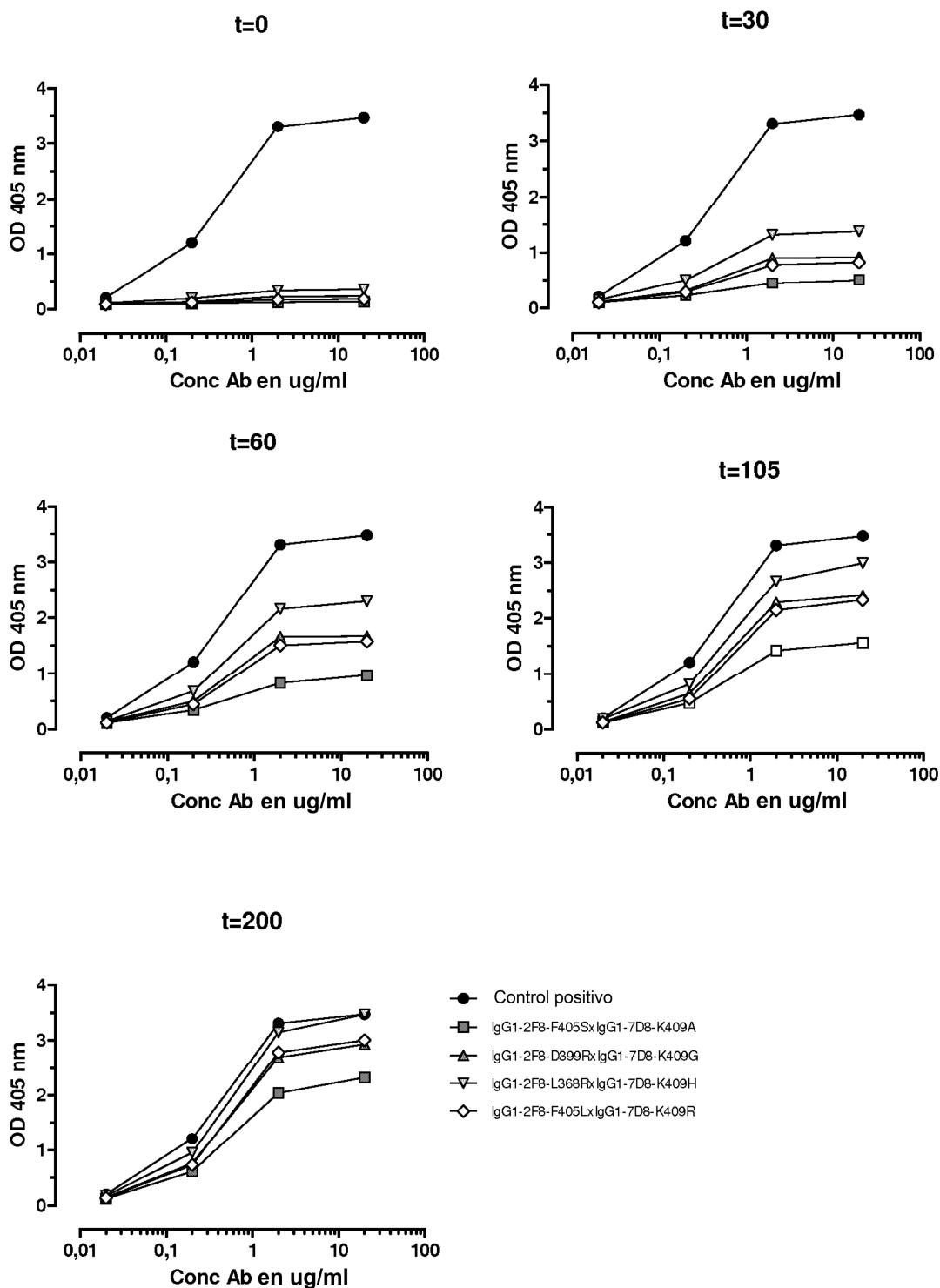
Figura 39

Figura 40

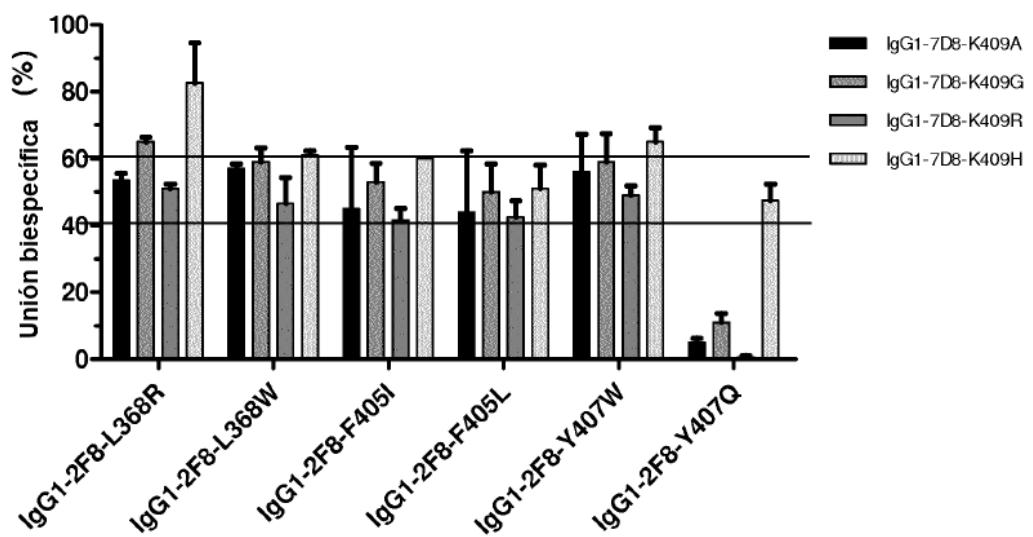


Figura 41

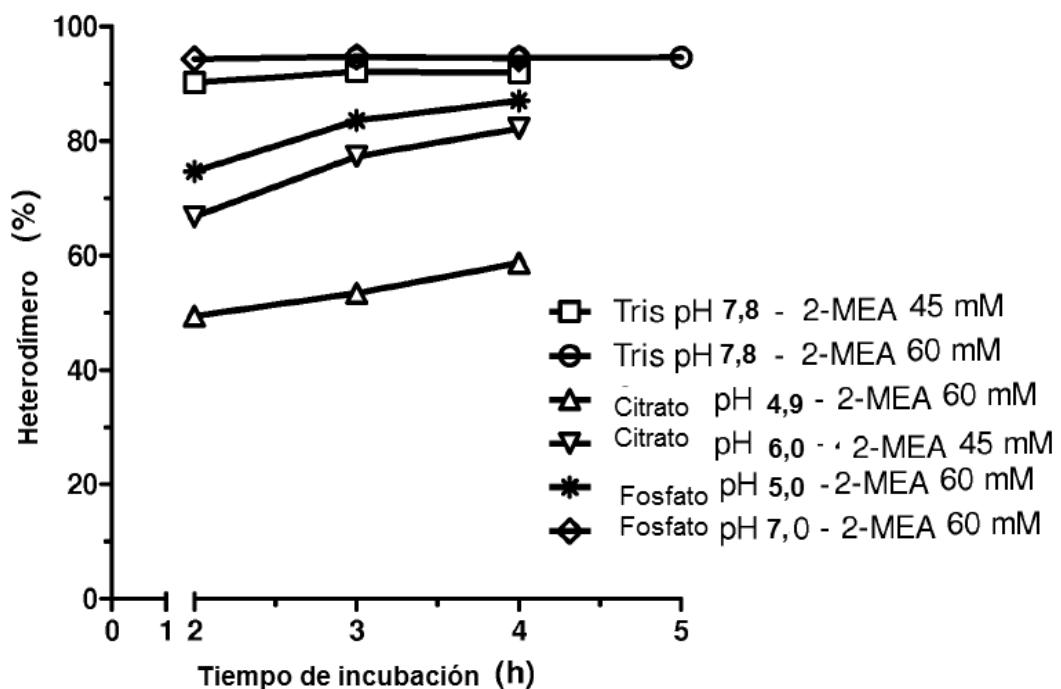


Figura 42

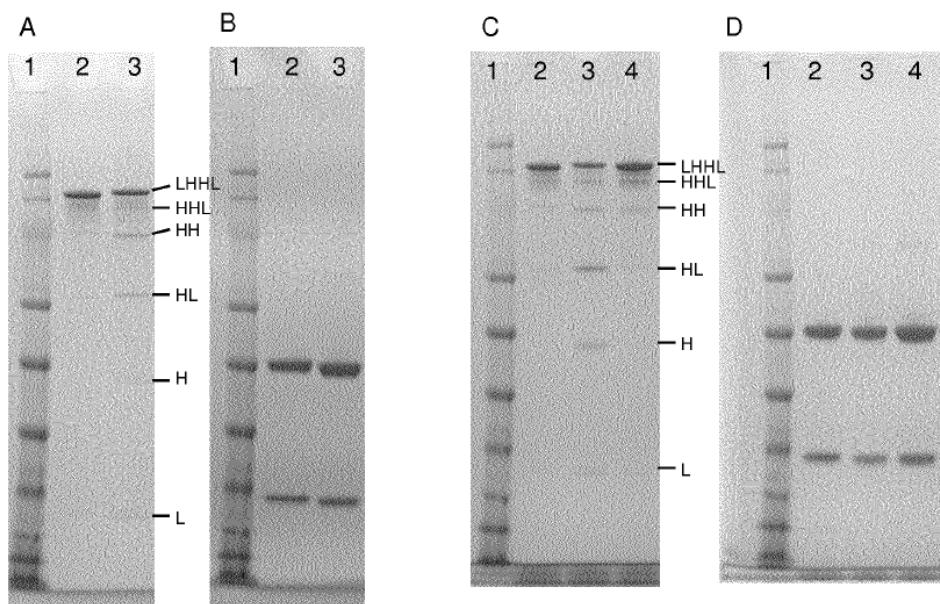


Figura 43

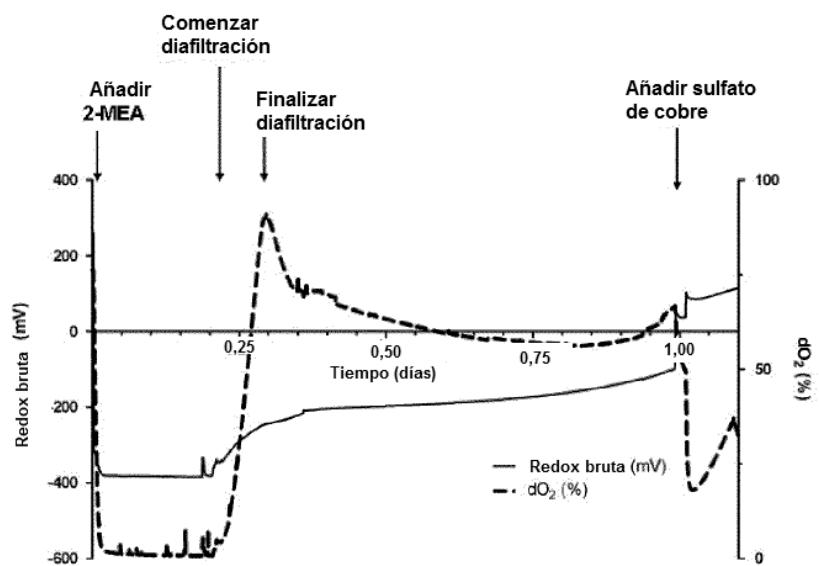


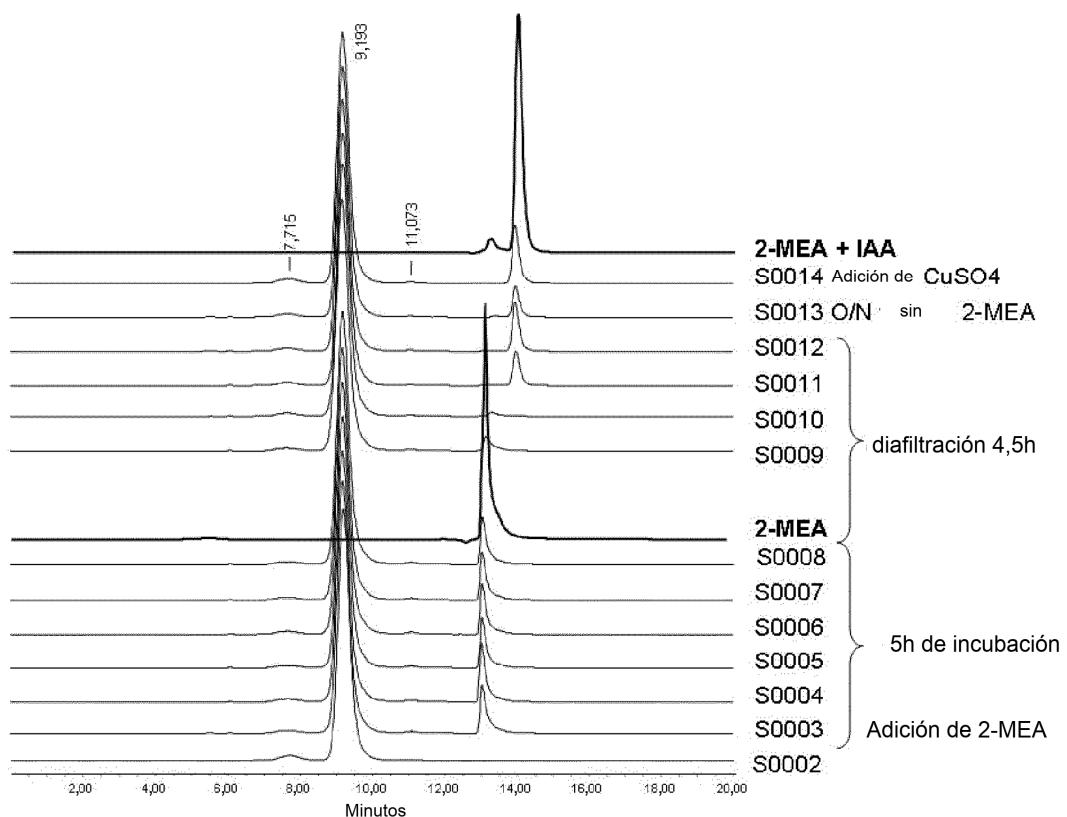
Figura 44

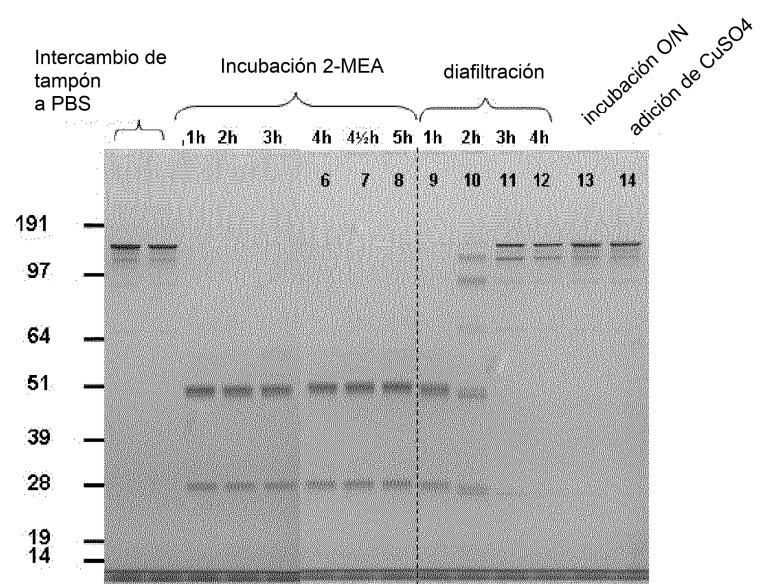
Figura 45

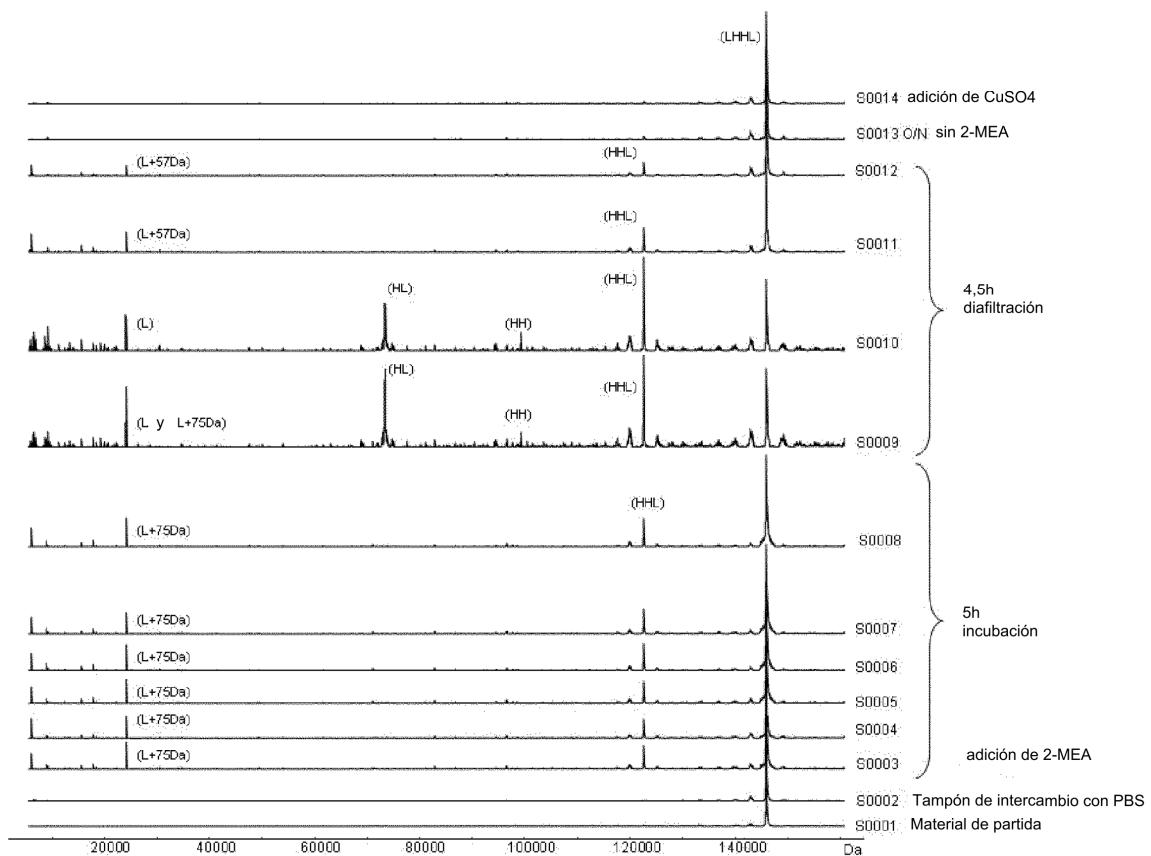
Figura 46

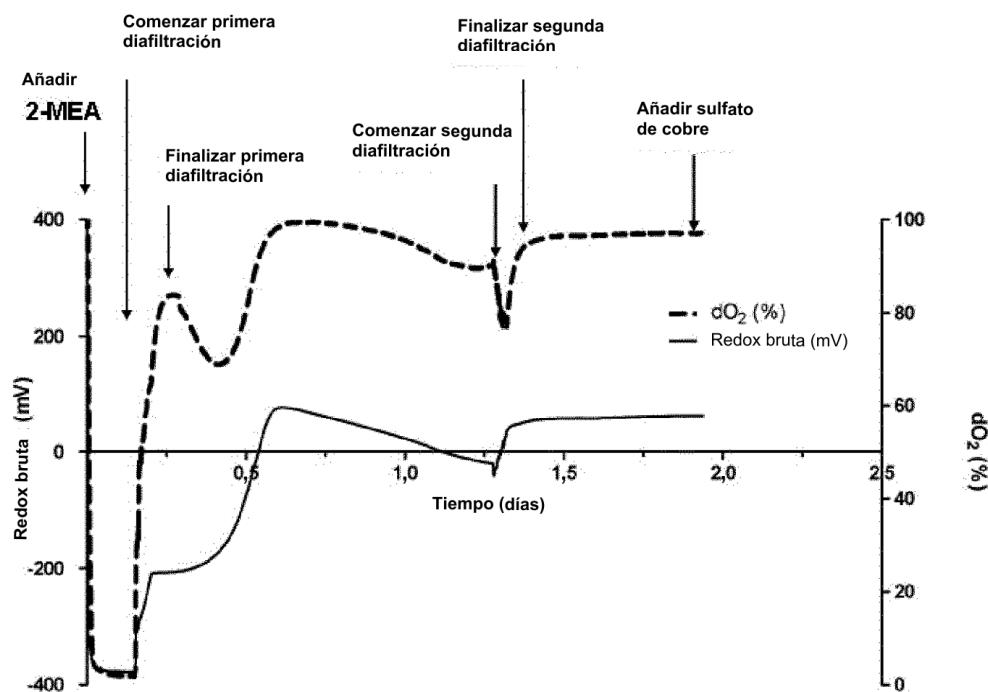
Figura 47

Figura 48

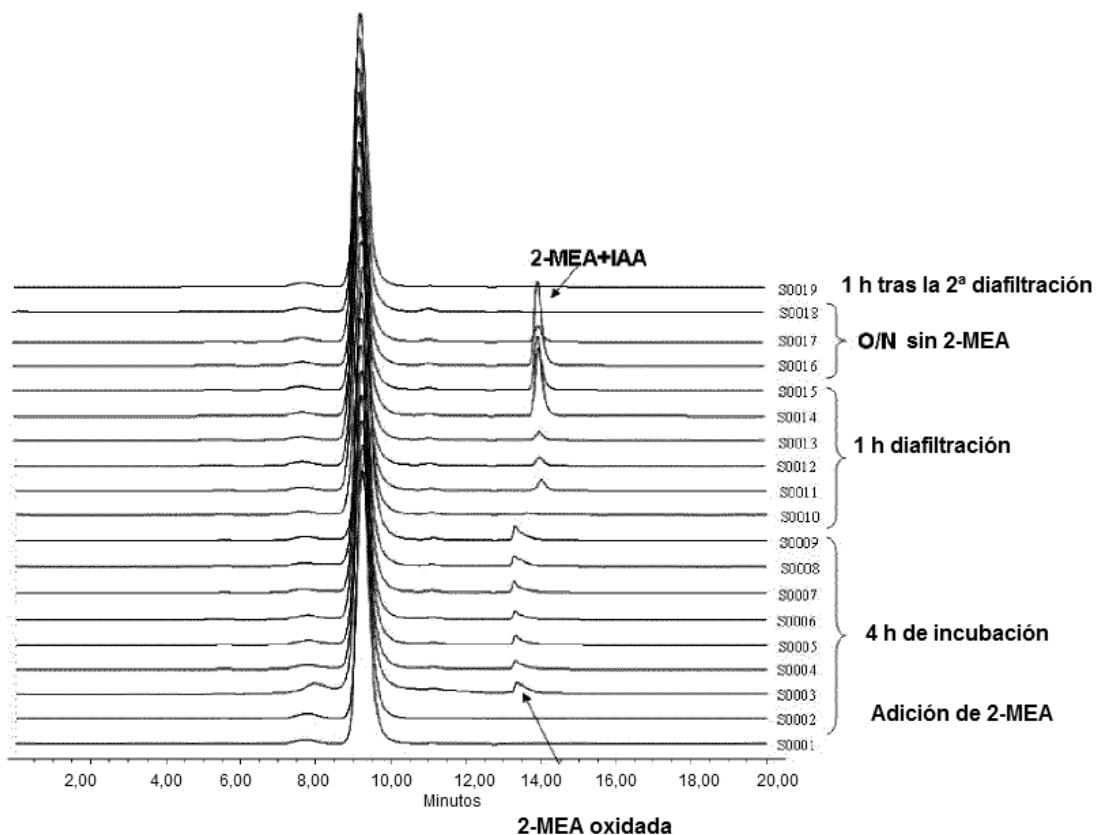


Figura 49

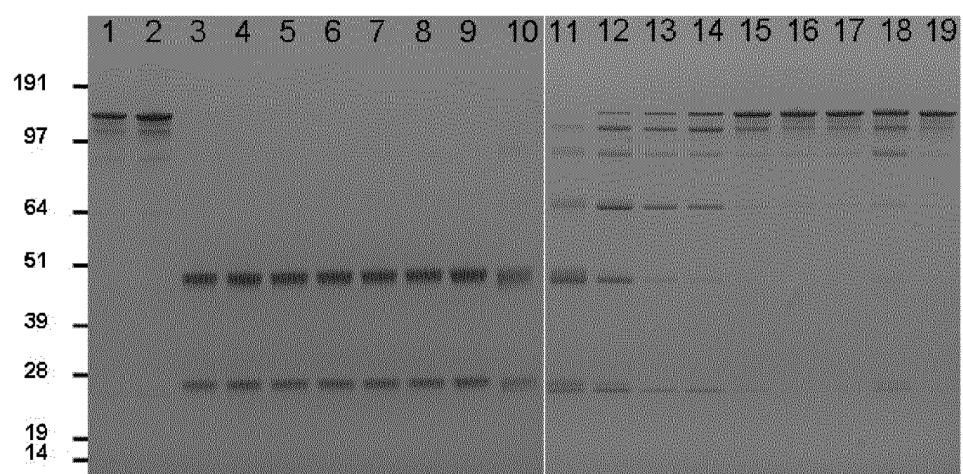


Figura 50

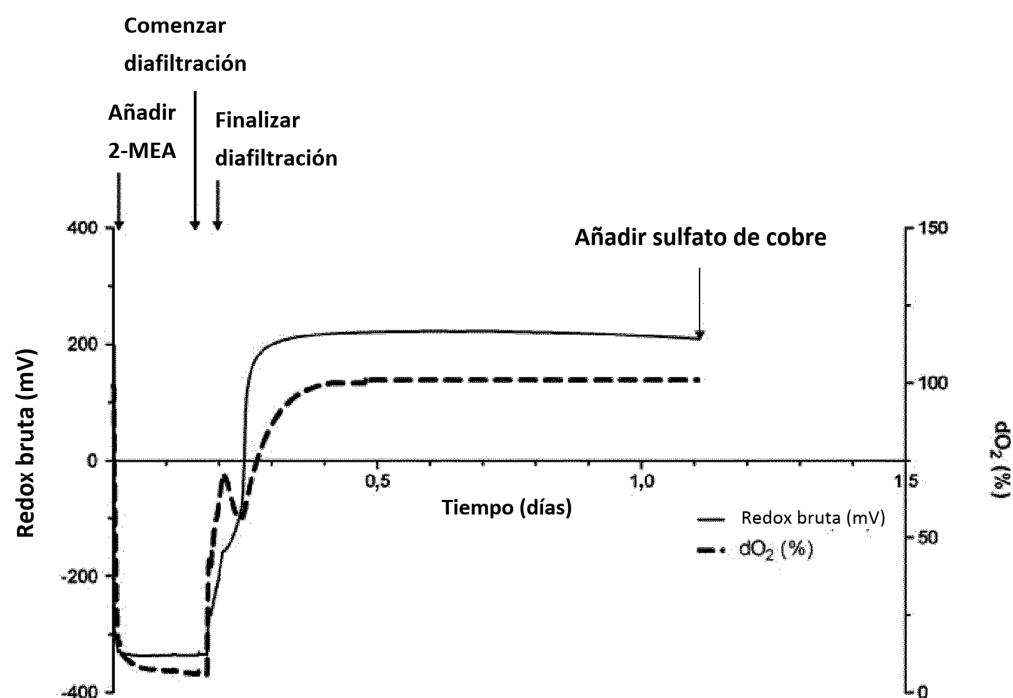


Figura 51

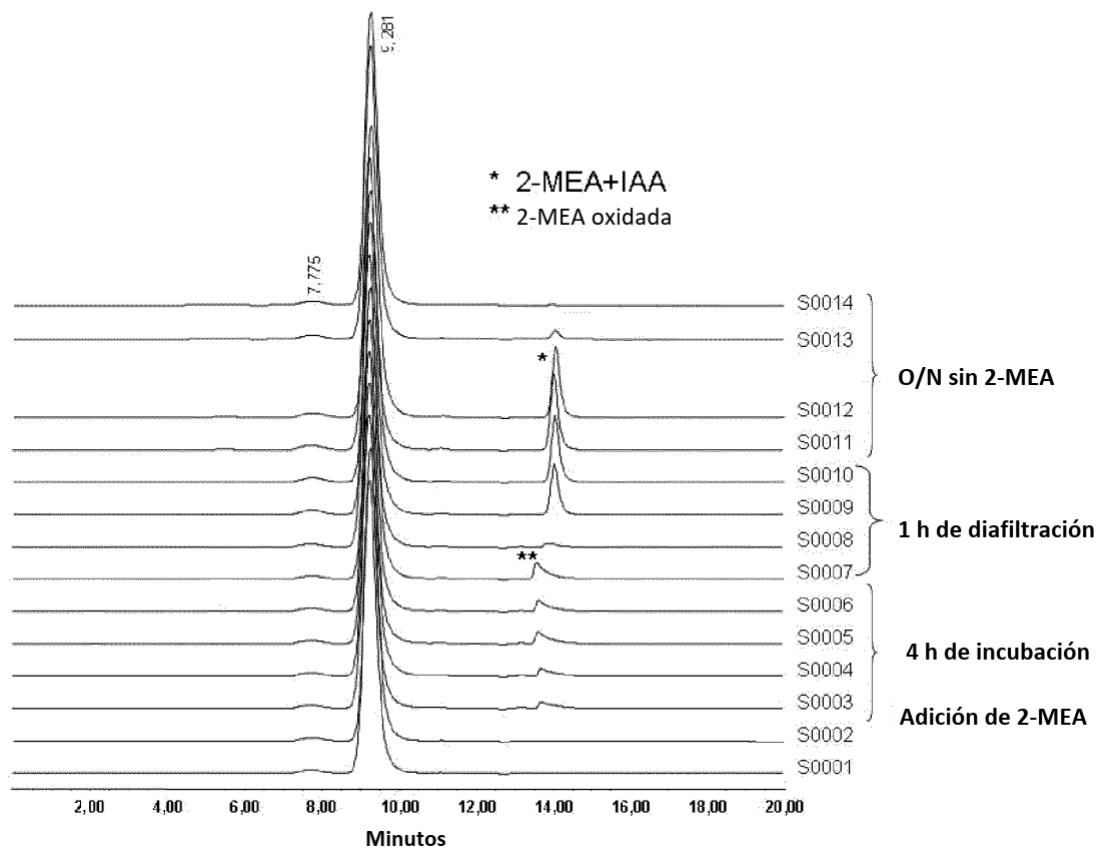


Figura 52

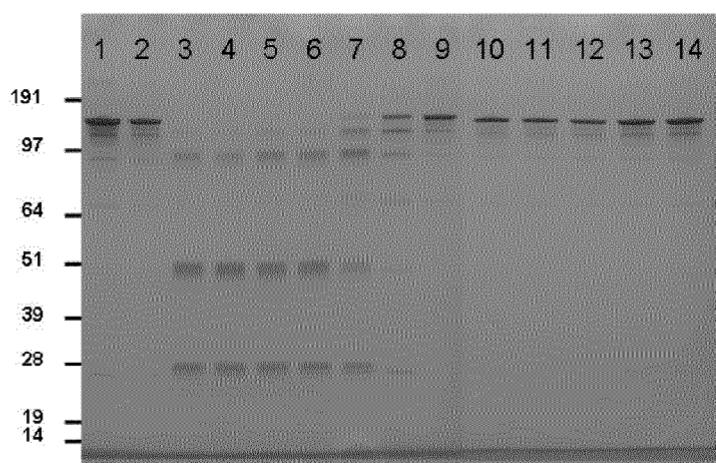
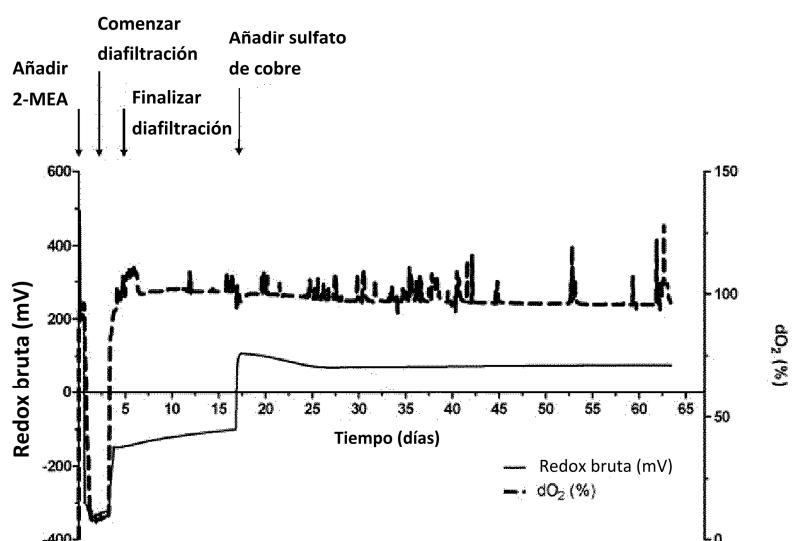


Figura 53

A)



B)

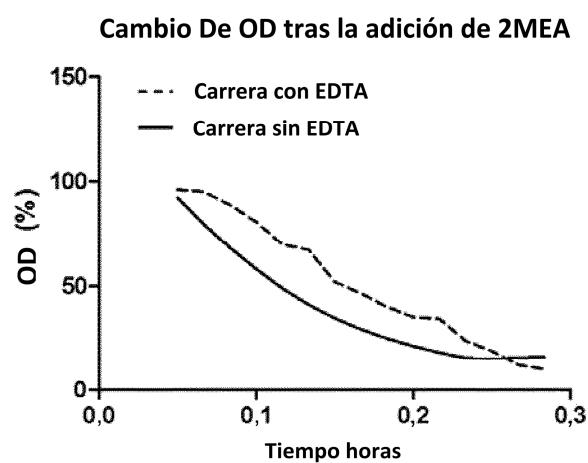


Figura 54

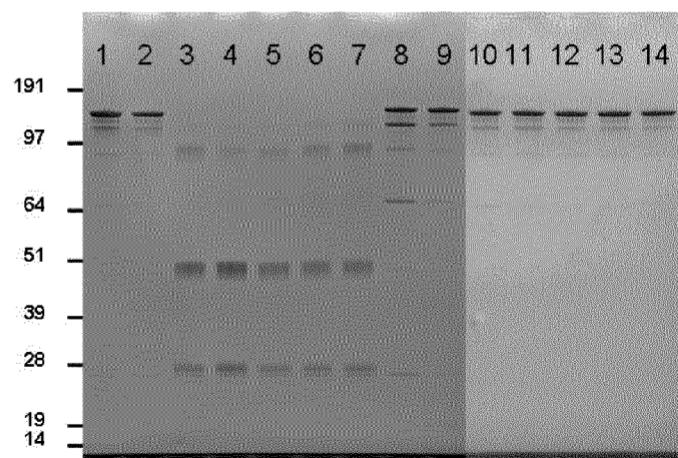


Figura 55

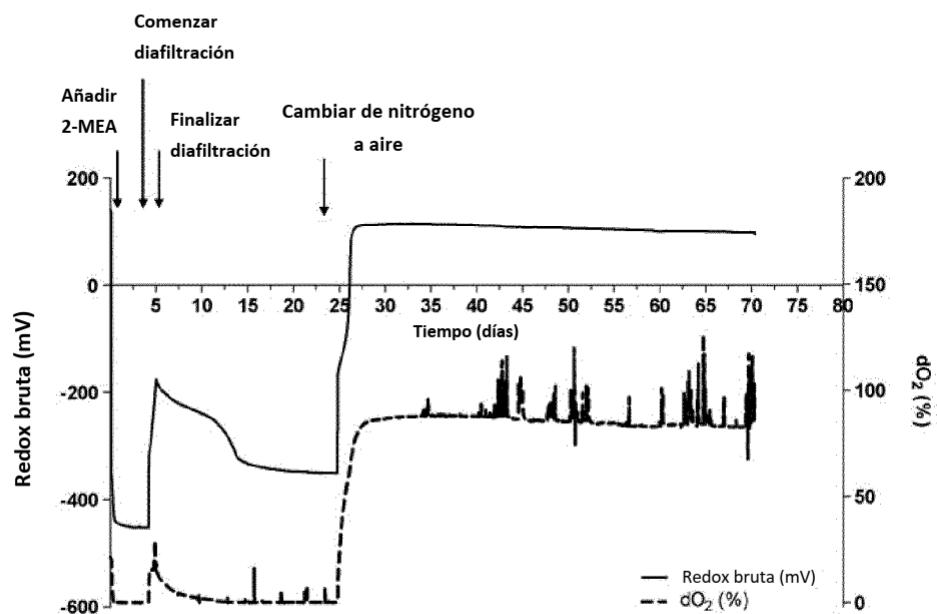


Figura 56

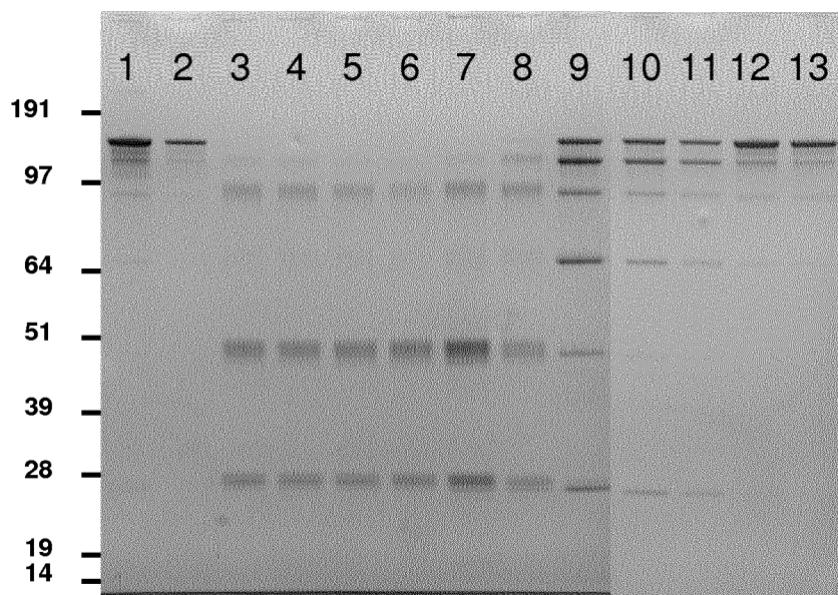


Figura 57

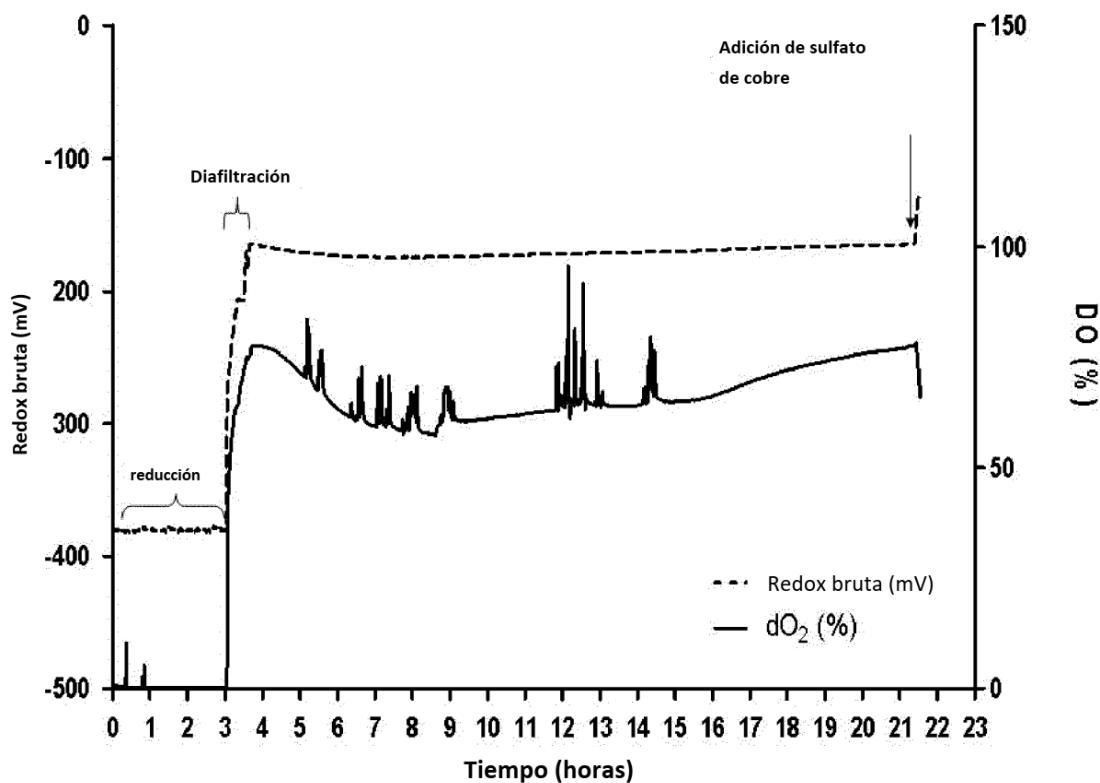


Figura 58

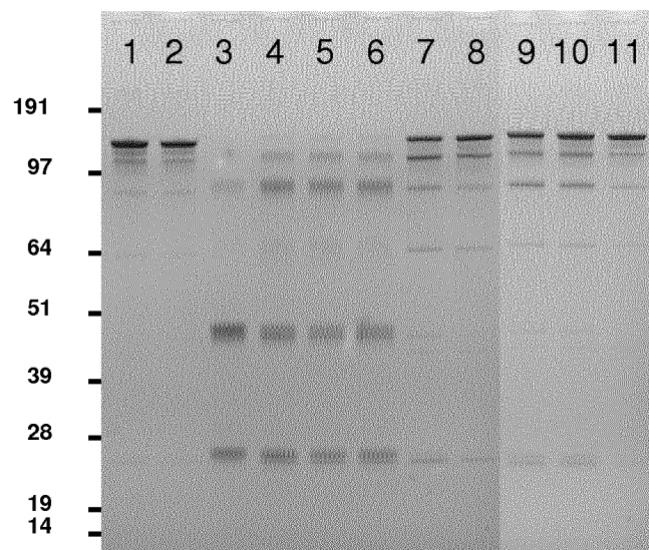


Figura 59

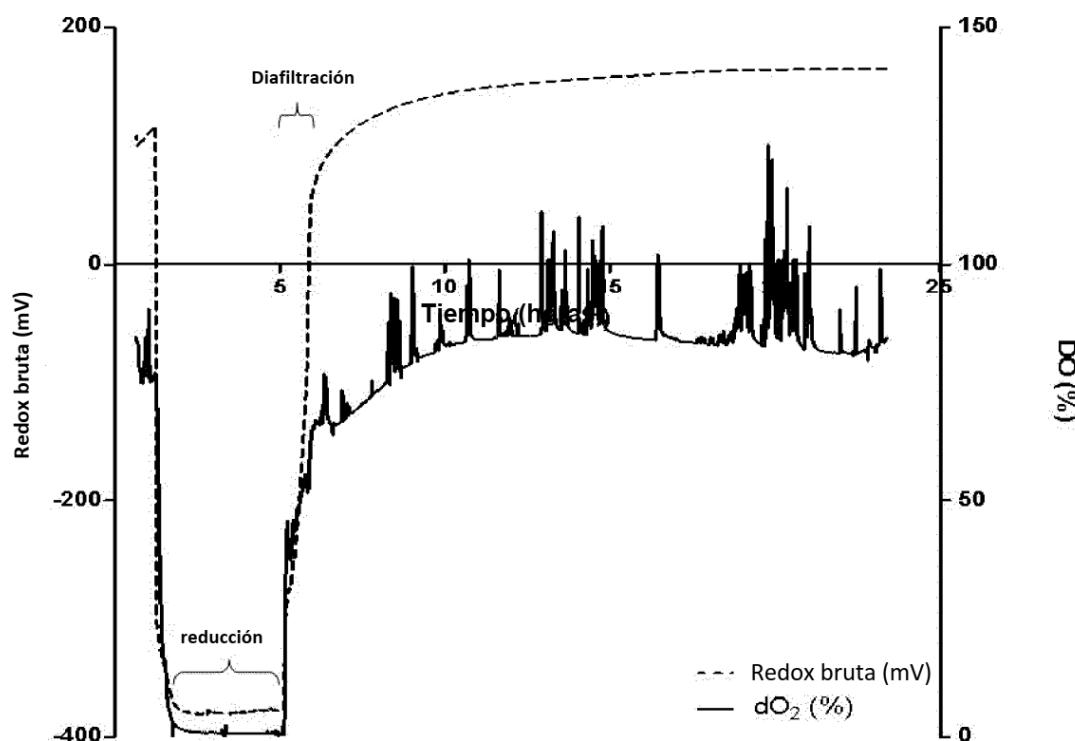


Figura 60

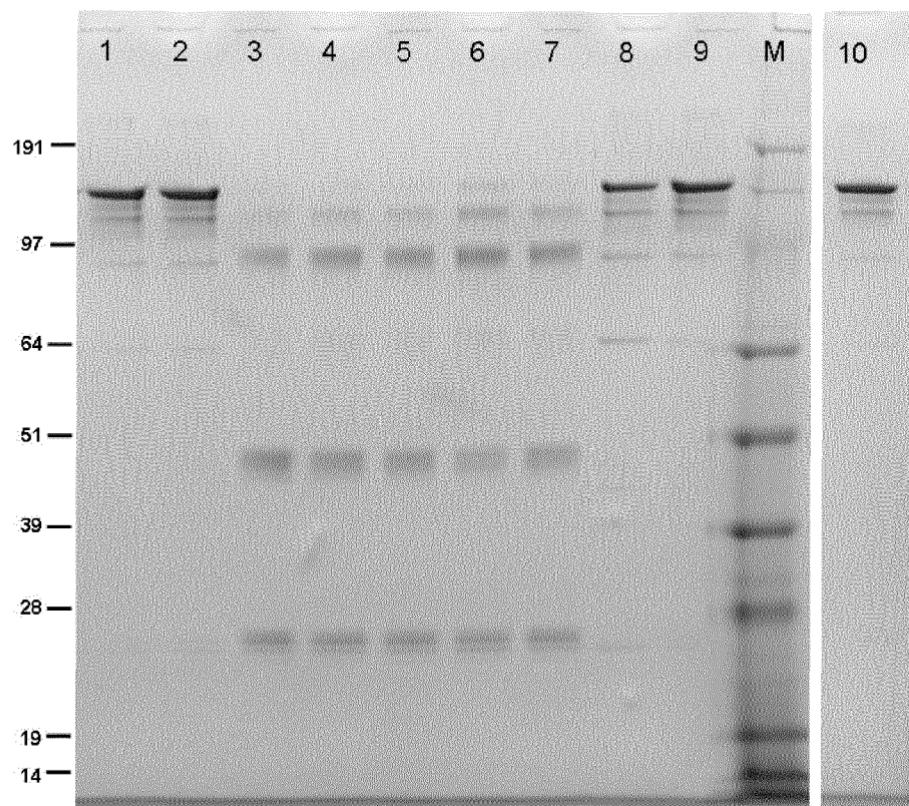


Figura 61

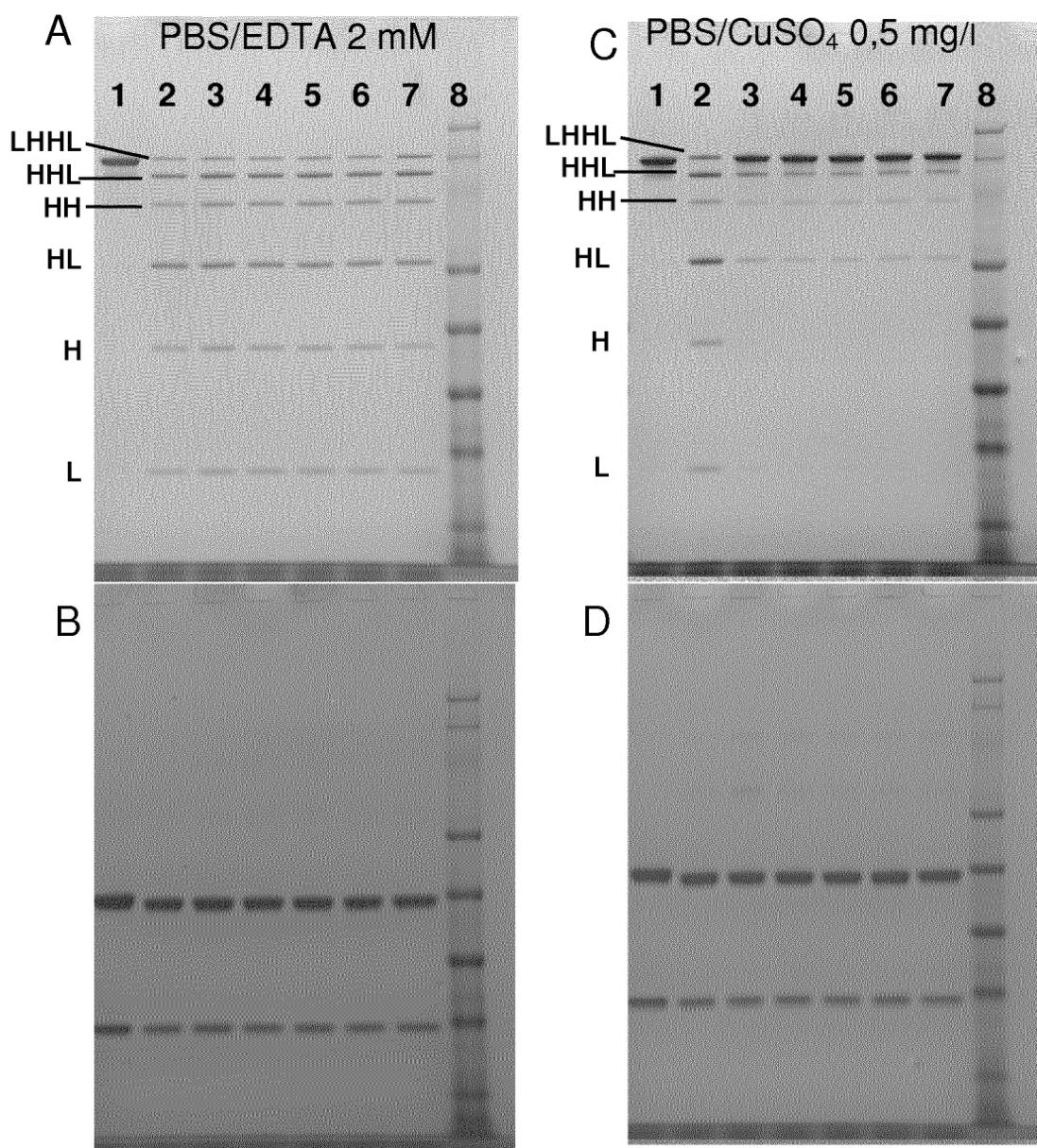


Figura 62

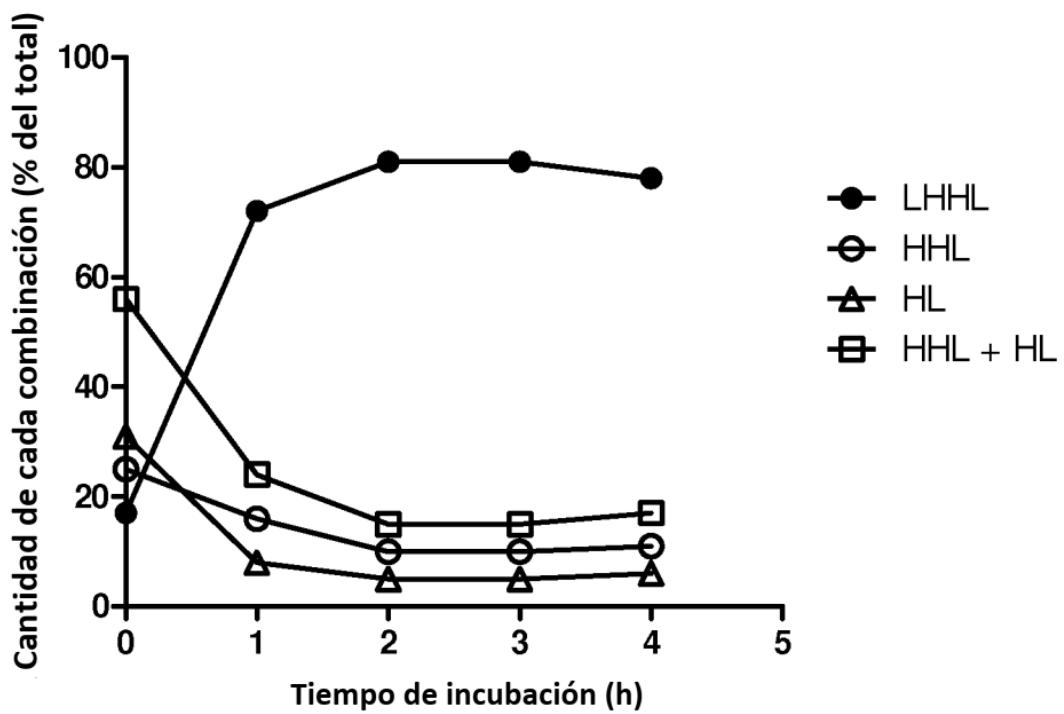


Figura 63

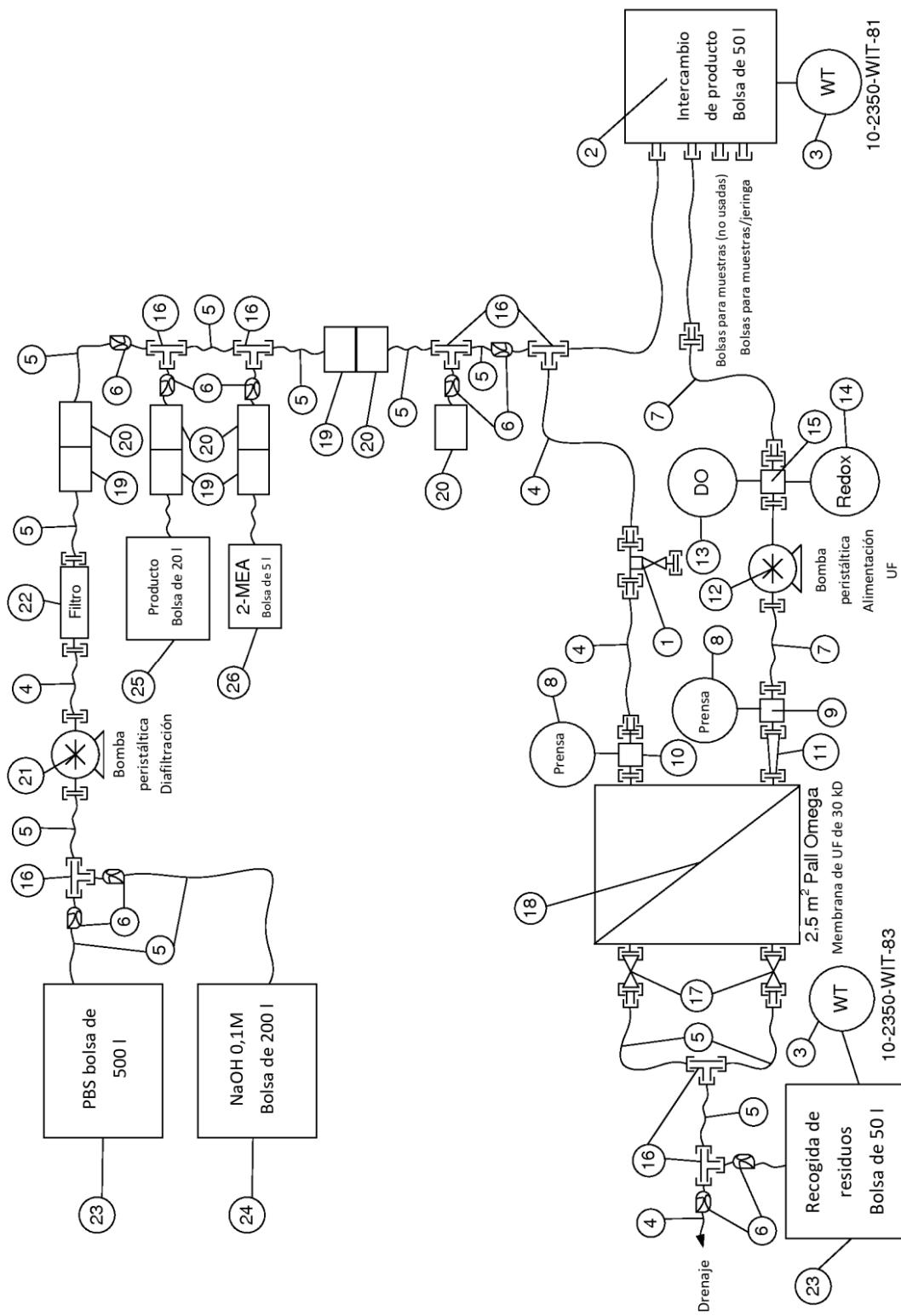


Figura 64

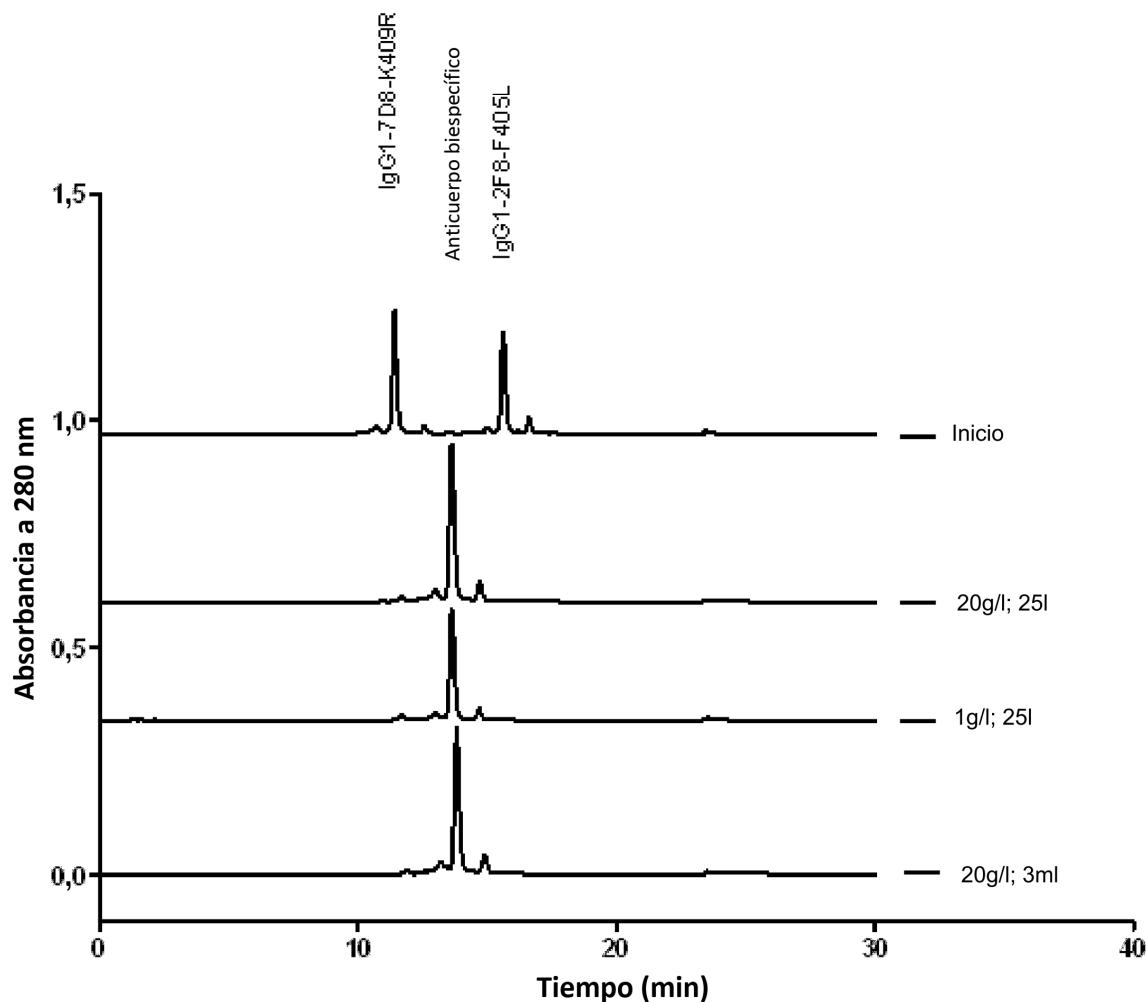


Figura 65

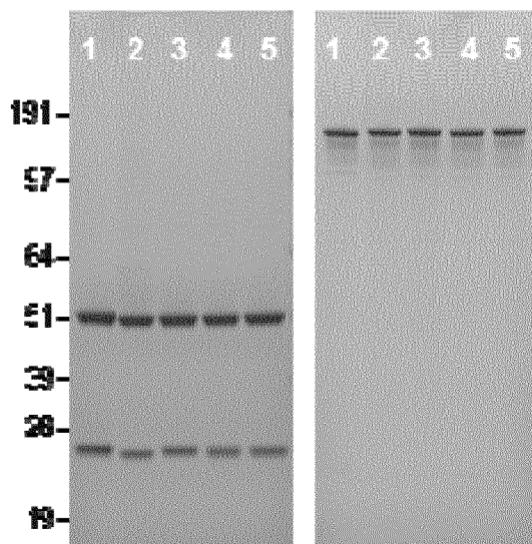


Figura 66

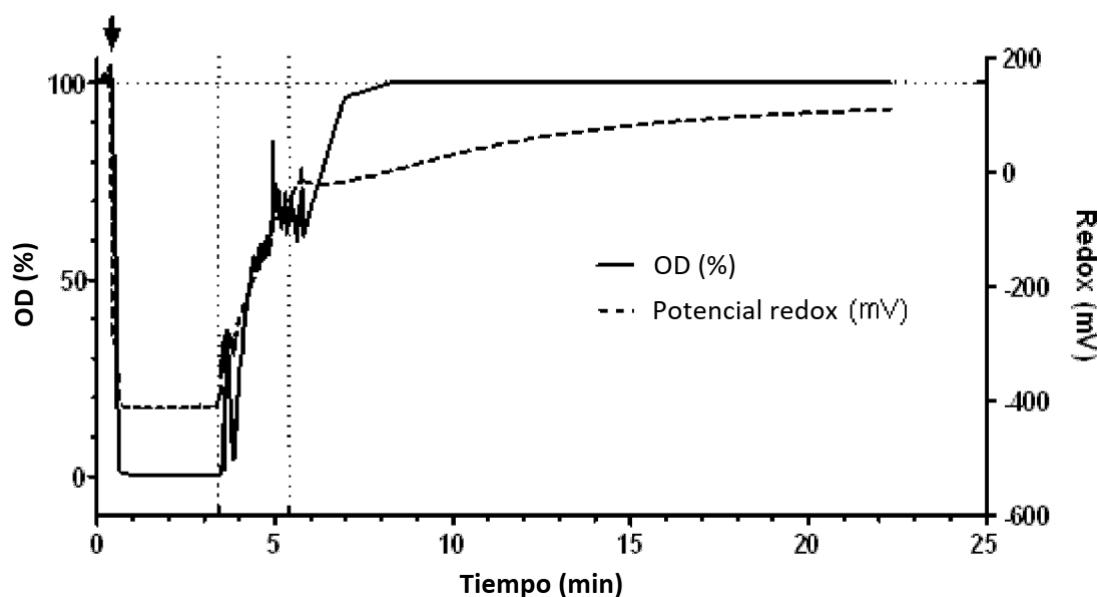


Figura 67

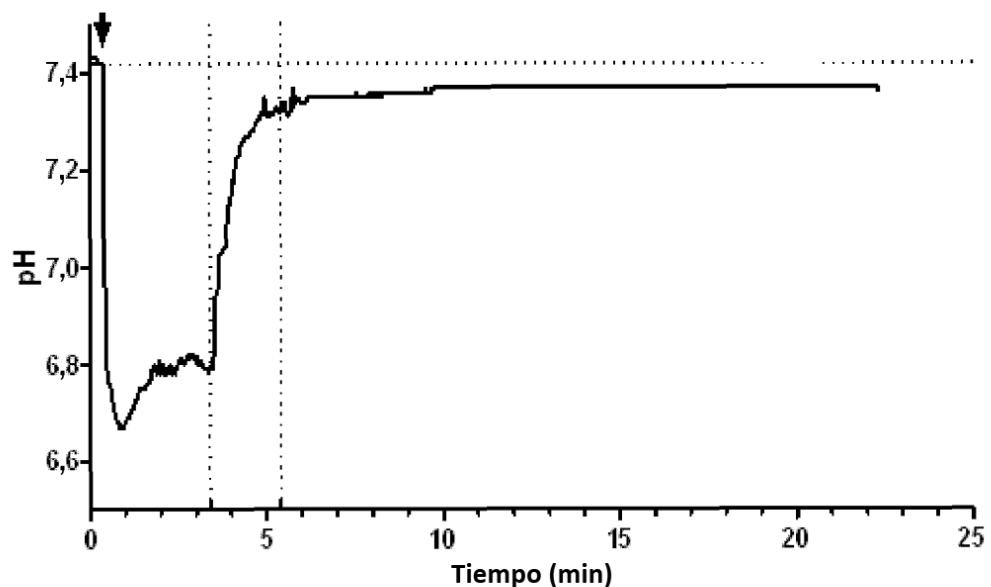


Figura 68

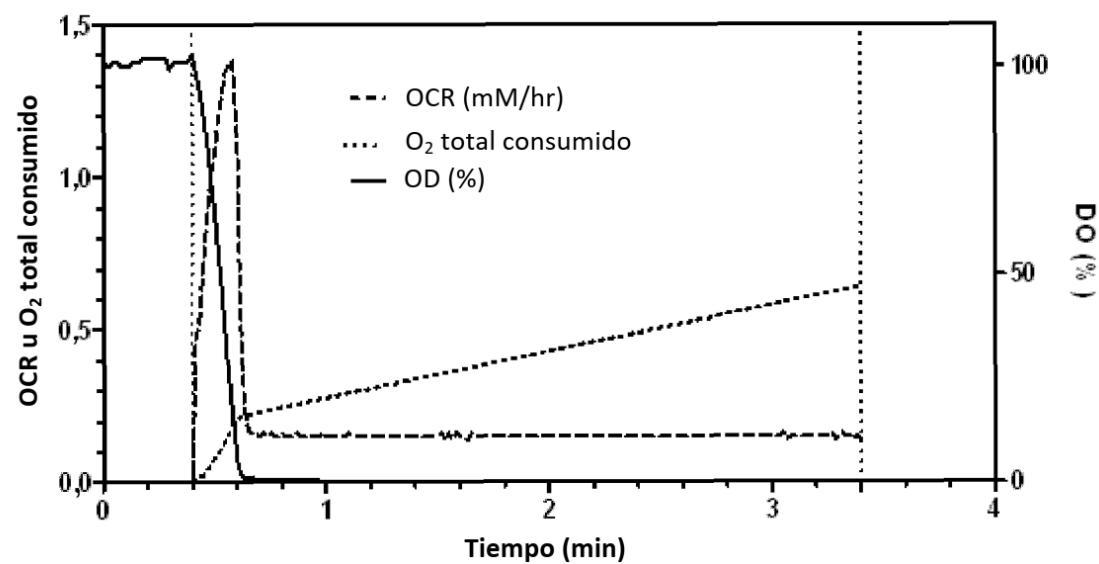


Figura 69

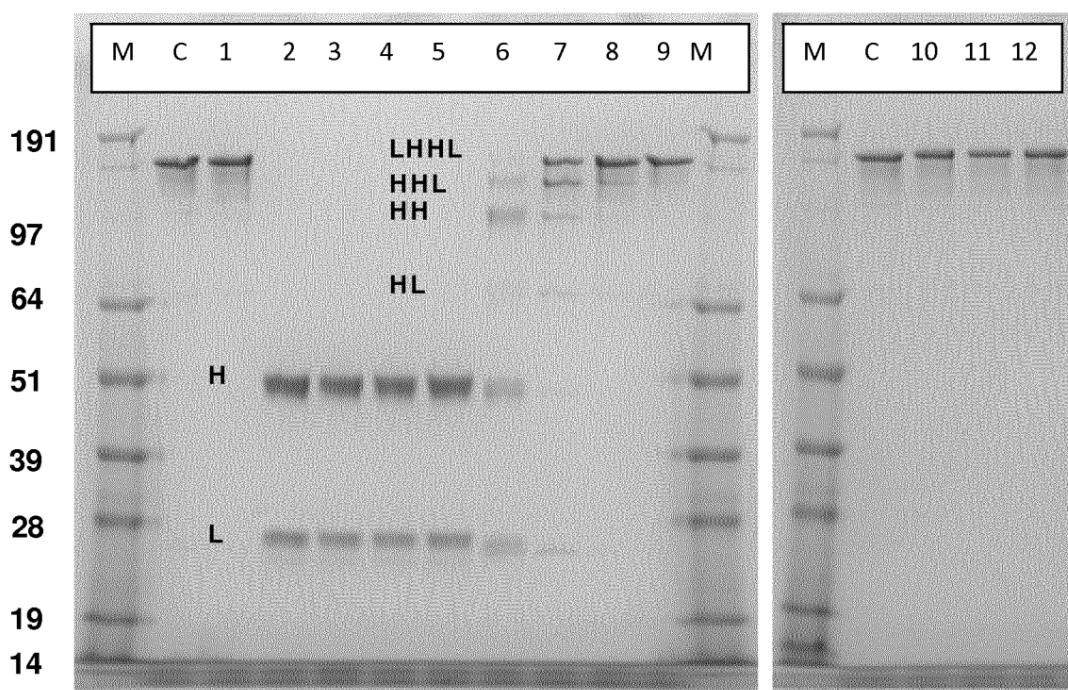


Figura 70

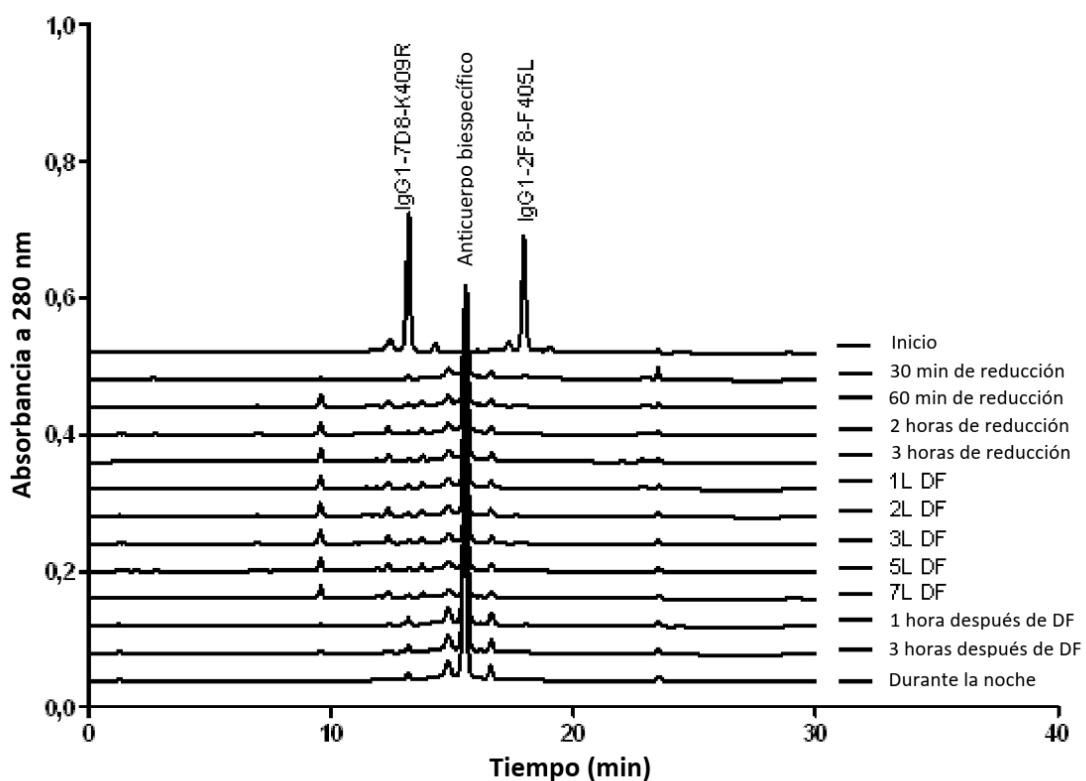


Figura 71

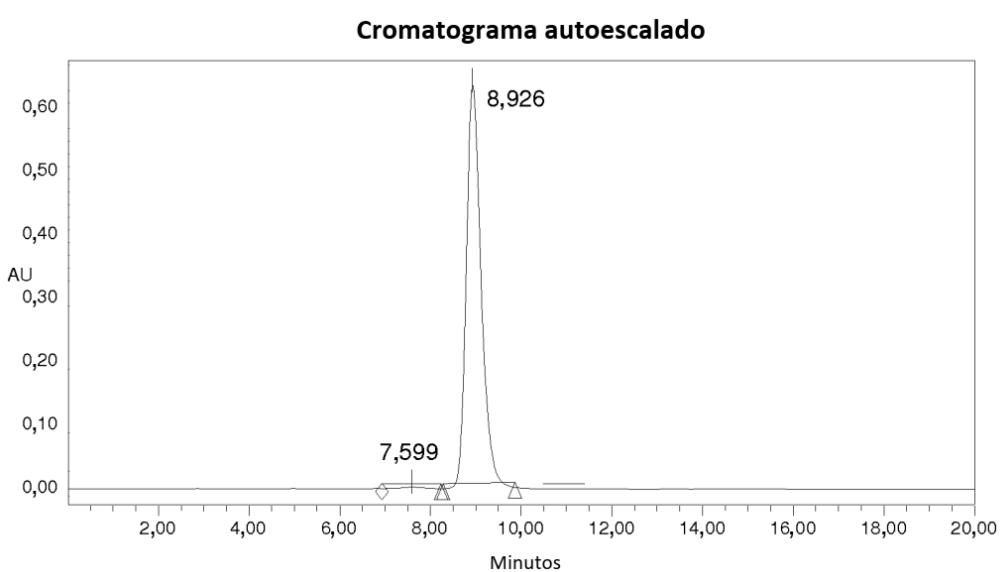


Figura 72

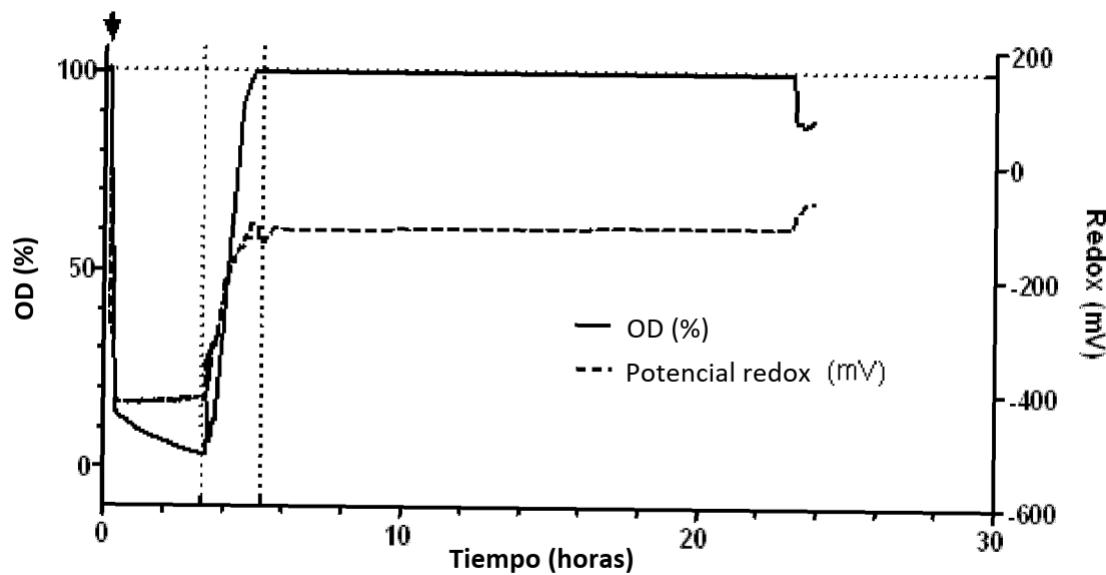


Figura 73

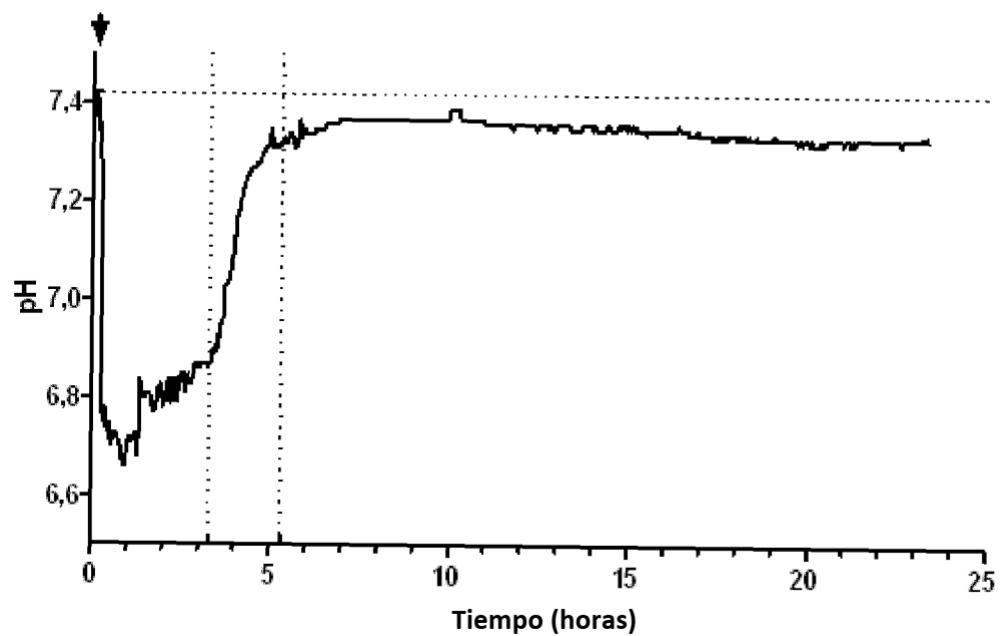


Figura 74

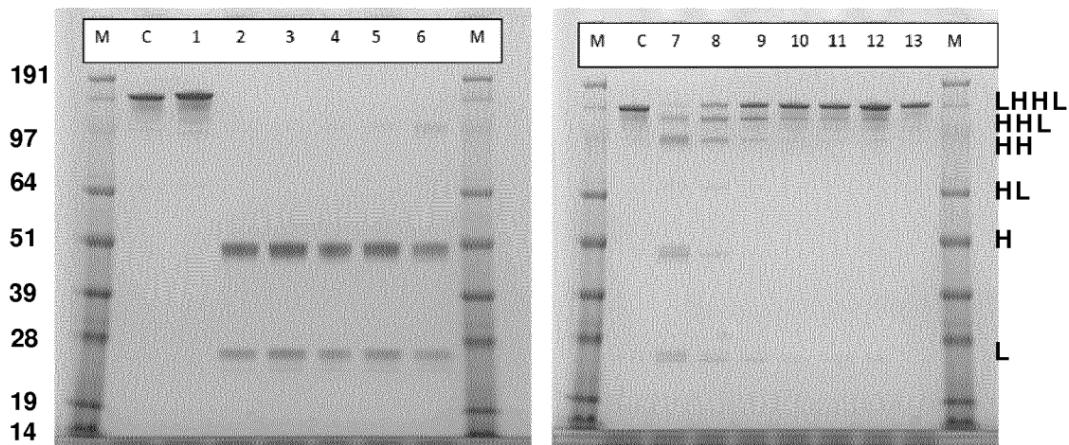


Figura 75

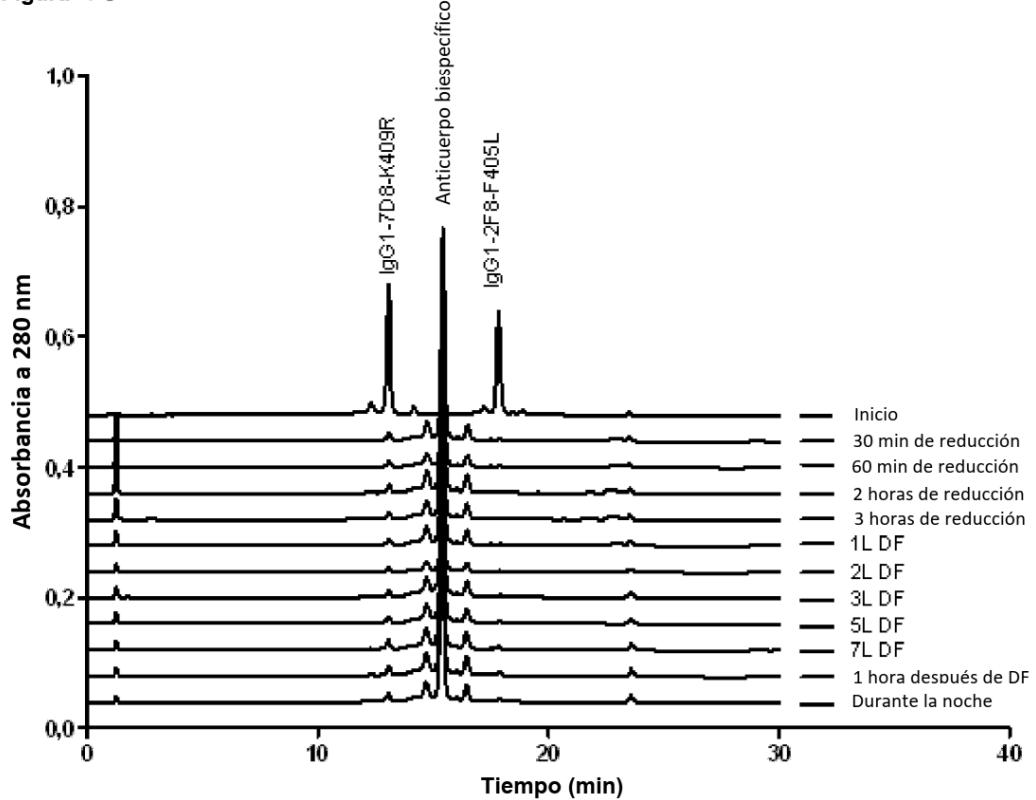


Figura 76

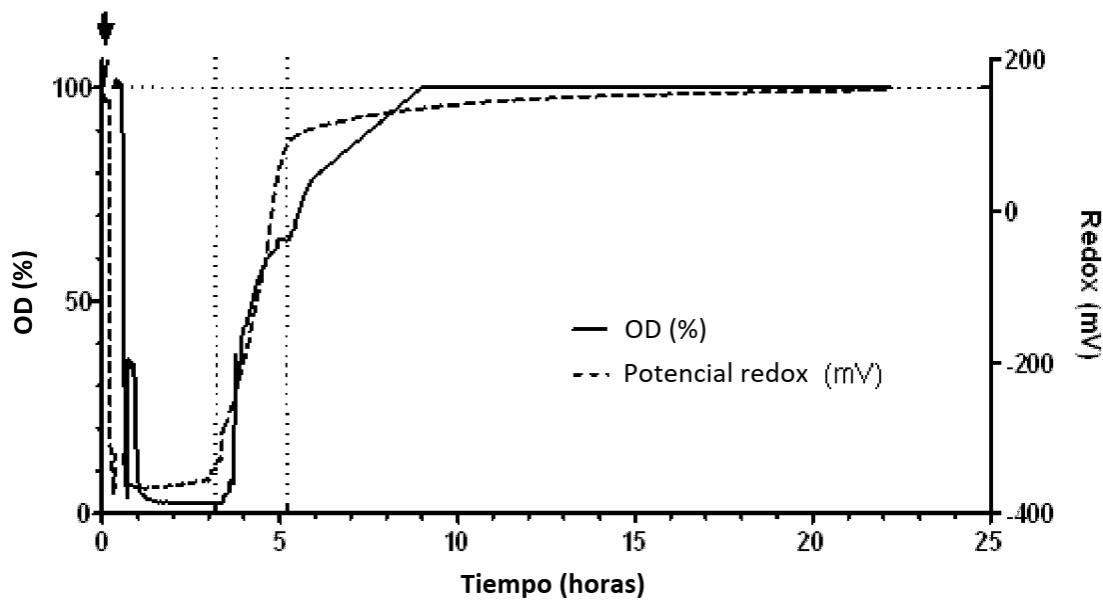


Figura 77

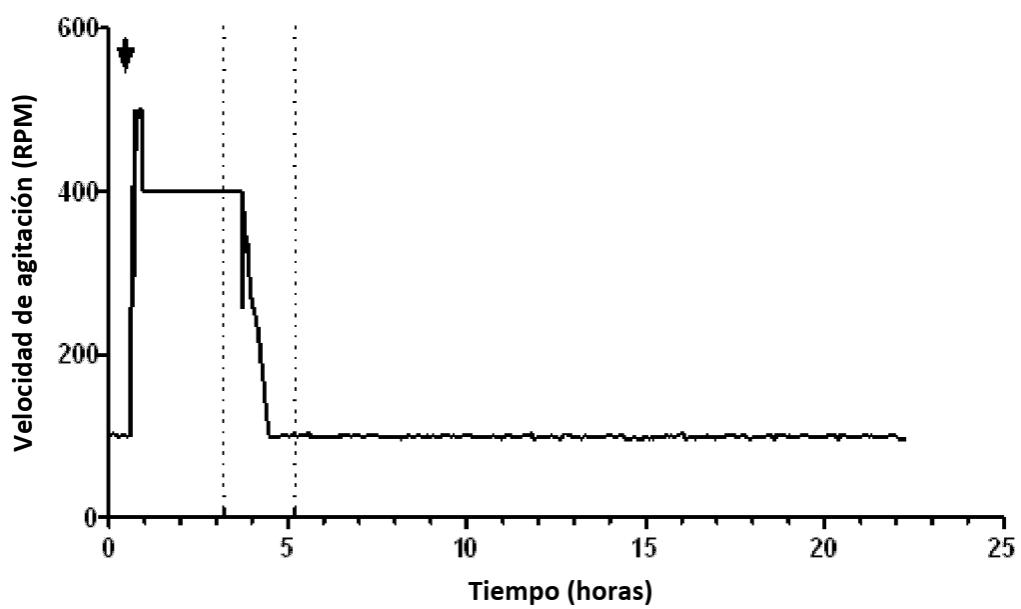


Figura 78

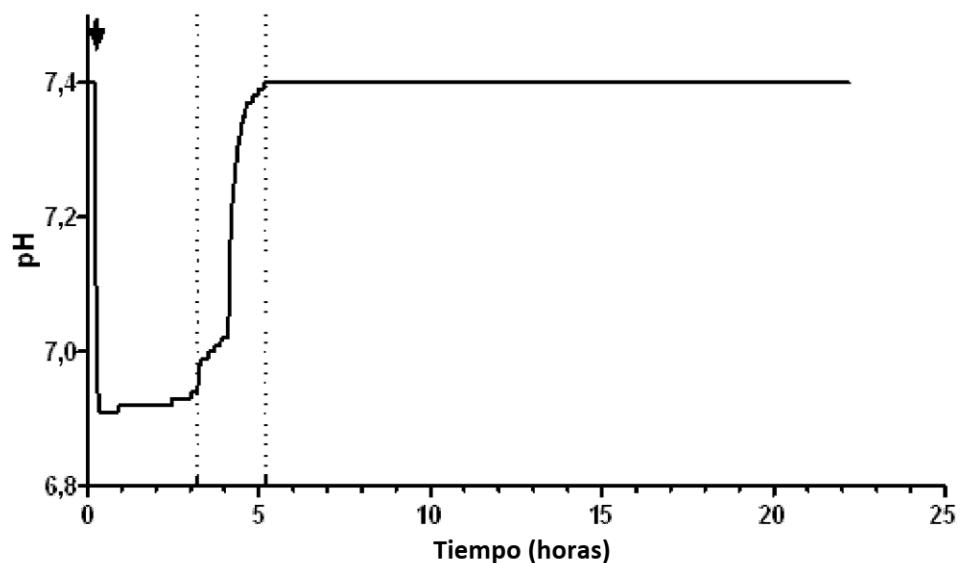


Figura 79

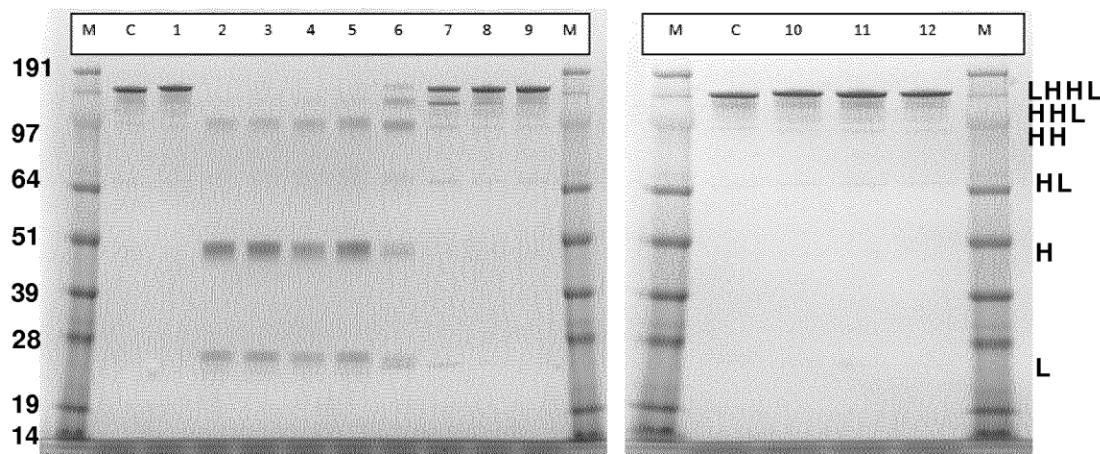


Figura 80

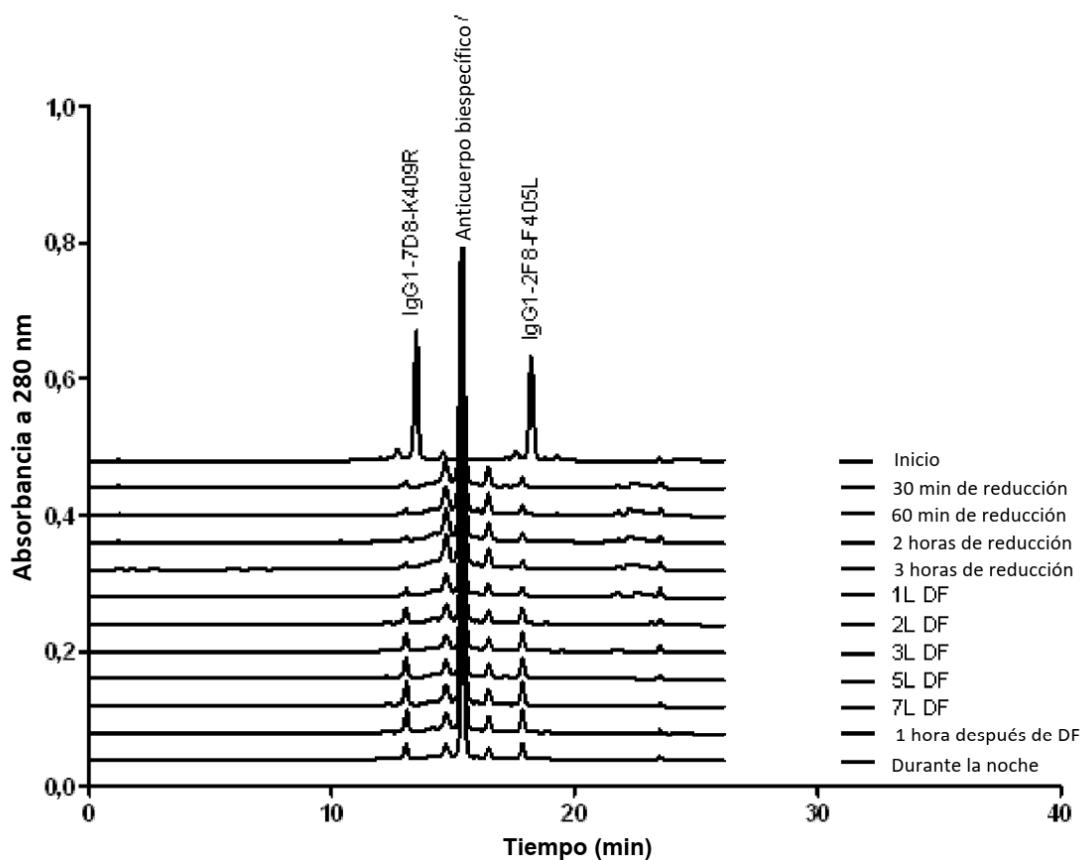


Figura 81

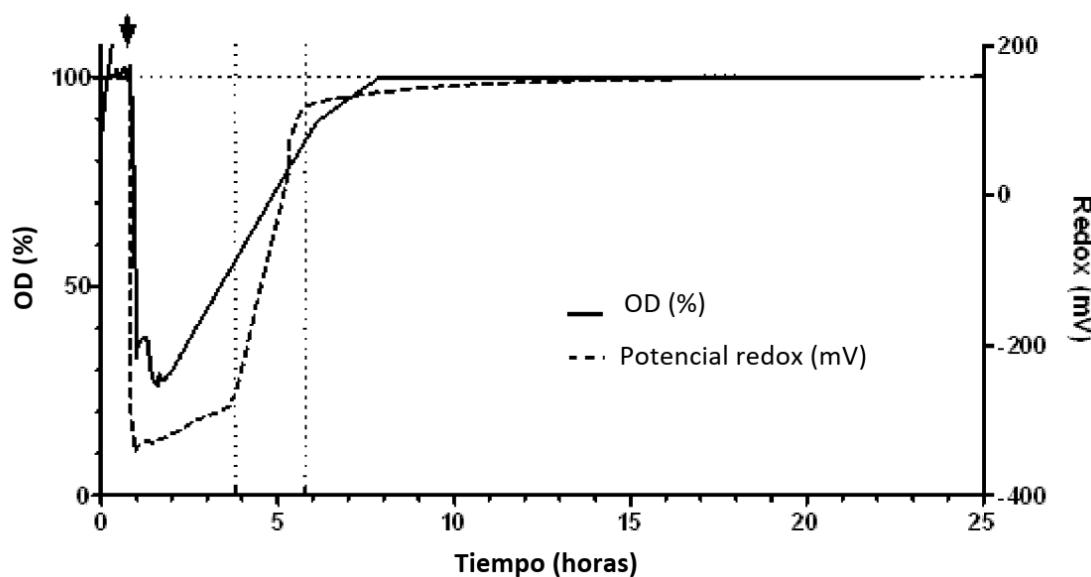


Figura 82

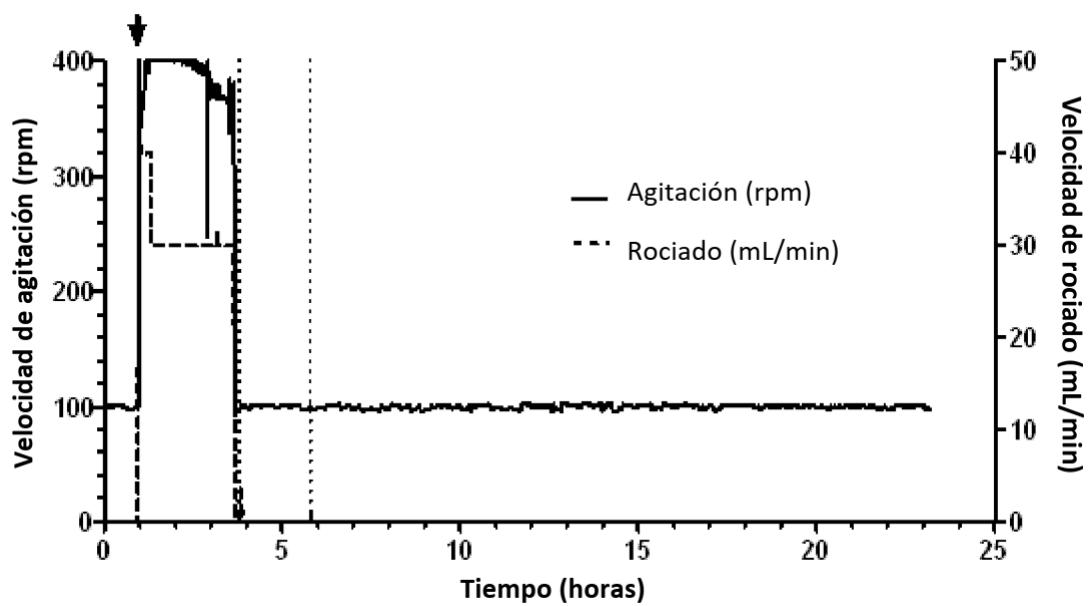


Figura 83

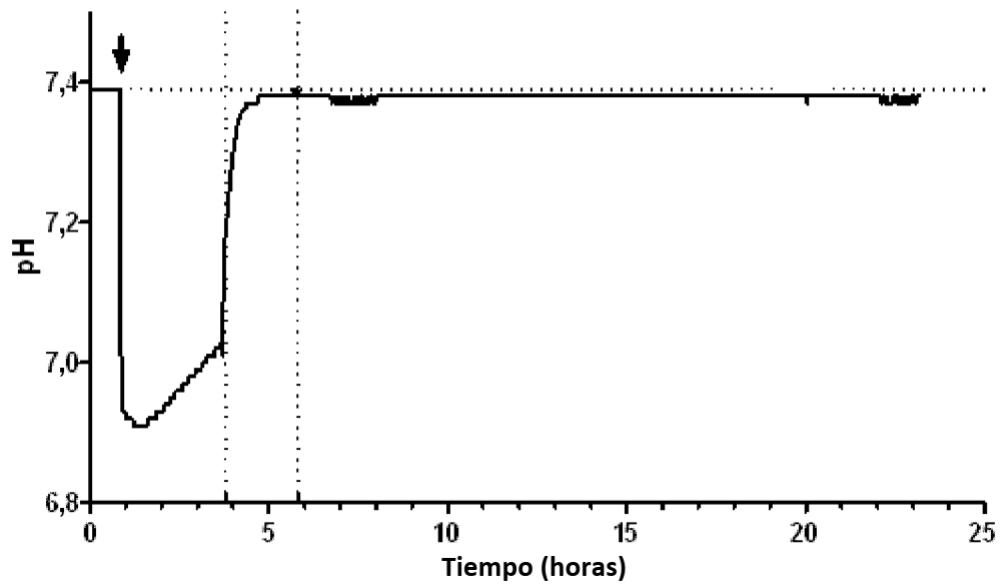


Figura 84

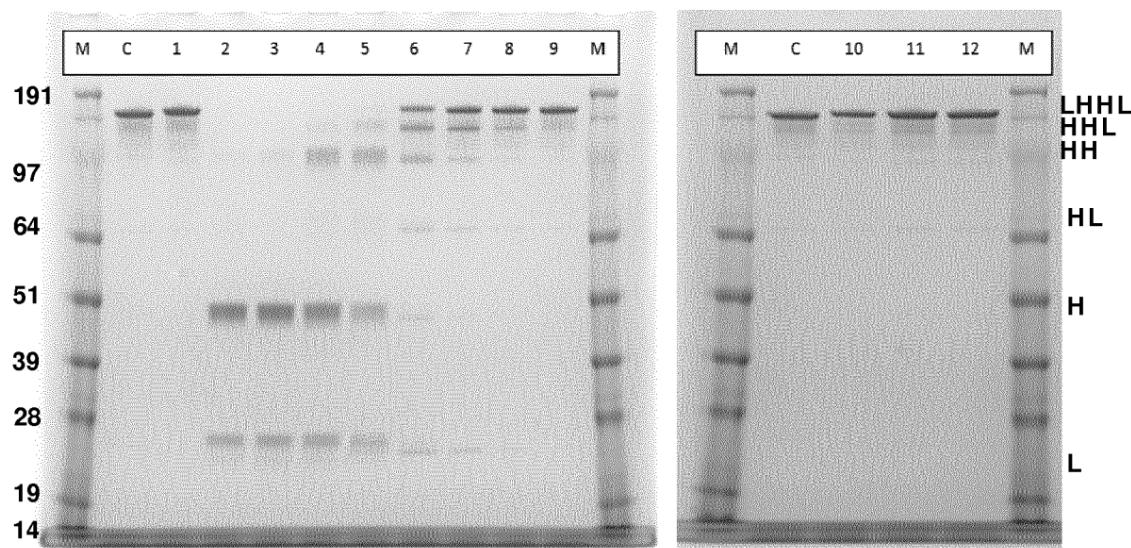


Figura 85

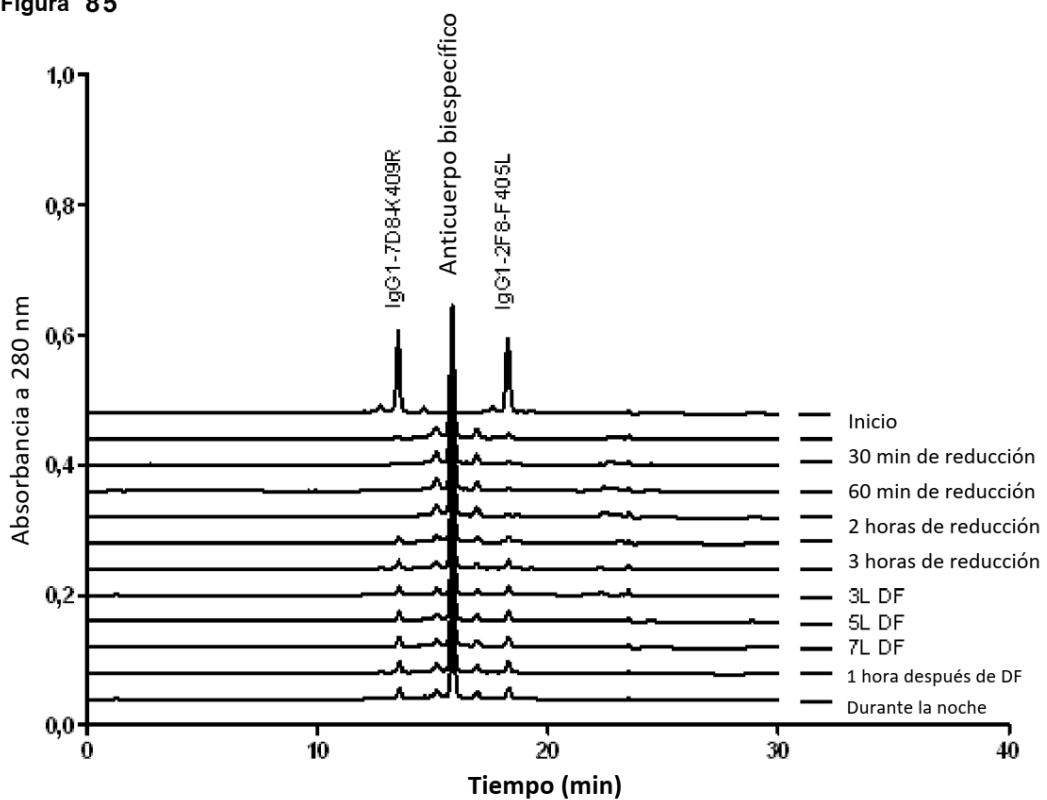


Figura 86

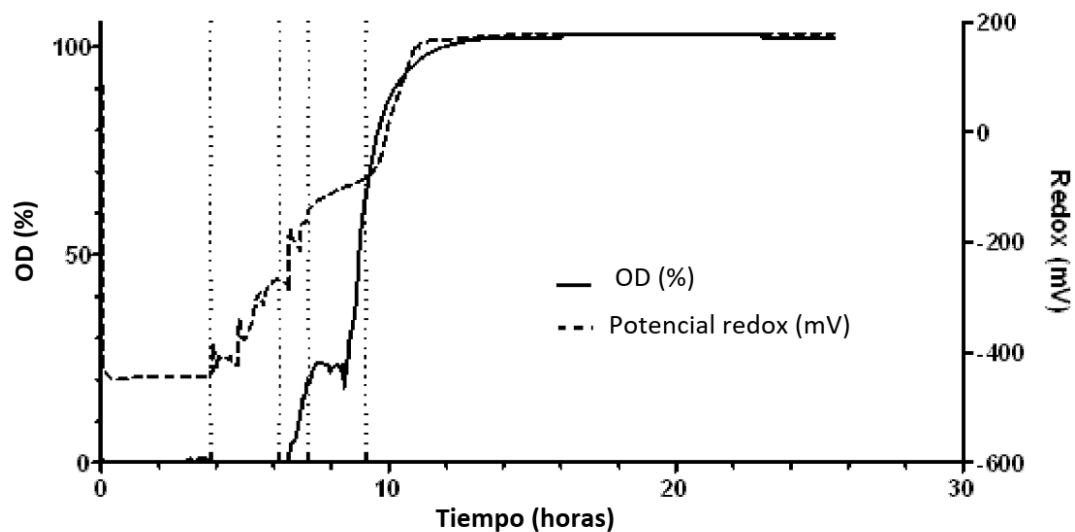


Figura 87

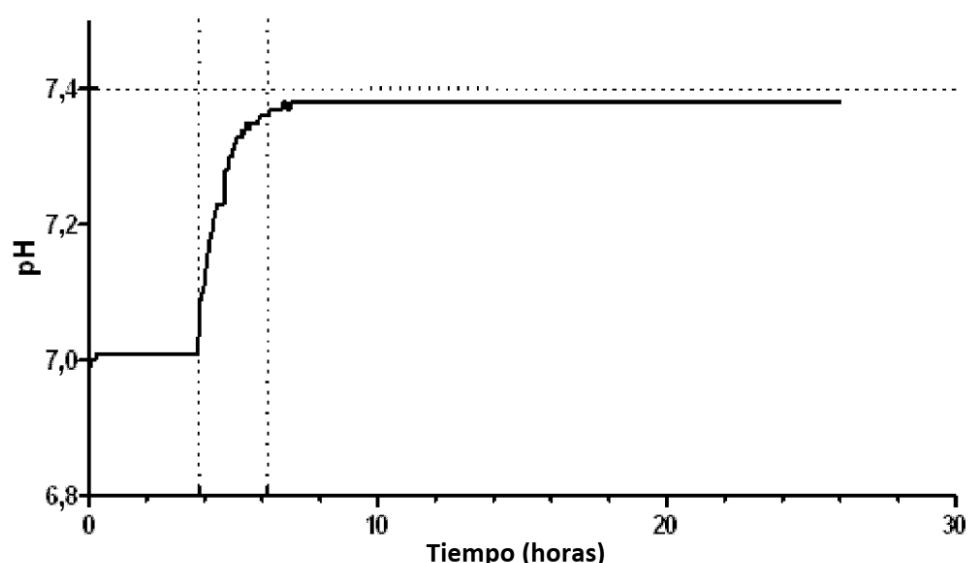


Figura 88

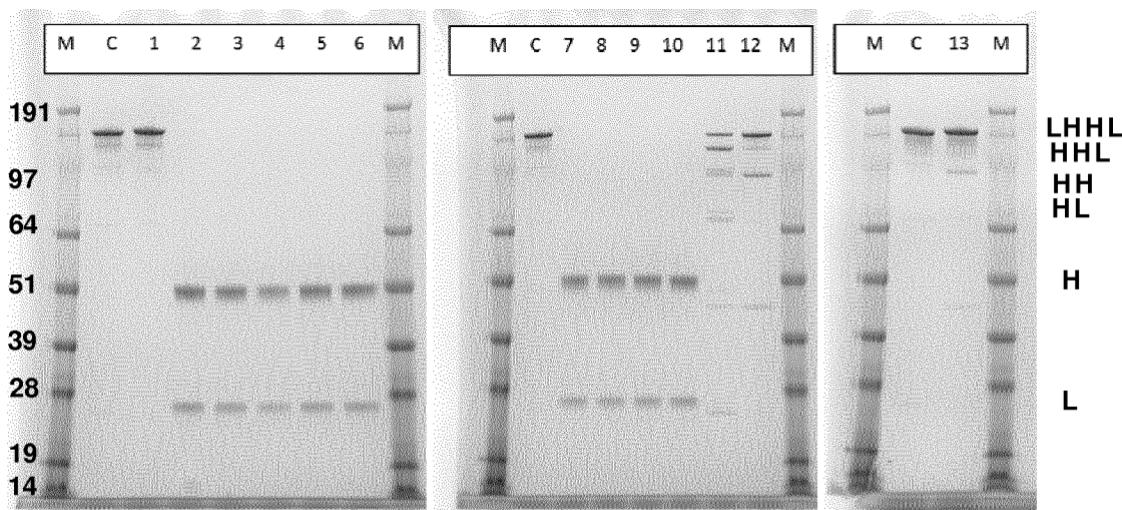


Figura 89

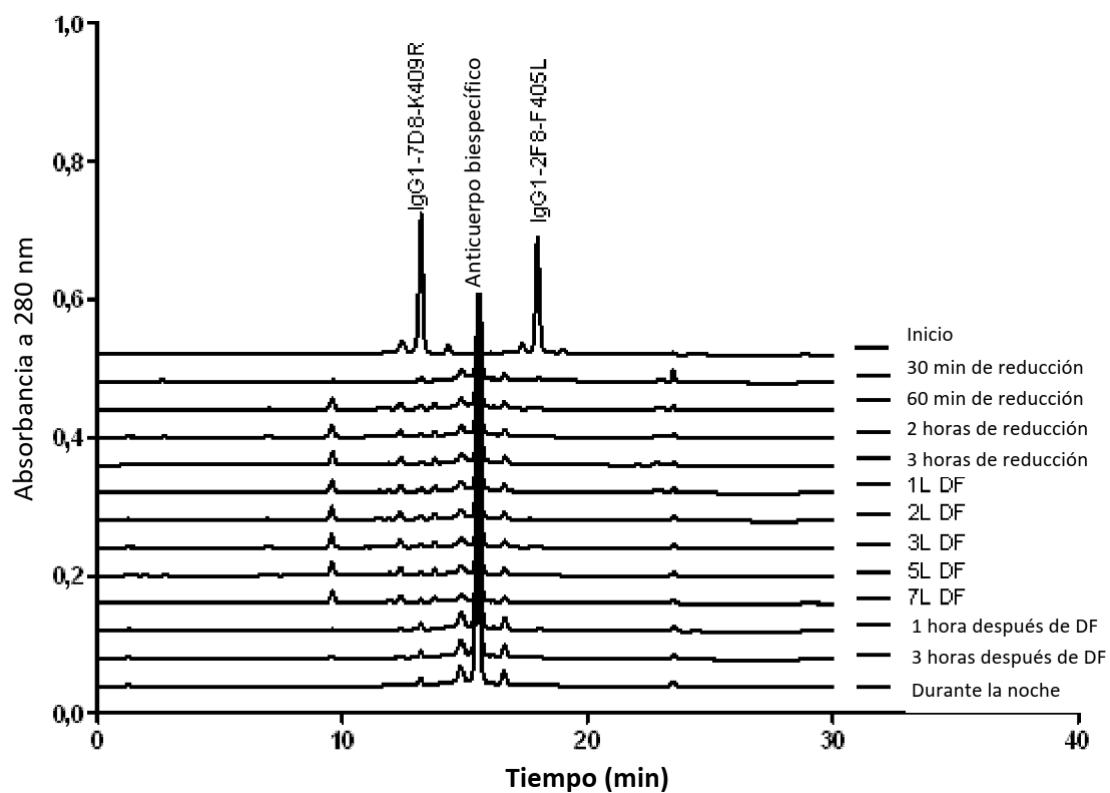


Figura 90

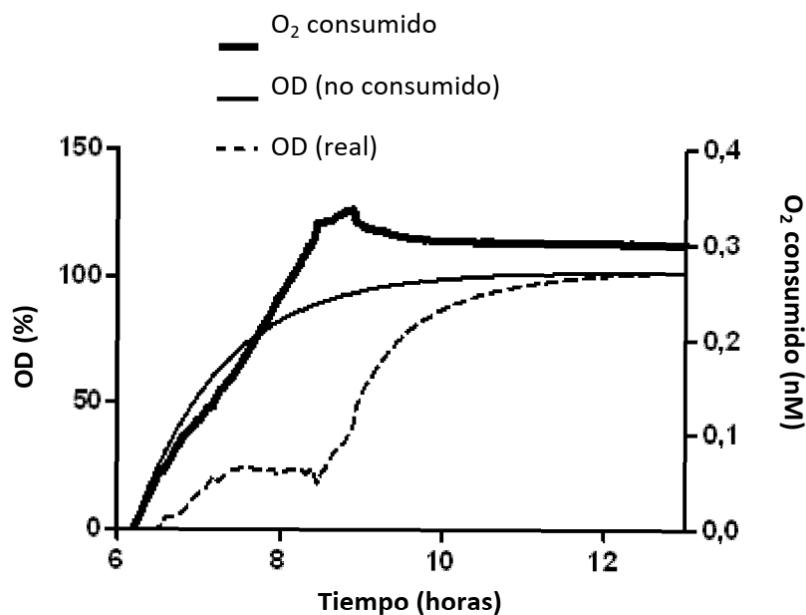


Figura 91

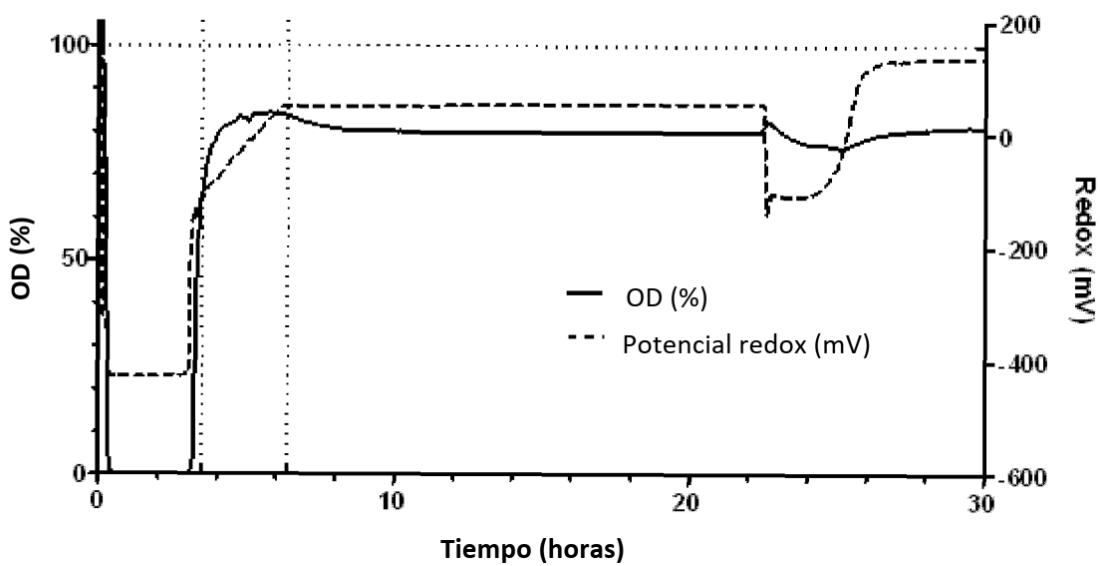


Figura 92

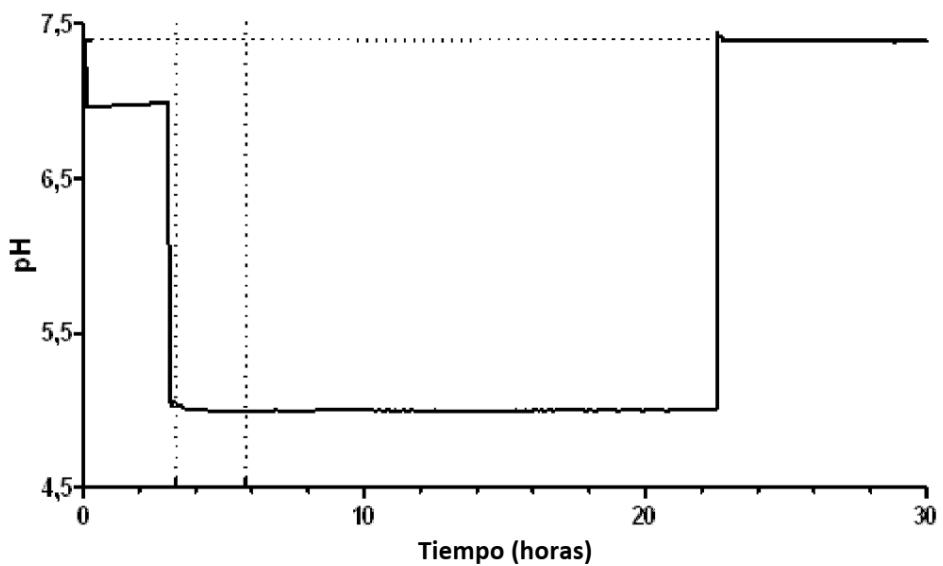


Figura 93

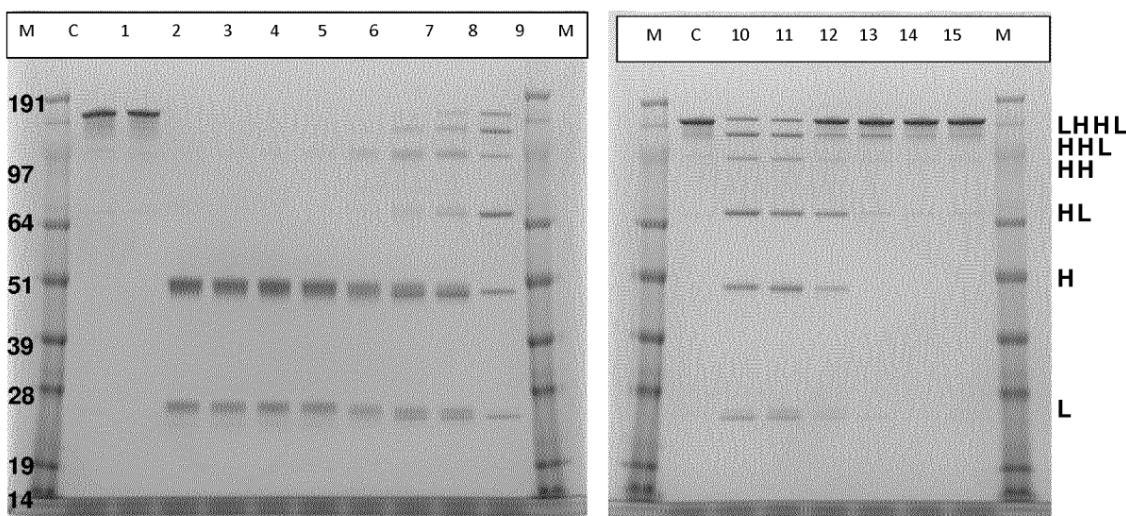


Figura 94

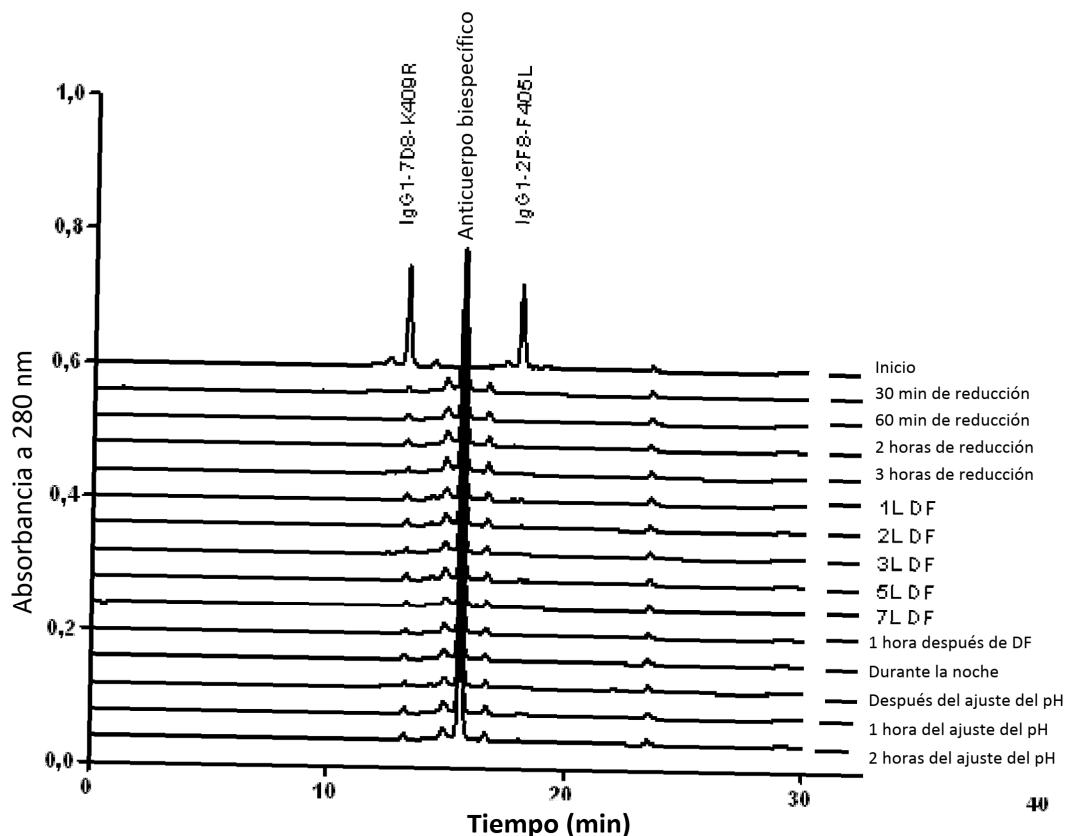


Figura 95

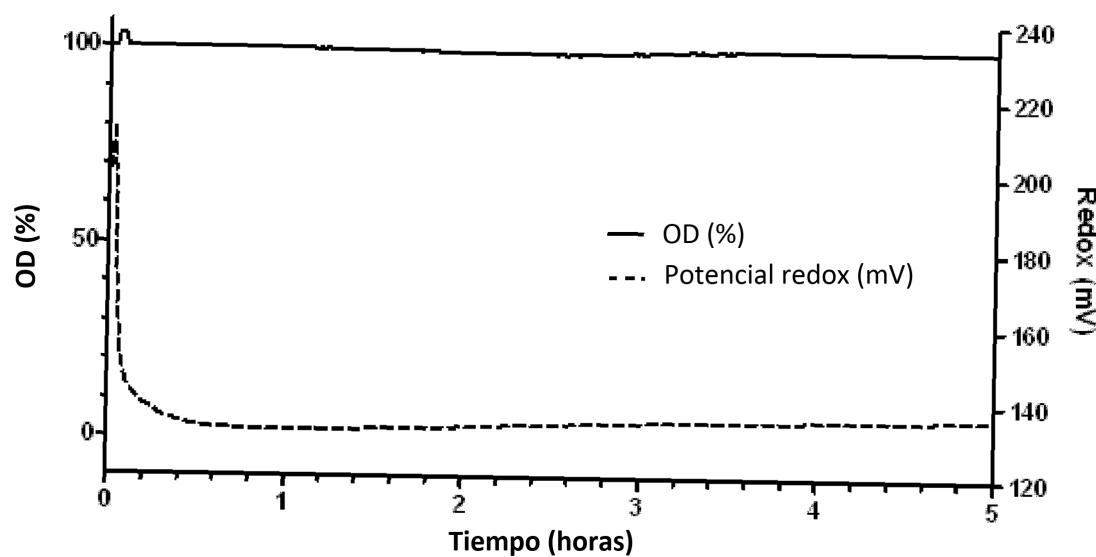


Figura 96

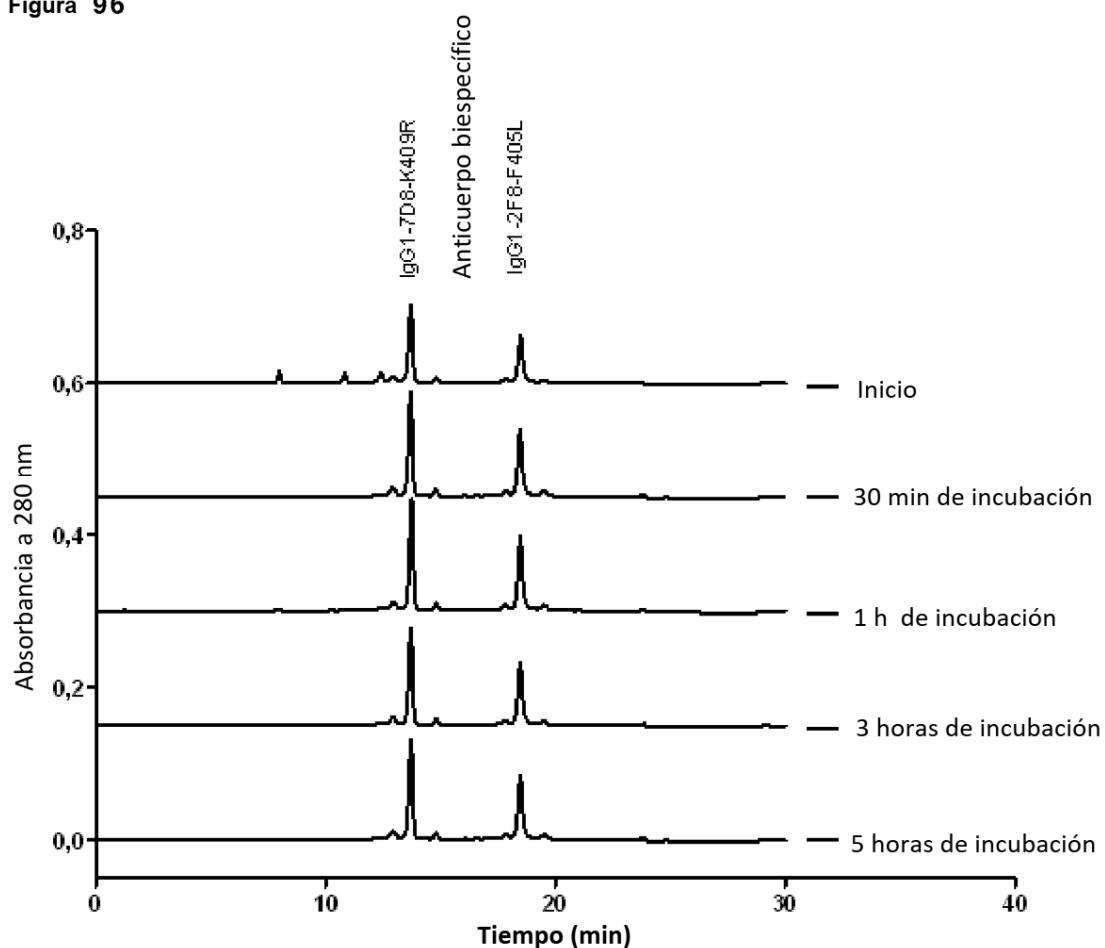


Figura 97

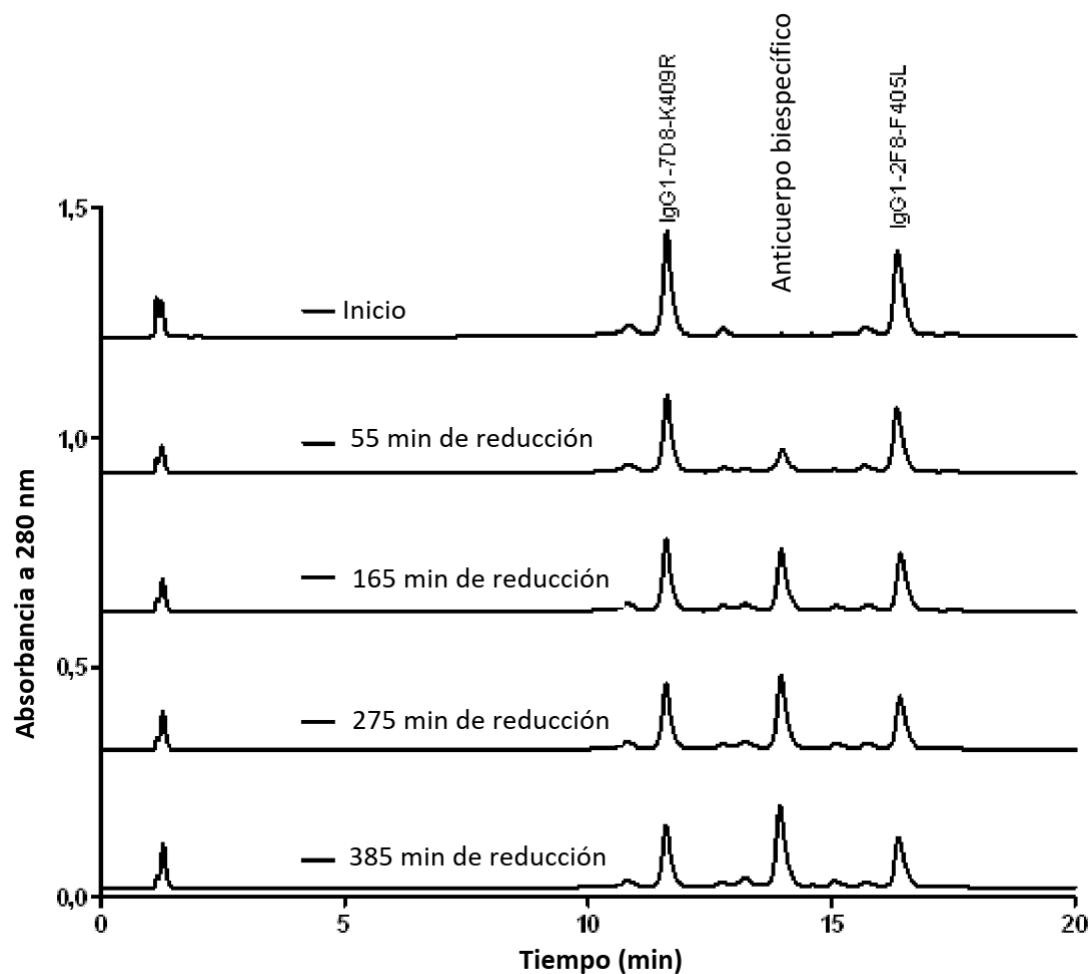


Figura 98

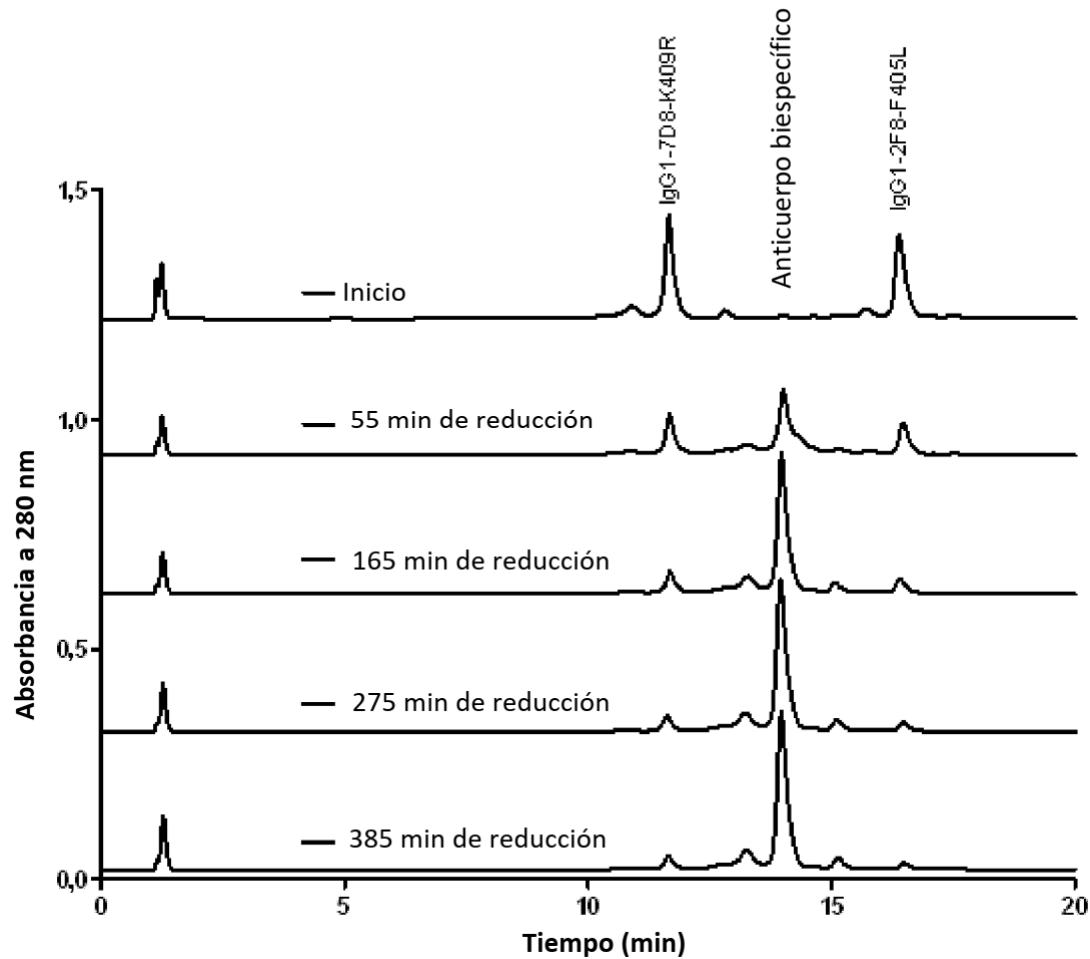


Figura 99

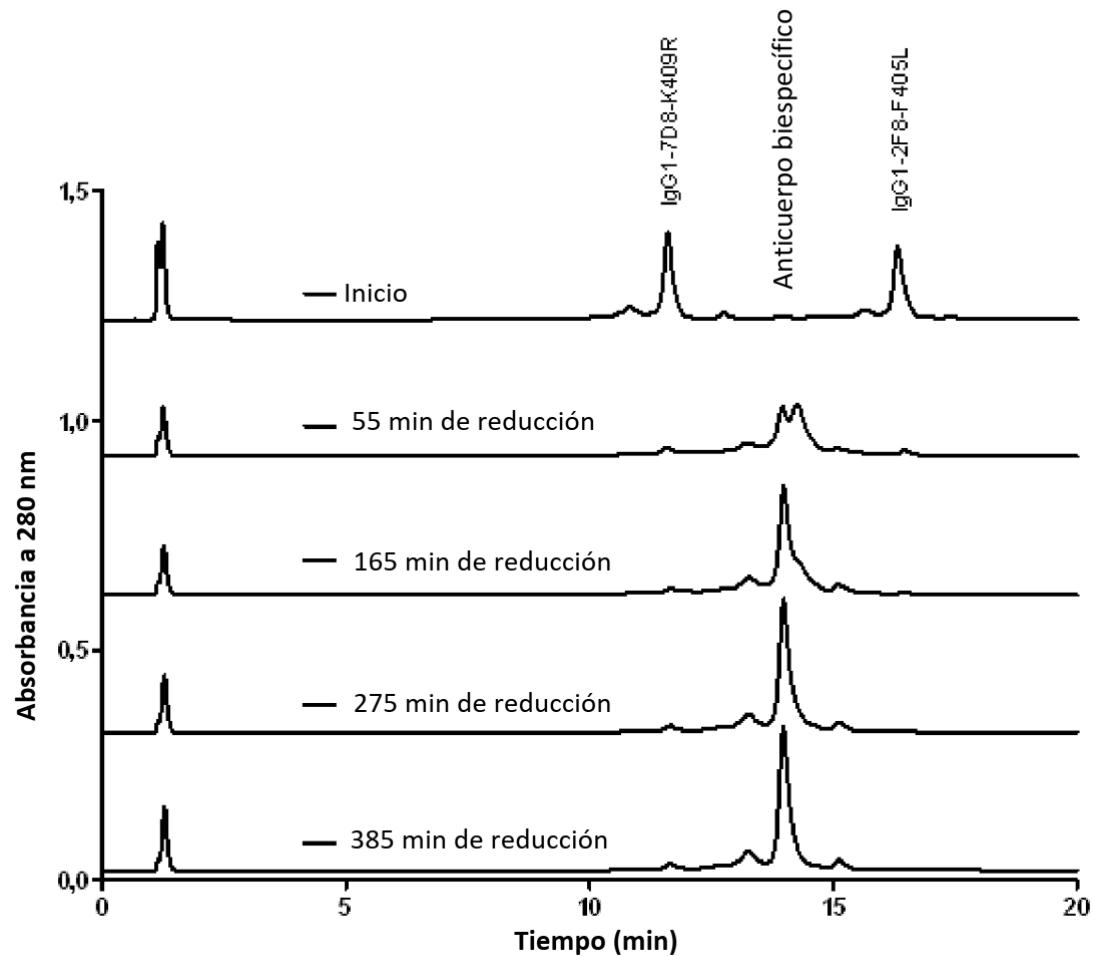


Figura 100

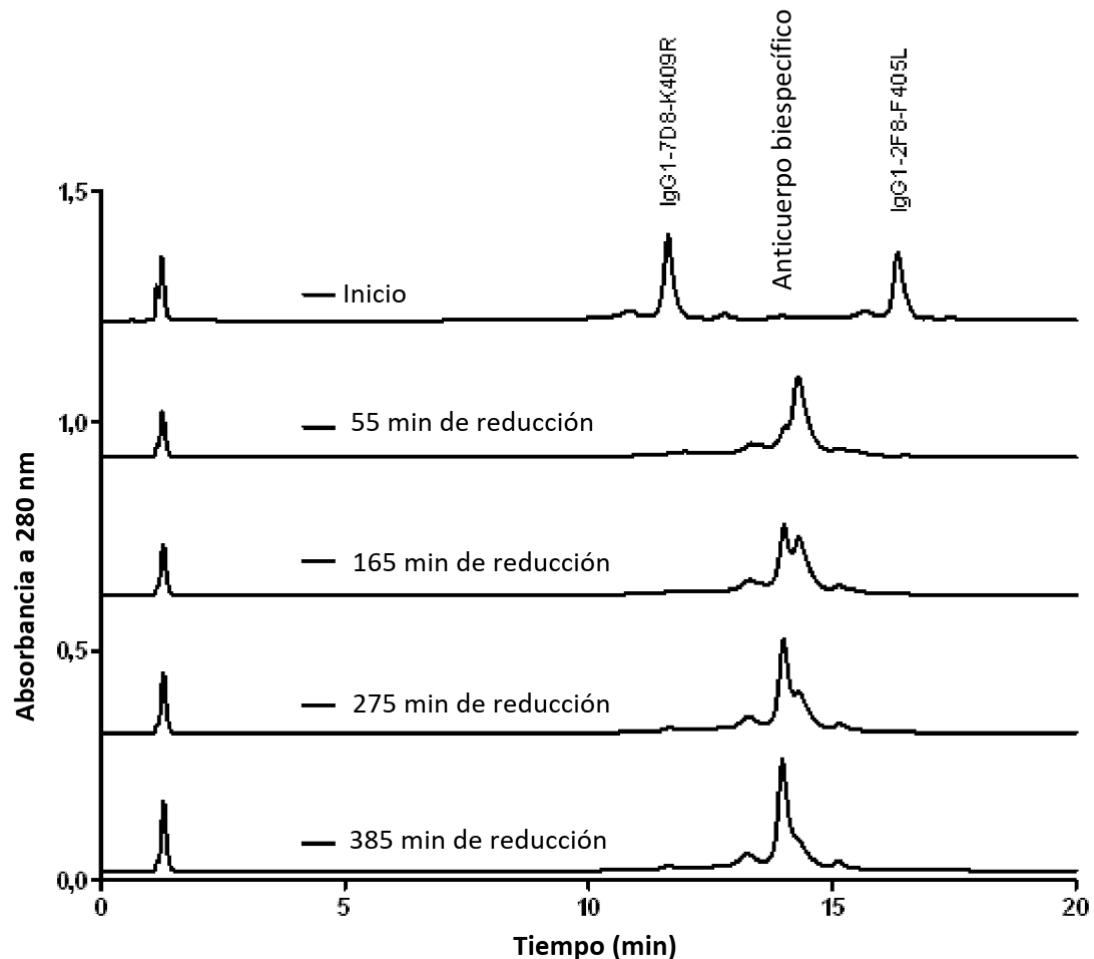


Figura 101

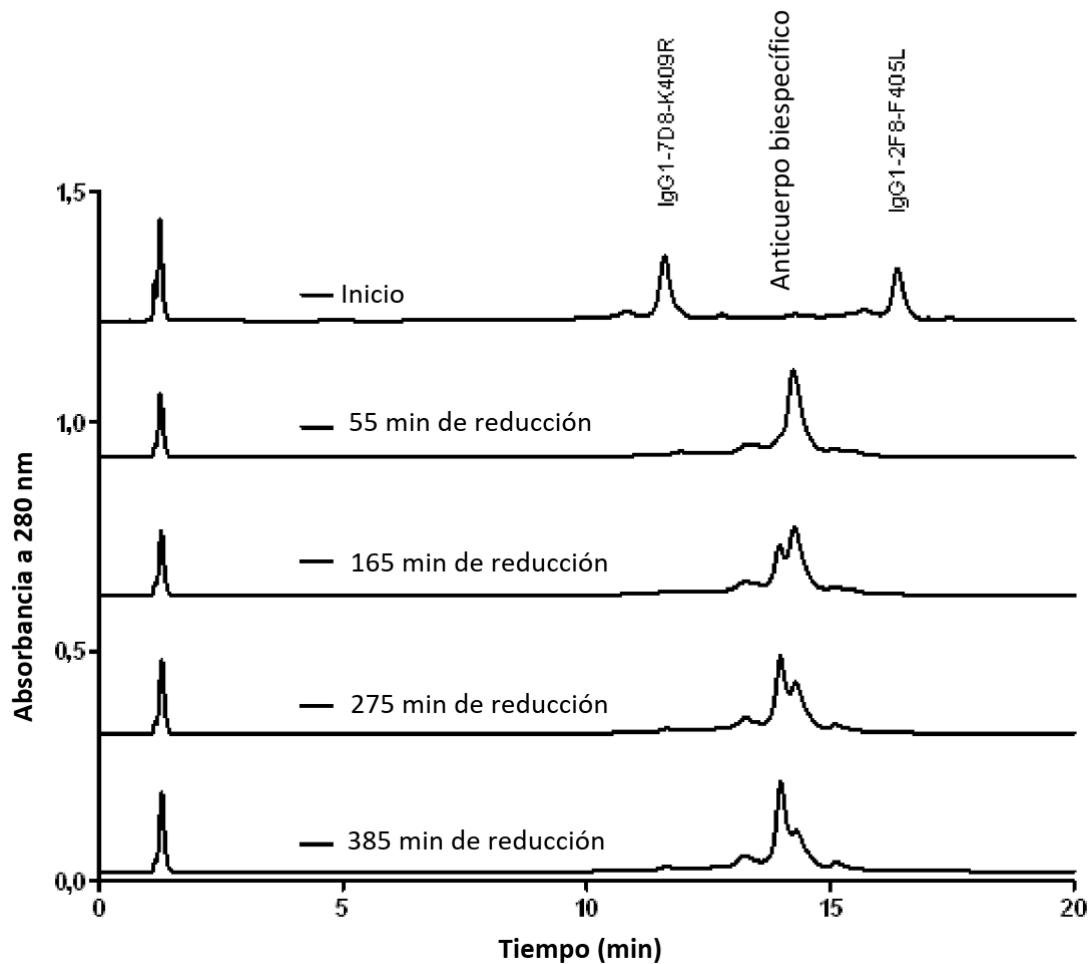


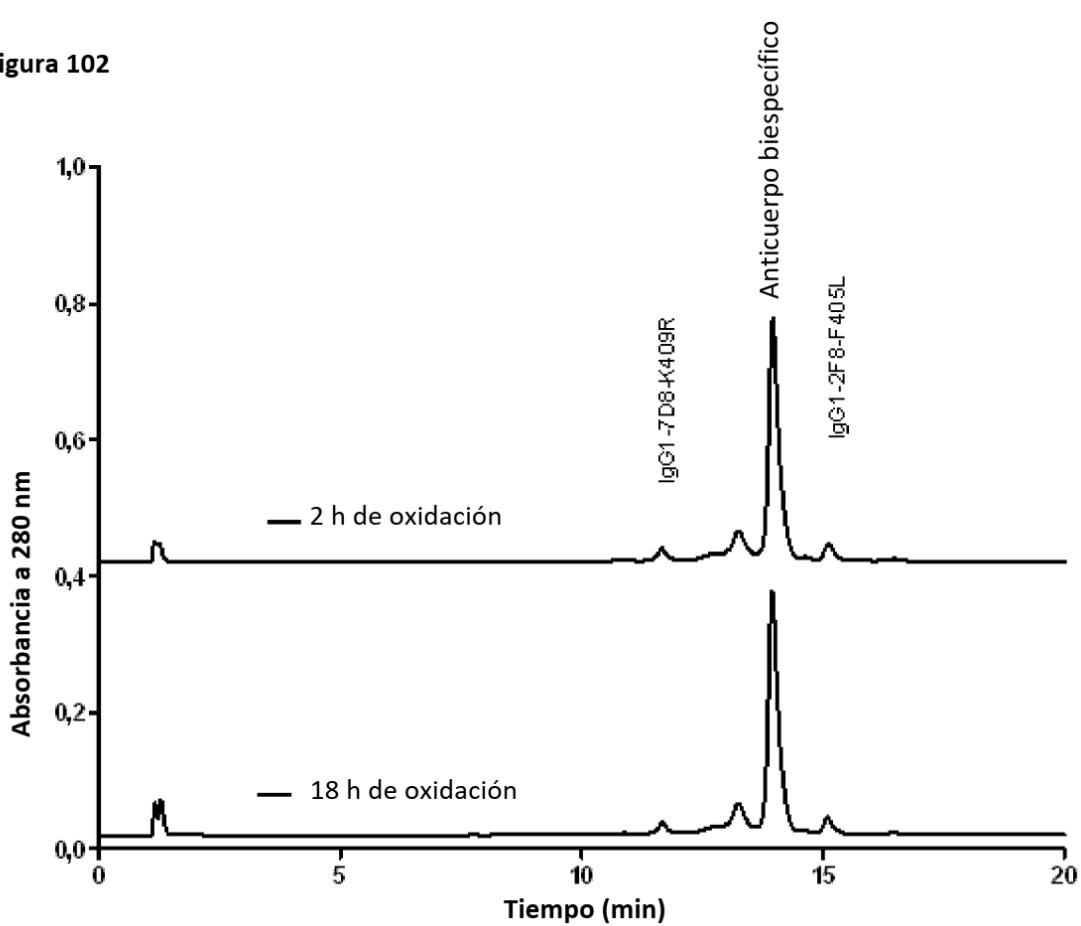
Figura 102

Figura 103

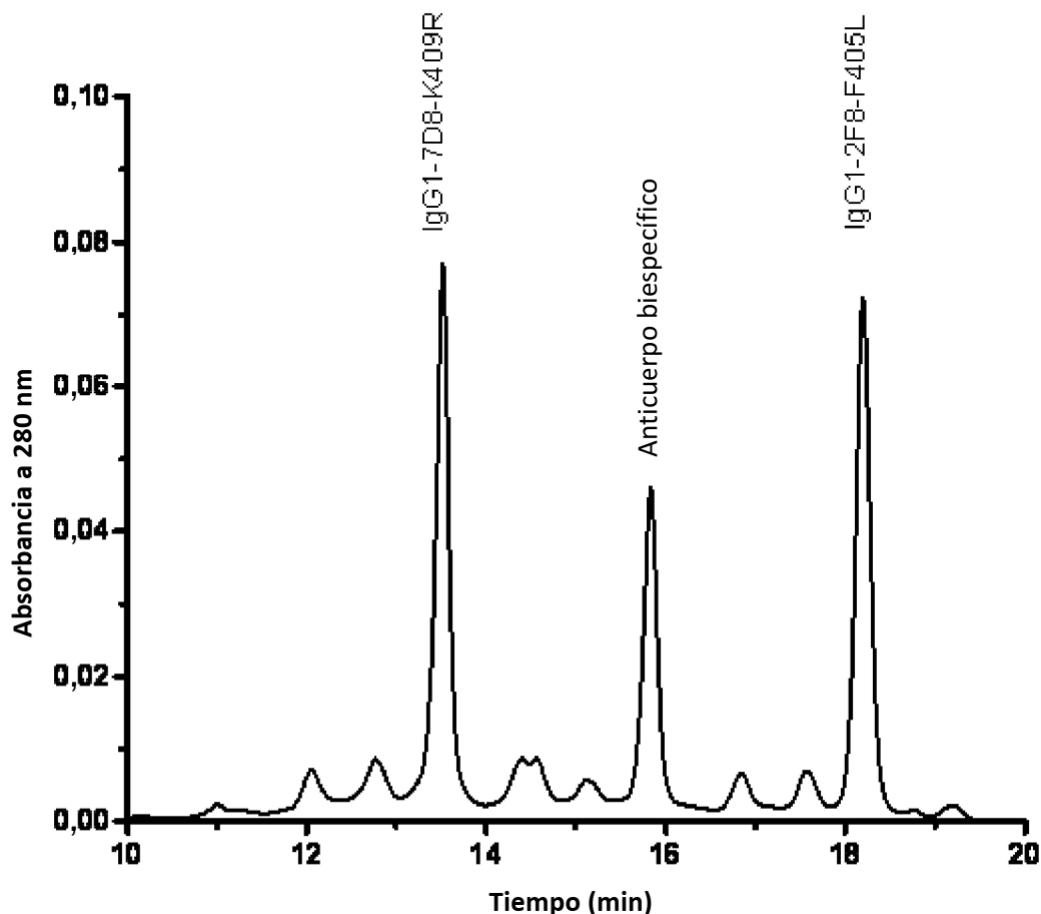


Figura 104

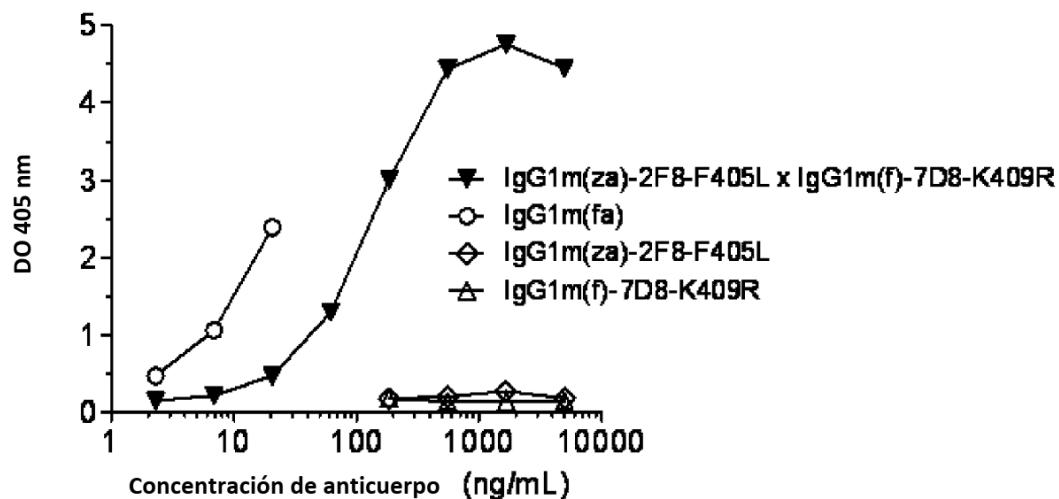


Figura 105

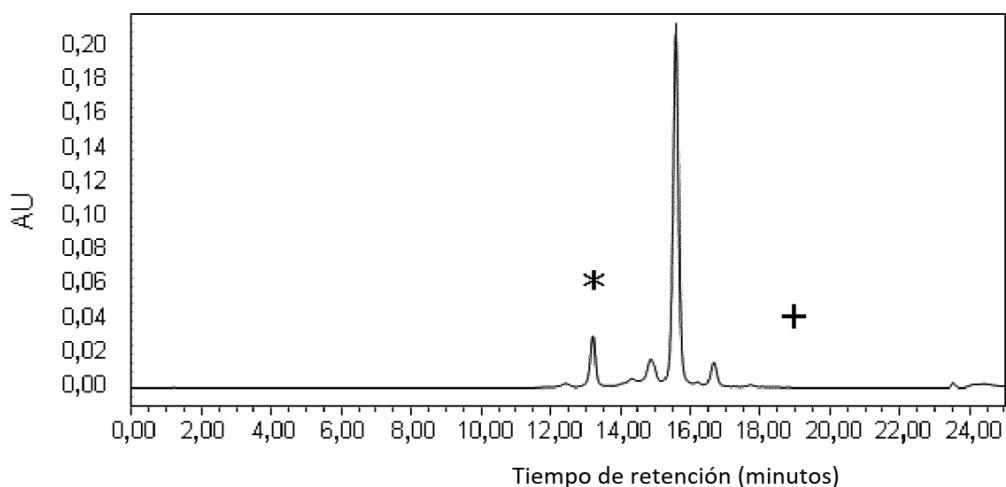


Figura 106

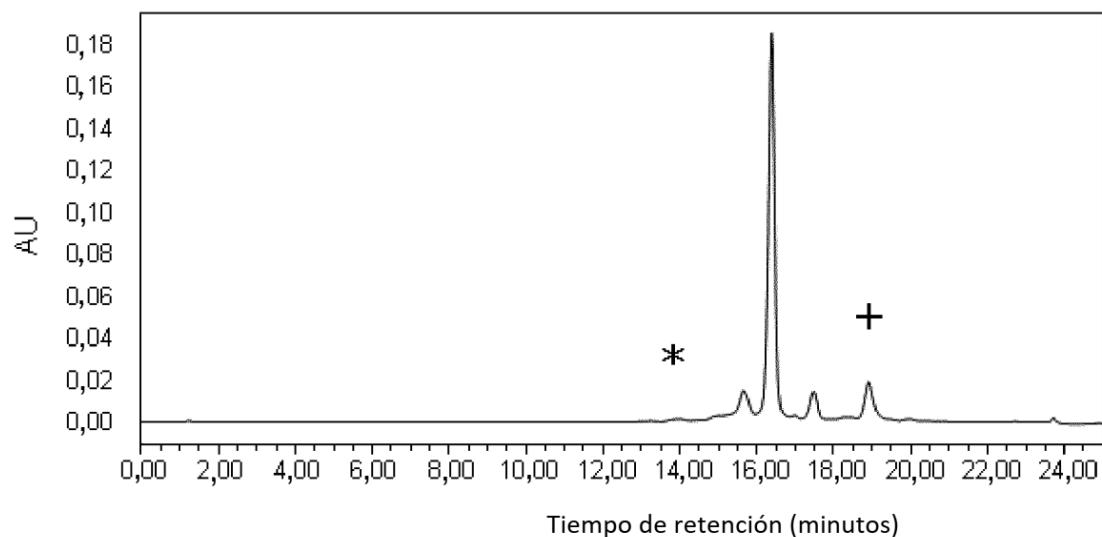


Figura 107

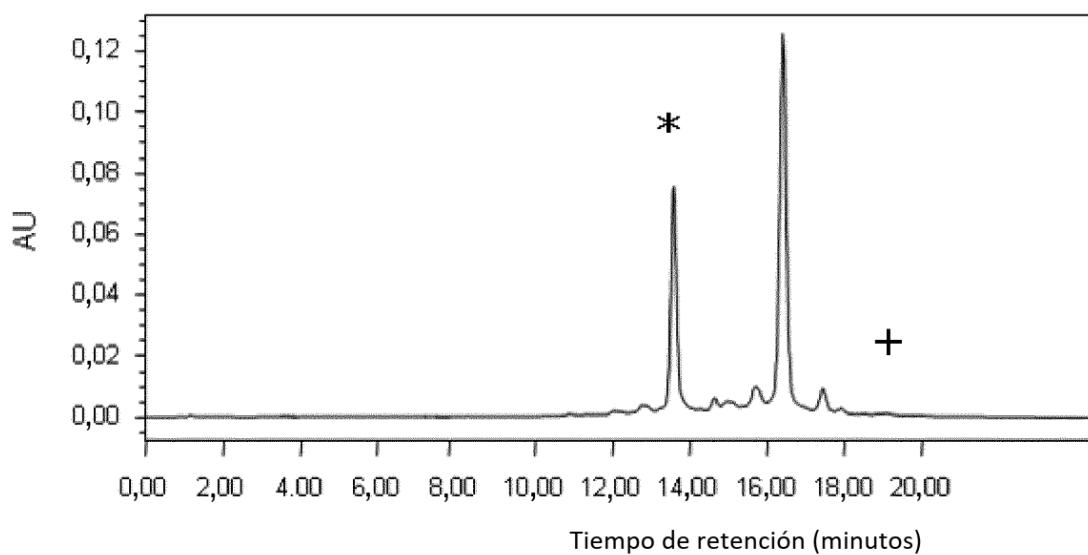


Figura 108

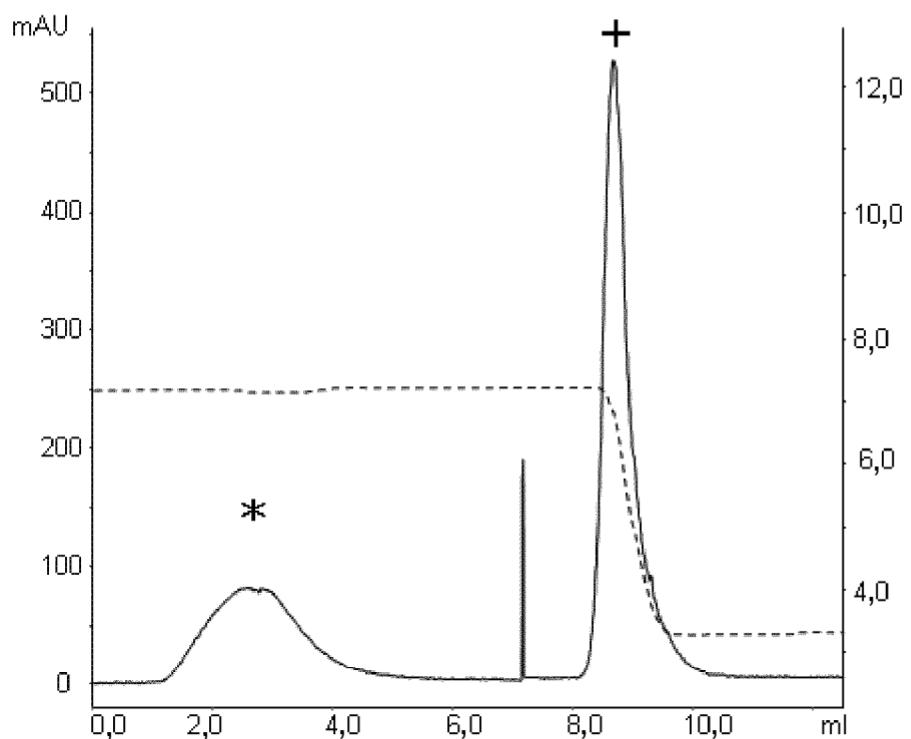


Figura 109

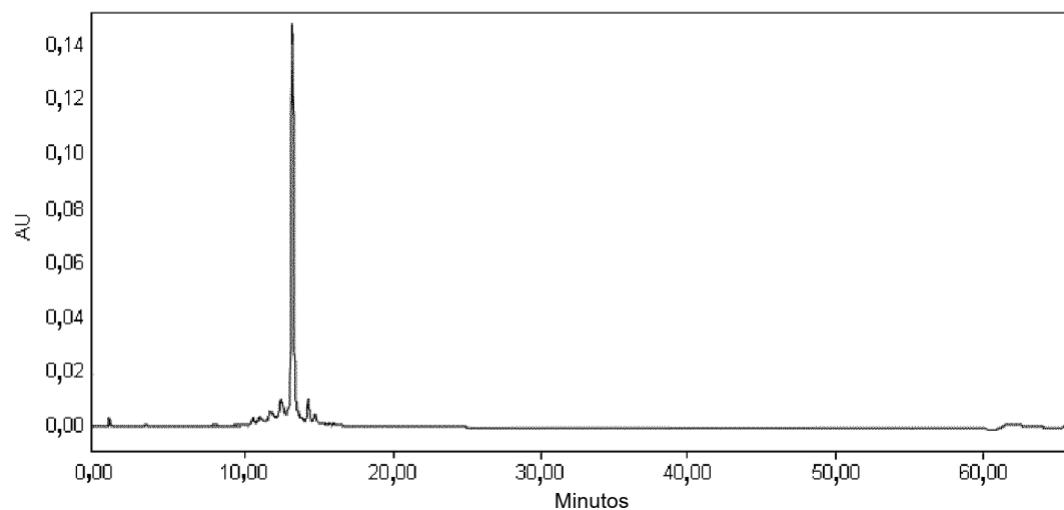


Figura 110

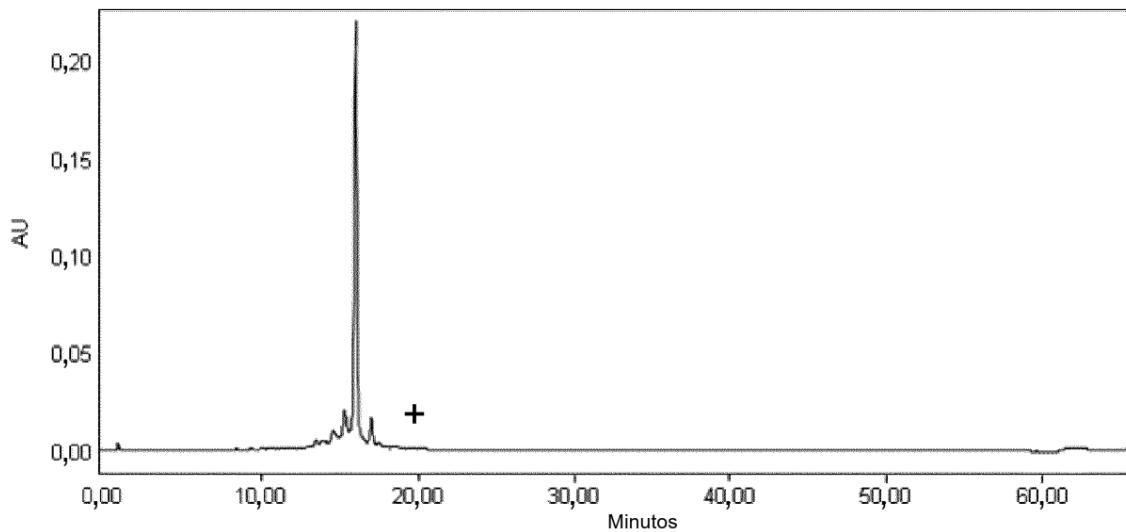
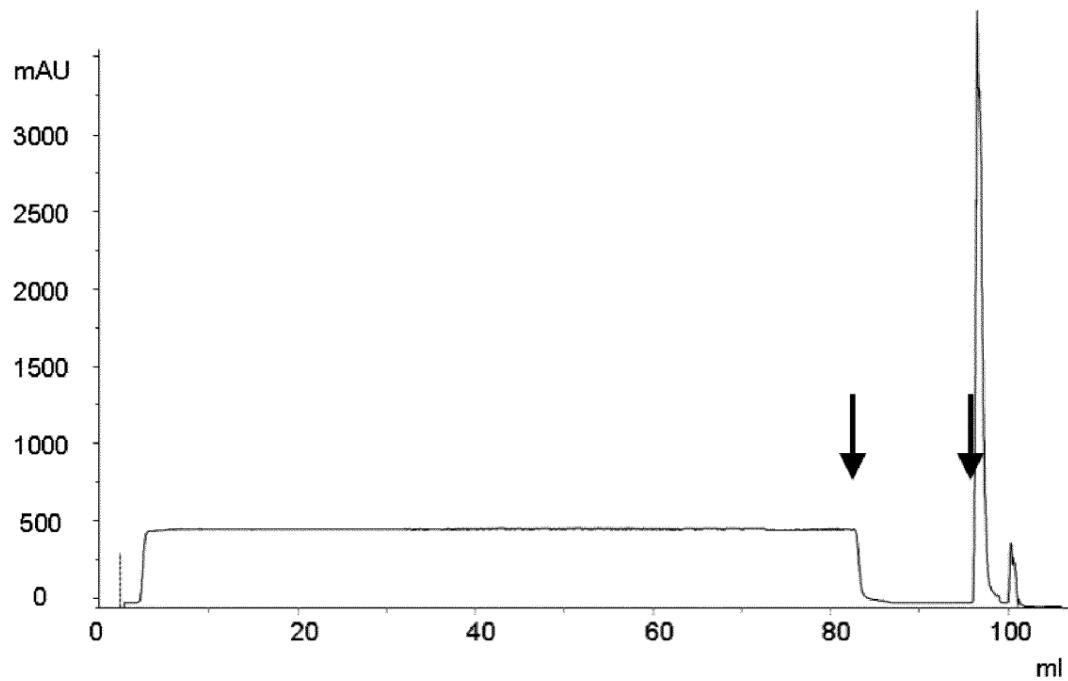


Figura 111



ES 2 739 808 T3

Figura 112

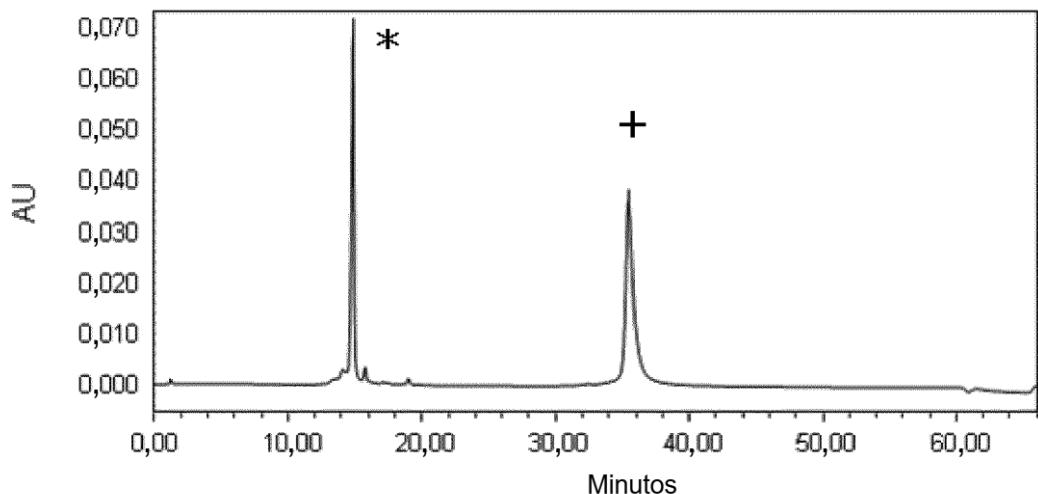


Figura 113

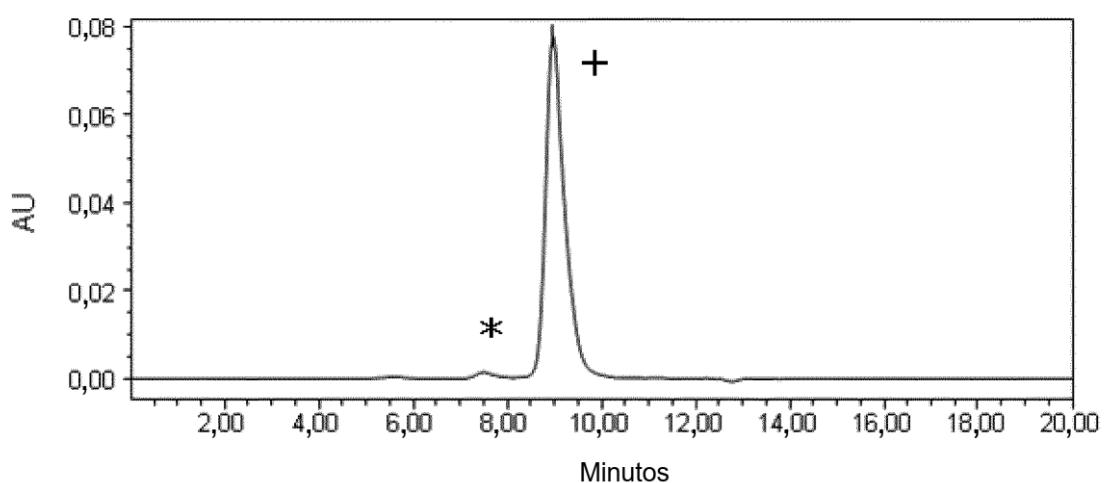


Figura 114

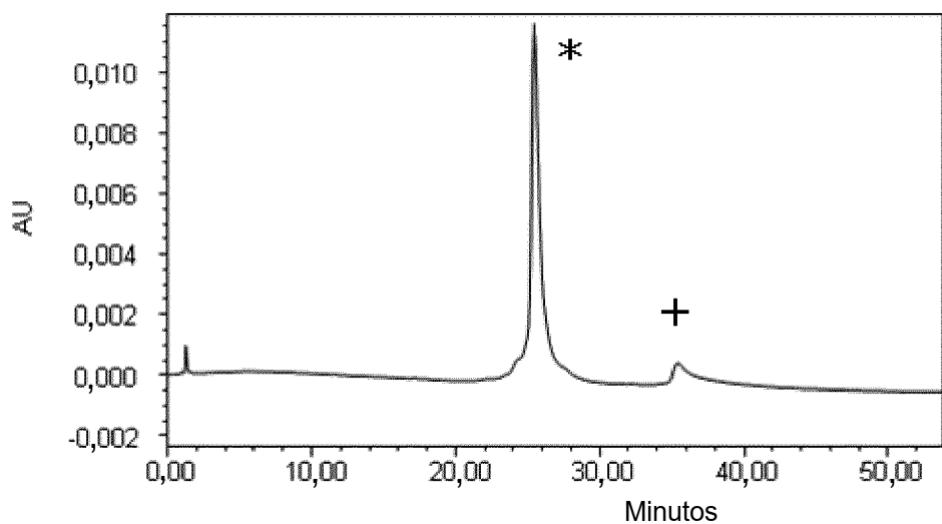


Figura 115

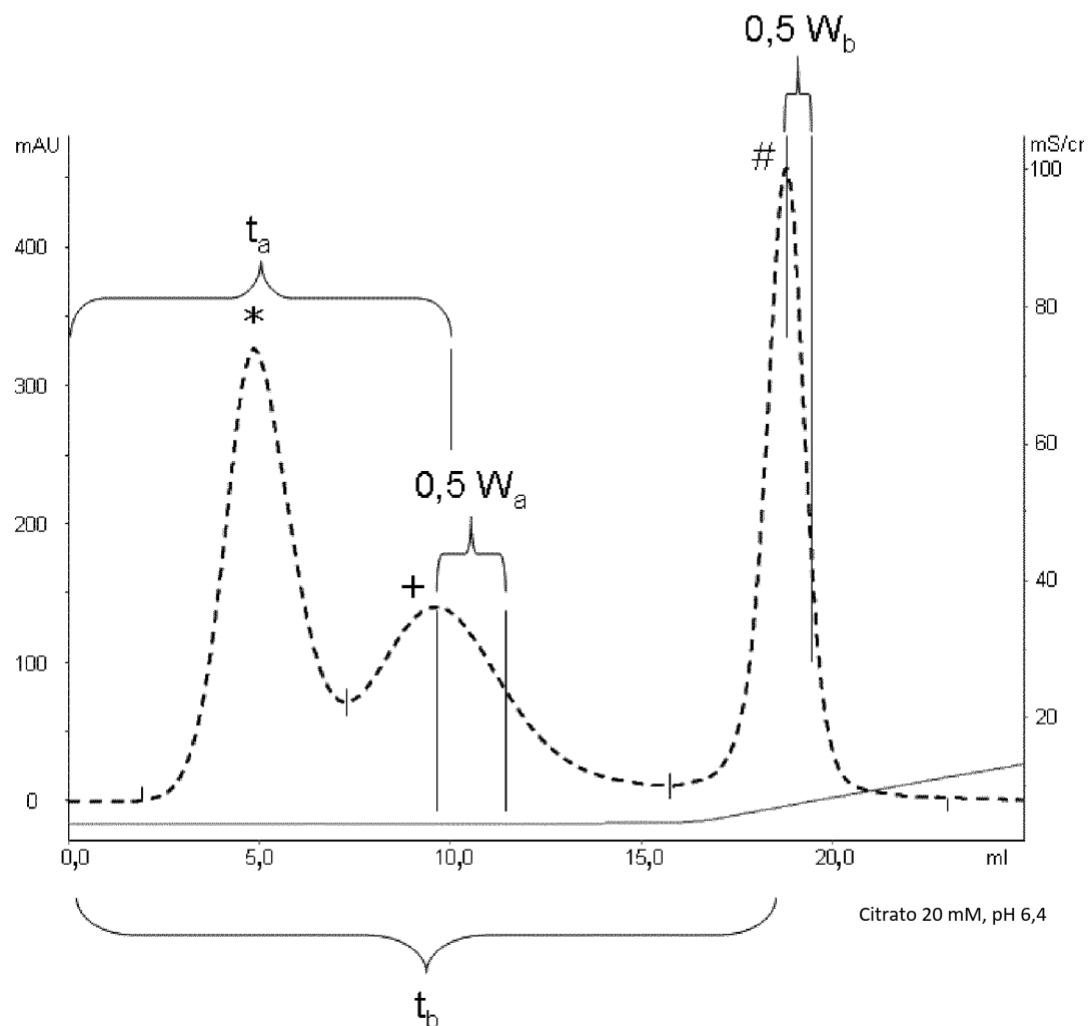


Figura 116

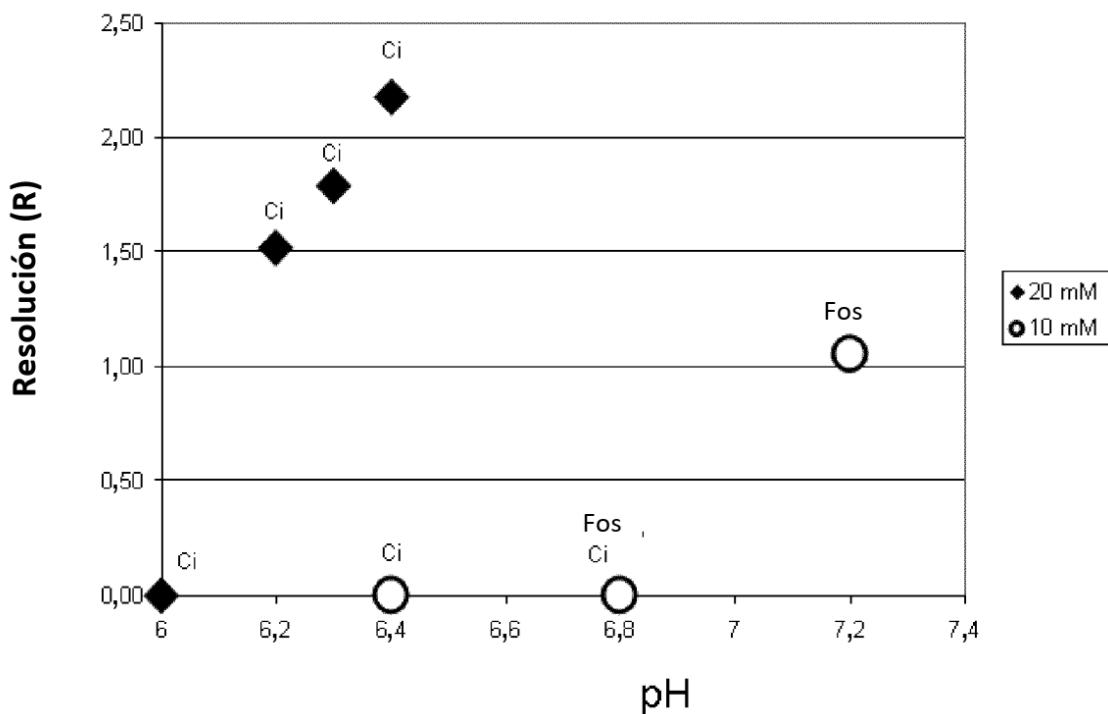


Figura 117

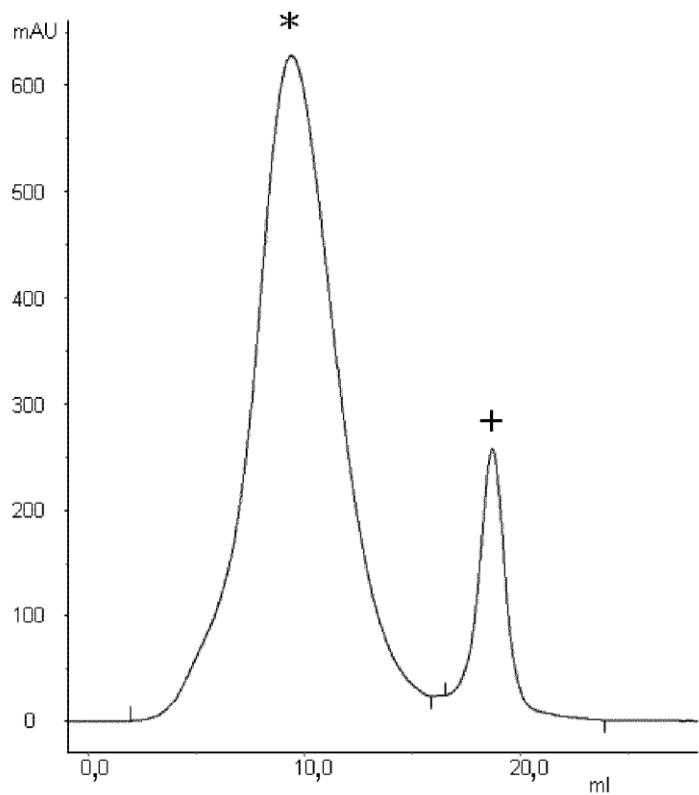


Figura 118

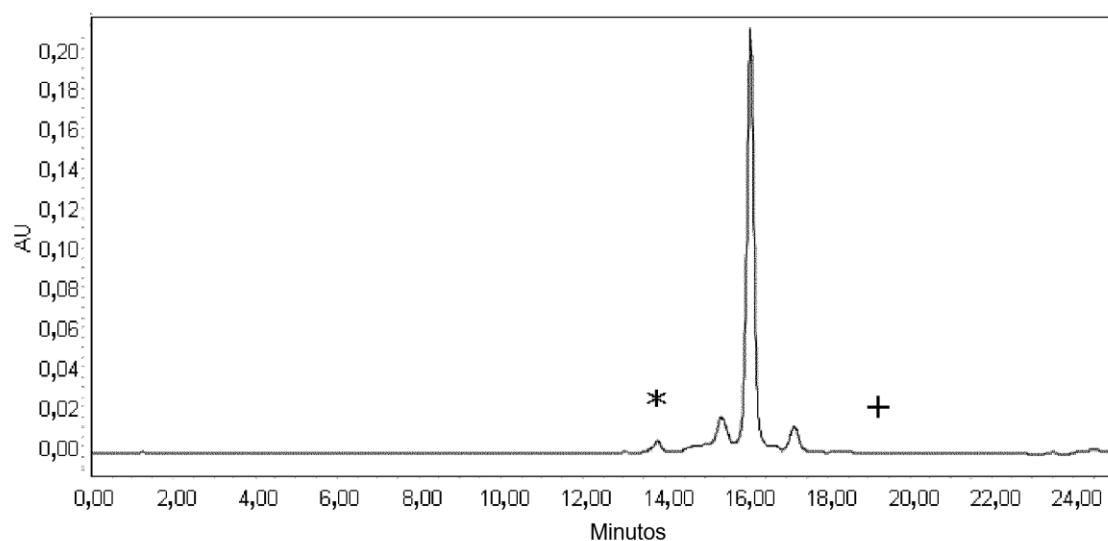


Figura 119

A

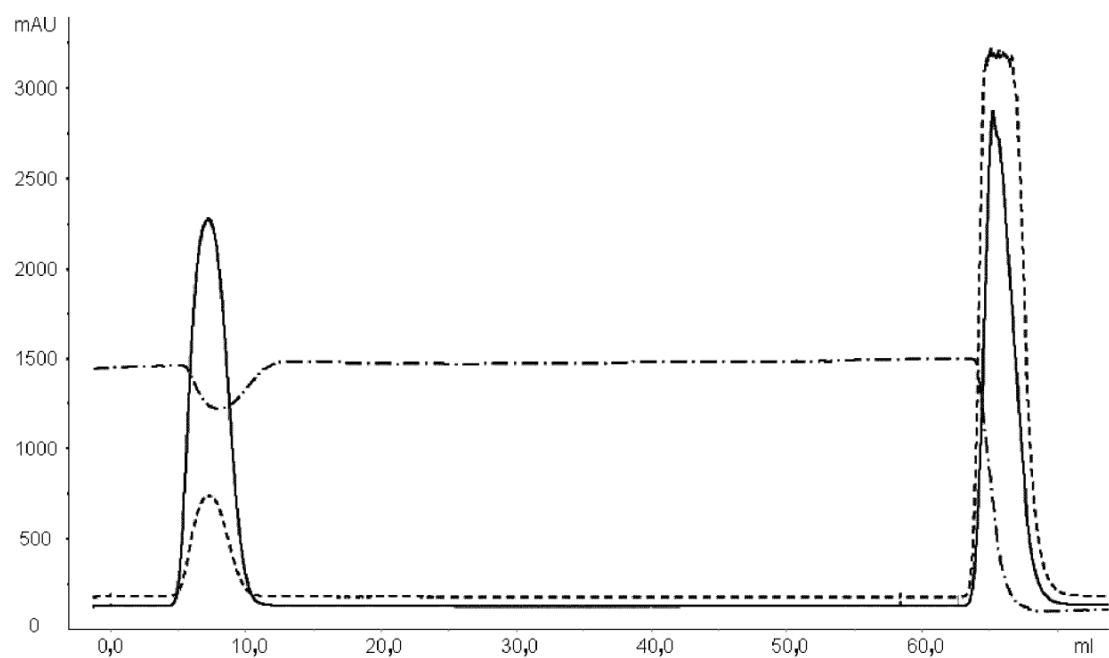


Figura 119

B

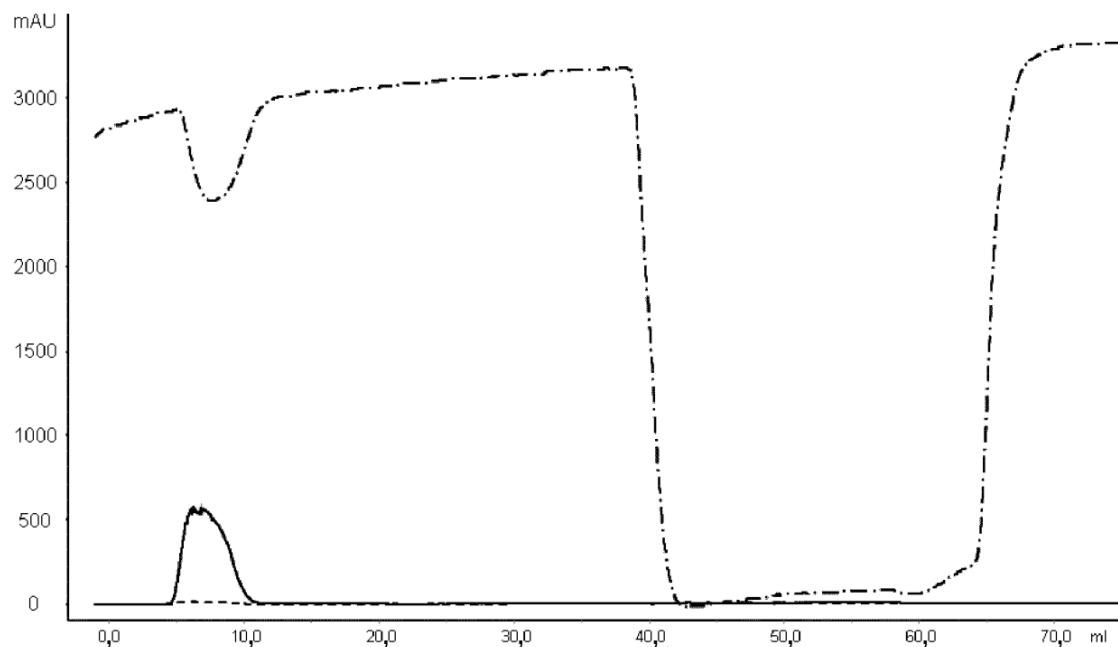


Figura 120 A

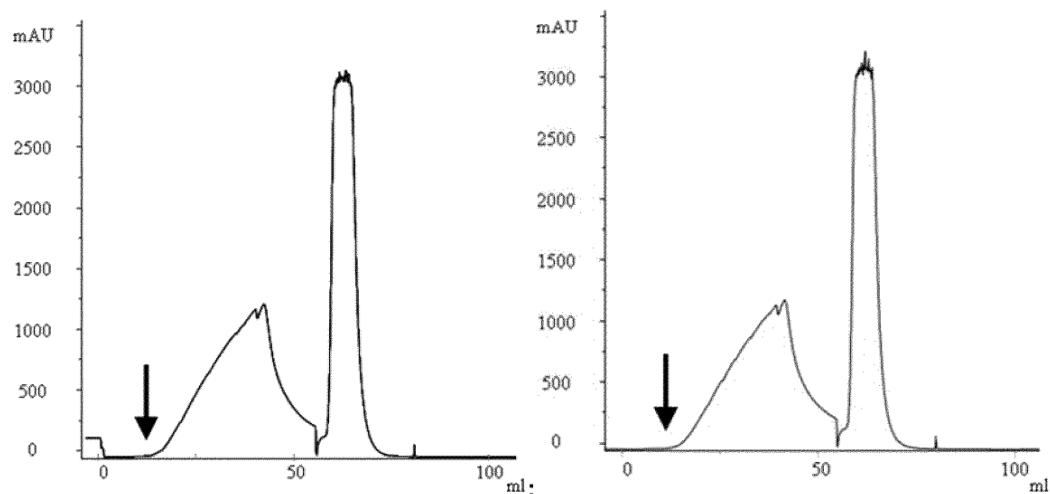


Figura 120 B

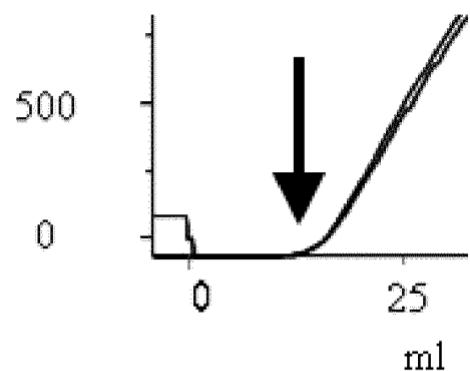


Figura 121

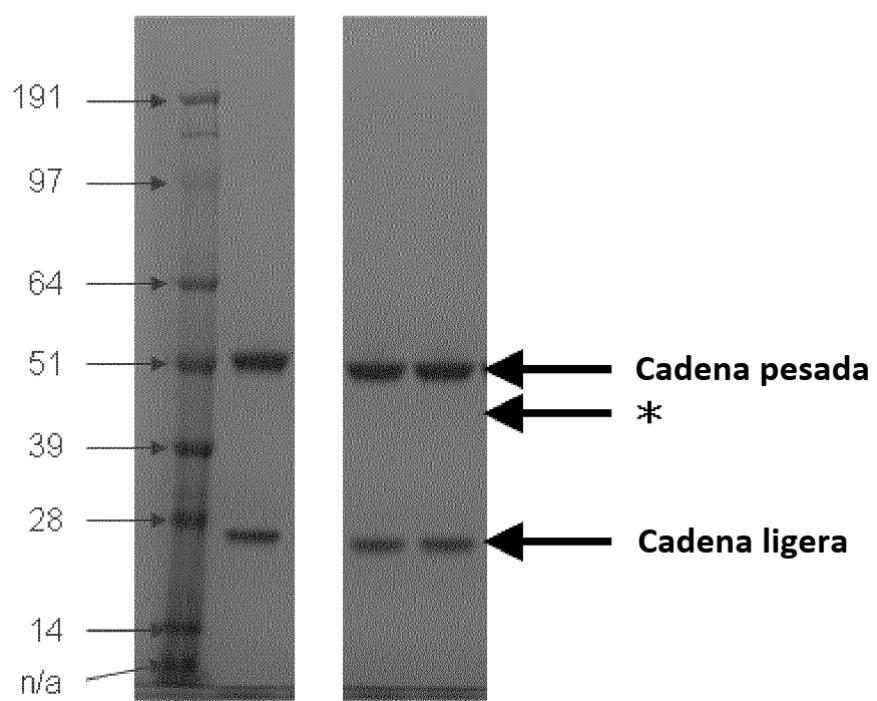


Figura 122

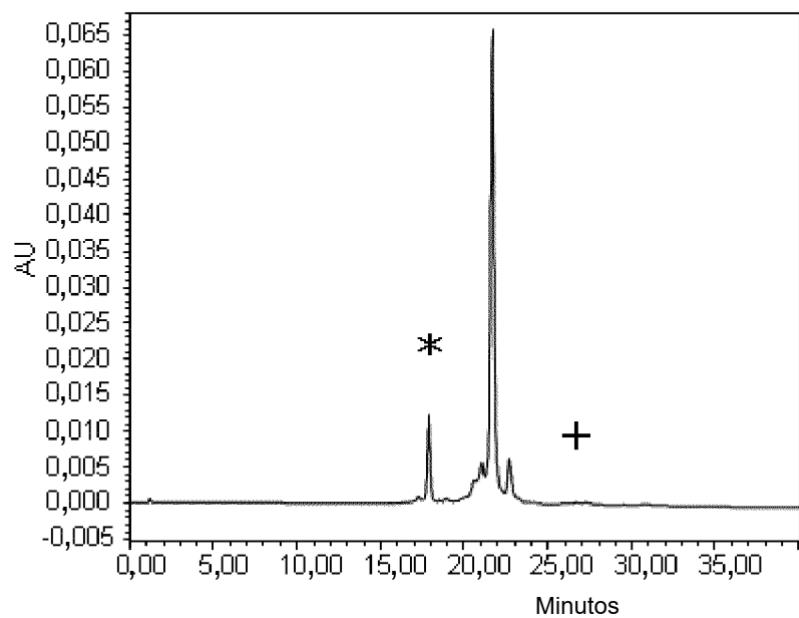


Figura 123

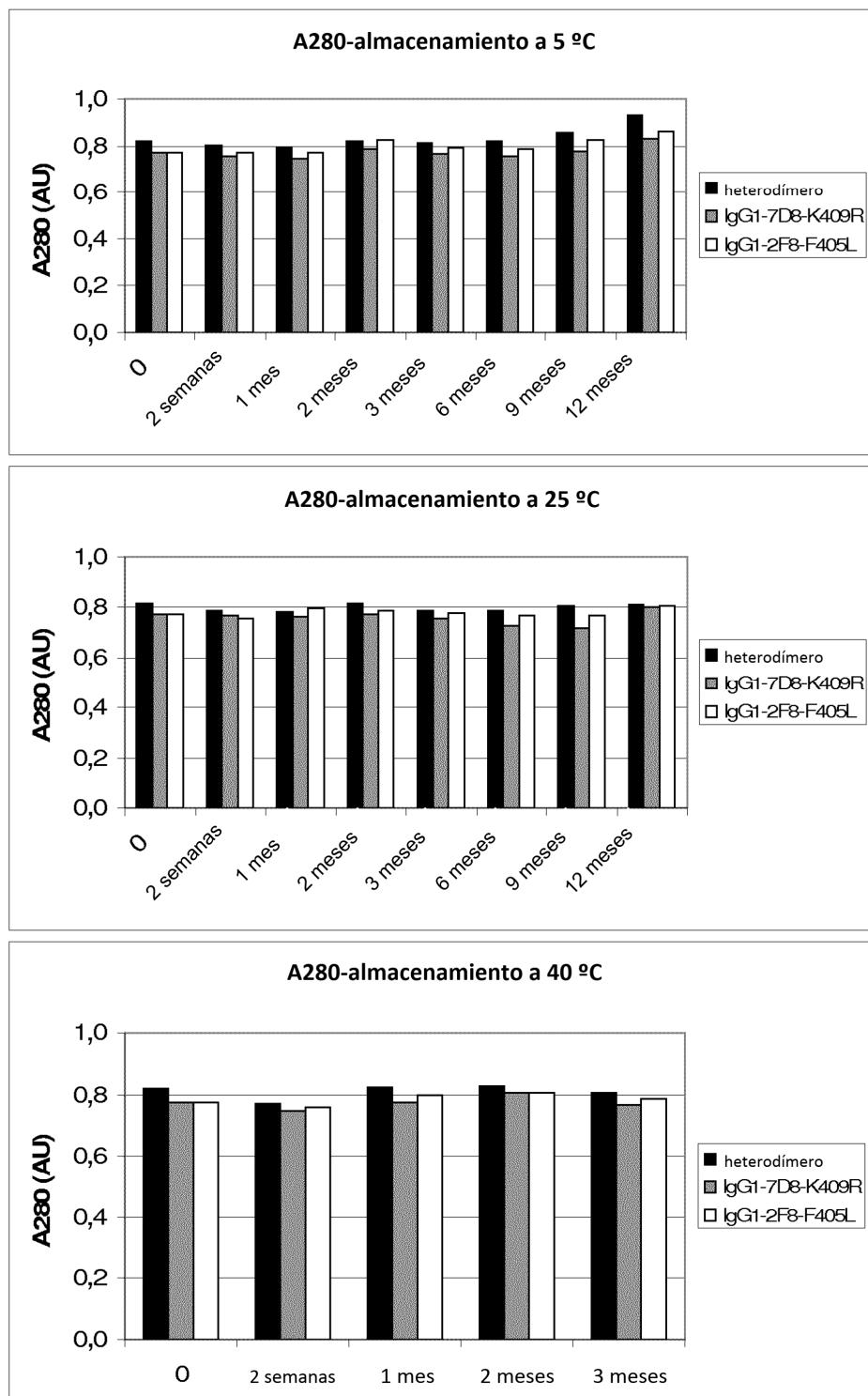


Figura 124

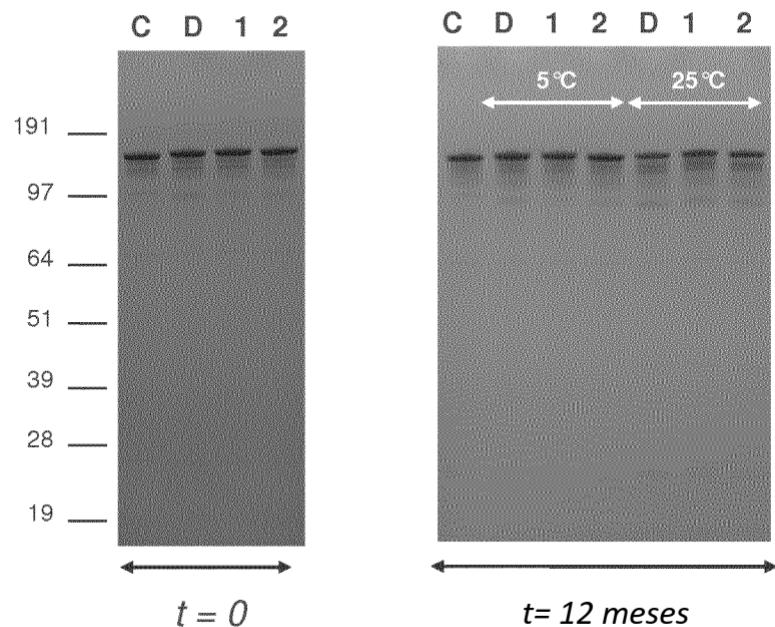


Figura 125

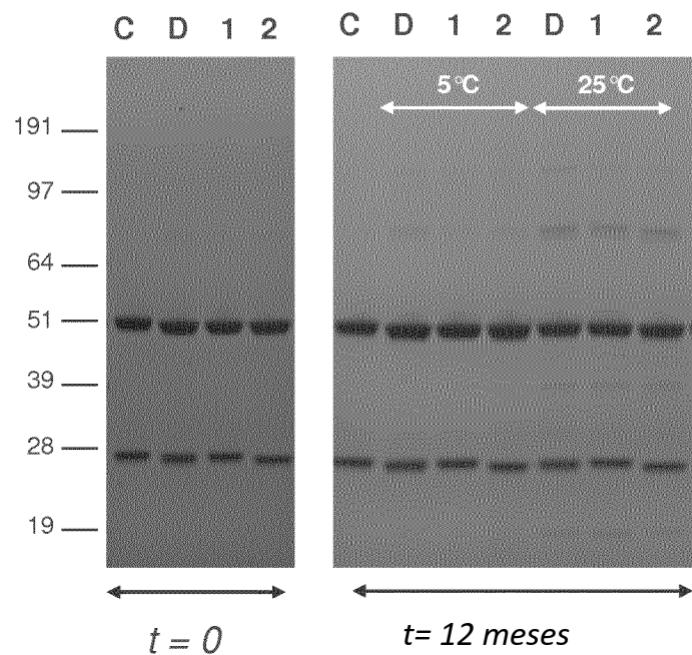


Figura 126

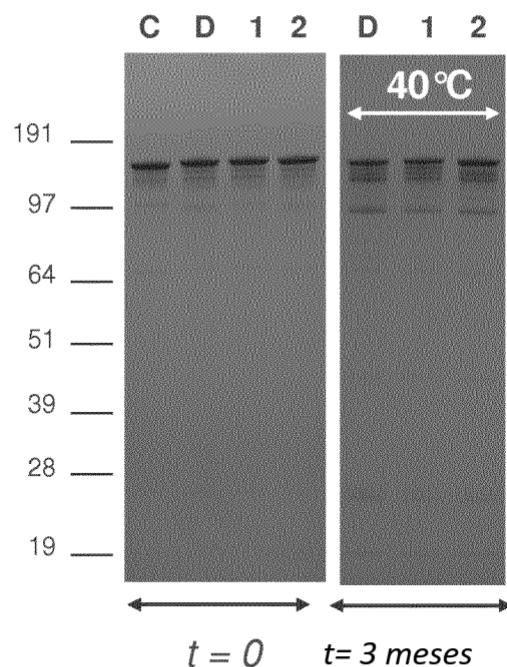
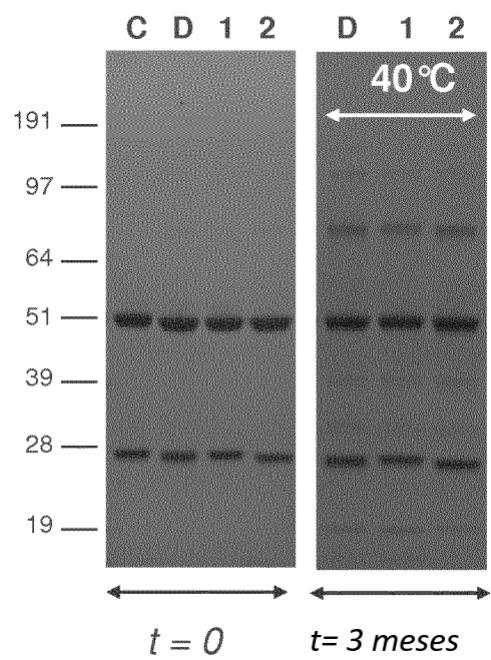


Figura 127



ES 2 739 808 T3

Figura 128

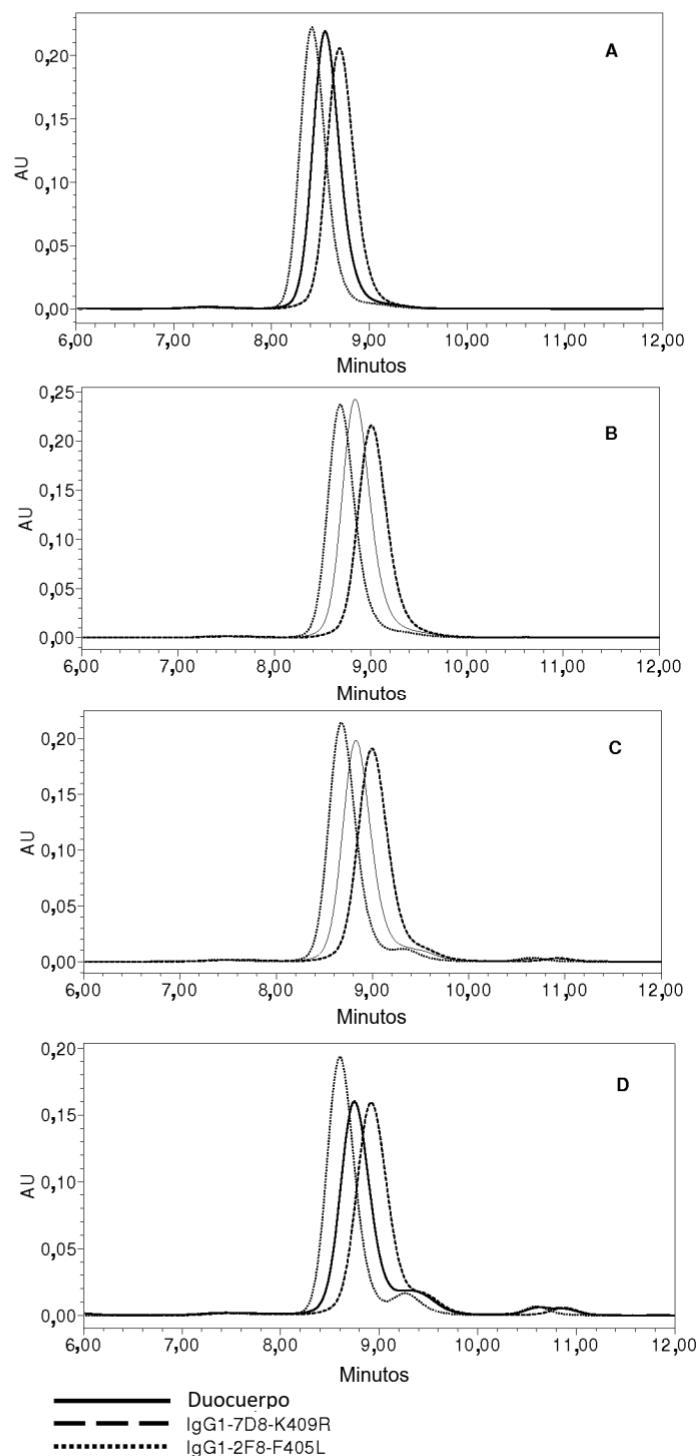


Figura 129

