

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 816 078**

51 Int. Cl.:

C12P 21/08 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2012** **PCT/US2012/070310**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2013** **WO13096291**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2012** **E 12860127 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2020** **EP 2794905**

54 Título: **Polipéptidos modificados para armazones de anticuerpo biespecífico**

30 Prioridad:

20.12.2011 US 201161577956 P

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

31.03.2021

73 Titular/es:

MEDIMMUNE, LLC (100.0%)
One MedImmune Way
Gaithersburg, MD 20878, US

72 Inventor/es:

CHOWDHURY, PARTHA S.;
OGANESYAN, VAHEH;
MAZOR, YARIV y
DIMASI, NAZZARENO

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 816 078 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

Polipéptidos modificados para armazones de anticuerpo biespecífico

5 **Campo**

La tecnología se relaciona en parte con anticuerpos modificados por ingeniería. En algunos aspectos tales anticuerpos pueden utilizarse para aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas.

10 **Antecedentes**

Los anticuerpos, que también se denominan inmunoglobulinas (Ig), son proteínas que se producen naturalmente en la sangre u otros fluidos corporales de vertebrados. Los anticuerpos son agentes del sistema inmunitario que se unen y neutralizan objetos extraños, como bacterias y virus.

15 Los anticuerpos naturales incluyen generalmente dos cadenas pesadas más grandes y dos cadenas ligeras más pequeñas. En el caso de los anticuerpos nativos de longitud completa, estas cadenas se unen para formar una proteína "en forma de Y". Las cadenas pesadas y las cadenas ligeras incluyen aminoácidos cisteína que pueden unirse entre sí mediante enlaces disulfuro. Tales enlaces disulfuro se forman generalmente entre restos de cadena lateral de tiol de los aminoácidos cisteína libres. Las cadenas pesadas se unen entre sí mediante enlaces disulfuro entre los aminoácidos cisteína en cada cadena. Cada cadena ligera se une a una cadena pesada también mediante enlaces disulfuro entre aminoácidos cisteína en las cadenas. Los aminoácidos cisteína particulares en cada cadena pesada y cadena ligera a veces se denominan "cisteínas intercadena", ya que generalmente participan en enlaces disulfuro entre cadenas de anticuerpos.

25 Cada cadena pesada (HC) tiene en un extremo un dominio variable (VH) seguido de varios dominios constantes (CH). Cada cadena ligera (LC) tiene un dominio variable (VL) en un extremo y un dominio constante (CL) en el otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. En ciertos anticuerpos de longitud completa, los dominios variables se encuentran en los extremos de cada brazo de la proteína "en forma de Y". Los dominios variables dentro de un anticuerpo nativo tienen típicamente la misma secuencia polipeptídica para cada componente de cadena pesada variable y la misma secuencia polipeptídica para cada componente de cadena ligera variable y, cuando están completamente ensamblados, cada grupo puede unirse a la misma especie antigénica. En algunos casos, un anticuerpo puede modificarse por ingeniería para que tenga dominios variables con secuencias polipeptídicas diferentes y especificidades antigénicas y/o epitópicas diferentes. A menudo tales moléculas se denominan anticuerpos "biespecíficos" y pueden ser útiles para aplicaciones de diagnóstico o terapéuticas.

Sumario

40 La presente invención proporciona un anticuerpo IgG1 biespecífico humano que comprende:
 (a) una cadena pesada modificada, en donde la región CH1 de la cadena pesada modificada comprende
 (i) una sustitución de una cisteína nativa por un aminoácido que no es cisteína, y
 (ii) una sustitución de un aminoácido que no es cisteína nativa por un aminoácido cisteína; y
 (b) una cadena ligera correspondiente modificada, en donde la región CL de la cadena ligera modificada comprende
 45 (i) una sustitución de una cisteína nativa por un aminoácido que no es cisteína, y
 (ii) una sustitución de un aminoácido que no es cisteína nativa por un aminoácido cisteína; y
 (c) una segunda cadena pesada y una segunda cadena ligera correspondiente, en donde la segunda cadena pesada y la segunda cadena ligera correspondiente no comprenden una sustitución de un aminoácido que no es cisteína nativa por un aminoácido cisteína y no comprenden una sustitución de una cisteína nativa por un aminoácido que no es cisteína; y
 50 en donde la cadena pesada modificada y la cadena ligera correspondiente modificada se seleccionan del grupo que consiste en variantes
 a. que comprenden un dominio CH1 en donde el aminoácido en la posición 141 está sustituido por cisteína y la cisteína en la posición 220 está sustituida por un aminoácido que no es cisteína; y un dominio CL en donde el aminoácido en la posición 116 está sustituido por cisteína y la cisteína en la posición 214 está sustituida por un aminoácido que no es cisteína;
 55 b. un dominio CH1 en donde el aminoácido en la posición 168 está sustituido por cisteína y la cisteína en la posición 220 está sustituida por un aminoácido que no es cisteína; y un dominio CL en donde el aminoácido en la posición 164 está sustituido por cisteína y la cisteína en la posición 214 está sustituida por un aminoácido que no es cisteína;
 c. un dominio CH1 en donde el aminoácido en la posición 126 está sustituido por cisteína y la cisteína en la posición 220 está sustituida por un aminoácido que no es cisteína; y un dominio CL en donde el aminoácido en la posición 121 está sustituido por cisteína y la cisteína en la posición 214 está sustituida con un amino que no es cisteína;
 60 en donde la numeración se realiza según el índice de UE.

Los anticuerpos IgG1 biespecíficos humanos descritos anteriormente pueden comprender,
 65 (a) dos cadenas ligeras que comprenden cada una un dominio VL y un dominio CL, en donde los dominios VL tienen secuencias de aminoácidos diferentes y los dominios CL tienen secuencias de aminoácidos diferentes; y/o

(b) dos cadenas pesadas que comprenden cada una un dominio VH, un dominio CH1 y una región Fc, en donde los dominios VH tienen secuencias de aminoácidos diferentes, los dominios CH1 tienen secuencias de aminoácidos diferentes y las regiones Fc tienen secuencias de aminoácidos diferentes, opcionalmente en donde una cadena ligera es una cadena ligera kappa y una cadena ligera es una cadena ligera lambda. En tales anticuerpos, las dos cadenas pesadas forman un heterodímero.

El anticuerpo IgG1 biespecífico humano descrito anteriormente se une específicamente a dos antígenos independientes o a dos epítomos independientes en el mismo antígeno.

- 10 Los anticuerpos IgG1 biespecíficos humanos descritos anteriormente pueden tener una región Fc que comprende una primera cadena pesada y una segunda cadena pesada y las modificaciones en el dominio CH3 de la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada se seleccionan de los pares que consisten en
 - (i) una modificación de T366Y en el dominio CH3 de la primera cadena pesada, y una modificación de Y407T en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada;
 - 15 (ii) una modificación de T366W en el dominio CH3 de la primera cadena pesada, y una modificación de Y407A en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada;
 - (iii) una modificación de T366Y en el dominio CH3 de la primera cadena pesada, y una modificación de Y407T en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada;
 - (iv) una modificación de T394W en el dominio CH3 de la primera cadena pesada, y una modificación de F405A en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada;
 - 20 (v) modificaciones de T366Y y F405A en el dominio CH3 de la primera cadena pesada, y modificaciones de T394W e Y407T en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada;
 - (vi) modificaciones de T366W y F405W en el dominio CH3 de la primera cadena pesada, y modificaciones de T394S e Y407A en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada;
 - 25 (vii) una modificación de F405W en el dominio CH3 de la primera cadena pesada, y una modificación de T394S en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada;
 - (viii) una modificación de D399C en el dominio CH3 de la primera cadena pesada, y una modificación de K392C en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada;
 - (ix) una modificación de T366W en el dominio CH3 de la primera cadena pesada, y modificaciones de T366S, L368N e Y407V en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada;
 - 30 (x) modificaciones de T366W y D399C en el dominio CH3 de la primera cadena pesada, y modificaciones de T366S, L368N, K392C e Y407V en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada;
 - (xi) modificaciones de T366W y K392C en el dominio CH3 de la primera cadena pesada, y modificaciones de T366S, D399C, L368N e Y407V en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada;
 - 35 (xii) modificaciones de S354C y T366W en el dominio CH3 de la primera cadena pesada, y modificaciones de Y349C, T366S, L368N e Y407V en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada;
 - (xiii) modificaciones de Y349C y T366W en el dominio CH3 de la primera cadena pesada, y modificaciones de S354C, T366S, L368A e Y407V en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada;
 - (xiv) modificaciones de E356C y T366W en el dominio CH3 de la primera cadena pesada, y modificaciones de Y349C, T366S, L368A e Y407V en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada;
 - 40 (xv) modificaciones de Y349C y T366W en el dominio CH3 de la primera cadena pesada, y modificaciones de E356C, T366S, L368N e Y407V en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada;
 - (xvi) modificaciones de E357C y T366W en el dominio CH3 de la primera cadena pesada, y modificaciones de Y349C, T366S, L368N e Y407V en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada;
 - 45 (xvii) modificaciones de Y349C y T366W en el dominio CH3 de la primera cadena pesada, y modificaciones de E357C, T366S, L368A, Y407V en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada;
 - (xviii) modificaciones de K370E, D399K y K439D en el dominio CH3 de la primera cadena pesada y modificaciones de D356K, E357K y K409D en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada;
 - (xix) una modificación de K409D en el dominio CH3 de la primera cadena pesada, y una modificación de D399K en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada;
 - 50 (xx) una modificación de K409E en el dominio CH3 de la primera cadena pesada, y una modificación de D399K en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada;
 - (xxi) una modificación de K409E en el dominio CH3 de la primera cadena pesada, y una modificación de D399R en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada;
 - 55 (xxii) una modificación de K409D en el dominio CH3 de la primera cadena pesada, y una modificación de D399R en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada;
 - (xxiii) una modificación de D339K en el dominio CH3 de la primera cadena pesada, y una modificación de E356K en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada;
 - (xxiv) modificaciones de D399K y E356K en el dominio CH3 de la primera cadena pesada y modificaciones de K409D y K392D en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada;
 - 60 (xxv) modificaciones de D399K y E356K en el dominio CH3 de la primera cadena pesada y modificaciones de K409D y K439D en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada;
 - (xxvi) modificaciones de D399K y E357K en el dominio CH3 de la primera cadena pesada, y modificaciones de K409D y K370D en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada;
 - 65 (xxvii) modificaciones de D399K, E356K y E357K en el dominio CH3 de la primera cadena pesada, y modificaciones de K409D, K392D y K370D en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada;

(xxiii) modificaciones de D399K y E357K en el dominio CH3 de la primera cadena pesada, y modificaciones de K409D y K392D en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada;

(xxx) modificaciones de K392D y K409D en el dominio CH3 de la primera cadena pesada y una modificación de D399K en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada; y

5 (xxxi) modificaciones de K409D y K360D en el dominio CH3 de la primera cadena pesada y una modificación de D399K en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada, en donde la numeración se realiza según el índice de UE. La región Fc de una o ambas cadenas pesadas puede comprender las sustituciones de aminoácidos H435R e Y436F que alteran la unión a la proteína A. Además, la región Fc puede comprender:

10 (a) la región Fc de cadena pesada modificada comprende la sustitución de aminoácido T366W, y la segunda región Fc de cadena pesada comprende la sustitución de aminoácidos Y407V, T366S y L368A o

(b) la región Fc de cadena pesada modificada comprende la sustitución de aminoácidos Y407V, T366S y L368A y la segunda región Fc de cadena pesada comprende la sustitución de aminoácido T366W. Además, la Región Fc puede comprender:

15 (a) la región Fc de cadena pesada modificada comprende además la sustitución de aminoácido S354C, y la segunda región Fc de cadena pesada comprende además la sustitución de aminoácido Y349C; o

(b) la región Fc de cadena pesada modificada que comprende además la sustitución de aminoácido Y349C, y la segunda región Fc de cadena pesada comprende además la sustitución de aminoácido S354C.

20 Los anticuerpos IgG1 biespecíficos humanos descritos anteriormente pueden comprender además modificaciones de M252Y, S254T y T256E en la región Fc.

La presente invención incluye composiciones que comprenden los anticuerpos IgG1 biespecíficos humanos descritos anteriormente y un excipiente.

25 La presente invención incluye células que comprenden

(a) un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de cadena ligera correspondiente modificado descrito anteriormente y una secuencia de nucleótidos que codifica el segundo polipéptido de cadena ligera correspondiente descrito anteriormente; y

30 (b) un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de cadena pesada modificado descrito anteriormente y una secuencia de nucleótidos que codifica el segundo polipéptido de cadena pesada descrito anteriormente.

La presente invención incluye un método para expresar un anticuerpo que comprende poner en contacto una pluralidad de células como anteriormente en condiciones en las cuales se expresan los polipéptidos.

35 **Breve descripción de los dibujos**

Los dibujos ilustran aspectos de la tecnología y no son limitantes. Para claridad y facilidad de ilustración, los dibujos no están hechos a escala y, en algunos casos, varios aspectos pueden mostrarse exagerados o ampliados para facilitar la comprensión de aspectos particulares.

Figura 1 muestra ilustraciones de anticuerpos. Los anticuerpos precursores monoespecíficos bivalentes parentales se ilustran en el panel A. Los anticuerpos biespecíficos monovalentes representativos (MBab) se ilustran en el panel B. La estrella en la cadena pesada que comprende el "Ojal" representa la modificación por ingeniería para eliminar la unión a la proteína A de la cadena "Ojal". A continuación se contemplan y describen construcciones de MBab adicionales. El MBab a la izquierda comprende una interfaz HC-LC de tipo silvestre en un brazo y una interfaz HC-LC modificada por ingeniería de cisteína en el otro brazo para reubicar el enlace disulfuro intercadena. El enlace disulfuro puede reubicarse dentro de la interfaz CH1-CL como se muestra, o puede reubicarse en la interfaz VL-VH como se describe en este documento. El MBab a la derecha comprende una interfaz de HC-LC modificada por ingeniería en cada brazo, en donde las regiones de interfaz se han modificado por ingeniería para favorecer interacciones específicas de interfaz de HC-LC, que pueden incluir la sustitución de los restos de cisteína nativa involucrados en la formación de enlaces disulfuro entre las regiones CL y CH1 (indicadas por líneas discontinuas). Ambos MBab se modificaron por ingeniería en la región Fc (p.ej., CH3) para favorecer la heterodimerización de la cadena pesada. Las especificidades de unión de las regiones Fab pueden dirigirse a cualquier diana deseada. Las especificidades de unión indicadas son para los anticuerpos utilizados en los ejemplos de este documento. Los anticuerpos parentales pueden unirse a uno de cuatro antígenos: IL-6, RAGE, EGFR o HER2. El anticuerpo biespecífico monovalente (MBab) puede unirse tanto a IL-6 como a RAGE o tanto a EGFR como a HER2.

Figura 2 muestra una representación tridimensional de un anticuerpo biespecífico monovalente (MBab) que tiene un brazo que se une a IL-6 y un segundo brazo que se une a RAGE. La flecha indica la ubicación de las mutaciones de la cadena pesada en la región constante de cadena pesada que facilitan la heterodimerización. La región Fab entre corchetes se muestra ampliada a la derecha. Las flechas indican las ubicaciones de las modificaciones en la variante 10 (V10; HC: A141C - LC: F116C); las modificaciones en la variante 11 (V11; HC: H168C - LC: T164C); y las modificaciones en la variante 12 (V12; HC: F126C - LC: S121C). Se muestran modificaciones adicionales que eliminan las cisteínas nativas (-Cys; p.ej., HC: C220V - LC: C214V) no se muestran, pero están presentes en las variantes 10-12 (V10-V12).

Figuras 3A a 3C ilustran vectores de expresión de MBab representativos que hacen uso de un único marcador de selección de mamífero. Figuras 3A y 3B muestran vectores para expresión de dos cadenas ligeras kappa o lambda y Figura 3C muestra un vector para la expresión de dos cadenas pesadas. Se podría generar fácilmente otro vector de cadena ligera que exprese una cadena lambda y una cadena kappa. Usando tales vectores pueden generarse numerosas combinaciones, incluyendo por ejemplo; Kappa WT/Kappa V12, Lambda WT/Lambda V12, Kappa WT/Lambda V12 y Lambda WT/Kappa V12. Cada vector puede expresar dos cadenas ligeras diferentes o dos cadenas pesadas diferentes. Cada cadena se expresa por separado utilizando su propio promotor. Cada vector comprende varios sitios de restricción que facilitan la clonación rápida de diferentes regiones variables. Cada vector también comprende marcadores de selección bacterianos y de mamíferos además de un origen de replicación bacteriano y una secuencia oriP que puede ser útil en combinación con secuencias de EBNA para mejorar el mantenimiento y la expresión de plásmidos en sistemas de mamíferos. La expresión de las dos cadenas ligeras de un primer vector y dos cadenas pesadas de un segundo vector minimiza la producción de cadenas pesadas homodimerizadas y otros productos no deseados que podrían resultar de la transformación de células con un solo vector. Por ejemplo, las cadenas pesadas típicamente no se secretan eficazmente sin cadenas ligeras y las cadenas ligeras típicamente no pueden purificarse mediante cromatografía de proteína A sin cadenas pesadas. Por tanto, cualquier célula secretora de proteína A que se une a anticuerpos llevará el primer y el segundo plásmidos que expresan las dos cadenas ligeras y las dos cadenas pesadas.

Figura 4 muestra el análisis SDS-PAGE en condiciones no reductoras de las variantes 10, 11 y 12 de anticuerpos monovalentes biespecíficos (MBab) IL6/RAGE (V10, V11 y V12), cada uno con un enlace disulfuro intercadena alternativo (es decir, reubicado) en la parte anti-RAGE de la molécula. El panel izquierdo muestra sobrenadantes de cultivo de células HEK293F transfectadas con vectores pMBab, como se describe en Ejemplo 1 y Ejemplo 5, para la expresión de: anti-IL6 WT + anti-RAGE WT (carril 1); anti-IL6 WT + anti-RAGE (-Cys) (carril 2); pesada anti-IL6 WT + anti-RAGE V10 (carril 3); anti-IL6 WT + anti-RAGE V11 (carril 4); y anti-IL6 WT + anti-RAGE V12 (carril 5). Cada cadena pesada incluía modificaciones de CH3 para facilitar la heterodimerización de HC, y las modificaciones de V10, V11 y V12 también incluían modificaciones -Cys. En el panel derecho, las flechas indican: 2H2L (aproximadamente 150 kDa) - IgG con 2 cadenas pesadas y 2 cadenas ligeras; 2H1L (aproximadamente 125 kDa) - IgG no tiene una cadena ligera; y 1L (aproximadamente 25 kDa) - cadena ligera libre. La variante -Cys dio como resultado la producción de una cadena ligera no emparejada que se solucionan mediante la introducción de variantes de enlace disulfuro descritas en este documento, con V12 teniendo el emparejamiento LC/HC más eficaz.

Figura 5 muestra una determinación de la biespecificidad de los anticuerpos IL6/RAGE usando un barrido con AlphaLISA. Las variantes -Cys no tenían enlaces disulfuro entre cadenas en el Fab anti-RAGE. Las variantes V10, V11 y V12 tenían enlaces disulfuro intercadena alternativos en el Fab anti-RAGE. La variante V12 produjo casi el 100 % de IgG biespecífica, mientras que los Fabs WT dieron como resultado menos del 30 %. Cada una de las variantes -Cys, V10 y V11 mostraron una mejora modesta (aproximadamente 42 %, aproximadamente 40 % y aproximadamente 33 %, respectivamente).

Figura 6A y Figura 6B muestran análisis SEC y de dispersión de luz de anticuerpo de la variante 12 anti-IL6 WT/anti-RAGE (V12) de anticuerpo biespecífico monovalente (MBab) y anticuerpos parentales. Figura 6A muestra trazas de UV por SEC para anticuerpos parentales purificados por SEC (parte superior izquierda y derecha) y MBab V12 anti-IL6 WT/anti-RAGE (parte inferior media) purificado por SEC. Cada traza mostró que el material purificado era en gran parte monomérico. Los anticuerpos parentales anti-RAGE y anti-IL6 tuvieron tiempos de retención de 24,61 y 26,27 minutos, respectivamente, mientras que el MBab V12 anti-IL6 WT/anti-RAGE tuvo un tiempo de retención intermedio de 25,85, que mostró que el MBab presentaba un perfil monomérico y mostraba propiedades de los dos MAb parentales. Figura 6B muestra una traza de UV por SEC para MBab V12 anti-IL6 WT/anti-RAGE purificado de proteína A (panel izquierdo) y la traza de dispersión de luz correspondiente (panel derecho), que mostró que el material purificado de proteína A estaba compuesto de IgG intacta aproximadamente al 85 % que tiene 2H2L, IgG aproximadamente al 10 % que tiene 1H1L (mitad de IgG) y aproximadamente 5 % de agregados.

Figuras 7A-C muestran el análisis de una construcción MBab-RF que comprende una cadena ligera lambda para unión al antígeno A (la cadena pesada del antígeno A comprende "Ojal" además de la sustitución "RF") y una cadena ligera kappa para la unión al antígeno B (la cadena pesada del antígeno comprende "Botón"). Figura 7A muestra el análisis SDS-PAGE (izquierda), Carril 1: MBab-RF purificado de proteína A sin reducción, Carril 2: MBab-RF purificado de proteína A con reducción y traza de UV por SEC (derecha) para MBab-RF purificado de proteína A. Figura 7B muestra el perfil de migración de anticuerpos parentales y MBab-RF purificados con proteína A en condiciones no reductoras. Figura 7C muestra el perfil de migración de MBab-RF purificado de proteína A en condiciones reductoras, cadena ligera de antígeno A (LC-A), cadena ligera de antígeno B (LC-B), cadena pesada de antígeno A (HC-A), cadena pesada de antígeno B (HC-B), se indican los tiempos de migración.

Figuras 8A-C muestran el análisis de la construcción MBab-RF purificada de LambdaSelect que comprende una cadena ligera lambda para unión al antígeno A (la cadena pesada del antígeno A comprende "Ojal" además de la sustitución "RF") y una cadena ligera kappa para unión al antígeno B (la cadena pesada del antígeno comprende "Botón"). Figura 8A muestra el análisis SDS-PAGE (izquierda), Carriles 1, 5: MBab-RF purificado de proteína A, Carriles 2, 6: MBab-RF purificado de proteína A + LambdaSelect, Carriles 3, 7: Flujo continuo de LambdaSelect, Carriles 4, 8: precursor B purificado de proteína A; y traza de UV por SEC (derecha) para MBab-RF purificado de proteína A + LambdaSelect. Figura 8B muestra el perfil de migración del flujo continuo de LambdaSelect en condiciones reductoras. Figura 8C muestra el

perfil de migración de MBab-RF purificado de proteína A + LambdaSelect en condiciones reductoras, cadena ligera de antígeno A (LC-A), cadena ligera de antígeno B (LC-B), cadena pesada de antígeno A (HC-A), cadena pesada de antígeno B (HC-B), se indican los tiempos de migración.

5 Figura 9A y Figura 9B muestran la biespecificidad del anticuerpo monovalente variante 12 anti-IL6 WT/anti-RAGE (MBab V12 IL6/RAGE), según lo determinado por análisis Octet. Figura 9A muestra trazas completas que incluyen una parte de
10 captura de anticuerpos (10 microgramos/ml), valor inicial y partes de unión a RAGE e IL6. Figura 9B muestra una ampliación del valor inicial, partes de unión a RAGE e IL6 que se unen a las trazas. Los dos anticuerpos parentales mostraron un aumento único de la señal como respuesta a la unión a su antígeno específico, mientras que el MBab V12 anti-IL6 WT/anti-RAGE mostró un aumento de la señal como respuesta tanto a RAGE como a IL6, lo que demostró biespecificidad y unión simultánea al antígeno. El MBab V12 anti-IL6 WT/anti-RAGE tenía un perfil de unión simultánea idéntico al biespecífico purificado 2X generado por coexpresión de los dos anticuerpos parentales seguido de purificación por afinidad secuencial en columnas de afinidad IL-6 y RAGE.

15 Figura 10A y Figura 10B muestran la cinética de unión del MBab V12 anti-IL6/anti-RAGE y los anticuerpos parentales. Las afinidades de unión del MBab V12 anti-IL6 WT/anti-RAGE para IL6 (Figura 10A) y RAGE (Figura 10B) fueron comparables a los anticuerpos parentales (anti-IL6 y anti-RAGE).

Figuras 11A a 11D muestran la expresión y el análisis del anticuerpo biespecífico monovalente variante 12 anti-EGFR WT/anti-HER2 (MBab V12 EGFR/HER2). Figura 11A muestra el análisis SDS-PAGE en condiciones no reductoras de MBab V12 EGFR/HER2 a la derecha y una ilustración esquemática de MBab V12 EGFR/HER2 a la izquierda. Las flechas indican 2H2L (aproximadamente 150 kDa) - IgG con 2 cadenas pesadas y 2 cadenas ligeras, y 1H1L (aproximadamente 75 kDa) - mitad de IgG con 1 cadena pesada y 1 cadena ligera. Figura 11B muestra el análisis SEC de MBab V12 EGFR/HER2. Antes de SEC, el material purificado de proteína A tenía un perfil SEC de aproximadamente 90 % del monómero, aproximadamente 10 % de mitad de IgG y menos del 3 % de agregados (panel superior). Después de SEC preparativa, el MBab V12 EGFR/HER2 monomérico representaba más del 99 % de la muestra (panel inferior). Figura 9C muestra trazas UV por SEC para anticuerpos parentales purificados por SEC (parte superior izquierda y derecha) y MBab V12 anti-EGFR WT/anti-HER2 purificado por SEC (parte media inferior). Todos eran en gran parte monoméricos. Los anticuerpos parentales anti-EGFR y anti-HER2 tuvieron tiempos de retención de 8,745 y 8,899 minutos, respectivamente, mientras que el MBab V12 anti-EGFR WT/anti-HER2 tuvo un tiempo de retención intermedio de 8,857, lo que mostró que el MBab presentaba propiedades intermedias de los dos precursores. Figura 9D muestra una superposición de las trazas de dispersión de luz para el MBab V12 anti-EGFR WT/anti-HER2 y los anticuerpos parentales, lo que mostró que el MBab V12 anti-EGFR WT/anti-HER2 tenía la masa molecular esperada de aproximadamente 150 kDa para un anticuerpo monomérico.

Figura 12A y Figura 12B muestran la biespecificidad del anticuerpo biespecífico monovalente V12 anti-EGFR WT/anti-HER2 (MBab V12 EGFR/HER2), según lo determinado por análisis Octet (formato de captura I). Figura 12A muestra trazas completas que incluyen una parte de captura de anticuerpos (20 microgramos/ml), valor inicial y partes de unión a HER2 y de unión a EGFR. Figura 12B muestra una ampliación del valor inicial, partes de unión a HER2 y EGFR de las trazas. Los dos anticuerpos parentales mostraron un aumento único de la señal como respuesta a la unión a su antígeno específico, mientras que el MBab V12 EGFR/HER2 mostró un aumento de la señal, respuesta tanto a HER2 como a EGFR, lo que demostró biespecificidad y unión antigénica simultánea. Como anticuerpo de control negativo se usó NMGC, que no se une ni a HER2 ni a EGFR.

Figura 13A y Figura 13B muestran biespecificidad del anticuerpo biespecífico monovalente V12 anti-EGFR WT/anti-HER2 (MBab V12 EGFR/HER2), según lo determinado por análisis Octet (formato de captura II). Figura 13A muestra trazas completas que incluyen una captura de anticuerpo en el antígeno EGFR, valor inicial y partes de unión al antígeno HER2. Figura 13B muestra trazas completas que incluyen una captura de anticuerpo en el antígeno HER2, valor inicial y partes de unión al antígeno EGFR. Los dos anticuerpos parentales mostraron un aumento único de la señal como respuesta a la unión a su antígeno específico, mientras que el MBab V12 EGFR/HER2 mostró un aumento de la señal, respuesta tanto a HER2 como a EGFR, lo que demostró biespecificidad y unión antigénica simultánea.

Figura 14A y Figura 14B muestran estudios de estabilidad térmica utilizando análisis de calorimetría de barrido diferencial. Figura 14A muestra termogramas para Anti-HER2 (anti-HER2; parte superior izquierda) y Anti-EGFR (anti-EGFR; parte inferior derecha). El termograma anti-HER2 mostró dos transiciones; el Fab era muy estable y su TM se superponía con la TM de CH3 a aproximadamente 81 °C, y el CH2 tenía una TM de aproximadamente 69 °C. El termograma anti-EGFR muestra cuatro transiciones. Figura 11B muestra termogramas para el anticuerpo biespecífico monovalente variante 12 anti-EGFR WT/anti-HER2 (MBab V12 EGFR/HER2). La desconvolución del termograma de MBab V12 EGFR/HER2 (parte superior izquierda) reveló 4 transiciones; la transición a aproximadamente 60 °C correspondía a los dominios variables de Cetuximabanti-EGFR, la transición a aproximadamente 73 °C correspondía a los dominios de Cetuximabanti-EGFR CH1 y Ck, la transición a aproximadamente 70 °C correspondía a los dominios CH2 y CH3 (botón en ojal), la transición a aproximadamente 81 °C correspondía al Fab anti-HER2 modificado por ingeniería en el MBab que tenía un enlace disulfuro alternativo. La correspondencia también se muestra mediante superposición de los termogramas (parte inferior derecha).

Figuras 15A y 15B muestran propiedades de unión celular del anticuerpo biespecífico monovalente variante 12 anti-EGFR WT/anti-HER2 (MBab V12 EGFR/HER2), según lo determinado por análisis de citometría de flujo. MBab V12 anti-EGFR/HER2 unido a células que expresan diferentes niveles de EGFR y HER2, similar al anticuerpo parental cuya tienen era predominante para el tipo de célula particular. Figura 15A muestra la unión a células A431 epidérmicas (izquierda) y células BxPC-3 pancreáticas (derecha). Estas células expresan niveles más altos de EGFR y expresan niveles más bajos de HER2. Figura 15B muestra la unión a células SKBR-3 de mama (izquierda) y a células SK-OV-3 de ovario (derecha). Estas células expresan niveles más altos de HER2 y expresan niveles más bajos de EGFR. Como anticuerpo secundario para detección se usó FITC de Fc de IgG anti-Hu. Como anticuerpo de control negativo se usó NMGC, que no se une a HER2 o EGFR. Los niveles de expresión diana se muestran en las tablas.

Figuras 16A a 16C muestran propiedades de citotoxicidad del anticuerpo biespecífico monovalente variante 12 anti-EGFR WT/anti-HER2 (MBab V12 anti-EGFR/HER2), según lo determinado por los ensayos de inhibición del crecimiento. MBab V12 anti-EGFR/HER2 inhibió el crecimiento celular en la misma medida que una combinación de anticuerpos parentales inhibió el crecimiento celular en varios tipos de células. Un efecto de eliminación aditivo se consiguió cuando los niveles de EGFR fueron similares o superiores a los de HER2, como se observa para células A431 y BxPC-3. Figura 16A muestra la inhibición del crecimiento de células A431 epidérmicas (superior) y células BxPC-3 pancreáticas (inferior). Estas células expresan niveles más altos de EGFR y expresan niveles más bajos de HER2. Figura 16B muestra la inhibición del crecimiento de células SK-OV-3 de ovario (inferior) y células SKBR-3 de mama (superior). Estas células expresan niveles más elevados de HER2, expresan niveles bajos de EGFR. Como anticuerpo secundario para detección se usó FITC de Fc de IgG anti-Hu. Como anticuerpo de control negativo se usó NMGC, que no se une a HER2 o EGFR. Los niveles de expresión diana se muestran en las tablas. Figura 16C muestra datos de inhibición para células A431, replicadas como un gráfico lineal.

Figura 17A y Figura 17B muestran unión a FcγRIIIa y C1q y actividad de ADCC. Figura 17A muestra unión al anticuerpo biespecífico monovalente variante 12 anti-EGFR WT/anti-HER2 purificado (MBab V12 Anti-EGFR/HER2) y anticuerpos parentales contra FcγRIIIa (parte superior izquierda) y C1q (parte inferior derecha), usando ELISA directo. Figura 17B muestra estudios de citotoxicidad de células dependientes de anticuerpos (ADCC) usando células A431. El MBab provocó actividad de ADCC específica al mismo nivel que el tratamiento combinado con anticuerpos parentales. El anticuerpo de control NMGC y el anti-HER2 parental no mostraron actividad de ADCC, mientras que el anti-EGFR parental demostró una fuerte actividad de ADCC. Los ensayos -KC incluyeron todos los componentes del ensayo excepto Linfocitos Citolíticos.

Figura 18 muestra un diagrama que representa el papel de la afinidad/avidez que regula la actividad de MBab. El panel superior muestra que a una concentración alta de MBab los efectos de avidez no entran en juego, por tanto, la unión al receptor estará mediada mediante el dominio de unión de alta afinidad, por tanto, no hay reticulación/activación del receptor. El panel inferior muestra que a una concentración baja de MBab, los efectos de avidez entran en juego, por tanto, la unión al receptor estará mediada por ambos dominios de unión, lo que conducirá a reticulación/activación del receptor.

Figura 19 muestra un diagrama que representa una aplicación para los MBab donde la homodimerización o la reticulación del receptor es indeseable y/o donde ambos antígenos están restringidos selectivamente a las células/tejidos diana. El panel izquierdo muestra la unión monovalente de baja avidez del MBab a células no diana que es insuficiente para provocar homodimerización. El panel derecho muestra unión bivalente de mayor avidez del MBab a ambos antígenos al mismo tiempo en células diana. La unión bivalente puede mejorar la unión preferente a células diana al unir las dos dianas simultáneamente y puede mejorar la dimerización del receptor.

Figura 20A-C muestra unión preferente y mejora selectiva de MBab. Figura 20A muestra un diagrama del ensayo de detección biológica utilizado para demostrar la unión simultánea de un MBab específico de C/D a células que expresan antígenos C y D de superficie celular. Figura 20B, panel izquierdo muestra las curvas de unión de los anticuerpos anti-C parental (símbolos abiertos) y anti-D (símbolos cerrados) a células que expresan el antígeno C (células C, triángulos), el antígeno D (células D, cuadrados) o ambos antígenos C y D (células C/D, círculos). Figura 20B, panel derecho muestra las curvas de unión del C/D-MBab a células que expresan el antígeno C (células C, triángulos), el antígeno D (células D, cuadrados) o ambos antígenos C y D (células C/D, círculos). Figura 20C muestra las curvas de unión de C/D-MBab que se unen a células que expresan el antígeno C (células C, triángulos), el antígeno D (células D, cuadrados) o ambos antígenos C y D (células C/D, círculos) seguido de unión de la proteína D recombinante marcada (rD, panel izquierdo) o la proteína C recombinante marcada (rC, panel derecho).

Figura 21A y Figura 21B muestran las secuencias de aminoácidos y la numeración de varias regiones variables representativas de la cadena ligera conocidas en la técnica (anti-CD52; anti-HER2; anti-VEGF; y anti-EGFR) según el índice de Kabat como se establece en Kabat (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Las regiones CDR están sombreadas y la ubicación de posibles inserciones en el esquema de numeración, como se describe a continuación, se indica con un obelisco (†) y un obelisco doble (‡). Véase Figura 23A y Figura 23B para las regiones variables de cadena pesada correspondientes.

Figura 22 muestra las secuencias de aminoácidos y la numeración para las regiones constantes de cadena ligera de IgG (kappa y lambda) según el índice de UE como se establece en Kabat (*ibid.*). Los restos de la cadena lambda que difieren de kappa están sombreados y los sitios de variación alélica conocida se indican con un asterisco (*).

Figura 23A y Figura 23B muestran las secuencias de aminoácidos y la numeración de varias regiones variables representativas de cadena pesada conocidas en la técnica (anti-CD52; anti-HER2; anti-VEGF; y anti-EGFR) según el índice de Kabat como se expone a continuación en Kabat (*ibid.*). Las regiones CDR están sombreadas y la ubicación de posibles inserciones adicionales en el esquema de numeración, como se describe a continuación, se indica con un obelisco doble (‡). Veas Figura 21A y Figura 21B para las regiones variables de cadena ligera correspondientes.

Figuras 24A a 24D muestran las secuencias de aminoácidos y la numeración de las cadenas pesadas de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) según el índice de UE establecido en Kabat (*ibid.*). Figura 24A-B muestra las secuencias de aminoácidos y la numeración para las regiones CH1 y bisagra. Figura 24C muestra las secuencias de aminoácidos y la numeración para la región CH2. Figura 24D muestra la secuencia de aminoácidos y la numeración para la región CH3. Los restos que difieren de la IgG están sombreados y los sitios de variación alélica conocida se indican con un asterisco (*).

Descripción detallada

En este documento se desvelan, como se analiza más detalladamente a continuación, anticuerpos biespecíficos modificados por ingeniería en donde una o más cisteínas intercadenas se han reubicado, lo que, en algunos aspectos, da como resultado la reubicación de un enlace disulfuro intercadena en la interfaz HC-LC. En algunos aspectos, esto implica la modificación de una cadena pesada y la cadena ligera correspondiente dentro de un anticuerpo mediante el cual una cisteína nativa está sustituida por un aminoácido que no es cisteína, y un aminoácido que no es cisteína nativa está sustituido por un aminoácido cisteína. Los anticuerpos proporcionados en este documento son biespecíficos, lo que significa que contienen dominios variables con diferentes especificidades de antígeno y/o epítipo. En ciertos aspectos, el dúplex de cadena pesada y ligera modificado para un anticuerpo dado contiene un dominio variable con una determinada especificidad de antígeno y el dúplex de cadena pesada y ligera no modificado dentro del mismo anticuerpo contiene un dominio variable con una especificidad de antígeno diferente. Se conocen métodos para generar anticuerpos biespecíficos. Sin embargo, tales métodos a menudo están limitados por una multitud de posibles formaciones de anticuerpos que pueden incluir varias combinaciones de pares incorrectos de cadenas pesadas y ligeras. Tales emparejamientos erróneos pueden disminuir la eficacia de producción. Otros métodos requieren el uso de una cadena ligera común, que puede afectar la afinidad de uno o ambos dominios variables o depender del uso de scFv que de manera similar puede influir en la afinidad y además son estructuras menos estables y potencialmente inmunogénicas. Otros métodos requieren la eliminación de todos los enlaces disulfuro y la introducción de numerosas mutaciones en las cadenas pesadas y ligeras para alterar la interacción electrostática de las cadenas, lo que puede reducir la estabilidad y aumentar la inmunogenicidad de la molécula resultante. Las cadenas pesadas modificadas y las cadenas ligeras modificadas proporcionadas en este documento superan estas limitaciones hibridándose preferentemente entre sí generando el conjunto de anticuerpo monovalente biespecífico preferente. Los BMAb proporcionados en este documento se producen fácilmente, son estables y es probable que no sean inmunogénicos o que se han menos inmunogénicos debido al número limitado de mutaciones involucradas.

Terminología

Los métodos proporcionados en este documento a menudo no se limitan a composiciones específicas o etapas del método, ya que tales pueden variar. Además, como se usa en este documento, la forma singular "un", "uno" y "el" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. En este documento los términos "un" (o "uno"), así como los términos "uno o más" y "al menos uno" pueden usarse indistintamente.

El término "aproximadamente", como se usa en este documento, se refiere a un valor dentro de 10 % del parámetro subyacente (es decir, más o menos 10 %), y el uso del término "aproximadamente" al comienzo de una cadena de valores modifica cada uno de los valores (es decir, "aproximadamente 1, 2 y 3" se refiere a aproximadamente 1, aproximadamente 2 y aproximadamente 3). Por ejemplo, un peso de "aproximadamente 100 gramos" puede incluir pesos entre 90 gramos y 110 gramos. Además, cuando en este documento se describe un listado de valores (p.ej., aproximadamente 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 % u 86 %) el listado incluye todos los valores intermedios y fraccionarios de los mismos (p.ej., 54 %, 85,4 %).

Además, "y/o", cuando se usa en este documento, pretende ser una divulgación específica de cada una de las dos características o componentes especificados con o sin el otro. Por tanto, el término "y/o" como se usa en una expresión como "A y/o B" en este documento pretende incluir "A y B", "A o B", "A" (solo) y "B" (solo). Del mismo modo, el término "y/o" como se usa en una expresión como "A, B y/o C" pretende incluir cada uno de los siguientes aspectos: A, B y C; A, B o C; A o C; A o B; B o C; A y C; A y B; B y C; A (solo); B (solo); y C (solo).

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente en la técnica con la que se relaciona esta tecnología. Por ejemplo, Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2a ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3a ed., 1999, Academic Press; y Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revisado,

2000, Oxford University Press, proporcionan un diccionario general de muchos de los términos utilizados en este documento.

Las unidades, prefijos y símbolos se indican en su forma aceptada por el Sistema Internacional de Unidades (SI). Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. A menos que se indique lo contrario, las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en orientación de amino a carboxi. Los títulos proporcionados en este documento no son limitaciones de los diversos aspectos o realizaciones de la tecnología en este documento, que pueden obtenerse haciendo referencia a la memoria descriptiva en su conjunto. Por consiguiente, los términos definidos a continuación se definen más completamente por referencia a la memoria descriptiva en su totalidad.

En este documento a menudo se hace referencia a aminoácidos mediante símbolos de tres letras comúnmente conocidos o por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB. Los nucleótidos, del mismo modo, a menudo se mencionan mediante códigos de una sola letra comúnmente aceptados.

El término "anticuerpo" significa una molécula de inmunoglobulina que reconoce y se une específicamente a una diana, como una proteína, polipéptido, péptido, carbohidrato, polinucleótido, lípido, otros haptenos o combinaciones de los anteriores mediante al menos un sitio de reconocimiento de antígeno dentro de la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se usan en este documento, los términos "anticuerpo" y "anticuerpos", también conocidos como inmunoglobulinas, incluyen anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos que comprenden al menos dos dominios de unión a epítopos diferentes (p.ej., anticuerpos biespecíficos), anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos camélidos, anticuerpos quiméricos, proteínas de fusión que comprenden una parte de determinación de antígeno de un anticuerpo, y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno siempre que los anticuerpos presenten la actividad biológica deseada. En particular, los anticuerpos incluyen moléculas de inmunoglobulina y fragmentos inmunológicamente activos de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen al menos un sitio de unión a antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier isotipo/clase (p.ej., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), subisotipo/subclase (p.ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o alotipo (p.ej., Gm, p.ej., G1m (f, z, a o x), G2m(n), G3m(g, b, o c), Am, Em, y Km(1, 2 o 3)). Los anticuerpos pueden derivarse de cualquier mamífero, incluyendo, entre otros, humanos, monos, cerdos, caballos, conejos, perros, gatos, ratones y similares, u otros animales como aves (p.ej., pollos). Los anticuerpos pueden estar desnudos o conjugados con otras moléculas como toxinas, radioisótopos, etc.

Una "región variable" de un anticuerpo se refiere a la región variable de cadena ligera del anticuerpo o la región variable de cadena pesada del anticuerpo, ya sea solo o en combinación. Las regiones variables de cadena pesada y ligera consisten en cuatro regiones marco (FW) conectadas por tres regiones determinantes de complementariedad (CDR), también conocidas como regiones hipervariables. Las CDR en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las regiones FW y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos. La numeración de aminoácidos en el dominio variable, región determinante de complementariedad (CDR) y regiones marco (FR) de un anticuerpo sigue, a menos que se indique lo contrario, la definición de Kabat (también denominada en este documento "Índice de Kabat" o "Numeración de Kabat") como se establece en Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991). Usando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o más correspondientes a un acortamiento o inserción en una FR o CDR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir una inserción de aminoácidos (resto 52a según Kabat) después del resto 52 de H2 y restos insertados (p.ej., restos 82a, 82b y 82c, etc. según Kabat) después del resto 82 de FR de cadena pesada.

La numeración de Kabat de los restos puede determinarse para un anticuerpo dado mediante alineamiento en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "estándar". El alineamiento máximo de los restos del marco requiere frecuentemente la inserción de restos "espaciadores" en el sistema de numeración, como se usa para la región Fv. Además, la identidad de ciertos restos individuales en cualquier número de sitio de Kabat dado puede variar de cadena de anticuerpo a cadena de anticuerpo debido a interespecies o divergencia alélica. Como se usa en toda la memoria descriptiva, las secuencias de CDR de VL y VH descritas corresponden a las ubicaciones clásicas de numeración de Kabat como se proporcionan en la Tabla 1, con las regiones marco intermedias numeradas en consecuencia. Figuras 15A, 15B, 17A y 17B proporcionan la numeración de Kabat de regiones variables (Marcos y las CDR) de varios anticuerpos representativos.

TABLA 1

CDR	L1	L2	L3	H1	H2	H3
Posición de Kabat	L24-L34	L50-L56	L89-L97	H31-H35	H50-H65	H95-H102

Como se usa en este documento, la región Fc (en este documento también denominada simplemente "Fc") incluye los polipéptidos que comprenden la región constante de un anticuerpo, excluyendo el primer dominio de inmunoglobulina de la región constante. Por tanto, Fc se refiere a los dos últimos dominios de inmunoglobulina de región constante de IgA,

IgD e IgG, y los últimos tres dominios de inmunoglobulina de región constante de IgE e IgM, y también puede incluir la bisagra N-terminal flexible para estos dominios. Para IgA e IgM, Fc puede incluir la cadena J. Para IgG, Fc comprende los dominios de inmunoglobulina Cgamma2 y Cgamma3 (Cy2 y Cy3) y al menos una parte de la bisagra entre Cgamma1 (Cy1) y Cgamma2 (Cy2). Fc puede referirse a esta región de forma aislada, o esta región en el contexto de un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o proteína de fusión de Fc. Aunque los límites de la región Fc pueden variar, la región Fc de la cadena pesada de IgG humana se define generalmente para comprender los restos C226 o P230 en su extremo carboxilo, donde la numeración es según el índice de UE establecido en Kabat (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Véase Figura 22 para la numeración de las regiones constantes de la cadena ligera kappa y lambda y Figuras 24A-24D para la numeración de las regiones constantes de cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, toda la numeración de la región constante se realiza según el índice de UE como se expone en Kabat. Se han observado polimorfismos en varias posiciones de Fc diferentes, incluyendo, pero sin limitarse a, las posiciones 270, 272, 312, 315, 356 y 358 numeradas por el índice de UE y, por tanto, pueden existir ligeras diferencias entre la secuencia presentada y las secuencias de la técnica anterior.

15 **Anticuerpos**

Los anticuerpos son proteínas inmunológicas que se unen a un antígeno específico. En la mayoría de los mamíferos, incluidos humanos y ratones, los anticuerpos se construyen a partir de cadenas polipeptídicas pesadas y ligeras emparejadas. Cada cadena está formada por dos regiones distintas, denominadas regiones variable (Fv) y constante (Fc). Las regiones Fv de cadena ligera y pesada contienen los determinantes de unión a antígeno de la molécula y son responsables de unirse al antígeno diana. Las regiones Fc definen la clase (o isotipo) de anticuerpo (IgG por ejemplo) y son responsables de unir una serie de proteínas naturales para provocar sucesos bioquímicos importantes.

Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente. Los dos dímeros de cadena ligera-cadena pesada se unen mediante puentes disulfuro entre las cadenas pesadas, formando una molécula en forma de Y. El número de enlaces disulfuro entre las cadenas pesadas puede variar entre los diferentes isotipos de inmunoglobulina. La región en donde las ramas de la Y se unen con el tallo se llama región de bisagra, y presenta cierta flexibilidad.

Cada cadena incluye regiones constantes que son representativas de la clase de anticuerpos y regiones variables específicas de cada anticuerpo. La región constante determina el mecanismo utilizado para destruir el antígeno. Los anticuerpos se dividen en cinco clases principales, IgM, IgG, IgA, IgD e IgE, según su estructura de región constante y su función inmunitaria. Las regiones variables y constantes de las cadenas ligeras y pesadas se pliegan estructuralmente en unidades funcionales llamadas dominios. Cada cadena ligera consiste en un dominio variable (VL) en un extremo y un dominio constante (CL) en el otro extremo. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (VH) seguido de tres o cuatro dominios constantes (CH1, CH2, CH3, CH4).

Los brazos de la Y contienen el sitio de unión al antígeno y se denomina región Fab (fragmento, unión a antígeno). Se compone de un dominio constante y uno variable de cada cadena pesada y ligera del anticuerpo. El dominio constante de cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de cadena pesada, y el dominio variable de cadena ligera está alineado con el dominio variable de cadena pesada. Las cadenas ligeras se clasifican como cadenas lambda o cadenas kappa basándose en la secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena ligera. En este documento de dominio variable de una cadena ligera kappa también puede denominarse VK.

La región Fc de un anticuerpo interactúa con una serie de ligandos, incluyendo receptores Fc y otros ligandos, impartiendo una serie de capacidades funcionales importantes denominadas funciones efectoras. Una familia importante de receptores Fc para la clase IgG son los receptores gamma de Fc (FcγR). Estos receptores median la comunicación entre los anticuerpos y el brazo celular del sistema inmunitario. En humanos, esta familia de proteínas incluye FcγRI (CD64), incluyendo las isoformas FcγRIA, FcγRIB, y FcγRIC; FcγRII (CD32), incluyendo las isoformas FcγRIIA, FcγRIIB, y FcγRIIC; y FcγRIII (CD16), incluyendo las isoformas FcγRIIIA y FcγRIIIB. Estos receptores suelen tener un dominio extracelular que media en la unión a Fc, una región que incluye la membrana y un dominio intracelular que puede mediar algún suceso de señalización dentro de la célula. Estos subtipos de FcγR diferentes se expresan en diferentes tipos de células. Por ejemplo, en humanos, FcγRIIIB se encuentra solo en neutrófilos, mientras que FcγRIIIA se encuentra en macrófagos, monocitos, linfocitos citolíticos naturales (NK) y una subpoblación de linfocitos T. La formación del complejo Fc/FcγR recluta células efectoras a sitios de antígeno unido, generalmente dando como resultado sucesos de señalización dentro de las células y respuestas inmunitarias posteriores importantes, como liberación de mediadores de inflamación, activación de linfocitos B, endocitosis, fagocitosis y ataque citotóxico. La capacidad de mediar en las funciones efectoras citotóxicas y fagocíticas es un mecanismo potencial por el cual los anticuerpos destruyen las células diana. La reacción mediada por células en donde las células citotóxicas inespecíficas que expresan FcγR reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente provocan la lisis de la célula diana se denomina citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC). Las células primarias para mediar ADCC, linfocitos NK, expresan solo FcγRIIIA, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII.

Otro ligando Fc importante es la proteína del complemento C1q. La unión de Fc a C1q media en un proceso llamado citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). C1q es capaz de unirse a seis anticuerpos, aunque la unión a dos IgG es suficiente para activar la cascada del complemento. C1q forma un complejo con las serina proteasas C1r y C1s para formar el complejo C1 de la vía del complemento.

Varias características fundamentales de los anticuerpos, que incluyen, pero no se limitan a, especificidad hacia la diana, capacidad de mediar en los mecanismos efectores inmunes y una semivida prolongada en suero, hacen que los anticuerpos y las moléculas de inmunoglobulina relacionadas sean agentes terapéuticos potentes. Existen varios mecanismos posibles por los cuales los anticuerpos destruyen las células tumorales, incluyendo antiproliferación mediante bloqueo de las vías de crecimiento necesarias, señalización intracelular que conduce a apoptosis, disminución de regulación y/o renovación de receptores, ADCC, CDC y favorecimiento de una respuesta inmunitaria adaptativa.

Los anticuerpos proporcionados en este documento incluyen anticuerpos completos o intactos, fragmentos de anticuerpo, anticuerpos de secuencia nativa o variantes de aminoácido, anticuerpos humanos, humanizados, modificados postraduccionalmente, quiméricos o de fusión, inmunoconjugados y fragmentos funcionales de los mismos. En algunos aspectos, los anticuerpos pueden modificarse en la región Fc, y ciertas modificaciones pueden proporcionar las funciones efectoras o semivida en suero deseadas. Como se analiza con más detalle en las secciones a continuación, con las regiones Fc apropiadas, un anticuerpo desnudo unido a la superficie celular puede inducir citotoxicidad, p.ej., mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) o reclutando complemento en citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o mediante reclutamiento de células citotóxicas inespecíficas que expresan uno o más ligandos efectoras que reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y, posteriormente, causan fagocitosis de la célula diana en la fagocitosis mediada por células dependientes de anticuerpo (ADCP), o algún otro mecanismo. Cuando sea deseable eliminar o reducir la función efectora, para minimizar los efectos secundarios o las complicaciones terapéuticas, pueden usarse otras regiones de Fc. La región Fc de los anticuerpos puede modificarse para aumentar la afinidad de unión por FcRn y, por tanto, aumentar la semivida en suero. Alternativamente, la región Fc puede conjugarse con PEG o albúmina para aumentar la semivida en suero, o alguna otra conjugación que dé como resultado un efecto deseado.

En ciertos aspectos, en este documento un anticuerpo es un anticuerpo aislado y/o purificado y/o sin pirógenos. El término "purificado", como se usa en este documento, se refiere a una molécula de interés que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Por tanto, en algunos aspectos, un anticuerpo proporcionado en este documento es un anticuerpo purificado en donde se ha separado de uno o más componentes de su entorno natural. El término "anticuerpo aislado" como se usa en este documento se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otras moléculas de anticuerpo que tienen estructura o especificidades antigénicas diferentes. Una molécula de anticuerpo bi- o multi-específico es un anticuerpo aislado cuando está sustancialmente libre de otras moléculas de anticuerpo. Por tanto, en algunos aspectos, los anticuerpos proporcionados son anticuerpos aislados que se han separado de los anticuerpos con una especificidad diferente. Un anticuerpo aislado puede ser un anticuerpo monoclonal. Sin embargo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a un epítipo, isoforma o variante de una diana puede tener reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, p.ej., de otras especies (p.ej., homólogos de especie). Un anticuerpo aislado como se proporciona puede estar sustancialmente libre de uno o más de otros materiales celulares. En algunos aspectos, se proporciona una combinación de anticuerpos monoclonales "aislados", y se refiere a anticuerpos que tienen diferentes especificidades y se combinan en una composición definida. Los métodos de producción y purificación/aislamiento de un anticuerpo se describen en cualquier parte de este documento.

Los anticuerpos aislados presentados comprenden secuencias de aminoácidos de anticuerpo desveladas en este documento, que pueden codificarse por cualquier polinucleótido adecuado. En ocasiones los anticuerpos aislados se proporcionan en forma formulada. En algunos aspectos, un anticuerpo se une a una o más proteínas y, por tanto, altera parcial o sustancialmente al menos una actividad biológica de al menos una proteína, por ejemplo, actividad de proliferación celular.

Anticuerpos humanizados

Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo o su variante o fragmento del mismo que puede unirse a un antígeno predeterminado y que comprende una región marco que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana y una región determinante de complementariedad (CDR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina no humana. Menudo las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) son las regiones más variables dentro de un anticuerpo que determinan la afinidad y especificidad del anticuerpo por antígenos específicos. Un anticuerpo humanizado comprende sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos dominios variables en donde todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana (es decir, anticuerpo donante) y todas o sustancialmente todas las regiones marco son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. Un anticuerpo humanizado también puede comprender al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. El anticuerpo puede contener tanto la cadena ligera como al menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo también puede incluir las regiones CH1, bisagra, CH2, CH3 y CH4 de la cadena pesada.

El anticuerpo humanizado se puede seleccionar de cualquier clase de inmunoglobulinas, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, incluyendo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Normalmente, el dominio constante es un dominio constante de fijación del complemento donde se desea que el anticuerpo humanizado presente actividad citotóxica, y la clase es típicamente IgG1. Cuando dicha actividad citotóxica no es deseable, el dominio constante puede ser de la clase IgG2 o IgG4. El anticuerpo humanizado puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo, y en la técnica se conocen métodos para seleccionar dominios constantes particulares para optimizar las funciones efectoras deseadas.

Las regiones marco y CDR de un anticuerpo humanizado no necesitan corresponder exactamente a las secuencias parentales, p.ej., la CDR del donante o el marco consenso pueden mutagenizarse por sustitución, inserción o delección de al menos un resto para que el resto de CDR o marco en ese sitio no corresponda ni al anticuerpo consenso ni al importado. Sin embargo puede que tales mutaciones no sean extensas. Al menos el 75 % de los restos de anticuerpo humanizado pueden corresponder a los de la región marco parental (FR) y las secuencias de CDR, con la correspondencia siendo en ocasiones del 90 % o superior o del 95 % o superior, por ejemplo.

La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo métodos conocidos en la técnica, sustituyendo las secuencias de regiones hipervariables por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Específicamente, los anticuerpos humanizados pueden prepararse mediante métodos conocidos en la técnica incluyendo enfoques de injerto de CDR, recubrimiento o revestimiento, estrategias de intercambio de cadenas, estrategias de modelado molecular y similares. Estos enfoques generales pueden combinarse con mutagénesis estándar y técnicas de síntesis recombinante para producir anticuerpos en este documento con las propiedades deseadas.

El injerto de CDR se realiza reemplazando una o más CDR de un anticuerpo aceptor (p.ej., un anticuerpo humano) con una o más CDR de un anticuerpo donante (p.ej., un anticuerpo no humano). Los anticuerpos aceptores pueden seleccionarse basándose en la similitud de los restos marco entre un anticuerpo aceptor candidato y un anticuerpo donante y pueden modificarse adicionalmente para introducir restos similares. Después del injerto de CDR, pueden realizarse cambios adicionales en las secuencias del donante y/o aceptor para optimizar la unión y la funcionalidad del anticuerpo.

El injerto de regiones CDR abreviadas es un enfoque relacionado. Las regiones CDR abreviadas incluyen los restos determinantes de especificidad y aminoácidos adyacentes, incluyendo aquellos en las posiciones 27d-34, 50-55 y 89-96 en la cadena ligera, y en las posiciones 31-35b, 50-58 y 95-101 en la cadena pesada. El injerto de restos determinantes de especificidad (SDR) se basa en el entendimiento de que la especificidad de unión y la afinidad de un sitio de combinación de anticuerpos está determinada por los restos más altamente variables dentro de cada una de las regiones CDR. El análisis de las estructuras tridimensionales de los complejos antígeno-anticuerpo, combinado con el análisis de los datos disponibles de la secuencia de aminoácidos se utilizó para modelar la variabilidad de la secuencia basada en la disimilitud estructural de los restos de aminoácido que se producen en cada posición dentro de la CDR. Las secuencias de polipéptidos mínimamente inmunogénicas que consisten en restos de contacto, que se denominan SDR, se identifican y se injertan en regiones marco humanas.

Los restos marco en las regiones marco pueden sustituirse con el resto correspondiente del anticuerpo donante de CDR para alterar, y potencialmente mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones marco se identifican mediante métodos conocidos en la técnica, p.ej., modelando las interacciones de la CDR y los restos marco para identificar los restos marco importantes para unión a antígeno y comparación de secuencias para identificar restos marco inusuales en posiciones particulares.

La sustitución o modificación en superficie se basa en el concepto de reducir secuencias de aminoácidos potencialmente inmunogénicas en un roedor u otro anticuerpo no humano por modificación del exterior accesible al disolvente del anticuerpo con secuencias de aminoácidos humanas. Por tanto, los anticuerpos sustituidos parecen menos extraños a las células humanas. Un anticuerpo no humano se sustituye al (1) identificar los restos de la región marco externa expuesta en el anticuerpo no humano, que son diferentes de aquellos en las mismas posiciones en las regiones marco de un anticuerpo humano, y (2) reemplazar los restos identificados con aminoácidos que normalmente ocupan estas mismas posiciones en anticuerpos humanos.

Por definición, los anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos. Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos en donde una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpos particular, mientras que otra parte de la(s) cadena(s) es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como a fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada. Los anticuerpos quiméricos de interés en este documento incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión a antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (p.ej., Mono del Viejo Mundo, como babuino, rhesus o mono cinomolgo) y secuencias de región constante humana.

Anticuerpos humanos

Para algunos usos, incluyendo el uso in vivo de anticuerpos en humanos y ensayos de detección in vitro, puede ser apropiado usar anticuerpos humanos o quiméricos. Los anticuerpos completamente humanos pueden ser deseables para el tratamiento terapéutico de sujetos humanos. Los anticuerpos humanos pueden prepararse mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica, incluyendo métodos de presentación en fagos que se describen a continuación usando bibliotecas de anticuerpos derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana.

Los anticuerpos humanos también pueden producirse usando ratones transgénicos que son incapaces de expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que pueden expresar genes de inmunoglobulinas humanas. Por ejemplo, los complejos de genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera humana pueden introducirse aleatoriamente o mediante recombinación homóloga en células madre embrionarias de ratón. Alternativamente, la región variable humana, la región constante y la región de diversidad pueden introducirse en células madre embrionarias de ratón además de los genes humanos de cadena pesada y ligera. Los genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera de ratón pueden volverse no funcionales por separado o simultáneamente con la introducción de loci de inmunoglobulina humana por recombinación homóloga. En particular, la delección homocigota de la región JH evita la producción de anticuerpos endógenos. Las células madre embrionarias modificadas se expanden y se microinyectan en blastocistos para producir ratones quiméricos. Los ratones quiméricos se crían para producir descendientes homocigotos que expresan anticuerpos humanos. Los ratones transgénicos se inmunizan de la manera normal con un antígeno seleccionado, p.ej., todo o una parte de un polipéptido de un anticuerpo en este documento.

Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno pueden obtenerse de ratones inmunizados y transgénicos usando tecnología de hibridoma convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humana alojados por los ratones transgénicos se reorganizan durante la diferenciación de linfocitos B, y posteriormente experimentan cambio de clase y mutación somática. Por tanto, usando tal técnica, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Además, compañías como Medarex (Princeton, NJ) proporcionan anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado.

En la técnica también se conoce un enfoque de "minilocus". En el enfoque de minilocus, se imita un locus de Ig exógena mediante inclusión de piezas (genes individuales) del locus de Ig. Por tanto, uno o más genes VH, uno o más genes DH, uno o más genes JH, una región constante mu y generalmente una segunda región constante (a veces una región constante gamma) se forman en una construcción para la inserción en un animal.

En la técnica también se conocen la generación de anticuerpos humanos a partir de ratones en donde, mediante la fusión de microceldas, se han introducido grandes piezas de cromosomas o cromosomas completos. Por ejemplo, el cruzamiento de ratones Tc de Kirin con ratones minilocus (Humab) de Medarex ha generado ratones que poseen el transcromosoma IgH humano de los ratones Kirin y el transgén de la cadena kappa de los ratones Genpharm.

Los anticuerpos humanos también pueden derivarse por métodos in vitro. Los ejemplos adecuados incluyen, entre otros, presentación de fagos (MedImmune (anteriormente CAT), Morphosys, Dyax, Biosite/Medarex, Xoma, Symphogen, Alexion (anteriormente Proliferon), Affimed) presentación de ribosomas (MedImmune (anteriormente CAT)), presentación de levadura, y similares. La tecnología de presentación de fagos puede utilizarse para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpo in vitro, a partir de repertorios génicos de dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. Según esta técnica, los genes del dominio V del anticuerpo se clonan en un gen de proteína de cubierta mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, como M13 o fd, y se muestran como fragmentos de anticuerpo funcionales en la superficie de la partícula del fago. Dado que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que exhibe esas propiedades. Por tanto, el fago imita algunas de las propiedades de linfocito B. La presentación de fagos puede realizarse en una variedad de formatos como se conoce en la técnica. Se ha aislado un conjunto diverso de anticuerpos anti-oxazolona de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria de genes V derivados del bazo de ratones inmunizados. Un repertorio de genes V de donantes humanos no inmunizados puede construirse y se pueden aislar anticuerpos contra una amplia gama de antígenos (incluyendo auto-antígenos) siguiendo esencialmente las técnicas conocidas en la técnica. Los anticuerpos humanos también pueden ser generados por linfocitos B activados in vitro.

Anticuerpos multivalentes

Los anticuerpos típicamente se caracterizan como bivalentes, lo que significa que contienen dos sitios de unión a antígeno (es decir, uno en cada brazo del fragmento F(ab')₂). También se contemplan los anticuerpos con más de dos valencias (p.ej., más de un sitio de unión a antígeno en uno o ambos brazos del fragmento F(ab')₂). Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos trispecíficos. Por tanto, los anticuerpos presentados en este documento pueden ser anticuerpos multivalentes (que son distintos de la clase IgM) con tres o más sitios de unión a antígeno (p.ej., anticuerpos tetravalentes), que pueden producirse fácilmente mediante expresión recombinante de ácido nucleico que codifica las cadenas polipeptídicas del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión a antígeno. En un aspecto, un dominio de dimerización comprende (o consiste en) una región Fc o una región bisagra. En este escenario, el anticuerpo puede comprender una región Fc y tres o más sitios de unión a antígeno amino-terminal y/o carboxilo-terminal a la región Fc. En ciertos aspectos, el anticuerpo multivalente en este documento comprende (o consiste en) de tres a aproximadamente ocho sitios de unión a antígeno. El anticuerpo multivalente comprende al menos una cadena polipeptídica donde la comprenden dos o más dominios variables. Por ejemplo, la(s) cadena(s) polipeptídica(s) pueden comprender VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc, donde VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena polipeptídica de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o polipéptido, y n es 0 o 1. Por ejemplo, la(s) cadena(s) polipeptídica(s) pueden comprender: cadena VH-CH1-conector flexible-VH-CH1-región Fc; o cadena VH-CH1-VH-CH1-región Fc. El anticuerpo multivalente en este documento puede comprender además al menos dos polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. El anticuerpo multivalente en este

documento puede comprender, por ejemplo, de aproximadamente dos a aproximadamente ocho polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. Los polipéptidos de dominio variable de cadena ligera contemplados en este documento, comprenden un dominio variable de cadena ligera y, opcionalmente, comprenden además un dominio C_L.

5 **Anticuerpos biespecíficos**

Los anticuerpos proporcionados en este documento son biespecíficos. Como se usa en este documento, los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión a al menos dos antígenos (o dianas) independientes o epítopos diferentes dentro del mismo antígeno. Los anticuerpos biespecíficos ejemplares pueden unirse a dos epítopos diferentes de una diana, o pueden unirse a dos dianas diferentes. Otros de estos anticuerpos pueden combinar un primer sitio de unión a la diana con un segundo sitio de unión para otra diana. Un brazo de unión a la diana a veces puede combinarse con un brazo que se une a una molécula desencadenante en un leucocito, como una molécula receptora de linfocitos T (p.ej., CD3), o receptores Fc para IgG (FcγR), como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16), para enfocar y localizar mecanismos de defensa celular en la célula que expresa la proteína diana. Los anticuerpos biespecíficos también pueden usarse para localizar agentes citotóxicos en células que expresan el antígeno. Tales anticuerpos pueden tener un brazo de unión diana y un brazo que se une al agente citotóxico (p.ej., saporina, anti-interferón-α, alcaloide de la vinca, cadena de ricina A, metotrexato o hapteno isótopo radiactivo).

En algunos casos, los anticuerpos biespecíficos proporcionan efectos terapéuticos aditivos y/o sinérgicos derivados de y seccionamiento de dos antígenos simultáneamente, con la administración de una sola molécula fabricada. Por ejemplo, una paciente con cáncer que tiene carcinoma de mama con expresión moderada de HER2, que no pudo ser tratada con terapia de mAb anti-HER2, podría beneficiarse del tratamiento sinérgico con una diana biespecífica tanto para HER2 como para EGFR, siempre que el tumor también exprese EGFR. Sin embargo, el tratamiento con dos mAb bivalentes o el derivado biespecífico bivalente de estos dos mAb podría presentar un riesgo terapéutico y/o tóxico grave. Dado que los dos mAb o los anticuerpos biespecíficos bivalentes reaccionan con dos receptores que están asociados con la transformación maligna, debería aumentar la especificidad tumoral del tratamiento. Sin embargo, dado que el tratamiento combinado de mAb o el anticuerpo biespecífico bivalente es activo contra células tumorales con expresión moderada del antígeno, pueden surgir algunos efectos secundarios nuevos, debido a la presencia de algunos tejidos normales con baja expresión de antígeno. Estos tejidos pueden no ser sensibles al único mAb, pero pueden volverse sensibles al tratamiento combinado de mAb o al derivado biespecífico bivalente. Este riesgo potencial puede ser más significativo con moléculas bivalentes o multivalentes que muestran una mayor unión de las células antigénicas debido a efectos de avidéz.

En algunos aspectos, los anticuerpos proporcionados en este documento son anticuerpos biespecíficos monovalentes (MBab). Los armazones de anticuerpo biespecífico monovalente descritos en este documento proporcionan una plataforma superior para la generación de anticuerpos biespecíficos que cumplen todos los beneficios asociados con los anticuerpos biespecíficos a la vez que reducen los riesgos terapéuticos potenciales mencionados anteriormente debido a su naturaleza monovalente. Además, los MBab proporcionados en este documento se expresan fácilmente, son estables y es probable que tengan baja inmunogenicidad. Como se usa en este documento, la expresión "biespecífico monovalente", que puede abreviarse "MBab", se refiere a anticuerpos biespecíficos, donde cada brazo puede unirse específicamente a un antígeno diana diferente, y para un par dado de antígenos diana diferentes (A y B), el MBab puede unirse a uno de cada uno. En ciertos aspectos, los anticuerpos biespecíficos monovalentes pueden unirse específicamente a dos antígenos (o dianas) independientes o dos epítopos independientes en el mismo antígeno. Típicamente, los anticuerpos biespecíficos monovalentes comprenden dos regiones variables diferentes. En algunos aspectos, la afinidad de unión para los dos antígenos independientes es casi la misma. En algunos aspectos, las afinidades de unión para los dos antígenos independientes son diferentes. En algunos aspectos, la afinidad de unión para dos epítopos independientes en el mismo antígeno es casi la misma. En algunos aspectos, la afinidad de unión para dos epítopos independientes en el mismo antígeno es diferente. En otros aspectos, cada brazo tiene la misma especificidad (p.ej., se une al mismo o un epítipo superpuesto) pero se une con una afinidad diferente. En algunos aspectos, las afinidades pueden diferir en 3 veces o más. Puede ser particularmente deseable tener un brazo con mayor afinidad y un brazo con menor afinidad cuando se combinan regiones variables de anticuerpos que tienen diferentes potencias in vivo para evitar la dosificación excesiva o insuficiente de uno de los brazos.

En ciertos aspectos, un MBab se une a los mismos epítopos o epítopos superpuestos en el mismo antígeno (p.ej., un receptor), con diferentes afinidades. En particular, los mismos epítopos o epítopos superpuestos, que están muy cerca cuando el antígeno se dimeriza. Tal anticuerpo tendrá una doble característica dependiendo de la concentración relativa. Por ejemplo, a altas concentraciones, donde la concentración de MBab está saturando la concentración de antígeno, el dominio de unión de alta afinidad competirá con el dominio de unión de baja afinidad y se producirá poco o ningún efecto de avidéz. Es decir, el anticuerpo funcionará principalmente como una entidad de unión monovalente y se producirá poca o ninguna reticulación/señalización del antígeno (véase Figura 18). Sin embargo, a baja concentración entrarán en juego los efectos de avidéz y el MBab puede unirse simultáneamente a ambos sitios de unión, preferentemente en dos moléculas de antígeno, lo que conduce a la reticulación/señalización del antígeno (véase Figura 18). De esta manera, la señalización del antígeno puede regularse mediante la concentración de MBab.

En ciertos aspectos, un MBab se une a dos antígenos diferentes (p.ej., diferentes receptores) donde la homodimerización de los antígenos es indeseable y/o ambos antígenos están presentes por separado en células/tejidos no diana y están presentes juntos en células/tejido diana. Tal anticuerpo se unirá con solo un brazo en células no diana, esta unión

monovalente de baja avididad de solo un brazo del MBab a células/tejidos no diana es insuficiente para provocar la homodimerización (véase Figura 19, parte izquierda). Por el contrario, el MBab puede unirse a ambos antígenos en las células/tejidos diana, la unión a ambos antígenos en las células diana simultáneamente dará como resultado una unión bivalente de mayor avididad que puede mejorar la unión preferente a células diana y puede mejorar la dimerización del receptor (véase Figura 19, parte derecha).

En algunos aspectos, los anticuerpos biespecíficos monovalentes comprenden además sitios de unión adicionales. Los sitios de unión adicionales pueden ser específicos para uno o ambos antígenos diana (A y B) del anticuerpo monoclonal biespecífico (MBab) y/o pueden ser específicos para antígenos diana adicionales. En algunos aspectos, se añaden uno o más fragmentos variables de cadena única (scFv) al extremo N o C de una o ambas cadenas pesadas y/o una o ambas cadenas ligeras, donde uno o más scFv se unen específicamente a uno o más antígenos diana adicionales. Por ejemplo, un anticuerpo trispecífico monovalente puede generarse mediante la adición de un scFv (específico para el antígeno C) a una cadena (p.ej., pesada o ligera) de un anticuerpo biespecífico monovalente (específico para los antígenos A y B). En este caso, el anticuerpo sería monovalente para los antígenos A, B y C. Si se añade un scFv (específico para el antígeno C) a dos cadenas (p.ej., ambas cadenas pesadas, ambas cadenas ligeras, una cadena pesada y una cadena ligera), el anticuerpo trispecífico sería monovalente para los antígenos A y B y bivalente para el antígeno C. En este documento se contempla cualquier combinación posible de sitios de unión adicionales para los anticuerpos biespecíficos monovalentes (véase, p.ej., Dimasi et al. *J. Mol. Biol.* (2009) 393: 672-692). Se contempla que la afinidad de unión de los sitios de unión adicionales puede ser aproximadamente la misma que uno o ambos brazos del MBab o puede ser diferente de uno o ambos brazos del MBab. Como se describió anteriormente, las afinidades relativas pueden seleccionarse o adaptarse según los antígenos y el uso previsto de la molécula.

Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (p.ej., anticuerpos biespecíficos F(ab')₂). La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen especificidades diferentes. Debido a la variedad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos híbridos (cuadros) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpos diferentes, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que generalmente se realiza mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante difícil y el rendimiento del producto puede ser bajo.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse a avidina, el otro a biotina. Los anticuerpos heteroconjugados pueden prepararse usando cualquier método de reticulación conveniente. Sin embargo, este método generalmente requiere el uso de proteínas no humanas, que pueden tener un alto potencial de inmunogenicidad. Además, en ocasiones los fragmentos de anticuerpo tienen poca o ninguna función efectora y una semivida corta.

Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse usando enlace químico. En un procedimiento, los anticuerpos intactos se cortan proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditiol, arsenito sódico, para estabilizar los ditiolos vecinales y prevenir la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados después se convierten en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Después, uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierte en Fab'-tiol por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Sin embargo, en ocasiones este método conduce a un bajo rendimiento, es difícil de controlar y los productos pueden tener un alto potencial de inmunogenicidad. Además, en ocasiones los fragmentos de anticuerpo tienen poca o ninguna función efectora y una semivida corta.

Los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de *E. coli*, que puede acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Una molécula de anticuerpo biespecífico completamente humanizado F(ab')₂ puede crearse secretando cada fragmento Fab' por separado de *E. coli* y sometiéndolo a un acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. Sin embargo, este método a menudo conduce a un rendimiento bajo y es difícil de controlar. Además, en ocasiones los fragmentos de anticuerpo tienen poca o ninguna función efectora y una semivida corta.

Los anticuerpos biespecíficos también pueden producirse usando cremalleras de leucina. Los péptidos con cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun están unidos a las partes Fab' de dos anticuerpos diferentes por fusión génica. Los homodímeros de anticuerpos se reducen en la región bisagra para formar monómeros y luego se reoxidan para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpo" descrita ha proporcionado un mecanismo adicional para hacer fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un VH conectada a un VL por un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. En consecuencia, los dominios VH y VL de un fragmento se ven obligados a emparejarse con los dominios VL y VH complementarios de otro fragmento, formando así dos sitios de unión a antígeno. En la técnica también se conocen otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros de cadena sencilla Fv (sFv). Sin embargo, en ocasiones este método conduce a un bajo rendimiento, es difícil de controlar y los productos pueden tener un alto potencial de inmunogenicidad. Además, en ocasiones los fragmentos de anticuerpo tienen poca o ninguna función efectora y una semivida corta.

Los anticuerpos biespecíficos también pueden producirse usando métodos de heterodimerización de cadena pesada. Tales métodos incluyen métodos de "botón en ojal" y dominio modificado por ingeniería de intercambio de hebras (SEED), y los que alteran la polaridad de la carga a través de la interfaz del dímero Fc. Tales métodos se describen con detalles adicionales en este documento y en, p.ej., la Patente de Estados Unidos N.º 7.183.076; Merchant et al. (1998) Nat. Biotech 16:677-681; Ridgway et al. (1996) Protein Engineering 9:617-621; Davis et al. (2010) Prot. Eng. Design & Selection 23:195-202; WO 2007/110205; WO 2007/147901; Gunasekaran et al. (2010) JBC 285:19637-46. En estos métodos, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo puede modificarse por ingeniería para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo celular recombinante. En el método de "botón en ojal", se genera una "protuberancia" al reemplazar una o más cadenas laterales de aminoácido pequeñas de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo con cadenas laterales más grandes (p.ej., tirosina o triptófano). Las "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la(s) cadena(s) lateral(es) grande(s) se crean en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando el aminoácido que tiene cadenas laterales grandes con aminoácidos que tienen cadenas más pequeñas (p.ej., alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados, como homodímeros. En el método SEED, los homodímeros Fc se convierten en heterodímeros interdigitando segmentos de hebra beta de dominios CH3 de IgG e IgA humanas. Estos derivados de los dominios CH3 de IgG e IgA humanas crean heterodímeros SEED CH3 humanos complementarios que están compuestos por segmentos alternos de secuencias CH3 de IgA e IgG humanas. El par resultante de dominios SEED CH3 se asocia preferentemente para formar heterodímeros cuando se expresa en células de mamífero. Otros métodos incluyen la introducción de modificaciones que alteran la polaridad de la carga a través de la interfaz del dímero Fc de manera que la coexpresión de regiones Fc electrostáticamente emparejadas da como resultado heterodimerización. Estos métodos mejoran la heterodimerización de la cadena pesada, pero no abordan los emparejamientos erróneos de la cadena ligera formada durante la formación de anticuerpos biespecíficos. En algunos casos, el uso de una cadena ligera común puede disminuir el número de posibles emparejamientos erróneos, como se describe en WO 98/50431, pero a menudo da como resultado la pérdida o reducción de especificidad y/o afinidad de unión.

Los anticuerpos específicos dobles son otro tipo de anticuerpo biespecífico que puede producirse (véase, p.ej., Bostrum et al. (2009) Science 323:1610-1614). Tales anticuerpos pueden producirse generando variantes con mutaciones en las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la cadena ligera (LC) de modo que puedan unirse a una nueva diana antigénica mientras mantienen la especificidad de unión para su antígeno diana nativo. Sin embargo, los sitios de unión a antígeno a menudo se superponen, evitando que el anticuerpo se una a ambos antígenos al mismo tiempo. Además, estos anticuerpos son difíciles de generar y pueden no poseer las afinidades deseadas para cada uno de los dos antígenos.

Los polipéptidos modificados proporcionados en este documento pueden ser útiles para la generación de anticuerpos biespecíficos y superar las limitaciones y dificultades técnicas señaladas anteriormente. En algunos aspectos, una cadena pesada y una cadena ligera dentro de un anticuerpo se modifican por lo que una cisteína nativa se sustituye por un aminoácido no cisteína, y un aminoácido no cisteína nativo se sustituye por un aminoácido cisteína. Tales modificaciones proporcionadas en este documento se generan en los dominios HC y LC y dan como resultado la reubicación de un puente disulfuro intercadena HC-LC. Cuando se genera un anticuerpo biespecífico a partir de cuatro polipéptidos separados, por ejemplo, cuando el brazo modificado tiene una especificidad de unión para una diana y el brazo no modificado tiene una especificidad de unión para una diana diferente, los cuatro polipéptidos se ensamblarán de manera que la cadena pesada modificada se hibride adecuadamente con la cadena ligera modificada y la cadena pesada no modificada se hibride adecuadamente con la cadena ligera no modificada. Como se usa en este documento, el término "no modificado" se refiere a cadenas pesadas y ligeras que no contienen las modificaciones de HC-LC introducidas para la reubicación de cisteínas y/o puentes disulfuro, como se describe en este documento. Tales cadenas pesadas y ligeras "no modificadas" pueden comprender otras modificaciones, como, por ejemplo, modificaciones de heterodimerización en las regiones CH2 y/o CH3 descritas en este documento y/o conocidas en la técnica. Las modificaciones de HC-LC proporcionadas en este documento pueden combinarse con modificaciones adicionales de la cadena pesada, particularmente en las regiones CH2 y/o CH3 para garantizar una heterodimerización adecuada de la cadena pesada y/o para mejorar la purificación del heterodímero de la cadena pesada y se describen en detalle a continuación.

Ensayos de biespecificidad

Cualquier ensayo conocido en la técnica para determinar la biespecificidad puede usarse para caracterizar los anticuerpos proporcionados en este documento. Los ejemplos no limitantes de ensayos de biespecificidad incluyen inmunoensayos, ensayos de unión directa y ensayos de reticulación. Por ejemplo, un ensayo AlphaLISA (Perkin Elmer) es un inmunoensayo que puede usarse para determinar la biespecificidad de un anticuerpo. Un ensayo APLHLISA se basa en la proximidad de una perla donante y aceptora, dando como resultado una señal registrable. Para un anticuerpo biespecífico, la unión simultánea de un anticuerpo a dos antígenos acerca la perla donante y aceptora y genera una señal. El primer antígeno puede modificarse por ingeniería para contener una etiqueta, como una etiqueta FLAG, que puede unirse a las perlasceptoras conjugadas con un anticuerpo anti-etiqueta (p.ej., anti-FLAG). El segundo antígeno puede estar biotinilado y puede unirse a perlas donantes recubiertas con estreptavidina. Un anticuerpo que sea biespecífico para el primer y segundo antígenos acercará las perlas donantes yceptoras y generará una señal. Los ensayos adicionales para determinar la biespecificidad se ejemplifican en los ejemplos de este documento.

Función de anticuerpo

Los anticuerpos pueden efectuar varias funciones, como unión a antígeno e inducción de una respuesta inmunitaria, por ejemplo.

5 **Unión a antígeno**

El término "antígeno" como se usa en este documento se refiere a una molécula que provoca una respuesta inmunológica cuando se introduce en un organismo y que puede unirse con anticuerpos específicos. La unión anticuerpo-antígeno está mediada por la suma de muchas interacciones débiles entre el antígeno y el anticuerpo incluyendo, por ejemplo, enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals e interacciones iónicas y/o hidrófobas.

Un antígeno se une a las regiones de complementariedad en un anticuerpo. Las regiones correspondientes del antígeno se denominan "determinante antigénico" o "epítipo". La mayoría de los antígenos tienen múltiples determinantes; si 2 o más son idénticos, el antígeno es multivalente.

La afinidad de un anticuerpo refleja el ajuste entre el determinante antigénico y el sitio de unión a anticuerpo y es independiente del número de sitios de unión. La avidez de la unión refleja la estabilidad general del complejo anticuerpo-antígeno. La avidez se define como la fuerza de unión total de todos los sitios de unión. Por tanto, la afinidad del anticuerpo por su antígeno así como las valencias tanto del anticuerpo como del antígeno pueden influir en la avidez. La participación de ambos, en lugar de solo uno, sitios de unión multivalentes puede fortalecer la unión en un factor de hasta 10.000 en una molécula de IgG típica.

La naturaleza multivalente de muchos anticuerpos y antígenos puede dar lugar a reacciones secundarias, como precipitación, aglomeración celular y fijación del complemento en un organismo. Tales reacciones pueden ser útiles en técnicas como transferencia de Western, ELISA, inmunoprecipitación y similares. Sin embargo, estas reacciones pueden ser indeseables en una molécula destinada a uso terapéutico y/o diagnóstico. La naturaleza monovalente de los anticuerpos biespecíficos proporcionados en este documento proporciona por tanto una ventaja para fines terapéuticos y/o diagnósticos.

30 **Ejemplos de dianas**

En algunos aspectos, los pares específicos de moléculas son dirigidos por anticuerpos como se proporcionan en este documento. Los anticuerpos de la divulgación pueden unir pares de citocinas seleccionadas de, por ejemplo, IL-1alfa e IL-1beta; IL-12 e IL-18; TNFalfa e IL-23; TNFalfa e IL-13; TNF e IL-18; TNF e IL-12; TNF e IL-1beta; TNF y MIF; TNF e IL-17; TNF e IL-15; TNF y VEGF; VEGFR y EGFR; IL-13 e IL-9; IL-13 e IL-4; IL-13 e IL-5; IL-13 e IL-25; IL-13 y TARC; IL-13 y MDC; IL-13 y MIF; IL-13 y TGF-beta; agonista IL-13 y LHR; IL-13 y CL25; IL-13 y SPRR2a; IL-13 y SPRR2b; IL-13 y ADAM8; TNFalfa y PGE4; IL-13 y PED2; TNF y PEG2; HER2 y HER3; HER1 y HER2; HER1 y HER3.

En ciertos aspectos, los anticuerpos como se proporcionan en este documento pueden unir pares de dianas seleccionadas de, por ejemplo, CD138 y CD20; CD138 y CD40; CD19 y CD20; CD20 y CD3; CD38 y CD138; CD38 y CD20; CD38 y CD40; CD40 y CD20; CD-8 e IL-6; CSPGs y RGM A; CTLA4 y BTNO2; IGF1 e IGF2; IGF1/2 y ErbB2; IGFR y EGFR; ErbB2 y ErbB3; ErbB2 y CD64; IL-12 y TWEAK; IL-13 y IL-1beta; MAG y RGM A; NgR y RGM A; NogoA y RGM A; OMGP y RGM A; PDL-1 y CTLA4; RGM A y RGM B; Te38 y TNFalfa; TNFalfa y Blys; TNFalfa y CD-22; TNFalfa y CTLA-4; TNFalfa y GP130; TNFalfa y IL-12p40; y TNFalfa y ligando RANK.

En algunos aspectos, los anticuerpos que se proporcionan en este documento pueden unir uno, dos o más factores de crecimiento, citocinas, proteínas relacionadas con citocinas y receptores seleccionados de, por ejemplo, BMP1, BMP2, BMP3B (GDF10), BMP4, BMP6, BMP8, CSF1(M-CSF), CSF2 (GM-CSF), CSF3 (G-CSF), EPO, FGF1 (aFGF), FGF2 (bFGF), FGF3 (int-2), FGF4 (HST), FGF5, FGF6 (HST-2), FGF7 (KGF), FGF9, FGF10, FGF11, FGF12, FGF12B, FGF14, FGF16, FGF17, FGF19, FGF20, FGF21, FGF23, FGFR, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FGFR11, FGFR6, IGF1, IGF2, IGF1R, IGF2R, IFNA1, IFNA2, IFNA4, IFNA5, IFNA6, IFNA7, IFNAR1, IFNAR2, IFNB1, IFNG, IFNW1, FIL1, FIL1 (EPSILON), FIL1 (ZETA), IL1A, IL1B, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL11, IL12A, IL12B, IL13, IL14, IL15, IL16, IL17, IL17B, IL18, IL19, IL20, IL22, IL23, IL24, IL25, IL26, IL27, IL28A, IL28B, IL29, IL30, IL2RA, IL1R1, IL1R2, IL1RL1, IL1RL2, IL2RA, IL2RB, IL2RG, IL3RA, IL4R, IL5RA, IL6R, IL7R, IL8RA, IL8RB, IL9R, IL10RA, IL10RB, IL11RA, IL12RB1, IL12RB2, IL13RA1, IL13RA2, IL15RA, IL17R, IL17RA, IL17RB, IL17RC, IL17RD, IL18R1, IL20RA, IL20RB, IL21R, IL22R, IL22RA1, IL23R, IL27RA, IL28RA, PDGFA, PDGFB, PDGFRA, PDGFRB, TGFA, TGFB1, TGFB2, TGFB3, TGFB1, TGFB2, TGFB3, ACVRL1, GFRA1, LTA (TNF-beta), LTB, TNF (TNF-alfa), TNFSF4 (ligando OX40), TNFSF5 (ligando CD40), TNFSF6 (FasL), TNFSF7 (ligando CD27), TNFSF8 (ligando CD30), TNFSF9 (ligando 4-1BB), TNFSF10 (TRAIL), TNFSF11 (TRANCE), TNFSF12 (APO3L), TNFSF13 (April), TNFSF13B, TNFSF14 (HVEM-L), TNFSF15 (VEGI), TNFSF18, TNFRSF1A, TNFRSF1B, TNFRSF10A (receptor de Trail), TNFRSF10B (receptor 2 de Trail), TNFRSF10C (receptor 3 de Trail), TNFRSF10D (receptor 4 de Trail), FIGF (VEGFD), VEGF, VEGFB, VEGFC, KDR, FLT1, FLT4, NRP1, IL1HY1, IL1RAP, IL1RAPL1, IL1RAPL2, IL1RN, IL6ST, IL18BP, IL18RAP, IL22RA2, AIF1, HGF, LEP (leptina), PTN, ALK y THPO.

En aspectos adicionales, los anticuerpos que se proporcionan en este documento pueden unir una o más quimioquinas, receptores de quimioquinas y proteínas relacionadas con las quimioquinas seleccionadas de, por ejemplo, CCL1(I-309),

CCL2 (MCP-1/MCAF), CCL3 (MIP-1a), CCL4 (MIP-1b), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL8 (mcp-2), CCL11 (eotaxina), CCL13 (MCP-4), CCL15 (MIP-1d), CCL16 (HCC-4), CCL17 (TARC), CCL18 (PARC), CCL19 (MIP-3b), CCL20 (MIP-3a), CCL21 (SLC/exodus-2), CCL22 (MDC/STC-1), CCL23 (MPIF-1), CCL24 (MPIF-2/eotaxina-2), CCL25 (TECK), CCL26 (eotaxin-3), CCL27 (CTACK/ILC), CCL28, CXCL1(GRO1), CXCL2 (GRO2), CXCL3 (GRO3), CXCL5 (ENA-78), CXCL6 (GCP-2), CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP 10), CXCL11 (I-TAC), CXCL12 (SDF1), CXCL13, CXCL14, CXCL16, PF4 (CXCL4), PPBP (CXCL7), CX3CL1 (SCYD1), SCYE1, XCL1 (linfotactina), XCL2 (SCM-1b), BLR1 (MDR15), CCBP2 (D6/JAB61), CCR1 (CKR1/HM145), CCR2 (mcp-1RB/RA), CCR3 (CKR3/CMKBR3), CCR4, CCR5 (CMKBR5/ChemR13), CCR6 (CMKBR6/CKR-L3/STRL22/DRY6), CCR7 (CKR7/EBI1), CCR8 (CMKBR8/TER1/CKR-L1), CCR9 (GPR-9-6), CCRL1 (VSHK1), CCRL2 (L-CCR), XCR1 (GPR5/CCXCR1), CMKLR1, CMKOR1 (RDC1), CX3CR1 (V28), CXCR4, GPR2 (CCR10), GPR31, GPR81 (FKSG80), CXCR3 (GPR9/CKR-L2), CXCR6 (TYMSTR/STRL33/Bonzo), HM74, IL8RA (IL8Ra), IL8RB (IL8Rb), LTB4R (GPR16), TCP10, CKLFSF2, CKLFSF3, CKLFSF4, CKLFSF5, CKLFSF6, CKLFSF7, CKLFSF8, BDNF, C5R1, CSF3, GRCC10 (C10), EPO, FY (DARC), GDF5, HIF1A, IL8, PRL, RGS3, RGS13, SDF2, SLIT2, TLR2, TLR4, TREM1, TREM2, y VHL.

Otros anticuerpos como se proporcionan en este documento pueden unir proteínas de la superficie celular seleccionadas entre, por ejemplo, proteínas integrales de membrana que incluyen canales iónicos, bombas iónicas, receptores acoplados a proteína G, proteínas estructurales, proteínas de adhesión como integrinas, transportadores, enzimas unidas a membrana, proteínas involucradas en acumulación y transducción de energía y proteínas ancladas a lípidos, incluyendo proteínas G y algunas quinasas ancladas a membrana. Los anticuerpos que se proporcionan en este documento también pueden unir enzimas como quinasas, proteasas, lipasas, fosfatasa, sintetasas de ácido graso, enzimas digestivas como pepsina, tripsina y quimotripsina, lisozima y polimerasas. Los anticuerpos como se proporcionan en este documento también pueden unirse a receptores como receptores hormonales, receptores de linfoquinas, receptores de monoquinas, receptores de factor de crecimiento, receptores acoplados a proteína G y más.

En algunos aspectos, la naturaleza multimérica de los anticuerpos como se proporciona en este documento confiere la capacidad de dirigir etiquetas o productos terapéuticos a un tipo celular o diana molecular específicos. Por ejemplo, un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo como se proporciona en este documento puede unirse a una diana en la superficie de una célula, mientras que otro dominio de unión a antígeno en el mismo anticuerpo se une a un hapteno o agente de marcado útil para detección. De manera similar, un dominio funcional puede unirse a una diana celular mientras que un segundo dominio funcional se une a una toxina. Dado que ambas reacciones de unión están mediadas a través de una sola molécula, la toxina puede colocarse cerca de la diana celular, donde influye en una función citotóxica.

Función inmunológica

Los anticuerpos se unen e inactivan patógenos, pueden estimular la eliminación de patógenos por macrófagos y otras células al recubrir el patógeno, y desencadenar la destrucción de patógenos al estimular otras respuestas inmunológicas, como la vía del complemento. Los anticuerpos activan la vía del complemento uniéndose a antígenos de superficie en, por ejemplo, una bacteria o célula cancerosa. La región Fc del anticuerpo después interactúa con la cascada del complemento. La unión del anticuerpo y de las moléculas en cascada del complemento atrae a fagocitos y marca el microbio o célula para ingestión. Los componentes del sistema del complemento pueden formar un complejo de ataque a membrana para ayudar a anticuerpos a matar la bacteria o célula directamente.

La unión a anticuerpo puede hacer que los patógenos se aglutinen. Los patógenos recubiertos con anticuerpos estimulan las funciones efectoras en las células que reconocen la región Fc del anticuerpo. La función efectora finalmente produce la destrucción del microbio invasor o célula patógena, p.ej., los fagocitos se fagocitarán, los mastocitos y los neutrófilos se degranularán, y los linfocitos citolíticos naturales liberarán citocinas y moléculas citotóxicas.

Las células tumorales transformadas expresan antígenos anómalos de varias fuentes, incluyendo virus oncogénicos, niveles anómalamente altos de las proteínas propias del organismo y oncogenes que inducen cáncer. Los antígenos tumorales se presentan en las principales moléculas de clase I de histocompatibilidad (MHC) de manera similar a los antígenos virales. Los antígenos activan los linfocitos citolíticos T y también generan anticuerpos que activan el sistema del complemento.

Un anticuerpo en este documento puede unirse a un tumor u otro antígeno celular patógeno y desencadenar la destrucción celular mediante una función de anticuerpo. En ciertos aspectos, un anticuerpo en este documento puede conjugarse con una molécula terapéutica, incluyendo una molécula de diagnóstico o toxina, y llevar la molécula conjugada al sitio seleccionado por medio de afinidad anticuerpo-antígeno.

Epítopos

El término "epítopo" como se usa en este documento se refiere a un determinante molecular capaz de unirse a un anticuerpo. Los epítopos incluyen generalmente agrupaciones de moléculas de superficie químicamente activa como aminoácidos y/o cadenas laterales de azúcar y generalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características químicas específicas (p.ej., carga, polaridad, básica, ácida, hidrofobia y similares). Los epítopos conformacionales y no conformacionales se distinguen porque la unión al primero pero no al último se pierde en presencia de disolventes desnaturizantes.

En ciertos aspectos, un epítipo está formado por al menos una parte extracelular, soluble, hidrófila, externa o citoplasmática de una proteína diana. Un epítipo especificado puede comprender cualquier combinación de al menos una secuencia de aminoácidos de al menos 3 restos de aminoácido a la parte especificada completa de aminoácidos contiguos de la proteína diana. En algunos aspectos, el epítipo tiene al menos 4 restos de aminoácido, al menos 5 restos de aminoácido, al menos 6 restos de aminoácido, al menos 7 restos de aminoácido, al menos 8 restos de aminoácido o al menos 9 restos de aminoácido para la parte especificada completa de aminoácidos contiguos de la proteína diana.

Fragmentos de anticuerpo

En ciertos aspectos, los presentes anticuerpos comprenden fragmentos de anticuerpo. El fragmento de anticuerpo comprende una parte del anticuerpo de longitud completa, que generalmente es la unión al antígeno o región variable del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fd y Fv. Diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena sencilla; y anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos formados a partir de estos fragmentos de anticuerpo.

Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaron mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos utilizando técnicas conocidas en la técnica. Sin embargo, ahora las células hospedadoras recombinantes pueden producir directamente estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y scFv pueden expresarse y secretarse de *E. coli*, permitiendo así la producción fácil de grandes cantidades de estos fragmentos. En un aspecto, los fragmentos de anticuerpo pueden aislarse de las fagotecas de anticuerpos discutidas en otras partes de este documento. Los fragmentos Fab'-SH también pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂. Los fragmentos F(ab')₂ también pueden aislarse directamente del cultivo de células hospedadoras recombinantes. En la técnica se conocen otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. En ciertos aspectos, los anticuerpos proporcionados en este documento comprenden un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv) u otro dominio de unión a antígeno.

En ciertos aspectos, en este documento los anticuerpos comprenden anticuerpos de dominio, p.ej., anticuerpos que contienen las pequeñas unidades funcionales de unión de anticuerpos, correspondientes a las regiones variables de las cadenas pesadas (VH) o ligeras (VL) de anticuerpos humanos. Los ejemplos de anticuerpos de dominio incluyen, pero no se limitan a, los disponibles en Domantis que son específicos para dianas terapéuticas. Las bibliotecas de anticuerpos de dominio disponibles comercialmente pueden usarse para identificar anticuerpos de dominio antigénico. En ciertos aspectos, los anticuerpos en este documento comprenden una unidad de unión funcional y una unidad de unión funcional del receptor gamma Fc.

En ciertos aspectos, los anticuerpos en este documento comprenden vaccicuerpos. Las vacunas son polipéptidos diméricos. Cada monómero de un anticuerpo consiste en un scFv con especificidad para una molécula de superficie en APC conectada mediante una región bisagra y un dominio Cy3 a un segundo scFv. En algunos aspectos, los anticuerpos que contienen como uno de los scFv un anticuerpo que carece del fragmento de cisteínas intercadena pueden usarse para yuxtaponer esas células para su destrucción y una célula efectora que media en ADCC.

En ciertos aspectos, en este documento los anticuerpos son anticuerpos lineales. Los anticuerpos lineales comprenden un par de segmentos Fd en tándem (VH-CH1-VH-CH1) que forman un par de regiones de unión a antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos, en ciertos aspectos.

Modificaciones de HC y LC

En este documento, en algunos aspectos, los anticuerpos se modifican por ingeniería en donde una o más cisteínas intercadena se han reubicado, lo que, en algunos aspectos, da como resultado la reubicación de un enlace disulfuro intercadena. En algunos aspectos, esto implica la modificación de una cadena pesada y una cadena ligera dentro de un anticuerpo mediante el cual una cisteína nativa en la cadena pesada y una cisteína nativa en la cadena ligera son sustituidas por un aminoácido que no es cisteína, y un aminoácido que no es cisteína nativa en la cadena pesada y un aminoácido que no es cisteína nativa en la cadena ligera se sustituyen cada uno por un aminoácido cisteína. En algunos aspectos, el puente disulfuro reubicado está en una de las dos interfaces CH1-CL de un anticuerpo (es decir, en un brazo del anticuerpo). A menudo, las regiones HC y LC se modifican de manera que cada una contenga una sustitución de una cisteína nativa por un aminoácido que no es cisteína, y una sustitución de un aminoácido que no es cisteína nativa por un aminoácido cisteína, de modo que el puente disulfuro resultante que se forma entre las regiones HC y LC modificadas está en una ubicación a lo largo de la interfaz que es diferente del puente disulfuro que se forma entre las regiones HC y LC no modificadas. En ciertos aspectos, cada cadena pesada comprende además una modificación que favorece la heterodimerización de la cadena pesada. En otros aspectos, una cadena pesada comprende además una modificación que facilita la purificación del heterodímero, esta modificación puede ser adicional o como alternativa a una modificación que favorece la heterodimerización de la cadena pesada.

En este documento también se proporcionan, en algunos aspectos, anticuerpos modificados por ingeniería en donde la(s) cadena(s) pesada(s) y la(s) cadena(s) ligera(s) correspondiente(s) se modificaron por ingeniería para favorecer el emparejamiento entre cadenas de una primera cadena pesada con una primera cadena ligera y una segunda cadena

5 pesada con una segunda cadena ligera. En algunos aspectos, esto implica la modificación de una primera cadena pesada y una primera cadena ligera mediante la cual la primera cadena pesada comprende una protuberancia y/o una cavidad y la primera cadena ligera comprende una cavidad compensatoria y/o una protuberancia que favorece el emparejamiento entre cadenas de la primera cadena pesada y primera ligera. En algunos aspectos, esto implica además la modificación de una segunda cadena pesada y una segunda cadena ligera por lo que la segunda cadena pesada comprende una protuberancia y/o una cavidad y la segunda cadena ligera comprende una cavidad compensatoria y/o una protuberancia que favorece el emparejamiento entre cadenas de la segunda cadena pesada y segunda cadena ligera. En algunos aspectos, las primeras cadenas pesadas y ligeras y/o las segundas cadenas pesadas y ligeras comprenden además una sustitución de una cisteína nativa por un aminoácido que no es cisteína. En ciertos aspectos, cada cadena pesada comprende además una modificación que favorece la heterodimerización de la cadena pesada. En otros aspectos, una cadena pesada comprende además una modificación que facilita la purificación del heterodímero, esta modificación puede ser adicional o como alternativa a una modificación que favorece la heterodimerización de la cadena pesada.

15 Ejemplos de posiciones, numeradas según el índice de UE como se establece en Kabat, que contienen una sustitución dentro de la región constante de una cadena pesada o ligera de IgG y las posiciones correspondientes dentro de las secuencias establecidas en la Tabla 8 y el listado de secuencias en este documento se presentan en la Tabla 2 a continuación. Figuras 22 y 24 muestran la numeración de las regiones constantes de la cadena ligera y pesada, respectivamente, según el índice de UE establecido en Kabat.

TABLA 2: Posiciones del Aminoácido de la Región Constante Modificada			
Isotipo de Anticuerpo - región CH	SEQ ID NO	Numeración según el índice de UE	Posición correspondiente para cada SEQ ID NO
Región Constante - Cadena Pesada			
IgG1- CH1	1	126	9
		128	11
		141	24
		145	28
		147	30
		168	51
		170	53
		183	66
		185	68
		220	103
IgG1-CH2-CH3	1	349	232
		354	237
		366	249
		368	251
		407	290
		435	318
		436	319
IgA2-CH1	2	126	9
		128	11
		131	14
		141	24
		145	28
		147	30
		168	51
		170	53
		183	66

TABLA 2: Posiciones del Aminoácido de la Región Constante Modificada			
Isotipo de Anticuerpo - región CH	SEQ ID NO	Numeración según el índice de UE	Posición correspondiente para cada SEQ ID NO
Región Constante - Cadena Pesada			
		185	68
		219	102
		220	103
IgG2-CH2-CH3	2	349	229
		354	234
		366	246
		368	248
		407	286
		435	314
		436	315
IgG3-CH1	3	126	9
		128	11
		131	14
		141	24
		145	28
		147	30
		168	51
		170	53
		183	66
		185	68
IgG3-CH2-CH3	3	349	379
		354	384
		366	296
		368	298
		407	337
		435	365
		436	366
IgG4-CH1	4	126	9
		128	11
		131	14
		141	24
		145	28
		147	30
		168	51
		170	53
		183	66
		185	68
IgG4-CH2-CH3	4	349	229

TABLA 2: Posiciones del Aminoácido de la Región Constante Modificada			
Isotipo de Anticuerpo - región CH	SEQ ID NO	Numeración según el índice de UE	Posición correspondiente para cada SEQ ID NO
Región Constante - Cadena Pesada			
		354	234
		366	246
		368	248
		407	287
		435	315
		436	316
Cadena Ligera			
Kappa	5	116	9
		118	11
		121	14
		131	24
		135	28
		164	57
		176	69
		178	71
		214	107
Lambda	6	116	9
		118	11
		121	14
		131	24
		135	28
		164	56
		176	68
		178	70
		214	104

En la Tabla 3 a continuación se presentan ejemplos de posiciones, numeradas según la definición de Kabat, que contienen una sustitución dentro de la región variable de una cadena pesada o ligera de IgG.

TABLA 3: Posiciones del Aminoácido de la Región Variable Modificada				
Cadena de Anticuerpo	Numeración según la definición de Kabat ‡		Cadena de Anticuerpo	Numeración según la definición de Kabat‡
Región Variable de Cadena Pesada	44		Región Variable de Cadena Ligera	100
	44			105
	45			87
	55			101
	100			50
	98			46
	101			46

TABLA 3: Posiciones del Aminoácido de la Región Variable Modificada					
Cadena Anticuerpo	de	Numeración según la definición de Kabat ‡	Cadena Anticuerpo	de	Numeración según la definición de Kabat‡
		105			43
		106			57

‡ La Tabla 3 proporciona la numeración de las regiones variables según la definición de Kabat. Figuras 15A, 15B, 17A y 17B proporcionan la numeración de Kabat de regiones variables (Marcos y las CDR) a partir de varios anticuerpos representativos.

Cisteínas nativas sustituidas por aminoácidos que no son cisteína

En algunos aspectos, las cisteínas nativas se reemplazan por aminoácidos que no son cisteína. En algunos aspectos, las cisteínas intercadenas dentro de la interfaz HC-LC son reemplazadas por aminoácidos que no son cisteína. En algunos aspectos, una o más cisteínas intercadenas se reemplazan por aminoácidos que no son cisteína en una cadena pesada IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En algunos aspectos, una cadena pesada de IgG1 tiene una sustitución de una cisteína nativa por un aminoácido que no es cisteína en la posición 220, donde la numeración se realiza según el índice de UE. En algunos aspectos, una cadena pesada de IgG2 tiene una sustitución de una cisteína nativa por un aminoácido que no es cisteína en la posición 131 y/o 219 y/o 220, donde la numeración se realiza según el índice de UE. En algunos aspectos, una cadena pesada de IgG3 o IgG4 tiene una sustitución de una cisteína nativa por un aminoácido que no es cisteína en la posición 131, donde la numeración se realiza según el índice de UE. En algunos aspectos, una cisteína intercadenas se reemplaza por un aminoácido que no es cisteína en una cadena ligera de IgG. En algunos aspectos, la cadena ligera es una cadena ligera kappa y en algunos aspectos la cadena ligera es una cadena ligera lambda. En algunos aspectos, una cadena ligera de IgG tiene una sustitución de una cisteína nativa por un aminoácido que no es cisteína en la posición 214, donde la numeración se realiza según el índice de UE. Tales aminoácidos que no son cisteína incluyen, en algunos aspectos, aminoácidos naturales y/o no clásicos.

Los aminoácidos naturales que no son cisteína incluyen glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, serina, treonina, metionina, histidina, lisina, arginina, glutamato, aspartato, glutamina, asparagina, fenilalanina, tirosina y triptófano. Los aminoácidos no clásicos a veces se pueden incorporar mediante sistemas de expresión celular (p.ej., sistemas de expresión procariotas y/o eucariotas). Los ejemplos de aminoácidos no clásicos incluyen ornitina, ácido diaminobutírico, norleucina, pirilalanina, tienilalanina, naftilalanina y fenilglicina. Otros ejemplos de aminoácidos no clásicos son aminoácidos alfa y alfa-disustituidos, N-alkil aminoácidos, ácido láctico*, derivados de haluro de aminoácidos naturales como trifluorotirosina*, p-X-fenilalanina (donde X es un haluro como F, Cl, Br o I)*, alilglicina*, ácido 7-aminoheptanoico*, metionina sulfona*, norleucina*, norvalina*, p-nitrofenilalanina*, hidroxiprolina#, tioprolina*, derivados de metilo de fenilalanina (Phe) como 4 -metil-Phe*, pentametil-Phe*, Phe (4-amino)#, Tyr (metilo)*, Phe (4-isopropilo)*, Tic (ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico)*, ácido diaminopropiónico, Phe (4-bencilo)*, ácido 4-aminobutírico (gamma-Abu)*, ácido 2-aminobutírico (alfa-Abu)*, ácido 6-aminohexanoico (épsilon-Ahx)*, ácido 2-aminoisobutírico (Aib)*, ácido 3-aminopropiónico*, norvalina*, hidroxiprolina, sarcosina, citrulina, homocitrulina, ácido cisteico, t-butilglicina*, t-butilalanina*, fenilglicina*, ciclohexilalanina*, fluoroaminoácidos, aminoácidos de diseño como beta-metil aminoácidos y similares. La notación * indica un derivado que tiene características hidrófobas y # indica un derivado que tiene características hidrófilas.

En ciertos aspectos, las cisteínas intercadenas HC-LC se sustituyen por valina o alanina. En algunos aspectos, el aminoácido en la posición 220 en una cadena pesada de IgG1 se sustituye por valina o alanina. En algunos aspectos, el aminoácido en la posición 131 y/o 219 y/o 220 en una cadena pesada de IgG2 se sustituye por valina o alanina. En algunos aspectos, el aminoácido en la posición 131 en una cadena pesada de IgG3 o IgG4 se sustituye por valina o alanina. En algunos aspectos, el aminoácido en la posición 214 en una cadena ligera de IgG se sustituye por valina.

Aminoácidos nativos que no son cisteína sustituidos por cisteína

En algunos aspectos, los aminoácidos que no son cisteína nativa se sustituyen por aminoácidos cisteína. En algunos aspectos, los aminoácidos nativos que no son cisteína se sustituyen por aminoácidos cisteína dentro de las regiones HC y LC. Los aminoácidos nativos que no son cisteína pueden sustituirse por aminoácidos cisteína en cualquier posición dentro de la región CH1 y la región CL que contiene un aminoácido nativo que no es cisteína. Tales posiciones, en algunos aspectos, son permisivas para la formación de enlaces disulfuro entre cadenas cuando el aminoácido nativo se sustituye por un aminoácido cisteína. En algunos aspectos, un aminoácido que no es cisteína nativa se sustituye por un aminoácido cisteína en una cadena pesada IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En algunos aspectos, una cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 tiene una sustitución de un aminoácido que no es cisteína nativa por un aminoácido cisteína en la posición 141, donde la numeración se realiza según el índice de UE. En algunos aspectos, una cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 tiene una sustitución de un aminoácido que no es cisteína nativa por un aminoácido cisteína en la posición 168, donde la numeración se realiza según el índice de UE. En algunos aspectos, una cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 tiene una sustitución de un aminoácido que no es cisteína nativa por un aminoácido cisteína en la posición 126, donde la numeración se realiza según el índice de UE. En algunos aspectos, una cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 o

IgG4 tiene una sustitución de un aminoácido que no es cisteína nativa por un aminoácido cisteína en la posición 128, donde la numeración se realiza según el índice de UE.

- En algunos aspectos, un aminoácido que no es cisteína nativa se sustituye por un aminoácido cisteína en una cadena ligera de IgG. En algunos aspectos, la cadena ligera es una cadena ligera kappa y en algunos aspectos la cadena ligera es una cadena ligera lambda. En algunos aspectos, una cadena ligera de IgG tiene una sustitución de un aminoácido que no es cisteína nativa por un aminoácido cisteína en la posición 116, donde la numeración se realiza según el índice de UE. En algunos aspectos, una cadena ligera de IgG tiene una sustitución de un aminoácido que no es cisteína nativa por un aminoácido cisteína en la posición 164, donde la numeración se realiza según el índice de UE. En algunos aspectos, una cadena ligera de IgG tiene una sustitución de un aminoácido que no es cisteína nativa por un aminoácido cisteína en la posición 121, donde la numeración se realiza según el índice de UE. En algunos aspectos, una cadena ligera de IgG tiene una sustitución de un aminoácido que no es cisteína nativa por un aminoácido cisteína en la posición 118, donde la numeración se realiza según el índice de UE.
- En algunos aspectos, la alanina en la posición 141 está sustituida por una cisteína en una cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En algunos aspectos, la histidina en la posición 168 está sustituida por una cisteína en una cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En algunos aspectos, la fenilalanina en la posición 126 está sustituida por una cisteína en una cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En algunos aspectos, la leucina en la posición 128 está sustituida por una cisteína en una cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En algunos aspectos, la fenilalanina o treonina en la posición 116 está sustituida por una cisteína en una cadena ligera de IgG. En algunos aspectos, la treonina o lisina en la posición 164 se sustituye por una cisteína en una cadena ligera de IgG. En algunos aspectos, la serina en la posición 121 está sustituida por una cisteína en una cadena ligera de IgG. En algunos aspectos, la fenilalanina en la posición 118 está sustituida por una cisteína en una cadena ligera de IgG.
- En algunos aspectos, los aminoácidos nativos que no son cisteína se sustituyen por aminoácidos cisteína dentro de las regiones VH y VL. Los aminoácidos nativos que no son cisteína pueden sustituirse por aminoácidos cisteína en cualquier posición dentro de la región VH y la región VL que contiene un aminoácido nativo que no es cisteína. Tales posiciones, en algunos aspectos, son permisivas para la formación de enlaces disulfuro entre cadenas cuando el aminoácido nativo se sustituye por un aminoácido cisteína. En algunos aspectos, un aminoácido que no es cisteína nativa se sustituye por un aminoácido cisteína en una región variable de cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En algunos aspectos, un aminoácido que no es cisteína nativa se sustituye por un aminoácido cisteína dentro de la región variable de VH y VL en una posición conocida en la técnica, véase por ejemplo, Brinkmann et al., 1993, PNAS, 90:7538-42; Zhu et al., 1997, Prot. Sci. 6:781-8; Reiter et al., 1994, Biochem. 33:5451-9; Reiter et al., 1996, Nature 14: 1239-45; Luo et al., 1995, J. Biochem. 118:825-31; Young et al., 1995, FEBS Let. 377:135-9; Glockshuber et al., 1990, Biochem. 29:1362-7. En algunos aspectos, una cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 tiene una sustitución de un aminoácido que no es cisteína nativa por un aminoácido cisteína en la posición 37 de la región variable, donde la numeración se realiza según el índice de Kabat. En algunos aspectos, una cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 tiene una sustitución de un aminoácido que no es cisteína nativa por un aminoácido cisteína en la posición 44 de la región variable, donde la numeración se realiza según el índice de Kabat. En algunos aspectos, una cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 tiene una sustitución de un aminoácido que no es cisteína nativa por un aminoácido cisteína en la posición 45 de la región variable, donde la numeración se realiza según el índice de Kabat. En algunos aspectos, una cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 tiene una sustitución de un aminoácido que no es cisteína nativa por un aminoácido cisteína en la posición 55 de la región variable, donde la numeración se realiza según el índice de Kabat. En algunos aspectos, una cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 tiene una sustitución de un aminoácido que no es cisteína nativa por un aminoácido cisteína en la posición 98 de la región variable, donde la numeración se realiza según el índice de Kabat. En algunos aspectos, una cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 tiene una sustitución de un aminoácido que no es cisteína nativa por un aminoácido cisteína en la posición 100 de la región variable, donde la numeración se realiza según el índice de Kabat. En algunos aspectos, una cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 tiene una sustitución de un aminoácido que no es cisteína nativa por un aminoácido cisteína en la posición 101 de la región variable, donde la numeración se realiza según el índice de Kabat. En algunos aspectos, una cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 tiene una sustitución de un aminoácido que no es cisteína nativa por un aminoácido cisteína en la posición 105 de la región variable, donde la numeración se realiza según el índice de Kabat. En algunos aspectos, una cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 tiene una sustitución de un aminoácido que no es cisteína nativa por un aminoácido cisteína en la posición 106 de la región variable, donde la numeración se realiza según el índice de Kabat.
- En algunos aspectos, un aminoácido que no es cisteína nativa se sustituye por un aminoácido cisteína en una región variable de cadena ligera de IgG. En algunos aspectos, una cadena ligera de IgG tiene una sustitución de un aminoácido que no es cisteína nativa por un aminoácido cisteína en la posición 43 en la región variable, donde la numeración se realiza según el índice de Kabat. En algunos aspectos, una cadena ligera de IgG tiene una sustitución de un aminoácido que no es cisteína nativa por un aminoácido cisteína en la posición 46 en la región variable, donde la numeración se realiza según el índice de Kabat. En algunos aspectos, una cadena ligera de IgG tiene una sustitución de un aminoácido que no es cisteína nativa por un aminoácido cisteína en la posición 50 en la región variable, donde la numeración se realiza según el índice de Kabat. En algunos aspectos, una cadena ligera de IgG tiene una sustitución de un aminoácido que no es cisteína nativa por un aminoácido cisteína en la posición 57 en la región variable, donde la numeración se realiza según el índice de Kabat. En algunos aspectos, una cadena ligera de IgG tiene una sustitución de un aminoácido que no es cisteína nativa por un aminoácido cisteína en la posición 87 en la región variable, donde la numeración se

realiza según el índice de Kabat. En algunos aspectos, una cadena ligera de IgG tiene una sustitución de un aminoácido que no es cisteína nativa por un aminoácido cisteína en la posición 95 en la región variable, donde la numeración se realiza según el índice de Kabat. En algunos aspectos, una cadena ligera de IgG tiene una sustitución de un aminoácido que no es cisteína nativa por un aminoácido cisteína en la posición 100 en la región variable, donde la numeración se realiza según el índice de Kabat. En algunos aspectos, una cadena ligera de IgG tiene una sustitución de un aminoácido que no es cisteína nativa por un aminoácido cisteína en la posición 101 en la región variable, donde la numeración se realiza según el índice de Kabat. En algunos aspectos, una cadena ligera de IgG tiene una sustitución de un aminoácido que no es cisteína nativa por un aminoácido cisteína en la posición 105 en la región variable, donde la numeración se realiza según el índice de Kabat.

Protuberancias y Cavidades

En algunos aspectos, la sustitución de al menos un aminoácido genera una protuberancia y/o una cavidad. Las sustituciones de aminoácido que generan una protuberancia y/o una cavidad pueden estar en cualquier posición dentro de la región CH1 y/o la región CL. En algunos aspectos, la sustitución de al menos un aminoácido genera una protuberancia y/o una cavidad dentro de la región CH1 y genera una cavidad compensatoria y/o protuberancia en la región CL. En ciertos aspectos, tales sustituciones favorecen el emparejamiento entre cadenas del CH1 que comprende la cavidad y/o protuberancia y el CL que comprende la cavidad compensatoria y/o protuberancia. En ciertos aspectos, además de las sustituciones que generan una protuberancia y/o una cavidad, el CH1 y el CL comprenden sustituciones adicionales incluyen las cisteínas entre cadenas dentro de la interfaz HC-LC con aminoácidos que no son cisteína como se describió anteriormente.

En algunos aspectos, la sustitución de al menos un aminoácido genera una protuberancia y/o una cavidad en una cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En algunos aspectos, la posición 145 de una cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 se sustituye con un aminoácido que tiene una cadena lateral grande donde la numeración se realiza según el índice de UE. En algunos aspectos, la posición 183 de una cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 se sustituye con un aminoácido que tiene una cadena lateral grande donde la numeración se realiza según el índice de UE. En algunos aspectos, la posición 185 de una cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 se sustituye con un aminoácido que tiene una cadena lateral grande donde la numeración se realiza según el índice de UE. En algunos aspectos, la posición 147 de una cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 está sustituida por un aminoácido que tiene una cadena lateral pequeña donde la numeración se realiza según el índice de UE. En algunos aspectos, la posición 170 de una cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 está sustituida por un aminoácido que tiene una cadena lateral pequeña donde la numeración se realiza según el índice de UE. En algunos aspectos, la posición 147 está sustituida por un aminoácido que tiene una cadena lateral pequeña y la posición 185 está sustituida por un aminoácido que tiene una cadena lateral grande en una cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 donde la numeración se realiza según el índice de UE. En algunos aspectos, la posición 145 está sustituida por un aminoácido que tiene una cadena lateral grande, la posición 170 está sustituida por un aminoácido que tiene una cadena lateral pequeña, la posición 183 está sustituida por un aminoácido que tiene una cadena lateral grande, y la posición 185 está sustituida por un aminoácido que tiene una cadena lateral grande en una cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 donde la numeración se realiza según el índice de UE. En ciertos aspectos, además de la sustitución(sustituciones) que generan una protuberancia y/o una cavidad, la cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 comprende además la sustitución de las cisteínas intercadenas con aminoácidos que no son cisteína como se describió anteriormente.

En algunos aspectos, la sustitución de al menos un aminoácido genera una protuberancia y/o una cavidad en una cadena ligera de IgG. En algunos aspectos, la cadena ligera es una cadena ligera kappa y en algunos aspectos la cadena ligera es una cadena ligera lambda. En algunos aspectos, la posición 131 de una cadena ligera de IgG está sustituida por un aminoácido que tiene una cadena lateral grande donde la numeración se realiza según el índice de UE. En algunos aspectos, la posición 176 de una cadena ligera de IgG está sustituida por un aminoácido que tiene una cadena lateral grande donde la numeración se realiza según el índice de UE. En algunos aspectos, la posición 135 de una cadena ligera de IgG está sustituida por un aminoácido que tiene una cadena lateral pequeña donde la numeración se realiza según el índice de UE. En algunos aspectos, la posición 178 de una cadena ligera de IgG está sustituida por un aminoácido que tiene una cadena lateral pequeña donde la numeración se realiza según el índice de UE. En algunos aspectos, la posición 131 está sustituida por un aminoácido que tiene una cadena lateral grande y la posición 135 está sustituida por un aminoácido que tiene una cadena lateral pequeña en una cadena ligera de IgG donde la numeración se realiza según el índice de UE. En algunos aspectos, la posición 176 está sustituida por un aminoácido que tiene una cadena lateral grande y la posición 178 está sustituida por un aminoácido que tiene una cadena lateral pequeña en una cadena ligera de IgG donde la numeración se realiza según el índice de UE. En ciertos aspectos, además de la(s) sustitución(sustituciones) que generan una protuberancia y/o una cavidad, la cadena ligera de IgG comprende además la sustitución de las cisteínas intercadenas por aminoácidos que no son cisteína como se describió anteriormente.

En un aspecto, la leucina en la posición 145 se sustituye por una fenilalanina en una cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 donde la numeración se realiza según el índice de UE. En un aspecto, la lisina en la posición 147 se sustituye por una alanina en una cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 donde la numeración se realiza según el índice de UE. En un aspecto, la fenilalanina en la posición 170 se sustituye por valina en una cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 donde la numeración se realiza según el índice de UE. En un aspecto, la serina en la posición 183 se sustituye por fenilalanina en una cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 donde la numeración se realiza según el índice de UE.

En un aspecto, la valina en la posición 185 se sustituye por un triptófano o fenilalanina en una cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 donde la numeración se realiza según el índice de UE. En un aspecto, la valina en la posición 185 se sustituye por un triptófano y la lisina en la posición 147 se sustituye por una alanina en una cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 donde la numeración se realiza según el índice de UE. En un aspecto, la leucina en la posición 145 se sustituye por una fenilalanina, la fenilalanina en la posición 170 se sustituye por valina, la serina en la posición 183 se sustituye por fenilalanina, y la valina en la posición 185 se sustituye por una fenilalanina en una cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 donde la numeración se realiza según el índice de UE. En ciertos aspectos, además de la sustitución(sustituciones) que generan una protuberancia y/o una cavidad, la cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 además comprende la sustitución de las cisteínas intercadenas por aminoácidos que no son cisteína como se describió anteriormente.

En un aspecto, la serina en la posición 131 de una cadena ligera kappa o la treonina en la posición 131 de una cadena ligera lambda se sustituye por triptófano donde la numeración se realiza según el índice de UE. En un aspecto, la serina en la posición 176 de una cadena ligera kappa o lambda se sustituye por una fenilalanina donde la numeración se realiza según el índice de UE. En un aspecto, la leucina en la posición 135 de una cadena ligera kappa o lambda se sustituye por una glicina donde la numeración se realiza según el índice de UE. En un aspecto, la treonina en la posición 178 de una cadena ligera kappa o la tirosina en la posición 178 de una cadena ligera lambda se sustituye por una alanina donde la numeración se realiza según el índice de UE. En algunos aspectos, la serina en la posición 131 se sustituye por un triptófano y la leucina en la posición 135 se sustituye por una alanina en una cadena ligera kappa donde la numeración se realiza según el índice de UE. En algunos aspectos, la serina en la posición 176 se sustituye por fenilalanina y la treonina en la posición 178 se sustituye por alanina en una cadena ligera kappa donde la numeración se realiza según el índice de UE.

En algunos aspectos, la treonina en la posición 131 se sustituye por un triptófano y la leucina en la posición 135 se sustituye por una alanina en una cadena ligera lambda donde la numeración se realiza según el índice de UE. En algunos aspectos, la serina en la posición 176 se sustituye por fenilalanina y la tirosina en la posición 178 se sustituye por alanina en una cadena ligera lambda donde la numeración se realiza según el índice de UE. En algunos aspectos, además de la sustitución(sustituciones) que generan una protuberancia y/o una cavidad, la cadena ligera de IgG además comprende la sustitución de las cisteínas intercadenas por aminoácidos que no son cisteína como se describió anteriormente.

Combinaciones de sustitución de aminoácido de HC-LC

En ciertos aspectos, las combinaciones de sustituciones se realizan en una cadena pesada de IgG y la cadena ligera correspondiente. A menudo, tales combinaciones de sustituciones dan como resultado la eliminación de cisteínas nativas que típicamente forman un puente disulfuro entre la cadena pesada y ligera dentro de las regiones HC y LC y la generación de un nuevo par de cisteínas capaces de formar un puente disulfuro en una ubicación diferente dentro de la interfaz HC-LC. El nuevo par de cisteínas puede ubicarse dentro de las regiones variables y/o el CH1-LC de las cadenas pesadas y ligeras. Tales combinaciones de sustituciones se resumen en la Tabla 4 a continuación. La numeración de las posiciones se realiza según el índice de UE para las regiones constantes y según el índice de Kabat para las regiones variables. Aunque no se indica específicamente en la Tabla 4, la cadena ligera puede ser una cadena ligera kappa (κ) o lambda (λ).

En ciertos aspectos, un anticuerpo biespecífico de la invención comprenderá dos cadenas pesadas diferentes del mismo tipo de Ig (p.ej., dos cadenas pesadas de IgG1, una con una modificación de un resto de cisteína y otra sin dicha modificación) y dos cadenas ligeras diferentes (p.ej., una con una modificación de un resto de cisteína y otra sin dicha modificación), que puede ser cualquier combinación de kappa y/o lambda (es decir, dos cadenas ligeras kappa, dos cadenas ligeras lambda o una cadena ligera lambda y una kappa). En un aspecto particular, un anticuerpo biespecífico de la invención comprenderá dos cadenas pesadas diferentes del mismo tipo de Ig y una cadena ligera lambda y una cadena ligera kappa.

Aunque el uso de las diversas modificaciones descritas en este documento mejora en gran medida la formación de anticuerpos bivalentes, pueden surgir algunos anticuerpos mal emparejados debido al emparejamiento erróneo de las cadenas pesadas y ligeras o debido a la homodimerización de las cadenas pesadas. La presencia de dos regiones constantes de cadena ligera diferentes proporciona un medio conveniente para eliminar cualquier anticuerpo mal emparejado que tenga la misma cadena ligera mediante el uso de medios de cromatografía por afinidad (p.ej., resinas) específicos para las cadenas ligeras de tipo kappa o lambda. En la técnica se conocen medios de cromatografía por afinidad que interactúan específicamente con los dominios constantes de la cadena ligera kappa o lambda (p.ej., las matrices de afinidad CaptureSelect Kappa y CaptureSelect Lambda (BAC BV, Holanda)). En ciertos aspectos, solo se forma un tipo de subproducto mal emparejado por LC debido al exceso de una sola cadena ligera. Por tanto, si la cadena ligera en exceso es kappa, el subproducto LC se eliminará usando un medio de cromatografía por afinidad específico para la cadena ligera lambda y si la cadena ligera en exceso es lambda, el subproducto se eliminará usando un medio de cromatografía por afinidad específico para la cadena ligera kappa.

Alternativamente, u opcionalmente, pueden usarse medios de afinidad específicos de cadena ligera en un proceso de múltiples etapas para purificar anticuerpos que tienen una cadena ligera kappa y una cadena ligera lambda. Se proporciona un proceso representativo de tres etapas a modo de ejemplo: (1) proteína A y/o resina G, si fuera apropiado, se usa para capturar IgG (toda IgG, incluyendo el producto mal emparejado, se unirá a la proteína A y/o G); (2) los

anticuerpos de los medios de proteína A y/o G se pasan sobre un medio específico kappa para capturar la(s) cadena(s) ligera(s) kappa que contiene IgG (toda IgG comprende una o dos cadenas ligeras kappa se unirán a un medio específico de kappa mientras que los anticuerpos que comprenden dos cadenas lambda fluirán), (3) los anticuerpos de los medios específicos kappa se pasan sobre un medio específico lambda para capturar IgG que contiene una cadena ligera lambda (los anticuerpos que comprenden dos cadenas kappa fluirán). Cabe señalar que el orden de las etapas puede alterarse y además que ciertas etapas pueden eliminarse y/o reemplazarse por otros métodos de cromatografía útiles en la purificación de anticuerpos de contaminantes (p.ej., proteínas de célula hospedadora). En este documento en los Ejemplos se proporciona un método representativo de dos etapas. Véase también, Publicación de Patente Internacional WO 2012/023053 y los Ejemplos proporcionados en este documento.

Las sustituciones de aminoácido como se describe en este documento (p.ej., de restos de aminoácido nativo, restos de aminoácido cisteína y/o que no es cisteína) pueden realizarse usando cualquier método conocido en la técnica. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, mutagénesis de solapamiento de extensión de PCR, mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis en casete (véase, en general, Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY, 1989; Ausbel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing & Wiley-Interscience, NY, 1993). Los kits de mutagénesis dirigida al sitio están disponibles comercialmente, p.ej., kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange® (Stratagen, La Jolla, CA). La mutagénesis en casete puede realizarse basándose en Wells et al., 1985, Gene, 34:315-323. Alternativamente, los mutantes pueden prepararse mediante síntesis génica total mediante hibridación, ligamiento y amplificación por PCR y clonación de oligonucleótidos superpuestos.

TABLA 4: Combinaciones de sustitución de aminoácido

Variante	Tipo de Ig	Posición(posiciones) en VH†	Posición(posiciones) en CH1‡	Posición(posiciones) en VL†	Posición(posiciones) en CL‡
V1	IgG1		147 para cadena lateral pequeña		131 para cadena lateral grande
			185 para cadena lateral grande		135 para cadena lateral pequeña
			Opcional: 220 Cys nativa respecto a no Cys		Opcional: 214 Cys nativa respecto a no Cys
V1-2a	IgG2		147 para cadena lateral pequeña		131 para cadena lateral grande
			185 para cadena lateral grande		135 para cadena lateral pequeña
			Opcional: 131 Cys nativa respecto a no Cys; 219 Cys nativa respecto a no Cys; 220 Cys nativa respecto a no Cys		Opcional: 214 Cys nativa respecto a no Cys
V1-2b	IgG2		147 para cadena lateral pequeña		131 para cadena lateral grande
			185 para cadena lateral grande		135 para cadena lateral pequeña
			Opcional: 131 Cys nativa respecto a no Cys; 220 Cys nativa respecto a no Cys		Opcional: 214 Cys nativa respecto a no Cys
V1-3	IgG3		147 para cadena lateral pequeña		131 para cadena lateral grande
			185 para cadena lateral grande		135 para cadena lateral pequeña
			Opcional: 131 Cys nativa respecto a no Cys		Opcional: 214 Cys nativa respecto a no Cys

TABLA 4: Combinaciones de sustitución de aminoácido					
Variante	Tipo de Ig	Posición(posiciones) en VH†	Posición(posiciones) en CH1‡	Posición(posiciones) en VL†	Posición(posiciones) en CL‡
V1-4	IgG4		147 para cadena lateral pequeña		131 para cadena lateral grande
			185 para cadena lateral grande		135 para cadena lateral pequeña
			Opcional: 131 Cys nativa respecto a no Cys		Opcional: 214 Cys nativa respecto a no Cys
V3	IgG1		145 para cadena lateral grande		176 para cadena lateral grande
			170 para cadena lateral pequeña		178 para cadena lateral pequeña
			183 para cadena lateral grande		Opcional: 214 Cys nativa respecto a no Cys
			185 para cadena lateral grande		
			Opcional: 220 Cys nativa respecto a no Cys		
V3-2a	IgG2		145 para cadena lateral grande		176 para cadena lateral grande
			170 para cadena lateral pequeña		178 para cadena lateral pequeña
			183 para cadena lateral grande		Opcional: 214 Cys nativa respecto a no Cys
			185 para cadena lateral grande		
			Opcional: 131 Cys nativa respecto a no Cys; 219 Cys nativa respecto a no Cys; 220 Cys nativa respecto a no Cys		
V3-2b	IgG2		145 para cadena lateral grande		176 para cadena lateral grande
			170 para cadena lateral pequeña		178 para cadena lateral pequeña
			183 para cadena lateral grande		Opcional: 214 Cys nativa respecto a no Cys
			185 para cadena lateral grande		
			Opcional: 131 Cys nativa respecto a no Cys; 220 Cys nativa respecto a no Cys		
V3-3	IgG3		145 para cadena lateral grande		176 para cadena lateral grande
			170 para cadena lateral pequeña		178 para cadena lateral pequeña

TABLA 4: Combinaciones de sustitución de aminoácido					
Variante	Tipo de Ig	Posición(posiciones) en VH†	Posición(posiciones) en CH1‡	Posición(posiciones) en VL†	Posición(posiciones) en CL‡
			183 para cadena lateral grande		Opcional: 214 Cys nativa respecto a no Cys
			185 para cadena lateral grande		
			Opcional: 131 Cys nativa respecto a no Cys		
V3-4	IgG4		145 para cadena lateral grande		176 para cadena lateral grande
			170 para cadena lateral pequeña		178 para cadena lateral pequeña
			183 para cadena lateral grande		Opcional: 214 Cys nativa respecto a no Cys
			185 para cadena lateral grande		
			Opcional: 131 Cys nativa respecto a no Cys		
V10	IgG1		141 no Cys nativa respecto a Cys		116 no Cys nativa respecto a Cys
			220 Cys nativa respecto a no Cys		214 Cys nativa respecto a no Cys
V10-2a	IgG2		141 no Cys nativa respecto a Cys		116 no Cys nativa respecto a Cys
			131 Cys nativa respecto a no Cys		214 Cys nativa respecto a no Cys
			219 Cys nativa respecto a no Cys		
			220 Cys nativa respecto a no Cys		
V10-2b	IgG2		141 no Cys nativa respecto a Cys		116 no Cys nativa respecto a Cys
			131 Cys nativa respecto a no Cys		214 Cys nativa respecto a no Cys
			220 Cys nativa respecto a no Cys		
V10-3	IgG3		141 no Cys nativa respecto a Cys		116 no Cys nativa respecto a Cys
			131 Cys nativa respecto a no Cys		214 Cys nativa respecto a no Cys
V10-4	IgG4		141 no Cys nativa respecto a Cys		116 no Cys nativa respecto a Cys
			131 Cys nativa respecto a no Cys		214 Cys nativa respecto a no Cys
V11	IgG1		168 no Cys nativa respecto a Cys		164 no Cys nativa respecto a Cys

TABLA 4: Combinaciones de sustitución de aminoácido					
Variante	Tipo de Ig	Posición(posiciones) en VH†	Posición(posiciones) en CH1‡	Posición(posiciones) en VL†	Posición(posiciones) en CL‡
			220 Cys nativa respecto a no Cys		214 Cys nativa respecto a no Cys
V11-2a	IgG2		168 no Cys nativa respecto a Cys		164 no Cys nativa respecto a Cys
			131 Cys nativa respecto a no Cys		214 Cys nativa respecto a no Cys
			219 Cys nativa respecto a no Cys		
			220 Cys nativa respecto a no Cys		
V11-2b	IgG2		168 no Cys nativa respecto a Cys		164 no Cys nativa respecto a Cys
			131 Cys nativa respecto a no Cys		214 Cys nativa respecto a no Cys
			220 Cys nativa respecto a no Cys		
V11-3	IgG3		168 no Cys nativa respecto a Cys		164 no Cys nativa respecto a Cys
			131 Cys nativa respecto a no Cys		214 Cys nativa respecto a no Cys
V11-4	IgG4		168 no Cys nativa respecto a Cys		164 no Cys nativa respecto a Cys
			131 Cys nativa respecto a no Cys		214 Cys nativa respecto a no Cys
V12	IgG1		126 no Cys nativa respecto a Cys		121 no Cys nativa respecto a Cys
			220 Cys nativa respecto a no Cys		214 Cys nativa respecto a no Cys
V12-2a	IgG2		126 no Cys nativa respecto a Cys		121 no Cys nativa respecto a Cys
			131 Cys nativa respecto a no Cys		214 Cys nativa respecto a no Cys
			219 Cys nativa respecto a no Cys		
			220 Cys nativa respecto a no Cys		
V12-2b	IgG2		126 no Cys nativa respecto a Cys		121 no Cys nativa respecto a Cys
			131 Cys nativa respecto a no Cys		214 Cys nativa respecto a no Cys
			220 Cys nativa respecto a no Cys		
V12-3	IgG3		126 no Cys nativa respecto a Cys		121 no Cys nativa respecto a Cys
			131 Cys nativa respecto a no Cys		214 Cys nativa respecto a no Cys

TABLA 4: Combinaciones de sustitución de aminoácido					
Variante	Tipo de Ig	Posición(posiciones) en VH†	Posición(posiciones) en CH1‡	Posición(posiciones) en VL†	Posición(posiciones) en CL‡
V12-4	IgG4		126 no Cys nativa respecto a Cys		121 no Cys nativa respecto a Cys
			131 Cys nativa respecto a no Cys		214 Cys nativa respecto a no Cys
VN	IgG1		128 no Cys nativa respecto a Cys		118 no Cys nativa respecto a Cys
			220 Cys nativa respecto a no Cys		214 Cys nativa respecto a no Cys
VN-2a	IgG2		128 no Cys nativa respecto a Cys		118 no Cys nativa respecto a Cys
			131 Cys nativa respecto a no Cys		214 Cys nativa respecto a no Cys
			219 Cys nativa respecto a no Cys		
			220 Cys nativa respecto a no Cys		
VN-2b	IgG2		128 no Cys nativa respecto a Cys		118 no Cys nativa respecto a Cys
			131 Cys nativa respecto a no Cys		214 Cys nativa respecto a no Cys
			220 Cys nativa respecto a no Cys		
VN-3	IgG3		128 no Cys nativa respecto a Cys		118 no Cys nativa respecto a Cys
			131 Cys nativa respecto a no Cys		214 Cys nativa respecto a no Cys
VN-4	IgG4		128 no Cys nativa respecto a Cys		118 no Cys nativa respecto a Cys
			131 Cys nativa respecto a no Cys		214 Cys nativa respecto a no Cys
VVa-1	IgG1	37 no Cys nativa respecto a Cys	220 Cys nativa respecto a no Cys	95 no Cys nativa respecto a Cys	214 Cys nativa respecto a no Cys
VVa-2a	IgG2	37 no Cys nativa respecto a Cys	131 Cys nativa respecto a no Cys	95 no Cys nativa respecto a Cys	214 Cys nativa respecto a no Cys
			219 Cys nativa respecto a no Cys		
			220 Cys nativa respecto a no Cys		
VVa-2b	IgG2	37 no Cys nativa respecto a Cys	131 Cys nativa respecto a no Cys 220 Cys nativa respecto a no Cys	95 no Cys nativa respecto a Cys	214 Cys nativa respecto a no Cys
VVa-3	IgG3	37 no Cys nativa respecto a Cys	131 Cys nativa respecto a no Cys	95 no Cys nativa respecto a Cys	214 Cys nativa respecto a no Cys
VVa-4	IgG4	37 no Cys nativa respecto a Cys	131 Cys nativa respecto a no Cys	95 no Cys nativa respecto a Cys	214 Cys nativa respecto a no Cys

TABLA 4: Combinaciones de sustitución de aminoácido					
Variante	Tipo de Ig	Posición(posiciones) en VH†	Posición(posiciones) en CH1‡	Posición(posiciones) en VL†	Posición(posiciones) en CL‡
VVb-1	IgG1	44 no Cys nativa respecto a Cys	220 Cys nativa respecto a no Cys	100 no Cys nativa respecto a Cys	214 Cys nativa respecto a no Cys
VVb-2a	IgG2	44 no Cys nativa respecto a Cys	131 Cys nativa respecto a no Cys	100 no Cys nativa respecto a Cys	214 Cys nativa respecto a no Cys
			219 Cys nativa respecto a no Cys		
			220 Cys nativa respecto a no Cys		
VVb-2b	IgG2	44 no Cys nativa respecto a Cys	131 Cys nativa respecto a no Cys	100 no Cys nativa respecto a Cys	214 Cys nativa respecto a no Cys
			220 Cys nativa respecto a no Cys		
VVb-3	IgG3	44 no Cys nativa respecto a Cys	131 Cys nativa respecto a no Cys	100 no Cys nativa respecto a Cys	214 Cys nativa respecto a no Cys
VVb-4	IgG4	44 no Cys nativa respecto a Cys	131 Cys nativa respecto a no Cys	100 no Cys nativa respecto a Cys	214 Cys nativa respecto a no Cys
VVc-1	IgG1	44 no Cys nativa respecto a Cys	220 Cys nativa respecto a no Cys	105 no Cys nativa respecto a Cys	214 Cys nativa respecto a no Cys
VVc-2a	IgG2	44 no Cys nativa respecto a Cys	131 Cys nativa respecto a no Cys	105 no Cys nativa respecto a Cys	214 Cys nativa respecto a no Cys
			219 Cys nativa respecto a no Cys		
			220 Cys nativa respecto a no Cys		
VVc-2b	IgG2	44 no Cys nativa respecto a Cys	131 Cys nativa respecto a no Cys	105 no Cys nativa respecto a Cys	214 Cys nativa respecto a no Cys
			220 Cys nativa respecto a no Cys		
VVc-3	IgG3	44 no Cys nativa respecto a Cys	131 Cys nativa respecto a no Cys	105 no Cys nativa respecto a Cys	214 Cys nativa respecto a no Cys
VVc-4	IgG4	44 no Cys nativa respecto a Cys	131 Cys nativa respecto a no Cys	105 no Cys nativa respecto a Cys	214 Cys nativa respecto a no Cys
VVd-1	IgG1	45 no Cys nativa respecto a Cys	220 Cys nativa respecto a no Cys	87 no Cys nativa respecto a Cys	214 Cys nativa respecto a no Cys
VVd-2a	IgG2	45 no Cys nativa respecto a Cys	131 Cys nativa respecto a no Cys	87 no Cys nativa respecto a Cys	214 Cys nativa respecto a no Cys
			219 Cys nativa respecto a no Cys		
			220 Cys nativa respecto a no Cys		
VVd-2b	IgG2	45 no Cys nativa respecto a Cys	131 Cys nativa respecto a no Cys	87 no Cys nativa respecto a Cys	214 Cys nativa respecto a no Cys
			220 Cys nativa respecto a no Cys		
VVd-3	IgG3	45 no Cys nativa respecto a Cys	131 Cys nativa respecto a no Cys	87 no Cys nativa respecto a Cys	214 Cys nativa respecto a no Cys

TABLA 4: Combinaciones de sustitución de aminoácido					
Variante	Tipo de Ig	Posición(posiciones) en VH†	Posición(posiciones) en CH1‡	Posición(posiciones) en VL†	Posición(posiciones) en CL‡
VVd-4	IgG4	45 no Cys nativa respecto a Cys	131 Cys nativa respecto a no Cys	87 no Cys nativa respecto a Cys	214 Cys nativa respecto a no Cys
We-1	IgG1	55 no Cys nativa respecto a Cys	220 Cys nativa respecto a no Cys	101 no Cys nativa respecto a Cys	214 Cys nativa respecto a no Cys
VVe-2a	IgG2	55 no Cys nativa respecto a Cys	131 Cys nativa respecto a no Cys	101 no Cys nativa respecto a Cys	214 Cys nativa respecto a no Cys
			219 Cys nativa respecto a no Cys		
			220 Cys nativa respecto a no Cys		
VVe-2b	IgG2	55 no Cys nativa respecto a Cys	131 Cys nativa respecto a no Cys	101 no Cys nativa respecto a Cys	214 Cys nativa respecto a no Cys
			220 Cys nativa respecto a no Cys		
VVe-3	IgG3	55 no Cys nativa respecto a Cys	131 Cys nativa respecto a no Cys	101 no Cys nativa respecto a Cys	214 Cys nativa respecto a no Cys
VVe-4	IgG4	55 no Cys nativa respecto a Cys	131 Cys nativa respecto a no Cys	101 no Cys nativa respecto a Cys	214 Cys nativa respecto a no Cys
VVf-1	IgG1	100 no Cys nativa respecto a Cys	220 Cys nativa respecto a no Cys	50 no Cys nativa respecto a Cys	214 Cys nativa respecto a no Cys
VVf-2a	IgG2	100 no Cys nativa respecto a Cys	131 Cys nativa respecto a no Cys	50 no Cys nativa respecto a Cys	214 Cys nativa respecto a no Cys
			219 Cys nativa respecto a no Cys		
			220 Cys nativa respecto a no Cys		
VVf-2b	IgG2	100 no Cys nativa respecto a Cys	131 Cys nativa respecto a no Cys	50 no Cys nativa respecto a Cys	214 Cys nativa respecto a no Cys
			220 Cys nativa respecto a no Cys		
VVf-3	IgG3	100 no Cys nativa respecto a Cys	131 Cys nativa respecto a no Cys	50 no Cys nativa respecto a Cys	214 Cys nativa respecto a no Cys
VVf-4	IgG4	100 no Cys nativa respecto a Cys	131 Cys nativa respecto a no Cys	50 no Cys nativa respecto a Cys	214 Cys nativa respecto a no Cys
VVg-1	IgG1	98 no Cys nativa respecto a Cys	220 Cys nativa respecto a no Cys	46 no Cys nativa respecto a Cys	214 Cys nativa respecto a no Cys
VVg-2a	IgG2	98 no Cys nativa respecto a Cys	131 Cys nativa respecto a no Cys	46 no Cys nativa respecto a Cys	214 Cys nativa respecto a no Cys
			219 Cys nativa respecto a no Cys		
			220 Cys nativa respecto a no Cys		
VVg-2b	IgG2	98 no Cys nativa respecto a Cys	131 Cys nativa respecto a no Cys	46 no Cys nativa respecto a Cys	214 Cys nativa respecto a no Cys
			220 Cys nativa respecto a no Cys		

TABLA 4: Combinaciones de sustitución de aminoácido					
Variante	Tipo de Ig	Posición(posiciones) en VH†	Posición(posiciones) en CH1‡	Posición(posiciones) en VL†	Posición(posiciones) en CL‡
VVg-3	IgG3	98 no Cys nativa respecto a Cys	131 Cys nativa respecto a no Cys	46 no Cys nativa respecto a Cys	214 Cys nativa respecto a no Cys
VVg-4	IgG4	98 no Cys nativa respecto a Cys	131 Cys nativa respecto a no Cys	46 no Cys nativa respecto a Cys	214 Cys nativa respecto a no Cys
VVh-1	IgG1	101 no Cys nativa respecto a Cys	220 Cys nativa respecto a no Cys	46 no Cys nativa respecto a Cys	214 Cys nativa respecto a no Cys
VVh-2a	IgG2	101 no Cys nativa respecto a Cys	131 Cys nativa respecto a no Cys	46 no Cys nativa respecto a Cys	214 Cys nativa respecto a no Cys
			219 Cys nativa respecto a no Cys		
			220 Cys nativa respecto a no Cys		
VVh-2b	IgG2	101 no Cys nativa respecto a Cys	131 Cys nativa respecto a no Cys	46 no Cys nativa respecto a Cys	214 Cys nativa respecto a no Cys
			220 Cys nativa respecto a no Cys		
VVh-3	IgG3	101 no Cys nativa respecto a Cys	131 Cys nativa respecto a no Cys	46 no Cys nativa respecto a Cys	214 Cys nativa respecto a no Cys
VVh-4	IgG4	101 no Cys nativa respecto a Cys	131 Cys nativa respecto a no Cys	46 no Cys nativa respecto a Cys	214 Cys nativa respecto a no Cys
VVi-1	IgG1	105 no Cys nativa respecto a Cys	220 Cys nativa respecto a no Cys	43 no Cys nativa respecto a Cys	214 Cys nativa respecto a no Cys
VVi-2a	IgG2	105 no Cys nativa respecto a Cys	131 Cys nativa respecto a no Cys	43 no Cys nativa respecto a Cys	214 Cys nativa respecto a no Cys
			219 Cys nativa respecto a no Cys		
			220 Cys nativa respecto a no Cys		
VVi-2b	IgG2	105 no Cys nativa respecto a Cys	131 Cys nativa respecto a no Cys	43 no Cys nativa respecto a Cys	214 Cys nativa respecto a no Cys
			220 Cys nativa respecto a no Cys		
VVi-3	IgG3	105 no Cys nativa respecto a Cys	131 Cys nativa respecto a no Cys	43 no Cys nativa respecto a Cys	214 Cys nativa respecto a no Cys
VVi-4	IgG4	105 no Cys nativa respecto a Cys	131 Cys nativa respecto a no Cys	43 no Cys nativa respecto a Cys	214 Cys nativa respecto a no Cys
VVj-1	IgG1	106 no Cys nativa respecto a Cys	220 Cys nativa respecto a no Cys	57 no Cys nativa respecto a Cys	214 Cys nativa respecto a no Cys
VVj-2a	IgG2	106 no Cys nativa respecto a Cys	131 Cys nativa respecto a no Cys	57 no Cys nativa respecto a Cys	214 Cys nativa respecto a no Cys
			219 Cys nativa respecto a no Cys		
			220 Cys nativa respecto a no Cys		
VVj-2b	IgG2	106 no Cys nativa respecto a Cys	131 Cys nativa respecto a no Cys	57 no Cys nativa respecto a Cys	214 Cys nativa respecto a no Cys

TABLA 4: Combinaciones de sustitución de aminoácido					
Variante	Tipo de Ig	Posición(posiciones) en VH†	Posición(posiciones) en CH1‡	Posición(posiciones) en VL†	Posición(posiciones) en CL‡
			220 Cys nativa respecto a no Cys		
VVj-3	IgG3	106 no Cys nativa respecto a Cys	131 Cys nativa respecto a no Cys	57 no Cys nativa respecto a Cys	214 Cys nativa respecto a no Cys
VVj-4	IgG4	106 no Cys nativa respecto a Cys	131 Cys nativa respecto a no Cys	57 no Cys nativa respecto a Cys	214 Cys nativa respecto a no Cys

† La numeración de las regiones variables se realiza según el índice de Kabat ‡ La numeración de la región constante se realiza según el índice de UE

Modificaciones de la región Fc

En este documento se proporcionan anticuerpos con modificaciones de HC y LC en las regiones variables y/o CH1 y/o CL. También se proporcionan, en algunos aspectos, anticuerpos modificados que comprenden además una o más modificaciones en la región Fc descrita a continuación. Las regiones Fc que comprenden una o más modificaciones en este documento se denominan "regiones Fc variantes".

La interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo puede modificarse por ingeniería para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo celular recombinante. Una interfaz apropiada comprende al menos una parte del dominio CH3. En este método, una "protuberancia" (también denominada aquí como "Botón") se genera al reemplazar una o más cadenas laterales de aminoácido pequeñas de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo por cadenas laterales más grandes (p.ej., tirosina o triptófano). Las "cavidades" compensatorias (en este documento también denominadas "Ojales") de tamaño idéntico o similar a la(s) cadena(s) lateral(es) grande(s) se crean en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando las cadenas laterales de aminoácidos grandes por otras más pequeñas (p.ej., alanina o treonina). Alternativamente, o adicionalmente, la región CH3 puede modificarse para incluir mutaciones que introducen restos de cisteína capaces de formar un enlace disulfuro. Estas modificaciones proporcionan un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados, como homodímeros. Las modificaciones de CH3 para mejorar la heterodimerización incluyen, por ejemplo, Y407V/T366S/L368A en una cadena pesada y T366W en la otra cadena pesada; S354C/T366W en una cadena pesada e Y349C/Y407V/T366S/L368A en la otra cadena pesada. Las modificaciones adicionales que dan como resultado una protuberancia en una cadena y una cavidad en la otra se proporcionan en la Tabla 5 y se describen en US 7.183.076; y Merchant et al., 1998, Nat. Biotech 16:677-681. Otras modificaciones que pueden usarse para generar heterodímeros incluyen, pero no se limitan a, las que alteran la polaridad de la carga mediante la interfaz del dímero Fc de modo que la coexpresión de regiones Fc electrostáticamente emparejadas da como resultado heterodimerización. Las modificaciones que alteran la polaridad de la carga incluyen, pero no se limitan a, las presentadas en la Tabla 6 (véase también, WO 2007/147901; Gunasekaran et al., 2010, JBC 285:19637-46). Además, Davis et al. (2010, Prot. Ing. Design & Selection 23:195-202) describen una plataforma Fc heterodimérica que usa regiones CH3 de dominio modificado por ingeniería con intercambio de hebra (SEED) que son derivados de dominios CH3 de IgG e IgA humanos (también, véase WO 2007/110205).

Tabla 5: Modificaciones de CH3 para heterodimerización‡	
Modificación(modificaciones) una cadena pesada	Modificación(modificaciones) otra cadena pesada
T366Y	Y407T
T366W	Y407A
T366Y	Y407T
T394W	F405A
T366Y/F405A	T394W/Y407T
T366W/F405W	T394S/Y407A
F405W	T394S
D399C	K392C
T366W	T366S/L368A/Y407V

T366W/ D399C	T366S/L368A/K392C/Y407V
T366W /K392C	T366S/D399C/L368A/Y407V
S354C/T366W	Y349C/T366S/L368A/Y407V
Y349C/ T366W	S354C/ T366S/L368A/Y407V
E356C/ T366W	Y349C/ T366S/L368A/Y407V
Y349C/ T366W	E356C/T366S/L368A/Y407V
E357C/ T366W	Y349C/T366S/L368A/Y407V
Y349C/ T366W	E357C/ T366S/L368A/Y407V
‡ La numeración de la región constante se realiza según el índice de UE	

Tabla 6: Modificaciones de CH3 para heterodimerización‡	
Modificación(modificaciones) una cadena pesada	Modificación(modificaciones) otra cadena pesada
K370E/D399K/K439D	D356K/E357K/K409D
K409D	D399K
K409E	D399K
K409E	D399R
K409D	D399R
D339K	E356K
D399K/E356K	K409D/K392D
D399K/E356K	K409D/K439D
D399K/E357K	K409D/K370D
D399K/E356K/E357K	K409D/K392D/K370D
D399K/E357K	K409D/K392D
K392D/K409D	D399K
K409D/K360D	D399K
‡ La numeración de la región constante se realiza según el índice de UE	

5 Cualquiera de las modificaciones de CH3 para mejorar la heterodimerización descrita en este documento puede estar en cualquiera de las cadenas de los anticuerpos proporcionados en este documento siempre que una cadena tenga un conjunto de modificaciones y la otra cadena tenga las modificaciones compensatorias. Por ejemplo, las modificaciones Y407V/T366S/L368A descritas anteriormente pueden estar en la misma cadena pesada que contiene las modificaciones CH1 descritas en este documento si la modificación T366W está en la cadena pesada con una región CH1 no modificada. Por el contrario, las modificaciones Y407V/T366S/L368A pueden estar en la cadena pesada con una región CH1 no modificada si la modificación T366W está en la cadena pesada que contiene las modificaciones CH1 descritas en este documento. En ciertos aspectos, se introducen mutaciones adicionales útiles para aumentar/estabilizar la formación de heterodímeros en las regiones CH2 y/o CH3. En algunos aspectos, uno o más restos en la región CH2 y/o CH3 están mutados a restos de cisteína capaces de formar enlaces disulfuro intercadena entre las dos cadenas pesadas,

15 Un experto en la materia entenderá que los anticuerpos que tienen diferentes regiones variables pueden expresarse a diferentes niveles. Por tanto, las cadenas pesadas y/o ligeras que tienen diferentes regiones variables que forman los MBab proporcionados en este documento pueden expresarse a diferentes niveles. Dicha expresión desigual puede dar como resultado la producción de anticuerpos que tienen cadenas pesadas homodiméricas emparejadas libremente que pueden secretarse como medios anticuerpos, o pueden secretarse y posteriormente formar mitades de anticuerpos. En este documento se proporcionan métodos para minimizar la producción de mitades de anticuerpos. Específicamente, en ciertos aspectos, una primera cadena pesada que se expresa a un nivel más alto que una segunda cadena pesada modificada por ingeniería para comprender una mutación en la región CH2 y/o CH3 que desestabiliza fuertemente el emparejamiento homodimérico. Sin quedar limitado a ninguna teoría en particular, la presencia de una mutación que desestabiliza fuertemente los pares homodiméricos da como resultado la degradación de dichos pares en lugar de secreción, minimizando así la producción de la mitad de anticuerpos. Por ejemplo, en ciertos aspectos, la mutación T366W se incorpora a la región CH3 de cualquier cadena pesada que se exprese a niveles más altos y las modificaciones

compensatorias Y407V/T366S/L368A se introducen en la otra cadena pesada. Como se describe en este documento, pueden incorporarse mutaciones adicionales en la región Fc para aumentar/estabilizar adicionalmente la formación de heterodímeros y/o alterar la función efectora y/o alterar la semivida. En otros métodos conocidos en la técnica también pueden usarse para equilibrar los niveles de expresión de las dos cadenas pesadas, como el uso de promotores fuertes/débiles.

El resto 435, numerado según el índice de UE, en la región Fc de IgG se encuentra en el sitio de interacción con la proteína estafilocócica A (Deisenhofer, 1981, Biochem. 20:2361-2370) y las IgG que comprenden H435 e Y436 se unen a la proteína A, mientras que las IgG que comprenden R435 y F436 no se unen a la proteína A (Jendeborg et al., 1997, J Immunol Methods 201:25-34). Además, los anticuerpos que comprenden H435/Y436 en una cadena pesada y R435/F436 en la otra cadena pesada pueden separarse de los anticuerpos que comprenden dos cadenas pesadas que comprenden H435/Y436 en medio de proteína A (véase, p.ej., WO2010/151792 y ejemplos proporcionados en este documento). Por tanto, la incorporación de la mutación apropiada en una región CH3 de cadena pesada proporciona un mecanismo para facilitar la eliminación de homodímeros usando cromatografía de proteína A. Por consiguiente, en algunos aspectos, los anticuerpos proporcionados en este documento son IgG1, IgG2 o IgG4 y comprenden una región CH3 de cadena pesada que tiene una mutación que reduce o elimina la unión a proteína A y una cadena pesada que mantiene la unión a proteína A. En otros aspectos, los anticuerpos proporcionados en este documento son IgG3 y comprenden una región CH3 de cadena pesada que tiene una mutación que restaura la unión a proteína A y una cadena pesada que no se une a proteína A. En ciertos aspectos, los anticuerpos proporcionados en este documento comprenden una región CH3 de cadena pesada que tiene H435 y una pesada cadena CH3 que tiene R435. En otros aspectos, los anticuerpos proporcionados en este documento comprenden una región CH3 de cadena pesada que tiene H435/Y436 y un CH3 de cadena pesada que tiene R435/F436.

Se sabe que el dominio variable de familia VH3 se une a proteína A. Por consiguiente, en ciertos aspectos, para evitar la unión de cadenas pesadas de Ojal que portan una mutación para eliminar la unión a proteína A pero comprendidas por dominio variable de familia VH3, se usa una forma de proteína A que no se une a dominios variables VH3 (p.ej., proteína A MabSelect SuRe LX, GE Healthcare),

Las modificaciones para alterar la unión a proteína A descritas en este documento pueden estar en cualquiera de las cadenas de los anticuerpos proporcionados en este documento siempre que solo una cadena pesada se modifique en el resto 435 solo o en combinación con 436, la otra cadena es de tipo silvestre en 435. Como se muestra en la Figura 24D, IgG1, IgG2 e IgG4 humanas de tipo salvaje comprenden cada una H435/Y436, mientras que IgG3 humana de tipo salvaje comprende R435/F436. Por tanto, la naturaleza de la mutación dependerá del tipo de IgG. Específicamente, para una IgG1, IgG2 o IgG4 se introducirán mutaciones H435R/Y436F en un CH3 de cadena pesada, mientras que para IgG3 se introducirán mutaciones 435H/F436Y en una CH3 de cadena pesada. En ciertos aspectos, una mutación alternativa que reduce o elimina la unión a proteína A se introduce en una sola cadena pesada de una IgG1, IgG2 o IgG4. En ciertos otros aspectos, se introduce una mutación alternativa que restaura la unión a proteína A en una sola cadena pesada de una IgG3. Se pueden identificar sustituciones alternativas en las posiciones 435 y/o 436 que reducen o eliminan la unión a proteína A, mediante la introducción de cualquiera de los otros 18 restos de aminoácidos estándar en la región CH3 de cadena pesada de un anticuerpo convencional IgG1, IgG2 o IgG4 y detección de pérdida de unión a proteína A. Pueden identificarse sustituciones alternativas en las posiciones 435 y/o 436 que restauran la unión a la proteína A, por introducción de cualquiera de los otros 18 restos de aminoácido estándar en la región CH3 de la cadena pesada de un anticuerpo IgG3 convencional y la detección de la unión a proteína A.

Aunque ciertas mutaciones de Fc proporcionadas en este documento mejoran la formación de anticuerpos bivalentes (por ejemplo, los proporcionados en Tabla 5), aún pueden surgir algunos anticuerpos mal emparejados debido a la homodimerización de las cadenas pesadas. En particular, se sabe que las cadenas pesadas que tienen mutación(mutaciones) que dan como resultado la formación de una cavidad (en este documento también denominada "Ojal") forman homodímeros, especialmente cuando están en exceso (Merchant, et al., 1998, Nat. Biotech 16:677-681). Por consiguiente, en algunos aspectos, las mutaciones de Fc útiles para aumentar la formación de heterodímeros pueden combinarse con mutaciones de Fc útiles para alterar la unión a medios de afinidad para mejorar la purificación de heterodímeros de cadena pesada. En ciertos aspectos, los anticuerpos proporcionados en este documento comprenden una cadena pesada que tiene mutaciones Fc que dan como resultado la formación de una "cavidad" y restos R435/F436 de CH3; y una cadena pesada que tiene mutaciones Fc que dan como resultado la formación de una "protuberancia" y restos H435/Y436 de CH3. A partir de la presente divulgación se entenderá que, dependiendo del tipo de IgG, una cadena u otra comprenderá mutaciones en las posiciones 435 y 436. En un aspecto específico, un Mbab es una IgG1, IgG2 o IgG4 y comprende una cadena pesada que tiene mutaciones Y407V/T366S/L368A/H435R de Fc y opcionalmente Y436F y una cadena pesada que tiene la mutación T366W de Fc. En otro aspecto específico, un Mbab es una IgG3 y comprende una cadena pesada que tiene mutaciones Y407V/T366S/L368A de Fc y una cadena pesada que tiene la mutación T366W/R435H de Fc y opcionalmente F436Y. En otro aspecto específico, un Mbab es una IgG1, IgG2 o IgG4 y comprende una cadena pesada que tiene la mutación Y349C/Y407V/T366S/L368A/H435R de Fc y opcionalmente Y436F y una cadena pesada que tiene la mutación S354C/T366W de Fc. En otro aspecto específico, un Mbab es una IgG3 y comprende una cadena pesada que tiene la mutación Y349C/Y407V/T366S/L368A de Fc y una cadena pesada que tiene la mutación S354C/T366W/R435H de Fc y opcionalmente F436Y.

- En ciertos aspectos, las modificaciones de Fc útiles para aumentar la formación de heterodímeros pueden combinarse con otras modificaciones de Fc conocidas útiles para alterar la función efectora como las descritas en Ghetie et al., 1997, Nat Biotech. 15:637-40; Duncan et al, 1988, Nature 332:563-564; Lund et al., 1991, J. Immunol 147:2657-2662; Lund et al, 1992, Mol Immunol 29:53-59; Alegre et al, 1994, Transplantation 57:1537-1543; Hutchins et al., 1995, Proc Natl. Acad Sci U S A 92:11980-11984; Jefferis et al, 1995, Immunol Lett. 44:111-117; Lund et al., 1995, Faseb J 9:115-119; Jefferis et al, 1996, Immunol Lett 54:101-104; Lund et al, 1996, J Immunol 157:4963-4969; Armour et al., 1999, Eur J Immunol 29:2613-2624; Idusogie et al, 2000, J Immunol 164:4178-4184; Reddy et al, 2000, J Immunol 164:1925-1933; Xu et al., 2000, Cell Immunol 200:16-26; Idusogie et al, 2001, J Immunol 166:2571-2575; Shields et al., 2001, J Biol Chem 276:6591-6604; Jefferis et al, 2002, Immunol Lett 82:57-65; Presta et al., 2002, Biochem Soc Trans 30:487-490); patentes de EE.UU. N.^{os} 5.624.821; 5.885.573; 5.677.425; 6.165.745; 6.277.375; 5.869.046; 6.121.022; 5.624.821; 5.648.260; 6.528.624; 6.194.551; 6.737.056; 7.122.637; 7.183.387; 7.332.581; 7.335.742; 7.371.826; 6.821.505; 6.180.377; 7.317.091; 7.355.008; 2004/0002587; y WO 99/58572. Otras modificaciones (por ejemplo, sustituciones y/o adiciones y/o delecciones) del Fc serán fácilmente evidentes para un experto en la materia.
- En algunos casos, ciertas modificaciones en la región Fc (por ejemplo, sustituciones de aminoácidos y/o adiciones y/o delecciones) pueden mejorar o disminuir la función efectora. En ciertos aspectos, las regiones Fc variantes de los anticuerpos exhiben un nivel similar de función efectora inductora en comparación con el Fc nativo. En varios aspectos, un anticuerpo con una región Fc variante exhibe una mayor inducción de la función efectora en comparación con el mismo anticuerpo con el Fc nativo. Un anticuerpo con una región Fc variante a veces exhibe una menor inducción de la función efectora en comparación con el mismo anticuerpo con el Fc nativo. En algunos aspectos, un anticuerpo con una región Fc variante exhibe una mayor inducción de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) en comparación con el mismo anticuerpo con el Fc nativo. En ciertos aspectos, un anticuerpo con una región Fc variante exhibe una inducción más baja de ADCC en comparación con el mismo anticuerpo con el Fc nativo. En algunos aspectos, un anticuerpo con una región Fc variante exhibe una mayor inducción de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) en comparación con el mismo anticuerpo con el Fc nativo. En algunos aspectos, un anticuerpo con una región Fc variante exhibe una menor inducción de CDC en comparación con el mismo anticuerpo con el Fc nativo.
- Puede analizarse la capacidad de cualquier anticuerpo particular con una región Fc variante para mediar la lisis de una célula diana por ADCC. Para evaluar la actividad de ADCC, se añade un anticuerpo con una región Fc de interés variante a las células diana en combinación con células efectoras inmunes, que pueden ser activadas por los complejos de anticuerpos antigénicos dando como resultado la citólisis de la célula diana. La citólisis generalmente se detecta mediante la liberación del marcador (por ejemplo, sustratos radiactivos, colorantes fluorescentes o proteínas intracelulares naturales) de las células lisadas. Las células efectoras para tales ensayos pueden incluir células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos y citolíticos naturales (NK). En la técnica se conocen ejemplos específicos de ensayos de ADCC in vitro.
- En ciertos aspectos, las funciones efectoras provocadas por los anticuerpos IgG dependen en gran medida del resto de carbohidrato unido a la región Fc de la proteína (Claudia Ferrara et al., 2006, Biotechnology and Bioengineering 93:851-861). Por tanto, la glicosilación de la región Fc de un anticuerpo descrito en este documento puede modificarse para aumentar o disminuir la función efectora (véase por ejemplo, Umana et al, 1999, Nat. Biotechnol 17:176-180; Davies et al., 2001, Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields et al, 2002, J Biol Chem 277:26733-26740; Shinkawa et al., 2003, J Biol Chem 278:3466-3473; Pat. EE.UU. N.^{os} 6.602.684; 6.946.292; 7.064.191; 7.214.775; 7.393.683; 7.425.446; 7.504.256; U.S. Publication. N.^{os} 2003/0157108; 2003/0003097; 2009/0010921; tecnología Potelligent® (Biowa, Inc. Princeton, N.J.); tecnología de diseño por ingeniería de glicosilación GlycoMAb® (GLYCART biotechnology AG, Zurich, Suiza)). Por consiguiente, en un aspecto, las regiones Fc de un anticuerpo descrito en este documento comprenden glicosilación alterada de restos de aminoácido. En otro aspecto, la glicosilación alterada de los restos de aminoácido da como resultado una función efectora reducida. En otro aspecto, la glicosilación alterada de los restos de aminoácido da como resultado una función efectora incrementada. En un aspecto específico, la región Fc redujo la fucosilación. En otro aspecto, la región Fc está afucosilada (véase, por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 2005/0226867). En un aspecto, estos anticuerpos con función efectora incrementada, específicamente ADCC, como se generan en células hospedadoras (p.ej., células CHO, *Lemna minor*) se modifican por ingeniería para producir anticuerpos altamente defucosilados con ADCC más de 100 veces superior en comparación con el anticuerpo producido por células parentales (Mori et al., 2004, Biotechnol Bioeng 88:901-908; Cox et al., 2006, Nat Biotechnol., 24:1591-7).
- La adición de ácido siálico a los oligosacáridos en las moléculas de IgG puede mejorar su actividad antiinflamatoria y alterar su citotoxicidad (p.ej., Keneko et al., Science, 2006, 313:670-673; Scallan et al., Mol. Immuno. marzo de 2007; 44(7):1524-34). Por tanto, la eficacia de anticuerpos terapéuticos puede optimizarse mediante la selección de una glicoforma que se adapte mejor a la aplicación prevista. Las dos cadenas de oligosacáridos interpuestas entre los dos dominios CH2 de los anticuerpos están involucradas en la unión de la región Fc a sus receptores. Las moléculas de IgG con sialilación aumentada exhiben propiedades antiinflamatorias, mientras que las moléculas de IgG con sialilación reducida muestran propiedades inmunoestimuladoras aumentadas. Por tanto, un anticuerpo terapéutico puede "hacerse a medida" con un perfil de sialilación apropiado para una aplicación particular. En la técnica se conocen métodos para modular el estado de sialilación de anticuerpos (por ejemplo, Publicación de EE.UU. N.º 2009/0004179 y Publicación Internacional N.º WO 2007/005786).

En algunos aspectos, las modificaciones de Fc útiles para aumentar la formación de heterodímeros pueden combinarse con otras modificaciones que son útiles para alterar las propiedades de unión para un ligando de Fc (p.ej., un receptor de Fc, Clq) en relación con una molécula comparable (p.ej., una proteína que tiene la misma secuencia de aminoácidos excepto que tiene una región Fc de tipo silvestre). Los ejemplos de propiedades de unión incluyen, pero no se limitan a, especificidad de unión, constante de disociación de equilibrio (K_D), tasas de disociación y asociación (k_{dis} y k_{asoc} respectivamente), afinidad y/o avidez de unión. En general, se entiende que una molécula de unión, como un anticuerpo, con una K_{asoc} baja puede ser preferente a una molécula de unión con una k_{dis} elevada. Sin embargo, en algunos casos, el valor de k_{asoc} o k_{dis} puede ser más relevante que el valor de K_D . Un experto en la materia puede determinar qué parámetro cinético es el más importante para una aplicación de anticuerpo dada.

Las afinidades y propiedades de unión de una región Fc para su ligando pueden determinarse mediante una variedad de métodos de ensayo in vitro (ensayos basados en bioquímica o inmunología) conocidos en la técnica para determinar las interacciones Fc-FcR, es decir, la unión específica de una región Fc a un FcR que incluye, pero no se limitan a, métodos de equilibrio (p.ej., ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) o radioinmunoensayo (RIA)), o cinética (p. ej. análisis BIACORE®) y otros métodos como ensayos de unión indirecta, ensayos de inhibición competitiva, transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), electroforesis en gel y cromatografía (p.ej., filtración en gel). Estos y otros métodos pueden utilizar una etiqueta en uno o más de los componentes que se están examinando y/o emplear una variedad de métodos de detección que incluyen, pero no se limitan a, etiquetas colorimétricas, espectrométricas, espectrofotométricas, fluorescentes, luminiscentes o isotópicas.

En algunos aspectos, un anticuerpo con una región Fc variante tiene una unión mejorada a uno o más ligandos de Fc respecto al mismo anticuerpo con el Fc nativo. En varios aspectos, el anticuerpo con una región Fc variante tiene una unión mejorada a un receptor de Fc. En algunos aspectos, el anticuerpo con una región Fc variante tiene una unión mejorada al receptor FcγRIIIA de Fc. En ciertos aspectos, el anticuerpo con una región Fc variante tiene una unión mejorada al receptor FcγR IIB de Fc. El anticuerpo con una región Fc variante en ocasiones tiene una unión mejorada a Clq respecto al mismo anticuerpo con el Fc nativo. En varios aspectos, el anticuerpo con una región Fc variante tiene una unión mejorada al receptor FcRn de Fc.

En algunos aspectos, un anticuerpo con una región Fc variante tiene una actividad ADCC mejorada respecto al mismo anticuerpo con el Fc nativo. En ciertos aspectos, un anticuerpo con una región Fc variante tiene una unión mejorada al receptor FcγRIIIA de Fc y tiene una actividad ADCC mejorada respecto al mismo anticuerpo con el Fc nativo. En algunos aspectos, el anticuerpo con una región Fc variante tiene tanto actividad ADCC mejorada como semivida sérica mejorada respecto al mismo anticuerpo con el Fc nativo.

En ciertos aspectos, un anticuerpo con una región Fc variante tiene actividad ADCC reducida respecto al mismo anticuerpo con el Fc nativo. En varios aspectos, un anticuerpo con una región Fc variante tiene unión al receptor FcγRIIIA de Fc reducida y tiene actividad de ADCC reducida respecto al mismo anticuerpo con el Fc nativo. En ocasiones el anticuerpo con una región Fc variante en ocasiones tiene tanto actividad ADCC reducida como semivida sérica mejorada respecto al mismo anticuerpo con el Fc nativo.

En algunos aspectos, un anticuerpo con una región Fc variante tiene actividad CDC mejorada respecto al mismo anticuerpo con el Fc nativo. En ciertos aspectos, el anticuerpo con una región Fc variante tiene tanto actividad CDC mejorada como semivida sérica mejorada respecto al mismo anticuerpo con el Fc nativo. En algunos aspectos, el anticuerpo con una región Fc variante tiene unión reducida a uno o más ligandos Fc respecto al mismo anticuerpo con el Fc nativo.

En algunos aspectos, el anticuerpo con una región Fc variante tiene unión reducida a un receptor Fc respecto al mismo anticuerpo con el Fc nativo. En ciertos aspectos, el anticuerpo con una región Fc variante tiene unión reducida al receptor FcγRIIIA de Fc respecto al mismo anticuerpo con el Fc nativo. En ocasiones el anticuerpo con una región Fc variante tiene una unión reducida al receptor FcRn de Fc respecto al mismo anticuerpo con el Fc nativo. En algunos aspectos, el anticuerpo con una región Fc variante tiene unión a Clq reducida respecto al mismo anticuerpo con el Fc nativo.

La región Fc también puede modificarse para aumentar la semivida de proteínas. Un aumento de la semivida puede permitir la reducción de la cantidad de fármaco administrado a un paciente, así como reducir la frecuencia de administración. Por consiguiente, los anticuerpos en este documento con semividas aumentadas pueden generarse modificando (por ejemplo, sustituyendo, eliminando o añadiendo) restos de aminoácidos identificados como implicados en la interacción entre el receptor Fc y el receptor FcRn (U.S. 7.083.784). En ciertos aspectos, una metionina en la posición 252, y/o una serina en la posición 254 y/o una treonina en la posición 256 de un anticuerpo de isotipo IgG1 pueden cambiarse por tirosina, treonina y glutamato, respectivamente, de modo que el anticuerpo resultante incluya tirosina-252, treonina-254 y glutamato-256 (es decir, M252Y, S254T, T256E). Dicha región Fc de un anticuerpo IgG1 incluye una modificación YTE y las posiciones homólogas pueden modificarse de manera similar en los anticuerpos IgG2, IgG3 e IgG4. Además, en este documento la semivida de los anticuerpos puede aumentarse mediante conjugación con PEG o albúmina mediante técnicas conocidas en la técnica. En ciertos aspectos, las modificaciones de Fc útiles para aumentar la formación de heterodímeros pueden combinarse con otras modificaciones útiles para alterar la semivida del anticuerpo, incluyendo, pero sin limitarse a, M252Y y/o S254T y/o T256E y/o con otros Fc conocidos modificaciones útiles para alterar la función efectora y/o alterar la unión a uno o más ligandos Fc, incluidos los descritos en este documento.

Síntesis de anticuerpos

Puede producirse un anticuerpo que contenga cisteínas intercadena reubicadas por cualquier método conocido en la técnica para síntesis de anticuerpos, en particular, por síntesis química o por técnicas de expresión recombinante.

Para sintetizar un anticuerpo puede usarse cualquier antígeno. En este documento se describen ejemplos de antígenos o "dianas". Las células que expresan el antígeno deseado en su superficie celular o membranas preparadas a partir de tales células también pueden usarse para generar anticuerpos. Los antígenos pueden producirse de forma recombinante y aislarse en células bacterianas o eucariotas utilizando la metodología estándar de ADN recombinante. El antígeno puede expresarse como una etiqueta (p.ej., etiqueta de epítipo) u otra proteína de fusión para facilitar el aislamiento y la identificación en varios ensayos.

Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos y se dirigen contra un único sitio antigénico o múltiples sitios antigénicos en el caso de anticuerpos modificados por ingeniería multiespecíficos. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra el mismo determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque pueden sintetizarse sin contaminarse por otros anticuerpos.

Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando una amplia variedad de técnicas conocidas en la técnica incluyendo el uso de hibridoma, tecnologías recombinantes y de presentación de fagos, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden producirse usando técnicas de hibridoma incluyendo las conocidas en la técnica. La expresión "anticuerpo monoclonal" como se usa en este documento no se limita a anticuerpos producidos mediante tecnología de hibridoma. La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que se deriva de un solo clon, incluyendo cualquier clon eucariota, procariota o fago, y no el método por el cual se produce. En algunos aspectos, un anticuerpo en este documento es 90 % o más monoclonal. A continuación se presenta una descripción de métodos representativos para producir anticuerpos monoclonales que no es limitante y puede usarse para producir, por ejemplo, anticuerpos monoclonales de mamífero, quiméricos, humanizados, humanos, de dominio, diacuerpos, vaccicuerpos, anticuerpos lineales y multiespecíficos.

En la técnica se conoce métodos para producir y detectar anticuerpos específicos usando tecnología de hibridoma. Brevemente, los ratones pueden inmunizarse con un antígeno diana (ya sea la proteína de longitud completa o un dominio de la misma, p.ej., el dominio extracelular o el dominio de unión a ligando) y una vez que se detecta una respuesta inmune, p.ej., se detectan anticuerpos específicos para el antígeno diana en el suero de ratón, se extrae el bazo de ratón y se aíslan los esplenocitos. Los esplenocitos se fusionan después mediante técnicas conocidas a cualquier célula de mieloma adecuada, por ejemplo, células de la línea celular SP20 disponibles en la ATCC. Los hibridomas se seleccionan y clonan por dilución limitada. Los clones de hibridoma se analizan después mediante métodos conocidos en la técnica para células que secretan anticuerpos capaces de unirse a un polipéptido de un anticuerpo en este documento. El líquido ascítico, que generalmente contiene altos niveles de anticuerpo, puede generarse inmunizando ratones con clones de hibridoma positivos.

Por consiguiente, los anticuerpos monoclonales pueden generarse cultivando una célula de hibridoma que secreta un anticuerpo, donde el hibridoma se genera fusionando esplenocitos aislados de un ratón inmunizado con un antígeno diana con células de mieloma y después seleccionando los hibridomas resultantes de la fusión para clones de hibridoma que secretan un anticuerpo capaz de unirse a un antígeno diana específico.

Además, los linfocitos pueden inmunizarse in vitro. Después de la inmunización, los linfocitos se aíslan y después se fusionan con una línea celular de mieloma usando un agente de fusión adecuado o un compañero de fusión, como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma. En ciertos aspectos, las células de mieloma seleccionadas son aquellas que se fusionan eficazmente, apoyan la producción estable de anticuerpos de alto nivel por células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio selectivo que selecciona contra las células parentales no fusionadas. En un aspecto, las líneas celulares de mieloma son líneas de mieloma murino, como las derivadas de tumores MOPC-21 y MPC-11 de ratón disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, EE.UU., y SP-2 y derivados, p.ej., células X63-Ag8-653 disponibles en la American Type Culture Collection, Rockville, Md. EE.UU. En la técnica también se conocen líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos.

Una vez que se identifican las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones pueden subclonarse mediante procedimientos de dilución limitante y crecer mediante métodos estándar. Los medios de cultivo adecuados para esta finalidad incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden crecer in vivo como tumores ascíticos en un animal, p.ej., por inyección i.p. de las células en ratones.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, fluido ascítico o suero mediante procedimientos de purificación de anticuerpos convencionales tales como, por ejemplo,

cromatografía de afinidad (p.ej., usando proteína A o proteína G-Sepharose o Kappa) o cromatografía de intercambio iónico, etiquetas de afinidad, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, etc. A continuación se describen métodos de purificación ejemplares.

Los fragmentos de anticuerpo que reconocen epítopos de antígeno diana específicos pueden generarse mediante cualquier técnica conocida en la técnica. Por ejemplo, los fragmentos Fab y F(ab')₂ en este documento pueden producirse mediante escisión proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, usando enzimas como papaina (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂). Los fragmentos F(ab')₂ contienen la región variable, la región constante de la cadena ligera y el dominio CH1 de cadena pesada. Además, los anticuerpos en este documento también pueden generarse usando diversos métodos de presentación en fagos conocidos en la técnica y discutidos más ampliamente a continuación, incluyendo el uso de bibliotecas de anticuerpo derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana.

Técnicas de presentación de fagos

En los métodos de presentación de fagos, los dominios de anticuerpo funcional se muestran en la superficie de las partículas de fagos que llevan las secuencias de polinucleótidos que los codifican. En particular, las secuencias de ADN que codifican los dominios VH y VL se amplifican a partir de bibliotecas de ADNc de animales (por ejemplo, bibliotecas de ADNc humano o murino de tejidos linfoides). El ADN que codifica los dominios VH y VL se recombina junto con un conector scFv por PCR y se clona en un vector fagémido (por ejemplo, p CANTAB 6 o pComb 3 HSS). El vector se electropora en *E. coli* y la *E. coli* se infecta con fago auxiliar. Los fagos utilizados en estos métodos son típicamente fagos filamentosos que incluyen fd y M13 y los dominios VH y VL se fusionan generalmente de forma recombinante con el gen del fago III o el gen VIII. Los fagos que expresan un dominio de unión a antígeno que se une a un epítipo de interés pueden seleccionarse o identificarse con antígeno, p.ej., usando antígeno marcado o antígeno unido o capturado a una superficie sólida o perla. En la técnica se conocen métodos de presentación de fagos.

Después de la selección de fagos, las regiones codificantes de anticuerpos de fago pueden aislarse y usarse para generar anticuerpos completos, incluyendo anticuerpos humanos, o cualquier otro fragmento de unión a antígeno deseado, y expresarse en cualquier hospedador deseado, incluyendo células de mamífero, células de insecto, células vegetales, levadura y bacterias, p.ej., como se describe a continuación. Las técnicas para producir recombinantemente fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ también pueden emplearse usando métodos conocidos en la técnica.

Para generar anticuerpos completos, pueden usarse cebadores de PCR que incluyen secuencias de nucleótidos de VH o VL, un sitio de restricción y una secuencia de flanqueo para proteger el sitio de restricción para amplificar las secuencias de VH o VL en clones scFv. Utilizando técnicas de clonación conocidas en la técnica, los dominios VH amplificados por PCR pueden clonarse en vectores que expresan una región constante VH, p.ej., la región constante gamma 4 humana, y los dominios VL amplificados por PCR pueden clonarse en vectores que expresan una región constante VL, p.ej., regiones constantes humanas kappa o lambda. En ocasiones los vectores para expresar los dominios VH o VL comprenden un promotor (p.ej., un promotor EF-1α), una señal de secreción (p.ej., una señal pelB), un sitio de clonación para el dominio variable, dominios constantes y un marcador de selección tal como neomicina. Los dominios VH y/o VL también pueden clonarse en un vector que expresa las regiones constantes necesarias. Como se detalla en los ejemplos a continuación, los dos dominios VL pueden clonarse en un vector que expresa las regiones CL necesarias de modo que las dos cadenas ligeras puedan expresarse a partir de un solo vector (véanse, por ejemplo, Figuras 3A y 3B), y los dos dominios VH pueden clonarse en un vector que expresa las regiones constantes necesarias de modo que las dos cadenas pesadas puedan expresarse a partir de un solo vector (véase, por ejemplo, Figura 3C). Los vectores de la cadena pesada y los vectores de la cadena ligera se cotransfectan después en líneas celulares para generar líneas celulares estables o transitorias que expresan anticuerpos de longitud completa, p.ej., IgG, usando técnicas conocidas en la técnica. En el Ejemplo 1 se describen ejemplos no limitantes de clonación y expresión de cadenas de anticuerpos biespecíficos monovalentes.

Ácidos nucleicos

Mediante cualquier método conocido en la técnica puede obtenerse un polinucleótido, y puede determinarse la secuencia de nucleótidos del polinucleótido. Dado que las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos se conocen, las secuencias de nucleótidos que codifican estos anticuerpos pueden determinarse utilizando métodos conocidos en la técnica, p.ej., codones de nucleótidos que se sabe que codifican aminoácidos particulares se ensamblan de tal manera que generan un ácido nucleico que codifica el anticuerpo o fragmento del mismo en este documento. Tal polinucleótido que codifica el anticuerpo puede ensamblarse a partir de oligonucleótidos sintetizados químicamente que, brevemente, implican la síntesis de oligonucleótidos superpuestos que contienen partes de la secuencia codificante del anticuerpo, hibridación y ligamiento de esos oligonucleótidos, y después amplificación de los oligonucleótidos ligados por PCR.

En algunos aspectos, un polinucleótido que codifica un anticuerpo puede generarse a partir de ácido nucleico desde una fuente adecuada. Si un clon que contiene un ácido nucleico que codifica un anticuerpo particular no está disponible, pero se conoce la secuencia del anticuerpo, un ácido nucleico que codifica la inmunoglobulina puede sintetizarse químicamente u obtenerse de una fuente adecuada (p.ej., una biblioteca de ADNc de anticuerpos o una biblioteca de ADNc generada a partir de, o ácido nucleico, a veces poli A+ ARN, aislado de, cualquier tejido o células que expresen el anticuerpo mediante

amplificación por PCR usando cebadores sintéticos hibridables a los extremos 3' y 5' de la secuencia o mediante clonación usando una sonda de oligonucleótidos específica para que la secuencia génica particular identifique, p.ej., un clon de ADNc de una biblioteca de ADNc que codifica el anticuerpo. Los ácidos nucleicos amplificados generados por PCR pueden clonarse en vectores de clonación replicables usando cualquier método conocido en la técnica.

Una vez que se determina la secuencia de nucleótidos del anticuerpo, la secuencia de nucleótidos del anticuerpo puede manipularse usando métodos conocidos en la técnica para la manipulación de secuencias de nucleótidos, p.ej., técnicas de ADN recombinante, mutagénesis dirigida al sitio, PCR, etc., para generar anticuerpos que tienen una secuencia de aminoácidos diferente, por ejemplo para crear sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos, que incluyen, por ejemplo, las sustituciones de aminoácidos proporcionadas en este documento.

En ciertos aspectos, una o más de las CDR se insertan dentro de las regiones marco utilizando técnicas de ADN recombinante. Las regiones marco pueden ser regiones marco naturales o consenso, y en ocasiones regiones marco humanas. El polinucleótido generado por la combinación de las regiones marco y las CDR puede codificar un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno o antígenos o epítopos seleccionados. En algunos aspectos, pueden realizarse una o más sustituciones de aminoácidos dentro de las regiones marco, y las sustituciones de aminoácidos pueden mejorar la unión del anticuerpo a su antígeno. Otras alteraciones del polinucleótido están incluidas en esta divulgación y/o se conocen en la técnica.

Sistemas de expresión

La expresión recombinante de un anticuerpo en este documento, cadena pesada de anticuerpo, cadena ligera de anticuerpo, derivado, análogo o fragmento del mismo, requiere la construcción de un vector de expresión que contenga un polinucleótido o polinucleótidos que codifiquen el anticuerpo o una porción del mismo. Una vez que se ha obtenido un polinucleótido que codifica un anticuerpo o una cadena pesada o ligera de un anticuerpo, o una parte del mismo, en este documento, el vector para la producción del anticuerpo puede producirse mediante tecnología de ADN recombinante usando técnicas conocidas en la técnica. Por tanto, en este documento se describen métodos para preparar una proteína mediante expresión de un polinucleótido que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo. Los métodos conocidos en la técnica pueden usarse para construir vectores de expresión que contienen secuencias codificantes de anticuerpos y señales de control transcripcionales y traduccionales apropiadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante in vitro, técnicas sintéticas y recombinación genética in vivo.

En este documento se proporcionan, por tanto, vectores replicables que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo en este documento, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo, un dominio variable de cadena pesada o ligera de un anticuerpo o una porción del mismo, o una CDR de cadena pesada o ligera, unidos operativamente a un promotor. Tales vectores pueden incluir la secuencia de nucleótidos que codifica la región constante del anticuerpo y el dominio variable del anticuerpo puede clonarse en dicho vector para expresión de la cadena pesada completa, la cadena ligera completa o las cadenas pesada y ligera completas. En particular, se proporcionan vectores que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican dos cadenas ligeras diferentes que pueden ser cualquier combinación de kappa y/o lambda (es decir, dos cadenas ligeras kappa, dos cadenas ligeras lambda o una cadena ligera lambda y una kappa). También se proporcionan vectores que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican dos cadenas pesadas diferentes, las cuales pueden ser IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Se contempla específicamente que estos vectores se usen en combinación para expresión de un anticuerpo como se proporciona en este documento que comprende dos cadenas pesadas diferentes y dos cadenas ligeras diferentes.

El vector de expresión se transfiere a una célula hospedadora mediante técnicas convencionales y las células transfectadas se cultivan después mediante técnicas convencionales para producir un anticuerpo en el presente documento. Por tanto, en este documento se proporcionan células hospedadoras que contienen un polinucleótido que codifica un anticuerpo en este documento o fragmentos del mismo, o una cadena pesada o ligera del mismo, o una parte del mismo, o un anticuerpo de cadena única en este documento, unidas operativamente a un promotor heterólogo. En ciertos aspectos para la expresión de anticuerpos bcatenarios, los vectores que codifican las cadenas pesada y ligera pueden coexpresarse en la célula hospedadora para la expresión de la molécula de inmunoglobulina completa, como se detalla a continuación.

En este documento puede utilizarse una variedad de sistemas de vectores de expresión de hospedador para expresar los anticuerpos. Tales sistemas de expresión de hospedador representan vehículos mediante los cuales las secuencias codificantes de interés pueden producirse y posteriormente purificarse, pero también representan células que pueden, cuando se transforman o transfectan con las secuencias de codificación de nucleótidos apropiadas, expresar un anticuerpo en este documento in situ. Estos incluyen, pero no se limitan a, microorganismos como bacterias (p.ej., *E. coli* y *B. subtilis*) transformadas con ADN de bacteriófagos recombinantes, ADN plasmídico o vectores de expresión de ADN cósmido que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; levadura (p.ej., *Saccharomyces Pichia*) transformada con vectores de expresión en levadura recombinante que contienen secuencias codificantes de anticuerpo; sistemas de células de insectos infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (p.ej., baculovirus) que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; sistemas de células vegetales infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (p.ej., virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (p.ej., plásmido Ti) que contienen secuencias codificantes de

anticuerpos; o sistemas de células de mamífero (p.ej., células COS, CHO, BHK, 293, NS0 y 3T3) que albergan construcciones de expresión recombinante que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (p.ej., promotor de metalotioneína) o de virus de mamífero (p.ej., promotor de adenovirus tardío; el promotor del virus vaccinia de 7,5K).

Las células bacterianas como *Escherichia coli* y, células eucariotas, pueden usarse para la expresión de un anticuerpo recombinante. Para un ejemplo no limitante, las células de mamífero como células de ovario de hámster chino (CHO), junto con un vector como el principal elemento promotor de genes temprano intermedio del citomegalovirus humano pueden ser un sistema de expresión eficaz para anticuerpos.

En sistemas bacterianos, varios vectores de expresión pueden seleccionarse ventajosamente dependiendo del uso previsto para el anticuerpo que se expresa. Por ejemplo, cuando se produce una gran cantidad de dicha proteína, para la generación de composiciones farmacéuticas de un anticuerpo, pueden ser deseables los vectores que dirigen la expresión de altos niveles de productos de proteína de fusión que se purifican fácilmente. Tales vectores incluyen, pero no se limitan a, el vector de expresión pUR278 de *E. coli*, en donde la secuencia codificante de anticuerpos puede unirse individualmente al vector en marco con la región codificante lac Z para producir una proteína de fusión; vectores PIN y similares. Los vectores PGEX también pueden usarse para expresar polipéptidos extraños como proteínas de fusión con glutatión 5-transferasa (GST). En general, tales proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente de las células lisadas mediante adsorción y unión a perlas de glutatión-agarosa de la matriz, seguido de elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX se diseñan para incluir sitios de escisión de proteasa del factor Xa o trombina para que el producto del gen diana clonado pueda liberarse del resto GST.

En un sistema de insectos, la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* en un sistema de insectos, el virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) se usa como vector para expresar genes extraños. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia codificante de anticuerpos puede clonarse individualmente en regiones no esenciales del virus y colocarse bajo el control de un promotor AcNPV.

En células hospedadoras de mamífero, pueden utilizarse varios sistemas de expresión basados en virus. En casos en que se usa un adenovirus como vector de expresión, la secuencia codificante de anticuerpos de interés puede ligarse a un complejo de control de transcripción/traducción de adenovirus, p.ej., el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Este gen quimérico después puede insertarse en el genoma del adenovirus mediante recombinación in vitro o in vivo. La inserción en una región no esencial del genoma viral (p.ej., región E1 o E3) puede dar como resultado un virus recombinante que sea viable y capaz de expresar el anticuerpo en hospedadores infectados. Las señales de inicio específicas también pueden ser necesarias para la traducción eficaz de secuencias codificantes de anticuerpos insertadas. Estas señales incluyen el codón de inicio ATG y secuencias adyacentes. Además, el codón de inicio debe estar en fase con el marco de lectura de la secuencia codificante deseada para garantizar la traducción de todo el inserto. Estas señales de control de traducción exógenas y codones de inicio pueden tener diversos orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficacia de la expresión puede mejorarse mediante la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción apropiados, terminadores de la transcripción, etc.

En algunos aspectos, puede elegirse una cepa de la célula hospedadora que modula la expresión de las secuencias insertadas, o modifica y procesa el producto génico de la manera específica deseada. Dichas modificaciones (p.ej., glicosilación) y procesamiento (p.ej., escisión) de productos proteicos pueden ser importantes para la función proteica. Las diferentes células hospedadoras tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento y la modificación postraduccionales de proteínas y productos génicos. Pueden elegirse líneas celulares o sistemas hospedadores apropiados para garantizar la modificación y el procesamiento correctos de la proteína extraña expresada. Con este fin, pueden usarse células hospedadoras eucariotas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento adecuado de la transcripción primaria, glicosilación y fosforilación del producto génico. Tales células hospedadoras de mamífero incluyen, pero no se limitan a, células CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20, NS1 y T47D, NS0 (una línea celular de mieloma murino que no produce endógenamente ninguna cadena de inmunoglobulina), CRL7030 y HsS78Bst.

Para producción a largo plazo de alto rendimiento de proteínas recombinantes, la expresión estable es apropiada. Por ejemplo, pueden modificarse por ingeniería líneas celulares que expresan el anticuerpo establemente. En lugar de usar vectores de expresión que contienen orígenes virales de replicación, las células hospedadoras pueden transformarse con ADN controlado por elementos de control de expresión apropiados (p.ej., promotor, potenciador, secuencias, terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación, etc.) y un marcador seleccionable. Después de introducir el ADN extraño, puede permitirse que las células modificadas por ingeniería crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido, y después se cambian a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren establemente el plásmido en sus cromosomas y crezcan para formar focos que a su vez pueden clonarse y expandirse en líneas celulares. Este método puede usarse para modificar por ingeniería líneas celulares que expresen el anticuerpo. Tales líneas celulares modificadas por ingeniería pueden ser útiles para identificación y evaluación de composiciones que interactúan directa o indirectamente con el anticuerpo.

En ciertos aspectos, los anticuerpos presentados en este documento se expresan en una línea celular con expresión transitoria del anticuerpo. La transfección transitoria es un proceso en donde el ácido nucleico introducido en una célula

no se integra en el genoma o el ADN cromosómico de esa célula, sino que se mantiene como un elemento extracromosómico, p.ej., como un episoma, en la célula. Los procesos de transcripción del ácido nucleico del episoma no se ven afectados y se produce una proteína codificada por el ácido nucleico del episoma.

5 La línea celular, estable o transfectada transitoriamente, se mantiene en medio de cultivo celular y en condiciones conocidas en la técnica que dan como resultado la expresión y producción de proteínas de anticuerpos. En ciertos aspectos, los medios de cultivo de células de mamífero se basan en formulaciones de medios disponibles comercialmente, que incluyen, por ejemplo, DMEM o F12 de Ham's. En algunos aspectos, los medios de cultivo celular se modifican para soportar aumentos tanto en el crecimiento celular como en la expresión de proteínas biológicas. Como se usan en este documento, las expresiones "medio de cultivo celular", "medio de cultivo" y "formulación de medio" se refieren a una solución nutritiva para mantenimiento, crecimiento, propagación o expansión de células en un entorno artificial in vitro fuera de un organismo tejido multicelular. El medio de cultivo celular puede optimizarse para un uso específico de cultivo celular, que incluye, por ejemplo, medio de crecimiento de cultivo celular que se formula para favorecer el crecimiento celular, o medio de producción de cultivo celular que se formula para favorecer la producción de proteína recombinante. En este documento los términos nutriente, ingrediente y componente se usan indistintamente para referirse a los constituyentes que forman un medio de cultivo celular.

En varios aspectos, las líneas celulares se mantienen utilizando un método de alimentación discontinuo. Como se usa en este documento, "método semicontinuo" se refiere a un método mediante el cual un cultivo celular semicontinuo se administra con nutrientes adicionales después de incubarse primero con un medio basal. Por ejemplo, un método semicontinuo puede comprender añadir medios suplementarios según un programa de alimentación determinado dentro de un período de tiempo dado. Por tanto, un "cultivo celular semicontinuo" se refiere a un cultivo celular donde las células, típicamente de mamífero, y el medio de cultivo se suministran al recipiente de cultivo inicialmente y los nutrientes de cultivo adicionales se alimentan, continuamente o en incrementos discretos, al cultivo durante el cultivo, con o sin recolección periódica de células y/o productos antes de terminar del cultivo.

El medio de cultivo celular utilizado y los nutrientes contenidos en el mismo se conoce en la técnica. En algunos aspectos, el medio de cultivo celular comprende un medio basal y al menos un hidrolizado, p.ej., a base de soja, hidrolizado, un hidrolizado a base de levadura, o una combinación de los dos tipos de hidrolizados que dan como resultado un medio basal modificado. En ocasiones los nutrientes adicionales pueden incluir solo un medio basal, como un medio basal concentrado, o pueden incluir solo hidrolizados o hidrolizados concentrados. Los medios basales adecuados incluyen, pero no se limitan a, medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), DME/F12, Medio esencial mínimo (MEM), medio Eagle basal (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, Medio esencial α -Mínimo (α -MEM), Medio esencial mínimo de Glasgow (G-MEM), PF CHO (véase, p.ej., medio sin proteína de CHO (Sigma) o Medio sin suero EX-CELL™ 325 PF CHO para células CHO sin proteína (SAFC Bioscience), y Medio de Dulbecco modificado por Iscove. Otros ejemplos de medios basales que pueden usarse en la tecnología en este documento incluyen Medio basal BME (Gibco-Invitrogen; Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, polvo) (Gibco-Invitrogen (n.º 31600)).

En ciertos aspectos, el medio basal puede ser sin suero, lo que significa que el medio no contiene suero (p.ej., suero bovino fetal (FBS), suero de caballo, suero de cabra o cualquier otro suero derivado de animales conocido en la técnica) o medios sin proteínas animales o medios químicamente definidos.

El medio basal puede modificarse para eliminar ciertos componentes no nutricionales que se encuentran en el medio basal estándar, como diversos tampones inorgánicos y orgánicos, tensioactivos y cloruro sódico. La eliminación de tales componentes del medio celular basal permite una mayor concentración de los componentes nutricionales restantes y puede mejorar el crecimiento celular general y la expresión proteica. Además, los componentes omitidos pueden agregarse nuevamente al medio de cultivo celular que contiene el medio celular basal modificado de acuerdo con los requisitos de las condiciones de cultivo celular. En ciertos aspectos, el medio de cultivo celular contiene un medio celular basal modificado y al menos uno de los siguientes nutrientes, una fuente de hierro, un factor de crecimiento recombinante; un amortiguador; un tensioactivo; un regulador de osmolaridad; una fuente de energía; e hidrolizados no animales. Además, el medio celular basal modificado puede contener opcionalmente aminoácidos, vitaminas o una combinación de aminoácidos y vitaminas. En algunos aspectos, el medio basal modificado contiene además glutamina, por ejemplo, L-glutamina y/o metotrexato.

En algunos aspectos, la producción de anticuerpos se realiza en gran cantidad mediante un proceso de biorreactor que utiliza métodos de biorreactor de alimentación alimentado por lotes, discontinuos, de perfusión o continuos conocidos en la técnica. Los biorreactores a gran escala tienen al menos 1000 litros de capacidad, a veces aproximadamente 1.000 a 100.000 litros de capacidad. Estos biorreactores pueden usar impulsores agitadores para distribuir oxígeno y nutrientes. Los biorreactores a pequeña escala se refieren generalmente al cultivo celular en no más de aproximadamente 100 litros de capacidad volumétrica, y pueden variar de aproximadamente 1 litro a aproximadamente 100 litros. Alternativamente, los biorreactores de un solo uso (SUB) pueden usarse para el cultivo a gran escala o pequeña escala.

La temperatura, pH, agitación, aireación y densidad del inóculo pueden variar según las células hospedadoras utilizadas y la proteína recombinante expresada. Por ejemplo, un cultivo celular de proteína recombinante puede mantenerse a una temperatura entre 30 y 45 grados centígrados. El pH del medio de cultivo puede controlarse durante el proceso de cultivo de modo que el pH se mantenga en un nivel óptimo, que puede estar para ciertas células hospedadoras, dentro de un

- intervalo de pH de 6,0 a 8,0. Se puede usar una mezcla impulsada por impulsor para tales métodos de cultivo por agitación. La velocidad de rotación del impulsor puede ser de aproximadamente 50 a 200 cm/s de velocidad de punta, pero se pueden usar otros sistemas de transporte aéreo u otros sistemas de mezcla/aireación conocidos en la técnica, dependiendo del tipo de célula hospedadora que se cultive. Se proporciona aireación suficiente para mantener una concentración de oxígeno disuelto de aproximadamente 20 % a 80 % de saturación de aire en el cultivo, de nuevo, dependiendo de la célula hospedadora seleccionada que se cultive. Alternativamente, un biorreactor puede rociar aire u oxígeno directamente en el medio de cultivo. Existen otros métodos de suministro de oxígeno, incluidos sistemas de aireación sin burbujas que emplean aireadores de membrana de fibra hueca.
- Se pueden usar varios sistemas de selección, incluyendo, pero sin limitación, timidina quinasa del virus del herpes simple, glutamina sintetasa, hipoxantina guanina fosforibosiltransferasa, y pueden emplearse genes de adenina fosforibosiltransferasa en células tk, gs, hgprt o aprt, respectivamente. Además, la resistencia a antimetabolitos se puede utilizar como base de selección para los siguientes genes: dhfr, que confiere resistencia al metotrexato gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico, neo, que confiere resistencia al aminoglucósido G-418, e hgro, que confiere resistencia a la higromicina.
- Los métodos conocidos en la técnica de tecnología de ADN recombinante pueden aplicarse para seleccionar el clon recombinante deseado, incluyendo, pero sin limitación, timidina quinasa del virus del herpes simple, glutamina sintetasa, hipoxantina guanina fosforibosiltransferasa, que pueden emplearse genes de adenina fosforibosiltransferasa en células tk, gs, hgprt o aprt, respectivamente.
- Además, la resistencia a antimetabolitos se puede utilizar como base de selección para los siguientes genes: dhfr, que confiere resistencia al metotrexato; gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico; neo, que confiere resistencia al aminoglucósido G-418; e hgro, que confiere resistencia a la higromicina. Los métodos conocidos en la técnica de la tecnología de ADN recombinante pueden aplicarse para seleccionar el clon recombinante deseado.
- Los niveles de expresión de proteínas de anticuerpos se pueden aumentar mediante amplificación de vectores. Cuando un marcador en el sistema del vector que expresa proteínas de anticuerpos es amplificable, el aumento en el nivel de inhibidor presente en el cultivo de la célula hospedadora puede aumentar el número de copias del gen marcador. Dado que la región amplificada está asociada con el gen del anticuerpo, la producción de la proteína del anticuerpo también puede aumentar.
- Para la producción de los anticuerpos biespecíficos monovalentes proporcionados en el presente documento, la célula hospedadora puede cotransfectarse con dos vectores de expresión de los anticuerpos en el presente documento; en donde cada vector codifica una cadena pesada y una cadena ligera, de modo que entre los dos vectores se codifican las cuatro cadenas (es decir, las dos cadenas pesadas y las dos cadenas ligeras). Cuando cada vector codifica una cadena pesada y una ligera, es preferible que cada vector comprenda un marcador de selección de mamífero diferente. El uso de dos marcadores de selección diferentes asegura que ambos vectores estén presentes en una célula hospedadora. Alternativamente, el primer vector codifica dos polipéptidos de cadena pesada (véase, por ejemplo, la Figura 3C) y el segundo vector codifica dos polipéptidos de cadena ligera (véanse, por ejemplo, las Figuras 3A y 3B). Cuando cada vector expresa solo cadenas pesadas o ligeras, los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos, ya que solo las células hospedadoras que comprenden ambos plásmidos expresarán IgG y es muy probable que sean predominantemente MBabs. Alternativamente, se puede usar un solo vector que codifica, y es capaz de expresar, todos los polipéptidos de cadena pesada y ligera. En tales situaciones, las cadenas ligeras pueden colocarse antes de las cadenas pesadas para evitar un exceso de cadena pesada libre de tóxicos. Como se describe en el presente documento, se pueden utilizar varios métodos para permitir la expresión igual de polipéptidos de cadena pesada y ligera. Las secuencias de codificación para las cadenas pesadas y ligeras pueden comprender ADNc o ADN genómico.
- En algunos aspectos, la célula hospedadora se cotransfecta con dos vectores de expresión; el primer vector codifica un primer polipéptido de cadena pesada que comprende cualquiera de las modificaciones descritas en el presente documento y un segundo polipéptido de cadena pesada sin modificaciones o con modificaciones compensatorias de Fc (véase, por ejemplo, la Figura 3C); y el segundo vector que codifica un primer polipéptido de cadena ligera modificado que corresponde a la primera cadena pesada y un segundo polipéptido de cadena ligera no modificado (véanse, por ejemplo, las Figuras 3A y 3B). En algunos aspectos, cada cadena se expresa individualmente usando su propio promotor. La expresión de dos cadenas ligeras de un solo vector y dos cadenas pesadas de uno solo puede ser particularmente útil para generar anticuerpos con diferentes cadenas pesadas y ligeras. Además, como se describe en este documento, la selección de qué mutaciones introducir en la región Fc de cada cadena pesada se puede usar para minimizar la producción de semi anticuerpos.
- Una vez que se ha producido un anticuerpo con una interfase HC-LC modificada y una interfase HC-LC no modificada por expresión recombinante, se puede purificar por cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, por cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, particularmente por afinidad por el antígeno específico después de la proteína A y la cromatografía en columna de tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Además, los anticuerpos en el presente documento o sus fragmentos pueden fusionarse con secuencias de polipéptidos heterólogos descritas en el presente documento o conocidas de otro modo en la técnica para facilitar la purificación.

Purificación y aislamiento de anticuerpos

Una vez se ha producido una proteína de anticuerpo en el presente documento por expresión recombinante, se puede purificar por cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, por cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, particularmente por afinidad por los antígenos específicos Proteína A o Proteína G, y cromatografía en columna de tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial, o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Además, los anticuerpos de la presente tecnología o sus fragmentos pueden fusionarse con secuencias de polipéptidos heterólogos (denominados en el presente documento "etiquetas") descritas anteriormente o conocidas de otro modo en la técnica para facilitar la purificación. En algunos aspectos, los anticuerpos proporcionados en el presente documento se purifican mediante un proceso de múltiples etapas que comprende dos o más medios de afinidad. Los medios útiles para la purificación de los anticuerpos proporcionados en el presente documento incluyen medios específicos para la porción Fc, por ejemplo, proteína A o proteína G; resinas específicas para la región constante de cadena ligera, por ejemplo, CaptureSelect Kappa y CaptureSelect Lambda; resinas específicas para el dominio de unión a antígeno, por ejemplo, resinas que incorporan todo o una porción del antígeno, o que comprenden un dominio de unión a anticuerpo anti-id.

Cuando se usan técnicas recombinantes, la proteína del anticuerpo puede producirse intracelularmente, en el espacio periplásmico, o secretarse directamente al medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como primer paso, los desechos particulados, ya sea células hospedadoras o fragmentos lisados, se retiran, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Por ejemplo, los procedimientos para aislar anticuerpos que se secretan en el espacio periplásmico de *E. coli* se conocen en la técnica. Cuando la proteína del anticuerpo se secreta en el medio, los sobrenadantes de tales sistemas de expresión generalmente se concentran primero usando un filtro de concentración de proteína disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de la proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para prevenir el crecimiento de contaminantes adventicios.

La composición de anticuerpos preparada a partir de las células puede purificarse usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de intercambio iónico, electroforesis en gel, diálisis y/o cromatografía de afinidad, ya sea sola o en combinación con otras etapas de purificación. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y el isotipo de cualquier región Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo y entenderá el experto en la materia. La matriz a la que está unido el ligando de afinidad es con frecuencia agarosa, pero hay otras matrices disponibles. Las matrices mecánicamente estables tales como vidrio de poro controlado o poli(estirenodivinil)benceno permiten velocidades de flujo más rápidas y tiempos de procesamiento más cortos que los que se pueden lograr con agarosa. Cuando la proteína del anticuerpo comprende un dominio CH3, la resina Bakerbond ABX (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas tales como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación en etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía sobre heparina, cromatografía de SEPHAROSE sobre una resina de intercambio aniónico o catiónico (como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía de enfoque, SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio también están disponibles dependiendo de la proteína de anticuerpo recuperada.

Después de cualquier etapa(s) de purificación preliminar, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y los contaminantes puede someterse a cromatografía de interacción hidrófoba de pH bajo usando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5-4,5, y realizarse a bajas concentraciones de sal (por ejemplo, aproximadamente sal 0-0,25 M).

Por tanto, en ciertos aspectos, los anticuerpos como se proporcionan en este documento están sustancialmente purificados/aislados. En un aspecto, estos anticuerpos expresados recombinantemente aislados/purificados pueden administrarse a un paciente para mediar un efecto profiláctico o terapéutico. En algunos aspectos, estos anticuerpos aislados/purificados pueden usarse para diagnosticar una enfermedad.

Métodos diagnósticos de uso

En ciertos aspectos, los anticuerpos con una interfase HC-LC modificada y las composiciones de la presente invención pueden usarse in vivo y/o in vitro para diagnosticar enfermedades asociadas con la molécula de anticuerpo. Esto se puede lograr, por ejemplo, contactando una muestra para ensayo, opcionalmente junto con una muestra de control, con el anticuerpo en condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo y la molécula de interés. Luego se detecta la formación de complejos (por ejemplo, usando un ELISA). Cuando se usa una muestra de control junto con la muestra de prueba, se detecta complejo en ambas muestras y cualquier diferencia estadísticamente significativa en la formación de complejos entre las muestras es indicativa de la presencia de la molécula de interés en la muestra de ensayo.

En algunos aspectos, la tecnología en el presente documento proporciona un método para determinar la presencia de una molécula de interés en una muestra sospechosa de contener dicha molécula, comprendiendo el método exponer la muestra a un anticuerpo proporcionado en este documento y determinar la unión del anticuerpo a la molécula de interés en la muestra donde la unión del anticuerpo a la molécula de interés en la muestra es indicativa de la presencia de la molécula de interés en la muestra. En algunos aspectos, la muestra es una muestra biológica. En ciertos aspectos, la

muestra biológica es de un mamífero que experimenta o se sospecha que padece una enfermedad o trastorno asociado con la molécula de interés.

En ciertos aspectos, un anticuerpo proporcionado aquí puede usarse para detectar la sobreexpresión o amplificación de una molécula de interés usando un ensayo de diagnóstico in vivo. En algunos aspectos, un anticuerpo proporcionado en este documento se agrega a una muestra donde el anticuerpo se une a la molécula de interés para la detección y se etiqueta con una etiqueta detectable (por ejemplo, un isótopo radiactivo o una etiqueta fluorescente) y escanea externamente al paciente para localizar la etiqueta.

Los ensayos de FISH tales como INFORM™ (vendido por Ventana, Ariz.) o PATHVISION™ (Vysis, Ill.) se pueden llevar a cabo en tejido fijado con formalina e incluido en parafina para determinar el grado (si existe) de sobreexpresión de una molécula de interés en el tumor.

En ciertos aspectos, un anticuerpo proporcionado en este documento puede usarse en un método para diagnosticar un trastorno proliferativo celular asociado con un aumento en las células que expresan una molécula de interés. En algunos aspectos, el método comprende poner en contacto las células de ensayo en una muestra biológica con un anticuerpo proporcionado en este documento; determinar el nivel de una molécula de interés en las células de ensayo en la muestra mediante la detección de la unión de un anticuerpo proporcionado en este documento; y comparar el nivel de anticuerpo unido a las células en una muestra de control, donde el nivel de anticuerpo unido se normaliza a la molécula número de células que expresan interés en las muestras de ensayo y control, y donde un mayor nivel de anticuerpo unido en la muestra de ensayo en comparación con la muestra de control indica la presencia de un trastorno proliferativo celular asociado con células que expresan la molécula de interés.

En ciertos aspectos, un anticuerpo proporcionado en este documento puede usarse en un método para detectar una molécula soluble de interés en sangre o suero. En algunos aspectos, el método comprende poner en contacto una muestra de ensayo de sangre o suero de un mamífero sospechoso de experimentar un trastorno asociado con una molécula de interés con un anticuerpo proporcionado en este documento y detectar un aumento en la molécula soluble de interés en la muestra de ensayo en relación con una muestra de control de sangre o suero de un mamífero normal. En algunos aspectos, el método de detección es útil como método de diagnóstico de un trastorno asociado con un aumento de la molécula soluble de interés la sangre o suero de un mamífero.

Métodos de tratamiento de uso

En varios aspectos, un anticuerpo proporcionado en este documento se administra a células, por ejemplo, células cancerosas. El efecto biológico del anticuerpo proporcionado en este documento puede observarse, incluyendo, pero sin limitarse a, células, muerte, inhibición de la proliferación celular, falta de efecto, cambios en la morfología celular y cambios en el patrón de crecimiento celular. En algunos aspectos, el anticuerpo proporcionado en este documento comprende un marcador detectable y/o lleva un fármaco o toxina a un antígeno tumoral. En ciertos aspectos, la etiqueta indica la ubicación del antígeno tumoral dentro de la célula.

Los ejemplos de afecciones o trastornos hiperproliferativos incluyen tumores benignos o malignos, leucemia y neoplasias linfoides. Otros incluyen neoplasias neuronales, gliales, astrocíticas, hipotalámicas, glandulares, macrofágicas, epiteliales, endoteliales y estromales. Otros cánceres o trastornos hiperproliferativos incluyen: cánceres de cabeza, cuello, ojos, boca, garganta, esófago, pecho, piel, hueso, pulmón, colon, recto, colorrectal, estómago, bazo, riñón, músculo esquelético, tejido subcutáneo, melanoma metastásico, endometrial, próstata, mama, ovarios, testículos, tiroides, sangre, ganglios linfáticos, riñones, hígado, páncreas, cerebro o sistema nervioso central. Los ejemplos de cánceres que pueden prevenirse, controlarse, tratarse o mejorarse según los métodos incluidos en este documento incluyen, pero no se limitan a, cáncer de cabeza, cuello, ojos, boca, garganta, esófago, tórax, hueso, pulmón, colon, recto, estómago, próstata, mama, ovarios, riñón, hígado, páncreas y cerebro. Los cánceres adicionales incluyen, entre otros, los siguientes: leucemias, tal como, pero no limitadas a, leucemia aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemias mielocíticas agudas como leucemias mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica, eritroleucémicas y síndrome mielodisplásico, leucemia crónica como, pero no limitadas a, leucemia mielocítica crónica (granulocítica), leucemia linfocítica crónica, leucemia de células pilosas; policitemia vera; linfomas tales como, pero no limitados a, enfermedad de Hodgkin, enfermedad no Hodgkin; mielomas múltiples tales como, pero no limitados a, mieloma múltiple latente, mieloma no secretor, mieloma osteosclerótico, leucemia de células plasmáticas, plasmacitoma solitario y plasmacitoma extramedular, macroglobulinemia de Waldenstrom; gammopatía monoclonal de importancia indeterminada; gammopatía monoclonal benigna; enfermedad de la cadena pesada; cáncer óseo y sarcomas del tejido conectivo, tales como, pero no limitados a, sarcoma óseo, mieloma, enfermedad ósea, mieloma múltiple, osteosarcoma óseo inducido por colesteatoma, enfermedad ósea de Paget, osteosarcoma, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, tumor maligno de células gigantes, fibrosarcoma de hueso, cordoma, sarcoma perióstico, sarcomas de tejidos blandos, angiosarcoma (hemangiosarcoma), fibrosarcoma, sarcoma de Kaposi, leiomiomas, liposarcoma, linfangiosarcoma, neurilemmoma, rabdomiosarcoma y sarcoma sinovial; tumores cerebrales tales como, pero no limitados a, glioma, astrocitoma, glioma del tronco encefálico, ependimoma, oligodendroglioma, tumor no glial, neurinoma del acústico, craneofaringioma, meduloblastoma, meningioma, pineocitoma, pineoblastoma y linfoma cerebral primario; cáncer de mama, que incluye, pero no se limita a, adenocarcinoma, carcinoma lobular (células pequeñas), carcinoma intraductal, cáncer de mama medular, cáncer de mama mucinoso, cáncer de mama tubular, cáncer de mama papilar, enfermedad de Paget (incluyendo enfermedad de

Paget juvenil) y cáncer de mama inflamatorio; cáncer adrenal tal como, pero no limitado a, feocromocitoma y carcinoma adrenocortical; cáncer de tiroides tal como, pero no limitado a, cáncer de tiroides papilar o folicular, cáncer de tiroides medular y cáncer de tiroides anaplásico; cáncer pancreático tal como, pero no limitado a, insulinoma, gastrinoma, glucagonoma, vipoma, tumor secretor de somatostatina y tumor carcinoide o de células de los islotes; cánceres pituitarios tales como, pero limitados a enfermedad de Cushing, tumor secretor de prolactina, acromegalia y diabetes insípida; cánceres oculares tales como, pero no limitados a, melanoma ocular, como melanoma de iris, melanoma coroideo y melanoma de cuerpo ciliar, y retinoblastoma; cánceres vaginales tales como carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma y melanoma; cáncer vulvar tal como carcinoma de células escamosas, melanoma, adenocarcinoma, carcinoma de células basales, sarcoma y enfermedad de Paget; cánceres cervicales tales como, pero no limitados a, carcinoma de células escamosas y adenocarcinoma; cánceres uterinos tales como, pero no limitados a, carcinoma endometrial y sarcoma uterino; cánceres de ovario tales como, pero no limitados a, carcinoma epitelial de ovario, tumor límite, tumor de células germinales y tumor del estroma; cánceres esofágicos tales como, pero no limitados a, cáncer escamoso, adenocarcinoma, carcinoma adenoide cístico, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma adenoescamoso, sarcoma, melanoma, plasmacitoma, carcinoma verrugoso y carcinoma de células de avena (células pequeñas); cánceres de estómago tales como, pero no limitados a, adenocarcinoma, hongos (polipoides), ulceración, diseminación superficial, diseminación difusa, linfoma maligno, liposarcoma, fibrosarcoma y carcinosarcoma; cánceres de colon; cánceres rectales; cánceres de hígado tales como, pero no limitados a, carcinoma hepatocelular y hepatoblastoma, cánceres de vesícula biliar como adenocarcinoma; colangiocarcinomas tales como, pero no limitados a, papilar, nodular y difuso; cánceres de pulmón tales como cáncer de pulmón de células no microcíticas, carcinoma de células escamosas (carcinoma epidermoide), adenocarcinoma, carcinoma de células macrocíticas y cáncer de pulmón de células pequeñas; cánceres testiculares tales como, pero no limitados a, tumor germinal, seminoma, anaplásico, clásico (típico), espermatocítico, no seminoma, carcinoma embrionario, carcinoma de teratoma, coriocarcinoma (tumor de saco vitelino), cánceres de próstata tales como, pero no limitados a, adenocarcinoma, leiomiomasarcoma y rabdomiosarcoma; cánceres de pene; cánceres orales tales como, pero no limitados a, carcinoma de células escamosas; cánceres basales; cánceres de glándulas salivales tales como, pero no limitados a, adenocarcinoma, carcinoma mucoepidermoide y carcinoma adenoidiquístico; cánceres de faringe tales como, pero no limitados a, cáncer de células escamosas y verrugoso; cánceres de piel tales como, pero no limitados a, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas y melanoma, melanoma de diseminación superficial, melanoma nodular, melanoma maligno lentigo, melanoma lentiginoso acral; cánceres de riñón tales como, pero no limitados a, cáncer de células renales, adenocarcinoma, hipernefoma, fibrosarcoma, cáncer de células transicionales (pelvis renal y/o uréter); tumor de Wilms; cánceres de vejiga tales como, pero no limitados a, carcinoma de células transicionales, cáncer de células escamosas adenocarcinoma, carcinosarcoma. Además, los cánceres incluyen mixosarcoma, sarcoma osteogénico, endoteliosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, mesotelioma, sinovioma, hemangioblastoma, carcinoma epitelial, cistadenocarcinoma, carcinoma broncogénico, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar y carcinoma papilar.

También se contempla que los cánceres causados por anomalías en la apoptosis también pueden tratarse con los métodos y composiciones de este documento. Tales cánceres pueden incluir, pero no se limitan a, linfomas foliculares, carcinomas con mutaciones de p53, tumores dependientes de hormonas de mama, próstata y ovario, y lesiones precancerosas como poliposis adenomatosa familiar y síndromes mielodisplásicos.

Las proteínas y composiciones de anticuerpos en este documento son útiles para muchas finalidades, por ejemplo, como agentes terapéuticos contra una amplia gama de enfermedades y trastornos crónicos y agudos que incluyen, pero no se limitan a, trastornos autoinmunes y/o inflamatorios, incluyendo síndrome de Sjogren, artritis reumatoide, lupus psoriasis, aterosclerosis, retinopatías diabéticas y otras, fibroplasia retrolental, degeneración macular relacionada con la edad, glaucoma neovascular, hemangiomas, hiperplasias tiroideas (incluyendo enfermedad de Grave), trasplante corneal y de otros tejidos, e inflamación crónica, sepsis, artritis reumatoide, peritonitis, enfermedad de Crohn, lesión por reperfusión, septicemia, shock endotóxico, fibrosis quística, endocarditis, psoriasis, artritis (p.ej., artritis psoriásica), shock anafiláctico, isquemia orgánica, lesión por reperfusión, lesión de la médula espinal y rechazo a aloinjerto.

Los ejemplos de trastornos autoinmunes y/o inflamatorios incluyen, pero no se limitan a, alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, enfermedad de Addison autoinmune, enfermedades autoinmunes de la glándula suprarrenal, anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune, ooforitis y orquitis autoinmune, síndrome de Sjogren, psoriasis, aterosclerosis, retinopatías diabéticas y otras, fibroplasia retrolental, degeneración macular relacionada con la edad, glaucoma neovascular, hemangiomas, hiperplasias tiroideas (incluyendo enfermedad de Grave), trasplante corneal y de otros tejidos, e inflamación crónica, sepsis, artritis reumatoide, peritonitis, enfermedad de Crohn enfermedad, lesión por reperfusión, septicemia, shock endotóxico, fibrosis quística, endocarditis, psoriasis, artritis (p.ej., artritis psoriásica), shock anafiláctico, isquemia orgánica, lesión por reperfusión, lesión de la médula espinal y rechazo a aloinjerto, trombocitopenia autoinmune, enfermedad de Behcet, penfigoide ampolloso, cardiomiopatía, dermatitis celiaca, síndrome de disfunción inmunitaria por fatiga crónica (CFIDS), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss, pénfigo cicatricial, síndrome CREST, enfermedad de aglutinina fría, lupus discoide mixto, lupus discoide mixto crioglobulinemia, fibromialgia-fibromiositis, glomerulonefritis, Guillain-Barré, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, trombocitopenia idiopática (IPT), neuropatía por IgA, artritis juvenil, líquen plano, lupus eritematoso, enfermedad de Meniere, enfermedad de tejido conjuntivo mixto, esclerosis múltiple, diabetes mellitus de tipo 1 o inmunomediada, miastenia gravis, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, polcndritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis psoriática, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia,

síndrome de Sjogren, síndrome del hombre rígido, lupus eritematoso sistémico, lupus eritematoso, arteritis de takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, uveítis, vasculitis como dermatitis herpetiformis vasculitis, vitíligo, y granulomatosis de Wegener.

- 5 Los ejemplos de trastornos inflamatorios incluyen, pero no se limitan a, asma, encefalitis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), trastornos alérgicos, shock séptico, fibrosis pulmonar, espondiloartropatía indiferenciada, artropatía indiferenciada, artritis, osteólisis inflamatoria, e inflamación crónica resultante de infecciones virales o bacterianas crónicas.
- 10 Las composiciones y métodos de este documento pueden usarse con una o más terapias convencionales que se usan para prevenir, controlar o tratar las enfermedades anteriores. También se proporcionan, en algunos aspectos, métodos para usar anticuerpos para inactivar diversos agentes infecciosos, como virus, hongos, microbios eucariotas y bacterias. En algunos aspectos, los anticuerpos de este documento pueden usarse para inactivar los virus RSV, hMPV, PIV o gripe. En algunos aspectos, los anticuerpos de este documento pueden usarse para inactivar patógenos fúngicos, como, pero sin limitarse a, miembros de los géneros *Naegleria*, *Aspergillus*, *Blastomyces*, *Histoplasma*, *Candida* o *Tinea*. En algunos aspectos, los anticuerpos de este documento pueden usarse para inactivar microbios eucariotas, como, pero sin limitarse a, miembros de los géneros *Giardia*, *Toxoplasma*, *Plasmodium*, *Trypanosoma* y *Entamoeba*. En algunos aspectos, los anticuerpos de este documento pueden usarse para inactivar patógenos bacterianos, como, pero sin limitarse a, miembros de los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Borrelia*, *Vibro* y *Neisseria*.
- 15
- 20 Los anticuerpos y las composiciones de este documento son útiles para muchos propósitos, por ejemplo, como agentes terapéuticos contra una amplia gama de enfermedades y trastornos crónicos y agudos que incluyen, pero no se limitan a, enfermedades infecciosas, incluyendo enfermedades virales, bacterianas y fúngicas. Los ejemplos de patógenos virales incluyen, pero no se limitan a: adenoviridae (p.ej., mastadenovirus y aviadenovirus), herpesviridae (p.ej., virus 1 del herpes simplex, virus 2 del herpes simplex, virus 5 del herpes simplex, y virus 6 del herpes simplex), leviviridae (p.ej., levivirus, MS2 fase enterobacteria, allovirus), poxviridae (p.ej., chordopoxvirinae, parapoxvirus, avipoxvirus, capripoxvirus, leporipoxvirus, suipoxvirus, molluscipoxvirus, y entomopoxvirinae), papovaviridae (p.ej., poliomavirus y papilomavirus), paramixoviridae (p.ej., mparamixovirus, virus 1 de parainfluenza, morbillivirus (p.ej., virus del sarampión), rubulavirus (measles or ejemplo, virus de las paperas), pneumonovirinae (p.ej., pneumovirus, virus sincitial respiratorio humano), y metapneumovirus (p.ej., pneumovirus aviar y metapneumovirus humano)), picornaviridae (p.ej., enterovirus, rinovirus, hepatovirus (p.ej., virus de la hepatitis A humana), cardiovirus, y aphovirus), reoviridae (p.ej., orthoreovirus, orbivirus, rotavirus, cytovirus, fijivirus, phytoreovirus, y oryzavirus), retroviridae (p.ej., retrovirus de tipo B de mamífero, retrovirus de tipo C de mamífero, retrovirus de tipo C aviar, grupo de retrovirus de tipo D, retrovirus BLVHTLV, lentivirus (p.ej., virus 1 de inmunodeficiencia humana y virus 2 de inmunodeficiencia humana), spumavirus), flaviviridae (p.ej., virus de la hepatitis C), hepadnaviridae (p.ej., virus de la hepatitis B), togaviridae (p.ej., alfavirus (p.ej., virus sindbis) y rubivirus (p.ej., virus de la rubéola)), rhabdoviridae (p.ej., vesiculovirus, lyssavirus, ephemerovirus, cytorhabdovirus, y necleorhabdovirus), arenaviridae (p.ej., arenavirus, virus de la coriomeningitis linfocítica, virus lpp, y virus de lassa), y coronavirusidae (p.ej., coronavirus y torovirus).
- 25
- 30
- 35 Los ejemplos de patógenos bacterianos incluyen, pero no se limitan a: la familia Aquaspirillum, familia Azospirillum, familia Azotobacteraceae, familia Bacteroidaceae, especie Bartonella, familia Bdellovibrio, especie Campylobacter, especie Chlamydia (p.ej., Chlamydia pneumoniae), clostridium, familia Enterobacteriaceae (p.ej., especie Citrobacter, Morganella, Enterobacter aerogenes, especie Erwinia, Escherichia coli, especie Hafnia, especie Klebsiella, especie Proteus vulgaris, Providencia, especie Salmonella, Serratia marcescens, y Shigella flexneri), familia Gardinella, Haemophilus influenzae, familia Halobacteriaceae, familia Helicobacter, familia Legionellaceae, familia Listeria, familia Methylococcaceae, micobacteria (p.ej., Mycobacterium tuberculosis), familia Neisseriaceae, familia Oceanospirillum, familia Pasteurellaceae, especie Pneumococcus, especie Pseudomonas, familia Rhizobiaceae, familia Spirillum, familia Spirosomaceae, Staphylococcuss (p.ej., Staphylococcus aureus y Staphylococcus pyrogenes resistentes a metilina), Streptococcus (p.ej., Streptococcus enteritidis, Streptococcus fasciae, y Streptococcus pneumoniae), familia Vampirovibr Helicobacter, y familia Vampirovibrio.
- 40
- 45
- 50 Los ejemplos de patógenos fúngicos incluyen, pero no se limitan a: especie Absidia (p.ej., Absidia corymbifera y Absidia ramosa), especie Aspergillus, (p.ej., Aspergillus flavus, Aspergillus fumigatus, Aspergillus nidulans, Aspergillus niger y Aspergillus terreus), Basidiobolus ranarum, Blastomyces sp. glabrata, Candida kerr, Candida krusei, Candida parapsilosis, Candida pseudotropicalis, Candida quillermondii, Candida rugosa, Candida stellatoidea y Candida tropicalis), Coccidioides immitis, especie Conidiobolus, Cryptococcus neoforms, especie Cunninghamella, dermatofitos, Histoplasma capsulatum, Microsporium gypseum, Mucor pusillus, Paracoccidioides brasiliensis, Pseudallescheria boydii, Rhinosporidium seeberi, Pneumocystis carinii, especie Rhizopus (e.g., Rhizopus arrhizus, Rhizopus oryzae, y Rhizopus microsporus), especie Saccharomyces, Sporothrix schenckii, zygomycetes, y clases como Zigomicetos, Ascomicetos, los Basidiomicetos, Deuteromicetos, y Oomicetos. En algunos aspectos también se proporcionan métodos para usar anticuerpos para agotar una población celular. En un aspecto, los métodos de este documento pueden usarse en el agotamiento de los siguientes tipos celulares: eosinófilos, basófilos, neutrófilos, linfocitos T, linfocitos B, mastocitos, monocitos, células endoteliales y células tumorales.
- 55
- 60
- 65 En ciertos aspectos, los anticuerpos en este documento también pueden ser útiles en el diagnóstico y detección de enfermedades con síntomas de los mismos. En algunos aspectos, las composiciones de este documento pueden ser

útiles en la monitorización de la progresión de la enfermedad. En diversos aspectos, las composiciones de este documento pueden ser útiles en la monitorización de los regímenes de tratamiento. En ciertos aspectos, las composiciones de este documento son útiles para el diagnóstico en una aplicación ex vivo, como un kit de diagnóstico.

- 5 Las composiciones de este documento pueden ser útiles en la visualización de antígenos diana. En algunos aspectos, los antígenos diana son receptores de superficie celular que se internalizan. En ciertos aspectos, el antígeno diana es un antígeno intracelular. En algunos aspectos, la diana es un antígeno intranuclear. En algunos aspectos, algunos de los anticuerpos en este documento una vez unidos, se internalizan en células

10 **Conjugados**

Los anticuerpos proporcionados en este documento pueden usarse en forma no conjugada o conjugarse con al menos uno de una variedad de restos heterólogos para facilitar la detección de la habían o para formación de imágenes o terapia. Los armazones de Tn3 pueden marcarse o conjugarse antes o después de la purificación, cuando se realiza purificación.

- 15 Muchas fracciones heterólogas carecen de grupos funcionales adecuados a los que pueden unirse los anticuerpos en este documento. Por tanto, en algunos aspectos, la molécula efectora está unida al armazón mediante un conector, donde el conector contiene grupos reactivos para conjugación. En algunos aspectos, el resto heterólogo conjugado con un anticuerpo en este documento puede funcionar como un conector. En otros aspectos, el resto se conjuga con un anticuerpo en este documento mediante un conector que puede ser escindible o no escindible. En un aspecto, la molécula de enlace escindible es una molécula de enlace escindible redox, de modo que la molécula de enlace es escindible en entornos con un potencial redox más bajo, como el citoplasma y otras regiones con mayores concentraciones de moléculas con grupos sulfhidrilo libres. Los ejemplos de moléculas de enlace que pueden escindirse debido a un cambio en el potencial redox incluyen las que contienen disulfuros.

- 25 En algunos aspectos, un anticuerpo en este documento se modifica por ingeniería para proporcionar grupos reactivos para conjugación. En tales anticuerpos, el extremo N-terminal y/o C-terminal también puede servir para proporcionar grupos reactivos para conjugación. En otros aspectos, el extremo N-terminal puede conjugarse con un resto (como, pero sin limitarse a, PEG) mientras que el extremo C-terminal está conjugado con otro resto (como, pero sin limitarse a, biotina), o viceversa.

- 30 El término "polietilenglicol" o "PEG" significa un compuesto de polietilenglicol o un derivado del mismo, con o sin agentes de acoplamiento, restos de acoplamiento o de activación (p.ej., con tiol, triflato, tresilato, aziridina, oxirano, N-hidroxisuccinimida o un resto de maleimida). El término "PEG" pretende indicar polietilenglicol de un peso molecular entre 35 500 y 150.000 Da, incluyendo análogos del mismo, donde por ejemplo el grupo OH terminal ha sido reemplazado por un grupo metoxi (denominado mPEG).

- Los anticuerpos en este documento pueden derivatizarse con polietilenglicol (PEG). PEG es un polímero lineal, soluble en agua de unidades repetitivas de óxido de etileno con dos grupos hidroxilo terminales. Los PEG se clasifican por sus pesos moleculares, que típicamente varían de aproximadamente 500 daltons a aproximadamente 40.000 daltons. En un aspecto específico, los PEG empleados tienen pesos moleculares que varían de 5.000 daltons a aproximadamente 20.000 daltons. Los PEG acoplados a los armazones de este documento pueden ser ramificados o no ramificados. Véase, por ejemplo, Monfardini, C. et al. 1995 Bioconjugate Chem 6:62-69. Los PEG están disponibles comercialmente en Nektar Inc., Sigma Chemical Co. y otras compañías. Dichos PEG incluyen, pero no se limitan a, monometoxipolietilenglicol (MePEG-OH), monometoxipolietilenglicol-succinato (MePEG-S), monometoxipolietilenglicol-succinimidil succinato (MePEG-S-NHS), monometoxipolietilenglicol-amina (MePEG-NH₂), monometoxipolietilenglicol-tresilato (MePEG-TRES), y monometoxipolietilenglicol-imidazolil-carbonilo (MePEG-IM).

- 50 Brevemente, el polímero hidrófilo que se emplea, por ejemplo, PEG, está protegido en un extremo con un grupo no reactivo como un grupo metoxi o etoxi. Posteriormente, el polímero se activa en el otro extremo por reacción con un agente de activación adecuado, como haluros cianúricos (por ejemplo, cloruro, bromuro o fluoruro cianúrico), carbonildiimidazol, un reactivo anhídrido (por ejemplo, un anhídrido dihalo succínico, como anhídrido dibromosuccínico), acil azida, p-diazoniobencil éter, 3- (p-diazoniobenoxi)-2-hidroxipropiléter) y similares. El polímero activado después reacciona con un polipéptido como se describe en este documento para producir un polipéptido derivatizado con un polímero. Alternativamente, un grupo funcional en un anticuerpo en este documento puede activarse para reacción con el polímero, o los dos grupos pueden unirse en una reacción de acoplamiento concertada usando métodos de acoplamiento conocidos. Se observará rápidamente que los polipéptidos de este documento pueden derivatizarse con PEG usando una miríada de otros esquemas de reacción conocidos en la técnica. Un PEG puede acoplarse a un armazón en este documento en uno o más grupos funcionales en cualquier extremo del anticuerpo o dentro del anticuerpo. En 60 ciertos aspectos, el PEG se acopla al extremo N-terminal o al C-terminal.

- En otros aspectos, un anticuerpo en este documento, análogos o derivados del mismo pueden conjugarse con un agente de diagnóstico o detectable. Tales anticuerpos pueden ser útiles para monitorizar o pronosticar el desarrollo o la progresión de una enfermedad como parte de un procedimiento de ensayo clínico, como determinar la eficacia de una 65 terapia particular.

La tecnología en este documento incluye además los usos de un anticuerpo en este documento conjugado con un resto terapéutico. Un anticuerpo en este documento puede conjugarse con un resto terapéutico como una citotoxina, *p.ej.*, un agente citostático o citocida, un agente terapéutico o un ion metálico radiactivo, *p.ej.*, emisores alfa. Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para las células.

Composiciones

En ciertos aspectos, la divulgación proporciona composiciones. Tales composiciones pueden ser composiciones que comprenden una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo proporcionado en este documento. Tales composiciones farmacéuticas también pueden ser composiciones que comprenden un anticuerpo proporcionado en este documento, o una combinación de anticuerpos en este documento farmacéuticamente aceptable. En ciertos aspectos, las composiciones de la divulgación se usan como medicamento.

En ciertos aspectos, los anticuerpos en este documento o una combinación de anticuerpos en este documento (o moléculas de ácido nucleico que codifican uno o más anticuerpos en este documento) pueden formularse con un vehículo, excipiente o estabilizante farmacéuticamente aceptable, como composiciones farmacéuticas. En ciertos aspectos, tales composiciones farmacéuticas son adecuadas para administración a un animal humano o no humano mediante una o más vías de administración usando métodos conocidos en la técnica. Como conservará el experto en la materia, la vía y/o modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" significa uno o más materiales no tóxicos que no interfieren con la eficacia de la actividad biológica de los principios activos. Tales preparaciones pueden contener habitualmente sales, agentes tamponantes, conservantes, vehículos compatibles y, opcionalmente, otros agentes terapéuticos. Tales preparaciones farmacéuticamente aceptables también pueden contener cargas sólidas o líquidas compatibles, diluyentes o sustancias encapsulantes que son adecuadas para administración en un ser humano. Otros vehículos, excipientes y/o aditivos contemplados, que pueden utilizarse en las formulaciones descritas en este documento incluyen, por ejemplo, agentes aromatizantes, agentes antimicrobianos, edulcorantes, antioxidantes, agentes antiestáticos, lípidos, excipientes de proteínas como albúmina sérica, gelatina, caseína, contraiones formadores de sal como sodio y similares. En la técnica se conocen estos y otros vehículos, excipientes y/o aditivos farmacéuticos conocidos adicionales adecuados para uso en las formulaciones descritas en este documento, *p.ej.*, como se enumera en "Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 21a ed., Lippincott Williams & Wilkins, (2005), y en el "Physician's Desk Reference", 60a ed., Medical Economics, Montvale, N.J. (2005). Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden seleccionarse rutinariamente para que sean adecuados para el modo de administración, solubilidad y/o estabilidad deseada o requerida.

En un aspecto, las formulaciones de la divulgación son formulaciones sin pirógenos que están sustancialmente libres de endotoxinas y/o sustancias pirógenas relacionadas. Las endotoxinas incluyen toxinas que están confinadas dentro de un microorganismo y se liberan solo cuando los microorganismos se descomponen o mueren. Las sustancias pirógenas también incluyen sustancias termoestables inductoras de fiebre (glicoproteínas) de la membrana externa de las bacterias y otros microorganismos. Ambas sustancias pueden causar fiebre, hipotensión y shock si se administran a humanos. Debido a los posibles efectos nocivos, incluso pequeñas cantidades de endotoxinas deben eliminarse de las soluciones farmacéuticas administradas por vía intravenosa. La Food & Drug Administration ("FDA") ha establecido un límite superior de 5 unidades de endotoxina (UE) por dosis por kilogramo de peso corporal en un solo periodo de una hora para aplicaciones de fármacos intravenosos (The United States Pharmacopeial Convention, Pharmacopeial Forum 26 (1):223 (2000)). En ciertos aspectos específicos, los niveles de endotoxinas y pirógenos en la composición son inferiores a 10 EU/mg, o inferiores a 5 EU/mg, o inferiores a 1 EU/mg, o inferiores a 0,1 EU/mg, o inferiores a 0,01 EU/mg, o inferiores a 0,001 EU/mg.

Cuando se usan para administración *in vivo*, las formulaciones de la divulgación deberían ser estériles. Las formulaciones de la divulgación pueden esterilizarse mediante diversos métodos de esterilización, incluyendo filtración estéril, radiación, etc. En un aspecto, la formulación se esteriliza por filtración con un filtro preterilizado de 0,22 micrómetros. Las composiciones estériles para inyección pueden formularse según la práctica farmacéutica convencional como se describe en "Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 21a ed., Lippincott Williams & Wilkins, (2005).

Las composiciones terapéuticas de la presente divulgación pueden formularse para vías particulares de administración, como administración oral, nasal, pulmonar, tópica (incluyendo bucal y sublingual), rectal, vaginal y/o parenteral. Las expresiones "administración parenteral" y "administrado parenteralmente", como se usa en este documento, se refieren a modos de administración diferentes a la administración enteral y tópica, generalmente mediante inyección, e incluyen, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaco, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal. Las formulaciones de la presente divulgación que son adecuadas para administración tópica o transdérmica incluyen polvos, aerosoles, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e sustancias inhalantes. Los iMers pueden mezclarse en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable y con cualquier conservante, tampón o propulsor que pueda requerirse (Patente de EE.UU. N.º 7.378.110; 7.258.873; 7.135.180; Publicación de EE.UU. N.º 2004-0042972; y 2004-0042971).

Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse por cualquier método conocido en la técnica farmacéutica. Los niveles de dosificación reales de los principios activos en las

composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden variarse para obtener una cantidad del principio activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particulares, sin ser tóxico para el paciente (p.ej., "una cantidad terapéuticamente eficaz"). El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos incluyendo la actividad de las composiciones particulares empleadas, la ruta de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto particular que se emplea, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, condición, salud general e historial médico previo del paciente que se está tratando, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. Las dosis adecuadas pueden variar de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal o superior, por ejemplo, aproximadamente 0,1, 1, 10 o 50 mg/kg de peso corporal, siendo adecuado de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal.

Véase que la divulgación también contempla pueden prepararse formulaciones adecuadas para uso en diagnóstico e investigación. La concentración del agente activo en tales formulaciones, así como la presencia o ausencia de excipientes y/o pirógenos pueden seleccionarse en función de la aplicación particular y el uso previsto.

Ejemplos

Los ejemplos presentados a continuación ilustran ciertos aspectos y no limitan la tecnología.

Ejemplo 1: Materiales y métodos

Los materiales y métodos presentados en este ejemplo se usaron para realizar los experimentos descritos en ejemplos posteriores. Todos los reactivos fueron de Invitrogen, Carlsbad, CA, a menos que se indique lo contrario.

Construcción de vectores de expresión de mamífero pMBab-Pesada y pMBab-Ligera y clonación de genes de inmunoglobulina expresados como MBab IgG1

Los plásmidos pMBab-Pesada y pMBab-Ligera (kappa y lambda) se diseñaron para producción de anticuerpos IgG1 humanos biespecíficos monovalentes (MBab) en cultivos de células de mamífero. El vector pMBab-Pesada contenía dos casetes de cadena pesada (HC) gamma1 humana para soportar la heterodimerización de HC, la primera cadena pesada porta el conjunto de mutaciones "Ojal" en el dominio CH3 mientras que la última lleva la mutación complementaria "Botón" en CH3, aunque el orden de los casetes podría revertirse fácilmente. Para evitar el emparejamiento erróneo de las cadenas pesadas y ligeras, la cisteína nativa en el dominio CH1 de la cadena pesada "Botón" que forma el disulfuro de la interfaz con la cadena ligera se elimina y se inserta una interfaz de cisteína alternativa en otra parte del dominio CH1 o en cualquier otro lugar de la región VH para soportar la homodimerización de cadenas ligeras y pesadas afines (en este documento también denominadas "correspondientes"). Alternativamente, la cisteína nativa en el dominio CH1 de la cadena pesada "Ojal" que forma el disulfuro de la interfaz con la cadena ligera puede eliminarse y se insertó una interfaz de cisteína alternativa en otro lugar en el dominio CH1 o en otro lugar en el dominio VH para soportar la dimerización de las cadenas ligeras y pesadas afines. Opcionalmente, en lugar de una interfaz de cisteína alternativa, se introducen una o más sustituciones en cada CH1 que generan una cavidad y/o protuberancia para soportar la dimerización de cadenas ligeras y pesadas relacionadas, los dominios VH se introducen en los casetes de HC "Ojal" y "Botón" en el vector pMBab-Pesada como fragmentos de restricción BssHII/NheI y BsrGI/Sall, respectivamente. El vector pMBab-Ligera-kappa contiene dos casetes de cadena ligera (LC) kappa humana. Los dominios Vk se introducen en los casetes LC en el vector pMBab-Ligera-kappa como fragmentos de restricción BssHII/BsiWI y BsrGI/NotI, respectivamente. Un vector pMBab-Ligera-lambda se prepara usando métodos similares. Los dominios VL se introducen en los casetes LC en el vector pMBab-Ligera-Lambda como fragmentos de restricción BssHII/KasI y BsrGI/HindIII, respectivamente. De manera similar, podría construirse un vector pMBab-Ligera que tuviera un casete con un dominio kappa y un casete con un dominio lambda. Para eludir los desajustes de las cadenas pesadas y ligeras, la cisteína nativa en uno de los dominios CL (Ck o CA) que forman el disulfuro de la interfaz con la cadena pesada se elimina y, en su lugar, se inserta una interfaz de cisteína alternativa en otra parte del dominio CL (Ck o CA) o en otra parte de VL que se complementa con la cisteína alternativa en el dominio CH1 o el dominio VH para soportar la dimerización de cadenas ligeras y pesadas relacionadas. Opcionalmente, en lugar de una interfaz de cisteína alternativa en el dominio CL, se introducen una o más sustituciones en cada CL que generan una protuberancia y/o cavidad compensatoria que se complementan con la cavidad y/o protuberancias en los dominios CH1 para soportar la dimerización de las cadenas pesadas y ligeras. Usando estos vectores puede generarse un MBab que tiene dos cadenas pesadas y (i) dos cadenas kappa; (ii) dos cadenas lambda; o (iii) una cadena lambda y una cadena kappa, en donde se han introducido sustituciones en al menos una de las cadenas pesadas y una de las cadenas ligeras para evitar el emparejamiento erróneo y apoyar la dimerización de las cadenas ligeras y pesadas afines.

Los plásmidos pMBab-Pesada y pMBab-Ligera (kappa y lambda) se construyeron sobre la estructura principal de un vector interno de expresión de mamífero utilizado para producción de anticuerpos IgG1 humanos de mamífero. Para la construcción del vector pMBab-Pesada, un sitio PmlI se introdujo en la secuencia de la región bisagra mediante mutagénesis dirigida al sitio utilizando técnicas de PCR de extensión solapada para facilitar la clonación conveniente de dominios constantes modificados por ingeniería. La mutación "Botón", T366W, y una mutación estabilizadora, S354C, se introdujeron en el dominio CH3 mediante mutagénesis dirigida al sitio utilizando técnicas de PCR de extensión solapada.

El producto de PCR de CH2-CH3 "Botón" resultante se clonó de nuevo en el vector como un fragmento de restricción PmlI/EcoRI dando como resultado la eliminación de un sitio NotI interno en el vector. Para construir la variante V12, dos mutaciones, C220V y F126C, se introdujeron en el dominio CH1 de la cadena pesada "Botón" mediante mutagénesis dirigida al sitio utilizando técnicas de PCR de extensión de solapamiento, donde el primero mutaba la Cisteína nativa en CH1 formando el la interfaz de disulfuro con la cadena ligera y el segundo introdujo una interfaz de Cisteína alternativa en CH1 para apoyar la homodimerización de cadenas ligeras y pesadas afines. Para construir las variantes V10, V11 o VN, una mutación C220V se combina con una mutación A141C, o una mutación H168C, o una mutación L128C. Para construir la variante V1, las mutaciones V185W y K147A se combinan opcionalmente con una mutación C220V. Para construir la variante V3, las mutaciones L145F, F170V, S183F y V185F se combinan opcionalmente con el C220V. En los ejemplos detallados a continuación, la variante V1 o V3 se combinó con la mutación C220V mediante generación de fragmentos de genes sintéticos y se insertó en el casete de cadena pesada "Botón" en diferentes vectores y posteriormente se combinó con la variante alternativa (es decir, V1 en el casete de Botón se emparejó con V3 en el casete ojal) en el casete de cadena pesada "Ojal" (véase a continuación). Para facilitar la eliminación de homodímeros indeseables "Ojal-Ojal", se introducen mutaciones adicionales en el dominio CH3 "Botón" de las regiones Fc de IgG3 para introducir la unión a la proteína A. Por ejemplo, se sabe que las mutaciones R435H, F436Y introducen la unión de la proteína A en los anticuerpos IgG3 y pueden introducirse utilizando métodos similares a los detallados a continuación.

El conjunto de mutaciones "Ojal", T366S, L368A, Y407V, y una mutación estabilizadora, Y349C, se introdujeron en el dominio CH3 de un segundo vector mediante mutagénesis dirigida al sitio usando técnicas de PCR de extensión solapada. El producto resultante de PCR de VH-CH1-CH2-CH3 "Ojal" se digirió con BssHII/XbaI y se volvió a insertar en el vector que portaba la cadena pesada "Botón" después de la linealización del vector con BssHII/NheI. En consecuencia, el fragmento de cadena pesada "Ojal" había reemplazado el segmento de cadena ligera en el vector e introdujo además una mutación silenciosa que eliminó un sitio interno de NheI e insertó un nuevo sitio HindIII. Para la clonación conveniente de dominios VH en el segmento de la cadena pesada "Ojal", el sitio Sall interno en el dominio 5' de CH1 fue mutado a NheI por mutagénesis dirigida al sitio usando técnicas de PCR de extensión solapada. Después de validar la secuencia, el plásmido resultante se denominó pMBab-Pesada. Para construir la variante V1, las mutaciones V185W y K147A se combinan opcionalmente con una mutación C220V. Para construir la variante V3, las mutaciones L145F, F170V, S183F y V185F se combinan opcionalmente con el C220V. En los ejemplos detallados a continuación, las variantes V1 y V3 se generaron como fragmentos de genes sintéticos sin la mutación C220V y se insertaron en el casete de cadena pesada "Ojal" de los vectores pMBab-Pesada que comprenden la variante alternativa en el casete "Botón", respectivamente. Para facilitar la eliminación de homodímeros indeseables "Ojal-Ojal", se introducen mutaciones adicionales en el dominio CH3 "Ojal" de las regiones Fc de IgG1, IgG2 o IgG4 para reducir o eliminar la unión a la proteína A. Por ejemplo, las mutaciones H435R, Y436F que se sabe que eliminan la unión a la proteína A se introdujeron como se describe a continuación.

Para la construcción del vector pMBab-Ligera que comprende la variante V12, se introdujeron dos mutaciones, C214V y S121C, en el casete de la cadena ligera en el vector mediante mutagénesis dirigida al sitio usando técnicas de PCR de extensión solapada. El primero mutaba la Cisteína nativa en el dominio Ck formando la interfaz de disulfuro con la cadena pesada y el último introdujo una interfaz alternativa de Cisteína en Ck para complementar con la Cisteína alternativa en el dominio CH1 para apoyar la homodimerización de las cadenas ligeras y pesadas relacionadas. El producto resultante de PCR V-Ck se introdujo de nuevo en el vector como fragmento de restricción BsrGI/EcoRI, reemplazando el casete de cadena pesada existente. Esto además dio como resultado la eliminación de un sitio interno de NotI en el vector. Para la clonación conveniente de los dominios Vk en la cadena ligera mutada de cisteína, el sitio Sall interno el 5' del dominio Ck fue mutado a NheI por mutagénesis dirigida al sitio usando técnicas de PCR de extensión solapada. Después de validar la secuencia, el vector resultante se denominó pMBab-cadena kappa Ligera. Un vector similar hecho usando la región VL comprende un sitio HindIII diseñado que reemplaza el sitio NotI en el segundo cassette de cadena ligera y un sitio KspI que reemplaza el BsiWI en el primer cassette de cadena ligera. El vector resultante se denominó pMBab-cadena lambda Ligera. Para construir las variantes V10, V11 o VN, una mutación C214V se combina con una mutación F116C (κ)/mutación T116C (A), o una mutación T164C (κ o A), o una mutación F118C (κ o λ),

Para construir la variante V1, una mutación S131W (κ)/T131W (κ) y una mutación L135G (κ o λ) se combinan opcionalmente con una mutación C220V. Para construir la variante V3, una mutación S176F (κ o λ) y una mutación T178A (κ)/Y178A (λ) se combinan opcionalmente con el C220V. En los ejemplos detallados a continuación, la variante V1 o V3 se combinó con la mutación C214V mediante la generación de fragmentos de genes sintéticos y se insertó en el vector pMBab-Ligera. La mutación C214V se incluyó solo en el VL emparejado con el CH1 de respuesta simultánea que tenía la mutación C220V.

Expresión, purificación por afinidad y cuantificación de proteínas

Todas las construcciones indicadas a continuación se expresaron transitoriamente en células HEK293F en suspensión usando 293fectin™ (Invitrogen) como reactivo de transfección y se cultivaron en medio Freestyle™ sin suero de Invitrogen. Las siguientes combinaciones de vectores se usaron para la expresión de los anticuerpos utilizados en estos estudios:

1. pMBab-Pesada anti-IL6 WT + anti-RAGE WT + pMBab-Ligera anti-IL6 WT + anti-RAGE WT;
2. pMBab-Pesada anti-IL6 WT + anti-RAGE (-Cys) + pMBab-Ligera anti-IL6 WT + anti-RAGE (-Cys);
3. pMBab-Pesada anti-IL6 WT + anti-RAGE V10 + pMBab-Ligera anti-IL6 WT + anti-RAGE V10;
4. pMBab-Pesada anti-IL6 WT + anti-RAGE V11 + pMBab-Ligera anti-IL6 WT + anti-RAGE V11; 5. pMBab-Pesada anti-IL6 WT + anti-RAGE V12 + pMBab-Ligera anti-IL6 WT + anti-RAGE V12;

5. pMBab-Pesada anti-EGFR WT + anti-HER2 V12 + pMBab-Ligera anti-EGFR WT + anti-HER2 V12;
6. pMBab-Pesada anti-IL6 V1 + anti-RAGE V3 (-Cys) + pMab-Ligera anti-IL6 V1 + anti-RAGE V3 (-Cys);
7. pMBab-Pesada anti-IL6 V3 + anti-RAGE V1 (-Cys) + pMab-Ligera anti-IL6 V3 + anti-RAGE V1 (-Cys);
8. pMBab-Pesada anti-IL6 V1 + anti-RAGE V3 + pMab-Ligera anti-IL6 V1 + anti-RAGE V3; y
9. pMBab-Pesada anti-IL6 V3 + anti-RAGE V1 + pMab-Ligera anti-IL6 V3 + anti-RAGE V1.

El medio de cultivo se recogió 10 días después de la transfección, y todos los formatos de anticuerpo se purificaron mediante cromatografía de afinidad de proteína A estándar según el protocolo del fabricante (GE Healthcare, Piscataway, NJ) y posteriormente se intercambiaron tampón en PBS (pH 7,4). La pureza de las construcciones se analizó usando SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras y usando cromatografía analítica de exclusión por tamaño (véase el método a continuación). Las concentraciones de los anticuerpos purificados se determinaron leyendo la absorbancia a 280 nm usando coeficientes de extinción teóricamente determinados.

Ingeniería, producción y análisis de una construcción pMBab-Pesada que porta mutaciones "RF" en la cadena pesada "Ojal".

Para la ablación de la unión a la proteína A de la cadena pesada "Ojal", los restos de hIgG1 H435 e Y436 en el dominio CH3 se mutaron a los correspondientes R435 y F436 respectivamente (H435R/Y436F), como se encuentra en la IgG3 humana mediante mutagénesis dirigida al sitio usando técnicas de PCR de superposición-extensión. Las mutaciones H435R e Y436F de cadena pesada "IgG1" humanas resultantes que se referían a la mutación "RF" carecen de la capacidad de unirse a la proteína A. Las construcciones de pMBab que llevan la mutación RF se expresaron transitoriamente en células HEK293F en suspensión usando 293fectin™ (Invitrogen) como un reactivo de transfección y cultivado en medio Freestyle™ sin suero de Invitrogen. Los sobrenadantes de cultivo se purificaron mediante cromatografía de afinidad de proteína A estándar según el protocolo del fabricante (GE Healthcare, Piscataway, NJ) y posteriormente se intercambiaron con tampón en PBS (pH 7,4). Las muestras de proteína se analizaron y caracterizaron por SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras, por cromatografía de exclusión por tamaño analítico (SEC) y por cromatografía líquida de fase inversa de alta presión (RP-HPLC) en condiciones reductoras y no reductoras. Los subproductos mal emparejados de la cadena ligera (es decir, heterodímeros de cadena pesada que comprenden cadenas ligeras mal emparejadas) se eliminaron por cromatografía de afinidad CaptureSelect LC-Kappa o LC-Lambda según el protocolo del fabricante (GE Healthcare, Piscataway, NJ) y posteriormente se intercambiaron con tampón en PBS (pH 7,4). Las concentraciones de los anticuerpos purificados se determinaron leyendo la absorbancia a 280 nm usando los coeficientes de extinción determinados.

SEC-HPLC y análisis de detección de dispersión de luz

La SEC-HPLC preparativa se realizó utilizando una columna Superdex 200 (GE Healthcare), a un caudal de 1 ml/min. SEC-HPLC analítico (sistema LC capilar Agilent 1100) acoplado en línea con un detector de dispersión de luz se usó para determinar las masas moleculares absolutas de los anticuerpos parentales y el anticuerpo biespecífico monovalente (MBab).

Unión mediante ELISA

Las placas para ELISA se revistieron con antígenos diluidos en PBS (pH 7,4) a 4 °C durante 20 horas y se bloquearon con leche descremada al 2 % (v/v) + TWEEN 20 al 0,05 % (v/v) en PBS durante dos horas a temperatura ambiente. Todas las etapas posteriores se realizaron a temperatura ambiente. Los anticuerpos se aplicaron a las placas a diversas concentraciones y se incubaron durante 1 hora. Como anticuerpo secundario se usó anticuerpo de cabra anti-humano conjugado con HRP. Las placas para ELISA se desarrollaron usando el sustrato cromogénico HRP TMB y el desarrollo del color se terminó con H₂SO₄ 1 M y la señal obtenida se leyó a A450 nm.

Unión mediante AlphaLISA

Todos los reactivos AlphaLISA fueron de PerkinElmer. Las etapas de incubación con perlas AlphaLISA se realizaron en condiciones de iluminación tenue a temperatura ambiente. Los ensayos se realizaron en OPTIPLATES blancas de media área de 96 pocillos. Los anticuerpos a diversas concentraciones se incubaron con perlas aceptoras AlphaLISA anti-FLAG a 40 microgramos/ml y 10 nM de antígenos IL6 y RAGE-FLAG biotinilados en tampón de inmunoensayo AlphaLISA 1X durante 1 hora a temperatura ambiente. Se añadieron perlas donantes AlphaLISA (SA) a 400 microgramos/ml durante 30 minutos y posteriormente las placas de ensayo se leyeron en un lector de placas ENVISION.

Cinética y unión simultánea

La cinética de unión se midió por interferometría de biocapa en un instrumento Octet384 (ForteBio) usando dos formatos de captura diferentes.

Formato I: Los biosensores de captura anti-hIgG-Fc (AHC) se cargaron con anticuerpos en PBS pH 7,4, 1 mg/ml de BSA, TWEEN al 0,05 % (v/v) (tampón cinético). Los biosensores cargados se lavaron en el mismo tampón antes de realizar mediciones de asociación y disociación con diversos antígenos durante los tiempos indicados. Los parámetros cinéticos

(kasoc y kdisoc) y las afinidades (KD) se calcularon a partir de un ajuste no lineal de los datos utilizando el software OCTET v.6.1.

Formato II: Los biosensores de alta capacidad de unión a estreptavidina (calidad cinética) se cargaron con antígenos biotinilados en PBS pH 7,4, 1 mg/ml de BSA, Tween al 0,05 % (v/v) (tampón cinético). Los biosensores cargados se lavaron en el mismo tampón antes de realizar mediciones de asociación y disociación con anticuerpos y antígenos durante los tiempos indicados. El análisis de datos se realizó utilizando el software Octet v.6.1.

Análisis diferencial de calorimetría de barrido

Los experimentos de DSC se realizaron utilizando un microcalorímetro de barrido MICROCAL VP-DSC (Microcal, Northampton, MA). Todas las soluciones y muestras utilizadas para DSC se filtraron utilizando un filtro de 0,22 micrómetros y se desgasificaron antes de cargarlas en el calorímetro. Los anticuerpos utilizados para los estudios de DSC fueron superiores al 95 % de monómeros, según se juzga por cromatografía analítica de filtración en gel. Antes del análisis DSC, todas las muestras se dializaron exhaustivamente (al menos tres intercambios de tampones) en histidina-HCl 25 mM (pH 6). El tampón de esta diálisis se usó después como tampón de referencia para experimentos DSC posteriores. Antes de medir la muestra, se obtuvieron mediciones de referencia (tampón frente a tampón) para la resta de la medición de la muestra. Se añadieron muestras dializadas (a una concentración de 1 mg/ml) al pocillo de muestra y se realizaron mediciones de DSC a una velocidad de exploración de 1 °C/min. El análisis y la desconvolución de los datos se realizaron utilizando el software Origin™ DSC proporcionado por Microcal. El análisis de desconvolución se realizó utilizando un modelo que no es de dos estados y los mejores ajustes se obtuvieron utilizando 100 ciclos de iteración. La interpretación de los resultados de la deconvolución DSC se basó en el hecho de que los diferentes dominios en los formatos de anticuerpos oligospecíficos se desarrollan independientemente con transiciones cooperativas.

Mapeo Peptídico

Los grupos tiol libres en la muestra se protegieron inicialmente usando N-etilmaleimida 1 mM. La muestra se desnaturizó después en una solución de hidrogenofosfato disódico 5 mM, cloruro sódico 100 mM y guanidina 6 M, pH 7,0 a 37 °C durante 30 minutos. La solución desnaturizada se diluyó después 2,5 veces con tampón fosfato 100 mM que contenía EDTA 0,06 mM a pH 7,0. Se añadió endoproteinasa Lys-C a una relación enzima:proteína de 1:10 y la mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 16 horas. Se añadió LysC adicional a una relación enzima:proteína de 1:10 y se incubó adicionalmente durante 4 horas a 37 °C. Después de digestión con Lys-C, la mitad de cada mezcla de reacción se redujo añadiendo DTT a una concentración final de 30 mM e incubando a 37 °C durante 15 minutos. La otra mitad de la mezcla de reacción se preparó sin reducción. Los péptidos digeridos se separaron mediante análisis cromatográfico de fase inversa UPLC (columna Waters ACCLCITY UPLC BEH RP C18; 1,7 micrómetros 100 × 2,1 mm) y se analizaron mediante un detector UV y un espectrómetro de masas LTQ ORBITRAP en línea (ThermoElectron). La fase móvil RP-UPLC A era TFA al 0,02 % en agua y la fase móvil B es TFA al 0,02 % en acetonitrilo; las muestras se eluyeron usando un gradiente de tampón creciente B. Los péptidos se identificaron y analizaron comparando los resultados de los mapas peptídicos no reducidos (que contienen péptidos unidos con disulfuro) y reducidos (que contienen péptidos en forma reducida). La secuencia de cada péptido se identificó usando MS (masas) y se confirmó usando datos de MS/MS (secuenciación masiva de péptidos), basándose en la secuencia conocida de la proteína. Los péptidos unidos por disulfuro se confirmaron mediante datos de MS y también como péptidos que estaban presentes solo en la muestra no reducida.

Análisis Q-TOF LC-MS digerido con papaína

Para la digestión con papaína, los anticuerpos a 1 mg/ml se trataron con 0,4 microgramos de solución de trabajo de papaína y se incubaron en un baño de agua a 37 ± 1°C durante 4 horas. Q-TOF MS se realizó con uno de los espectrómetros de masas tipo Q-TOF (tiempo de vuelo de aceleración cuadrupolo y ortogonal) junto con un sistema Waters ACQUITY UPLC™. La separación por cromatografía de fase inversa se realizó en una columna BEH C4 de 1,7 micrómetros de 2,1 x 50 mm utilizando la fase móvil A de FA al 0,1 %, TFA al 0,01 % en agua y la fase móvil de B de FA al 0,1 %, TFA al 0,01 % en acetonitrilo. Las muestras se eluyeron usando un gradiente lineal de 25 minutos de fase móvil creciente B. Se identificaron fragmentos de Fab y Fc mAb usando datos de MS (masa), basados en las secuencias conocidas de las proteínas.

Unión celular

La unión celular por el anticuerpo IgG1 biespecífico monovalente (MBab) y los mAb parentales se probaron por citometría de flujo. Las líneas celulares utilizadas fueron la línea celular A431 de carcinoma epidermoide humano, la línea celular SKBR3 de carcinoma de mama humano, la línea celular BxPC-3 de carcinoma de páncreas humano y la línea celular SK-OV-3 de carcinoma de ovario humano. En cada experimento se utilizaron aproximadamente 5×10⁵ células. Después de la tripsinización, las células se lavaron dos veces con tampón FACS (BSA al 1 % en D-PBS (Ca⁺⁺, mg⁺⁺ libre)). Se añadieron anticuerpos a 10 microgramos/ml a los tubos celulares durante 1 hora a 4 °C. Después de lavar dos veces con tampón FACS, se añadió anticuerpo de cada anti-humano marcado con FITC durante 45 minutos a 4 °C. La detección de anticuerpos unidos se realizó mediante citometría de flujo en un SLR II (Becton Dickinson, CA) y los resultados se analizaron con el programa FLOWJO.

Ensayos de viabilidad celular

Las actividades de destrucción celular se midieron mediante el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® (Promega). Las líneas celulares utilizadas fueron la línea celular A431 de carcinoma epidermoide humano, la línea celular SKBR3 de carcinoma de mama humano, la línea celular BxPC-3 de carcinoma de páncreas humano y la línea celular SK-OV-3 de carcinoma de ovario humano. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 5×10^3 células/pocillo en DMEM suplementado con FCS al 10 %. Se añadieron anticuerpos a diversas concentraciones para cuadruplicar las muestras, y las células se incubaron durante 96 horas a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 %. Después del tratamiento, las células se expusieron al reactivo CellTiter-Glo® durante 20 minutos y la luminiscencia se midió utilizando un lector de placas ENVISION.

Cinética de unión a receptores Fc

La afinidad de unión de los anticuerpos MBab y los isotipos IgG1 humanos a una variedad de receptores Fc humanos estaba en ProteOn utilizando un ensayo de unión en equilibrio de estado estacionario. Los anticuerpos a 50 ug/ml se inmovilizaron en una superficie de chip GLC en tampón de acetato de ProteOn a pH 5,0. Los analitos se pasaron sobre la superficie inmovilizada a 5 concentraciones en diluciones en serie 1:3 usando el mismo tampón. Los estudios de unión se realizaron a temperatura ambiente y se determinaron las tasas de unión de equilibrio de cada analito y se usaron para calcular las constantes de disociación en equilibrio (KD).

Estudios de ADCC

ADCC se midieron mediante el ensayo de citotoxicidad no radioactiva CYTOTOX 96 (Promega). En este ensayo se usó la línea celular A431 de carcinoma epidermoide humano. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 4×10^4 células/pocillo en RPMI 1640 sin rojo fenol suplementado con FCS al 3 %. La línea de linfocitos NK humanos de un linfoma no Hodgkin maligno transgénico para CD16 humano (FcγRIIIA) y FcεR1y se mezclaron con células diana en una proporción de 1:1. Se añadieron anticuerpos a diversas concentraciones para cuadruplicar las muestras, y las células se incubaron durante 5 horas a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 %. Después del tratamiento, las células se expusieron al reactivo CYTOTOX 96 durante 15 minutos y la DO se midió a 409 nm usando un lector de placas SPECTRAMAX 340PC.

Estudios vinculantes preferentes

Para estudios de unión preferentes, se generó un MBab compuesto por un antígeno de superficie anti-celular C (anti-C) y un antígeno de superficie anti-celular D (anti-D) (C/D-MBab). La unión preferente del MBab a las células que expresan ambos antígenos diana (C y D) se midió usando un sistema de cultivo de población combinado que mezcló el antígeno C que expresa las células solamente (células C), las células que expresan el antígeno D (células D) y las células que expresan tanto C como D (células C/D) en un solo pocillo para tinción de anticuerpos. Brevemente, las células C y C/D se tiñeron cada una con un colorante trazador de identificación único antes de su combinación en cultivo: Células C con eFluor® 670 (eBioscience, n.º Cat65-0840-90) células C/D con Violeta CellTrace™ (Invitrogen, n.º Cat C34557), mientras que las células D se dejaron sin teñir. De esta manera, cada población podría distinguirse durante el análisis de citometría de flujo después de la tinción de anticuerpos. Las células se combinaron en una relación 1:1:1 y se incubaron con diluciones en serie de C/D-MBab y las dos IgG parentales bivalentes (anti-C y anti-D). Las incubaciones de anticuerpos primarios se realizaron a 4 °C durante 1 hora, se eliminó el exceso de anticuerpos y se detectó el anticuerpo unido a las células usando una IgG anti-humana marcada con PE. El análisis se realizó en un BD LSR II, con dobletes excluidos en función de las propiedades físicas (altura, anchura y densidad).

La unión simultánea de cada brazo de C/D-MBab a su antígeno diana en la misma célula se determinó usando proteína diana recombinante marcada con Alexa Fluor® 647 (Invitrogen, A30009) y análisis de citometría de flujo. Las células C/D (que expresan ambos antígenos diana) se incubaron con dilataciones seriales de C/D-MBab (de 5-01 nM) durante 1 hora, después de lo cual el C/D-MBab no unido se eliminó mediante 2 lavados con tampón FACS (PBS + suero de ternera fetal al 1 %). El C/D-MBab unido a la célula se detectó usando IgG anti-humana marcada con PE y el brazo C/D-MBab no unido se pudo detectar usando la proteína diana recombinante (C o D) marcada con el kit de etiquetado de proteínas fluorescentes Alexa Fluor® 647 de microescala (Invitrogen, A30009) colorante. Para garantizar que se esté midiendo la unión simultánea en una célula, los dobletes (dos o más células que pasan a través del citómetro de flujo juntas) se excluyen rigurosamente en función de las propiedades físicas de altura, anchura y densidad de cada célula incluida en el análisis.

Ejemplo 2: Diseño de anticuerpo biespecífico monovalente (MBab)

En la Figura 1B se presenta una representación esquemática de un formato IgG biespecífico monovalente (MBab). El MBab es un anticuerpo biespecífico con un sitio de unión monovalente para cada antígeno en un formato IgG. Para la heterodimerización de dos cadenas pesadas distintas, la plataforma aprovechó el concepto clásico de "botón en ojal" en el dominio CH3 como se describe en Ridgway et al. (1996) Protein Eng. 9(7):617-21, y también la incorporación de un disulfuro intercadenal en el dominio CH3 que mejoró aún más la estabilidad y la heterodimerización de las dos cadenas pesadas, como se describe en Merchant et.al. (1998) Nat. Biotech 16:677-681. Además o alternativamente, el dominio

CH3 se modifica por ingeniería para comprender los restos de aminoácido H435 e Y436 en una cadena pesada y los restos de aminoácido R435 y F436 en la otra cadena pesada para eliminar la unión de la proteína A en una cadena. Como se describió anteriormente, cuando se usa la plataforma de "botón en ojal", la cadena pesada que comprende el "ojal" puede comprender los restos ácidos R435 y F436 (indicados por una estrella en Figura 1B). La ubicación del dominio CH3 se indica mediante la flecha en la estructura presentada en el panel izquierdo de la Figura 2. Para el emparejamiento correcto de las cadenas pesadas y ligeras relacionadas en los anticuerpos biespecíficos monovalentes, se eliminaron las Cisteínas nativas entre cadenas que forman el enlace disulfuro entre la cadena pesada y ligera de uno de los dos anticuerpos en la construcción MBab y en su lugar se insertó un disulfuro intercadena alternativo en otro lugar en la interfaz CL-CH1 para soportar la homodimerización de cadenas pesadas y ligeras relacionadas.

Ejemplo 3: Diseño de variantes con cisteínas alternativas en la interfaz LC-HC

Pueden implementarse varios métodos para generar interfaces LC-HC alternativas para forzar el emparejamiento correcto de solo cadenas pesadas y ligeras relacionadas, incluido el reestructurado de los disulfuros intercadenas en uno de los dos anticuerpos en la construcción MBab. Inicialmente, las Cisteínas nativas entre cadenas que forman el enlace disulfuro entre la cadena pesada y la cadena ligera fueron reemplazadas por un resto de aminoácido que no es Cisteína, p.ej., Valina. A continuación, se utilizaron tres criterios para identificar pares de aminoácidos en la interfaz LC-HC adecuada para la sustitución de cisteína. Primero, la distancia entre los carbonos alfa correspondientes debe ser similar a la que se encuentra en los enlaces disulfuro naturales (6,0 - 7,0 Å). Segundo, los carbonos beta deben apuntar uno hacia el otro con una distancia de (4,0 - 5,0 Å). Tercero, los pares de restos deben pertenecer a diferentes cadenas. En la Tabla 7 se proporcionan siete pares de restos en la interfaz LC-HC que satisfacen estos criterios.

Tabla 7: Pares de interfaz LC-HC*	
HC: F126	LC (κ): S121 o LC (λ): S121
HC: L128	LC (κ): F118 o LC (λ): F118
HC: A141	LC (κ): F116 o LC (λ): T116
HC: H168	LC (κ): T164 o LC (λ): T164
HC: F170	LC (κ): S176 o LC (λ): S176
HC: P171	LC (κ): S162 o LC (λ): T162
HC: V173	LC (κ): Q160 o LC (λ): V160
* La numeración en la Tabla 6 se realiza según el índice de UE como se establece en Kabat et al. (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). En las posiciones indicadas para la cadena lambda (λ) y kappa (κ) se proporcionan los restos correspondientes. Se entenderá que, debido al alotipo y a las variaciones alélicas presentes en la población, el resto de aminoácido de tipo silvestre en estas posiciones puede variar del listado anterior. Independientemente del Resto de aminoácido de tipo silvestre, cada posición de un par dado se sustituirá por una Cisteína. En este documento se proporcionan una serie de alotipos y variaciones alélicas.	

Se probaron tres variantes; HC: A141/LC: F116, HC: H168/LC: T164 y HC: F126/LC: S121 correspondiendo a las variantes 10, 11 y 12 (V10, V11 y V12), respectivamente. La ubicación de estas posiciones se indica mediante flechas en la estructura presentada en el panel derecho de la Figura 2.

En otro enfoque, un disulfuro intercadenas alternativo puede modificarse por ingeniería en la región variable del anticuerpo entre las regiones VH y VL. En particular, dicho disulfuro puede introducirse en las regiones marco de manera que las regiones VL y VH se unan mediante el disulfuro alternativo. En este enfoque, las Cisteínas entre cadenas nativas que forman el enlace disulfuro entre la cadena pesada y la cadena ligera se reemplazan por un resto de aminoácido que no es cisteína (por ejemplo, Valina, Alanina, Glicina, etc.) y ciertos aminoácidos que no son Cisteína en el VH y Las regiones VL, generalmente en las regiones Marco, se reemplazan por Cisteína. Las posiciones se seleccionan de manera que los restos de cisteína puedan formar un enlace disulfuro. La posición de los restos en las regiones VH y VL que satisfacen estos criterios se proporciona en la Tabla 8.

Tabla 8: Pares VH-VL‡
VH44 + VL100
VH44 + VL105
VH45 + VL87
VH55 + VL101

Tabla 8: Pares VH-VL‡
VH100 + VL50
VH98 + VL46
VH101 + VL46
VH105 + VL43
VH106 + VL57
‡ La numeración en la Tabla 7 se realiza según el índice de Kabat como se establece en Kabat et al. (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Se entenderá que el resto de aminoácido de tipo silvestre en estas posiciones variará. Independientemente del resto de aminoácido de tipo silvestre, cada posición de un par dado se sustituirá con una Cisteína. La Tabla 1 proporciona la numeración de varias regiones variables representativas según el índice de Kabat.

Todavía en otro enfoque, la región CH1 puede diseñarse para generar una protuberancia y/o una cavidad, mientras que la cadena ligera relacionada está diseñada para generar una cavidad y/o protuberancia compensatoria. Para reforzar aún más el emparejamiento correcto de solo cadenas pesadas y ligeras congnadas, la región CH1 y CL puede modificarse aún más para eliminar las cisteínas nativas entre cadenas que forman el enlace disulfuro entre la cadena pesada y ligera.

Pueden generarse anticuerpos biespecíficos en donde la interfaz LC-HC de un solo brazo se modifica como se describe anteriormente, o alternativamente, se pueden modificar ambos brazos. Basándose en la enseñanza de este documento se entenderá que la interfaz LC-HC de cada brazo se modificará de manera diferente para forzar el emparejamiento correcto de las cadenas pesadas y ligeras relacionadas mientras se minimiza el emparejamiento erróneo. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, un brazo puede modificarse para reubicar el enlace disulfuro nativo en una posición diferente dentro de las regiones LC y CH1, y el otro brazo puede modificarse por ingeniería para reubicar el enlace disulfuro nativo en la región VL-VH o ambos brazos pueden modificarse para reubicar los enlaces disulfuro nativos en una posición diferente dentro de la interfaz LC y CH1, o ambos brazos pueden modificarse para incorporar una cavidad y/o protuberancia en diferentes posiciones dentro de la interfaz LC y CH1.

Ejemplo 4: Desarrollo del sistema de vectores pMBab para producción de anticuerpos biespecíficos monovalentes en células de mamífero

Los plásmidos pMBab-Pesada y pMBab-Ligera se diseñaron para la producción de anticuerpos IgG1 humanos biespecíficos monovalentes en cultivos de células de mamífero. El vector pMBab-Pesada (Figura 3C) contenía dos casetes de cadena pesada gamma1 humana para soportar la heterodimerización de HC, la primera cadena pesada portaba el conjunto de mutaciones "Ojal" en el dominio CH3 mientras que la última portaba la mutación complementaria "Botón" en el CH3 dominio y la alternativa Cisteína en el dominio CH1. Los dominios VH se introdujeron en los casetes HC "Ojal" y "Botón" en el vector pMBab-Pesada como fragmentos de restricción BssHII/NheI y BsrGI/Sall, respectivamente. El vector pMBab-ligera kappa (Figura 3A) contenía dos casetes de cadena ligera (LC) kappa humana, este último portaba la interfaz de Cisteína alternativa en el dominio Ck que se complementaba con la Cisteína alternativa en el dominio CH1. Los dominios Vk se introdujeron en los casetes LC en el vector pMBab-Ligera como fragmentos de restricción BssHII/BsiWI y BsrGI/NotI, respectivamente. El promotor temprano del citomegalovirus humano fuerte puede conducir los genes de cadena ligera y pesada en ambos vectores pMBab. La colocación de las dos cadenas pesadas y las dos cadenas ligeras en vectores separados eliminó el riesgo de producir cualquiera de los anticuerpos parentales debido a la monotransfección. Además, la región variable de la cadena pesada de un anticuerpo que tiene niveles de expresión más altos puede clonarse en el casete de región constante que comprende el "botón" para minimizar la producción de la mitad de los anticuerpos. Además, los dominios CH3 de las cadenas pesadas pueden modificarse por ingeniería como se describe en este documento para que solo una cadena se una a la proteína A.

Ejemplo 5: Expresión Purificación y análisis de variantes

Las variantes se expresaron transitoriamente en células HEK293F y los sobrenadantes de cultivo antes y después de la cromatografía de afinidad con proteína A se analizaron en SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras. Como se muestra en Figura 4, la eliminación de las Cisteínas nativas entre cadenas que forman el enlace disulfuro entre la parte pesada y ligera de la porción anti-RAGE de la molécula conduce a la separación de la cadena ligera en una SDS-PAGE en condiciones no reductoras y da como resultado un Perfil de migración de 125 kDa y 25 kDa que corresponden a 2H1L y una cadena ligera separada. Se observó un perfil de migración similar para los anticuerpos que comprenden las variantes V1 y V3 con un brazo que carece de la cisteína intercadena nativa (datos no mostrados). La presencia de la cadena ligera libre en las fracciones purificadas de proteína A indica que los anticuerpos se ensamblan adecuadamente en solución y se pueden purificar como anticuerpos intactos que tienen 2 cadenas ligeras y dos cadenas pesadas. Las variantes que carecen de las cisteínas nativas entre cadenas, pero que llevan un enlace disulfuro intercadena alternativo, se probaron para determinar su capacidad de reconstituir el perfil de migración de 150 kDa que indica la formación del enlace disulfuro intercadena alternativo y el correcto montaje de los dos pares de cadenas pesadas y ligeras. Aunque las

variantes 10 y 11 (V10 y V11) demostraron cierta reconstitución del perfil de migración de 150 kDa y reducción en la cantidad de cadena ligera libre, la variante 12 (V12) demostró la reconstitución completa del marcador molecular de 150 kDa con un perfil de migración idéntico global como la molécula WT IgG con disulfuros intercadena nativos en Fab y botón en ojal en CH3 (botón en ojal de IgG) (Figura 4). El análisis del estado oligomérico de la fracción purificada de proteína A de la variante 12 (V12) en una HPLC analítica de exclusión por tamaño (SEC-HPLC y dispersión de luz de múltiples ángulos SEC (SEC-MALS)) indicó que el MBab monomérico representaba aproximadamente el 85 % con aproximadamente 10 % de media IgG no emparejado y aproximadamente 5 % de agregados (Figura 6B). Después de la SEC preparativa, la variante 12 (V12) se purificó hasta casi una homogeneidad de más del 99% de monómero y un perfil de SEC similar en general como los mAb anti-RAGE y anti-IL6 parentales.

Se resolvió la estructura cristalina de un Fab portador de V12. La densidad electrónica confirmó la formación de un nuevo enlace disulfuro entre la cadena pesada y ligera en la ubicación de los residuos de cisteína recién introducidos (datos no mostrados).

La expresión desigual de las 4 cadenas que comprenden la molécula MBab puede conducir a la formación de 3 tipos de subproductos; Homodímeros Ojal-Ojal, Ojal-media-IgG y subproducto LC mal emparejado debido al exceso de una de las cadenas ligeras. La formación de subproductos de homodiméricos de "Ojal-Ojal" se informó previamente (Ridgway, et al. 1996, Prot Eng 9:617-21; Merchant et al. (1998) Nat Biotech 16:677-681). Se demostró que la sustitución de His 435 en el dominio CH3 de IgG1 por la Arg 435 correspondiente de IgG3 elimina las capacidades de unión a la proteína A (Jendeberg et al., 1997, J Immunol Methods 201:25-34). La sustitución adicional de Tyr436Phe se realizó para reducir la inmunogenicidad al mantener toda la secuencia de anticuerpos humanos (Jendeberg, et al. *ibid*). Para la eliminación eficaz de los subproductos relacionados con "Ojal", los restos H435 e Y436 en el dominio CH3 de la cadena pesada "Ojal" se mutaron a los correspondientes R435 y F436 respectivamente, como en IgG3. La cadena pesada de hlgG1 "Ojal" resultante que portaba las mutaciones H435R e Y436F se denominó "Ojal-RF". Una construcción MBab compuesta de un anti-antígeno A (cadena pesada de Ojal; cadena ligera lambda) y anti-antígeno B (cadena pesada de Botón; cadena ligera kappa) que portaba la mutación de RF en la cadena pesada de "Ojal" (denominada "MBab-RF") se expresaba transitoriamente en células HEK293F. Los rendimientos de expresión del MBab-RF (190 mg/l) se correlacionaron con el perfil de expresión de los dos anticuerpos parentales (200 a 348 mg/l). El análisis SDS-PAGE de las fracciones purificadas de proteína A en condiciones no reductoras y reductoras no muestra un exceso de cadena pesada "Ojal", sino una distribución equitativa de las cadenas pesadas "Ojal" y "Botón" (Figura 7A, panel izquierdo, carriles 1 y 2, respectivamente). El perfil SEC de la proteína A MBab-RF purificada indicó ~97,5 % de monómero y -2,5 % de agregados sin subproducto de la mitad de IgG no emparejado (Figura 7A, panel derecho). El perfil de migración de las proteínas IgG y MBab-RF parentales purificadas en condiciones no reductoras por RP-HPLC indicó que el MBab-RF con un centro de elución de ~ 16,2 min migró entre el parental B (14,7 min) y el parental A (17,4 min) (Figura 7B). Estos datos confirman nuevamente que el MBab-RF se compone de cantidades iguales de cadenas pesadas "Ojal" y "Botón" sin exceso de la cadena pesada "Ojal". El análisis del estado oligomérico de la fracción purificada de proteína A del MBab-RF por RP-HPLC en condiciones reductoras indicó un exceso de la cadena ligera del antígeno B sobre la cadena ligera del antígeno A en una proporción de 1,0 a 0,6 conduciendo a -25 % de subproducto emparejado erróneamente de cadena ligera kappa de antígeno B (Figura 7C).

Para la eliminación eficaz de los subproductos de la cadena ligera emparejados erróneamente, se implementa la cromatografía de afinidad selectiva de la cadena ligera, como se describe en este documento usando medios de afinidad selectivos para que el lambda capture el MBab deseado y permitiendo que se eliminen los anticuerpos emparejados erróneamente que comprenden dos cadenas kappa. Como se ilustra en Figura 8, la posterior separación de la fracción purificada de proteína A del MBab-RF en la columna de afinidad LambdaFabSelect dio como resultado la eliminación del subproducto emparejado erróneamente de la cadena ligera del antígeno B, produciendo un producto MBab-RF puro y correctamente ensamblado. El análisis de SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras muestra cantidades iguales de las dos cadenas ligeras para la muestra purificada LambdaFabSelect, mientras que la proteína en el flujo completo lleva solo la cadena ligera cMET (Figura 8A, lado izquierdo, comparar los carriles 6 y 7). El perfil SEC del LambdaFabSelect MBab-RF purificado indicaba un 100 % de monómero sin agregados (Figura 8A, lado derecho). El análisis del estado oligomérico de las fracciones purificadas de LambdaFabSelect del MBab-RF por RP-HPLC en condiciones reductoras indicó que la proteína en el flujo correspondía con el subproducto mal emparejado con luz del antígeno A (Figura 8B) mientras que la proteína en la fracción eluida correspondía con un MBab puro compuesto de cantidades iguales de las dos cadenas ligeras (Figura 8C).

Ejemplo 6: Determinación de la biespecificidad variante por AlphaLISA

Para determinar la biespecificidad y la unión simultánea de los dos sitios de unión, se desarrolló un ensayo AlphaLISA como se indica en el Ejemplo 1. Brevemente, la unión simultánea de los dos sitios de unión a los antígenos RAGE e IL6 llevó a las perlas donantes yceptoras a una proximidad cercana que dio como resultado una señal registrada. Para cuantificar el nivel de biespecificidad de las variantes, se generó una IgG biespecífica monovalente de referencia mediante la coexpresión de plásmidos de ADN de los anticuerpos anti-IL6 y anti-RAGE parentales en una sola célula. El emparejamiento espontáneo de las cadenas ligeras y pesadas debería dar como resultado, en teoría, un 12,5 % de la proteína total producida como IgG biespecífica monovalente. La cromatografía de afinidad secuencial primero en una columna IL6 y después en una columna RAGE dio como resultado una IgG biespecífica monovalente pura sin ingeniería involucrada. La señal AlphaLISA obtenida con el biespecífico monovalente purificado en 2 etapas se usó para establecer

una referencia de biespecificidad al 100 % (Figura 5). La combinación de las variantes 1 y 3 mostró un pequeño aumento en el ensayo de biespecificidad AlphaLISA sobre la IgG de botón en ojal, que mejoró aún más mediante la adición de una sola (-Cys). La combinación de IL6 V1 y RAGE V3 (-Cys) mostró el mayor aumento en el ensayo de biespecificidad AlphaLISA sobre la IgG de botón en ojal (Figura 5A). Según el análisis SDS-PAGE, aunque las variantes 10 y 11 (V10 y V11) demostraron una mejora modesta en el ensayo de especificidad AlphaLISA sobre la IgG de botón en ojal, la variante 12 (V12) demostró una biespecificidad de casi el 100 % (Figura 5b).

Ejemplo 7: Cinética y unión simultánea por análisis Octet

La biespecificidad y la unión concurrente de MBab variante 12 (V12) a los antígenos RAGE e IL6 se caracterizó adicionalmente por interferometría de biocapa en un Octet384 usando el formato de captura descrito anteriormente. Los siguientes anticuerpos: MBab variante 12, anti-RAGE, anti-IL6 y el derivado biespecífico monovalente purificado en 2 etapas, se capturaron en sensores anti-Fc y después se analizaron para determinar la unión de antígeno específico. Aunque el anti-IL6 y el anti-RAGE parentales demostraron una unión específica solo a su antígeno respectivo, MBab variante 12 y el biespecífico monovalente purificado en 2 etapas mostraron un perfil de unión simultáneo idéntico a los antígenos RAGE e IL6 (Figura 9). Cuando se probó su cinética de unión a los antígenos RAGE e IL6, la variante 12 demostró las mismas afinidades cinéticas (KD) que los anticuerpos parentales a los antígenos respectivos con tasas generales de kon y koff similares a las indicadas en la Figura 10.

Ejemplo 8: Producción y análisis de MBab HER2/EGFR

Para evaluar la importancia terapéutica de la molécula MBab y validar aún más la plataforma, se generó un anticuerpo biespecífico monovalente (MBab) con características de unión similares a dos anticuerpos clínicamente aprobados; Herceptin® y Erbitux® (Cetuximab) (Figura 11A, panel izquierdo). El tratamiento simultáneo con Herceptin® y Cetuximab puede conducir a una regresión tumoral mucho mayor en xenoinjertos humanos, en comparación con el efecto de cada mAb solo (Larbouret et al. (2001) Clin. Cancer Res. 13:3356-3362). Después de cotransfección transitoria de los vectores pMBab-Pesada y pMBab-Ligera en células HEK293F, los sobrenadantes de cultivo se purificaron en cromatografía de afinidad de proteína A. El análisis de SDS-PAGE en condiciones no reductoras mostró que la mayoría del anticuerpo se produjo correctamente con 2 cadenas pesadas y 2 cadenas ligeras (Figura 11A, panel derecho). Los rendimientos de expresión del MBab (150 mg/l) se correlacionaron con el perfil de expresión de los dos anticuerpos parentales; anti-HER2 (200 mg/l) y anti-EGFR (90 mg/l). El perfil SEC-HPLC de MBab purificado de proteína A indicó aproximadamente 90 % de monómero, aproximadamente 10 % de mitad de IgG no emparejado y menos del 3 % de agregados. Después de SEC preparativa, el MBAB HER2/EGFR se purificó hasta una homogeneidad de aproximadamente 99 % de monómero (Figura 11B) y un perfil de SEC similar en general como los mAbs parentales (Figura 11C). El análisis SEC-MALS indicó valores de MW de 154,8 KD para MBab y 158,5 KD y 154,0 KD para anti-EGFR y anti-HER2, respectivamente. Los perfiles de migración de los tres anticuerpos indicaron que el MBab con un centro de elución de aproximadamente 9,28 min migró entre anti-EGFR (9,20 min) y anti-HER2 (9,33 min) (Figura 11D).

Ejemplo 9: Análisis de unión simultánea por análisis Octet

La biespecificidad y la unión simultánea del MBab HER2/EGFR a los antígenos HER2 y EGFR se determinó mediante análisis Octet usando el formato I descrito anteriormente. Después de la captura en un sensor anti-Fc, el MBab demostró perfiles de unión simultánea a los antígenos HER2 y EGFR, mientras que los anticuerpos parentales demostraron una unión específica solo a sus antígenos respectivos (Figura 12).

Además, la biespecificidad y la unión concurrente del MBab Her2/EGFR a los antígenos HER2 y EGFR se determinó mediante análisis Octet utilizando un formato de captura alternativo (formato II descrito anteriormente). Después de la captura de EGFR biotinilado o HER2 biotinilado en sensores de Capacidad de Unión Elevada a Estreptavidina, el MBab demostró un perfil de unión concurrente al antígeno no marcado correspondiente, mientras que los anticuerpos parentales anti-HER2 y anti-EGFR demostraron una unión específica solo a su antígeno respectivo (Figura 13)

Ejemplo 10: Análisis de estabilidad térmica por calorimetría diferencial de barrido

La estabilidad térmica de MBab anti-HER2, anti-EGFR y HER2/EGFR V12 se evaluó mediante DSC (Figura 14). El termograma DSC de anti-HER2 mostró dos transiciones de desplegamiento distintas con temperaturas de desnaturalización (Tm) de 68,9 °C y 81,3 °C (Figura 14A, parte superior izquierda). Estas transiciones correspondieron a la desnaturalización de los dominios CH2 y Fab + CH3, respectivamente. El termograma DSC de anti-EGFR reveló cuatro transiciones (Figura 14A, parte inferior derecha). El dominio Fab quimérico de anti-EGFR mostró valores de Tm separados para los dominios CH1, Ck y VH, y Vk de 73,5 °C y 63,1 °C, respectivamente. Los dominios CH2 y CH3 de anti-EGFR demostraron valores de Tm de 68,4 °C y 82,1 °C, respectivamente. La desconvolución del termograma HER2/EGFR V12 MBab DSC reveló 4 transiciones (Figura 14B, parte superior izquierda). Al comparar las temperaturas de transición de desarrollo de MBab V12 HER2/EGFR con las de los anticuerpos parentales, se dedujo que el pico con una Tm de 60,4 °C correspondía a la transición de desnaturalización de los dominios variables anti-EGFR. En paralelo, el pico con una Tm de 73,5 °C correspondió a la transición de desnaturalización de los dominios anti-EGFR CH1 y Ck. En algunos casos, la incorporación de las mutaciones de botón en ojal en el dominio CH3 puede reducir la Tm del dominio CH3 de aproximadamente 80,0 °C a aproximadamente 69,0 °C. Por tanto, el pico con una Tm de 69,7 °C correspondió a la

transición de desnaturalización de los dominios CH2 y CH3. En consecuencia, el pico con una Tm de 80,6 °C correspondió a la transición de desnaturalización del dominio Fab anti-HER2. Los tres termogramas DSC superpuestos (Figura 14B, parte inferior derecha) indicaron que la transición de desnaturalización del dominio Fab anti-HER2 se superponía con el pico MBab V12 HER2/EGFR a una Tm de aproximadamente 80,0 °C. Esto indicó que el disulfuro intercadena alternativo diseñado en la parte Fab anti-HER2 del MBab V12 HER2/EGFR no desestabilizó el plegamiento general del armazón de Fab. En total, los estudios de estabilidad térmica confirmaron que el MBab V12 HER2/EGFR mostraba transiciones de desplegamiento similares a los anticuerpos IgG convencionales.

Ejemplo 11: Mapeo QTOF LC-MS digerido con papaína

Los resultados de Q-TOF LC-MS digerido con papaína confirmaron las regiones Fab esperadas de la proteína MBab V12 HER2/EGFR. La región Fab (B) del MBab V12 HER2/EGFR eluyendo a los 10,7 minutos se identificó como LC + anti-HER2 (1-224) y LC + anti-HER2 (1-227). El tiempo de retención y los sitios de escisión fueron consistentes con las muestras parentales anti-HER2 IgG, anti-HER2 Fab WT y anti-HER2 V12 Fab. La región Fab (A) del MBab V12 HER2/EGFR eluyendo a los 11,9 minutos se identificó como LC + anti-EGFR (1-226). Este sitio de escisión y el tiempo de retención fueron consistentes con la región Fab de la IgG anti-EGFR parental.

Ejemplo 12: Unión celular por citometría de flujo

Las propiedades de unión celular del MBab V12 Her2/EGFR a cuatro líneas celulares tumorales que expresan niveles variables de HER2 y EGFR se probaron mediante citometría de flujo y se compararon con las actividades de unión celular de los dos anticuerpos parentales. Los resultados presentados en la Figura 15 muestran que las intensidades de tinción de los anticuerpos anti-HER2 y anti-EGFR parentales correspondieron con los niveles de antígenos HER2 y EGFR en las diversas células tumorales. Sin embargo, el MBab maximizó insistentemente la intensidad de tinción del anticuerpo parental que obtuvo la señal de FACS más alta en células con diferentes niveles de HER2 y EGFR.

Ejemplo 13: Ensayos de viabilidad celular

Para evaluar la aplicación terapéutica del MBab V12 Her2/EGFR, se probó la potencia de la molécula en experimentos de destrucción celular in vitro. En algunos casos, la actividad terapéutica aditiva o sinérgica obtenida con el tratamiento combinado de anti-EGFR y anti-HER2 puede ocurrir en tumores con niveles similares o mayores de EGFR sobre HER2 (véase, p.ej., Larbouret et al. (2001) Clin. Cancer Res. 13:3356-3362). Para demostrar esto, se seleccionaron cuatro líneas celulares tumorales con niveles variables de HER2 y EGFR. La actividad de destrucción celular del MBab se comparó con la de los anticuerpos parentales solos y el tratamiento combinado con los dos anticuerpos parentales. Los resultados presentados en la Figura 16 muestran que con las células A431 que expresan aproximadamente 25 veces más EGFR sobre HER2, el MBab V12 Her2/EGFR demostró una actividad aditiva de destrucción celular que fue similar a la de la combinación de los dos mAb parentales y mucho más actividad potente que la de cada mAb solo. El mismo perfil de eliminación de aditivos se observó con células BxPc3 que expresan aproximadamente 20 veces más EGFR y también con células SK-OV-3 que expresan niveles relativamente similares de los dos antígenos. Sin embargo, para las células SKBR3 que expresan más de 40 veces más HER2 sobre EGFR, no se obtuvieron efectos de eliminación de aditivos con el MBab o el tratamiento combinado con los dos anticuerpos parentales. La curva de titulación de la muerte celular de MBab reveló que a una concentración de anticuerpos alta, el MBab V12 Her2/EGFR confiere actividad de muerte celular aditiva al mismo nivel que el tratamiento combinado y más alta que la de cada mAb solo, sin embargo, a concentraciones de anticuerpos más bajas, el MBab V12 Her2/EGFR demostró una actividad reducida en comparación con el tratamiento combinado (Figura 16C). Este comportamiento probablemente se atribuyó a la monovalencia del MBab V12 Her2/EGFR que resultó con la falta de efectos de avidéz. Esta propiedad única del MBab podría conferir menos toxicidad relacionada con la diana.

Ejemplo 14: Cinética de unión a receptores Fc

Para evaluar el impacto de las mutaciones de botón y no al, así como las mutaciones V12 en la interfaz CL-CH1 en la unión con varios receptores Fc humanos, se generó una variedad de construcciones de MBab y se midió su cinética de unión a los receptores Fc humanos y se comparó con la de la correspondiente IgG1 parental. Las constantes de disociación (KD) se determinaron mediante un ensayo de unión en equilibrio en estado estable en un ProteOn. Las IgG parentales utilizadas en este estudio fueron; el anti-EGFR parental, anti-HER2 y un hIgG1 de control (NMGC). Las construcciones de MBab generadas para este estudio incluyeron las siguientes combinaciones: HER2/EGFR, EGFR/EGFR, HER2/HER2, EGFR/NMGC y NMGC/HER2. Los valores de KD resumidos en la Tabla 9 no revelaron diferencias en la cinética de unión a ninguno de los receptores Fc probados entre las construcciones de MBab y sus IgG parentales correspondientes, así como con los valores informados para el isotipo de IgG1 humana.

Tabla 9: valores de KD de la unión del receptor de Fc y C1q

Ligando	Anticuerpo KD [nM]						
	Fcy R Ia	Fcy R IIa	Fcy R IIb	Fcy R IIIa 158F	Fcy R IIIa 158V	Hu FcRn pH 6	C1q
EGFR/HER2 MBab	7,86	960	5390	2540	315	1050	174

EGFR/EFGR de botón en ojal	7,64	916	5240	2420	277	1050	164
HER2/HER2 de botón en ojal	9,42	954	5310	2510	294	1070	151
NMGC IgG1	9,94	906	5650	2210	246	810	28,9
EGFR IgG1	7,11	1000	4640	2440	284	1100	120
HER2 IgG1	8,1	903	5620	2270	253	998	83,3
EGFR/NMGC MBab	9,82	1020	4710	2620	288	1210	131
NMGC /HER2 MBab	9,84	991	4640	2450	270	1010	95,5
Valores informados para la IgG1 humana	10-200	500-3000	800-7000	500-5000	500-5000	100-2500	100-700

Ejemplo 15: Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo y unión a FcγRIIIa y C1q

La capacidad de mantener la unión a FcγRIIIa y C1q puede ser un indicador clave de la capacidad de un anticuerpo para provocar ADCC y CDC. En este ejemplo, el ELISA probó la unión directa de MBab a FcγRIIIa y C1q y también su capacidad para provocar ADCC en células A431. Los resultados presentados en la Figura 17A muestran que el MBab exhibió unión a FcγRIIIa y C1q. Además, en estudios de ADCC, el MBab provocó actividades de ADCC similares a la combinación con los dos anticuerpos parentales. El anti-HER2 parental solo no mostró actividad ADCC mientras que Cetuximabanti-EGFR exhibió una actividad ADCC más fuerte (Figura 17B).

Ejemplo 16: Unión preferente y selectividad mejorada mediante unión simultánea a dos antígenos en una sola célula

Para demostrar la unión preferente y la selectividad mejorada mediante la unión simultánea a dos antígenos de la superficie celular (denominados aquí antígenos C y D) en una sola célula, se generó un MBab compuesto por un anti-C y un anti-D (denominado C/D-MBab). La unión preferente de C/D-MBab a las células que expresan ambos antígenos diana (C y D) se analizó mediante citometría de flujo mezclando poblaciones pre-teñidas de células que expresan C solo (células C), células que expresan D solo (D células) y células que expresan C y D (células C/D) en una proporción 1:1:1 en un solo pocillo seguido de incubación con las IgG parentales o C/D-MBab. Como se muestra en (Figura 20B, paneles izquierdo y derecho, respectivamente), el C/D-MBab demostró una unión preferente a las células C/D que expresan tanto los antígenos de la superficie celular como los antígenos C y D. Para confirmar que la unión preferente a las células C/D se debió al compromiso bivalente simultáneo con los antígenos de la superficie celular C y D, se utilizaron proteínas C y D recombinantes solubles marcadas con Alexa Fluor® 647 fluorescente para rastrear los brazos no unidos de la molécula C/D-MBab. En esencia, si el C/D-MBab se une monovalentemente a la superficie celular, un brazo permanecerá libre para unirse a las formas fluorescentes solubles de las proteínas C o D que pueden detectarse mediante análisis de citometría de flujo (representado esquemáticamente en la Figura 20A). Un control clave para el estudio es el uso de la población celular que se sabe que expresa solo uno de los antígenos diana. En este caso, cualquier C/D-MBab que se una a la superficie solo puede hacerlo monovalentemente, dejando el brazo libre sin unir para ser detectado por la proteína recombinante soluble Alexa Fluor 647. La incubación del C/D-MBab con células C que no expresan D condujo a una señal fluorescente dependiente de la concentración después de la incubación con la proteína D recombinante marcada con Alexa Fluor 647 que indica que para cada molécula de C/D-MBab unida al antígeno C en la célula superficie, mientras que el brazo anti-D era libre de unirse a la proteína D recombinante marcada con Alexa Fluor 647 (Figura 20C, panel izquierdo). De la misma manera, la incubación del C/D-MBab con células D, que expresan solo el antígeno D y ningún antígeno C, dio como resultado una señal fluorescente dependiente de la concentración después de la adición de la proteína C recombinante marcada con Alexa Fluor 647 que indica que para cada molécula de C/D-MBab unido al antígeno D en la superficie celular, el brazo anti-C fue libre de unirse a la proteína C recombinante marcada con Alexa Fluor 647 (Figura 20C, panel derecho). Sin embargo, cuando el C/D-MBab se incubó con células C/D, no se observó un aumento en la señal fluorescente después de la adición de la proteína D recombinante marcada con Alexa Fluor 647 o la proteína C recombinante marcada con Alexa Fluor 647, lo que indica que ambos brazos C/D-MBab participan simultáneamente y ninguna proteína recombinante puede unirse al complejo célula-anticuerpo, por lo tanto, solo se ve una señal de PE (Figura 20C, ambos paneles). La relación entre la cantidad de C/D-MBab en la superficie celular y la cantidad de proteína recombinante soluble que puede unirse en última instancia proporciona evidencia de unión bivalente o monovalente concurrente de C/D-MBab a la superficie celular. Cuando es evidente que C/D-MBab está unido a la superficie celular, pero no se detecta un brazo libre, puede concluirse que ambos brazos están simultáneamente en contacto con su antígeno diana.

Ejemplo 16: Ejemplos de Secuencias

En lo sucesivo se proporcionan ejemplos no limitantes de ciertas secuencias de aminoácidos.

TABLA 8: Ejemplos de Secuencias

Nombre	Tipo	SEQ ID NO	Secuencia
Región constante de cadena pesada de IgG1 humana	AA	1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKX ₁ *VEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRX ₂ *EX ₃ *TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEX ₄ *LHNHYTQKSLSLSPGK
			*X ₁ =Lys o Arg; X ₂ =Asp o Glu; X ₃ =Leu o Met; X ₄ =Ala o Gly
Región constante de cadena pesada de IgG2 humana	AA	2	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTX ₁ *SSX ₂ *X ₃ *GTQTYTCNVNHHKPSNTKVDKTVKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGX ₄ *EVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIX ₅ *VEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
			*X ₁ =Pro o Thr; X ₂ =Asn o Ser; X ₃ =Phe o Leu; X ₄ =Val o Met; X ₅ =Ala o Ser
Región constante de cadena pesada de IgG3 humana	AA	3	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQX ₁ *SGLYSLSSVVTVPSSX ₂ *X ₃ *GTQTYTCNVNHHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFCFSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK
			*X ₁ =Ser o Thr; X ₂ =Asn o Ser; X ₃ =Phe o Leu
Región constante de cadena pesada de IgG4 humana	AA	4	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Región constante de cadena ligera Kappa humana	AA	5	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNX ₁ *LQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKX ₂ *YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
			*X ₁ =Ala o Val; X ₂ =Val o Leu
Región constante de cadena ligera Lambda humana	AA	6	QPKAX ₁ *PX ₂ *VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADX ₃ *SPVKAGVETX ₄ *TPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHX ₅ *SYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC
			*X ₁ =Ala o Asn; X ₂ =Ser o Thr; X ₃ =Ser o Gly; X ₄ =Thr o Lys; X ₅ =Arg o Lys

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> MedImmune LLC
 <120> Polipéptidos modificados para armazones de anticuerpo biespecifico
 <130> AEMs-110WO1
 <160> 6
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 330
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (97)..(97)
 15 <223> Xaa es Lys o Arg
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (239)..(239)
 <223> Xaa es Asp o Glu
 20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (241)..(241)
 <223> Xaa es Leu o Met
 <220>
 25 <221> MISC_FEATURE
 <222> (314)..(314)
 <223> Xaa es Ala o Gly
 <400> 1
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

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

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

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

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

 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 30

ES 2 816 078 T3

Xaa Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Xaa Glu
 225 230 235 240
 Xaa Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Xaa Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 2

<211> 326

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (72)..(72)

<223> Xaa es Pro o Thr

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (75)..(75)

<223> Xaa es Asn o Ser

<220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (76)..(76)
 <223> Xaa es Phe o Leu
 <220>
 5 <221> MISC_FEATURE
 <222> (161)..(161)
 <223> Xaa es Val o Met
 <220>
 10 <221> MISC_FEATURE
 <222> (257)..(257)
 <223> Xaa es Ala o Ser
 <400> 2
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

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

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

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

 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Xaa Ser Ser Xaa Xaa Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

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

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

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

ES 2 816 078 T3

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160
 Xaa Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 165 170 175
 Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 180 185 190
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 195 200 205
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255
 Xaa Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270
 Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

<210> 3

<211> 377

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (59)..(59)

<223> Xaa es Ser o Thr

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (75)..(75)

<223> Xaa es Asn o Ser

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (76)..(76)

<223> Xaa es Phe o Leu

<400> 3

ES 2 816 078 T3

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	1	5	10	15
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	20	25	30	
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	35	40	45	
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Xaa	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	50	55	60	
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Xaa	Xaa	Gly	Thr	Gln	Thr	65	70	75	80
Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	85	90	95	
Arg	Val	Glu	Leu	Lys	Thr	Pro	Leu	Gly	Asp	Thr	Thr	His	Thr	Cys	Pro	100	105	110	
Arg	Cys	Pro	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Thr	Pro	Pro	Pro	Cys	Pro	Arg	115	120	125	
Cys	Pro	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Thr	Pro	Pro	Pro	Cys	Pro	Arg	Cys	130	135	140	
Pro	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Thr	Pro	Pro	Pro	Cys	Pro	Arg	Cys	Pro	145	150	155	160
Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	165	170	175	
Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	180	185	190	
Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Lys	Trp	Tyr	195	200	205	

ES 2 816 078 T3

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
210 215 220

Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
225 230 235 240

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
245 250 255

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
260 265 270

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
275 280 285

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
290 295 300

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
305 310 315 320

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
325 330 335

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
340 345 350

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
355 360 365

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
370 375

<210> 4
<211> 327
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 4

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

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

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

ES 2 816 078 T3

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 5

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (46)..(46)
 <223> Xaa es Ala o Val
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (84)..(84)
 <223> Xaa es Val o Leu
 <400> 5
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

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

 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Xaa Leu Gln
 35 40 45

 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80

 Lys His Lys Xaa Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105
 10 <210> 6
 <211> 104
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa es Ala o Asn
 <220>
 20 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa es Ser o Thr
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 25 <222> (45)..(45)
 <223> Xaa es Ser o Gly
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (55)..(55)
 30 <223> Xaa es Thr o Lys
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (82)..(82)
 <223> Xaa es Arg o Lys
 35 <400> 6

ES 2 816 078 T3

Gln	Pro	Lys	Ala	Xaa	Pro	Xaa	Val	Thr	Leu	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser	Glu
1				5					10					15	
Glu	Leu	Gln	Ala	Asn	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu	Ile	Ser	Asp	Phe
			20					25					30		
Tyr	Pro	Gly	Ala	Val	Thr	Val	Ala	Trp	Lys	Ala	Asp	Xaa	Ser	Pro	Val
		35					40					45			
Lys	Ala	Gly	Val	Glu	Thr	Xaa	Thr	Pro	Ser	Lys	Gln	Ser	Asn	Asn	Lys
	50					55					60				
Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ser	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Trp	Lys	Ser
65					70					75					80
His	Xaa	Ser	Tyr	Ser	Cys	Gln	Val	Thr	His	Glu	Gly	Ser	Thr	Val	Glu
				85					90					95	
Lys	Thr	Val	Ala	Pro	Thr	Glu	Cys								
			100												

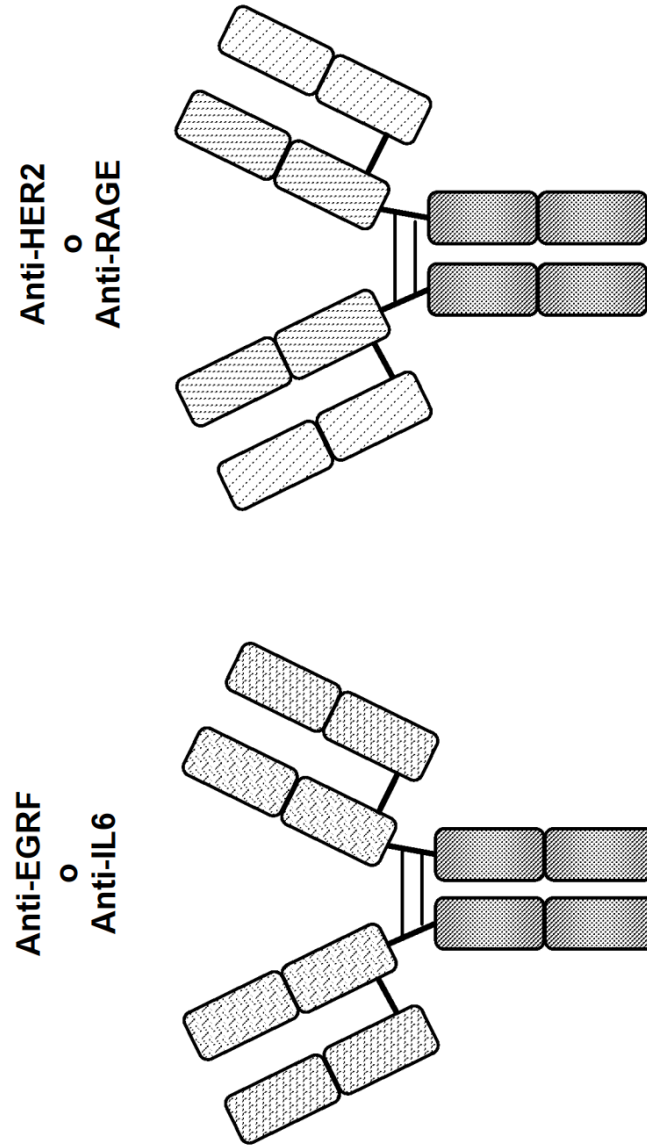
REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo IgG1 biespecífico humano que comprende:
 - (a) una cadena pesada modificada, en donde la región CH1 de la cadena pesada modificada comprende
 - (i) una sustitución de una cisteína nativa por un aminoácido que no es cisteína, y
 - (ii) una sustitución de un aminoácido que no es cisteína nativa por un aminoácido cisteína; y
 - (b) una cadena ligera correspondiente modificada, en donde la región CL de la cadena ligera modificada comprende
 - (i) una sustitución de una cisteína nativa por un aminoácido que no es cisteína, y
 - (ii) una sustitución de un aminoácido que no es cisteína nativa por un aminoácido cisteína; y
 - (c) una segunda cadena pesada y una segunda cadena ligera correspondiente, en donde la segunda cadena pesada y la segunda cadena ligera correspondiente no comprenden una sustitución de un aminoácido que no es cisteína nativa por un aminoácido cisteína y no comprenden una sustitución de una cisteína nativa por un aminoácido que no es cisteína; y en donde la cadena pesada modificada y la cadena ligera correspondiente modificada se seleccionan del grupo que consiste en variantes
 - a. que comprenden un dominio CH1 en donde el aminoácido en la posición 141 está sustituido por cisteína y la cisteína en la posición 220 está sustituida por un aminoácido que no es cisteína; y un dominio CL en donde el aminoácido en la posición 116 está sustituido por cisteína y la cisteína en la posición 214 está sustituida por un aminoácido que no es cisteína;
 - b. un dominio CH1 en donde el aminoácido en la posición 168 está sustituido por cisteína y la cisteína en la posición 220 está sustituida por un aminoácido que no es cisteína; y un dominio CL en donde el aminoácido en la posición 164 está sustituido por cisteína y la cisteína en la posición 214 está sustituida por un aminoácido que no es cisteína;
 - c. un dominio CH1 en donde el aminoácido en la posición 126 está sustituido por cisteína y la cisteína en la posición 220 está sustituida por un aminoácido que no es cisteína; y un dominio CL en donde el aminoácido en la posición 121 está sustituido por cisteína y la cisteína en la posición 214 está sustituida por un aminoácido que no es cisteína;
- en donde la numeración se realiza según el índice de UE.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde,
 - (a) cada una de las dos cadenas ligeras comprenden un dominio VL y un dominio CL, en donde los dominios VL tienen secuencias de aminoácidos diferentes y los dominios CL tienen secuencias de aminoácidos diferentes; y/o
 - (b) cada una de las dos cadenas pesadas comprenden un dominio VH, un dominio CH1 y una región Fc, en donde los dominios VH tienen secuencias de aminoácidos diferentes, los dominios CH1 tienen secuencias de aminoácidos diferentes y las regiones Fc tienen secuencias de aminoácidos diferentes, opcionalmente en donde una cadena ligera es una cadena ligera kappa y una cadena ligera es una cadena ligera lambda.
3. El anticuerpo de la reivindicación 2, en donde las dos cadenas pesadas forman un heterodímero.
4. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el anticuerpo se une específicamente a dos antígenos independientes o a dos epítomos independientes en el mismo antígeno.
5. El anticuerpo de las reivindicaciones 2 a 4, en donde la región Fc comprende una primera cadena pesada y una segunda cadena pesada y las modificaciones en el dominio CH3 de la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada se seleccionan de los emparejamientos que consisten en
 - (i) una modificación de T366Y en el dominio CH3 de la primera cadena pesada, y una modificación de Y407T en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada;
 - (ii) una modificación de T366W en el dominio CH3 de la primera cadena pesada, y una modificación de Y407A en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada;
 - (iii) una modificación de T394W en el dominio CH3 de la primera cadena pesada, y una modificación de F405A en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada;
 - (iv) modificaciones de T366Y y F405A en el dominio CH3 de la primera cadena pesada, y modificaciones de T394W e Y407T en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada;
 - (v) modificaciones de T366W y F405W en el dominio CH3 de la primera cadena pesada, y modificaciones de T394S e Y407A en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada;
 - (vi) una modificación de F405W en el dominio CH3 de la primera cadena pesada, y una modificación de T394S en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada;
 - (vii) una modificación de D399C en el dominio CH3 de la primera cadena pesada, y una modificación de K392C en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada;
 - (viii) una modificación de T366W en el dominio CH3 de la primera cadena pesada, y modificaciones de T366S, L368N e Y407V en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada;
 - (ix) modificaciones de T366W y D399C en el dominio CH3 de la primera cadena pesada, y modificaciones de T366S, L368N, K392C e Y407V en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada;
 - (x) modificaciones de T366W y K392C en el dominio CH3 de la primera cadena pesada, y modificaciones de T366S, D399C, L368N e Y407V en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada;
 - (xi) modificaciones de S354C y T366W en el dominio CH3 de la primera cadena pesada, y modificaciones de Y349C, T366S, L368N e Y407V en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada;
 - (xii) modificaciones de Y349C y T366W en el dominio CH3 de la primera cadena pesada, y modificaciones de S354C, T366S, L368A e Y407V en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada;

- (xiii) modificaciones de E356C y T366W en el dominio CH3 de la primera cadena pesada, y modificaciones de Y349C, T366S, L368A e Y407V en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada;
- (xiv) modificaciones de Y349C y T366W en el dominio CH3 de la primera cadena pesada, y modificaciones de E356C, T366S, L368N e Y407V en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada;
- 5 (xv) modificaciones de E357C y T366W en el dominio CH3 de la primera cadena pesada, y modificaciones de Y349C, T366S, L368N e Y407V en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada;
- (xvi) modificaciones de Y349C y T366W en el dominio CH3 de la primera cadena pesada, y modificaciones de E357C, T366S, L368A, Y407V en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada;
- 10 (xvii) modificaciones de K370E, D399K y K439D en el dominio CH3 de la primera cadena pesada, y modificaciones de D356K, E357K y K409D en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada;
- (xx) una modificación de K409D en el dominio CH3 de la primera cadena pesada, y una modificación de D399K en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada;
- (xxi) una modificación de K409E en el dominio CH3 de la primera cadena pesada, y una modificación de D399K en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada;
- 15 (xx) una modificación de K409E en el dominio CH3 de la primera cadena pesada, y una modificación de D399R en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada;
- (xxi) una modificación de K409D en el dominio CH3 de la primera cadena pesada, y una modificación de D399R en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada;
- (xxii) una modificación de D339K en el dominio CH3 de la primera cadena pesada, y una modificación de E356K en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada;
- 20 (xxv) modificaciones de D399K y E356K en el dominio CH3 de la primera cadena pesada y modificaciones de K409D y K392D en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada;
- (xxiv) modificaciones de D399K y E356K en el dominio CH3 de la primera cadena pesada y modificaciones de K409D y K439D en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada;
- 25 (xxv) modificaciones de D399K y E357K en el dominio CH3 de la primera cadena pesada, y modificaciones de K409D y K370D en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada;
- (xxvi) modificaciones de D399K, E356K y E357K en el dominio CH3 de la primera cadena pesada, y modificaciones de K409D, K392D y K370D en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada;
- 30 (xxvii) modificaciones de D399K y E357K en el dominio CH3 de la primera cadena pesada, y modificaciones de K409D y K392D en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada;
- (xxviii) modificaciones de K392D y K409D en el dominio CH3 de la primera cadena pesada y una modificación de D399K en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada; y
- (xxix) modificaciones de K409D y K360D en el dominio CH3 de la primera cadena pesada y una modificación de D399K en el dominio CH3 de la segunda cadena pesada,
- 35 en donde la numeración se realiza según el índice de UE.
6. El anticuerpo de la reivindicación 5, en donde la región Fc de cualquiera o ambas cadenas pesadas comprende las sustituciones de aminoácidos H435R e Y436F que alteran la unión a la proteína A en donde la numeración se realiza según el índice de UE.
- 40 7. El anticuerpo de la reivindicación 5 o 6, en donde:
- (a) la región Fc de cadena pesada modificada comprende la sustitución de aminoácido T366W, y la segunda región Fc de cadena pesada comprende la sustitución de aminoácidos Y407V, T366S y L368A; o
- (b) la región Fc de cadena pesada modificada comprende la sustitución de aminoácidos Y407V, T366S y L368A, y la segunda región Fc de cadena pesada comprende la sustitución de aminoácido T366W, y
- 45 en donde la numeración se realiza según el índice de UE.
8. El anticuerpo de la reivindicación 7, en donde:
- (a) la región Fc de cadena pesada modificada comprende además la sustitución de aminoácido S354C, y la segunda región Fc de cadena pesada comprende además la sustitución de aminoácido Y349C; o
- 50 (b) la región Fc de cadena pesada modificada comprende además la sustitución de aminoácido Y349C, y la segunda región Fc de cadena pesada comprende además la sustitución de aminoácido S354C, y en donde la numeración se realiza según el índice de UE.
9. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, que comprende además modificaciones de M252Y, S254T y T256E en la región Fc.
- 55 10. Una composición que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes y un excipiente.
11. Una célula que comprende
- 60 (a) un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de cadena ligera correspondiente modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y una secuencia de nucleótidos que codifica el segundo polipéptido de cadena ligera correspondiente de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9; y
- (b) un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de cadena pesada modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y una secuencia de nucleótidos que codifica el segundo polipéptido de cadena pesada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 65

12. Un método para expresar un anticuerpo que comprende poner en contacto una pluralidad de células según la reivindicación 11 en condiciones en las cuales se expresan los polipéptidos.

Mab Parental



Monoespecífico bivalente

Fig. 1A

MBab

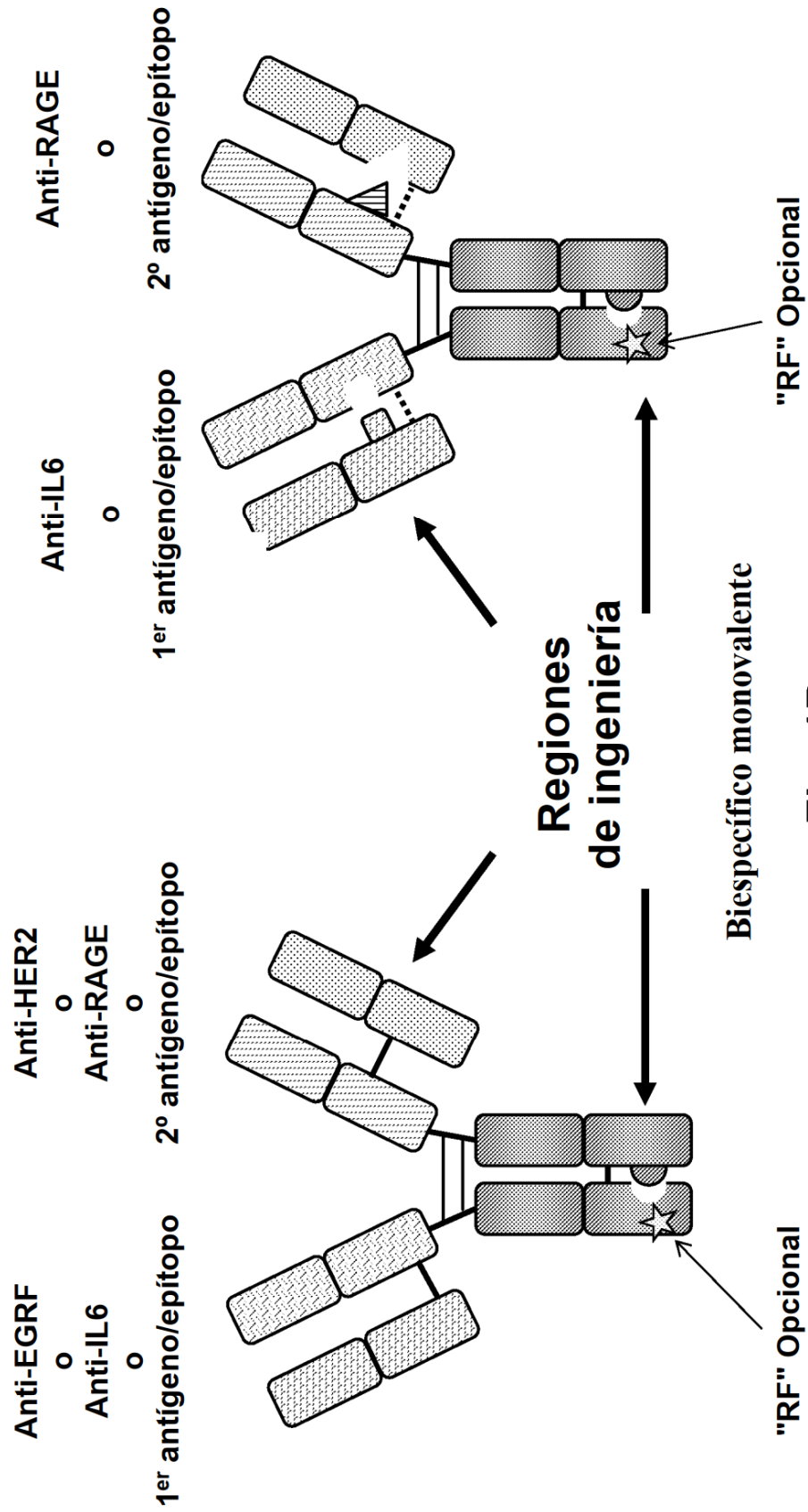


Fig. 1B

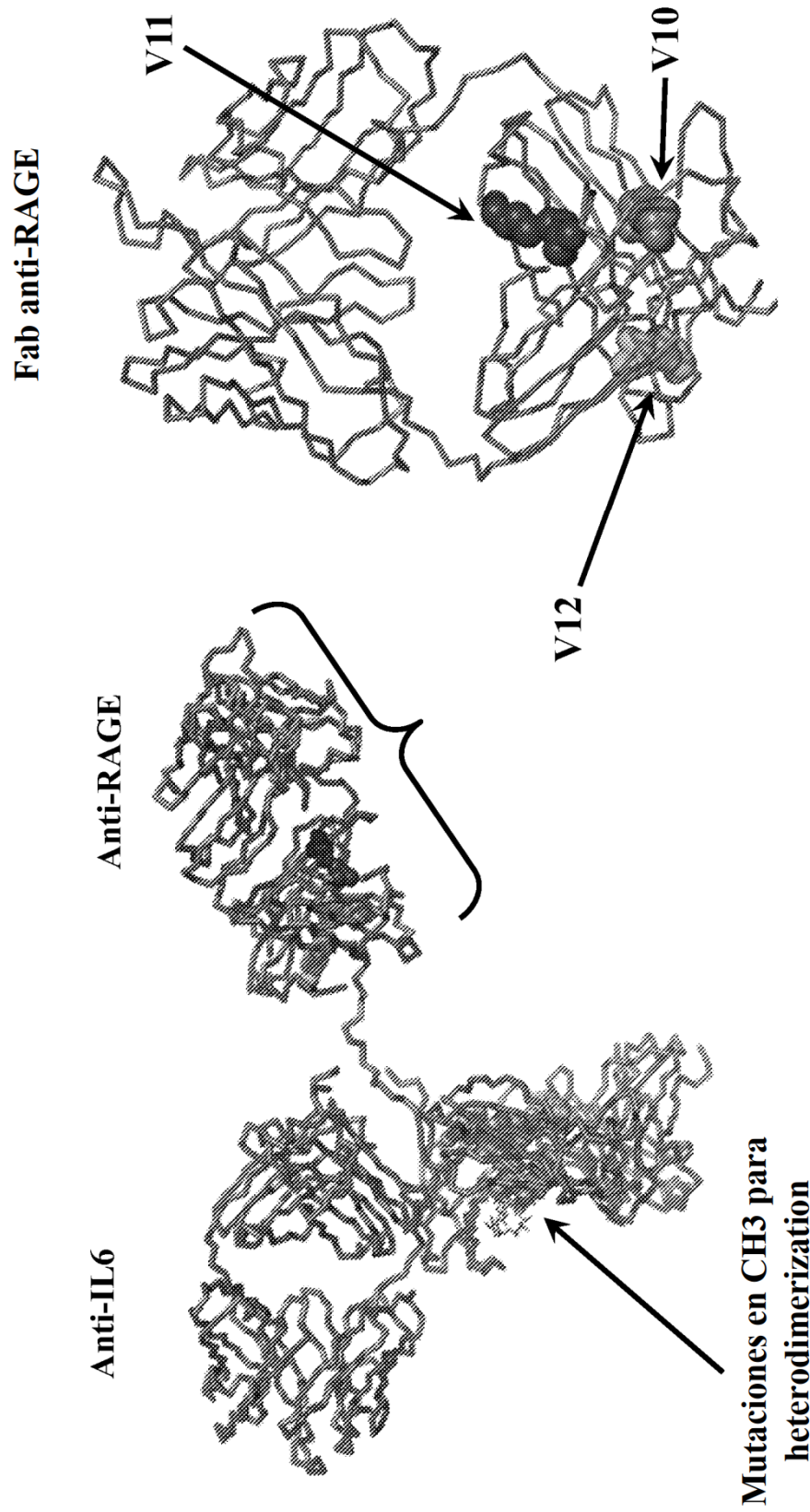


Fig. 2

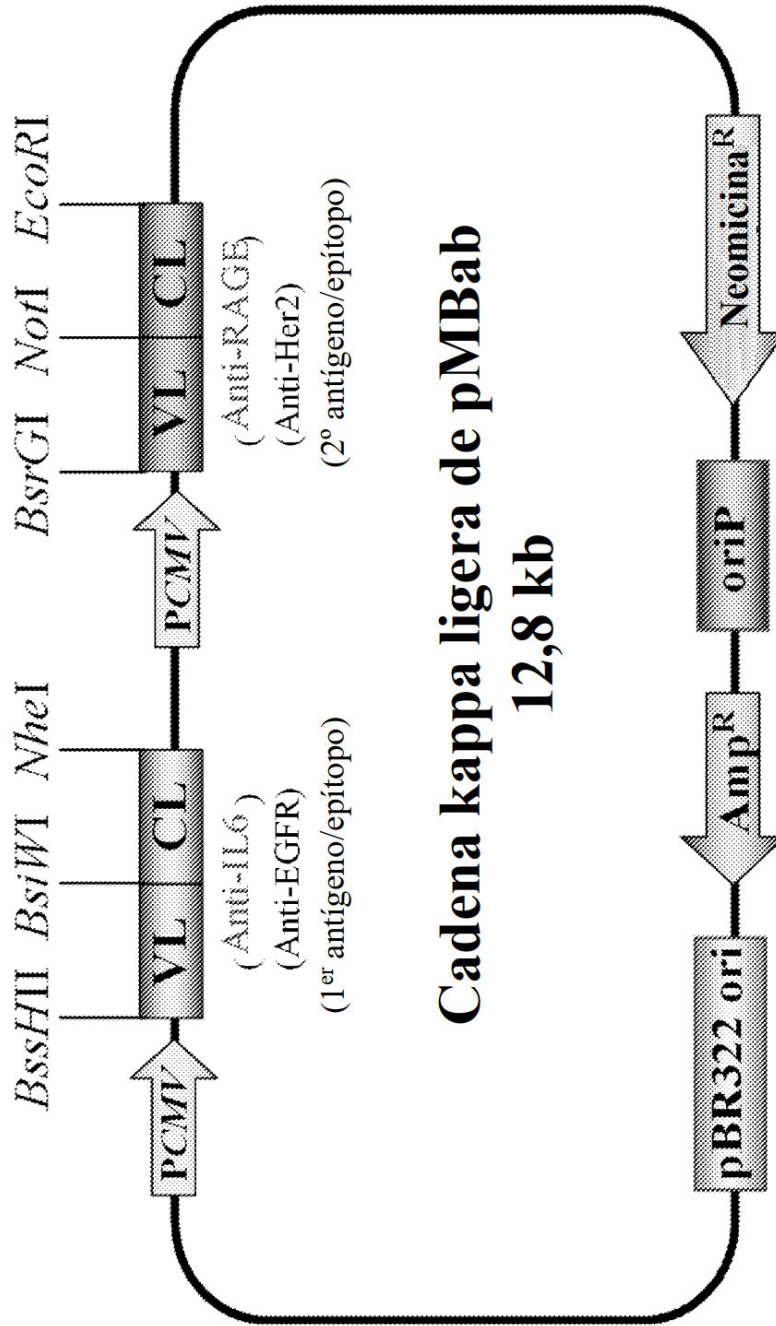


Fig. 3A

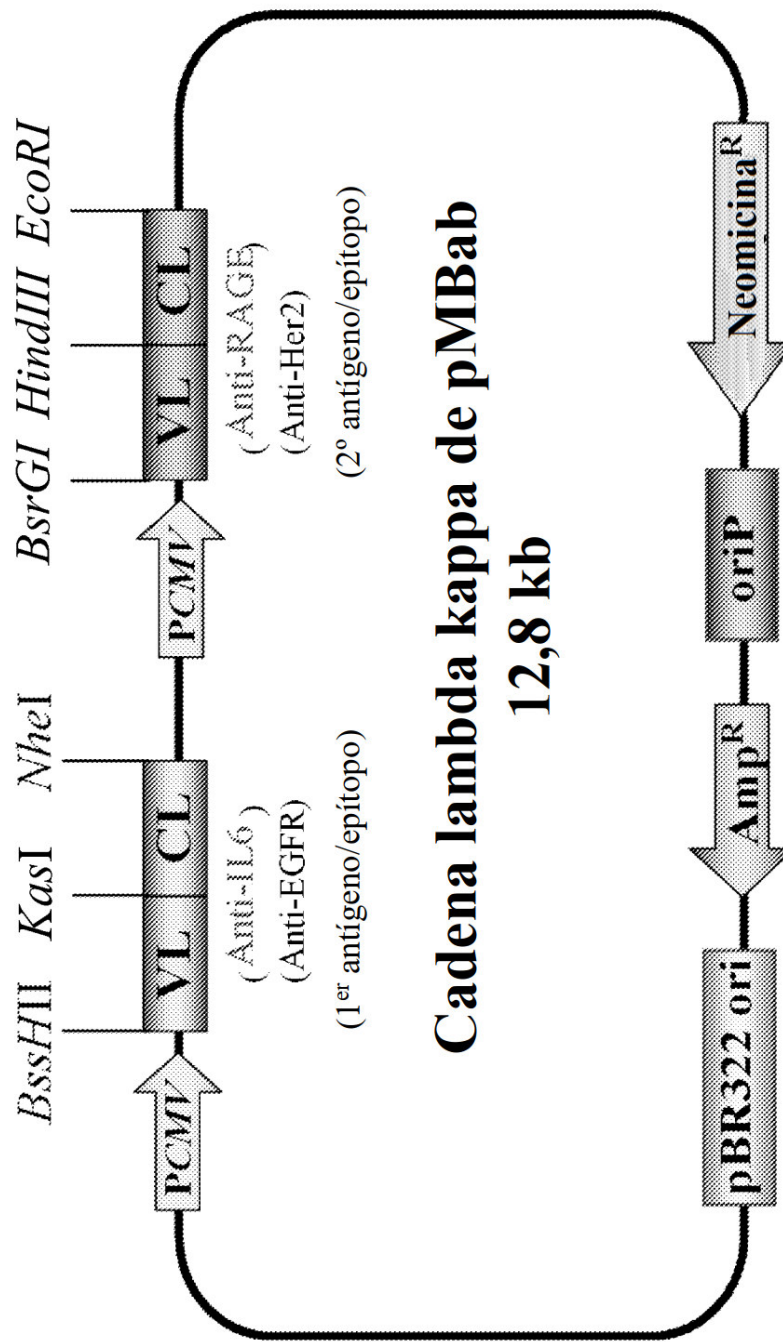


Fig. 3B

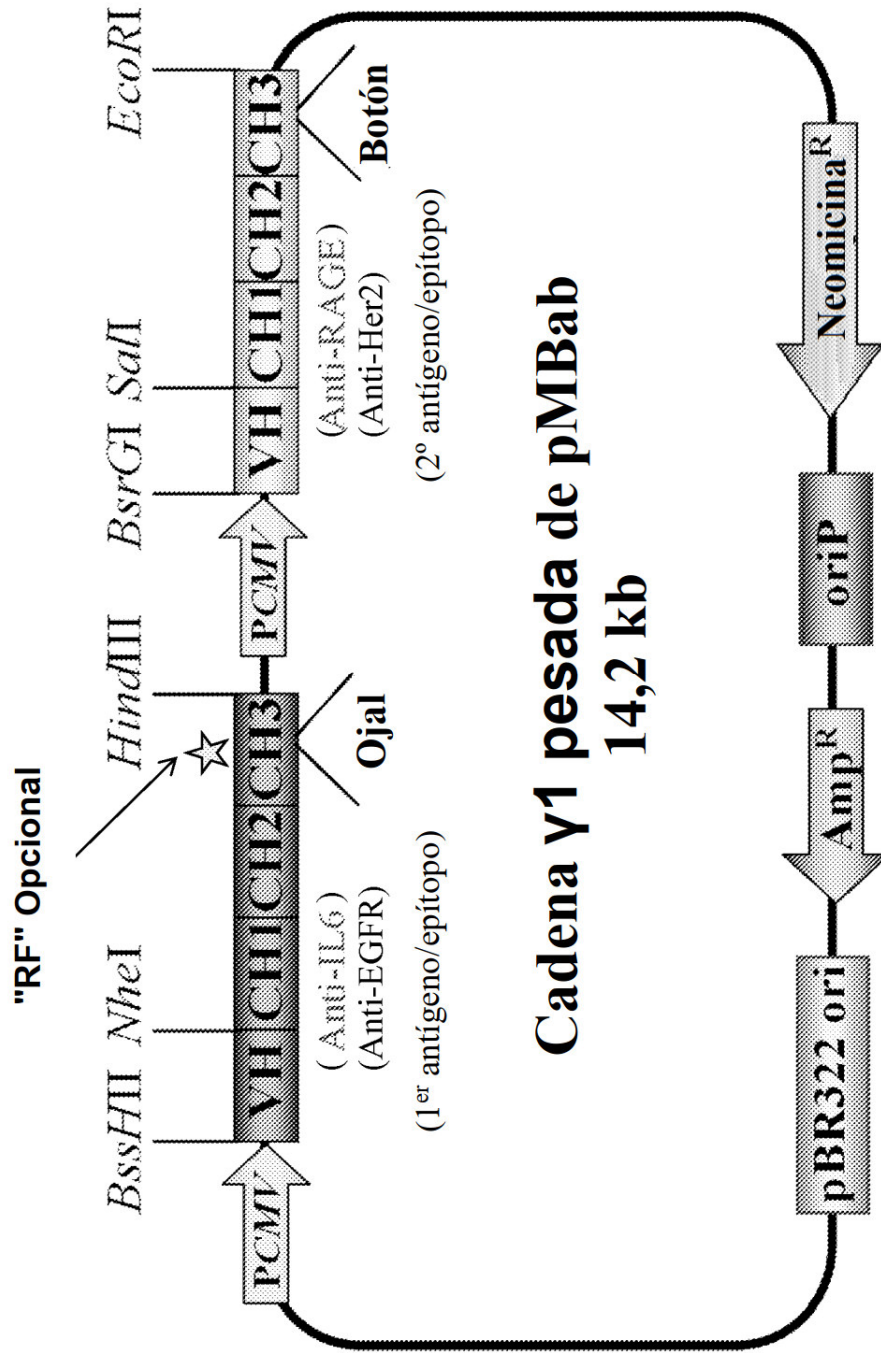


Fig. 3C

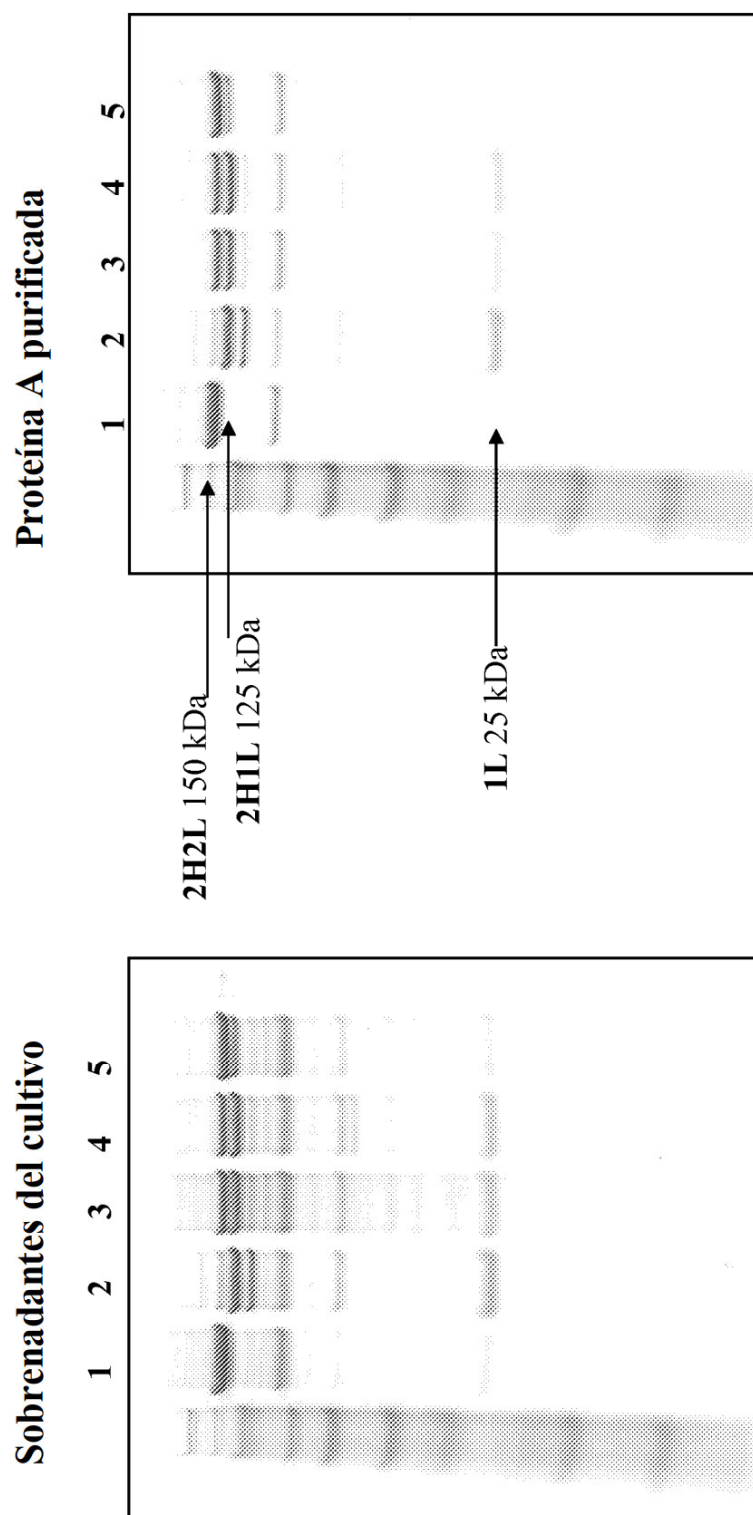


Fig. 4

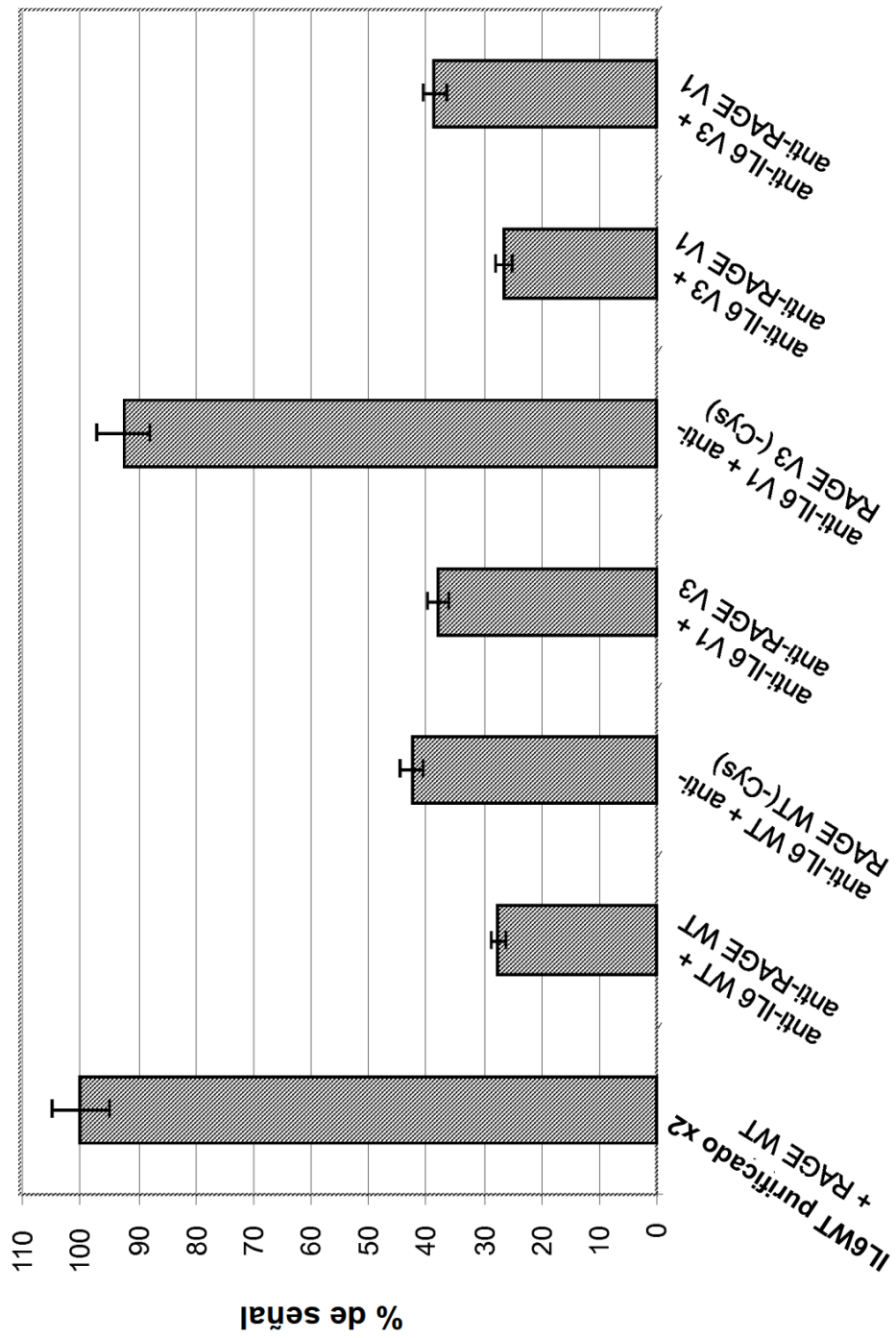
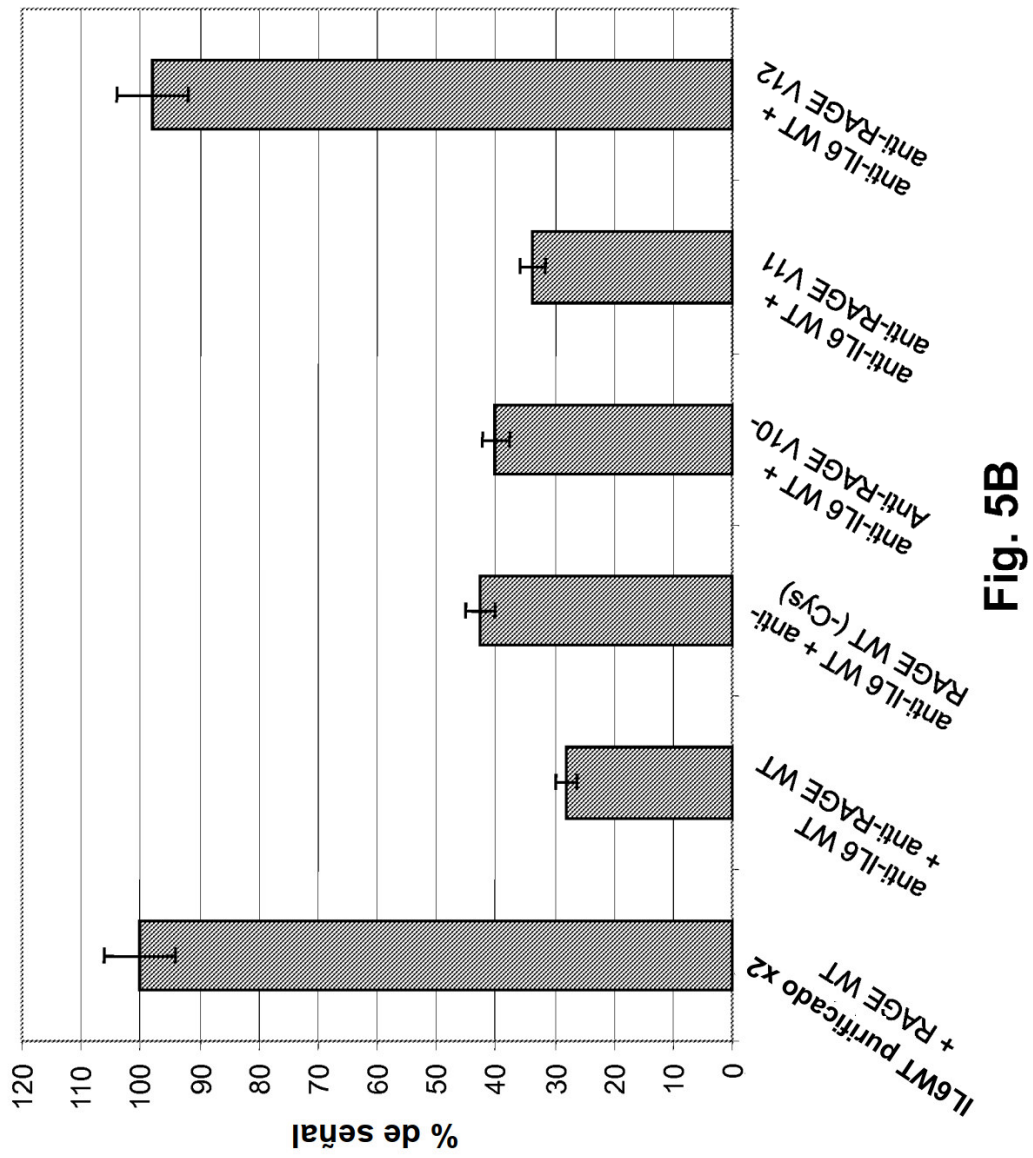


Fig. 5A



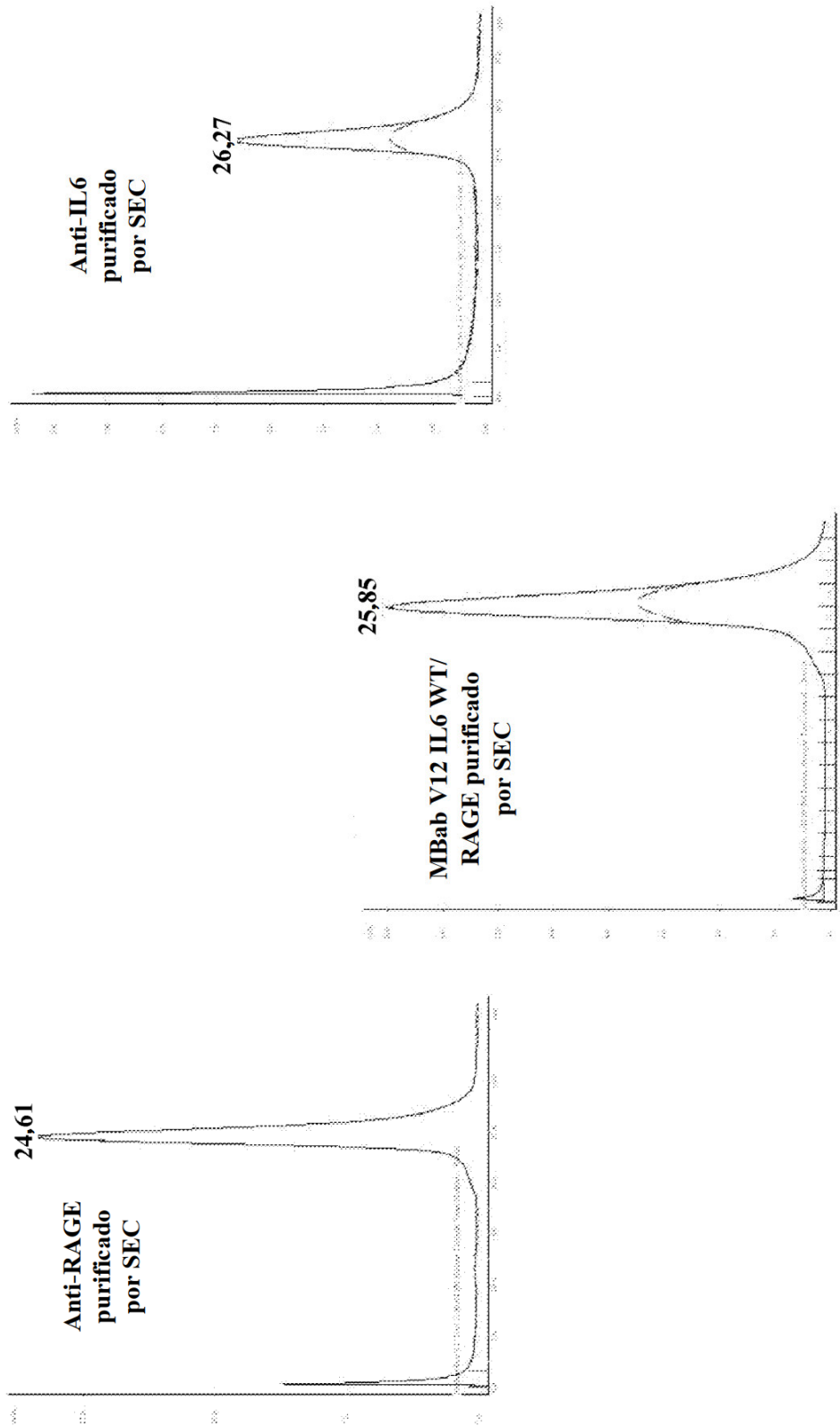


Fig. 6A

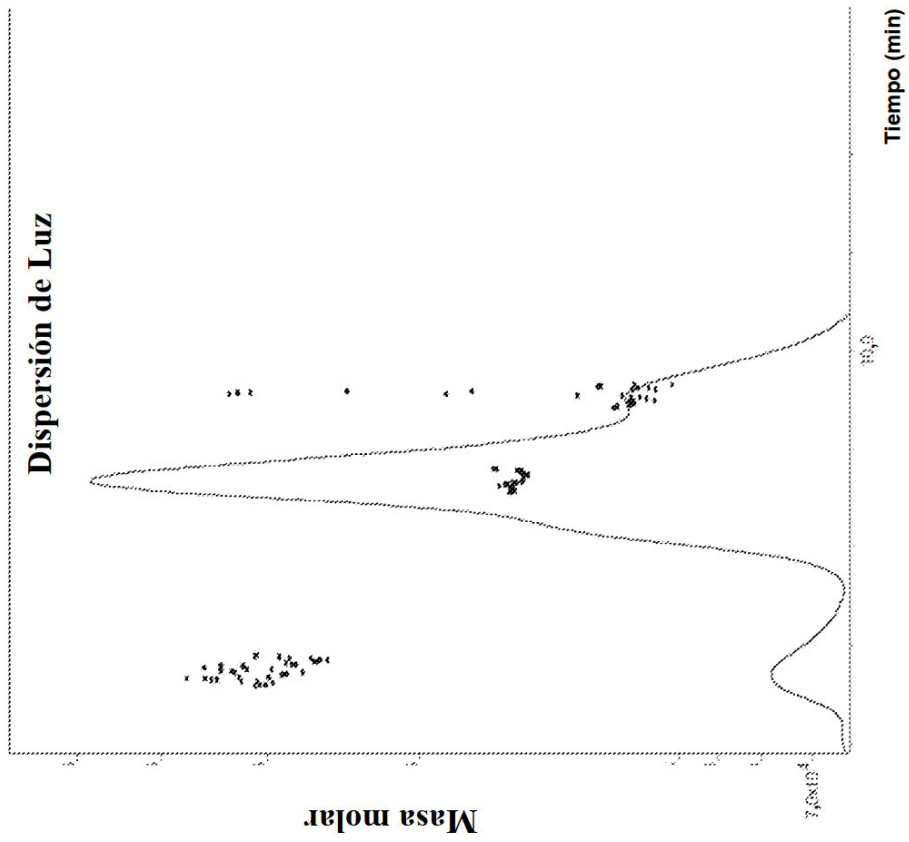
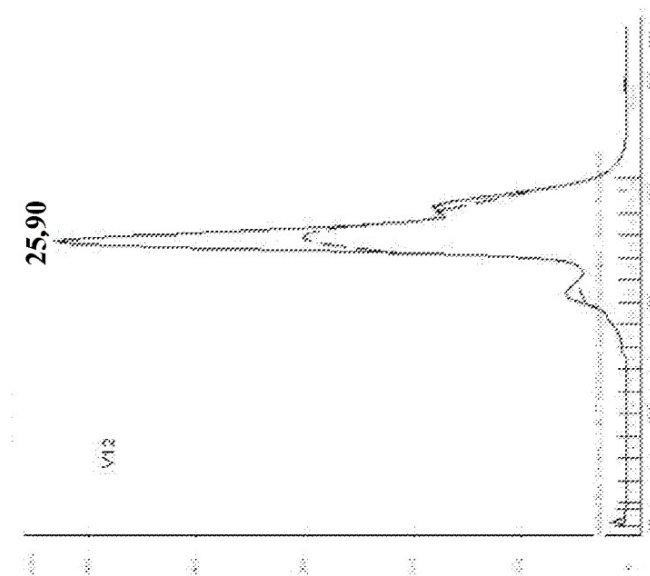


Fig. 6B



2H2L monomérico al 85 %
1H1L monomérico al 10 %
Agregados al 5 %

M 1 2

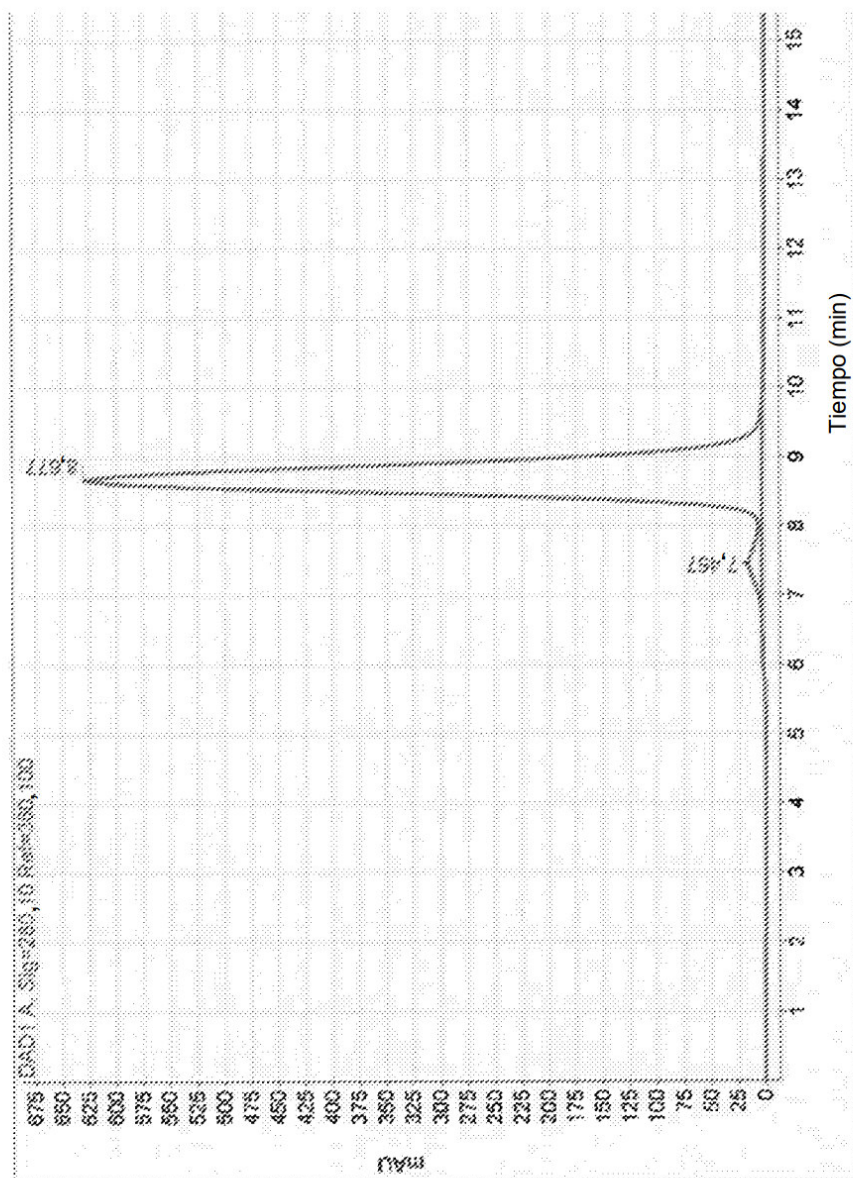
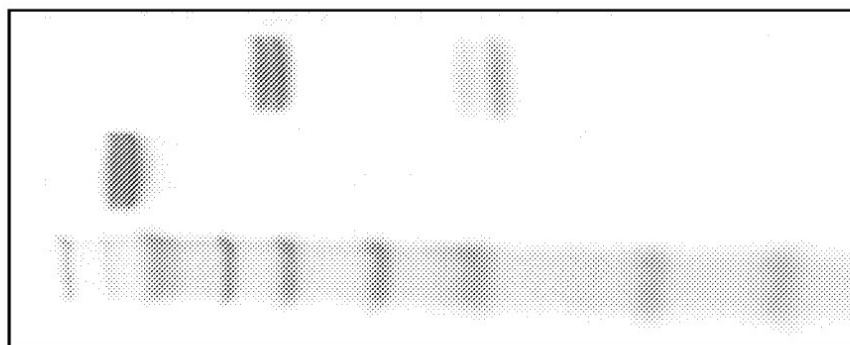


Fig. 7A

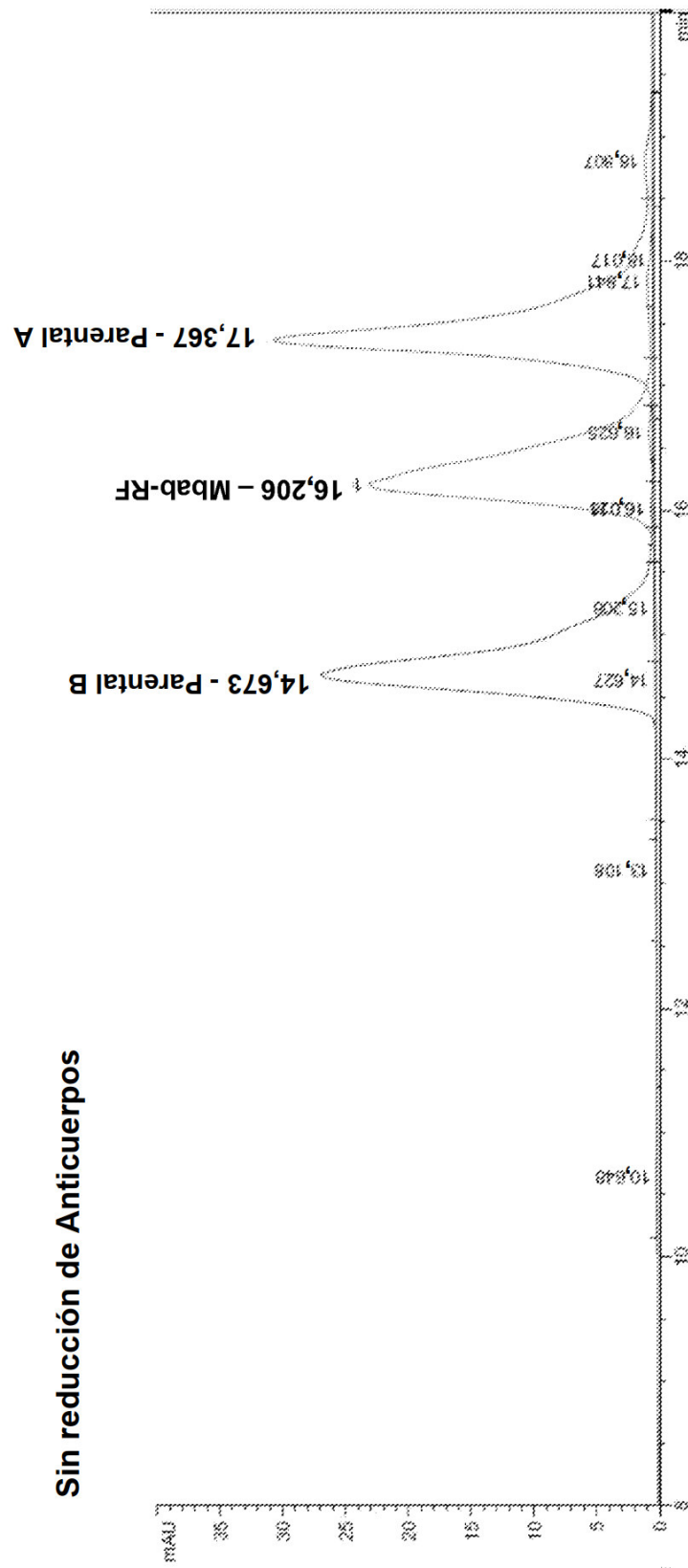


Fig. 7B

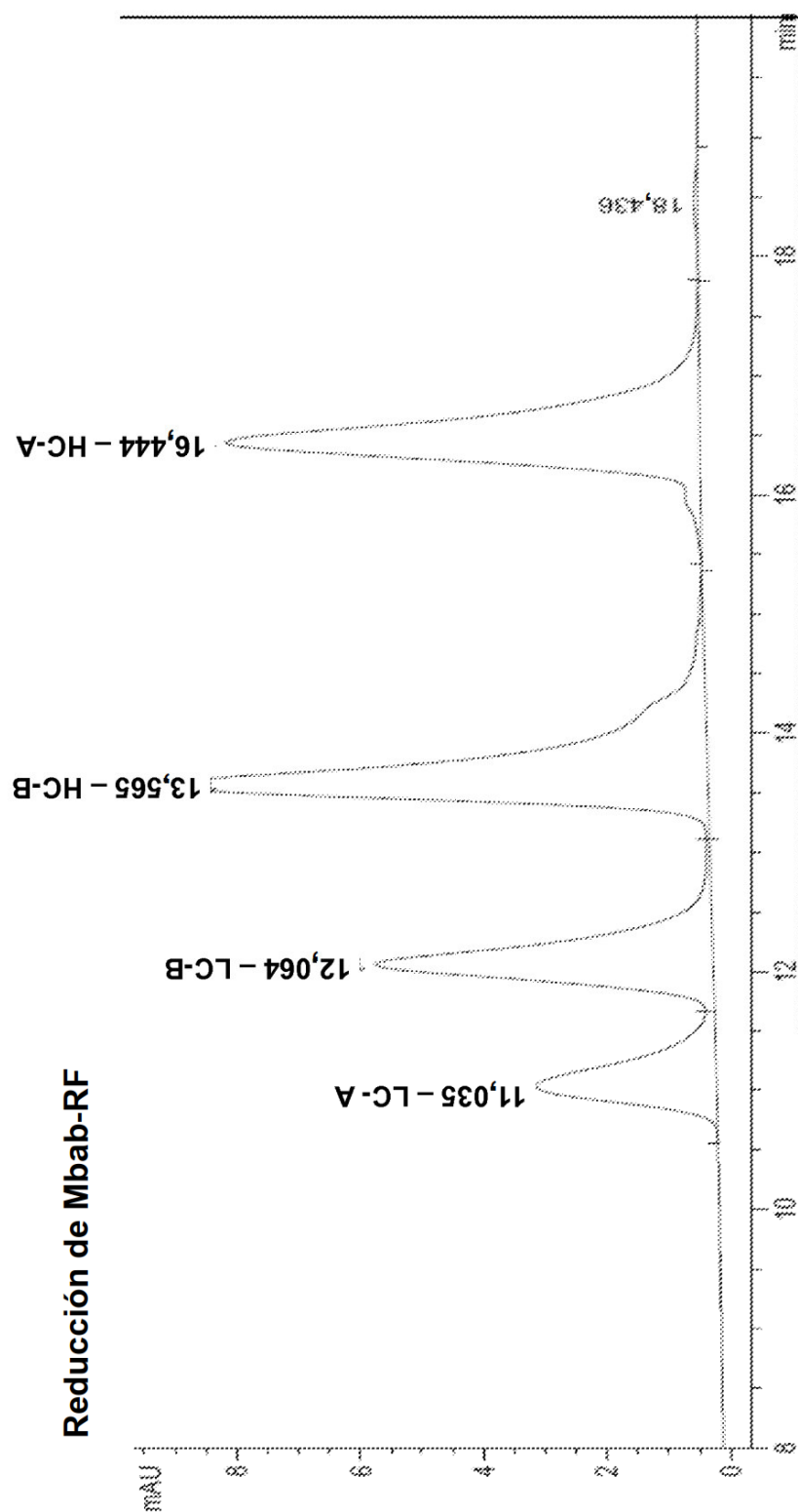


Fig. 7C

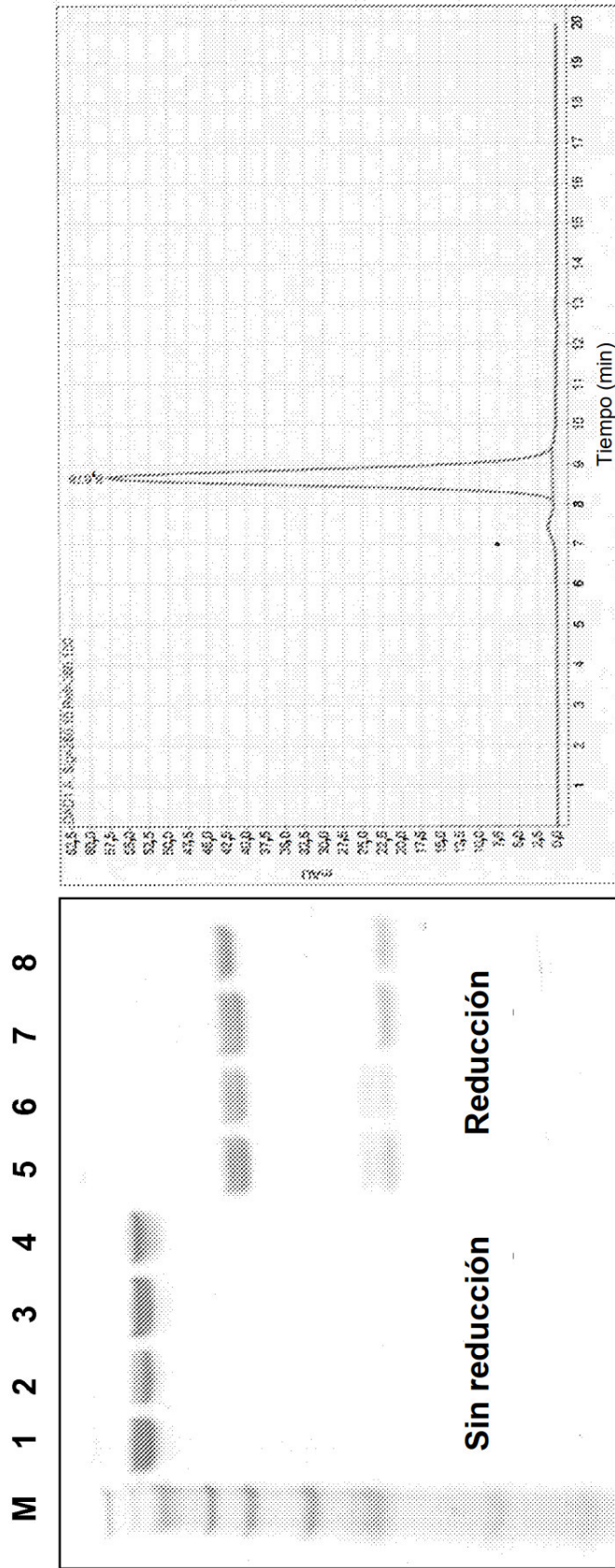


Fig. 8A

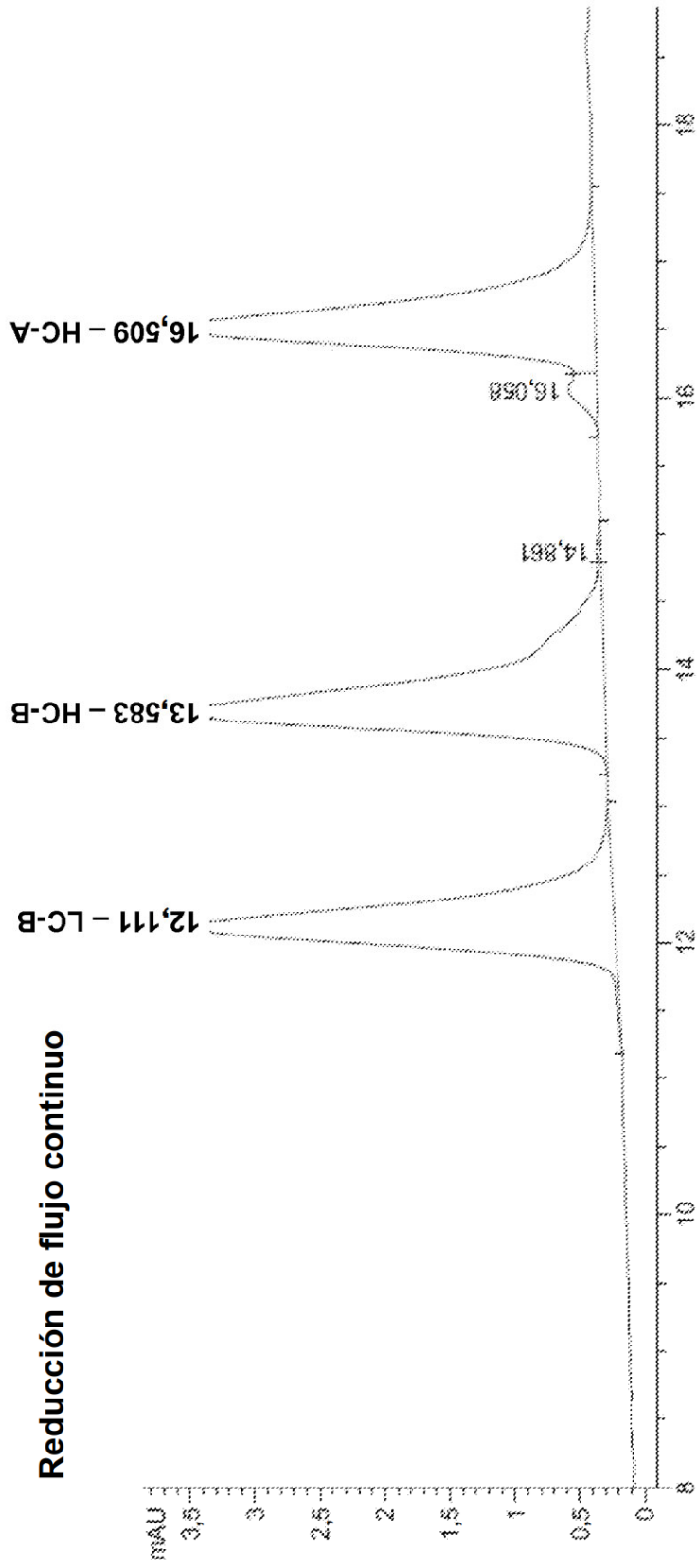


Fig. 8B

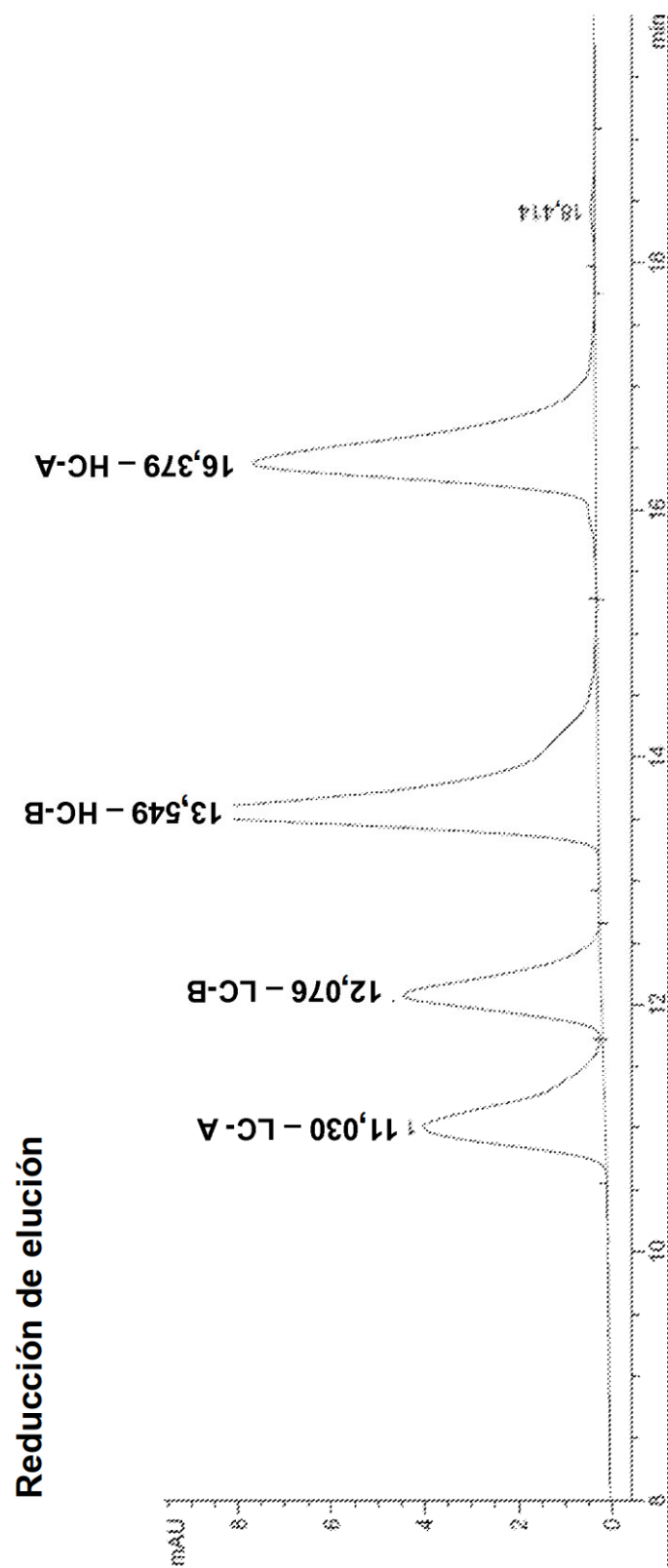


Fig. 8C

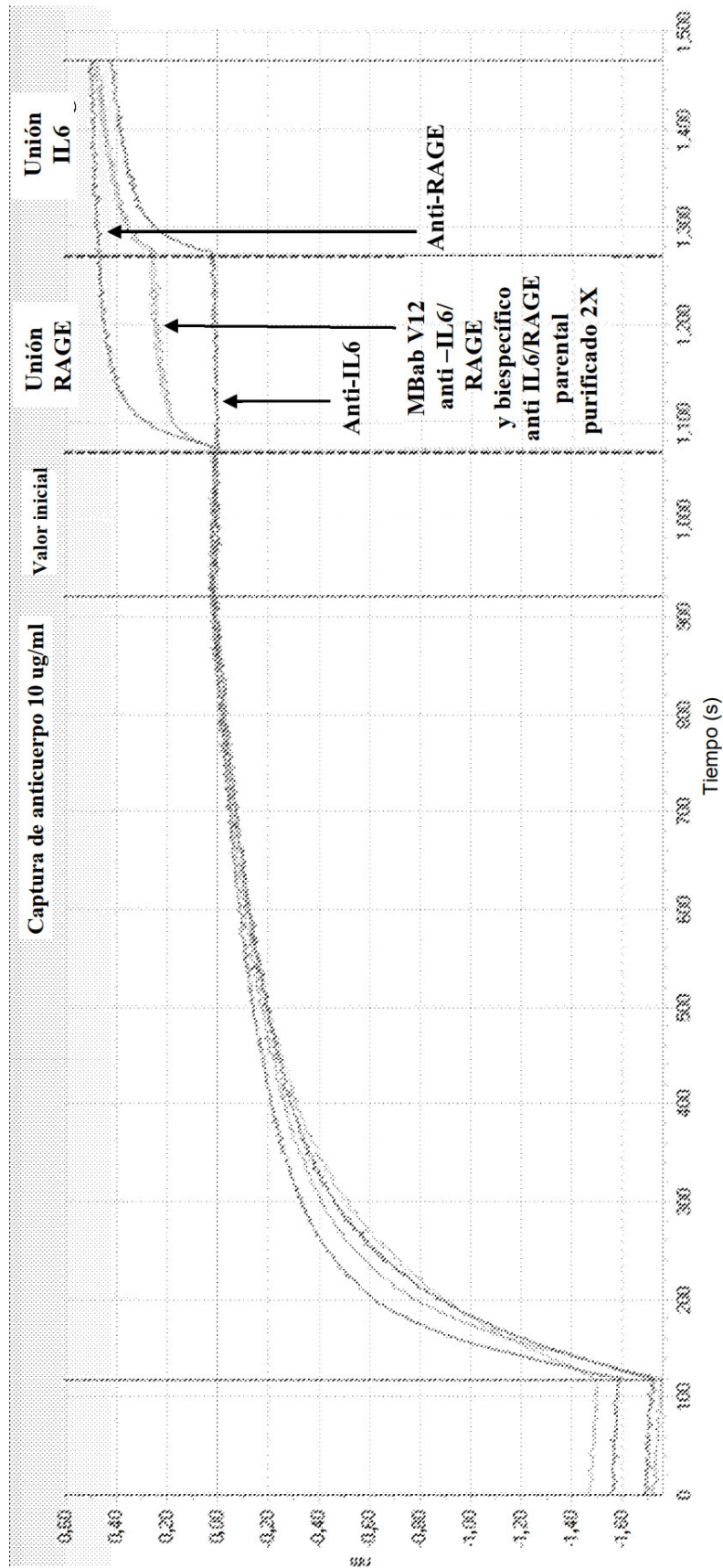


Fig. 9A

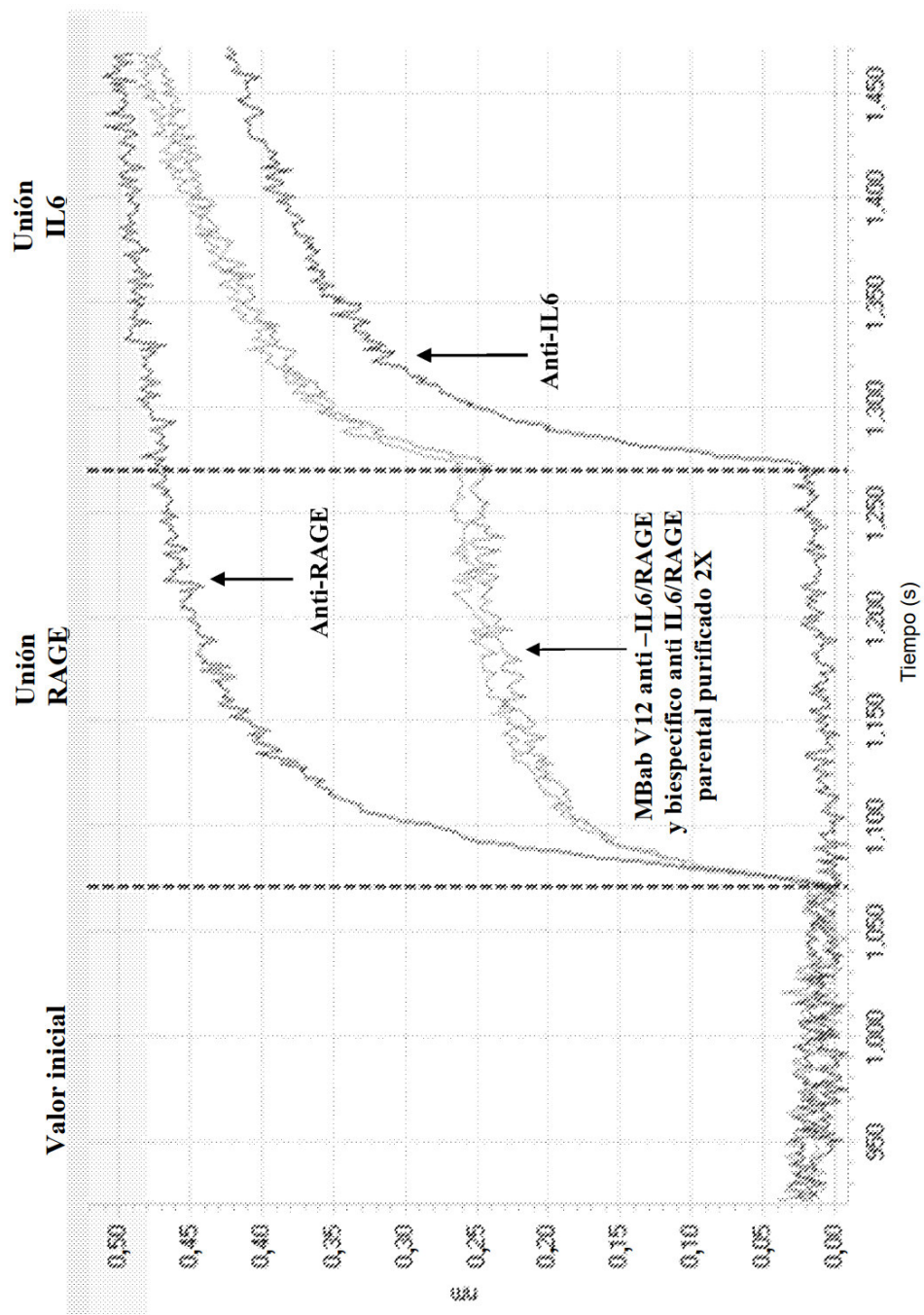


Fig. 9B

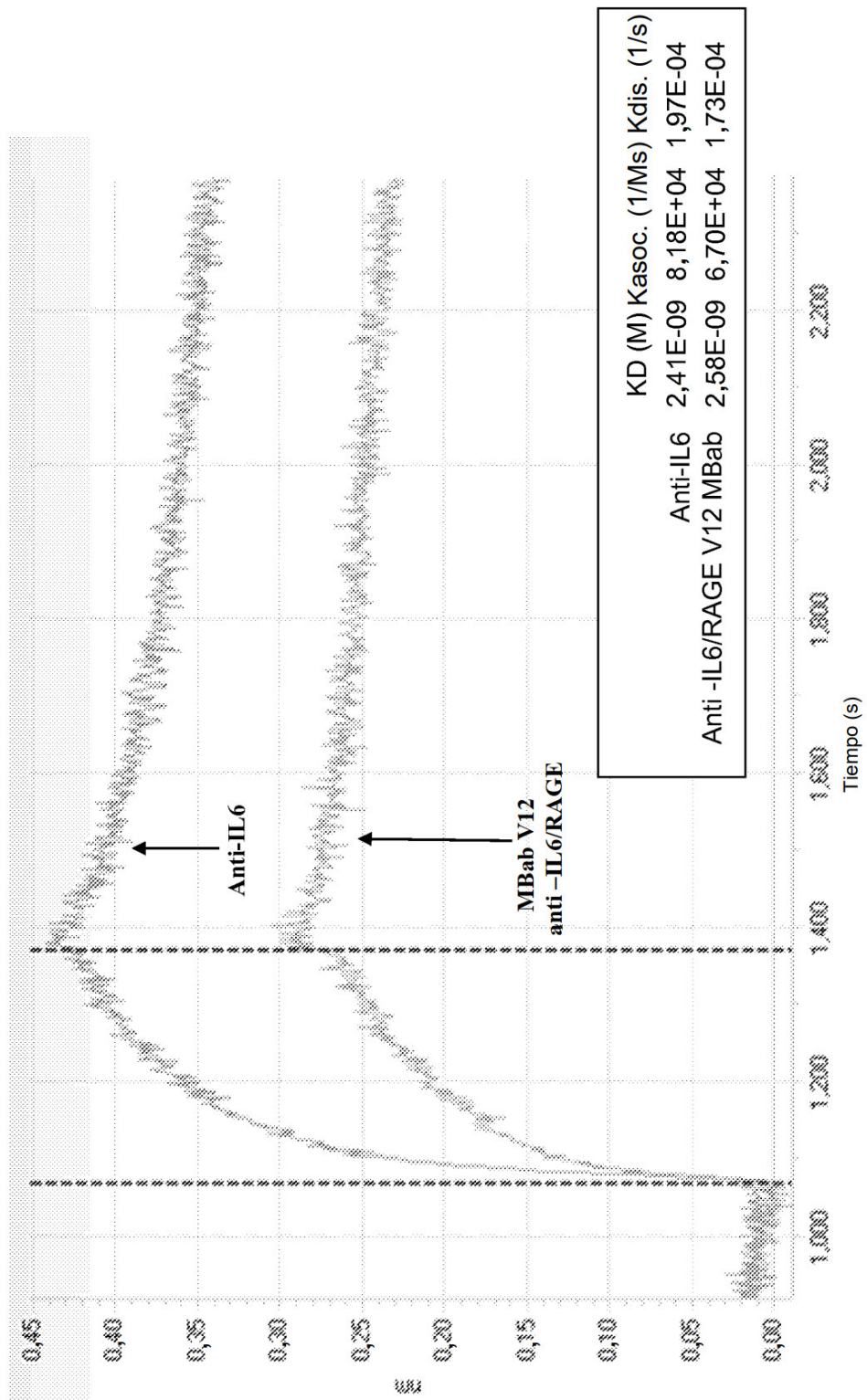


Fig. 10A

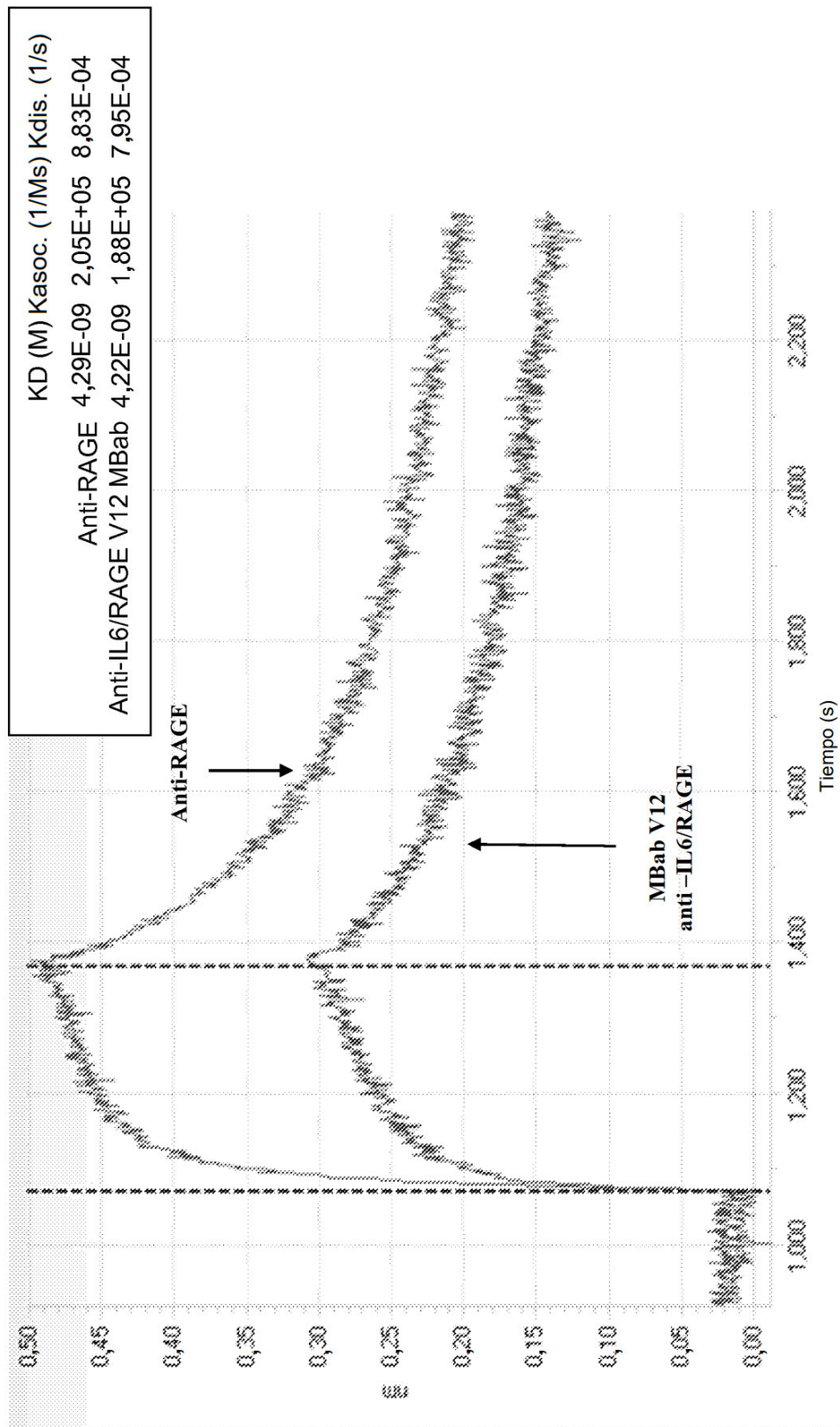


Fig. 10B

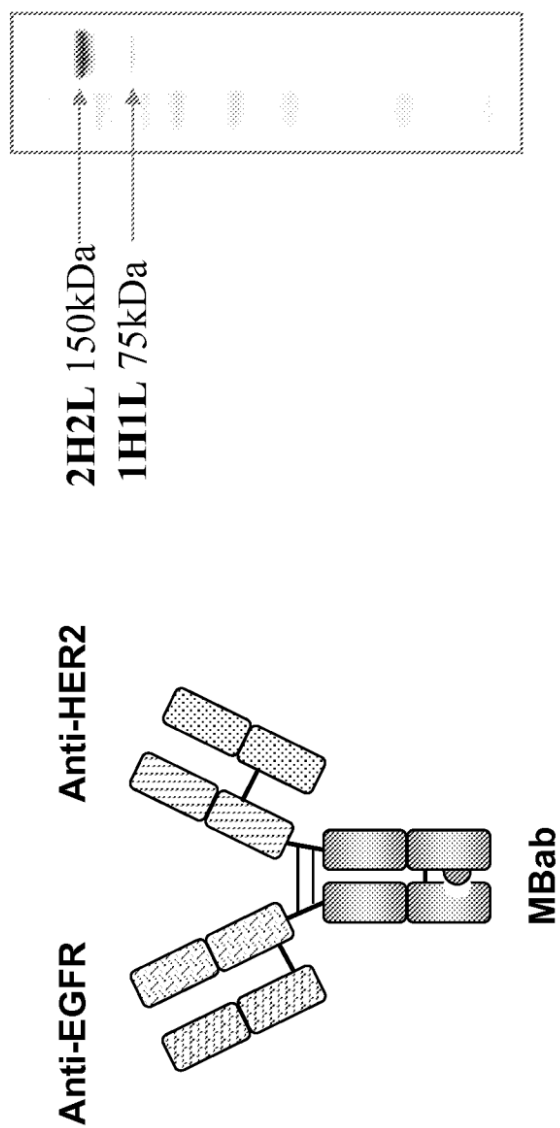


Fig. 11A

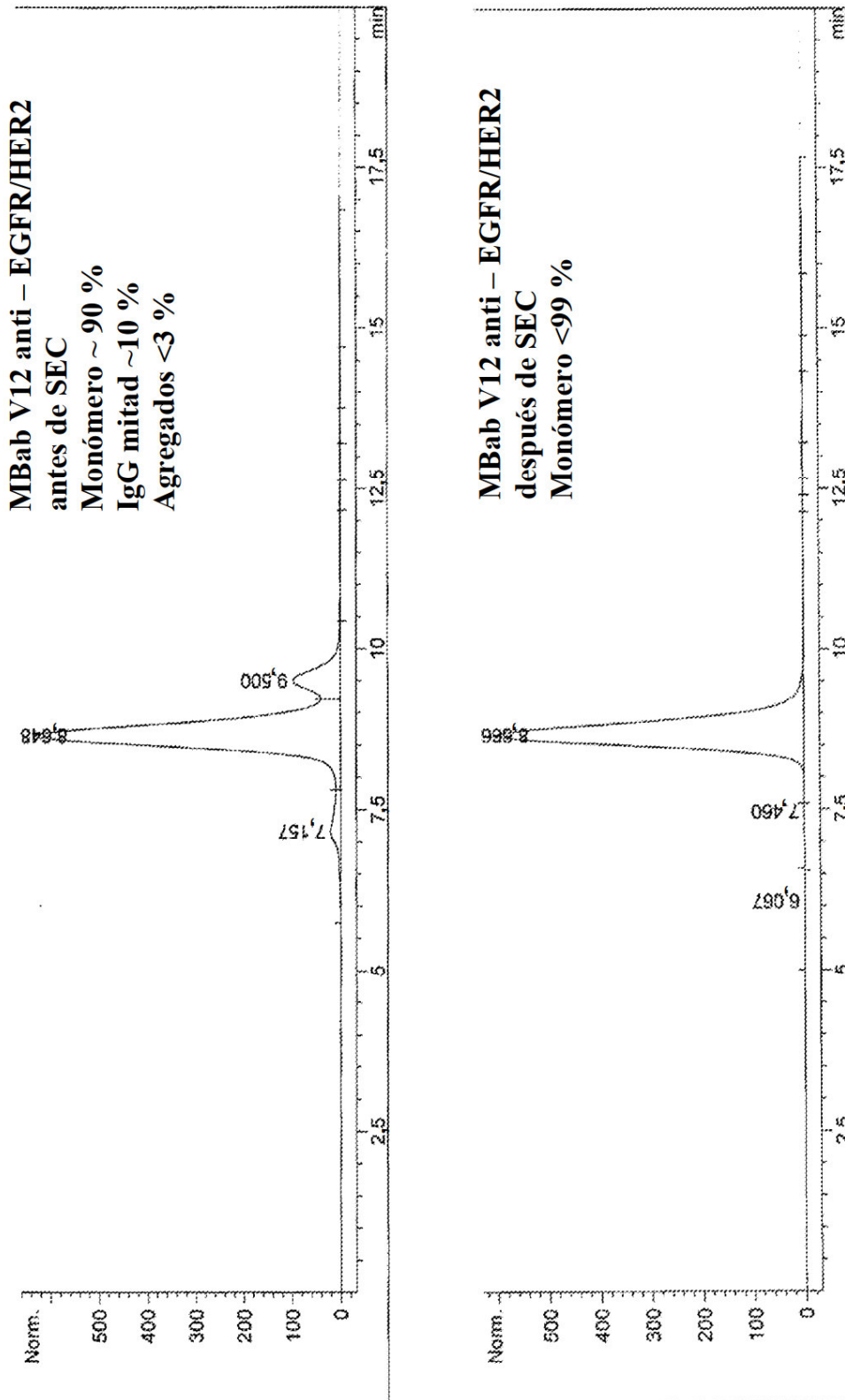


Fig. 11B

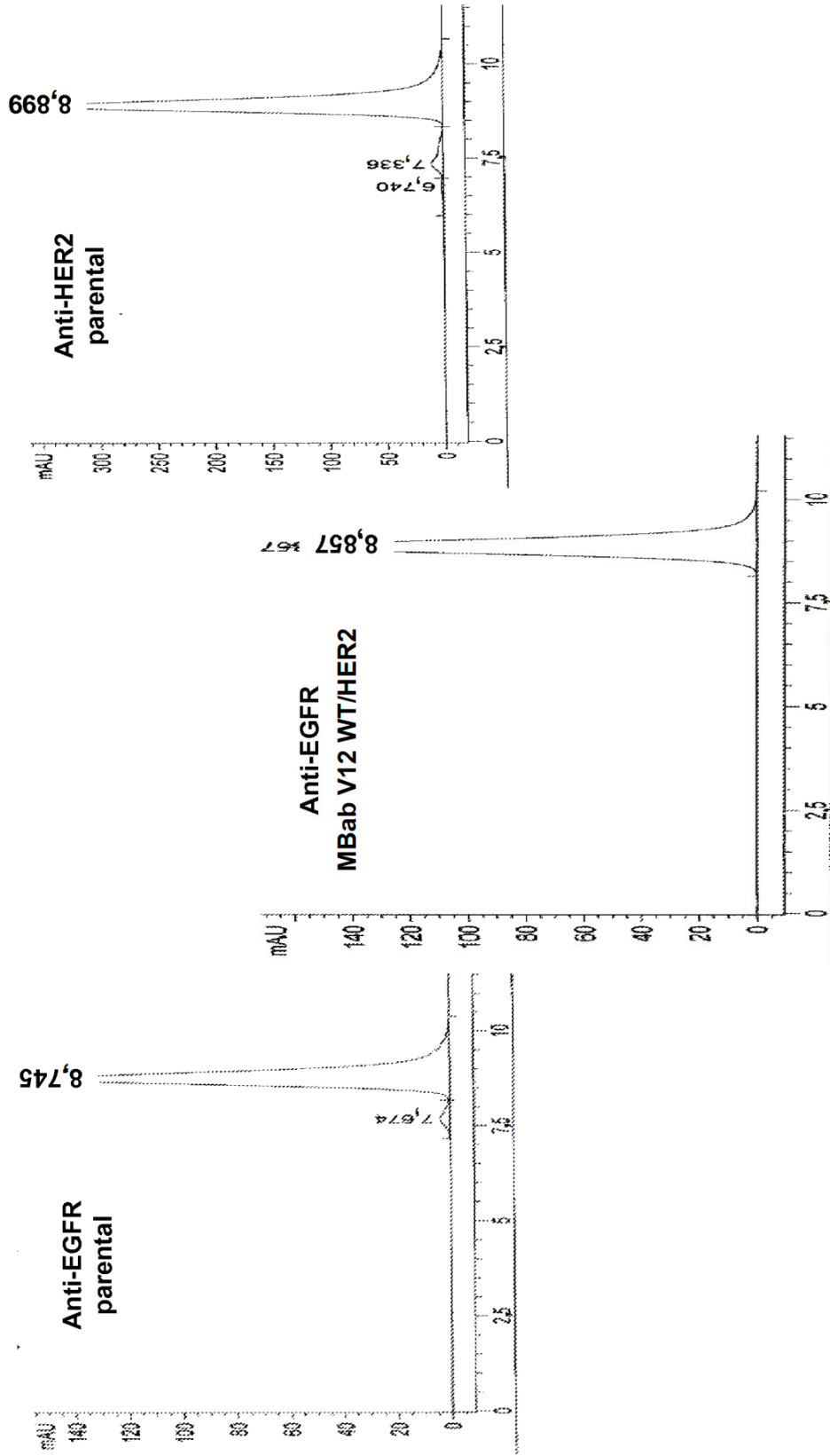


Fig. 11C

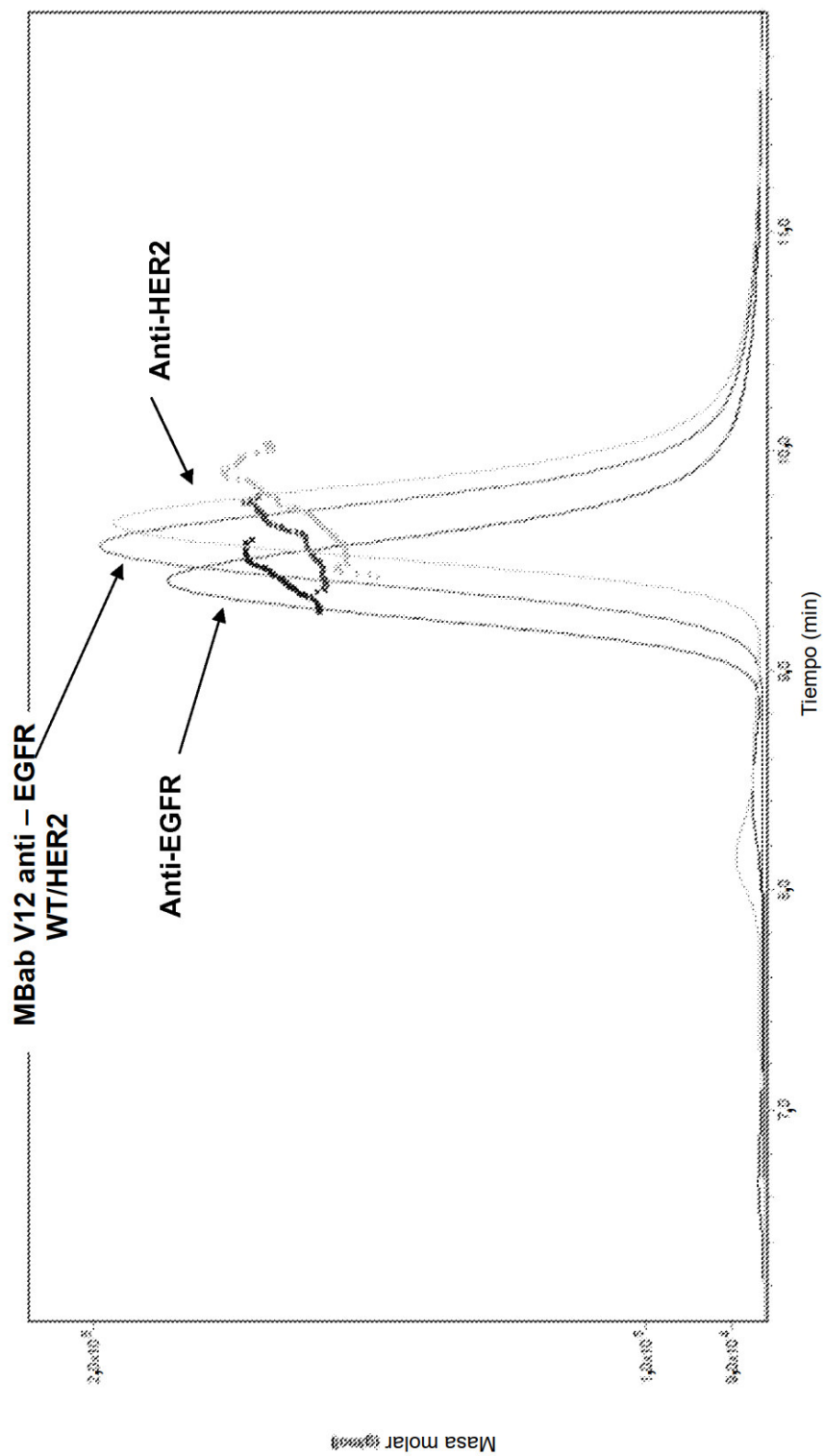


Fig. 11D

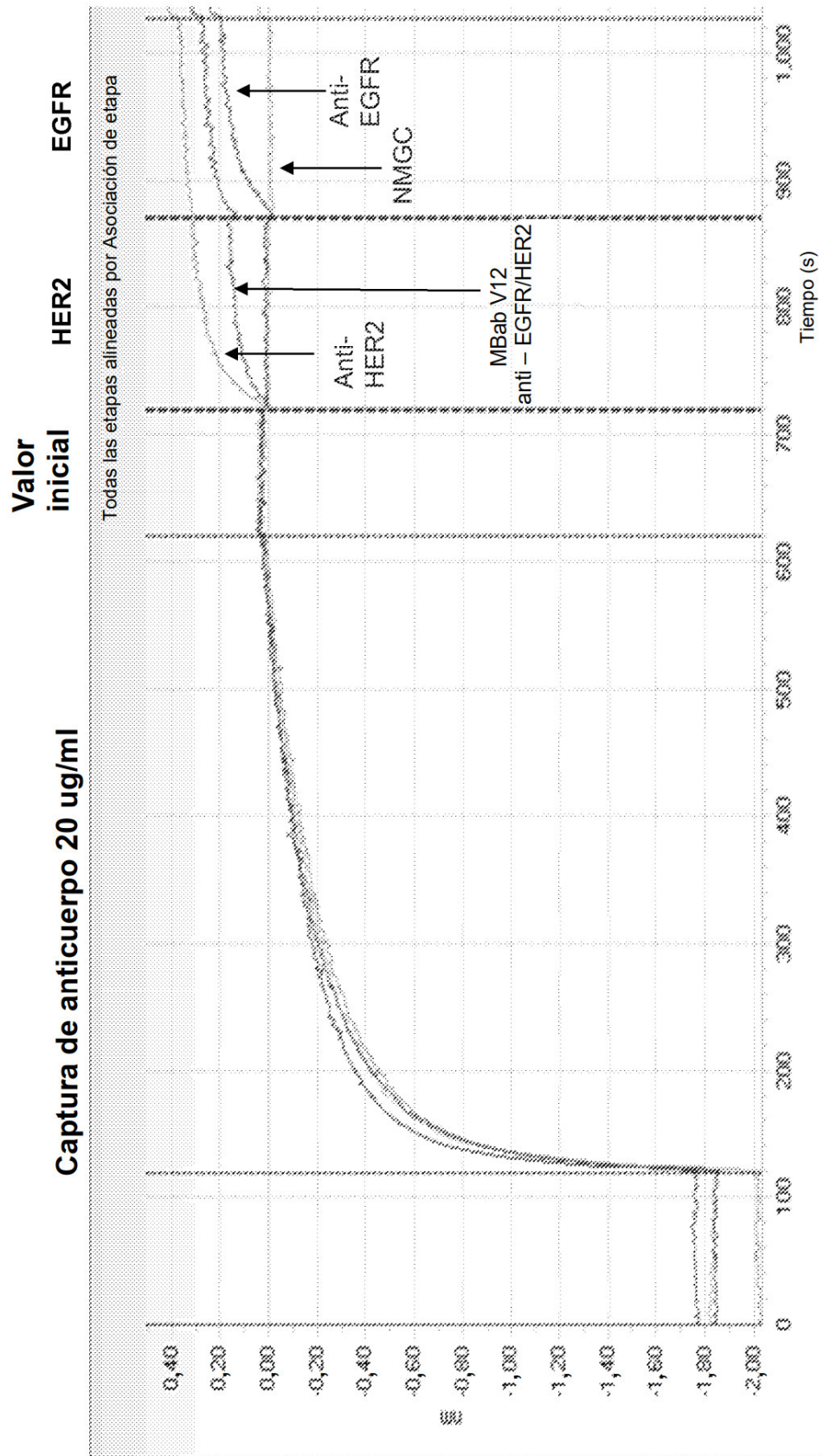


Fig. 12A

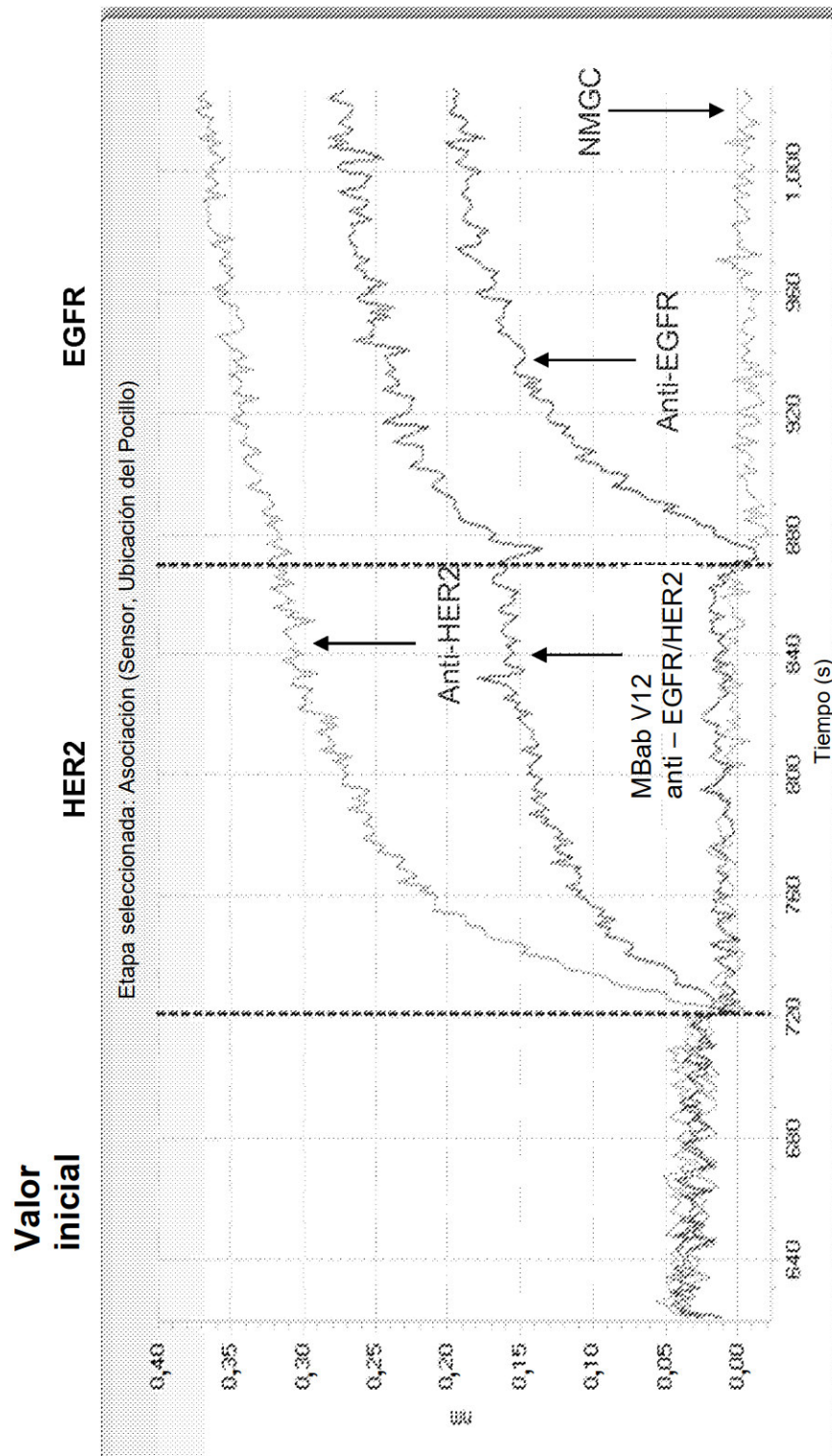


Fig. 12B

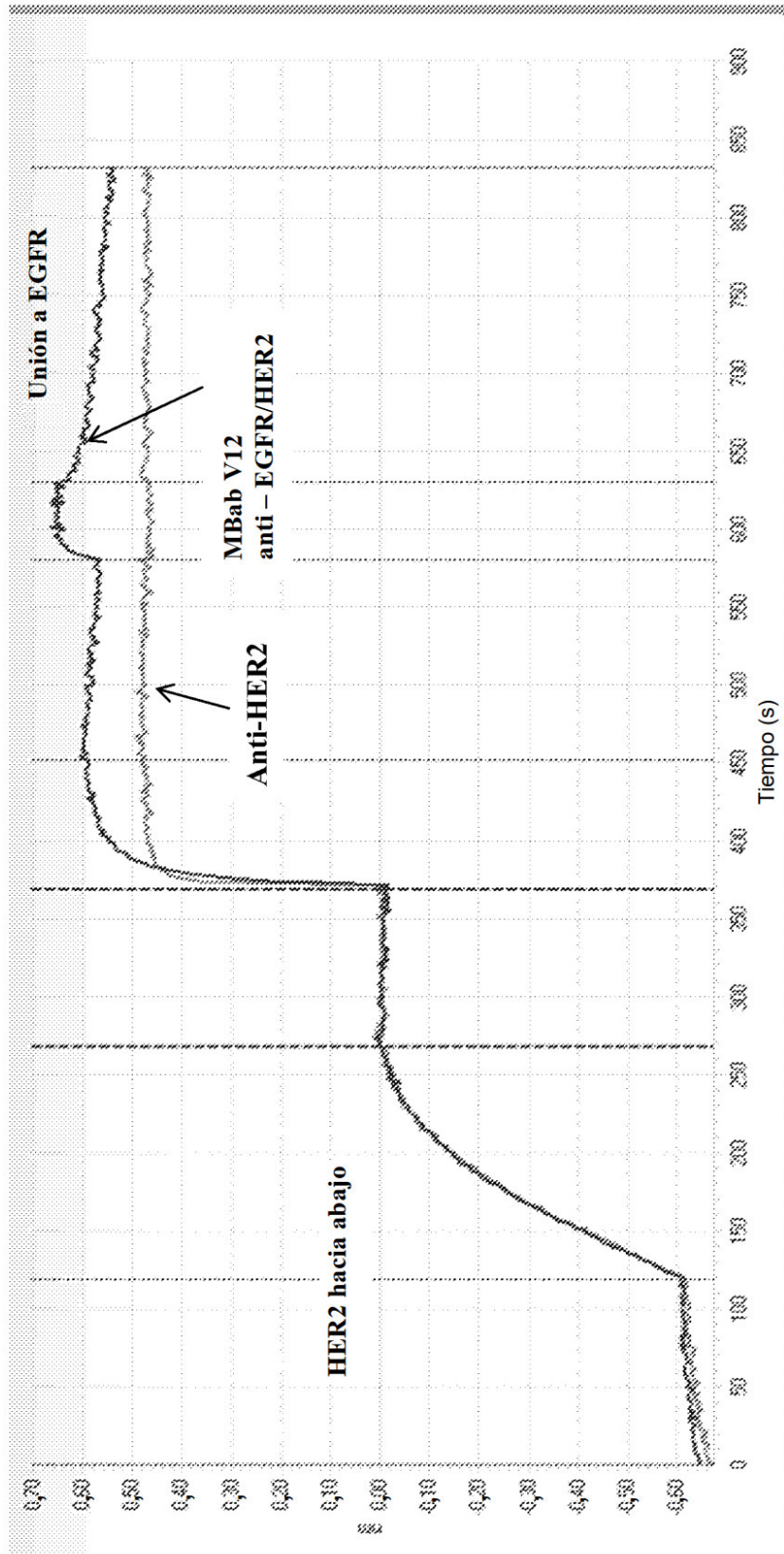


Fig. 13A

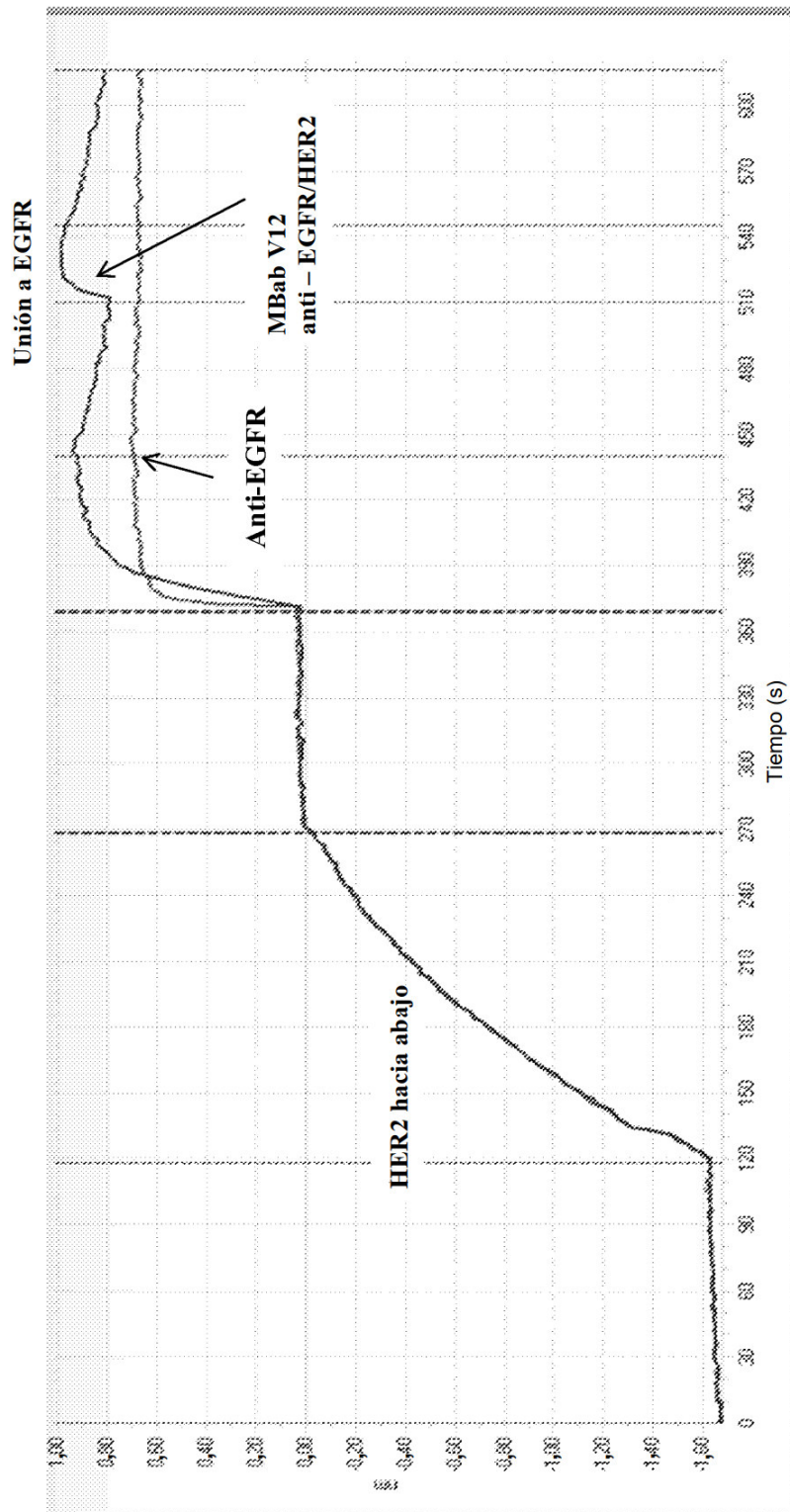


Fig. 13B

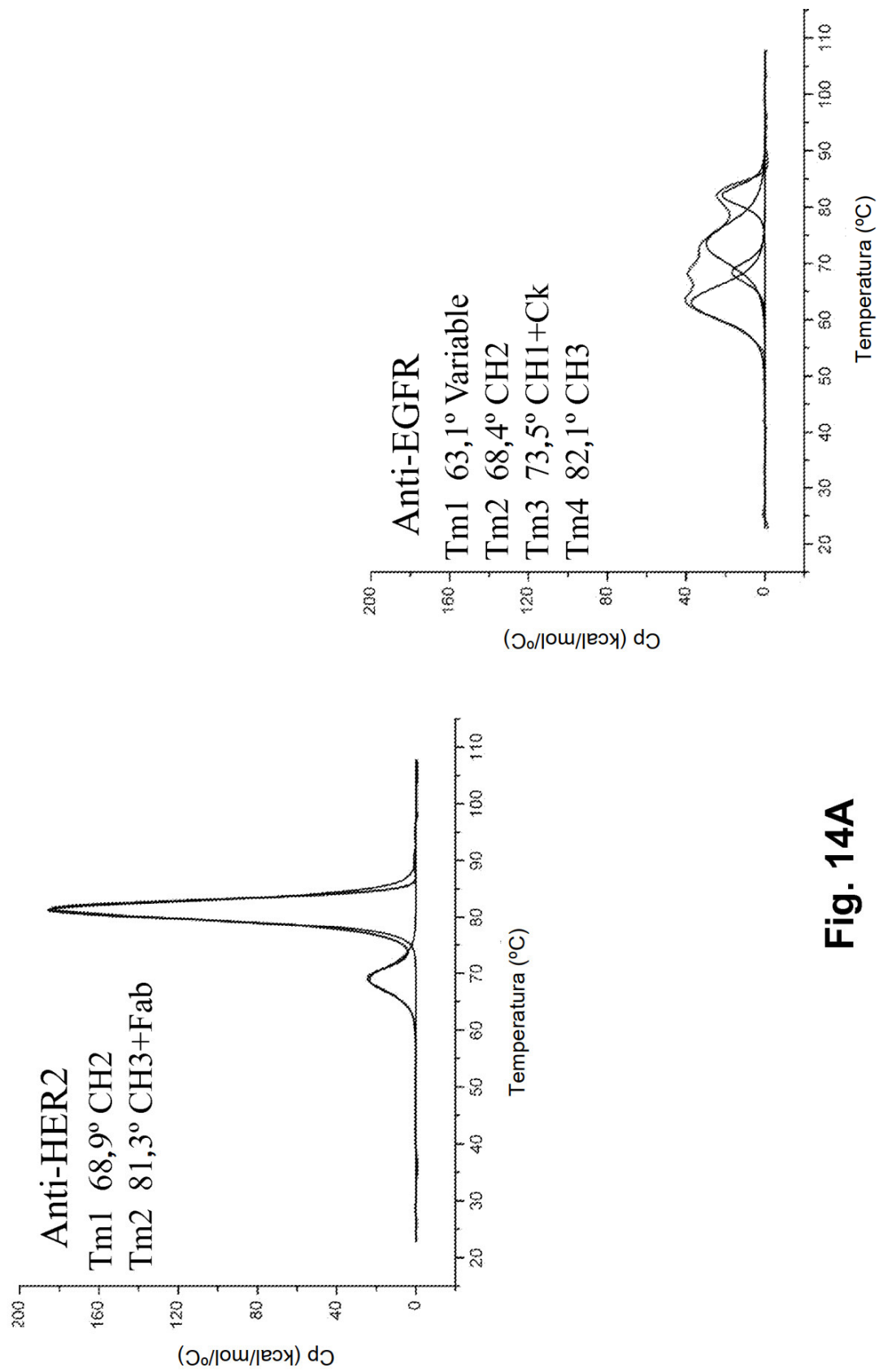


Fig. 14A

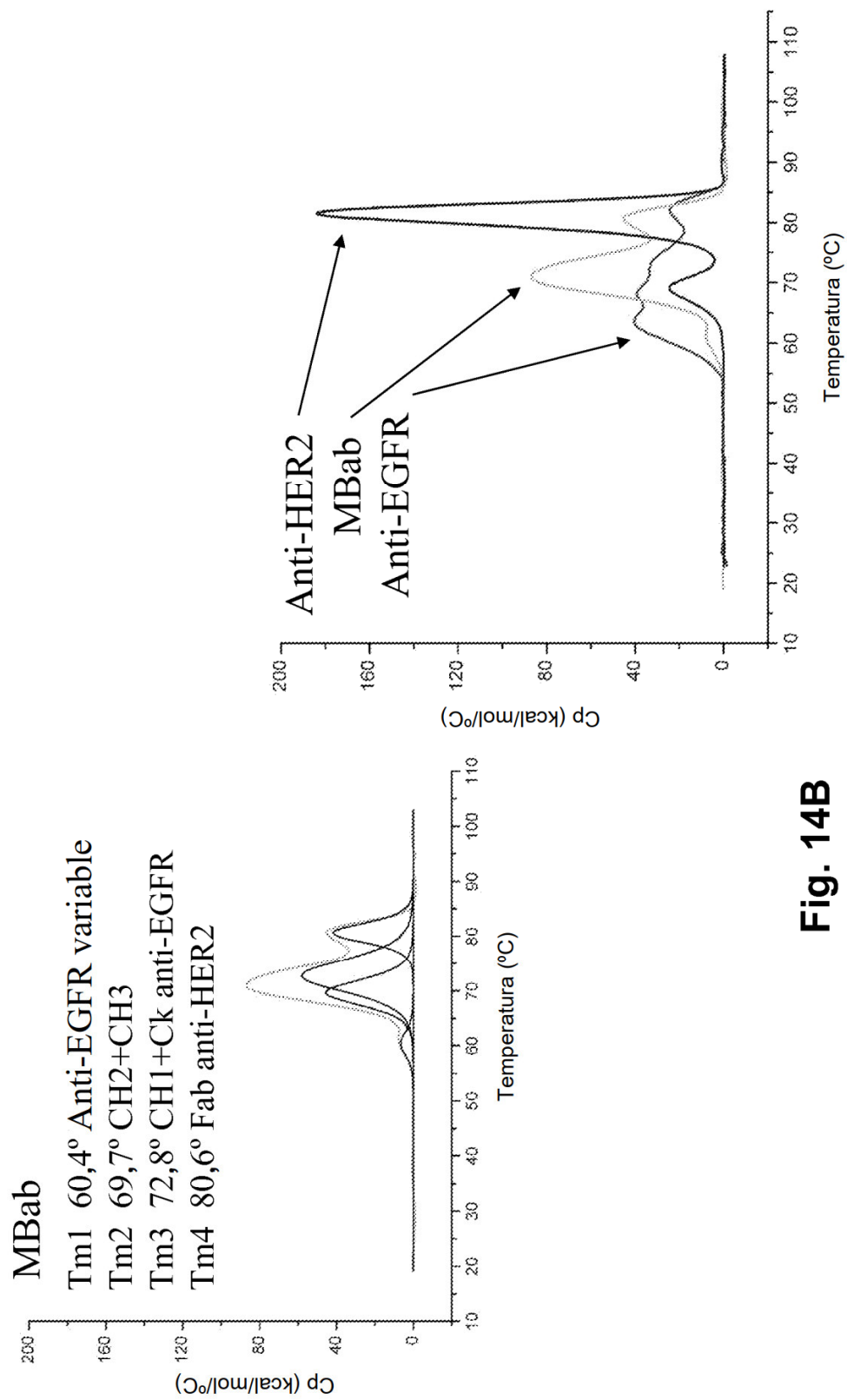
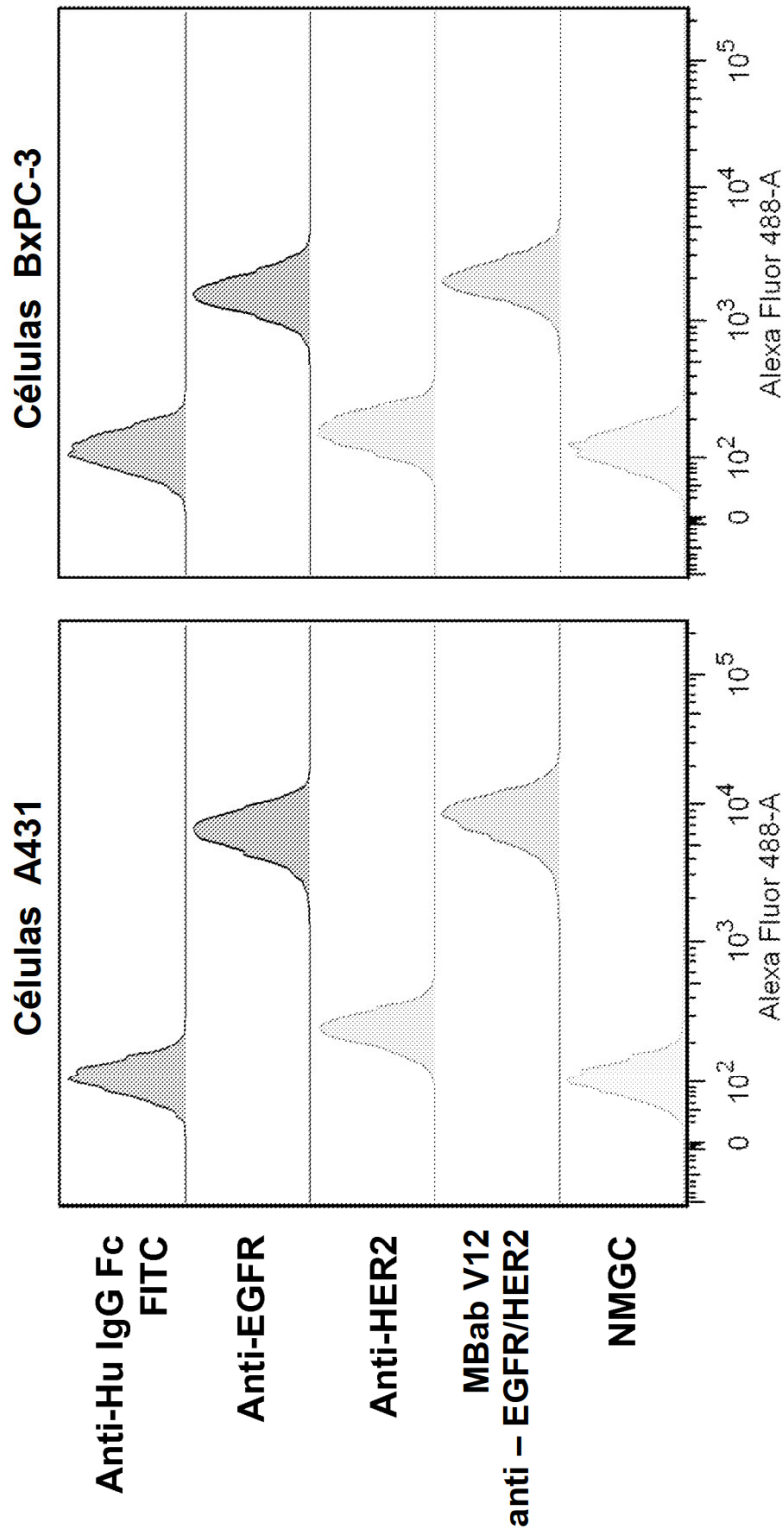


Fig. 14B



Línea celular	Tipo	EGFR	HER2
A431	Epidérmico	83,3 x 10 ⁴	3,3 x 10 ⁴
BxPC-3	Páncreas	20,3 x 10 ⁴	1,1 x 10 ⁴

Fig. 15A

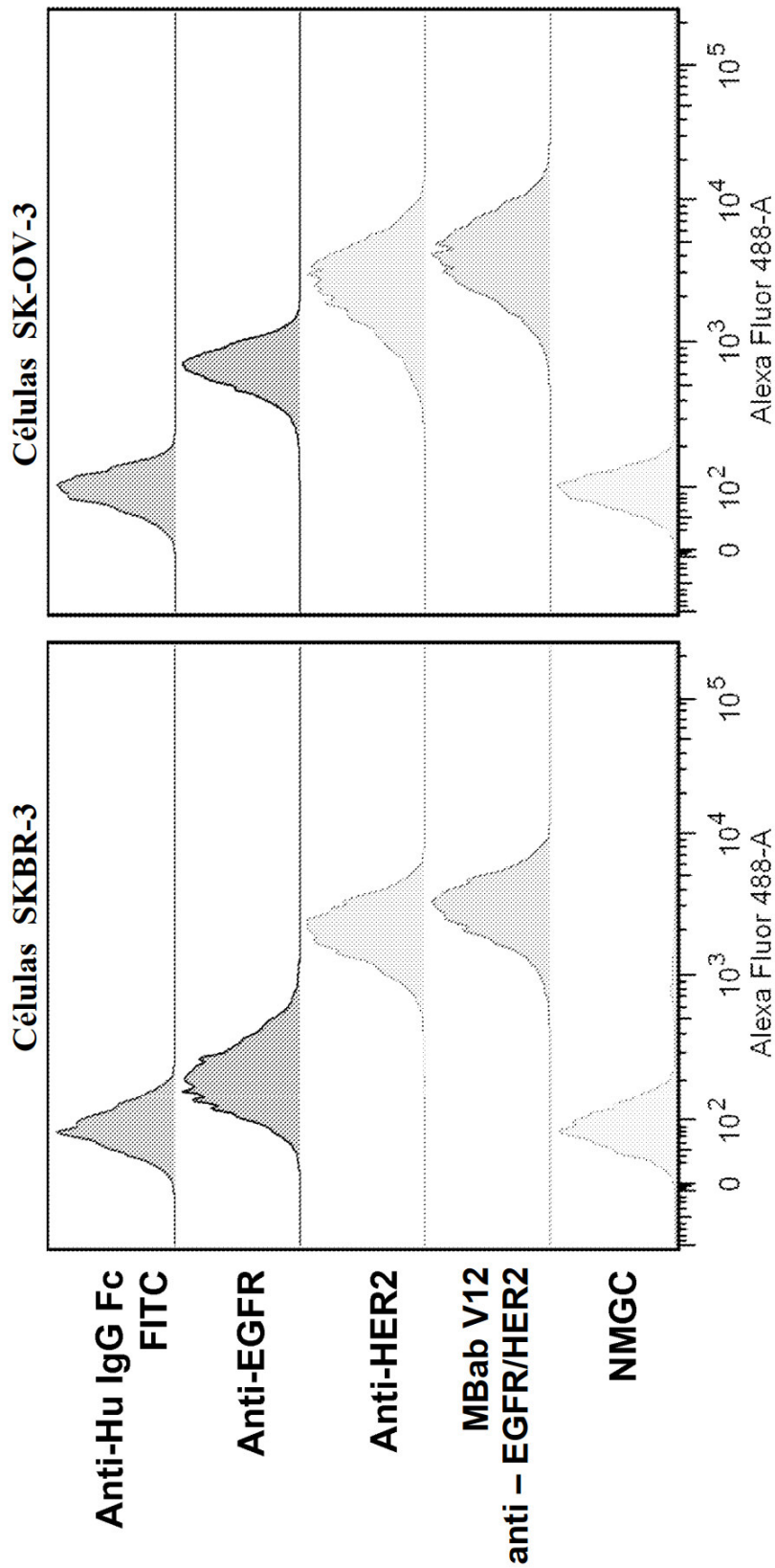
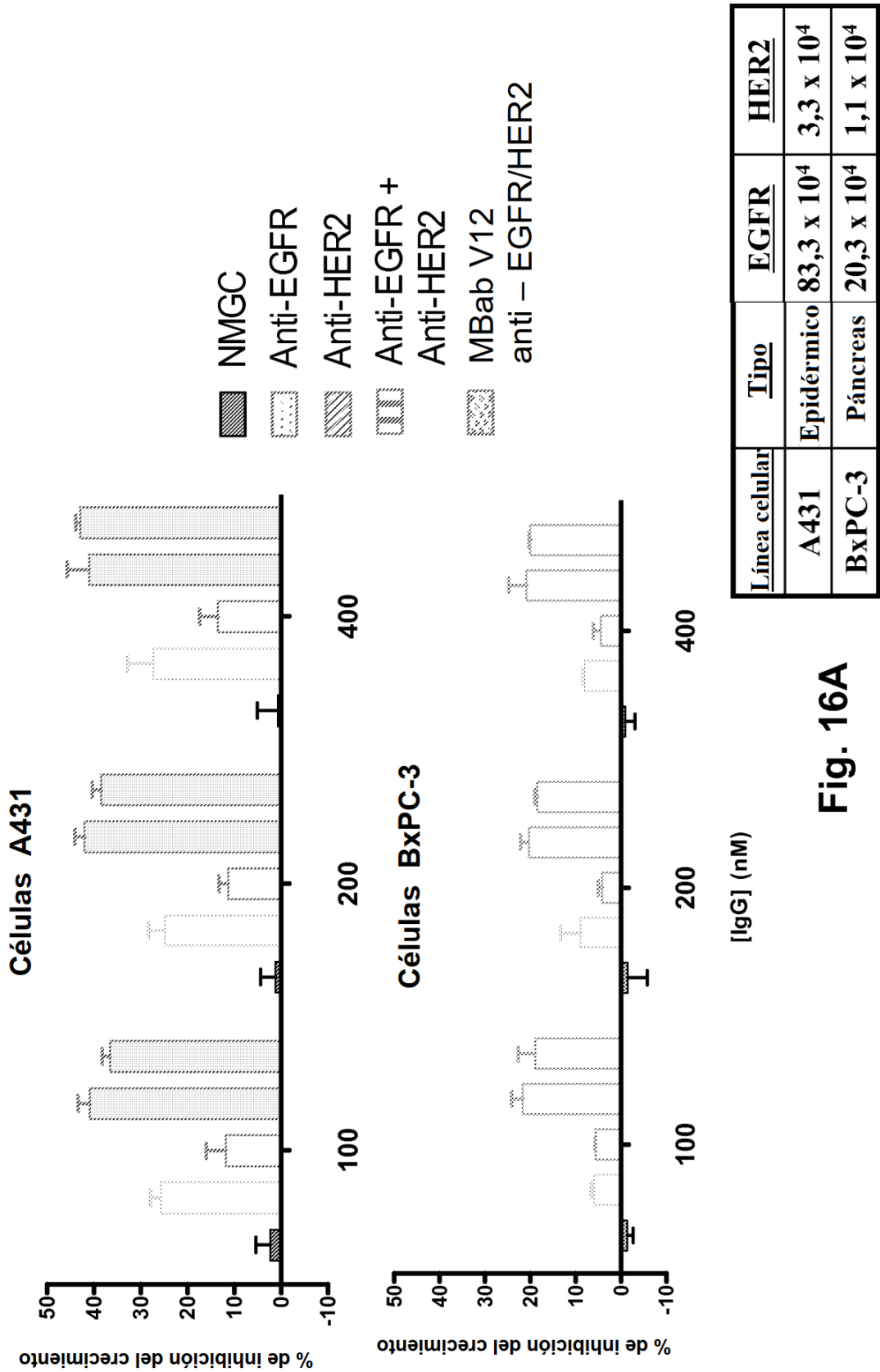


Fig. 15B

Línea celular	Tipo	EGFR	HER2
SKBR-3	Mama	4,2 x 10 ⁴	176 x 10 ⁴
SK-OV-3	Ovario	14,4 x 10 ⁴	34,5 x 10 ⁴



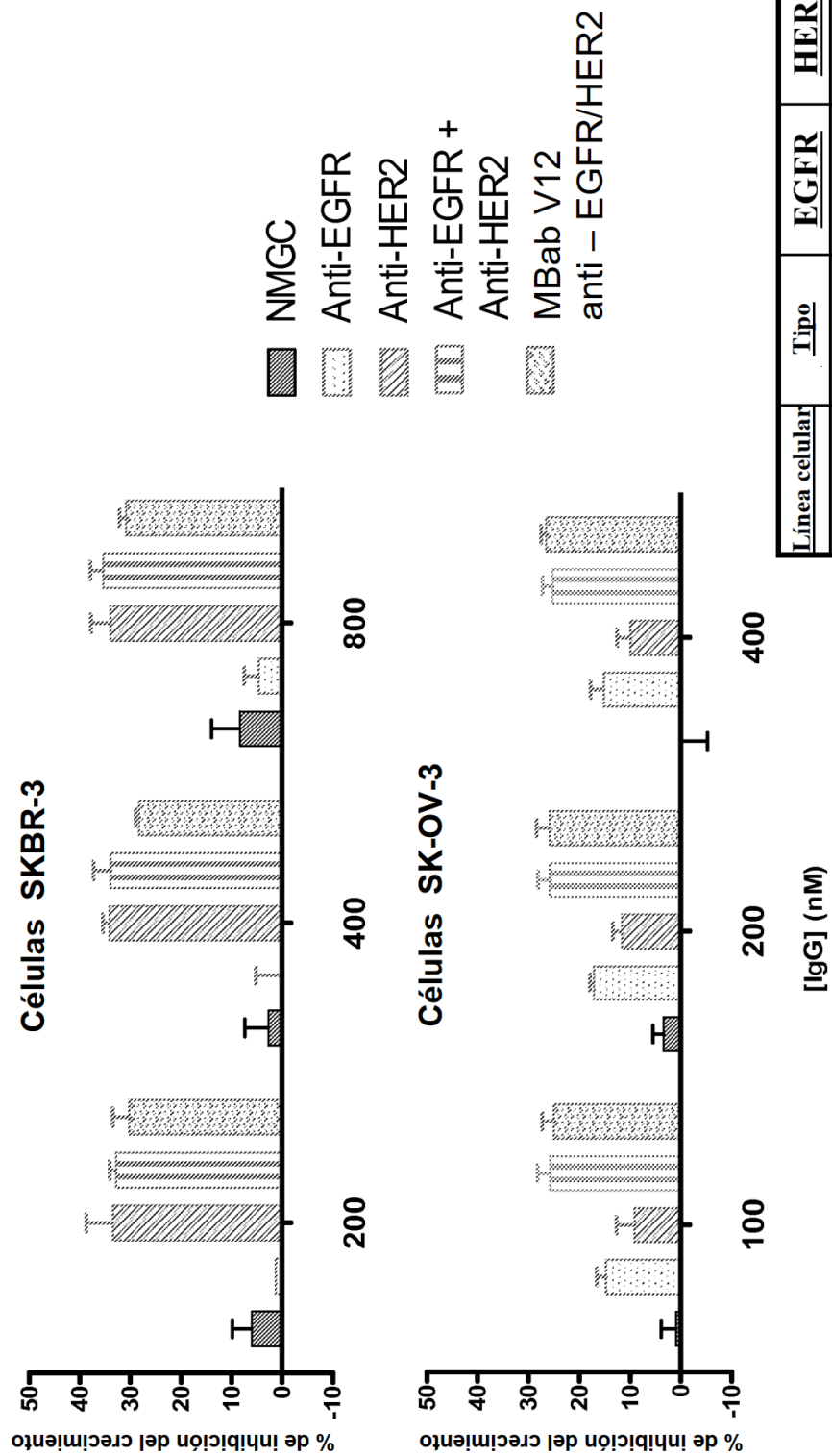


Fig. 16B

Línea celular	Tipo	EGFR	HER2
SKBR-3	Mama	4,2 x 10 ⁴	176 x 10 ⁴
SK-OV-3	Ovario	14,4 x 10 ⁴	34,5 x 10 ⁴

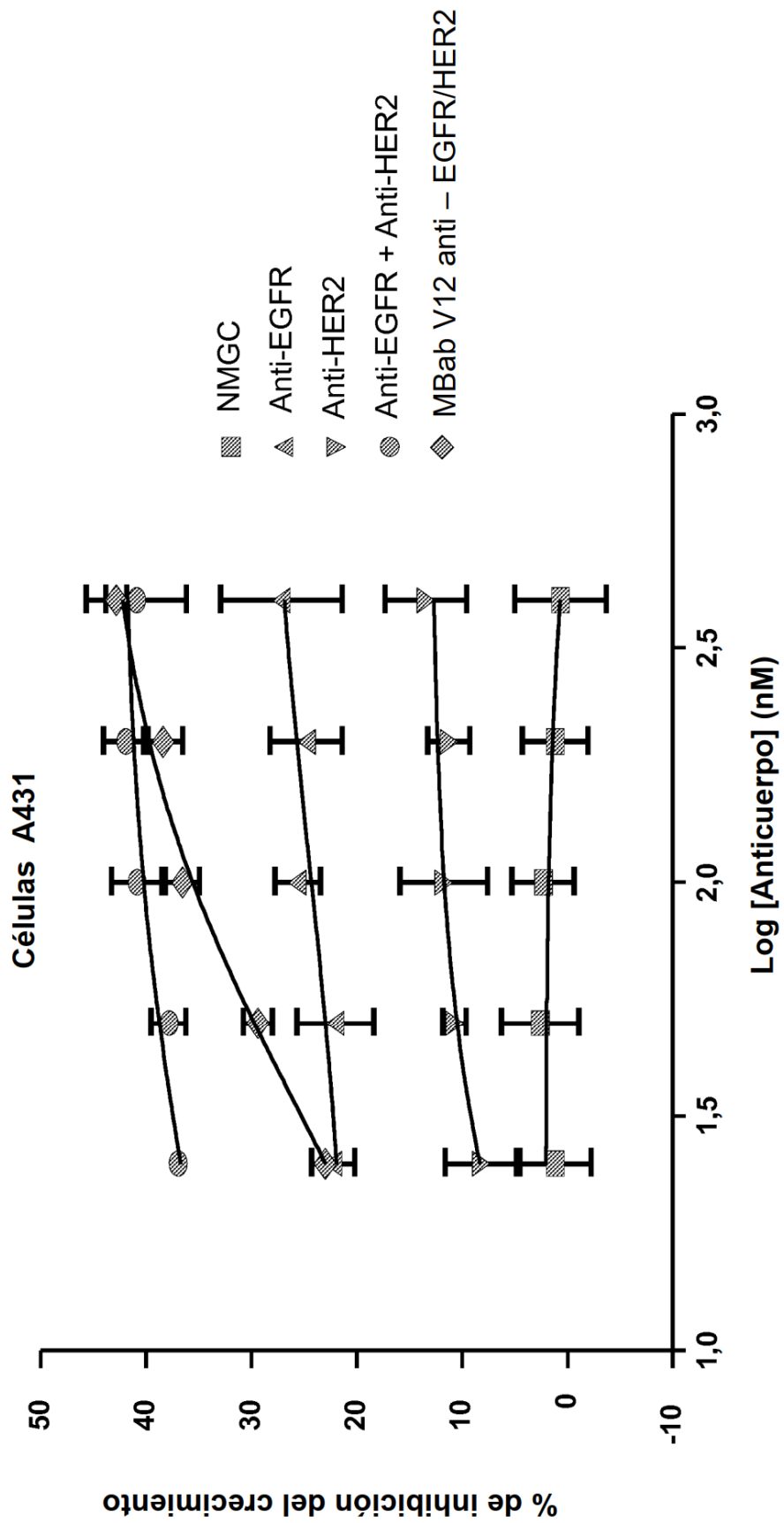


Fig. 16C

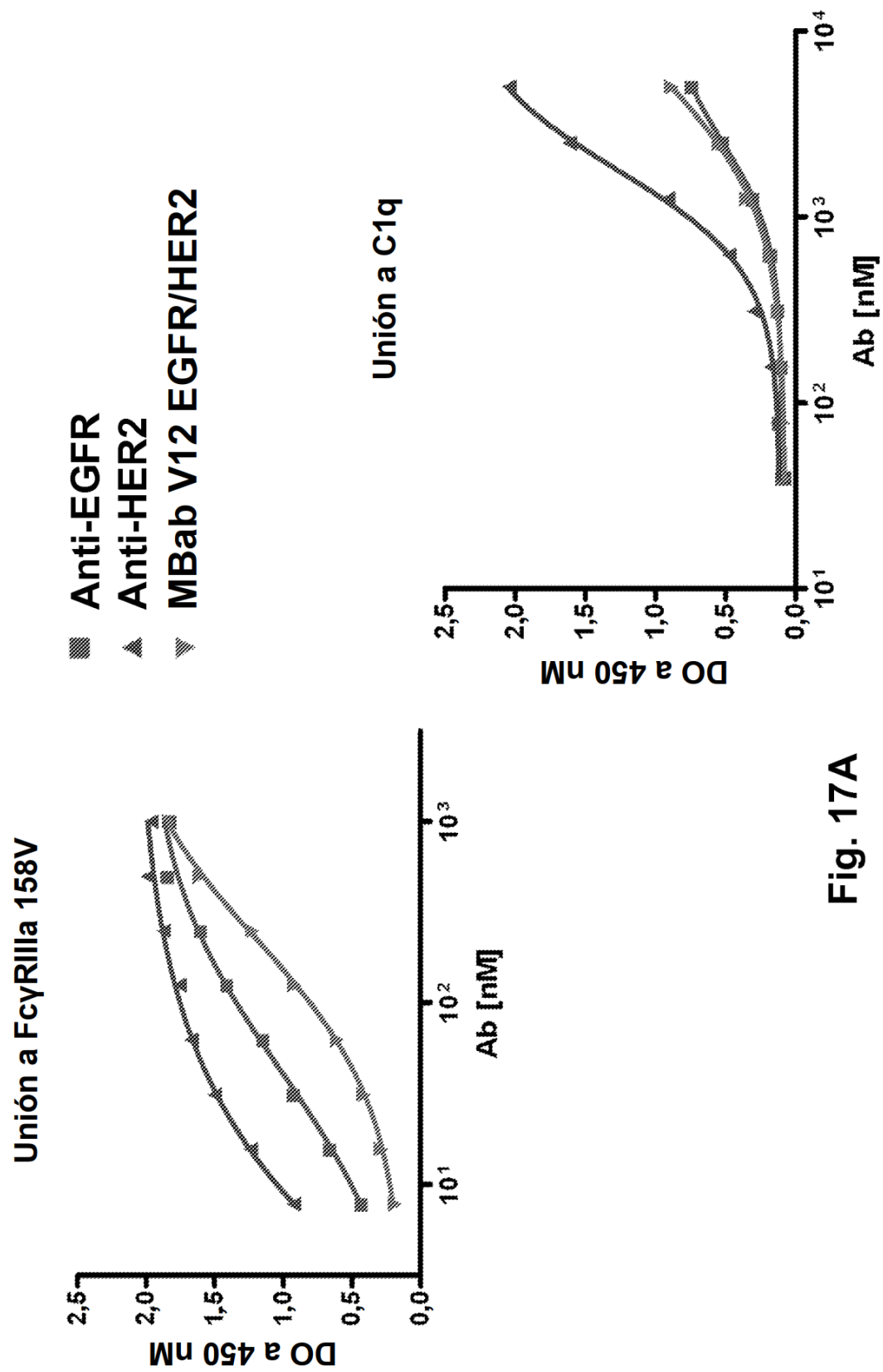


Fig. 17A

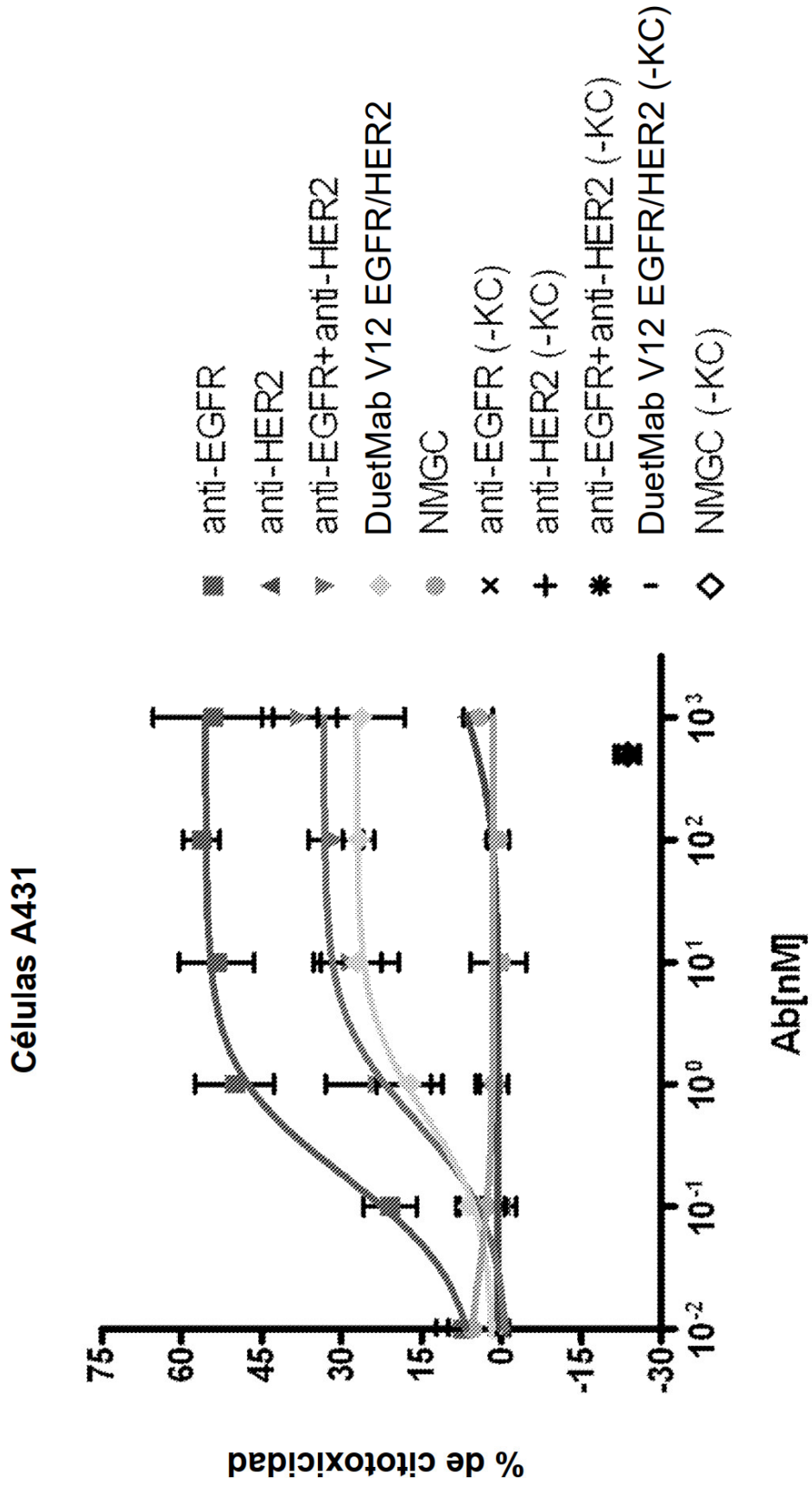


Fig. 17B

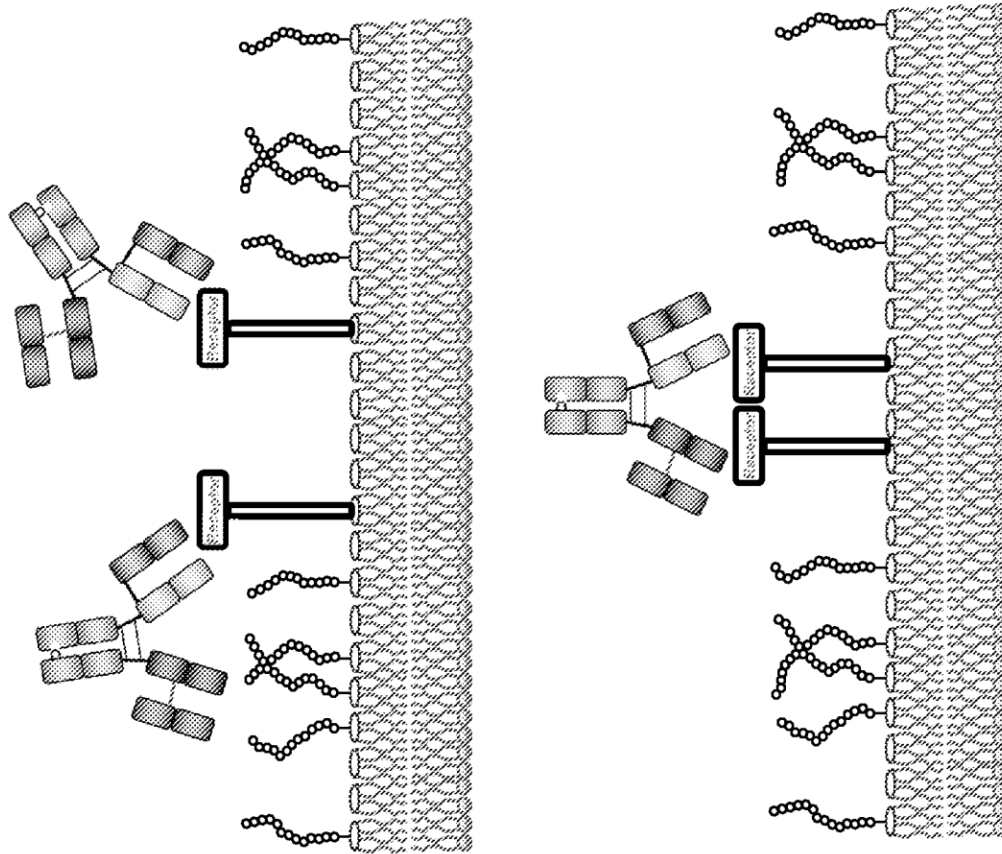
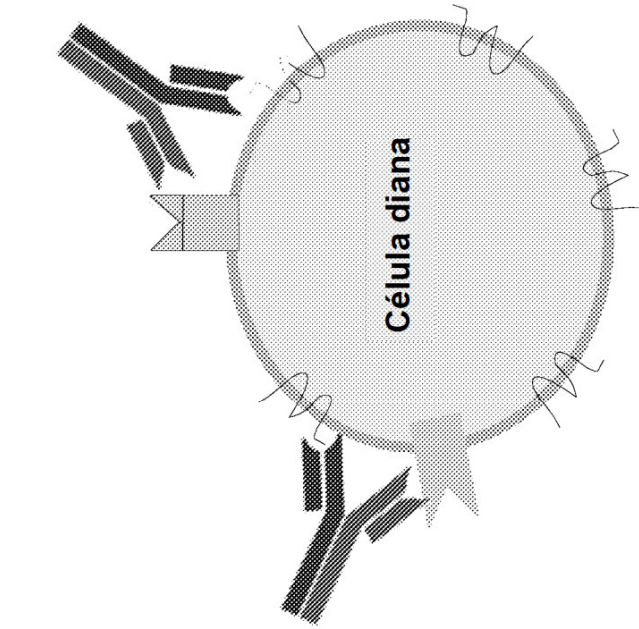


Fig. 18

La unión bivalente a ambos antígenos - mejora la unión preferente a células diana y puede dar como resultado la heterodimerización del receptor



La unión monovalente es de menor avidez y es insuficiente para provocar la homodimerización del receptor

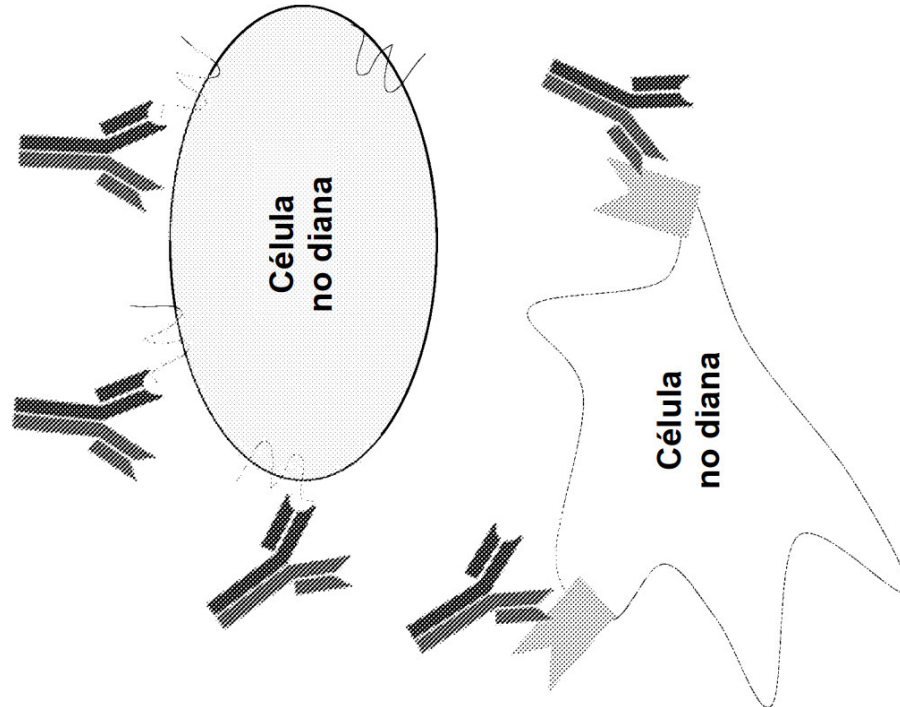


Fig. 19

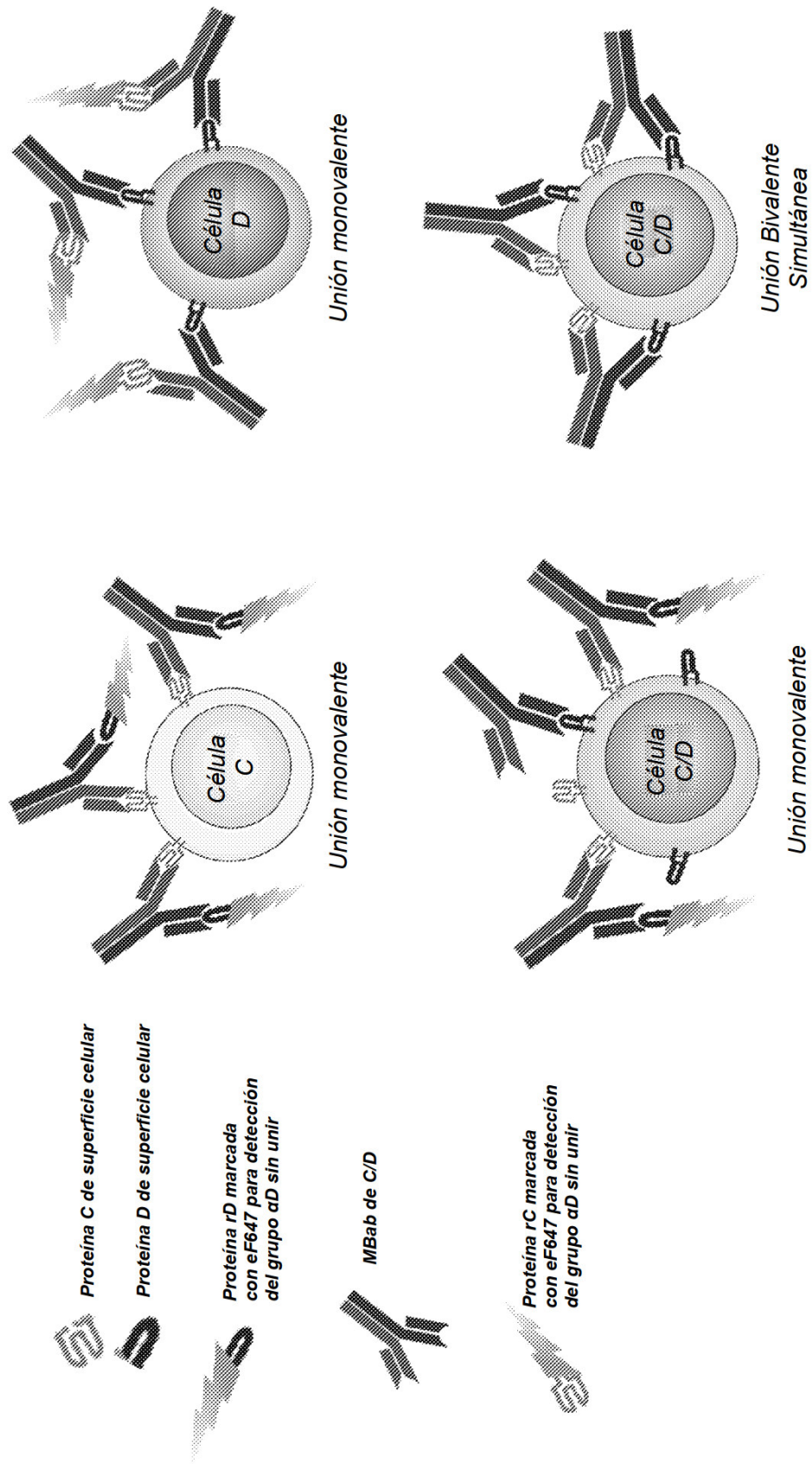


Fig. 20A

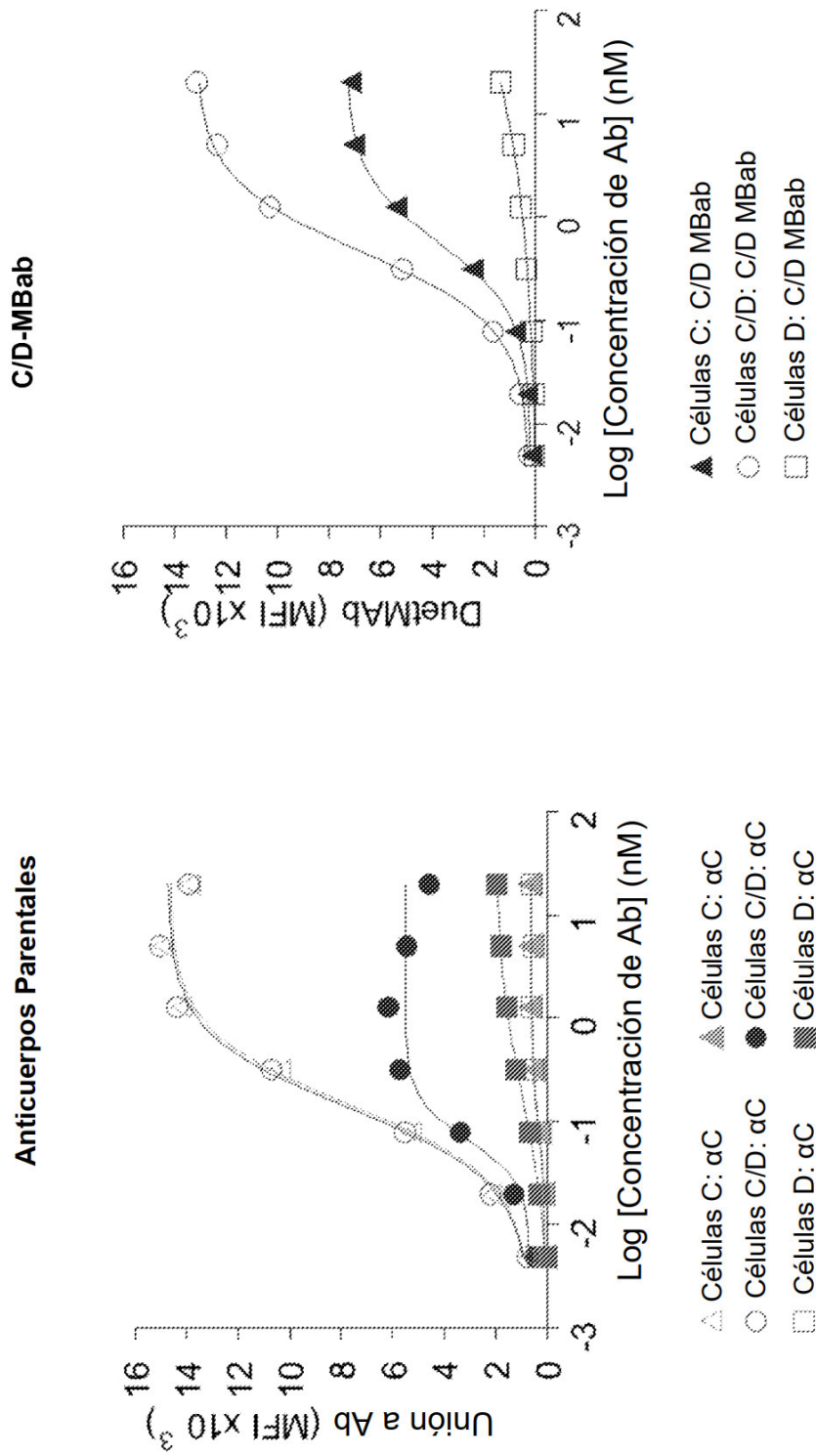


Fig. 20B

Detección de unión monovalente

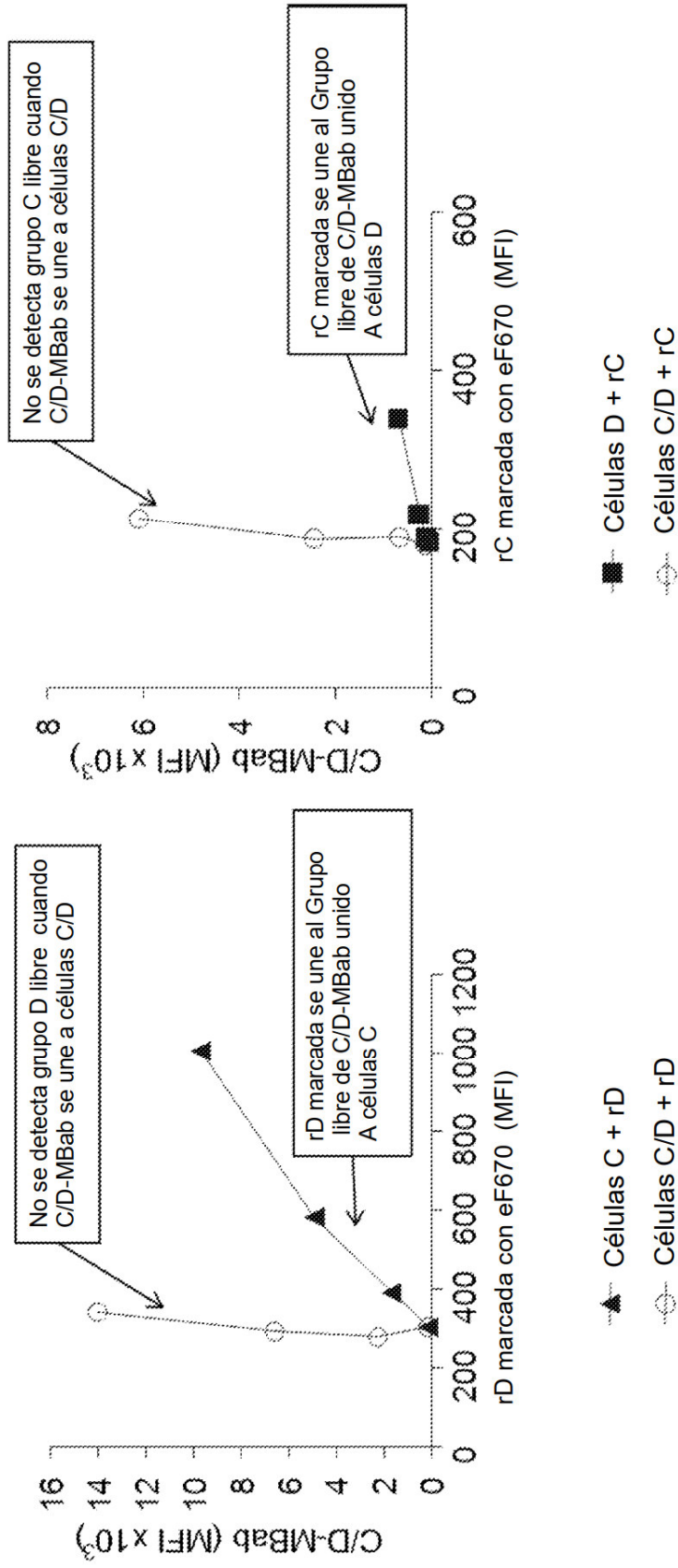


Fig. 20C

Región	FR1																					
Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
anti CD52	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T
anti-Her2	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T
anti-VEGF	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T
anti-EGFR	D	I	L	L	T	Q	S	P	V	I	L	S	V	S	P	G	E	R	V	S	F	S

Región	FW2																					
Kabat	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
anti CD52	C	K	A	S	Q	N	I	D	K	Y	L	N	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P
anti-Her2	C	R	A	S	Q	D	V	N	T	A	V	A	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P
anti-VEGF	C	S	A	S	Q	D	I	S	N	Y	L	N	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P
anti-EGFR	C	R	A	S	Q	S	I	G	T	N	I	H	W	Y	Q	Q	R	T	N	G	S	P

Región	FW3																					
Kabat	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
anti CD52	K	L	L	I	Y	N	T	N	N	L	Q	T	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G
anti-Her2	K	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	R
anti-VEGF	K	V	L	I	Y	F	T	S	S	L	H	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G
anti-EGFR	R	L	L	I	K	Y	A	S	E	S	I	S	G	I	P	S	R	F	S	G	S	G

Fig. 21A

Región																						
Kabat	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88
anti-CD52	S	G	T	D	F	T	F	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	I	A	T	Y	Y	C
anti-Her2	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C
anti-VEGF	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C
anti-EGFR	S	G	T	D	F	T	L	S	I	N	S	V	E	S	E	D	I	A	D	Y	Y	C

Región	CDR3										FW4																
Kabat	89	90	91	92	93	94	95†	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107								
anti-CD52	L	Q	H	I	S	R	P	R	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K								
anti-Her2	Q	Q	H	Y	T	T	P	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K								
anti-VEGF	Q	Q	Y	S	T	V	P	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K								
anti-EGFR	Q	Q	N	N	N	W	P	T	T	F	G	A	G	T	K	L	E	L	K								

anti-CD52 véase por ejemplo US 7923538
anti-Her2 véase por ejemplo US 6719971
anti-VEGF véase por ejemplo US7117096
anti-EGFR véase por ejemplo US 7060808

‡ Puede incluir los restos adicionales 27a, 27b, 27c, etc., de CDR
† Puede incluir los restos adicionales 95a, 95b, 95c, etc., de CDR

Fig. 21B

EU	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129
Ck	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T
CA	Q	P	K	A	A*	P	S*	V	T	L	F	P	P	S	S	E	E	L	Q	A	N	K

EU	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151
Ck	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D
CA	A	T	L	V	C	L	I	S	D	F	Y	P	G	A	V	T	V	A	W	K	A	D

EU	152	153		154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172
Ck	N	A*		L	Q	S	G	N	S	Q	E	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T
CA	S*	S	P	V	K	A	G	-	-	V	E	T*	T	T	P	S	K	Q	S	N	N	K

EU	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194
Ck	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V*	Y	A	C
CA	Y	A	A	S	S	Y	L	S	L	T	P	E	Q	W	K	S	H	R*	S	Y	S	C

EU	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214
Ck	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C
CA	Q	V	T	H	E	G			S	T	V	E	K	T	V	A	P	T	E	C

*sitio de variación alélica conocida

Fig. 22

Región	FW1																				
Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
anti CD52	Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	R	P	S	Q	T	L	S	L	T
anti-Her2	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S
anti-VEGF	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S
anti-EGFR	Q	V	Q	L	K	Q	S	G	P	G	L	V	Q	P	S	Q	S	L	S	I	T

Región	FW2																				
Kabat	CDR1										FW2										
	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
anti CD52	C	T	V	S	G	F	T	F	T	D	F	Y	M	N	W	V	R	Q	P	P	G
anti-Her2	C	A	A	S	G	F	N	I	K	D	T	Y	I	H	W	V	R	Q	A	P	G
anti-VEGF	C	A	A	S	G	Y	T	F	T	N	Y	G	M	N	W	V	R	Q	A	P	G
anti-EGFR	C	T	V	S	G	F	S	L	T	N	Y	G	V	H	W	V	R	Q	S	P	G

Región	FW3																				
Kabat	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	52a	52b	52c	53	54	55	56	57	58	59	60
anti CD52	R	G	L	E	W	I	G	F	I	R	D	K	A	K	G	Y	T	T	E	Y	N
anti-Her2	K	G	L	E	W	V	A	R	I	Y	P	-	-	T	N	G	Y	T	R	Y	A
anti-VEGF	K	G	L	E	W	V	G	W	I	N	T	-	-	Y	T	G	E	P	T	Y	A
anti-EGFR	K	G	L	E	W	L	G	V	I	W	-	-	-	S	G	G	N	T	D	Y	N

Región	FW3																				
Kabat	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81
anti CD52	P	S	V	K	G	R	V	T	M	L	V	D	T	S	K	N	Q	F	S	L	R
anti-Her2	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L	Q
anti-VEGF	A	D	F	K	R	R	F	T	F	S	L	D	T	S	K	S	T	A	Y	L	Q
anti-EGFR	T	P	F	T	S	R	L	S	I	N	K	D	N	S	K	S	Q	V	F	F	K

Fig. 23A

Región	CDR3																				
	82	82a	82b	82c	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99
Kabat	L	S	S	V	T	A	A	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	E	G	H	T	A
anti-CD52	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	S	R	W	G	G	D	G
anti-Her2	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	K	Y	P	H	Y	Y
anti-VEGF	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	A	L	T	Y	Y
anti-EGFR	M	N	S	L	Q	S	N	D	T	A	I	Y	Y	C	A	R	A	L	T	Y	Y

Región	FW4																			
	100	100a	100b	100c	100d	100e	100f	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113
Kabat	A	P	F	-	-	-	-	D	Y	W	G	Q	G	S	L	V	T	V	S	S
anti-CD52	F	Y	A	M	-	-	-	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
anti-Her2	G	S	S	H	W	Y	F	D	V	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
anti-VEGF	D	Y	E	F	-	-	-	A	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	A
anti-EGFR	D	Y	E	F	-	-	-	A	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	A

anti-CD52 véase por ejemplo US 7923538
anti-Her2 véase por ejemplo US 6719971
anti-VEGF véase por ejemplo US7117096
anti-EGFR véase por ejemplo US 7060808

‡ Puede incluir los restos adicionales 35a, 35b, 35c, etc., de CDR

Fig. 23B

EU	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137
IgG1	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G
IgG2	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	C	S	R	S	T	S	E
IgG3	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	C	S	R	S	T	S	G
IgG4	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	C	S	R	S	T	S	E

EU	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157
IgG1	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S
IgG2	S	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S
IgG3	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S
IgG4	S	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S

EU	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177
IgG1	W	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S
IgG2	W	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S
IgG3	W	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S*	S
IgG4	W	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S

EU	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197
IgG1	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T
IgG2	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P*	S	S	N*	F*	G	T	Q	T
IgG3	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S*	L*	G	T	Q	T
IgG4	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	K	T

*sitio de variación alélica conocida

Fig. 24A

EU	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217
IgG1	Y	I	C	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K*	V	E	P
IgG2	Y	T	C	N	V	D	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	T	V	E	R
IgG3	Y	T	C	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	R	V	E	L
IgG4	Y	T	C	N	V	D	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	R	V	E	S

EU	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228
IgG1	K		S	C	D	K	T	H	T	C	P
IgG2	K		C	C	V		E		C	P	P
IgG3	K	T	P	L	G	D	T	H	T	C	P
IgG4	K	Y	G				P	P	C	P	S

EU	229	230
IgG1		
IgG2		
IgG3	C	P
IgG4		

*sitio de variación alélica conocida

Fig. 24B

EU	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252
IgG1	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M
IgG2	A	P	P	V	A		G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M
IgG3	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M
IgG4	A	P	E	F	L	G	G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M

EU	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274
IgG1	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K
IgG2	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	Q
IgG3	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	Q
IgG4	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	Q	E	D	P	E	V	Q

EU	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296
IgG1	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y
IgG2	F	N	W	Y	V	D	G	V*	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	F
IgG3	F	K	W	Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P*	R*	E	E	Q	Y*
IgG4	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	F

EU	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318
IgG1	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E
IgG2	N	S	T	F	R	V	V	S	V	L	T	V	V	H	Q	D	W	L	N	G	K	E
IgG3	N	S	T	F	R	V	V	S	V	L	T	V	L*	H	Q	D	W	L	N	G	K	E
IgG4	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E

EU	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340
IgG1	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K
IgG2	Y	K	C	K	V	S	N	K	G	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	T	K
IgG3	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	T*	K
IgG4	Y	K	C	K	V	S	N	K	G	L	P	S	S	I	E	K	T	I	S	K	A	K

Fig. 24C

*sitio de variación alélica conocida

EU	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362
IgG1	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	D*	E	L*	T	K	N	Q
IgG2	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q
IgG3	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q
IgG4	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	Q	E	E	M	T	K	N	Q

EU	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384
IgG1	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N
IgG2	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	S*	V	E	W	E	S	N
IgG3	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V*	E	W	E	S	S*
IgG4	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N

EU	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406
IgG1	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L
IgG2	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	M	L	D	S	D	G	S	F	F	L
IgG3	G	Q	P	E	N	N*	Y	N	T	T	P	P	M*	L	D	S	D	G	S	F	F	L
IgG4	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L

EU	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428
IgG1	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M
IgG2	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M
IgG3	Y	S	K*	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q*	G	N	I*	F	S	C	S	V	M
IgG4	Y	S	R*	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	E	G	N	V	F	S	C	S	V	M

EU	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447
IgG1	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G	K
IgG2	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G	K
IgG3	H	E	A	L	H	N	R*	F*	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G	K
IgG4	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	L	G	K

Fig. 24D

*sitio de variación alélica conocida