

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 733**

51 Int. Cl.:
C07K 16/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03764997 .7**
96 Fecha de presentación: **15.07.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1523496**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.04.2005**

54 Título: **PRODUCCIÓN RECOMBINANTE DE MEZCLAS DE ANTICUERPOS.**

30 Prioridad:
18.07.2002 EP 02077953
18.07.2002 US 397066 P
27.05.2003 WO PCT/EP03/50201

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.11.2011

73 Titular/es:
MERUS B.V.
UPPSALALAAN 8
3584 CT UTRECHT, NL

72 Inventor/es:
VAN BERKEL, Patrick, Hendrikus, Cornelis;
BRUS, Ronald, Hendrik, Peter;
BOUT, Abraham y
LOGTENBERG, Ton

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 368 733 T3

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

DESCRIPCIÓN

Producción recombinante de mezclas de anticuerpos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de la medicina, más particularmente al campo de la producción de anticuerpos, más particularmente a la producción de mezclas de anticuerpos.

Antecedentes de la invención

10 La función esencial del sistema inmunológico es la defensa contra infecciones. El sistema inmunológico humoral combate las moléculas reconocidas como no propias, tales como los patógenos, usando inmunoglobulinas. Estas inmunoglobulinas, también denominadas anticuerpos, son generadas específicamente contra el agente infeccioso, que actúa como un antígeno, después del primer contacto (Roitt, Essential Immunology, Blackwell Scientific Publications, quinta edición, 1984). Los anticuerpos son moléculas multivalentes que comprenden cadenas pesadas (H) y cadenas livianas (L) unidas con enlaces disulfuro intercatenarios. Se conocen varios isotipos de anticuerpos, incluyendo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgD, IgE e IgM. Una IgG contiene dos cadenas pesadas y dos cadenas livianas. Cada cadena contiene regiones constantes (C) y variables (V), que pueden ser subdivididas en dominios denominados C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} , V_H , y C_L , V_L (Fig. 1). El anticuerpo se liga al antígeno a través de los dominios de la región variable contenidos en la porción Fab, y después de la ligadura puede interactuar con moléculas y células del sistema inmunológico a través de los dominios constantes, principalmente a través de la porción Fc.

20 Los linfocitos B pueden producir anticuerpos en respuesta a la exposición a sustancias biológicas tales como bacterias, virus y sus productos tóxicos. Los anticuerpos son generalmente específicos para los epitopos y se unen fuertemente a sustancias que llevan estos epitopos. La técnica del hibridoma (Kohler y Milstein 1975) aprovecha la capacidad de las células B para producir anticuerpos monoclonales a antígenos específicos y para producir subsiguientemente estos anticuerpos monoclonales fusionando las células B de ratones expuestos al antígeno de interés a células plasmáticas murinas inmortalizadas. Esta tecnología dio por resultado el reconocimiento de que los anticuerpos monoclonales producidos por los hibridomas podrían ser usados en investigación, diagnóstico y terapias para tratar diferentes tipos de enfermedades, tales como cáncer y trastornos de tipo autoinmune.

25 Como los anticuerpos que son producidos en el hibridoma del ratón inducen fuertes respuestas inmunológicas en los seres humanos, se ha apreciado en el arte que los anticuerpos requeridos para un tratamiento exitoso en los seres humanos necesitaban ser menos, o preferentemente no, inmunogénicos. Para ello, se generaron primero por ingeniería genética anticuerpos murinos reemplazando las regiones constantes murinas con regiones constantes humanas (denominados anticuerpos quiméricos). Subsiguientemente, los dominios entre las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) en los dominios variables, las así llamadas regiones marco, fueron reemplazadas por sus contrapartidas humanas (denominados anticuerpos humanizados). La etapa final en este procedimiento de humanización ha sido la producción de anticuerpos completamente humanos.

30 En el arte también se han descrito anticuerpos biespecíficos, que tienen especificidades de ligadura para dos antígenos diferentes. Estos se usan generalmente para ser direccionados a una parte terapéutica o de diagnóstico, por ejemplo, célula T, una molécula disparadora citotóxica o un quelante que liga un radionúclido, que es reconocido por una región variable del anticuerpo a una célula que es reconocida por la otra región variable del anticuerpo, por ejemplo, una célula tumoral (ver, para anticuerpos biespecíficos, Segal et al, 2001).

35 Un método muy útil conocido en la técnica para obtener anticuerpos monoclonales completamente humanos con propiedades de ligadura deseables emplea bibliotecas de presentación de fagos. Esta es una propuesta *in vitro*, basada en ADN recombinante, que simula las características clave de la respuesta inmunológica humoral (ver, para métodos de presentación de fagos, por ejemplo, CF Barbas III et al, "Phage Display. A laboratory manual". Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 2001). Para la construcción de las bibliotecas de presentación de fagos, se expresan colecciones de genes de la región variable de la cadena pesada y liviana de los anticuerpos monoclonales humanos en la superficie de partículas de bacteriófagos, usualmente en formato Fab o Fv de cadena simple (scFv). Las bibliotecas grandes de fagos que expresan fragmentos de anticuerpos contienen típicamente más de 10^9 especificidades de anticuerpos y pueden ser combinados de las regiones V de inmunoglobulinas expresadas en los linfocitos B de individuos inmunizados o no inmunizados. Alternativamente, las bibliotecas de presentación de fagos pueden ser construidas a partir de regiones variables de inmunoglobulinas que han sido ensambladas o reordenadas parcialmente *in vitro* para introducir una diversidad adicional de anticuerpos en la biblioteca (bibliotecas semisintéticas) (De Kruif et al, 1995b). Por ejemplo, las regiones variables reunidas *in vitro* contienen tramos de ADN aleatorizado o parcialmente aleatorizado, producido sintéticamente en aquellas regiones de las moléculas que son importantes para la especificidad del anticuerpo. La información genética que codifica los anticuerpos identificados por presentación en fagos, se puede usar para la clonación de anticuerpos en un formato deseado, por ejemplo, IgG, IgA o IgM, para producir el anticuerpo con métodos de ADN recombinantes (Boel et al, 40 45 50 55 2000).

Un método alternativo para proveer anticuerpos completamente humanos usa ratones transgénicos que comprenden material genético *que* codifica un repertorio de inmunoglobulina humana (Fishwild et al, 1996; Méndez et al, 1997).

Tales ratones pueden ser inmunizados con un antígeno objetivo, y la respuesta inmunológica resultante producirá anticuerpos completamente humanos. Las secuencias de estos anticuerpos se pueden usar en métodos de producción recombinantes.

5 La producción de anticuerpos monoclonales en forma rutinaria se realiza mediante el uso de la expresión recombinante de las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las cadenas H y L de anticuerpos en células huésped (ver, por ejemplo, EP0120694; EP0314161; EP0481790; patente U.S. 4.816.567; WO 00/63403).

10 Hasta la fecha, muchas enfermedades diferentes están siendo tratadas con anticuerpos monoclonales humanizados o completamente humanos. Los productos basados en anticuerpos monoclonales que están aprobados actualmente para el uso en seres humanos incluyen Herceptin™ (anti-Her2/Neu), Reopro™ (receptor anti-glicoproteína IIB/IIIA), Mylotarg™ (anti-CD33), Rituxan™ (Rituximab, anti-CD20), Simulect™ (anti-CD25), Remicade™ (anti-TNF), Synagis™ (anti-RSV), Zenapax™ (receptor IL2), CAMPATH™ (anti-CD52). A pesar de estos éxitos, hay lugar aún para nuevos productos de anticuerpos y para una mejora considerable de productos de anticuerpos existentes. El uso de anticuerpos monoclonales en el tratamiento del cáncer ha mostrado que pueden surgir las así llamadas "variantes tumorales con pérdida del antígeno", haciendo que el tratamiento con el anticuerpo monoclonal sea menos efectivo.

15 El tratamiento con el anticuerpo monoclonal muy exitoso Rituximab (anti-CD20) ha mostrado, por ejemplo, que pueden ocurrir variantes que escapan a la pérdida del antígeno, llevando a una recaída del linfoma (Massengale et al, 2002). En el arte, la potencia de los anticuerpos monoclonales se ha aumentado fusionándolos a compuestos tóxicos, tales como los radionúclidos, toxinas, citoquinas, y similares. Cada una de estas propuestas, sin embargo, tienen sus limitaciones, incluyendo problemas tecnológicos y de producción y/o alta toxicidad.

20 Además, parece que la ganancia en especificidad de los anticuerpos monoclonales en comparación con los anticuerpos policlonales indefinidos tradicionales, se produce a costo de la pérdida de eficacia. In vivo, las respuestas de los anticuerpos son de naturaleza policlonal, es decir, se produce una mezcla de anticuerpos porque varias células B responden al antígeno, dando por resultado que varias especificidades estén presentes en la mezcla de anticuerpo policlonal. Los anticuerpos policlonales también pueden ser usados para aplicaciones terapéuticas, por ejemplo, para vacunación pasiva o para inmunoterapia activa, y actualmente se derivan usualmente de suero combinado de animales inmunizados o de seres humanos que se recuperaron de la enfermedad. El suero combinado es purificado en la fracción proteinácea o de gammaglobulina, así llamadas porque

25 contiene predominantemente moléculas de IgG. Los anticuerpos policlonales que se usan actualmente para tratamiento incluyen anticuerpos policlonales anti-rhesus, gammaglobulina para inmunización pasiva, veneno anti-ofídico policlonal (Crdeab), Thimoglobulin™ para rechazos de aloinjertos, anti-digoxina para neutralizar el fármaco para el corazón digoxina, y anticuerpos policlonales de la vacuna antirrábica. En los anticuerpos terapéuticos actualmente comercializados, un ejemplo de la mayor eficacia de los anticuerpos policlonales en comparación con los anticuerpos monoclonales se puede hallar en el tratamiento del rechazo agudo de trasplantes con los anticuerpos anti-células T. Los anticuerpos monoclonales en el comercio (anti-CD25 basiliximab) son menos eficaces que un anticuerpo policlonal de conejo contra timocitos (Thimoglobulin™) (publicaciones en la prensa de fecha 12 de marzo, 29 de abril y 26 de agosto, 2002, en www.sangstat.com). El uso de suero humano combinado sin embargo lleva aparejado potencialmente el riesgo de infecciones con virus tales como HIV o hepatitis, con toxinas tales como lipopolisacáridos, con agentes infecciosos proteináceos tales como priones, y con agentes infecciosos desconocidos. Además, el suministro que se encuentra disponible es limitado, e insuficiente para tratamientos humanos extendidos. Los problemas asociados con la aplicación actual de anticuerpos policlonales derivados de sueros animales en la clínica incluyen una fuerte respuesta inmunológica del sistema inmunológico humano contra tales anticuerpos extraños. Por lo tanto tales anticuerpos policlonales no son adecuados para un tratamiento repetido, o para un tratamiento de individuos a los que se les inyectaron previamente otros preparados séricos de la misma especie animal.

45 La técnica describe la idea de la generación de animales con un repertorio de inmunoglobulinas humanas, que se pueden usar subsiguientemente para la inmunización con un antígeno para obtener anticuerpos policlonales contra este antígeno de animales transgénicos (documento WO 01/19394). Sin embargo, deberán superarse aún muchos obstáculos tecnológicos antes de que un sistema como éste sea una realidad práctica en animales más grandes que los ratones, y tomará años de desarrollo antes de que tales sistemas puedan proveer los anticuerpos policlonales en una manera segura y consistente en cantidades suficientes. Además, los anticuerpos producidos de sueros combinados, ya sea de origen humano o animal, comprenderán siempre una alta cantidad de especificidades no relacionadas y no deseadas, ya que sólo un pequeño porcentaje de los anticuerpos presentes en un suero dado serán dirigidos contra el antígeno usado para inmunización. Se sabe, por ejemplo, que en animales normales, es decir, no transgénicos, aprox. 1-10% de la fracción de inmunoglobulina circulante es dirigida contra el antígeno usado para hiperinmunización, por eso la gran mayoría de las inmunoglobulinas circulantes no son específicas.

50 Se ha descrito una propuesta con respecto a la expresión de bibliotecas de anticuerpos policlonales (documento WO 95/20401; patentes U.S. 5.789.208 y 6.335.163). Una biblioteca policlonal de fragmentos de anticuerpos Fab es expresada usando un vector de presentación de fagos, y seleccionada para reactividad con respecto a un antígeno. Las combinaciones de genes de las regiones variables pesadas y livianas seleccionadas son transferidas en masa, como pares ligados, a un vector de expresión eucariótico que provee genes de las regiones constantes, para obtener una subbiblioteca de anticuerpos policlonales intactos. Después de transfección de esta subbiblioteca en células de mieloma, clones estables producen anticuerpos monoclonales que pueden ser mezclados para obtener

una mezcla de anticuerpos policlonales. Si bien en teoría sería posible obtener anticuerpos policlonales directamente de un solo procedimiento de producción recombinante usando este método mediante el cultivo de una población mixta de células transfectadas, se producirían problemas potenciales con respecto a la estabilidad de la población de células mixtas, y por lo tanto la consistencia de la mezcla de anticuerpos policlonales producida. El control de toda una población de diferentes células en un procedimiento de gran escala farmacéuticamente aceptable (es decir, industrial), es una tarea enorme. Parecería que las características tales como las tasas de crecimiento de las células y las tasas de producción de los anticuerpos deberían permanecer estables para todos los clones individuales de la población no clonal para mantener la relación de anticuerpos en la mezcla de anticuerpos policlonales más o menos constante. Así, si bien se ha reconocido en el arte la necesidad de mezclas de anticuerpos, no existen soluciones aceptables para preparar mezclas de anticuerpos económicamente en una manera farmacéuticamente aceptable. El objeto de la presente invención es proveer nuevos medios para producir una mezcla de anticuerpos en huéspedes recombinantes.

Breve descripción de las figuras

Fig. 1 Representación esquemática de un anticuerpo. Las cadenas pesada y liviana están apareadas a través de enlaces disulfuro intercatenarios (líneas de puntos). La cadena pesada puede ser o bien del isotipo α , γ , μ , δ o ϵ . La cadena liviana es o bien λ o κ . Se muestra un anticuerpo del isotipo IgG1.

Fig. 2 Representación esquemática de un anticuerpo monoclonal biespecífico. Un anticuerpo biespecífico contiene dos dominios funcionales diferentes F(Ab), indicados por los modelos diferentes de las regiones V_H - V_L .

Fig. 3 Alineación de la secuencia de V_L y V_H de K53, UBS-54 y 02-237. La secuencia de ADN de V_L común de UBS54 y K53 es SEQ. ID. NO. 1, mientras que la secuencia de aminoácidos está dada como SEQ. ID. NO. 2. Las secuencias de ADN de V_L de 02-237, y V_H de UBS54, K53 y 02-237 son las SEQ. ID. NOs. 3, 5, 7 y 9, respectivamente, mientras que las secuencias de aminoácidos están dadas en las SEQ. ID. NOs. 4, 6, 8 y 10, respectivamente.

Fig. 4 Visión de conjunto de los plásmidos pUBS3000Neo y pCD46_3000 (Neo).

Fig. 5A. IEF de pUBS3000Neo, pCD46_3000(Neo) y una combinación de ambos expresados transitoriamente. B. La parte superior muestra una representación esquemática de las moléculas esperadas cuando se expresan una sola cadena liviana y una sola cadena pesada en una célula, llevando a los anticuerpos monoclonales UBS-54 o K53. La parte inferior bajo la flecha muestra una representación esquemática de las combinaciones producidas cuando ambas cadenas pesadas y la cadena liviana común son coexpresadas en una célula huésped, con cantidades teóricas cuando ambas cadenas pesadas son expresadas a niveles iguales y se aparean entre sí con igual eficiencia. La cadena liviana común está indicada con las barras de rayas verticales.

Fig. 6. Representación esquemática de una forma de realización posible del método de acuerdo con la invención (ver por ejemplo, Ejemplo 9). (1) Introducción de secuencias de ácidos nucleicos que codifican una cadena liviana y tres diferentes cadenas pesadas capaces de aparearse con la cadena liviana común para dar anticuerpos funcionales en células huésped; (2) selección de clones estables; (3) los clones pueden ser rastreados por ejemplo, con respecto a los niveles de expresión, ligadura; (4) clones expandidos; (5) producción de mezclas de anticuerpos funcionales. Algunos o todos los pasos 2-5 podrían realizarse simultáneamente o en un orden diferente.

Fig. 7. Secuencia de V_H y V_L de fagos dirigida contra CD22 (clon B28), CD72 (clon II-2) y HLA-DR (clase II; clon I-2). Las secuencias de ADN de V_L de clones B28, II-2 y I-2 son las SEQ. ID. NOs. 11, 13 y 15, respectivamente, mientras que las secuencias de aminoácidos son las SEQ. ID. NOs. 12, 14 y 16, respectivamente. La secuencia de ADN de la cadena liviana común de estos clones es la SEQ. ID. NO. 17, mientras que la secuencia de aminoácidos es la SEQ. ID. NO. 18.

Fig. 8. Mapa de pUBS54-IgA (pCRU-L01 que codifica la IgA1 humana contra EPCAM).

Fig. 9. IgA biespecífica dimérica con una sola cadena liviana (indicada por una barra de rayas horizontal). El método de la invención producirá una mezcla de formas en donde se pueden aparear diferentes cadenas pesadas, y sólo la forma más simple está ilustrada en esta representación esquemática. Se muestra una cadena J que se une a los dos monómeros.

Fig. 10. IgM multiespecífica pentamérica con una sola cadena liviana (indicada por barras de rayas horizontales). El método de la invención producirá una mezcla de muchas formas diferentes en donde se pueden aparear diferentes cadenas pesadas, y sólo la forma más simple cuando se expresan 5 diferentes cadenas pesadas con una sola cadena liviana, y las 5 diferentes cadenas pesadas son incorporadas en el pentámero y apareadas a la misma cadena pesada, se ilustra en esta representación esquemática. También se pueden formar pentámeros con menos especificidades por incorporación de menos de 5 diferentes cadenas pesadas. Especialmente cuando la cadena J no es expresada, también se pueden obtener hexámeros.

Fig. 11. Expresión de una mezcla de isotipos de IgG humana que consisten en una cadena liviana común, pero con diferentes especificidades de ligadura en una sola célula para evitar la formación de anticuerpos biespecíficos. Las diferentes especificidades de ligaduras están indicadas por los diferentes colores de las secuencias de V_H . La

cadena liviana común está indicada con las barras de rayas verticales. El isotipo de IgG1 está indicado con la Fc gris Fc, el isotipo de IgG3 está indicado con la parte Fc negra.

Fig. 12. Secuencias de ADN y proteínas de cadenas pesadas y livianas de dominios variables de K53, UBS54 y 02-237 IgG.

5 Fig. 13 Alineación de las secuencias variables de las cadenas pesadas de K53, 02-237 y UBS54. Las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 se indican en negrita.

Fig. 14 Análisis BIACORE de K53 y 02-237. CD46 humana purificada por afinidad de células LS174T fue acoplada (640 RU) a chips de CM5 (BIACORE BR-1000-14). La ligadura de 1000 (A), 500 (B), 250 (C), 125 (D), 63 (E), 31 (F), 16 (G), 8 (H) o 0 (I) nM 02-237 o k53 purificada de líneas celulares derivadas PER.C6TM estables a CD46 fue monitoreada usando un sistema BIACORE 3000 a 37 °C. Usando este procedimiento experimental, se halló Kd de 9,1 X 10⁻⁷ y 2,2 X 10⁻⁸ para K53 y 02-237, respectivamente.

Fig. 15 Ligadura de K53 y 02-237 a células LS174T. Diluciones seriadas de 02-237 (■) purificada, K53 (*) y el control negativo GBSIII (♠) conjugado a biotina fueron incubadas con células LS147T preincubadas con suero humano normal para bloquear la interacción del receptor. Fcα ligadura (MFI, ordenada) fue determinada por FACS después de incubación con ficoeritrina conjugada con estreptavidina.

Fig. 16. Análisis SDS-PAGE de fracciones de IgG purificadas.

Tres µg de IgG purificada fueron analizados en un gel Nupage 4-20% (Novex) no reducido (A) y reducido (B) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Las proteínas fueron visualizadas por coloración con azul coloidal (Novex cat. No. LC6025) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

20 La identidad de los clones se indica en la parte superior del SDS-PAGE. Cada gel contiene un control, que es o bien 02-237 purificada o K53. NR, No reducido; R, reducido.

Fig. 17. Análisis IEF de fracciones de IgG purificadas. Diez µg de IgG purificada fueron analizados en un gel Isogel 3-10 (BMA) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

25 Las proteínas fueron visualizadas por coloración con azul coloidal (Novex, cat. No. LC6025) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La identidad de los clones se indica en la parte superior del IEF. Cada gel contiene un control, que consiste en una mezcla 1:1:1 de 02-237, K53 y UBS54.

Fig. 18. Análisis IEF de mezclas policlonales 241, 280, 282, 361 y 402 en comparación con K53, 02-237 y UBS54 simples. Diez µg de IgG purificada fueron analizados en un gel Isogel 3-10 (BMA) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Las proteínas fueron visualizadas por coloración con azul coloidal (Novex, cat. No. LC6025) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La identidad de la IgG se indica en la parte superior del IEF.

Fig. 19. Cromatogramas de masa de péptidos CDR3 de K53, 02-237, UBS54 y los dos únicos péptidos de cadena liviana L1-K53/UBS54 y L1-237 en la fracción de IgG Poli1-280. En el lado derecho de cada cromatograma de masa, se muestra el modelo isotópico del péptido. El ion doblemente cargado en m/z 1058,98 (PM 2115,96 Da) resulta del péptido H11-K53. El ion doblemente cargado en m/z 1029,96 (PM 2057,92 Da) resulta del péptido H11-02-237. El ion triplemente cargado en m/z 770,03 (PM 2307,09 Da) resulta del péptido H9-UBS54. El ion doblemente cargado en m/z 1291,08 (PM 2580,16 Da) resulta del péptido L1-K53/UBS54. El ion doblemente cargado en m/z 1278,11 (PM 2554,22 Da) resulta del péptido L1-02-237.

40 IgG purificada se disolvió en un 0,1% RapiGestTM (Waters) en 50 mM NH₄HCO₃. Los disulfuros fueron reducidos usando 1 M DTT (1,4-ditio-DL-treitol), seguido por incubación a 65°C durante 30 minutos. Luego, para la alquilación de todos los grupos sulfhidrilo, se agregó 1 M yodoacetamida, seguido por incubación a temperatura ambiente durante 45 minutos a oscuras. La alquilación se detuvo por adición de 1 M DTT. El tampón se cambió a 25 mM NH₄HCO₃, pH 7,5. Finalmente los anticuerpos fueron digeridos durante la noche a 37°C por adición de una solución de tripsina recién preparada en 25 mM NH₄HCO₃. La mezcla de péptidos fue analizada por LC-MS. El sistema LC consistía en una columna C18 de fase inversa Vydac, que fue eluida aplicando un gradiente de solvente A (5/95/1 acetonitrilo, agua, ácido acético glacial v/v/v) y solvente B (90/10/1 acetonitrilo, agua, ácido acético glacial v/v/v). La LC fue acoplada en línea a un espectrómetro de masas Q-TDE2 (Micromass), equipado con una fuente de electronebulización operada a 3 kV. Los espectros de masas fueron registrados en modo de ion positivo de m/z 50 a 1500 a un voltaje de cono de 35 V. La resolución instrumental de >10,000 permitió la determinación no ambigua de la carga, y por lo tanto la masa de los iones hasta por lo menos +7. De esta manera se identificaron todos los péptidos de acuerdo con su peso molecular. La secuencia de aminoácidos del péptido se confirmó por experimentos MS/MS. Los espectros MS/MS se registraron en modo de ion positivo de m/z 50-2000 con energía de colisión entre 20 y 35 eVolts.

Fig. 20. Análisis BIACORE de 280 policlonal. CD46 humana purificada por afinidad de células LS174T fue acoplada (640 RU) a chips CM5 (BIACORE BR-1000-14). La ligadura de 1000 (A), 500 (B), 250 (C), 125 (D), 63 (E), 31 (F), 16 (G), 8 (H) o 0 (I) nM Poli1-280 a CD46 fue monitoreada usando un sistema BIACORE 3000 a 37 °C.

Fig. 21. Análisis IEF de subclones a partir de clones poli 1-241, poli 1-280 y poli 1-402 que producen una mezcla de anticuerpos. A. Clones poli 1-241 y poli 1-280. La banda 1 contiene un marcador pl (Amersham, Cat. No. 17-0471-01). La banda 2 contiene IgG aislada del clon parental poli 1-241 (como en la Fig. 18). Las bandas 3, 4 y 5 respectivamente contienen IgG aislada de 3 subclones independientes derivados de poli 1-241 por limitación de la dilución. La banda 6 contiene IgG aislada del clon parental poli 1-280 (como en la Fig. 18). Las bandas 7, 8 y 9 respectivamente contienen IgG aislada de tres subclones independientes derivados de poli 1-280 por limitación de la dilución. B. Clon poli 1-402. Las bandas 1 y 7 contienen un marcador pl. La banda 2 contiene IgG aislada del clon parental poli 1-402 (como en la Fig. 18). Las bandas 3, 4 y 5 respectivamente contienen IgG aislada de 3 subclones independientes derivados de poli 1-402 por limitación de la dilución. La banda 6 contiene un control (una mezcla 1:1:1 de 02-237, K53 y UBS54).

Fig. 22. Análisis FACS de mezclas de anticuerpos producidos a partir de subclones de poli 1-241 (A), poli 1-280 (B) y poli 1-402 (C). La ligadura de las mezclas de anticuerpos a células transfectadas con cDNA de CD46, EpCAM, o un control negativo (CD38), fue determinada con análisis FACS, y la intensidad fluorescente media (MFI) se muestra para los diversos clones parentales y tres subclones independientes de cada uno. Los anticuerpos control GBS-III (control negativo), anti-CD72 (02-004; control negativo) y los anticuerpos simples UBS54, 02-237 y K53 también están incluidos.

Compendio de la invención

En un aspecto la presente invención provee un método para producir una mezcla de anticuerpos en un huésped recombinante, el método comprende el paso de: expresar en una célula huésped recombinante una secuencia de ácidos nucleicos o secuencias de ácidos nucleicos que codifican por lo menos una cadena liviana común y por lo menos tres diferentes cadenas pesadas que son capaces de aparearse con dicha por lo menos una cadena liviana. Un aspecto adicional de la invención es la eliminación de la producción de un apareamiento de cadenas livianas-pesadas potencialmente no funcional usando combinaciones de cadenas pesadas y livianas preseleccionadas. Se ha reconocido que las bibliotecas de presentación de fagos construidas a partir de una sola cadena liviana y muchas cadenas pesadas diferentes pueden codificar fragmentos de anticuerpos con propiedades de ligadura muy distintas. Esta característica se puede usar para hallar diferentes anticuerpos que tienen la misma cadena liviana pero diferentes cadenas pesadas, contra el mismo objetivo o diferentes objetivos, en donde un objetivo puede ser un antígeno completo o un epitopo de éste. Tales diferentes objetivos pueden estar, por ejemplo, en la misma superficie (por ejemplo, célula o tejido). Tales fragmentos de anticuerpos obtenidos por presentación de fagos pueden ser clonados en vectores para el formato deseado, por ejemplo, IgG, IgA o IgM, y las secuencias de ácidos nucleicos que codifican estos formatos se pueden usar para transfectar las células huésped. En una propuesta, las cadenas H y L pueden ser codificadas por diferentes constructos que, después de la transfección en una célula en donde son expresadas, dan lugar a moléculas de Ig intactas. Cuando diferentes constructos de cadena H son transfectados en una célula con un constructo de una sola cadena L, las cadenas H y L serán reunidas para formar todas las combinaciones posibles. Sin embargo, por contraste con las propuestas en donde se expresan diferentes cadenas livianas, tal como para la producción de anticuerpos biespecíficos, este método dará por resultado sólo regiones de ligadura funcionales. Sería particularmente útil si el huésped, por ejemplo, una sola línea celular, es capaz de expresar niveles aceptables de anticuerpos recombinantes, sin necesidad de amplificar primero en dicha célula las secuencias de ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos. La ventaja es que las líneas celulares con sólo un número de copias limitado de dichos ácidos nucleicos se espera que sean genéticamente más estables, porque habrá menos recombinación entre las secuencias que codifican las cadenas pesadas, que en líneas celulares en donde están presentes una multitud de estas copias. Una línea celular adecuada para el uso en los métodos de acuerdo con la invención es la línea celular humana PER.C6TM. Usando este método se puede producir una mezcla de anticuerpos con especificidades definidas a partir de un solo clon de célula de una manera segura, controlada y consistente.

La invención provee un método para la producción de una mezcla de anticuerpos en un huésped recombinante, el método comprende el paso de: expresar una secuencia de ácidos nucleicos o secuencias de ácidos nucleicos que codifican por lo menos una cadena liviana común y por lo menos tres diferentes cadenas pesadas que son capaces de aparearse con dicha por lo menos una cadena liviana en una célula huésped recombinante. En un aspecto preferido, la célula huésped recombinante comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena liviana común que es capaz de aparearse con dichas por lo menos tres diferentes cadenas pesadas, de tal modo que los anticuerpos producidos comprenden una cadena liviana común. Evidentemente, los expertos en el arte reconocerán que "común" también se refiere a equivalentes funcionales de la cadena liviana de la cual la secuencia de aminoácidos no es idéntica. Existen muchas variantes de dicha cadena liviana en donde están presentes mutaciones (delecciones, sustituciones, adiciones) que no influyen materialmente sobre la formación de las regiones de ligadura funcionales. La invención provee además una composición que comprende una mezcla de por lo menos tres diferentes anticuerpos recombinantes, en donde dichos por lo menos tres diferentes anticuerpos tienen una cadena liviana común, en donde por lo menos tres diferentes cadenas pesadas están representadas en dicha mezcla, mezcla que se puede obtener mediante un método de acuerdo con la invención. Preferentemente, la mezcla de anticuerpos es más eficaz que los anticuerpos individuales que comprende, más preferentemente, la mezcla actúa sinérgicamente en un ensayo funcional.

La invención provee además una célula huésped recombinante para producir mezclas de anticuerpos, y métodos

para preparar tales células huésped.

Los clones independientes obtenidos de la transfección de secuencias de ácidos nucleicos que codifican una cadena liviana y más de una cadena pesada pueden expresar los diferentes anticuerpos en la mezcla a diferentes niveles. Otro aspecto de la invención es seleccionar un clon usando un ensayo funcional, para la mezcla de anticuerpos más potente. Se describe además un método para identificar por lo menos un clon de una célula huésped que produce una mezcla de anticuerpos, en donde dicha mezcla de anticuerpos tiene un efecto deseado de acuerdo con un ensayo funcional, el método comprende los pasos de: (i) proveer una célula huésped con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica por lo menos una cadena liviana y secuencias de ácidos nucleicos que codifican por lo menos dos diferentes cadenas pesadas, en donde dichas cadenas pesadas y livianas son capaces de aparearse entre sí; (ii) cultivar por lo menos un clon de dicha célula huésped en condiciones que conducen a la expresión de dichas secuencias de ácidos nucleicos; (iii) rastrear dicho por lo menos un clon de la célula huésped para la producción de una mezcla de anticuerpos que tiene el efecto deseado por un ensayo funcional; e (iv) identificar por lo menos un clon que produce una mezcla de anticuerpos que tiene el efecto deseado. Este método de acuerdo con la invención puede ser llevado a cabo usando procedimientos de alta producción, si se desea. Los clones identificados por el método se pueden usar para producir mezclas de anticuerpos de acuerdo con la invención.

Se describen además animales no humanos transgénicos y plantas transgénicas o células de plantas transgénicas capaces de expresar mezclas de anticuerpos, y mezclas de anticuerpos producidos por éstas.

La invención provee además composiciones farmacéuticas que comprenden una mezcla de anticuerpos producidos en forma recombinante y un vehículo adecuado.

La invención provee además mezclas de anticuerpos para usar en el tratamiento o el diagnóstico y para la preparación de un medicamento para usar en el tratamiento o el diagnóstico de una enfermedad o trastorno en un sujeto humano o animal.

La invención provee además un método para producir una mezcla de anticuerpos que comprende diferentes isotipos a partir de un solo clon de una célula huésped.

La invención provee además un método para identificar una mezcla de anticuerpos que tiene un efecto deseado en un ensayo funcional.

Se describe además un método para producir una mezcla de anticuerpos que son capaces de ligarse a un objetivo, el método comprende los pasos de:

i) poner en contacto una biblioteca de fagos que comprende anticuerpos con material que comprende un objetivo, ii) por lo menos un paso de seleccionar fagos que se ligan a dicho objetivo, iii) identificar por lo menos dos fagos que comprenden anticuerpos que se ligan a dicho objetivo, en donde dichos por lo menos dos anticuerpos comprenden una cadena liviana común, iv) introducir una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la cadena liviana y una secuencia o secuencias de ácidos nucleicos que codifican las cadenas pesadas de dichos por lo menos dos anticuerpos en una célula huésped, v) cultivar un clon de dicha célula huésped en condiciones que conducen a la expresión de dichas secuencias de ácidos nucleicos.

Descripción detallada de la invención

Un objeto de la presente invención es proveer un método para producir una mezcla de anticuerpos en un huésped recombinante, el método comprende el paso de: expresar en una célula huésped recombinante una secuencia de ácidos nucleicos o secuencias de ácidos nucleicos que codifican por lo menos una cadena liviana común y por lo menos tres diferentes cadenas pesadas que son capaces de aparearse con dicha por lo menos una cadena liviana común. De acuerdo con la invención, las cadenas livianas y pesadas cuando son apareadas forman dominios de ligadura de antígenos funcionales. Un dominio de ligadura de antígenos funcionales es capaz de ligarse específicamente a un antígeno.

En un aspecto de acuerdo con la invención, el método para producir una mezcla de anticuerpos de acuerdo con la invención comprende además el paso de recuperar los anticuerpos de la célula o el cultivo de la célula huésped para obtener una mezcla de anticuerpos adecuada para uso ulterior. En una forma de realización de la invención, se provee un método para la producción de una mezcla de anticuerpos, el método comprende el paso de: expresar en una célula huésped recombinante una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena liviana común y una secuencia o secuencias de ácidos nucleicos que codifican por lo menos tres diferentes cadenas pesadas que son capaces de aparearse con dicha cadena liviana común, de tal modo que los anticuerpos que son producidos comprenden cadenas livianas comunes. En un aspecto la cadena liviana común es idéntica en cada par de cadena liviana/cadena pesada.

El término "anticuerpo" como se usa en la presente significa un polipéptido que contiene uno o más dominios que ligan un epitopo en un antígeno, en donde tales dominios se derivan de, o tienen identidad de secuencia con la región variable de un anticuerpo. La estructura de un anticuerpo está representada esquemáticamente en la Fig.1. Ejemplos de anticuerpos de acuerdo con la invención incluyen anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpos, anticuerpos biespecíficos, inmunoconjugados, y similares. Un anticuerpo de acuerdo con la invención

puede ser un isotipo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgM, y similares, o un derivado de estos. Los fragmentos de anticuerpos incluyen los fragmentos Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, y similares. Los anticuerpos de acuerdo con la invención pueden ser de cualquier origen, incluyendo murino, de más de un origen, es decir, quimérico, humanizado, o anticuerpos completamente humanos. Los inmunocombinados comprenden dominios de ligadura de antígenos y una parte no de anticuerpo tal como una toxina, una radiomarca, una enzima, y similares. Un "dominio de ligadura de antígenos" comprende preferentemente regiones variables de una cadena pesada y una cadena liviana, y es responsable de la ligadura específica a un antígeno de interés. Los anticuerpos recombinantes son preparados expresando ambas, una cadena pesada y una cadena liviana en una célula huésped. Similarmente, expresando dos cadenas con sus respectivas cadenas livianas (o una cadena liviana común), en donde cada cadena pesada/cadena liviana tiene su propia especificidad, se pueden preparar los así llamados anticuerpos "biespecíficos". Los "anticuerpos biespecíficos" comprenden dos combinaciones de cadena pesada-liviana no idénticas (Fig. 2), y ambas regiones e ligadura de antígenos de un anticuerpo biespecífico pueden reconocer diferentes antígenos o diferentes epitopos en un antígeno.

Una "cadena liviana común" de acuerdo con la invención se refiere a cadenas livianas que pueden ser idénticas o tener diferencias de secuencias de aminoácido. Dichas cadenas livianas pueden comprender mutaciones que no alteran la especificidad del anticuerpo cuando se combinan con la misma cadena pesada, sin apartarse del alcance de la presente invención. Es posible, por ejemplo, dentro del alcance de la definición de cadenas livianas comunes como se usa en la presente, preparar o hallar cadenas livianas que no son idénticas, pero aún funcionalmente equivalentes, por ejemplo, introduciendo y testeando cambios de aminoácidos conservadores, cambios de aminoácidos en regiones que no contribuyen, o sólo en parte, a la especificidad de ligadura cuando se aparean con la cadena pesada, y similares. Un aspecto de la presente invención es usar como cadena liviana común una cadena liviana idéntica para combinar con diferentes cadenas pesadas para formar anticuerpos con dominios de ligadura de antígenos funcionales. El uso de una cadena liviana común evita la formación de heterodímeros en donde el apareamiento de las cadenas livianas y pesadas da por resultado dominios de ligadura de antígenos que no son funcionales, en otras palabras que no son capaces de ligarse al antígeno o antígenos objetivo. El uso de una cadena liviana común y dos cadenas pesadas ha sido propuesto por (Merchant et al, 1998; WO 98/50431) para un propósito diferente, a saber, para *aumentar* la formación de anticuerpos biespecíficos funcionales a expensas de una complejidad de la mezcla de anticuerpos. Estas publicaciones enseñan un método para producir preferentemente un anticuerpo biespecífico definido y deseado, *minimizando* de este modo la complejidad de la mezcla producida. Por lo tanto, Merchant enseña específicamente evitar la producción de anticuerpos mono-específicos, por estos son subproductos indeseados en el procedimiento para la producción de anticuerpos biespecíficos descritos en esas publicaciones. Claramente, no hay una enseñanza en la técnica anterior para preparar una mezcla compleja de anticuerpos a partir de una célula huésped recombinante evitando la formación de dominios de ligadura no funcionales o los beneficios de estos, y menos de que manera. En el método de acuerdo con la presente invención, se expresan por lo menos tres diferentes cadenas pesadas que son capaces de aparearse con la cadena liviana común. En otras formas de realización, la célula huésped de acuerdo con la invención está provista de secuencias de ácidos nucleicos que codifican para 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más cadenas pesadas capaces de aparearse con la cadena liviana común, para aumentar la complejidad de la mezcla de anticuerpos producida.

"Diferentes cadenas pesadas" de acuerdo con la invención pueden diferir en la región variable y tener la misma región constante. En otras formas de realización, en donde está claro del contexto, pueden tener la misma región variable y diferir en la región constante, por ejemplo, ser de un isotipo diferente. El uso de una mezcla de anticuerpos que tienen diferentes regiones constantes, tales como la porción Fc, puede ser ventajoso si se tienen que movilizar diferentes brazos del sistema inmunológico en el tratamiento del cuerpo humano o animal. En otras formas de realización, también claros del contexto, ambas regiones, la variable y la constante, pueden diferir.

Una "mezcla de anticuerpos" de acuerdo con la invención comprende por lo menos tres anticuerpos recombinantes no idénticos, pero pueden comprender 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más anticuerpos diferentes, y pueden parecer una mezcla de anticuerpos policlonales o por lo menos oligoclonales con respecto a la complejidad y el número de moléculas de ligadura de antígenos funcionales. Las mezclas producidas de acuerdo con la presente invención comprenderán usualmente anticuerpos biespecíficos. Si se desea, la formación de anticuerpos mono-específicos en la mezcla puede ser favorecida sobre la formación de anticuerpos biespecíficos. Cuando n cadenas pesadas y una cadena liviana común son expresadas de acuerdo con la invención en una célula huésped a niveles iguales, el porcentaje teórico de anticuerpos biespecíficos producido por el método de acuerdo con la invención es $(1-1/n)*100\%$. El número total de diferentes anticuerpos en la mezcla producida por el método de acuerdo con la invención es teóricamente $n+(n^2-n)/2$, de los cuales $(n^2-n)/2$ son anticuerpos biespecíficos. La distorsión de la relación de los niveles de expresión de las diferentes cadenas pesadas puede llevar a valores que se desvían de los valores teóricos. La cantidad de anticuerpos biespecíficos también puede ser disminuida, en comparación con estos valores teóricos, si no todas las cadenas pesadas se aparean con igual eficiencia. Es posible, por ejemplo, generar por ingeniería genética las cadenas pesadas, por ejemplo, introduciendo superficies de interacción específicas y complementarias entre cadenas pesadas seleccionadas, para promover el apareamiento de homodímeros sobre el apareamiento de heterodímeros, al contrario de lo que propuso Merchant, *supra*. Las cadenas pesadas también pueden ser seleccionadas de modo de minimizar la formación de heterodímeros en la mezcla. Una forma especial de esta forma de realización comprende cadenas pesadas de dos o más isotipos diferentes (por ejemplo, IgG1, IgG3, IgA). Cuando se expresan cadenas pesadas de diferentes isotipos en la misma célula huésped de acuerdo

con la presente invención y una cadena liviana que puede aparearse con estas cadenas pesadas, la cantidad de anticuerpos biespecíficos será reducida, posiblemente a niveles muy bajos o inclusive indetectables. Así, cuando los anticuerpos biespecíficos son menos deseables, es posible producir una mezcla de anticuerpos de acuerdo con la invención, en donde una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena liviana común y secuencias de ácidos nucleicos que codifican por lo menos tres diferentes cadenas pesadas con una región variable diferente capaz de aparearse con dicha cadena liviana común son expresadas en un huésped recombinante, y en donde dichas cadenas pesadas difieren además en sus regiones constantes suficientemente para reducir o prevenir el apareamiento entre las diferentes cadenas pesadas. Las mezclas de anticuerpos de acuerdo con la invención pueden ser producidas a partir de un clon que se derivó de una sola célula huésped, es decir, de una población de células que contiene las mismas secuencias de ácidos nucleicos recombinantes.

Se comprenderá que las diferentes cadenas pesadas de acuerdo con la invención pueden ser codificadas en moléculas de ácidos nucleicos separadas, pero también pueden estar presentes en una molécula de ácidos nucleicos que comprende diferentes regiones que codifican a dichas por lo menos tres cadenas pesadas. Las moléculas de ácidos nucleicos codifican usualmente a precursores de las cadenas livianas y/o pesadas, las cuales cuando son expresadas son segregadas de las células huéspedes, siendo procesadas de este modo para dar la forma madura. Estos y otros aspectos de la expresión de anticuerpos en una célula huésped son bien conocidos por los expertos en el arte.

[0028] Una "célula huésped recombinante", como se usa en la presente, es una célula que comprende uno o más de los así llamados transgenes, es decir, secuencias de ácidos nucleicos recombinantes no presentes naturalmente en dicha célula. Estos transgenes son expresados en dicha célula huésped para producir anticuerpos recombinantes codificados por estas secuencias de ácidos nucleicos, cuando estas células son cultivadas en condiciones conducen a la expresión de dichas secuencias de ácidos nucleicos. La célula huésped de acuerdo con la invención puede estar presente en la forma de un cultivo de un clon que se deriva de una sola célula huésped en donde han sido introducidos los transgenes. Para obtener la expresión de secuencias de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos, es bien sabido por los expertos en el arte que las secuencias capaces de dirigir tal expresión pueden ser ligadas funcionalmente a las secuencias de ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos. Que está ligado funcionalmente describe que las secuencias de ácidos nucleicos que codifican los fragmentos de anticuerpos o precursores de estos están ligadas a las secuencias capaces de dirigir la expresión de tal modo que estas secuencias pueden dirigir la expresión de los anticuerpos o precursores de estos. Los vectores de expresión útiles se encuentran disponibles en el arte, por ejemplo, la serie de vectores pcDNA de Invitrogen. En donde la secuencia que codifica al polipéptido de interés está adecuadamente insertada con referencia a las secuencias que gobiernan la transcripción y la traducción del polipéptido codificado, el casete de expresión resultante es útil para producir el polipéptido de interés, que se denomina expresión. Las secuencias que dirigen la expresión pueden incluir promotores, intensificadores y similares, y combinaciones de estos. Estos deberían ser capaces de funcionar en la célula huésped, dirigiendo de este modo la expresión de las secuencias de ácidos nucleicos que están ligadas funcionalmente a estos. Los promotores pueden ser constitutivos o regulados, y pueden ser obtenidos de varias fuentes, incluyendo virus, fuentes procarióticas o eucarióticas, o diseñados artificialmente. La expresión de ácidos nucleicos de interés puede ser del promotor o derivado natural de estos o de un promotor completamente heterólogo. Algunos promotores bien conocidos y muy usados para la expresión en células eucarióticas comprenden promotores derivados de virus, tales como adenovirus, por ejemplo, el promotor E1A, los promotores derivados de citomegalovirus (CMV), tal como el promotor temprano inmediato de CMV (IE), los promotores derivados del Virus de Simio 40 (SV40), y similares. Los promotores adecuados también pueden ser derivados de células eucarióticas, tales como los promotores de metalotioneína (MT), el promotor del factor de elongación 1 α (EF-1 α), el promotor de actina, un promotor de inmunoglobulina, promotores de shock térmico, y similares. Cualquier promotor o intensificador/promotor capaz de dirigir la expresión de la secuencia de interés en la célula huésped es adecuado en la invención. En una forma de realización, la secuencia capaz de dirigir la expresión comprende una región de un promotor de CMV, preferentemente la región que comprende los nucleótidos -735 a +95 del intensificador/promotor del gen temprano inmediato de CMV. El experto en el arte comprenderá que las secuencias de expresión usadas en la invención pueden ser combinadas adecuadamente con elementos que pueden estabilizar o aumentar la expresión, tales como los aislantes, las regiones de unión a la matriz, los elementos STAR (WO 03/004704), y similares. Esto puede aumentar la estabilidad y/o los niveles de expresión. La producción de proteínas en las células huésped recombinantes ha sido descrita ampliamente, por ejemplo, en "Current Protocols in Protein Science", 1995, Coligan JE, Dunn BM, Ploegh HL, Speicher DW, Wingfield PT, ISBN 0-471-11184-8; Bendig, 1988. El cultivo de una célula se realiza para permitir que se metabolice, y/o crezca y/o divida y/o produzca proteínas recombinantes de interés. Esto se puede lograr mediante métodos bien conocidos por los expertos en el arte, e incluye, pero no está limitado a, proveer nutrientes para la célula. Los métodos comprenden cultivo que se adhiere a las superficies, cultivo en suspensión, o combinaciones de estos. Varias condiciones de cultivo pueden ser optimizadas por métodos bien conocidos en el arte para optimizar los rendimientos de la producción de proteínas. El cultivo se puede realizar, por ejemplo, en discos, frascos cilíndricos o en biorreactores, usando sistemas de a lotes, alimentados por lotes, continuos, de fibra hueca, y similares. Para lograr una producción a gran escala (continua) de proteínas recombinantes a través del cultivo de células se prefiere en el arte tener células capaces de crecer en suspensión, y se prefiere tener células capaces de ser cultivadas en ausencia de suero derivado de animales o humanos o componentes de suero derivados de animales o humanos. Así la purificación es más fácil y la seguridad es aumentada debido a la ausencia de proteínas animales o humanas adicionales derivadas del medio de cultivo,

mientras el sistema también es muy confiable ya que los medios de síntesis son los mejores en reproducibilidad.

“Células huésped” de acuerdo con la invención, pueden ser cualquier célula huésped capaz de expresar moléculas de ADN recombinante, incluyendo bacterias tales como Escherichia (por ejemplo, E. coli), Enterobacter, Salmonella, Bacillus, Pseudomonas, Streptomyces, levaduras tales como S. cerevisiae, K. lactis, P. pastoris, Candida, o yarrowia, hongos filamentosos tales como Neurospora, Aspergillus oryzae, Aspergillus nidulans y Aspergillus niger, células de insectos tales como Spodoptera frugiperda SF-9 o células SF-21, células de mamíferos tales como las células de ovario de hámster chino (CHO), células BHK, células de ratón incluyendo células SP2/0 y células de mieloma NS-0, células de primates tales como COS y células Vero, células MDCK, células BRL 3A, hibridomas, células tumorales, células primarias inmortalizadas, células humanas tales como W138, HepG2, HeLa, HEK293, HT1080 o células de retina embrionarias, tales como PER.C6™, y similares. Frecuentemente, el sistema de expresión de elección comprenderá un huésped y un vector de expresión de células de mamíferos, de modo que los anticuerpos son glicosilados apropiadamente. Se puede usar ventajosamente una línea celular humana, preferentemente PER.C6™, para obtener anticuerpos con un modelo de glicosilación completamente humano. Las condiciones para cultivar o multiplicar células (ver por ejemplo, “Tissue Culture”, Academic Press, Kruse y Paterson, editores (1973)) y las condiciones para la expresión del producto recombinante puede diferir un poco, y la optimización del procedimiento se realiza usualmente para aumentar los rendimientos del producto y/o el crecimiento de las células unas con respecto a las otras, de acuerdo con métodos generalmente conocidos para el experto en el arte. En general, se pueden hallar los principios, protocolos y las técnicas prácticas para maximizar la productividad de los cultivos de células de mamíferos en “Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach” (M. Butler, ed., IRL Press, 1991). La expresión de anticuerpos en células huésped recombinantes ha sido descripta ampliamente en el arte (ver por ejemplo, EP0120694; EP0314161; EP0481790; EP0523949; patente U.S. 4816567; WO 00/63403). Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican las cadenas livianas y pesadas pueden estar presentes como copias extracromosómicas y/o estar integradas en forma estable en el cromosoma de la célula huésped. Con respecto a la estabilidad de producción, se prefiere esta última.

Los anticuerpos son expresados en las células de acuerdo con la invención, y pueden ser recuperados de las células o preferentemente del medio de cultivo celular, por métodos generalmente conocidos por los expertos en el arte. Tales métodos pueden incluir precipitación, centrifugación, filtración, cromatografía de exclusión de tamaño, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio de cationes y/o aniones, cromatografía de interacción hidrófoba, y similares. Para una mezcla de anticuerpos que comprende moléculas de IgG, se puede usar adecuadamente la cromatografía de afinidad de la proteína A o la proteína G (ver por ejemplo, las patentes U.S. 4.801.687 y 5.151.504).

En una forma de realización, por lo menos dos anticuerpos de la mezcla producidos de acuerdo con la invención comprenden un dímero de cadena pesada-liviana que tiene diferentes especificidades y/o afinidades. La especificidad determina qué antígeno o epitopo de este es ligado por el anticuerpo. La afinidad es una medida de la fuerza de la ligadura a un antígeno o epitopo particular. La ligadura específica es definida como ligadura con una afinidad (K_a) de por lo menos 5×10^4 litro/mol, más preferentemente 5×10^5 , más preferentemente más de 5×10^6 , aún más preferentemente 5×10^7 , o más. Típicamente, los anticuerpos monoclonales pueden tener afinidades que van hasta 10^{10} litros por mol, o aún mayores. La mezcla de anticuerpos producida de acuerdo con la presente invención puede contener por lo menos dos anticuerpos que se ligan a diferentes epitopos en la misma molécula de antígeno y/o puede contener por lo menos dos anticuerpos que se ligan a diferentes moléculas de antígenos presentes en una mezcla que comprende antígenos. Una mezcla que comprende antígenos como ésta puede ser una mezcla de antígenos purificados parcialmente o completamente, tales como toxinas, componentes de membranas y proteínas, proteínas con envuelta viral, o puede ser una célula sana, una célula enferma, una mezcla de células, un tejido o mezcla de tejidos, un tumor, un órgano, un sujeto humano o animal completo, un hongo o una levadura, una bacteria o un cultivo bacteriano, un virus o un stock de virus, combinaciones de estos, y similares. A diferencia de los anticuerpos monoclonales que son capaces de ligarse a un solo antígeno o epitopo, la mezcla de anticuerpos de acuerdo con la presente invención puede por lo tanto tener muchas de las ventajas de una mezcla de anticuerpos policlonales u oligoclonales.

En una forma de realización preferida, la célula huésped de acuerdo con el método de la invención es capaz de una expresión de alto nivel de la inmunoglobulina humana, es decir, por lo menos 1 pg/célula/día, preferentemente por lo menos 10 pg/célula/día y aún más preferentemente por lo menos 20 pg/célula/día o más, sin la necesidad de amplificación de las moléculas de ácidos nucleicos que codifican a las cadenas pesadas y livianas en dicha célula huésped. Preferentemente, las células huéspedes de acuerdo con la invención contienen en su genoma entre 1 y 10 copias de cada ácido nucleico recombinante a ser expresado. En el arte, la amplificación del número de copias de las secuencias de ácidos nucleicos que codifican a una proteína de interés en por ejemplo, células de CHO pueden ser usadas para aumentar los niveles de expresión de la proteína recombinante por las células (ver por ejemplo, Bendig, 1988; Cockett et al, 1990; patente U.S. 4.399.216). Este es actualmente un método usado ampliamente. Sin embargo, se requiere un esfuerzo significativo que consume mucho tiempo antes de que se haya establecido un clon con un número de copias alto deseado y niveles de expresión altos, y además clones que alberguen números de copias muy altos (hasta cientos) del casete de expresión frecuentemente son inestables (por ejemplo, Kim et al., 1998). Por lo tanto, una forma de realización preferida de la presente invención es el uso de células huésped que no requieren tales estrategias de amplificación expresiones de alto nivel de los anticuerpos de interés. Esto permite la rápida generación de clones estables de las células huésped que expresan la mezcla de anticuerpos de acuerdo con

- la invención de una manera consistente. Proporcionamos evidencia de que las células huésped de acuerdo con la invención pueden ser obtenidas, subclonadas y propagadas además para por lo menos alrededor de 30 divisiones celulares (duplicaciones de poblaciones) mientras se expresa la mezcla de anticuerpos de acuerdo con la invención de una manera estable, en ausencia de la presión de selección. Por lo tanto, en algunos aspectos los métodos de la invención incluyen el cultivo de las células para por lo menos 20, preferentemente 25, más preferentemente 30 duplicaciones de la población, y en otros aspectos las células huésped de acuerdo con la invención han sufrido por lo menos 20, preferentemente 25, más preferentemente 30 duplicaciones de la población y aún son capaces de expresar una mezcla de anticuerpos de acuerdo con la invención. La invención también provee un cultivo de células que produce una mezcla de inmunoglobulinas a partir de una sola célula, comprendiendo dicha mezcla por lo menos una cadena liviana común y por lo menos tres diferentes cadenas pesadas. La invención también provee un cultivo de células que produce por lo menos tres diferentes inmunoglobulinas monoespecíficas a partir de una sola célula. En algunos aspectos preferidos, dicho cultivo produce dicha mezcla o dichas por lo menos tres diferentes inmunoglobulinas monoespecíficas en una sola célula para más de 20, preferentemente más de 25, más preferentemente más de 30 duplicaciones de población.
- Preferentemente las células huésped de acuerdo con el método de la invención se derivan de células de retina humana que han sido inmortalizadas o transformadas con secuencias adenovirales E1. Una célula huésped particularmente preferida de acuerdo con los métodos de la presente invención es PER.C6™ como se depositó bajo ECACC no. 96022940, o un derivado de éste. Los clones derivados de PER.C6 pueden ser generados rápidamente, usualmente contienen un número limitado de copias (aprox. 1-10) del transgén, y son capaces de expresión de alto nivel de anticuerpos recombinantes (Jones et al, 2003). Por lo tanto, se espera que tales clones mantengan un número de copias estable durante muchas generaciones, lo que a su vez es una ventaja en la producción de productos biofarmacéuticos. Las células PER.C6™ han sido caracterizadas y documentadas ampliamente, demostrando un buen procedimiento de aumento progresivo, cultivo en suspensión e independencia del factor de crecimiento. Además, las PER.C6™ pueden ser incorporadas en una suspensión de una manera altamente reproducible, haciéndolas particularmente adecuadas para una producción en gran escala. A este respecto, la línea celular PER.C6™ ha sido caracterizada para el cultivo en biorreactor, en donde puede crecer a densidades muy altas. El uso de PER.C6™ para la producción recombinante de anticuerpos ha sido descrita con detalles en la publicación WO 00/63403 y en (Jones et al., 2003).
- Otro aspecto de la presente invención es proveer una mezcla de anticuerpos que se puede obtener por un método de acuerdo con la invención. Se espera que tales mezclas de anticuerpos sean más efectivas que los componentes individuales que comprende, en analogía con los anticuerpos policlonales que son usualmente más efectivos que los anticuerpos monoclonales al mismo objetivo. Tales mezclas pueden ser preparadas contra una variedad de antígenos o epitopos epitopo.
- Otro aspecto de la presente invención es proveer una célula huésped recombinante que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena liviana y una secuencia de ácidos nucleicos o secuencias de ácidos nucleicos que codifican por lo menos tres diferentes cadenas pesadas de un anticuerpo, en donde dichas cadenas livianas y cadenas pesadas son capaces de apareamiento, preferentemente para formar un dominio de ligadura funcional. La cadena pesada y la liviana apareadas forman regiones de ligadura de antígenos funcionales contra el antígeno objetivo o antígenos objetivo. Las células huésped de acuerdo con la invención son útiles en el método de acuerdo con la invención. Pueden ser usados para producir mezclas de anticuerpos de acuerdo con la invención.
- [0035]** Otro aspecto de la presente invención para proveer una composición que comprende una mezcla de anticuerpos producidos en forma recombinante, en donde por lo menos tres diferentes secuencias de cadenas pesadas son representadas en la mezcla de anticuerpos recombinantes. Los anticuerpos monoclonales son producidos de forma rutinaria por métodos recombinantes. La presente invención divulga mezclas de anticuerpos útiles para el diagnóstico o el tratamiento en varios campos. Las composiciones de acuerdo con la invención comprenden mezclas de por lo menos tres diferentes cadenas pesadas apareadas con las cadenas livianas en la forma de anticuerpos, Las cadenas livianas de los anticuerpos en dichas mezclas tienen preferentemente una cadena liviana común. Las mezclas pueden comprender anticuerpos biespecíficos. Las mezclas pueden ser producidas a partir de un clon que fue derivado de una sola célula huésped, es decir, de una población de células que contiene las mismas secuencias de ácidos nucleicos recombinantes. Las mezclas pueden ser obtenidas por métodos de acuerdo con la invención, o ser producidas por células huésped de acuerdo con la invención. En otras formas de realización, el número de cadenas pesadas representado en dicha mezcla es 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más. La mezcla óptima para un determinado propósito puede ser determinada empíricamente por métodos bien conocidos por el experto en el arte, o por métodos provistos por la presente invención. Tales composiciones de acuerdo con la invención pueden tener varias de las ventajas de una mezcla de anticuerpos policlonales, sin las desventajas usualmente asociadas en forma inherente con las mezclas de anticuerpos policlonales, debido a la manera en la cual fueron producidos. Se espera además que la mezcla de anticuerpos sea más eficaz que los anticuerpos monoclonales separados. Por lo tanto la dosis, y por eso la capacidad de producción requerida, pueden ser menos para las mezclas de anticuerpos de acuerdo con la invención que para los anticuerpos monoclonales.
- Se ha descrito, por ejemplo, que aunque ningún anticuerpo monoclonal individual a la neurotoxina botulínica (BoNT/A) neutralizó significativamente a la toxina, una combinación de tres de tales anticuerpos monoclonales (anticuerpo oligoclonal) neutralizó 450.000 50% de dosis letales de BoNT/A, una potencia 90 veces superior a la

globulina hiperinmune humana (Nowakowski et al, 2002). Este resultado demuestra que las mezclas oligoclonales de anticuerpos que comprenden sólo 2 a 3 diferentes especificidades pueden tener una potencia muy alta.

Además, las posibilidades de que una mezcla de la invención pierda su actividad debido a la pérdida del objetivo o del epitopo es reducida, cuando se compara con un anticuerpo monoclonal individual. En formas de realización particulares, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más de los anticuerpos presentes en la mezcla de acuerdo con la invención tienen diferentes especificidades. Dichas especificidades diferentes pueden ser dirigidas a diferentes epitopos en el mismo antígeno y/o puede ser dirigidas a diferentes antígenos presentes en una mezcla que comprende antígenos. Una composición de acuerdo con la invención puede comprender además 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más anticuerpos que tienen diferentes afinidades para el mismo epitopo. Los anticuerpos con diferentes afinidades por el mismo epitopo pueden ser generados, por ejemplo, por métodos de maduración de afinidad, conocidos por el experto en la técnica.

En una forma de realización particularmente preferida, la composición de acuerdo con la invención tiene un efecto que es mayor que el efecto de cada anticuerpo mono-específico individual presente en dicha composición. Dicho efecto puede ser medido en un ensayo funcional. Un "ensayo funcional" de acuerdo con la presente invención es un ensayo que se puede usar para determinar uno o más parámetros deseados del anticuerpo o de la mezcla de anticuerpos sujetos a las condiciones de ensayo. Los ensayos funcionales adecuados pueden ser ensayos de ligadura, ensayos de apoptosis, ensayos de citotoxicidad celular dependiente (ADCC), ensayos de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), inhibición del crecimiento celular o proliferación (efecto citostático), ensayos de destrucción de células (efecto citotóxico), ensayos de señalización de células, ensayos para medir la inhibición de la ligadura del patógeno a la célula objetivo, ensayos para medir la secreción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) u otras moléculas segregadas, ensayos para bacteriostasis, actividad bactericida, neutralización de virus, ensayos para medir la atracción de componentes del sistema inmunológico al sitio en donde se ligan los anticuerpos, incluyendo métodos de hibridación in situ, métodos de marcado, y similares. Claramente, se pueden usar para este propósito también los ensayos in vivo tales como modelos animales, incluyendo modelos tumorales del ratón, modelos de enfermedad autoinmune, modelos de primates o roedores infectados con virus o infectados con bacterias, y similares. La eficacia de una mezcla de anticuerpos de acuerdo con la invención puede ser comparado con anticuerpos individuales en tales modelos por métodos generalmente conocidos por el experto en el arte.

Se describe además un método para identificar por lo menos un clon de la célula huésped que produce una mezcla de anticuerpos, en donde dicha mezcla de anticuerpos tiene un efecto deseado de acuerdo con un ensayo funcional, el método comprende los pasos de: (i) proveer una célula huésped que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica por lo menos una cadena liviana, y una secuencia o secuencias de ácidos nucleicos que codifican por lo menos dos diferentes cadenas pesadas, en donde dichas cadenas pesadas y livianas son capaces de aparearse entre sí; (ii) cultivar por lo menos un clon de dicha célula huésped en condiciones que conducen a la expresión de dichas secuencias de ácidos nucleicos; (iii) rastrear dicho por lo menos un clon de la célula huésped para la producción de una mezcla de anticuerpos que tiene el efecto deseado por un ensayo funcional; e (iv) identificar por lo menos un clon que produce una mezcla de anticuerpos que tiene el efecto deseado. Preferentemente, dicha célula huésped comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena liviana común que es capaz de aparearse con dichas por lo menos dos diferentes cadenas pesadas, de tal modo que los anticuerpos producidos comprenden cadenas livianas comunes, como se describe más arriba. En formas de realización específicas dicho cultivar en el paso (ii) y dicho rastrear en el paso (iii) del método se realizan con por lo menos dos clones. El método puede incluir opcionalmente un ensayo para medir los niveles de expresión de los anticuerpos que son producidos, ensayo que puede ser durante o después del paso (ii) de acuerdo con el método, o más tarde en el procedimiento. Tales ensayos son bien conocidos por el experto en el arte, e incluyen ensayos de concentración de proteínas, ensayos específicos de inmunoglobulinas, tales como ELISA, RIA, DELFIA, y similares. En formas de realización particulares, la célula huésped comprende una secuencia o secuencias de ácidos nucleicos que codifican por lo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más cadenas pesadas capaces de aparearse con dicha por lo menos una cadena liviana. Los ensayos funcionales útiles pueden ser ensayos para apoptosis, ADCC, CDC, destrucción de células, inhibición de proliferación, neutralización de virus, opsonización bacteriana, señalización mediada por receptores, señalización de células, actividad bactericida, y similares. Ensayos de rastreo útiles para anticuerpos anticáncer han sido descritos, por ejemplo, en la patente U.S. 6.180.357. Tales ensayos también se pueden usar para identificar un clon de acuerdo con el método de la presente invención. Es posible, por ejemplo, usar ensayos de inmunosorción ligados a enzimas (ELISA) para testear la ligadura de anticuerpos al objetivo. Usando tales ensayos, es posible rastrear con respecto a mezclas de anticuerpos que se ligan más ávidamente al antígeno objetivo (o mezcla de antígenos objetivo contra los cuales se debe testear la mezcla de anticuerpos). Otra posibilidad que se puede explorar es rastrear directamente con respecto a la citotoxicidad o los efectos citostáticos. Es posible que después de un rastreo diferente como éste, se elijan otros o los mismos clones que producen mezclas de anticuerpos, en vez de con el ELISA mencionado más arriba. El rastreo con respecto a la destrucción de células o la cesación del crecimiento de células cancerosas se puede usar adecuadamente de acuerdo con la invención. La muerte celular se puede medir por varios puntos finales, incluyendo la ausencia de metabolismo o la desnaturalización de enzimas. En una posible forma de realización de la presente invención, el ensayo se realiza enfocando en la actividad citotóxica con respecto a las células cancerosas como un punto final. Para este ensayo, se puede usar adecuadamente un kit de ensayo vivo/muerto, por ejemplo, el kit de ensayo de viabilidad/citotoxicidad

LIVE/DEAD® (L-3224) por Molecular Probes. También se pueden usar otros métodos de evaluación de la viabilidad celular, tales como exclusión de azul tripano, liberación de ⁵¹Cr, Calceína-AM, Alamar Blue™, actividad de LDH, y métodos similares. Los ensayos pueden incluir también el rastreo de la mezcla de anticuerpos con respecto a la especificidad al tejido que comprende el antígeno deseado. Los anticuerpos de acuerdo con la invención pueden tener una distribución tisular limitada. Es posible incluir el testeo de las mezclas de anticuerpos contra una variedad de células, tipos de células, o tejidos, para rastrear con respecto a mezclas de anticuerpos que se ligan preferentemente a las células, tipos de células o tejidos de interés. Independientemente de un ensayo funcional como se describió más arriba, la presente invención también enseña maneras de determinar la identidad de los anticuerpos expresados por un clon, usando métodos tales como enfoque isoeléctrico (IEF), espectrometría de masas (MS), y similares. Por lo tanto, un aspecto de la invención es proveer el uso de MS y/o IEF para seleccionar un clon que expresa una mezcla de anticuerpos de acuerdo con la invención. Cuando se producen anticuerpos monoclonales por las células huésped recombinantes, se realiza usualmente un paso de rastreo para evaluar los niveles de expresión de los clones individuales que fueron generados. La adición de más cadenas pesadas para producir mezclas agrega un nivel de complejidad a la producción de anticuerpos. Cuando las células huésped son transfectadas con moléculas de ácidos nucleicos que codifican las cadenas livianas y pesadas que formarán la mezcla de anticuerpos deseada, pueden surgir clones independientes que contienen la misma información genética, pero no obstante difiriendo en niveles de expresión, produciendo de este modo diferentes relaciones de los anticuerpos codificados, dando lugar a diferentes mezclas de anticuerpos a partir del mismo repertorio genético. El método de acuerdo con la invención es útil para identificar un clon que produce una mezcla óptima para un propósito determinado.

El cultivo y/o el rastreo de acuerdo con los pasos (ii) y (iii), respectivamente, pueden ser realizados adecuadamente usando procedimientos de alta producción, opcionalmente en una forma automatizada. Los clones pueden ser cultivados, por ejemplo, en placas de 96 cavidades u otras placas de múltiples cavidades, por ejemplo, en formato en serie, y rastreados con respecto a la producción de una mezcla deseada. Se puede emplear adecuadamente la robótica para este propósito. Los métodos para implementar el cultivo y los ensayos de alta producción se encuentran disponibles en general y son conocidos por el experto en el arte. Estará claro que también para este método de acuerdo con la invención, es beneficioso usar células huésped capaces de expresión de proteínas de alto nivel, sin la necesidad de amplificación del ácido nucleico que codifica a dichas proteínas en dicha célula. En una forma de realización, dicha célula huésped se deriva de una célula de retinoblasto embrionario humana, que ha sido inmortalizada o transformada por secuencias adenovirales E1. En una forma de realización preferida, dicha célula se deriva de PER.C6™. Se ha demostrado que esta línea celular es receptiva a manipulaciones de alto rendimiento, incluyendo el cultivo (WO 99/64582).

En formas de realización específicas de la presente invención, dicha mezcla de anticuerpos de acuerdo con el método de identificación de por lo menos una célula huésped de acuerdo con la invención, comprende por lo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más anticuerpos que tienen diferentes especificidades y/o afinidades.

Una ventaja potencial del método será que permitirá explorar muchas combinaciones posibles simultáneamente, incluyendo las combinaciones inherentemente la presencia de anticuerpos biespecíficos en la mezcla producida. Por lo tanto se pueden testear más combinaciones que sólo mezclando anticuerpos monoclonales conocidos purificados, tanto en número de combinaciones como en relaciones de presencia de diferentes anticuerpos en estas combinaciones.

El clon que ha sido identificado por el método de acuerdo con la invención, se puede usar para producir una mezcla de anticuerpos deseada. Por lo tanto, otro aspecto de la presente invención es proveer un método para producir una mezcla de anticuerpos, el método comprende el paso de: cultivar un clon de una célula huésped identificado por el método de identificación de por lo menos un clon de una célula huésped que produce una mezcla de anticuerpos de acuerdo con la invención, realizándose dicho cultivo en condiciones que conducen a la expresión de las moléculas de ácidos nucleicos que codifican a la por lo menos una cadena liviana común y las por lo menos tres diferentes cadenas pesadas. Los anticuerpos producidos pueden ser recuperados de las células huésped y/o del cultivo de la célula huésped, por ejemplo, del medio de cultivo. La mezcla de anticuerpos puede ser recuperada de acuerdo con una variedad de técnicas conocidas por el experto en el arte.

Otro aspecto de la presente invención es proveer una mezcla de anticuerpos que se puede obtener por el método de acuerdo con la invención, descrito más arriba. Dichas mezclas se pueden usar para una variedad de propósitos, tales como en el tratamiento o el diagnóstico de enfermedades, y puede reemplazar, o ser usado además de, los anticuerpos monoclonales o policlonales.

Los métodos de acuerdo con la presente invención pueden usar adecuadamente moléculas de ácidos nucleicos para codificar los anticuerpos, moléculas de ácidos nucleicos que fueron obtenidas por cualquier método adecuado, incluyendo métodos in vivo, por ejemplo, inmunización, o métodos in vitro, por ejemplo, de presentación de anticuerpos (A. Plückthun et al, "In vitro selection and evolution of proteins". En: Adv. Prot. Chem., F.M. Richards et al, Eds, Academic Press, San Diego, 2001, vol 55: 367-403), tal como presentación de fagos, presentación de ribosomas o presentación de mRNA (C. Schaffitzel et al., "In vitro selection and evolution of protein-ligand interactions by ribosome display". En: "Protein-Protein Interactions. A Molecular Cloning Manual", E. Golemis, Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 2001, pp 535-567), y presentación de levaduras (por ejemplo,

documento WO 99/36569). Los métodos de identificación de anticuerpos con respecto a un objetivo determinado, objetivo que puede ser un antígeno conocido o un antígeno no conocido presente en una mezcla antigénica, por presentación de fagos son conocidos por el experto en el arte. En general, una biblioteca de fagos que expresa un dominio de ligadura de antígenos o derivados de estos en su superficie, estando dicho dominio de ligadura de antígenos codificado por el material genético presente en dichos fagos, es incubada con el antígeno o la mezcla de antígenos de interés, después de lo cual se obtiene la ligadura de una subpoblación de los fagos que presentan sitios de ligadura de antígenos con respecto al antígeno deseado mientras que los fagos que no ligan son descartados. Tales pasos de selección pueden ser repetidos una, dos o más veces para obtener una población de fagos que son más o menos específicos con respecto al antígeno de interés. Los métodos de presentación de fagos para obtener anticuerpos, partes o derivados de estos han sido descritos ampliamente, por ejemplo, en (CF Barbas III et al, "Phage Display. A laboratory manual". Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 2001). La biblioteca usada para tal rastreo puede ser generada usando la información genética de una o más cadenas livianas, combinadas con información genética que codifica una pluralidad de cadenas pesadas. La biblioteca descrita por De Kruif et al. (1995b) comprende 7 cadenas livianas. Por lo tanto, en un panel de fagos que se ligan a un objetivo, que puede ser obtenido, por ejemplo, por métodos descritos en De Kruif et al (supra); patente U.S. 6.265.150; no más de 7 diferentes cadenas livianas serán representadas, y si el panel es suficientemente grande, se pueden hallar varios fagos con la misma cadena liviana acoplada a cadenas pesadas no relacionadas. Tales fagos pueden ser usados para obtener las moléculas de ácidos nucleicos útiles en los métodos de acuerdo con la presente invención.

Se describe además un método para producir una mezcla de anticuerpos a un objetivo, el método comprende los pasos de: i) poner en contacto una biblioteca de presentación de anticuerpos que comprenden anticuerpos o fragmentos de anticuerpos con material que comprende un objetivo, ii) por lo menos un paso de seleccionar anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se ligan a dicho objetivo, iii) identificar por lo menos dos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se ligan a dicho objetivo, en donde dichos por lo menos dos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos comprenden una cadena liviana común, iv) introducir una secuencia de ácidos nucleicos que codifican la cadena liviana y una secuencia de ácidos nucleicos o secuencias de ácidos nucleicos que codifican las cadenas pesadas de dichos por lo menos dos anticuerpos en una célula huésped, v) cultivar un clon de dicha célula huésped en condiciones que conducen a la expresión de dichas secuencias de ácidos nucleicos. La biblioteca de presentación de anticuerpos puede ser una biblioteca de presentación de fagos, una biblioteca de presentación de ribosomas, una biblioteca de presentación de mRNA, o una biblioteca de presentación de levaduras. Los pasos i) y ii) pueden repetirse opcionalmente una o más veces.

Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican a los anticuerpos obtenidos por el método de presentación de fagos, presentación de ribosomas o presentación de levaduras pueden ser convertidas para codificar cualquier formato de anticuerpos deseado tal como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgD, IgE, antes de introducirlos en una célula huésped, usando métodos de clonación molecular estándar y medios conocidos por el experto en el arte (por ejemplo, descritos en Boe1 et al, 2000).

Será evidente para los expertos en el arte que las bibliotecas en las cuales sólo está representada una cadena liviana son especialmente útiles a la luz de la presente invención, ya que todos los anticuerpos que se pueden obtener de una biblioteca como ésta, tendrán una cadena liviana común que es funcional para ligar el antígeno objetivo con cada una de las cadenas pesadas. En otras palabras, de acuerdo con los métodos de la invención, se evita la formación de dímeros no funcionales de cadena liviana-cadena pesada. Las bibliotecas de presentación de anticuerpos en fagos que tienen amplios repertorios de cadenas H y una o muy pocas secuencias de cadenas L han sido divulgadas en el arte (Nissim et al, 1994; Vaughan et al, 1996). En general, la especificidad de un anticuerpo parece estar determinada en una gran medida por su cadena pesada. Es posible aún rastrear, e identificar cadenas livianas que no contribuyen significativamente a la ligadura del anticuerpo, cadenas livianas que también podrían ser usadas adecuadamente de acuerdo con la invención. También puede ser posible seguir las enseñanzas de la presente invención, pero usar una cadena pesada y varias cadenas livianas. Sin embargo, el uso de una cadena liviana común y diferentes cadenas pesadas parece preferible, y las siguientes observaciones sustentan la idea de que la especificidad de un anticuerpo parece estar dominada por su secuencia de cadenas pesadas. En el procedimiento de edición del receptor, un mecanismo de células B para monitorear si su receptor de inmunoglobulina codifica un autoanticuerpo potencialmente peligroso, las células B que expresan un autoanticuerpo reemplazan la cadena pesada expresada con otra cadena pesada mientras retienen la cadena liviana expresada. Así, se genera una nueva especificidad por el anticuerpo que no codifica un autoanticuerpo. Esto muestra que una sola cadena liviana puede dimerizarse exitosamente con múltiples cadenas pesadas para formar diferentes especificidades de anticuerpos (Nemazee, 2000; Casellas et al, 2001). Se han informado series de líneas celulares transfectadas que usan un solo gen de cadena pesada con diferentes genes de cadenas livianas, manteniendo los anticuerpos producidos en gran medida su especificidad, independientemente de la cadena liviana (Radic et al, 1991). Se han obtenido diferentes anticuerpos a partir de una biblioteca que ha sido construida usando una sola cadena liviana (Nissim et al, 1994). Hemos obtenido varios anticuerpos de la biblioteca descrita por De Kruif et al (1995), que fue construida usando 7 cadenas livianas, que tienen la misma cadena liviana pero diferentes especificidades (ver por ejemplo, ejemplo 1: ligadura de anticuerpos a EpCAM y a CD46, descrita en WO 01/48485 y WO 02/18948, respectivamente). Aparte de rastrear una biblioteca de fagos con respecto a un objetivo, también será posible comenzar con un anticuerpo que ha probado ya sus méritos, y usar la cadena liviana de este anticuerpo

en la preparación de una biblioteca de cadenas pesadas combinadas con esta cadena liviana particular solamente, de acuerdo con métodos conocidos por el experto en el arte, tales como la presentación de fagos. Usando esta estrategia, se puede usar un anticuerpo monoclonal para obtener una mezcla de anticuerpos de acuerdo con la invención, que se asemeja funcionalmente a un anticuerpo policlonal u oligoclonal con respecto al mismo objetivo.

5 Alternativamente, se puede usar un método semejante al método descrito por Jespers et al (1994) para obtener un anticuerpo humano basado en un anticuerpo de roedor funcional. La cadena pesada de un anticuerpo conocido de origen no humano es clonado primero y apareado como una cadena modelo con un repertorio de cadenas livianas humanas para usar en la presentación de fagos, después de lo cual son seleccionados los fagos para ligarse al antígeno o mezcla de antígenos. La cadena liviana seleccionada es apareada a su vez con un repertorio de cadenas

10 pesadas humanas presentadas en un fago, y los fagos son seleccionados nuevamente para hallar varias cadenas pesadas, las que cuando son apareadas con la cadena liviana son capaces de ligarse al antígeno o mezcla de antígenos de interés. Esto permite crear una mezcla de anticuerpos humanos contra un objetivo para el cual hasta ahora sólo se describió un anticuerpo monoclonal no humano. Es posible que una mezcla de acuerdo con la presente invención tenga ya efectos funcionales beneficiosos cuando los anticuerpos individuales no tienen altas afinidades con respecto al objetivo, mientras que altas afinidades se requieren frecuentemente para que los anticuerpos monoclonales sean efectivos. Esto tendría la ventaja de que la maduración por afinidad puede ser requerida en menos casos para los métodos y mezclas de acuerdo con la presente invención que cuando se prevé una propuesta con anticuerpos monoclonales.

Las secuencias codificadoras de la cadena pesada y liviana se pueden introducir en forma simultánea o consecutiva

20 en la célula huésped. También es un aspecto de la invención preparar una célula huésped que comprende un ácido nucleico recombinante que codifica una cadena liviana de un anticuerpo. Tal célula se puede obtener por ejemplo por la transfección de dicho ácido nucleico, y opcionalmente se puede identificar un clon que tiene alta expresión de la cadena liviana. Un clon establecido luego se puede usar para añadir información genética que codifica 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más cadenas pesadas de la invención por la introducción de moléculas de ácido nucleico que las codifican en estas células del clon que ya contiene la cadena liviana. Las moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas pesadas se pueden introducir en dicha célula huésped en forma concomitante. Obviamente también es posible introducir las cadenas pesadas en forma consecutiva, por ejemplo por el uso de diferentes marcadores de selección, lo que puede ser ventajoso si no todas las cadenas pesadas se pueden introducir simultáneamente debido a que las células no captan suficientes copias de moléculas de ácido nucleico recombinante. Los métodos para introducir moléculas de ácido nucleico recombinante en las células huésped son bien conocidas por los expertos en la técnica, e incluyen transfección, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, infección con virus, y similares. Los profesionales expertos tiene varias posibilidades para introducir más vectores con las secuencias de ácido nucleico de interés en la misma célula huésped, ver, por ejemplo Sambrook, Fritsch y Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edición, 1989; *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel FM, et al, eds, 1987; the series *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.). Los marcadores de selección dominantes adecuados para introducir ácidos nucleicos en las células huésped eucarióticas de acuerdo con la invención pueden ser G418 o neomicina (geneticina), higromicina o ácido micofenólico, puromicina, y similares, para lo cual los genes que codifican la resistencia están disponibles en los vectores de expresión. Otras posibilidades incluyen por ejemplo el uso de vectores que contienen genes de DHFR o glutamato sintetasa para seleccionar en presencia de metotrexato

30 en una célula DHFR⁻ o la ausencia de glutamina en un auxótrofo de glutamina, respectivamente. El uso de los vectores de expresión con diferentes marcadores de selección permite las posteriores transfecciones con las secuencias de la cadena pesada de interés en la célula huésped, que ya contiene en forma estable otras cadenas pesadas introducidas previamente por el uso de otros marcadores de selección. También es posible usar marcadores de selección que se puedan utilizar más de una vez, por ejemplo cuando contiene mutaciones, intrones, o promotores debilitados que los vuelven dependientes de la concentración (por ejemplo EP0724639; WO 01/32901; patente US 5.733.779). Alternativamente, un marcador de selección se puede reusar al eliminarlo de la célula huésped después de usarlo, por ejemplo por recombinación específica del sitio. Un marcador seleccionable ubicado entre las secuencias reconocidas por una recombinasa específica del sitio, por ejemplo sitios lox o sitios FRT, se usa para la generación del primer transfectante estable (ver, para la recombinación específica del sitio Cre-lox, Wilson y Kola, 2001). Posteriormente, el marcador seleccionable se escinde del ADN de la célula huésped por la recombinasa específica del sitio coincidente, por ejemplo Cre o Flp. Una posterior transfección puede utilizar adecuadamente el mismo marcador de selección. Se pueden preparar clones de la célula huésped diferentes que comprenden la información genética que codifica una cadena liviana diferente. Si los anticuerpos se identifican con un método de despliegue de anticuerpos, en consecuencia es posible preparar varias células huésped, cada una que comprende una cadena liviana presente en la biblioteca de despliegue de anticuerpos. Después de identificar los anticuerpos que se unen a un blanco mediante el despliegue de anticuerpos, las moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas pesadas se pueden introducir en la célula huésped que contiene la cadena liviana común que es capaz de aparearse a las cadenas pesadas. En consecuencia, un aspecto de la presente invención es proporcionar un método para obtener una célula huésped para la producción de una mezcla de anticuerpos, el método comprende las etapas de: introducir en dicha célula huésped una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena liviana y secuencia o secuencias de ácidos nucleicos que codifican 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más cadenas pesadas diferentes que son capaces de aparearse con dicha cadena liviana, donde dichas moléculas de ácido nucleico se introducen en forma consecutiva o simultánea. Obviamente también es posible introducir al menos dos de dichas moléculas de ácido nucleico en forma simultánea, e introducir al menos otra de dichas moléculas de ácido nucleico en forma consecutiva. En aún otro aspecto de acuerdo con la invención, se proporciona un método para obtener una célula

65

huésped recombinante para la producción de una mezcla de anticuerpos, el método que comprende la etapa de: introducir una secuencia de ácidos nucleicos o secuencias de ácidos nucleicos que codifican 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más cadenas pesadas diferentes en una célula huésped recombinante que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena liviana capaz de aparearse con al menos tres de dichas cadenas pesadas.

- 5 En caso que pueda parecer que una célula huésped recombinante de acuerdo con la invención no exprese suficiente cadena liviana para dimerizar con el total de lo expresado, al menos dos cadenas pesadas, copias extra de las moléculas de ácido nucleico que codifican la cadena liviana se pueden transfectar en la célula.

Además de la integración aleatoria después de la transfección, también se pueden usar métodos para integrar los transgenes en posiciones predeterminadas del genoma que producen niveles de expresión favorables de acuerdo con la invención. Tales métodos, por ejemplo pueden emplear la integración específica del sitio por recombinación homóloga (ver por ejemplo WO 98/41645), o hacer uso de recombinasas específicas del sitio (Gorman y Bullock, 2000).

Además se describe un mamífero no humano transgénico o una planta transgénica que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena liviana y una secuencia de ácidos nucleicos o secuencias de ácidos nucleicos que codifican al menos dos cadenas pesadas diferentes que son capaces de aparearse con dicha cadena liviana, donde dichas secuencias de ácidos nucleicos que codifican dichas cadenas liviana y pesada están bajo el control de un promotor específico de tejido. Los promotores de las plantas también pueden ser no específicos de tejido, y también se pueden usar general elementos de expresión génica, tales como el promotor de CaMV 35S y el sitio de adición de nopalina sintasa poliA. Dicha cadena liviana es una cadena liviana común de acuerdo con la invención. En formas de realización específicas, el animal o planta transgénico de acuerdo con la invención comprende 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más secuencias de la cadena pesada. Además del cultivo celular como un sistema de producción para proteínas recombinantes, la técnica también describe el uso de animales transgénicos, plantas transgénicas, y por ejemplo pollos transgénicos para producir proteínas en los huevos y similares para producir proteínas recombinantes de interés (Pollock et al, 1999; Larrick y Thomas, 2001; documento WO 91/08216). Estas usualmente comprenden el gen o genes recombinantes que codifican una o más proteínas de interés en asociación operativa con un promotor específico de tejido. Por ejemplo, se ha mostrado que los anticuerpos recombinantes se pueden producir en altos niveles en la leche de los animales transgénicos, que contiene los ácidos nucleicos que codifican una cadena pesada y una liviana detrás de un promotor específico de la glándula mamaria (por ejemplo, Pollock et al, 1999; documento WO 95/17085). Particularmente útil en este aspecto son las vacas, ovejas, cabras, cerdos, conejos, ratones, y similares, que se pueden ordeñar para obtener anticuerpos. Los promotores útiles son los promotores de caseína, tales como el promotor de β -caseína, el promotor de α S1-caseína, el promotor de la proteína ácida del suero (WAP), el promotor de β -lactoglobulina, el promotor de α -lactalbúmina, y similares. La producción de proteínas biofarmacéuticas en la leche de mamíferos transgénicos se ha descrito extensivamente (por ejemplo Pollock et al, 1999). Además de los promotores específicos de la glándula mamaria, también se pueden usar otros promotores específicos de tejido, que dirigen la expresión en la sangre, orina, saliva, y similares. La generación de animales transgénicos que comprenden moléculas de ácido nucleico recombinante se ha documentado extensivamente, y pueden incluir la microinyección de oocitos (ver por ejemplo Wilmut y Clark, 1991), transferencia nuclear después de la transfección (por ejemplo, Schnieke et al, 1997), infección con virus recombinantes (por ejemplo, patente US 6291740), y similares. Los métodos de transferencia nuclear y clonación para las células mamíferas son conocidos por los expertos en la técnica, y por ejemplo, se describen en (Campbell et al, 1996; Wilmut et al, 1997; Dinnyes et al, 2002; WO 95/17500; WO 98/39416). En la actualidad es posible clonar la mayor parte de estos animales, para generar líneas de animales que son genéticamente idénticos, lo que hace posible que los expertos en la técnica creen tal línea una vez que se ha identificado el animal individual que produce la mezcla de anticuerpos deseada. Alternativamente, se pueden usar métodos de reproducción clásicos para generar crías transgénicas. Las estrategias para la generación de animales transgénicos para la producción de proteínas recombinantes en la leche se describen en Brink et al, 2000.

También se han descrito plantas o células de planta transgénicas que producen anticuerpos (Hiatt et al, 1989; Peeters et al, 2001), y plantas útiles para este fin incluyen cereal, maíz, tabaco, soja, alfalfa, arroz, y similares. Los promotores constitutivos, que se pueden usar en las plantas, son por ejemplo los promotores CaMV 35S y 19S, promotores de *Agrobacterium* nos y ocs. Otros promotores útiles son los promotores inducibles por la luz tales como *rbcS*. Los promotores específicos de tejido pueden ser, por ejemplo específicos de semilla, tales como promotores de zeína, napina, beta-faseolina, ubiquitina, o específicos de tubérculo, específicos de hoja (por ejemplo, útil en tabaco), específicos de raíz, y similares. También es posible transformar la organela plástido por recombinación homóloga, para expresar las proteínas en las plantas. Los métodos y medios para la expresión de proteínas en las plantas recombinantes o partes de estas, o cultivo celular de planta recombinante, son conocidos por los expertos en la técnica y se ha descrito, por ejemplo en (Giddings et al, 2000; WO 01/64929; WO 97/42313; patentes US 5888789, 6080560; Ver para orientación práctica: *Methods In Molecular Biology* vol. 49 "Plant Gene Transfer and Expression Protocols", Jones H, 1995). También se han descrito otros sistemas transgénicos para producir proteínas recombinantes, que incluyen el uso de pájaros transgénicos para producir proteínas recombinantes en huevos (por ejemplo, WO 97/47739), y el uso de peces transgénicos (por ejemplo, documento WO 98/15627), y se pueden usar en combinación con las descripciones de la presente invención para obtener mezclas de los anticuerpos. También es posible usar un sistema de transcripción/traducción in vitro o traducción in vitro para la expresión de las mezclas de anticuerpos de acuerdo con la presente invención. Será evidente para los expertos que las descripciones de la

presente invención permitirán producir las mezclas de anticuerpos en sistemas en que se puede introducir y expresar el ácido nucleico recombinante que codifica la cadena liviana y las cadenas pesadas. Con preferencia tales sistemas pueden producir anticuerpos codificados por dichas secuencias de ácidos nucleicos, sin el uso de la amplificación de dichas secuencias de ácidos nucleicos en dichos sistemas. Además, se describe una célula de un animal no humano transgénico o una planta transgénica. Tañes células se pueden usar para generar los animales o plantas mediante las técnicas conocidas por los expertos en la técnica, tales como transferencia nuclear u otros métodos conocidos de clonación de organismos totales a partir de células individuales. Las células de acuerdo con la invención también se pueden obtener por la introducción de la cadena liviana y al menos tres secuencias de la cadena pesada en las células aisladas de los animales no humanos o plantas, tales células son capaces de formar parte de un animal o plante transgénico. Particularmente útil para tales propósitos son las células madre embrionarias. Estas pueden contribuir a la línea germinal y en consecuencia la información genética introducida en tales células se puede pasar a las futuras generaciones. Además, los cultivos de células de planta de algodón, maíz, tomate. Soja, papa, petunia, y tabaco se pueden utilizar como huéspedes, cuando se transforman con las moléculas de ácido nucleico que codifican la cadena liviana y las cadenas pesadas, por ejemplo, por el uso de la bacteria transformadora de plantas *Agrobacterium tumefaciens* o por bombardeo de partículas, o por infección con virus de planta recombinante.

Otro aspecto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica que comprende una mezcla de anticuerpos producidos en forma recombinante de acuerdo con la invención y un portador adecuado, donde al menos tres cadenas pesadas diferentes están representadas en dicha mezcla de anticuerpos producidos en forma recombinante. Los portadores farmacéuticamente aceptables como se usan en la presente están ejemplificados, pero sin limitación, por adyuvantes, portadores sólidos, agua, buffer, u otros portadores usados en la técnica para mantener los componentes terapéuticos o sus combinaciones. En forma de realización particulares, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más cadenas pesadas diferentes están representadas en dicha mezcla. Dicha mezcla se puede obtener por el mezclado de los anticuerpos monoclonales producidos en forma recombinante, pero también se pueden obtener por métodos de acuerdo con la presente invención. Dicha mezcla en consecuencia puede comprender una cadena liviana común para dichos anticuerpos. Dicha mezcla puede comprender anticuerpos biespecíficos. Dicha mezcla se puede producir de un clon que se derivó de una célula huésped única, es decir, de una población de células que contienen las mismas moléculas de ácido nucleico recombinante. El término " producidos en forma recombinante" como se usa en la presente se refiere a la producción por células huésped que producen anticuerpos codificados por los ácidos nucleicos recombinantes introducidos en dichas células huésped o sus ancestros. Por ende no incluye el método clásico de producir anticuerpos policlonales, a través del cual el sujeto se inmuniza con un antígeno o mezcla que comprende el antígeno, después de lo cual los anticuerpos producidos por este sujeto se recuperan del sujeto, por ejemplo, de la sangre.

Otro aspecto de la presente invención es proporcionar una mezcla de anticuerpos de acuerdo con la invención donde al menos tres cadenas pesadas están representadas, para usar en el tratamiento o diagnóstico de un sujeto humano o animal. En otros aspectos, la invención proporciona el uso de una mezcla de anticuerpos donde al menos tres cadenas pesadas diferentes están representadas, para la preparación de un medicamento para usar en el tratamiento o diagnóstico de una enfermedad o trastorno en un sujeto humano o animal. En formas de realización particulares, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más cadenas pesadas están representadas en dicha mezcla. Dichas mezclas de anticuerpos pueden ser mezclas de anticuerpos de acuerdo con la invención, u obtenerse por los métodos de acuerdo con la invención. Los anticuerpos presentes en dicha mezcla con preferencia pueden comprender una cadena liviana común. Las mezclas pueden comprender anticuerpos biespecíficos, y se pueden producir de modo recombinante a partir de un clon que se derivó de una célula huésped individual, es decir, de una población de células que contienen las mismas moléculas de ácido nucleico recombinante. Los blancos se pueden usar para seleccionar una biblioteca de despliegue de anticuerpos, como se describe supra, para obtener 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más anticuerpos que comprenden una cadena liviana común que se une al blanco y produce una mezcla de estas de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención. Se puede usar prácticamente cualquier área de la medicina donde los anticuerpos monoclonales sean susceptibles al uso de las mezclas de acuerdo con la invención. Esto puede incluir, por ejemplo el tratamiento de enfermedades autoinmunes y cáncer, que incluyen tumores sólidos del cerebro, cabeza y cuello, mamas, próstata, colon, pulmón, y similares, así como tumores hematológicos tales como tumores de células B. Los trastornos neoplásicos que se pueden tratar con las mezclas de acuerdo con la presente invención incluyen leucemias, linfomas, sarcomas, carcinomas, tumores de células neurales, carcinomas de células escamosas, tumores de células germinales, metástasis, tumores no diferenciados, seminomas, melanomas, mielomas, neuroblastomas, tumores de células mixtas, neoplasias causadas por agentes infecciosos, y otras malignidades. Los blancos para las mezclas de anticuerpo pueden incluir, pero sin limitación, el receptor de HER-2/Neu, otros receptores del factor de crecimiento tales como receptor VEGFR1 y VEGFR2, marcadores de células B tales como CD19, CD20, CD22, CD37, CD72, etc., marcadores de células T tales como CD3, CD25, etc, otros marcadores de la superficie celular del leucocito tales como CD33 o HLA-DR, etc., citoquinas tales como TNF, interleuquinas, receptores para estas citoquinas tales como miembros de la familia del receptor de TNF, y similares. Se prevé que el uso de tales mezclas de anticuerpos en el tratamiento de los tejidos cancerosos u otras células que comprenden multiantígeno complejo tales como microorganismos o virus originarán menor aparición de variantes de escapa con pérdida de epitopo que el uso de anticuerpos monoclonales individuales. Varios tratamientos actuales usan mezclas de anticuerpos policlonales, que se derivan de seres humanos o animales inmunizados. Estos tratamientos se pueden reemplazar con el uso de las mezclas de acuerdo con la presente invención. El uso de estas

mezclas también puede incluir el uso en rechazos injerto versus huésped, conocido en la técnica del trasplante, por ejemplo, por el uso de anticuerpos antitímocitos. Se prevé que las mezclas de anticuerpos sean superiores a los anticuerpos monoclonales en el tratamiento de antígenos complejos, o antígeno que comprende mezclas tales como bacterias o virus. El consecuencia, el uso de acuerdo con la invención también puede incluir el uso contra cepas de bacterias y hongos, por ejemplo en el tratamiento de enfermedades infecciosas debido a bacterias patogénicas tales como *S. aureus* resistente a múltiples fármacos y similares, hongos tales como *Candida albicans* y especies de *Aspergillus*, levaduras y similares. Las mezclas de acuerdo con la invención también se pueden usar para la profilaxis posexposición contra los virus, tales como miembros del género *Lyssavirus* por ejemplo rabies virus, o para uso terapéutico o profiláctico contra virus tales como virus de *Varicella-Zoster*, *Adenovirus*, virus sinciales respiratorios, virus de inmunodeficiencia humana, *metapneumovirus* humano, virus de la gripe, virus de Nilo Occidental, el virus que causa el síndrome respiratorio agudo severo (SARS), y similares. Las mezclas de acuerdo con las invenciones también se pueden usar para proteger contra agentes, tanto bacterias como virus, y contra sustancias tóxicas que son potenciales amenazas de guerra biológica, el uso de acuerdo con la invención también puede incluir el uso contra cepas de bacterias tales como *Bacillus anthracis*, toxina de *Clostridium botulinum*, toxina Epsilon de *Clostridium perfringens*, *Yersinia Pestis*, *Francisella tularensis*, *Coxiella burnetii*, especies *Brucella*, enterotoxina B de *Staphylococcus* o contra virus tales como *Variola* mayor, *alphavirus* que causan síndromes de meningoencefalitis (EEEV, VEEV, y WEEV), virus conocidos por causar fiebres hemorrágicas tales como virus de Ebola, Marburg y Junin o contra virus tales como virus Nipah, *Hantavirus*, virus de encefalitis transmitido por la garrapata y virus de la fiebre amarilla o contra toxinas por ejemplo, toxina ricina de *Ricinus communis* y similares. El uso de las mezclas de acuerdo con la invención también puede incluir el uso contra parásitos unicelulares o multicelulares. Las mezclas recombinantes de los anticuerpos de acuerdo con la invención pueden ser una alternativa segura para los anticuerpos policlonales obtenidos de mezclas de suero humano por inmunización pasiva, o de suero de animales hiperinmunizados. Las mezclas pueden ser más eficaces que los anticuerpos monoclonales recombinantes en varias aplicaciones terapéuticas, que incluyen cáncer, alergia, enfermedades virales, inflamación crónica, y similares.

Se ha descrito que la homodimerización de los anticuerpos monoclonales reactivos al tumor aumenta su capacidad de inducir la detención del crecimiento o apoptosis de las células tumorales (Ghetie et al, 1997). Posiblemente, cuando los anticuerpos contra receptores u otros antígenos de superficie de las células blanco, tales como células tumorales u microorganismos infecciosos, se producen de acuerdo con la presente invención, los anticuerpos biespecíficos presentes en las mezclas de acuerdo con la invención también se pueden entrecruzar con diferentes receptores u otros antígenos en la superficie de las células blanco, y en consecuencia tales mezclas pueden ser muy adecuadas para destruir tales células. Alternativamente, cuando los anticuerpos biespecíficos son menos convenientes, la presente invención también proporciona métodos para producir en forma recombinante mezclas de anticuerpos que comprendan principalmente anticuerpos monoespecíficos. Se ha descrito que la eficacia del tratamiento con *Rituximab*[™] (anticuerpo monoclonal anti-CD20) aumentó cuando se añadieron los anticuerpos anti-CD59 (Herjunpaa et al, 2000). En consecuencia, se espera que la inclusión de los anticuerpos contra CD59 en una mezcla de acuerdo con la invención que comprende anticuerpos anti-tumorales en la forma de anticuerpos que reconocen el receptor de las células B aumente la sensibilidad de las células tumorales al ataque del complemento. También se ha mostrado que un cóctel de combinación triple de las inmunotoxinas anti-CD19, anti-CD22, y anti-CD38-saporina es mucho más efectivo que los componentes individuales en el tratamiento del linfoma de células B humano en un modelo de ratón inmunodeficiente (Flavell et al, 1997). Muchas otras combinaciones también son factibles y pueden ser diseñadas por los expertos en la técnica. En general, el uso de las mezclas de anticuerpo que son capaces de reconocer múltiples epítopos de las células B probablemente disminuirá la aparición de variantes de escape.

Otro blanco posible es un receptor de tirosina quinasa de transmembrana, codificado por el protooncogén *Her-2/Neu* (*ErbB2*) (ver por ejemplo, patentes US 5.772.997 y 5.783.186 para los anticuerpos anti-*Her2*). *Her-2* está sobreexpresado en un 30% de los cánceres de mamas altamente malignos y se han desarrollado anticuerpos exitosos contra este blanco, comercializados con la marca *Herceptin*[™] (*Trastuzumab*). Se ha demostrado que la dirección a múltiples epítopos de *Her-2* con una mezcla de anticuerpos monoclonales produce un aumento de actividad anticrecimiento de una línea de cáncer de mamas humano *in vitro* e *in vivo* (Spiridon et al, 2002). *Her-2* en consecuencia puede ser un buen blanco para las mezclas de anticuerpos de acuerdo con la presente invención. Los anticuerpos útiles para este fin se pueden obtener por los métodos descritos en la presente invención, que incluyen los métodos de despliegue de anticuerpos.

Los anticuerpos humanos son capaces de inducir la función efectora por medio de la unión a los receptores de inmunoglobulina en las células efectoras inmunes. La *IgG* humana, y en particular *IgG*₁ y *IgG*₃, fijan el complemento para inducir CDC e interactuar con los receptores de *Fcγ* para inducir la citotoxicidad mediada por células dependiente del anticuerpo (ADCC), fagocitosis, endocitosis, inducción del estallido respiratorio y liberación de mediadores y citoquinas inflamatorias. La *IgA* humana interactúa con *FCR* también para producir la eficiente activación de la ADCC y la fagocitosis de las células blanco. En consecuencia, debido a la distribución diferencial de *FcγR* y *FcαR* en las células de sangre periférica (Huls et al., 1999), usando una mezcla de anticuerpos dirigida contra el blanco y que consiste en *IgG* e *IgA* puede maximizar potencialmente el reclutamiento y la activación de diferentes células efectoras inmunes. Tal mezcla de ambas *IgG* e *IgA* se puede obtener por la producción del anticuerpo monoclonal de *IgG* e *IgA* en un proceso de producción separado usando dos líneas celulares de

producción distinta, pero también se puede obtener de una línea celular única que produce el anticuerpo monoclonal de IgG e IgA. Esto puede tener la ventaja de que solo se desarrolla un proceso de producción individual. Por ende, cuando se mencionan cadenas pesadas diferentes, las cadenas pesadas que difieren en sus regiones constantes están abarcadas en la invención. El principio de usar una cadena liviana común también se puede usar para la producción de una mezcla de isotipos de una célula huésped. En consecuencia aún otro aspecto de la presente invención es proporcionar un método para producir una mezcla de anticuerpos que comprende diferentes isotipos de una célula huésped, el método que comprende la etapa de: cultivar una célula huésped que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena liviana común y las secuencias de ácidos nucleicos que codifican al menos tres cadenas pesadas de diferente isotipo que son capaces de aparearse con dicha cadena liviana, en condiciones propicias para la expresión de dichas secuencias de ácidos nucleicos. De acuerdo con este aspecto de la invención, las cadenas pesadas diferentes puede tener regiones variables idénticas, y solo difieren en sus regiones constantes (es decir, de diferente isotipo tienen la misma especificidad). En una forma de realización particular, dichos isotipos comprenden al menos una IgG y una IgA y/o IgM, con preferencia IgG1 o IgG3 e IgA. También se pueden usar otras combinaciones de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En estas formas de realización, los anticuerpos biespecíficos no se producirán debido a que las regiones variables son las mismas.

En otras formas de realización de acuerdo con este aspecto de la invención, no solo pueden diferir las regiones constantes de las cadenas pesadas, sino también las regiones variables, que de este modo dan origen a especificidades diferentes, apareadas con la misma cadena liviana. Cuando no se desean anticuerpos biespecíficos para un propósito determinado, por ejemplo porque las mezclas de anticuerpos son menos eficaces a causa de la presencia de los anticuerpos biespecíficos, es posible usar al menos tres cadenas pesadas combinadas con la cadena liviana común de acuerdo con la invención donde dichas cadenas pesadas difieren suficiente en sus regiones constantes para reducir o prevenir el apareamiento entre las cadenas pesadas diferentes, por ejemplo por el uso de cadenas pesadas de isotipos diferentes, por ejemplo una IgG1 y una IgG3 (ver Fig. 11 para una representación esquemática). Se prevé que las cadenas pesadas de diferente isotipo se aparearán en forma mucho menos eficiente, si es que, se comparan con las mismas cadenas pesadas. Alternativamente, también es posible manipular genéticamente las cadenas pesadas diferentes en su región constante de modo que la homodimerización esté favorecido respecto de la heterodimerización, por ejemplo, por la introducción de interacciones autocomplementarias (ver, por ejemplo, documento WO 98/50431 para posibilidades, tales como estrategias e "protuberancia en la cavidad" (ver documento WO 96/27011)). En consecuencia, otro aspecto de la presente invención es proporcionar un método para producir una mezcla de anticuerpos en un huésped recombinante, el método incluye la etapa de: expresar en una célula huésped recombinante una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena liviana común y secuencias de ácidos nucleicos que codifican al menos tres cadenas pesadas diferentes que difieren en la región variable y que son capaces de aparearse con dicha cadena liviana común, y donde dichas cadenas pesadas además difieren suficientemente en sus regiones constantes para reducir o prevenir el apareamiento entre las cadenas pesadas diferentes. En una forma de realización, dichas cadenas pesadas son de isotipo diferente. En formas de realización específicas, se expresan 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más cadenas pesadas diferentes. Las mezclas de anticuerpos que se pueden obtener por este método también se realizan en la presente invención. Tales mezclas comprenderán principalmente anticuerpos mono-específicos.

Las enseñanzas de la presente invención también se pueden usar para obtener nuevos anticuerpos multiespecíficos o mezclas de estos. En consecuencia, en otro aspecto, la invención proporciona un método para producir una mezcla de anticuerpos que comprenden anticuerpos del isotipo IgA dimericos $\{(IgA)_2\}$ en un huésped recombinante, donde al menos parte de dichos anticuerpos de IgA dimericos tienen regiones de unión diferentes en cada una de las subunidades de IgA, el método comprende la etapa de: expresar en una célula huésped recombinante una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena liviana común y secuencias de ácidos nucleicos que codifican al menos dos cadenas pesadas diferentes del isotipo IgA capaz de aparearse a dicha cadena liviana común, donde dichas cadenas pesadas diferentes difieren en su región variable. La dimerización de las moléculas de IgA se puede aumentar por la coexpresión de la cadena J (Yoo et al, 1999). Dichos anticuerpos de IgA dimericos tienen dos especificidades (ver Fig. 9 para una representación esquemática de una forma posible producida y presente en la mezcla). En aún otro aspecto, la invención proporciona un método para producir una mezcla de anticuerpos que comprende un anticuerpo IgM que tiene al menos dos especificidades diferentes, el método comprende la etapa de expresar en una célula huésped recombinante una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena liviana común y secuencias de ácidos nucleicos que codifican al menos tres cadenas pesadas diferentes del isotipo IgM, donde dichas cadenas pesadas son capaces de aparearse a dicha cadena liviana común y formar regiones de unión al antígeno funcionales. Un pentámero de IgM puede comprender hasta cinco especificidades en presencia de la cadena J, y un hexámero de IgM hasta seis en ausencia de la cadena J (Yoo et al, 1999). Por ende, en formas de realización específicas, 3, 4, 5, o 6 cadenas pesadas de IgM se coexpresan con la cadena liviana común de acuerdo con este aspecto de la invención. Ver Fig. 10 para una representación esquemática de una de las posibles formas que se pueden producir y presentar en la mezcla de acuerdo con este aspecto de la invención, cuando cinco cadenas pesadas diferentes se expresan con una cadena liviana común. La invención también proporcionar dimeros de IgA, pentámeros o hexámeros de IgM que tienen al menos dos especificidades diferentes. Estas moléculas se pueden producir a partir de un clon de una sola célula huésped de acuerdo con la invención. Tales moléculas, que albergan las regiones de unión con el antígeno con especificidades diferentes, pueden unir epitopos diferentes en el mismo antígeno, diferentes antígenos en una célula o diferentes antígenos en diferentes células, de este modo se entrecruzan los antígenos o las células.

Además se describe un método para identificar una mezcla de anticuerpos que tiene un efecto deseado en un ensayo funcional, el método que comprende las etapas de i) añadir una mezcla de anticuerpos en un ensayo funcional, y ii) determinar el efecto de dicha mezcla en dicho ensayo, donde dicha mezcla de anticuerpos comprende los anticuerpos que tienen una cadena liviana común. En una forma de realización preferida dicha mezcla está compuesta de una composición de acuerdo con la presente invención.

Ejemplos

Se proveen los siguientes ejemplos para ilustrar la invención, y los mismos de ninguna manera han de interpretarse como límites de los alcances de la invención. A menos que se indique otra cosa, en la práctica de esta invención se emplearán técnicas convencionales de inmunología, biología molecular, microbiología, biología celular y de ADN recombinante, que se hallan dentro de la pericia de la especialidad. Véase por ejemplo Sambrook, Fritsch and Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition, 1989; *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel FM, et al, eds, 1987; las series de *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *PCR2: A Practical Approach*, MacPherson MJ, Hams BD, Taylor GR, eds, 1995; *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow and Lane, eds, 1988.

Ejemplo 1 Producción de una mezcla de anticuerpos monoclonales con una cadena liviana común y dos regiones variables de cadena pesada en una única célula

Se aislaron previamente el Clon UBS-54 y el Clon K53 mediante selecciones sobre la cepa de células colorectales SnoW40 (Huls et al., 1999) y sobre una mezcla heterogénea de células mononucleares de un paciente con mieloma múltiple (WO 02/18948), respectivamente, con una biblioteca semisintética (de Kruif et al., 1995b). Los estudios posteriores revelaron que los clones UBS-54 y K53 se ligaron a la molécula de adhesión homotípica EP-CAM (Huls et al., 1999) y a la proteína cofactor de membrana CD46 (WO 02/18948), respectivamente. El secuenciado de ADN de los clones reveló que eran únicos en los CDRs de cadena pesada, pero que contenían una secuencia de cadena liviana idéntica (Figura 3). Los V_H y V_L of clones UBS-54 y K53 fueron insertados en un vector de expresión que contenía la secuencia líder HAVT20 y la totalidad de las secuencias de codificación para los dominios constantes de una IgG1 humana con una cadena liviana Kappa mediante un método esencialmente como se describe en (Boel et al., 2000), siendo el resultado los plásmidos pUBS3000Neo y pCD46_3000(Neo) (Figura 4). Estos plásmidos se expresaron transitoriamente sea solos sea en combinación en células PER.C6™. En pocas palabras, cada frasco de 80 cm² fue transfectado por incubación durante 4 horas con 140 µl de lipofectamina + 10 µg de ADN (sea pUBS3000Neo, pCD46_3000(Neo) sea 10 µg de ambos) en medio DMEM libre de suero a 35°C. Después de 4 horas, esto fue reemplazado por DMEM + 10% de FBS, y se cultivaron las células durante la noche a 37°C. Seguidamente se lavaron las células con PBS, y se reemplazó el medio con medio Excell 525 (JRH Bioscience). Se permitió el cultivo de las células a 37°C durante 6 días, después de lo cual se cosechó el material sobrenadante del cultivo de células. El análisis ELISA específico para IgG humana (descrito en WO 00/63403) indicó que la IgG se hallaba presente a aproximadamente 10 µg/ml para todos los frascos que contenían plásmidos de expresión. No había IgG1 presente en un frasco de control que no había sido transfectado con plásmido de expresión. Subsiguientemente se purificó IgG humana de cada material sobrenadante, para lo cual se utilizó cromatografía de Afinidad de Proteína A (Hightrap Protein A HP, cat.no. 1-040203) de acuerdo con procedimientos estándar, y en base a las recomendaciones del fabricante (Amersham Biosciences). Después de la elución se concentraron las muestras en un concentrador (Amicon) y se intercambió la sustancia tampón a fosfato de sodio 10 mM, pH 6,7. A continuación se analizaron doce µg de IgG purificada sobre geles de enfoque Isoeléctrico (geles Serva Pre-cast IEF, intervalo de pH 3-10, cat. no. 42866). Se cargaron las muestras en el lado de bajo pH y después de enfoque se tiñó con azul coloidal(Figura 5) La Pista 1 muestra K53 expresado transitoriamente, la Pista 2 muestra UBS 54 expresado transitoriamente, y la Pista 3 muestra la muestra de IgG de las células en las que ambos anticuerpos fueron cotransfectados. Es evidente que K53 y UBS-54 tienen, cada uno de ellos, un perfil pI único y que la muestra a partir de la cotransfección mostró otras isoformas únicas, teniendo la isoforma principal un pI entre los de K53 y UBS-54. Esto se anticipa también sobre la base del pI teórico cuando se calcula con la herramienta ProtParam provista en la página de inicio de Expasy (<http://www.expasy.ch>; Appel et al., 1994). K53 y UBS-54 tienen un pI teórico de 8.24 y 7.65, respectivamente, mientras que una isoforma que represente un heterodímero de una cadena pesada UBS-54 y de una cadena pesada K53 tiene un pI teórico de 8.01. El ensamble de un heterodímero de este tipo puede tener lugar solamente cuando una célula individual traduce tanto la cadena pesada de K53 como la cadena pesada de UBS-54 y ensambla las mismas en una molécula de IgG de longitud completa junto con la cadena liviana común.

Por ello, este experimento muestra que es posible expresar dos moléculas IgG humanas únicas en una sola célula y que también se forma de manera eficiente un heterodímero consistente en estas dos especificidades ligantes únicas.

Ejemplo 2 Producción de una mezcla de anticuerpos contra marcadores células B humanas en un clon derivado de una cepa de células PER.C6™.

En la presente, se da a título de ejemplo un método para producir una mezcla de anticuerpos de acuerdo con la invención, para lo cual se utiliza la expresión en una célula hospedante recombinante de una única cadena liviana y tres cadenas pesadas diferentes capaces de aparearse a la cadena liviana individual de manera de formar anticuerpos funcionales; este método se ilustra esquemáticamente en la Figura 6. Unos fagos que codifican

anticuerpos capaces de ligar proteínas presentes sobre células B humanas, es decir CD22, CD72 y Clase II de MHC (Major Histocompatibility Complex) (también denominado HLA-DR) fueron previamente aislados a partir de una biblioteca de fago semisintéticos (de Kruif et al., 1995; van der Vuurst de Vries & Logtenberg, 1999). El secuenciado de ASN de las secuencias de V_H y V_L de los fagos clon B28 (anti-CD22), clon-2 (anti-HLA-DR) y clon II-2 (anti-CD72) reveló que todos ellos contenían una secuencia V_H única, pero una secuencia de cadena liviana común ($V_{\lambda 3}$) con una región CDR idéntica (Figura 7).

Las secuencias V_H y V_L de los clones B28, I-1 y II-2 se clonan detrás de las secuencias líder HAVT20 de un plásmido de expresión que comprende una cadena pesada. Un ejemplo de un plásmido de este tipo es el pCRU-K01 (contiene secuencias de cadena pesada kappa, que pueden intercambiarse fácilmente con secuencias de cadena pesada kappa si se desea, por una persona con pericia en la especialidad), como se registró en el ECACC bajo el número 03041601. La clonación da origen a plásmidos que codifican una IgG₁ de longitud completa con características de ligación para CD22, CD72 y HLA-DR. Estos plásmidos llevarán la designación de pCRU-CD22, pCRU-CD72 y pCRU-HLA-DR, respectivamente.

Se generan cepas de células derivadas de PER.C6™, estables, de acuerdo con métodos conocidos de la persona con pericia en la especialidad (véase por ejemplo WO 00/63403), las cepas de células expresan anticuerpos codificados por información genética sobre sea pCRU-CD22, pCRU-CD72 o pCRU-HLA-DR y una cepa de células que expresa anticuerpos codificados para la totalidad de los tres plásmidos. Por ello, se siembran células PER.C6™ en DMEM más 10% de FBS en platos de cultivo de tejidos (diámetro 10 cm) o en frascos T80 con aproximadamente $2,5 \times 10^6$ células por plato y se mantiene durante la noche bajo sus condiciones de cultivo normales (concentración de CO₂; 10%, 37°C). Al día siguiente, se llevan a cabo las transfecciones en platos separados a 37°C para lo cual se utiliza Lipofectamina (Invitrogen Life Technologies) de acuerdo con protocolos estándar provistos por el fabricante, con sea 1-2 µg de pCRU-CD22, 1-2 µg de pCRU-CD72, 1-2 µg de pCRU-HLA-DR o 1 µg de una mezcla de pCRU-CD22, pCRU-CD72 y pCRU-HLA-DR. Como control de la eficiencia de la transfección, se transfectan unos pocos platos con vector de control LacZ, mientras que unos pocos platos no serán transfectados y sirven como controles negativos.

Después de 4 - 5 horas se lavan las células dos veces con DMEM y se las vuelve a alimentar con medio fresco sin selección. Al día siguiente, se reemplazan los medios con medio fresco que contiene 500 µg/ml de G418. Se refrescan las células cada 2 ó 3 días con medio que contiene las mismas concentraciones de G418. Después de aproximadamente 20- 22 días del sembrado, hay una gran cantidad de colonias visibles, y de cada transfección se recolectan al menos 300 y se las cultiva a partir de placas de 96 pocillos y/o 24 pocillos o mediante placas de 6 depresiones en frascos T25. En esta etapa se congelan las células (al menos 1, pero usualmente cuatro ampollas por cada colonia subcultivada) y se determinan los niveles de producción de anticuerpo IgG humano recombinante en el material sobrenadante para lo cual se utiliza un ELISA específico para IgG₁ humana (descrito en el documento WO 00/63403). Asimismo, en esta etapa se retira el G418 del medio de cultivo y nunca se lo vuelve a aplicar. Para una cantidad representativa de colonias se cultivarán volúmenes más grandes para purificar la fracción de IgG₁ humana recombinante en el material sobrenadante acondicionado, para lo cual se utiliza cromatografía de afinidad de Proteína A de acuerdo con procedimientos estándar. La IgG₁ humana purificada de los diversos clones se analiza en SDS-PAGE, IEF (Iso-electric focusing, enfoque isoelectrónico) y ligación a los objetivos CD22, CD72 y HLA-DR para lo cual se utilizan transfectantes celulares que expresan estos antígenos humanos sobre su superficie celular (transfectantes que expresan CD72 y HLA-DR han sido descritos por van der Vuurst-de Vries y Logtenberg, 1999; se ha preparado un transfectante CD22 mediante procedimientos estándar similares en PER.C6™). Las colonias obtenidas a partir de la cotransfección con pCRU-CD22, pCRU-CD72 y pCRU-HLA-DR se separan mediante PCR sobre ADN genómico para establecer la presencia o ausencia de cada uno de los tres constructos. La identidad de los productos de PCR se confirma además mediante secuencia de ADN.

Seguidamente se demuestra que una cepa clonal de células explica la producción de cada una de las tres características de ligación, es decir se demuestra que una única célula es capaz de producir una mezcla de más de dos IgG humanas funcionales. Por ello, se expone una cantidad limitada de colonias, que mostraron ser positivas para la producción de cada una de las tres características de ligación (tanto por PCR a nivel de ADN así como también en los ensayos de ligación especificados contra CD22, CD72 y HLA-DR), a una clasificación de células individuales para lo cual se utiliza un clasificador FACS (fluorescence activated cell sorter, clasificador de células activado por fluorescencia) (Becton & Dickinson FACS VANTAGE SE). Como alternativa, se siembran colonias a razón de 0.3 células/pocillo para asegurar el desarrollo clonal. Las poblaciones de células clonales, designados de ahora en más como subclones, se refrescan una vez por semana con medio fresco. Los subclones se cultivan y transfieren desde 96 pocillos mediante placas de 24 y 5 pocillos a frascos T25. En esta etapa, se congelan los subclones (al menos 1, pero usualmente 4 ampollas por subclón) y se determinan los niveles de producción de anticuerpo IgG₁ humano recombinante en el material sobrenadante para lo cual se utiliza un ELISA específico para IgG₁ humana. Para una cantidad representativa de subclones, se cultivan volúmenes más grandes para purificar la fracción de IgG₁ humana recombinante a partir del material sobrenadante acondicionado, para lo cual se utiliza cromatografía de afinidad de proteína A de acuerdo con procedimientos estándar.

La IgG₁ humana purificada de los diversos subclones se analiza subsiguientemente como se describió con anterioridad para IgG₁ humana obtenido a partir de los clones progenitores, es decir por SDS-PAGE, enfoque isoelectrónico (IEF, iso-electric focusing) y ligación a los objetivos CD22, CD72 y HLA-DR. También se seleccionarán

subclones por PCR sobre ADN genómico para establecer la presencia o ausencia de cada uno de los tres constructos pCRU-CD22, pCRU-CD72 y pCRU-HLA-DR. La identidad de los productos de PCR se confirma además por secuenciado de ADN.

5 También es posible utilizar otros métodos tales como Southern blot y/o FISH para determinar si característica uno de los tres constructos se halla presente en la cepa clonal de células.

10 Los subclones que muestran ser transgénicos para cada uno de los tres constructos se llevan en cultivo durante un periodo prolongado para determinar si la presencia de los transgenes es estable y si la expresión de la mezcla de anticuerpos sigue siendo la misma, no solamente en términos de niveles de expresión, sino también en cuanto a la relación entre las diversas isoformas de anticuerpo que son segregadas desde la célula. Por ello, se mantiene el cultivo de subclón durante al menos 25 tiempos de duplicación de la población sea como un cultivo adherente sea como un cultivo de suspensión. En cada 4 – 6 duplicaciones de la población, se lleva a cabo un test específico de la producción para lo cual se utiliza el ELISA específico para IgG humana y se cultivan volúmenes más grandes para obtener las pellas de las células y el material sobrenadante. Se utilizan las pellas de las células para evaluar la presencia de los tres constructos en el ADN genómico, sea por PCR, Southern blot y/o FISH. Se utiliza el material sobrenadante para purificar la fracción de IgG₁ humana recombinante como se describió con anterioridad. La IgG₁ humana purificada obtenida en las diversas duplicaciones de la población se analiza como se describió, es decir por SDS-PAGE, IEF (Iso-electric focusing) y ligación a los objetivos CD22, CD72 y HLA-DR, para lo cual se utilizan transfectantes celulares que expresan estos antígenos.

20 Ejemplo 3 Selección de clones que expresan múltiples IgGs humanas para la mezcla más potente de IgGs humanas funcionales

25 La funcionalidad de la mezcla de anticuerpos se analiza en ensayos basados en células para determinar si la mezcla de IgG₁ humanas inhibe la proliferación y/o inducir la apoptosis de las cepas B de células, tales como por ejemplo las células de Ramos. También es posible utilizar otras cepas de células. Además, se analizan las mezclas de anticuerpos para establecer su capacidad potencial de inducir la toxicidad celular dependiente de los anticuerpos y de complementar la citotoxicidad dependiente de, por ejemplo, las células Ramos.

En cada uno de los siguientes experimentos se analiza la funcionalidad de la mezcla de anticuerpos que reconoce los objetivos CD22, CD72 y HLA-DR, y se la puede comparar con cada uno de los anticuerpos IgG₁ individuales y a una combinación equimolar de los tres caracteres individuales de IgG₁.

30 Para evaluar la capacidad de las mezclas de anticuerpos para inhibir la proliferación de las células de Ramos, se incuban estas células en placas de 96 pocillos (0.1 - 1.0 x 10⁵/ml) con varias concentraciones (5 - 20 µg/ml) de las mezclas de anticuerpos en función de CD22, CD72 y HLA-DR durante 24 horas. La proliferación de las células se mide mediante la incorporación de ³H-timidina durante otras 16 horas de cultivo. La inhibición del desarrollo se determina trazando el gráfico del porcentaje de la incorporación de la ³H-timidina en comparación con células sin tratar (tomado como un valor de referencia a 100%).

35 Para analizar la inducción de la apoptosis de las células de Ramos, se estimulan dichas células en placas de 48 pocillos (0.2 - 1.0 x 10⁶/ml) con varias concentraciones (5 - 20 µg/ml) de las mezclas de anticuerpos en función de los objetivos CD22, CD72 y HLA-DR durante 24 ó 48 horas. Después del periodo de incubación se analiza la exposición de la fosfatidilserina sobre células apoptóticas (Koopman G et al, 1994). Por ello, se cosechan las células, se las lava dos veces con PBS y se la incubaba a la temperatura ambiente durante 10 min con 100 µl de anexina V etiquetada con FITC (Caltag) diluido 1:25 en tampón de ligación anexina V I (Caltag). Antes del análisis de las muestras mediante citometría de flujo (FACSCalibur, Becton Dickinson, San José, CA) se añade yoduro de propidio (PI)(Sigma) hasta una concentración final de 5 µg/ml para diferenciar las células necróticas (anexina V-/PI+) de las células apoptóticas (anexina V+/PI-, células apoptóticas tempranas; anexina V+/PI+, células apoptóticas tardías).

45 En un ensayo alternativo, se induce la apoptosis reticulando las mezclas de anticuerpos contra CD22, CD72 y HLA-DR sobre la superficie de las células de Ramos con 25 µg/ml of F(ab)₂ de anticuerpos policlonales cabra-anti-humano (Fc-específico) (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA) durante el periodo de incubación.

En otro ensayo alternativo, se induce la apoptosis incubando las células de Ramos con diversas concentraciones (5 - 20 µg/ml) de las mezclas de anticuerpos en función de

50 CD22, CD72 y HLA-DR mientras se las coincuba con los agentes quimiosensibilizantes doxorubicina (Calbiochem) o dexametasona (UMCU, Utrecht, Países Bajos).

55 Se analiza la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo, de las mezclas de anticuerpos, para lo cual se utilizan células mononucleares de sangre periférica como células efectoras en un ensayo estándar de liberación de ⁵¹Cr (Huls et al, 1999). A tal efecto se etiquetan 1-3 x 10⁶ células de Ramos con 100 µCi (Amersham, Buckinghamshire, RU) durante 1 hora a 37°C. Después de tres lavados con medio, se recubren las células objetivo de Ramos en placas de 96 pocillos de fondo en U a razón de 5 x 10³ células/pocillo. Seguidamente en cada pocillo se añaden células mononucleares de sangre periférica obtenida de donantes sanos mediante gradientes de densidad con

relaciones efector:objetivo en el intervalo de 80:1 a 10:1 por triplicado. Se incuban las células a 37 °C en presencia de diversas concentraciones de las mezclas de anticuerpos (5 - 20 µg/ml) en un volumen final de 200 µl. Después de 4 horas de incubación se cosecha parte del material sobrenadante y se mide la liberación de ⁵¹Cr. Se calcula el porcentaje de lisis específica, para lo cual se utiliza la fórmula siguiente: % de lisis específica = $\frac{[\text{cpm experimental} - \text{cpm espontánea}]}{[\text{máxima} - \text{cpm espontánea}]} \times 100\%$). La liberación máxima de ⁵¹Cr se determina añadiendo tritón X-100 hasta una concentración final del 1% a las células objetivo, y se determina la liberación espontánea después de incubación de las células objetivo con medio solamente.

En un ensayo similar se determina la citotoxicidad dependiente de complemento. En lugar de células efectoras ahora se añade 50 µl de suero humano a las células objetivo. Subsiguientemente se lleva a cabo el ensayo de la misma manera.

Como alternativa se determina el ADCC y CDC de las mezclas de anticuerpos, para lo cual se utiliza un ensayo de liberación de Europio (Patel and Boyd, 1995) o para lo cual se utiliza un ensayo de liberación de LDH (Shields et al, 2001).

Ejemplo 4 Uso de display de fago para aislar múltiples fagos con una secuencia V_L idéntica en función de un objetivo predefinido (Her-2), y producción en una célula hospedante recombinante de una mezcla de anticuerpos capaces de ligar este objetivo.

Los fagos que exhiben fragmentos de scFv capaces de ligar múltiples epitopos presentes sobre la misma proteína, por ejemplo el receptor del factor del crecimiento epidérmico Her-2, pueden aislarse a partir de una biblioteca de fagos semisintéticos (de Kruif et al., 1995a,b). Es posible identificar varios de tales fagos y seleccionar aquellos que comprenden la misma secuencia de cadena liviana, para su uso ulterior de acuerdo con la invención. La biblioteca semisintética se forma mezclando 7 subbibliotecas cada una de las cuales contiene una cadena liviana diferente (de Kruif et al, 1995a,b). Por ello es particularmente práctico utilizar una subbiblioteca de este tipo, que contiene solamente una cadena liviana y muchas cadenas pesadas, para seleccionar de manera tal que se obtienen múltiples anticuerpos con una idéntica secuencia V_L, y se la utiliza seguidamente para expresar las mezclas de anticuerpos de acuerdo con la invención.

Para la selección de fagos en función de Her-2 se generan varias proteínas de fusión que comprenden diferentes partes del dominio extracelular de Her-2 que se fusionan a los dominios CH2 y CH3 de la IgG1 humana. Para esta finalidad se ha construido un vector de expresión pCDNA3.1zeo (Invitrogen) que contiene en su región de clonación múltiple un sitio de restricción XhoI en la región bisagra en el marco antes de los dominios CH2 y CH3 de la IgG1 humana. Para ello, se utiliza un clon Her-2 cDNA para generar fragmentos de PCR templado para lo cual se utilizan técnicas de biología molecular estándar conocidos de la persona con pericia en la especialidad. Estos fragmentos consisten en un sitio de restricción 5' único, un codón de arranque seguido por una secuencia líder eucariota que está ligado en marco sea al dominio extracelular (EC) total de Her-2 sea a una parte del dominio EC de Her-2 que es seguido en marco por un sitio de restricción XhoI. Estos fragmentos de PCR son subsiguientemente clonados en marco con la región CH2-CH3 IgG1 en el vector de expresión pCDNA3.1zeo. Además de la proteína de fusión que contiene el dominio EC total de Her-2, se generan proteínas de fusión más pequeños que contienen fragmentos no superpuestos del dominio Her-2 EC. Estos constructos que codifican las proteínas de fusión Her-2-Ig son utilizados para la transfección transitoria de células 293T para lo cual se utiliza el reactivo lipofectamina (Gibco). Cinco días después de la transfección se cosecha el material sobrenadantes de las células 293T y se purifican las proteínas de fusión Her-2-Ig para lo cual se utiliza la cromatografía de afinidad de proteína A de acuerdo con procedimientos estándar.

Las proteínas de fusión Her2-Ig que contienen fragmentos no superpuestos del dominio Her-2 EC son recubiertas durante 2 horas a 37° sobre la superficie de tubos de material plástico Maxisorp™ (Nunc) con una concentración de saturación (0.5 - 5 µg/ml). Los tubos se bloquean durante 1 h en polvo de leche libre de grasa al 2% disuelto en PBS (MPBS). Simultáneamente 500 µl (aproximadamente 10¹³ cfu) de una biblioteca de display de fagos semisintéticos (una subbiblioteca de acuerdo con la terminología mencionada arriba) en la que solamente se halla representada una cadena liviana V_{kappa}1 como se describe en De Kruif et al (1995a,b) y referencias contenidas, se añade a dos volúmenes de MBPS al 4%. Además se añade suero humano hasta una concentración final de 15% y se permite que continúe el bloqueo durante 30-60 min. Se vacían los tubos recubiertos de Her-2-Ig, y se añade la biblioteca de fagos bloqueada. Se sella el tubo y se lo hace rotar lentamente durante 1 hora, seguido por 2 h de incubación sin rotación. Se vacían los tubos y se los lava 10 veces en PBS que contiene Tween -20 al 0.1% seguido por lavado cinco veces en PBS. Se añade 1 ml de glicina -HCL, 0.05 M, pH 2.2, y se hace rotar el tubo lentamente durante 10 min. Se añaden los fagos eluidos a 500 µl de 1M Tris-HCl pH 7.4. A esta mezcla se añade 3.5 ml de cultivo bacteriano azul XL-1 de crecimiento exponencial. Se incuban los tubos durante 30 min a 37°C sin agitación. Subsiguientemente se aplican las bacterias sobre placas de agar 2TY que contienen ampicilina, tetraciclina y glucosa. Después de incubación durante la noche de las placas a 37 °C, se rascan las colonias de las placas y se las utiliza para preparar una biblioteca de fagos enriquecida, esencialmente como se describe en De Kruif et al. (1995a). En pocas palabras, se utilizan las bacterias rascadas para inocular un medio 2TY que contiene ampicilina, tetraciclina y glucosa, y se las cultiva a 37°C hasta un OD_{600nm} de ~0.3. Se añaden fagos Helper y se les permite infectar las bacterias después de lo cual se cambia el medio a 2TY que contiene ampicilina, tetraciclina y kanamicina. Se continúa con la incubación durante la noche a 30°C. Al día siguiente se retiran las bacterias del

- medio 2TY medio por centrifugación después de lo cual se precipitan los fagos, para lo cual se utiliza polietilén glicol 6000/NaCl. Finalmente se disuelven los fagos en un volumen pequeño de PBS-1% BSA, se esteriliza por filtro y se utiliza para la siguiente ronda de selección. El procedimiento de selección/reinfección se lleva a cabo dos veces.
- 5 Después de la segunda ronda de selección, se utilizan colonias de *E.coli* individuales para preparar anticuerpos de fago monoclonales. Esencialmente, se cultivan colonias individuales hasta la fase log y se las infecta con fagos helper después de lo cual se permite continuar con la producción de anticuerpos de fago durante la noche. Los anticuerpos de fago que contienen material sobrenadante se ensayan por ELISA para establecer la actividad de ligación con respecto a placas de 96 pocillos recubiertos con Her-2-total EC-Ig.
- 10 Los anticuerpos de fago seleccionados mediante la selección arriba descrita, son validados mediante ELISA en cuanto a su carácter específico. Para esta finalidad, unas proteínas de fusión de Her-2-Ig que contienen fragmentos no superpuestos del dominio Her-2 EC son aplicados sobre placas ELISA de Maxisorp. Después del recubrimiento, se bloquean las placas en MBPS al 2%. Los anticuerpos de fago seleccionados son incubados en un volumen igual de MBPS al 4%. Se vacían las placas, se las lava una vez en PBS, después de lo cual se añaden los fagos bloqueados. Se permite que la incubación continúe durante 1 h, se lavan las placas en PBS 0.1% Tween-20 y se
- 15 detectan los fagos, para lo cual se utiliza un anticuerpo anti-M13 conjugado a peroxidasa. El procedimiento se lleva a cabo simultáneamente, para lo cual se utiliza un anticuerpo fago dirigido contra tiroglobulina (De Kruijff et al. 1995a,b), que sirve como control negativo.
- En otro ensayo los anticuerpos fago seleccionados se analizan en cuanto a su capacidad de ligarse a células de cáncer de pecho humanas BT474 que expresan Her-2. Para el análisis de citometría de flujo, los anticuerpos de fago son primero bloqueados en un volumen igual de MBPS al 4% durante 15 min a 4°C antes del tinte de las células BT474. Se visualiza la ligación de los anticuerpos fago a las células, para lo cual se utiliza un anticuerpo anti-M13 biotinilado (Santa Cruz Biotechnology) seguido por estreptavidina-ficoeritrina (Caltag).
- 20 Como alternativa, se seleccionan anticuerpos fago que reconocen múltiples epítopos sobre Her-2, para lo cual se utiliza un método basado en la competencia de la ligación de fago a Her-2 con ligación de anticuerpos anti-Her-2 murino caracterizado así como HER50, HER66 y HER70 (Spiridon et al, 2002). Para esta finalidad se incuban 2×10^6 BT474 células a 4°C con aproximadamente 10^{13} cfu (0.5 ml) de una biblioteca de display de fagos semisintética en la que solamente se halla representada una cadena liviana $V_{\kappa}1$ como se describió con anterioridad y se bloquea con 2 volúmenes de medio que contiene FBS al 10% . Se hace rotar la mezcla lentamente a 4°C durante 2 horas en un tubo sellado. Subsiguientemente, los fagos no ligados son removidos mediante dos lavados con 50 ml de medio frío que contiene FBS al 10%. Seguidamente, los fagos que reconocen múltiples epítopos sobre Her-2 se eluyen, para lo cual se resuspenden las células BT474 en 1 ml de medio frío que contiene concentraciones saturantes (5-20 $\mu\text{g/ml}$) de los anticuerpos anti-Her-1 murino HER50, HER66 y HER70. Se dejan las células sobre hielo durante 10 min, se centrifuga, y el material sobrenadante que contiene los anticuerpos fago anti-Her-2 se utiliza para reinfectar células XL1-Blue como se describió con anterioridad.
- 25 Del panel de anticuerpos fago Her-2-específicos generados mediante las selecciones arriba descritas, se seleccionan tres anticuerpos fago que están reconociendo tres epítopos no superpuestos diferentes sobre la proteína Her. Las secuencias V_H y la única cadena liviana $V_{\kappa}1$ de estos clones, provisionalmente designadas como VK1HER2-1, VK1HER2-2 y VK1HER2-3, se clonan detrás de las secuencias líder HAVT20 del plásmido de expresión pRU-K01 (registro de ECACC: 03041601), o un plásmido de expresión similar, de manera de obtener plásmidos que codifican un IgG_1 -kappa humano de longitud completa con características de ligación para Her-2. Estos plásmidos reciben la designación provisoria de pCRU-VK1HER2-1, pCRU-VK1HER2-2 y pCRU-VK1HER2-3, respectivamente.
- 30 Se generan cepas de células derivadas de PER.C6™ de acuerdo con métodos conocidos de la persona con pericia en la especialidad, y las cepas de células expresan anticuerpos codificados mediante información genética sobre sea pCRU-VK1HER2-1, pCRU-VK1HER2-2 o pCRU-VK1HER2-3 y una cepa de células que expresan anticuerpos generados por la totalidad de los tres plásmidos. Por ello, se siembran células PER.C6™ en DMEM más FBS al 10% en platos de cultivo de tejidos (diámetro 10 cm) o en frascos T80 con aproximadamente 2.5×10^6 células por plato y se los mantiene durante la noche bajo sus condiciones de cultivo normales (CO_2 al 10% y 37°C). Al día siguiente se llevan a cabo transfecciones en platos separados a 37°C para lo cual se utiliza Lipofectamina (Invitrogen Life Technologies) de acuerdo con protocolos estándar provistos por el fabricante, con sea 1-2 μg de pCRU-VK1HER2-1, 1-2 μg de pCRU-VK1HER2-2, 1-2 μg de pCRU-VK1HER2-3 o 1 μg of a mixture de pCRU-VK1HER2-1, pCRU-VK1HER2-2 y pCRU-VK1HER2-3. A título de control de la eficiencia de la transfección, unos pocos platos son transfectados con un vector de control LacZ, mientras que unos pocos platos no son transfectados y sirven como controles negativos.
- 35 Después de 5 horas las células son lavadas dos veces con DMEM y realimentadas con medio fresco sin selección. Al día siguiente, se reemplaza el medio con medio fresco que contiene 500 $\mu\text{g/ml}$ de G418. Se refrescan las células cada 2 ó 3 días con un medio que contiene las mismas concentraciones de G418. Aproximadamente 20-22 días después del sembrado, hay una gran cantidad de colonias visibles y de cada transfección se recogen por lo menos 300 y se las cultiva mediante placas de 96 pocillos y/o de 24-pocillos vía placas de 6 pocillos a frascos T25. En esta
- 40 etapa se congelan las células (por lo menos 1, pero usualmente 4 ampollas por colonia subcultivada) y se determinan los niveles de producción de anticuerpo de IgG humana recombinante en el material sobrenadante para
- 45
- 50
- 55
- 60

lo cual se utiliza un ELISA específico para IgG₁ humana. Asimismo, en esta etapa se remueve el G418 del medio de cultivo y nunca se lo vuelve a aplicar. Para una cantidad representativa de colonias, se cultivan volúmenes más grandes para purificar la fracción de la IgG₁ humana recombinante del material sobrenadante para lo cual se utiliza cromatografía de afinidad de Proteína A de acuerdo con procedimientos estándar. La IgG₁ humana purificada de los diversos clones se analiza en SDS-PAGE, Iso-electric focusing (IEF), ensayo de ligación a proteínas de fusión Her-2-Ig mediante ELISA, y se analiza su ligación a Her-2 sobre la superficie de células BT474 mediante citometría de flujo.

Los clones obtenidos de la cotransfección de pCRU-VK1HER2-1, pCRU-VK1HER2-2 y pCRU-VK1HER2-3 son seleccionados mediante PCR sobre ADN genómico para establecer la presencia o ausencia de cada uno de los constructos. La identidad de los productos de PCR se confirma además mediante Secuenciado de ADN.

Seguidamente se demuestra que una cepa clonal de células es responsable de la producción de cada una de las tres características de ligación. Por ello, una cantidad limitada de células, que resultaron ser positivas para la producción de cada una de las tres características de ligación (tanto por PCR a nivel de ADN así como en los ensayos de ligación especificados en cuanto a Her-2), son expuestos a clasificación simple de células para lo cual se utiliza un FACS (fluorescence activated cell sorter, clasificador de células activado por fluorescencia) (Becton & Dickinson FACS VANTAGE SE). Como alternativa se siembran colonias a razón de 0.3 células/pocillo para asegurar el desarrollo clonal completo. Las poblaciones de células clonales, designadas de ahora en más subclones, son refrescadas una vez por semana con medio fresco. Se cultivan los subclones y se los transfiere desde placas de 96 pocillos por medio de placas de 24 y 6 pocillos a placas T25. En esta etapa se congelan los subclones (por lo menos 1, pero usualmente 4 ampollas por subclon) y se determinan los niveles de producción de anticuerpo IgG₁ humano recombinante del material sobrenadante para lo cual se utiliza un ELISA específico para IgG₁ humana. Para una cantidad representativa de subclones, se cultivan volúmenes más grandes para purificar la fracción de IgG₁ humana recombinante a partir del material sobrenadante acondicionado para lo cual se utiliza cromatografía de afinidad de Proteína A. de acuerdo con procedimientos estándar.

La IgG₁ humana purificada de los varios subclones se analiza seguidamente como se describió con anterioridad para IgG₁ humana obtenido a partir de los clones progenitores, es decir, por SDS-PAGE, IEF (Iso-electric focusing) y ligación a Her-2. Los subclones también serán seleccionados por PCR sobre ADN genómico para establecer la presencia o ausencia de cada uno de los tres constructos pCRU-VK1HER2-1, pCRU-VK1HER2-2 y pCRU-VK1HER2-3. La identidad de los productos de PCR se confirma además mediante secuenciado de ADN.

También es posible utilizar otros métodos tales como Southern Blot y/o FISH para determinar si cada uno de los tres constructos se halla presente en la cepa clonal de células.

Los subclones que han demostrado ser transgénicos para cada uno de los tres constructos son llevados a cultivo durante un periodo prolongado para determinar si la presencia de los transgenes es estable y si la expresión de la mezcla de anticuerpos sigue siendo la misma, no solamente en términos de niveles de expresión, sino también en cuanto a la relación entre los diversos anticuerpos que son segregados desde la célula. Por ello, se mantiene el cultivo de subclones durante por lo menos 25 tiempos de duplicación de la población sea como un cultivo adherente sea como un cultivo de suspensión. En cada 4 a 6 duplicaciones de la población, se lleva a cabo un ensayo de producción específico para lo cual se utiliza el ELISA específico para IgG humana y se cultivan volúmenes más grandes para obtener las pellas de células y el material sobrenadante. Se utiliza las pellas de células para evaluar la presencia de los tres constructos en el ADN genómico, sea por PCR, Southern blot y/o FISH. El material sobrenadante se utiliza para purificar la fracción de IgG₁ humana recombinante como se describió con anterioridad. La IgG₁ humana recombinante obtenida en las diversas duplicaciones de la población se analiza como se describió con anterioridad, es decir mediante SDS-PAGE, IEF (Iso-electric focusing) y ligación a Her-2 by ELISA y mediante citometría de flujo para lo cual se utilizan células BT474.

Se analiza la funcionalidad de la mezcla de anticuerpos anti-Her-2 en ensayos basados en células para determinar si la mezcla de IgG₁ humana inhibe la proliferación y/o induce la apoptosis de las células BT474. Además, se analizan las mezclas de anticuerpos para establecer su capacidad potencial de inducir una toxicidad celular anticuerpo-dependiente y una toxicidad complemento-dependiente de las células BT474.

En cada uno de los experimentos que se describen a continuación la funcionalidad de la mezcla de anticuerpos que reconoce Her-2 puede ser analizada y comparada con cada uno de los anticuerpos IgG₁ individuales y con una combinación equimolar de las tres moléculas IgG₁ mono-específicas individuales.

Para evaluar la capacidad de las mezclas de anticuerpos de inhibir la proliferación de las células BT474, se permite que estas células se adhieran durante la noche en placas de 96 pocillos (a razón de 1.5×10^5 /pocillo) y seguidamente se las incuban bajo diversas concentraciones (5 - 20 µg/ml) de las mezclas de anticuerpos en función de Her-2 durante 72 horas. La proliferación de las células se mide mediante la incorporación de ³H-timidina durante las últimas 6 horas de cultivo. La inhibición del crecimiento se determina trazando el gráfico del porcentaje de la incorporación de ³H-timidina en comparación con células no tratadas (tomadas como 100 % de valor de referencia).

Para analizar la inducción de la apoptosis de las células BT474, se permite que estas células se adhieran durante la noche en placas de 48 pocillos (a razón de 2.5×10^5 /pocillo en 1ml) y seguidamente se las cultiva bajo diversas

concentraciones (5 - 20 $\mu\text{g/ml}$) de las mezclas de anticuerpos en función de Her-2 durante 4 horas. A continuación se cosechan las células por tripsinización, se las lava dos veces con PBS y se las incuba a temperatura ambiente durante 10 min con 100 μl de anexina etiquetada con FITC V (Caltag) diluida en 1:25 de tampón de ligación anexina V (Caltag). Antes del análisis de las muestras mediante citometría de flujo (FACSCalibur, Becton Dickinson, San Jose, CA) se añade yoduro de propicio (PI)(Sigma) hasta una concentración final de 5 $\mu\text{g/ml}$ para diferenciar las células necróticas (anexina V/PI⁺) de las células apoptóticas (anexina V⁺/PI⁻, células apoptóticas tempranas; anexina V⁺/PI⁺, células apoptóticas tardías).

Se analiza la Citotoxicidad Celular Dependiente de los anticuerpos de las mezclas de anticuerpos para lo cual se utilizan células mononucleares de sangre periférica en calidad de células efectoras y células BT474 como células objetivo en un ensayo de liberación estándar de ⁵¹Cr como se describió con anterioridad (Huls et al, 1999). La Toxicidad complemento-dependiente se determina mediante un ensayo similar. En lugar de las células efectoras, ahora se añade 50 μl de suero humano a las células objetivo. Seguidamente se lleva a cabo el ensayo como se describió con anterioridad.

Como alternativa se determina el ADCC y CDC de las mezclas de anticuerpos para lo cual se utiliza un ensayo de liberación de europio (Patel y Boyd, 1995) o mediante un ensayo de liberación de LDHr (Shields et al, 2001).

También se ensaya la funcionalidad de las mezclas de anticuerpos en función del Her-2, para lo cual se utilizan modelos animales in vivo, tal como se describe por ejemplo en Spiridon et al, 2002.

Ejemplo 5

Expresión de diferentes IgG humanas funcionales en la leche de animales transgénicos

Las secuencias de V_H y V_H de fagos en función de proteínas presentes en células B humanas, es decir, CD22 clon B28), CD72 (clon II-2) y HLA-DR (clones I-2) (Figura 7) se clonan en el plásmido de expresión pBC1 (provisto en el sistema de expresión de leche de ratón pBC1, Invitrogen Life Technologies) para obtener la expresión de glándula mamaria y específica de lactación de estas moléculas de IgG humanas en animales transgénicos, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Estos vectores de expresión específicos de glándula mamaria, que codifican las secuencias de anticuerpo para anti-CD22, anti-CD72 y anti-HLA-DR se introducen en la línea germinal murina de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las crías obtenidas son seleccionadas de manera de establecer la presencia de cada uno de los tres constructos mediante PCR sobre ADN aislado a partir de la cola. Las crías, macho o hembra, confirmados como transgénicos para cada uno de estos tres anticuerpos, son destetados y madurados. Los ratones transgénicos hembra son fertilizados a la edad de 6 - 8 semanas y se obtienen muestras de leche en diversos instantes de tiempo después de la gestación. Los ratones transgénicos macho son apareados con hembras no transgénicas, y las descendencia hembra transgénica (como se determina mediante PCR como se describió con anterioridad) se aparea y ordeña como se describió con anterioridad para los fundadores hembra transgénicos. Cuando era necesario, los fundadores transgénicos macho y hembra fueron apareados en otra generación de manera de poder obtener cantidades suficientes de leche transgénica para cada línea fundadora. Se analiza la leche transgénica para establecer la presencia de IgG humana mediante un ELISA específico para IgG humana, que no reacciona cruzadamente con igG de ratón ni con otros componentes de leche de ratón. Se purifica la IgG humana a partir de leche de ratón transgénico para lo cual se utiliza cromatografía de afinidad de Proteína A de acuerdo con procedimientos estándar. El igG humano purificado se analiza en SDS-PAGE, Isoelectric focusing y ligación sobre los objetivos CD22, CD72 y HLA-DR. La funcionalidad de la mezcla de anticuerpos se analiza como se describió con anterioridad.

Ejemplo 6 Producción de una mezcla de IgA/IgG en función de un objetivo predefinido en un clon derivado de PER.C6™.

Las secuencias V_H-V_L del fago UBS-54 orientadas contra la molécula de adhesión homotípica EP-CAM (Huls et al., 1999) no solamente fueron clonadas en un vector que codifica los dominios constantes de una IgG1 humana con cadena liviana Kappa (vector de expresión pUBS3000Neo), sino también en un vector de expresión que codifica los dominios constantes de un IgA1 humano de cadena liviana Kappa (vector de expresión pUBS54-IgA, Figura 8). Por ello los anticuerpos derivados de pUBS3000Neo y pUBS54-IgA si se ligan al mismo epitopo sobre EPCAM. Las únicas diferencias de los anticuerpos derivados de pUBS3000Neo y pUBS54-IgA se hallan en las secuencias que codifican los dominios constantes de la cadena pesada, siendo el resultado un epitopo sea IgG₁ sea IgA₁. Las cadenas livianas Kappa de estos dos vectores son idénticas.

Se generan cepas de células estables derivadas de PER.C6™ que expresan anticuerpos codificados por información genética sobre UBS3000Neo y pUBS54-IgA mediante procedimientos de pocillo conocidos de la persona con pericia en la especialidad. Para ello se siembran células PER.C6™ en DMEM más FBS al 10 % en platos para cultivo de tejidos (diámetro 10 cm) o en frascos T80 con aproximadamente 2.5 x 10⁶ células por plato y se mantiene durante la noche bajo sus condiciones de cultivo normales (CO₂ al 10%, 37°C). Al día siguiente, se llevan a cabo las transfecciones en platos separados a 37°C para lo cual se utiliza Lipofectamina (Invitrogen Life Technologies) de acuerdo con protocolos estándar provistos por el fabricante, con sea 1-2 μg de pUBS3000Neo y pUBS54-IgA. A título de control para la eficiencia de la transfección, unos pocos platos son transfectados con un vector de control LacZ, mientras que unos pocos platos no son transfectados y sirven como controles negativos

Después de 4-5 horas, se lavan las células dos veces con DMEM y se las realimenta con medio fresco sin selección. Al día siguiente, se reemplaza el medio con medio fresco que contiene 500 µg/ml de G418. Se refrescan las células cada 2 ó 3 días con medio que contiene las mismas concentraciones de G418. Al cabo de aproximadamente 20-22 después del sembrado, puede observarse una gran cantidad de colonias y de cada transfección se recogen por lo menos 300 y se las cultiva mediante placas de 96 pocillos y/o 24 pocillos por medio de placas de 6 pocillos a frascos T25. En esta etapa, se congelan las células (por lo menos 1, pero usualmente 4 ampollas por colonia subcultivada) y se determinan los niveles de producción de IgG humana recombinante y de anticuerpo IgA humano en el material sobrenadante, para lo cual se utiliza un ELISA específico para IgG1, así como un ELISA específico para IgA humano. Asimismo, en esta etapa se retira el G418 del medio de cultivo y nunca se lo vuelve a utilizar. Para una cantidad representativa de colonias se cultivan volúmenes grandes a efectos de purificar la IgG₁ humana recombinante y la fracción de IgA humana del material sobrenadante acondicionado para lo cual se utiliza por ejemplo (una combinación de) cromatografía de afinidad de Proteína A, o una cromatografía de intercambio de cationes, cromatografía de interacción hidrófoba y filtración de gel. Los inmunoglobulinas humanas purificadas de los diversos clones se analizan en SDS-PAGE, IEF (Iso-electric focusing) y ligación al objetivo EPCAM para lo cual se utilizan cepas de células que tienen una elevada expresión de esta molécula. Los clones serán también seleccionados mediante PCR sobre ADN genómico para establecer la presencia o ausencia de pUBS3000Neo y pUBS54-IgA. La identidad de los productos de PCR se confirma además mediante secuenciado de ADN.

Una cantidad limitada de clones, que mostraron ser positivas en cuanto a la producción tanto de EPCAM IgG₁ como de EPCAM IgA, son sometidas a una clasificación simple de células para lo cual se utiliza un FACS (fluorescence activated cell sorter, clasificador de células activado por fluorescencia) (Becton Dickinson FACS VANTAGE SE). Como alternativa, se siembran colonias a razón de 0.3 células/pocillo para asegurar el desarrollo clonal completo. Las poblaciones de células clonales, a continuación designadas como subclones, son refrescadas una vez por semana con medio fresco. Los subclones son cultivados y transferidos desde placas de 96-pocillos a frascos T25 por intermedio de placas de 24 y 6 pocillos. En esta etapa, se congelan los subclones (por lo menos 1, pero usualmente 4 ampollas por subclon) y se determinan los niveles de producción de IgG₁ humana recombinante y de anticuerpo IgA en el material sobrenadante para lo cual se utiliza un ELISA específico para IgG₁ humana y un ELISA específico para IgA humano. Para una cantidad representativa de subclones, se cultivan volúmenes más grandes para purificar la IgG₁ humana recombinante y la fracción de IgA₁ humano del material sobrenadante acondicionado, para lo cual se utiliza por ejemplo (una combinación de) cromatografía de afinidad de Proteína A, cromatografía de intercambio de cationes, cromatografía de interacción hidrófoba, y filtración de gel. Se analizan las inmunoglobulinas humanas de los diversos clones sobre SALIZ<AnDS-PAGE, IEF (Iso-electric focusing) y ligación al objetivo EPCAM, para lo cual se utilizan cepas de células que tengan una elevada expresión de esta molécula. También se seleccionarán moléculas mediante PCR sobre ADN genómico para establecer la presencia o ausencia de pUBS3000Neo y pUBS54-IgA. La identidad de los productos de PCR se confirma además mediante secuenciado de ADN.

También pueden utilizarse otros métodos como Southern blot y/o FISH para determinar si ambos constructos se hallan presentes en la cepa clonal cepa de células.

Ejemplo 7 Producción de una mezcla de IgG₁/IgG₃ humanas frente a múltiples objetivos en una cepa clonal PER.C6™ de células

Se obtuvieron clones de fago UBS-54 y clones K53 (Figura 3) como se describe en el Ejemplo. 1. El V_H y V_L del clon UBS-54 fue insertado en un vector de expresión que contiene la secuencia líder HAVT20 y la totalidad de las secuencias de codificación para los dominios constantes de una IgG₁ humana con una cadena liviana Kappa mediante un método esencialmente como descrito (Boel et al, 2000). El plásmido resultante lleva la designación pUBS3000Neo (Figura 4). Es evidente que los vectores de expresión que contienen dominios constantes de cadena pesada de cualquier isotipo que se desee pueden construirse mediante métodos rutinarios de biología molecular, para lo cual se utilizan las secuencias de estas regiones que se hallan disponibles en la especialidad. Las secuencias V_H y V_L del clon de fago K53 se clonan en un vector de expresión que contiene la secuencia líder HAVT20, y todas las secuencias de codificación para los dominios constantes de una cadena pesada de una IgG₃ humana con una cadena liviana Kappa mediante un método esencialmente como se describe (Boel et al, 2000). Este vector de expresión lleva la designación pK53IgG3.

Estos plásmidos se expresan transitoriamente sea solos sea en combinación en células PER.C6™. En pocas palabras, cada frasco de 80 cm² es transfectado por incubación durante 4 horas con 140 µl de lipofectamina + 10 µg de ADN (sea pUBS3000Neo, pK53IgG3 sea µg de ambos) en medio DMEM libre de suero a 37°C. Después de 4 horas, se reemplaza esto con DMEM + 10% FBS, y se cultivan las células durante la noche a 37°C. Seguidamente se lavan las células con PBS y se reemplaza el medio con medio Excell 525 (JRH Bioscience). Se dejan las células en cultivo a 37 °C durante 6 días, después de los cual se cosecha el material sobrenadante del cultivo de células. Se efectúa el análisis ELISA específico para IgG humana, es decir se miden todos los subtipos, para determinar la concentración de IgG en las células PER.C6™ transfectadas y no transfectadas. Seguidamente se purifica la IgG humana de cada material sobrenadante para lo cual se utiliza la cromatografía de afinidad de Proteína A. (Hightrap Protein A HP, cat.no. 1-040203) de acuerdo con procedimientos estándar, siguiéndose las recomendaciones del fabricante (Amersham Biosciences). Después de la elución se concentran las muestras en un concentrador Microcon YM30 (Amicon) y se intercambia el tampón por fosfato de sodio 10 mM, 6.7. Se analizan las muestras en cuanto a

su ligación a los objetivos EPCAM y CD46 para lo cual se utilizan cepas de células que tengan una elevada expresión de estas moléculas tales como células LS174T. Doce μg de IgG purificada, que transitoriamente expresaban UBS-54 IgG1, K53 IgG3 o IgG de las células en las cuales ambos anticuerpos fueron cotransfectados, se analizan seguidamente mediante enfoque isoeléctrico mediante geles (Geles Serva Pre-cast IEF, intervalo de pH 3-10, cat. no. 42866). Las muestras se cargaron en el lado de bajo pH y después de enfocado se tiñó con azul coloidal. Se determinaron los valores de pI de las principales isoformas para cada muestra para ilustrar si hubo una expresión de S-54 IgG1, K53 IgG3 o de heterodímeros biespecíficos, en función de cómo se transfectaron las células. La identificación de los heterodímeros indicaría que las células individuales han traducido tanto la cadena pesada de IgG3 de K53 como la cadena pesada de IgG1 de UBS-54 y ensamblado las mismas en una molécula de IgG de longitud completa junto con la cadena liviana común. La ausencia de heterodímeros biespecíficos indica que es posible traducir tanto la IgG3 de cadena pesada de K53 como la cadena pesada IgG1 de UBS-54 en células individuales, pero que no se ensamblan en forma de una molécula de IgG de longitud completa junto con la cadena liviana común, es decir hay una ligación preferencial de cadenas pesadas de IgG1 e IgG3. Sin embargo, esto podría explicarse también por la falta de coexpresión de UBS-54 IgG₁ y K53 IgG₃. Por ello, se generan cepas clonales estables de células que expresan tanto pUBS3000Neo como pK53IgG3 mediante procedimientos de por si bien conocidos de la persona con pericia en la especialidad. Se siembran células PER.C6[™] células en DMEM más FBS al 10% en platos para el cultivo de tejidos (diámetro 10 cm) o en frascos T80 a razón de aproximadamente 2.5×10^6 células por plato y se mantiene durante la noche bajo sus condiciones de cultivo normales (CO_2 con una concentración de 10 % y 37°C). Al día siguiente, se llevan a cabo las transfecciones en platos separados a 37°C para lo cual se utiliza Lipofectamina (Invitrogen Life Technologies) de acuerdo con protocolos estándar provistos por el fabricante, con sea 1-2 μg de pUBS3000Neo, pK53IgG3 o ambos. A título de control para la eficiencia de la transfección, unos pocos platos son transfectados con un vector de control LacZ, mientras que unos pocos platos no serán transfectados y sirven como controles negativos.

Después de 4-5 horas, se lavan las células dos veces con DMEM y se las realimenta con medio fresco sin selección. Al día siguiente, se reemplaza el medio con medio fresco que contiene 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de G418. Se refrescan las células cada 2 ó 3 días con un medio que contiene las mismas concentraciones de G418. Aproximadamente 20-22 después del sembrado, puede observarse una gran cantidad de colonias y de cada transfección se recogen por lo menos 300 y se las cultiva por intermedio de placas de 96 pocillos y/o 24-pocillos y por medio de placas de 6-pocillos a frascos T25. En esta etapa, se congelan las células (por lo menos 1, pero usualmente 4 ampollas por cada colonia subcultivada) y se determinan los niveles de producción de anticuerpo IgG humano recombinante en el material sobrenadante para lo cual se utiliza un ELISA específico para todos los subtipos de IgG humana. Asimismo, en esta etapa se retira el G418 desde el medio de cultivo y nunca se lo vuelve a utilizar. Para una cantidad representativa de colonias se cultivan volúmenes más grandes para purificar el IgG humana recombinante desde el material sobrenadante acondicionado para lo cual se utiliza la cromatografía de afinidad de Proteína A (Hightrap Protein A HP, cat. no. 1-040203) de acuerdo con procedimientos estándar, siguiéndose las recomendaciones del fabricante (Amersham Biosciences). Las inmunoglobulinas humanas purificadas de los diversos clones se analizan en SDS-PAGE, IEF (Iso-electrofocusing) y ligación a los objetivos EPCAM y CD46 para lo cual se utilizan cepas de células que tengan una elevada expresión de estas moléculas tales como las células LS174T. También se seleccionan los clones por PCR sobre ADN genómico para establecer la presencia o ausencia de pUBS3000Neo y pK53IgG3. La identidad de los productos de PCR se confirma además mediante secuenciado de ADN.

Una cantidad limitada de clones, que demostraron ser positivos en cuanto a la producción tanto de EPCAM IgG1 como de K53 IgG3, son sometidos a una clasificación simple de células para lo cual se utiliza un FACS (fluorescence activated cell sorter, clasificador de células activado por fluorescencia) (Becton Dickinson FACS VANTAGE SE). Como alternativa, se siembran colonias a razón de 0.3 células/pocillo para asegurar desarrollo clonal completo. Las poblaciones de células clonales, seguidamente designadas subclones, son refrecadas una vez por semana con medio fresco. Se cultivan los subclones y se los transfiere de placas de 96-pocillos a frascos T25 por intermedio de placas de 24 y 6 pocillos. En esta etapa, se congelan los subclones (por lo menos 1, pero usualmente 4 ampollas por subclón) y se determinan los niveles de producción de anticuerpo IgG humano recombinante en el material sobrenadante para lo cual se utiliza un ELISA específico para IgG humana. Para una cantidad representativa de subclones, se cultivan volúmenes más grandes para purificar la fracción de IgG humana recombinante a partir del material sobrenadante acondicionado, para lo cual se utiliza la cromatografía de afinidad de Proteína A. (Hightrap Protein A HP, cat.no. 1-040203) de acuerdo con procedimientos estándar, y siguiéndose las recomendaciones del fabricante (Amersham Biosciences). Las inmunoglobulinas humanas purificadas de los diversos clones se analizan sobre SDS-PAGE, IEF (Iso-electric focusing) y ligación a los objetivos EPCAM y CD46, para lo cual se utilizan cepas de células que tengan una elevada expresión de estas moléculas, tales como por ejemplo las células LS174T, o transfectantes que expresan estas moléculas. También se seleccionan subclones mediante PCR sobre ADN genómico para establecer la presencia o ausencia de pUBS3000Neo y pK53IgG3. La identidad de los productos de PCR es objeto de una confirmación adicional mediante secuenciado de ADN.

También pueden utilizarse otros métodos tales como el Southern blot y/o FISH para determinar si ambos constructos se hallan presentes en la cepa clonal de células.

Una vez que los subclones clonales están disponibles y han sido confirmados positivos en cuanto a la expresión tanto de UBS-54 IgG1 como de K53 IgG3, la presencia de K53 y UBS-54 funcionales muestra que es posible generar una mezcla de IgG's funcionales con diversos isotipos con la cadena liviana común en una célula individual.

El análisis de la expresión de anticuerpos biespecíficos de la ligación tanto de EpCAM como de CD46 revelará en qué grado las diferentes cadenas pesadas que tienen diferencias subtipos se aparearán, lo que influirá sobre la cantidad de anticuerpos biespecíficos producidos. Se prevé que en este caso no se hallarán niveles de anticuerpos biespecíficos o a lo sumo niveles muy bajos.

- 5 Ejemplo 8. Selección de fago portador de fragmentos Fv de cadena simple que reconocen específicamente RVGP (rabies virus glyco protein, glicoproteína del virus de la rabia), para lo cual se utiliza proteína de fusión RVGP-Ig, y la expresión de mezclas de anticuerpos contra el virus de la rabia.

Este ejemplo describe la producción de mezclas de anticuerpos contra el virus de la rabia, como otro objetivo potencial. Como antígeno se elige el RVPG (Rabies Virus Glycoprotein, glicoproteína del virus de la rabia), pero para esta finalidad es también posible elegir otros antígenos de la rabia. En la técnica ya se han descrito varios anticuerpos que reconocen la RVGP, y también se han reconocido anticuerpos policlonales útiles en el tratamiento de las infecciones de rabia (por ejemplo, documentos EP0402029; EP0445625).

Se seleccionan fragmentos de anticuerpo, para lo cual se utiliza la tecnología MAbstract™ de bibliotecas de display de fagos de anticuerpos, esencialmente como se describe en la patente US N.º 6.265.150 y en el documento WO 98/15833. A menos que se indique otra cosa, todos los procedimientos se llevan a cabo a temperatura ambiente. La secuencia de la RVGP está disponible para la persona con pericia en la especialidad, para fines de clonación (por ejemplo, Yelverton et al, 1983). Se produce una proteína de fusión RVGP-Ig consistente en RVPG entero fusionado genéticamente a los dominios CH2 y CH3 de IgG1 humana para lo cual se utiliza el vector pcDNA3.1 Se expresa Zeo-CH2-CH3 en PER.C6™ y se recubre durante dos horas a 37 °C sobre la superficie de tubos de material plástico Maxisorp™ (Nunc) con una concentración de 1.25 µg/ml. Se bloquean los tubos durante 1 h en polvo de leche exento de grasa el 2% disuelto en PBS (MPBS). Al mismo tiempo 500 µl (aproximadamente 10¹³ cfu) de una biblioteca de display de fago con fragmentos Fv de cadena simple (scFV's) esencialmente preparado como se describe en De Kruif et al (1995a,b) y referencias en la misma, se añaden a dos volúmenes de MPBS al 4%. En este experimento se llevan a cabo selecciones para lo cual se utilizan fracciones de la biblioteca original construida utilizándose solamente una especie individual de gen de cadena liviana variable (por ejemplo, una biblioteca 'VK1'). Además se añade suero humano hasta una concentración final del 15% y se permite que prosiga el bloqueo durante 30-60 min. Se vacían los tubos recubiertos de RVGP-Ig, y se añade la biblioteca de fagos bloqueada. Se sella el tubo y se lo hace rotar lentamente durante 1 hora, seguido por 2 h de incubación sin rotación. Se vacían los tubos y se los lava diez veces en PBS que contiene Tween al 0.1% seguido por lavado 5 veces en PBS. Se añade 1 ml de glicina -HCL 0.05 M, pH 2.2, y se hace rotar el tubo lentamente durante 10 min. Se añaden los fagos eluidos a 500 µl de Tris-HCl 1 M pH 7.4. A esta mezcla se añade 3.5 ml de cultivo bacteriano azul XL-1 en desarrollo. Se incuban los tubos durante 30 min a 37°C sin sacudidas. Seguidamente, se aplican las bacterias sobre placas de agar 2TY que contiene ampicilina, tetraciclina y glucosa. Después de incubación durante la noche de las placas a 37°C, se rascan las colonias desde las placas y se las utiliza para preparar una biblioteca fago enriquecida, esencialmente como describe De Kruif et al. (1995a,b). En pocas palabras, se utilizan las bacterias rascadas para inocular medio 2TY que contiene ampicilina, tetraciclina y glucosa, y se cultiva a una temperatura de 37 °C hasta un D_{nm}, de 03. Se añaden fagos helper y se permite que infecten las bacterias. Se cambia el medio a 2TY que contiene ampicilina, tetraciclina y kanamicina. Se continúa con la incubación durante la noche a 30°C. Al día siguiente, se retiran las bacterias del medio 2TY mediante centrifugación después de lo cual los fagos se precipitan, para lo cual se utiliza polietilenglicol 6000/NaCl. Finalmente se disuelven los fagos en un pequeño volumen de PBS-1% BSA, se esteriliza por filtrado y se utiliza para una siguiente ronda de selección. El procedimiento de selección/reinfección se lleva a cabo dos veces. Después de la segunda ronda de selección, se utilizan colonias de *E. coli* individuales para preparar anticuerpos fago monoclonales. Esencialmente, se cultivan colonias individuales hasta fase log y se las infecta con fagos helper después de cual se permite que la producción de anticuerpos de fago continúe durante la noche. Los anticuerpos de fago que contienen material sobrenadante se someten a ensayo en un ELISA para establecer la actividad de ligación frente a las placas de 96 pocillos recubiertos de RVGP-Ig humano.

Los anticuerpos fago seleccionados que se han obtenido en la selección arriba descrita, se validan en ELISA para establecer su carácter específico. Para esta finalidad, se aplica RVGP-Ig humano como recubrimiento sobre placas Maxiisorp ELISA. Después del recubrimiento, se bloquean las placas en MBPS al 2%. Los anticuerpos fago seleccionados son incubados en un volumen igual de MPBS al 4%. Se vacían las placas, se las lava una vez en PBS, después de lo cual se añaden los fagos bloqueados. Se permite que continúe la incubación durante 1 hora, se lavan las placas en Tween -20 con PBS al 0.1% y se detectan los fagos ligados para lo cual se utiliza un anticuerpo anti-M13 conjugado a peroxidasa. A título de control, se lleva cabo el procedimiento simultáneamente para lo cual se utiliza un anticuerpo fago de control contra tiroglobulina (De Kruif et al. 1995a,b), que sirve como un control negativo.

55 Los anticuerpos de fago que se ligan a RVGP-Ig humano son subsiguientemente sometidos a ensayo para establecer la ligación a IgG de suero humano a efectos de excluir la posibilidad de que reconozcan la parte Fc de la proteína de fusión.

En otro ensayo se analizan los anticuerpos de fago para establecer su capacidad de ligarse a células PER.C6™ que expresan RVGP. Para esta finalidad se transfectan células PER.C6™ con un plásmido portador de una secuencia de cDNA que codifica RVGP o con el vector vacío y se seleccionan transfectantes estables para lo cual se utiliza técnicas estándar conocidas de la persona con pericia en la especialidad (por ejemplo, Coligan, J.E. et al. (2001),

Current protocols in protein science, volume I. John Wiley & Sons, Inc. New York). Para el análisis de citometría de flujo, se empieza por bloquear anticuerpos de fago en un volumen igual de MBPS al 4% durante 15 min a 4°C antes del tinte del PER.C6™ de RVGP y transfectado de control. Se añaden los fagos bloqueados a una mezcla de células PER.C6™ transfectados de control no etiquetados y células PER.C6™ transfectados con RVGP que sido etiquetados de verde mediante un tinte lipófilo (PKH67, Sigma). Se visualiza la ligación de los anticuerpos de fago a las células mediante un anticuerpo anti-M13 biotinilado (Santa Cruz Biotechnology) seguido por estreptavidina-ficoeritrina (Caltag). El scFV anti RVGP tiñe de manera selectiva el transfectante PER.C6™ RVGP, sin ligarse al transfectante de control.

Una manera alternativa de seleccionar fagos portadores de fragmentos de FV de cadena simple que de manera específica reconozcan RVGP humano, es mediante el uso de células PER.C6™ RVGP-transfectadas. Las células PER.C6™ que expresan RVGO ligado a membrana se producen como se describió con anterioridad. Se llevan a cabo experimentos de selección de fago como se describió con anterioridad, para lo cual se utilizan estas células como objetivo. Una fracción de la bibliotecas de fagos que comprende partículas scFv-fago mediante una única especie de scFV (500 µl, aproximadamente 10^{13} cfu) se bloquea con 2 ml de RPMI/10%FCS/1%NHS durante 15 min a temperatura ambiente. Unas células PER.C6™ no transfectadas (10×10^6 células) se añaden a las células PER.C6-RVGP (1.0×10^6 células). Se añade esta mezcla a la biblioteca de fagos restringida de cadena liviana restringida bloqueada y se incuba durante 2,5 h mientras se hace rotar lentamente a 4°C. Seguidamente las células se lavan dos veces y se las resuspende en 500 µl de RPMI/10%FCS y se incuba con un anticuerpo anti-RVGP murino (Becton Dickinson) seguido por un anticuerpo anti-ratón IgG ficoeritrina (PE) conjugado (Caltag) durante 15 min sobre hielo. Las células se lavan una vez y se las transfieren a un tubo de 4 ml. Se lleva cabo la clasificación de las células mediante un FACS (fluorescence activated cell sorter, clasificador de células activado por fluorescencia) (Becton Dickinson FACS VANTAGE SE), y las células RVGP (PE positivas) son seleccionadas. Las células seleccionadas son sometidas a centrifugación, se recupera el material sobrenadante y se eluyen los fagos eluidos de las células para lo cual se resuspenden las células en 500 µl de glicina 500 mM pH2.2 seguido por incubación durante 5 min a temperatura ambiente. Se neutraliza la mezcla con 250 µl de Tris-HCL 1M pH 7.4 y se añade al material sobrenadante recuperado. En su conjunto se utilizan estos fagos para preparar una biblioteca de fagos enriquecida como se describió con anterioridad. El procedimiento de selección/reinfección se lleva a cabo dos veces. Después de la segunda ronda de selección, se preparan anticuerpos monoclonales de fago y se los somete a ensayo para establecer la ligación a células RVGP-PER.C6™ y a células PER.C6™ no transfectadas, como se describió con anterioridad. Los fagos que son positivos sobre células transfectadas son seguidamente sometidas a ensayo en un ELISA como se describió con anterioridad, para establecer su ligación a la proteína de fusión RVGP-IgG.

Los fragmentos scFv seleccionados se clonan en un formato de IgG1 humana, de acuerdo con métodos conocidos de la persona con pericia en la especialidad (cfs, Boel et al, 2000). Para esta finalidad, el fragmento de VL compartido por el scFv seleccionado se amplifica por PCR para lo cual se utilizan oligo's que añaden sitios de restricción adecuados. Se utiliza un procedimiento similar para los genes V_H. Los genes así modificados se clonan en pCRU-K01 de expresión (registro ECACC 03041601), lo que resulta en vectores de expresión que codifican una cadena pesada hulgG1 completa y una gen humano de cadena liviana completa que tienen el mismo carácter específico que el clon fago original. Mediante este método, tres cadenas pesadas completas se clonan en vectores de expresión separados, mientras que un sólo de los vectores ha de comprender la cadena liviana en secuencia común. Estos vectores de expresión llevan la designación provisoria pCRU-RVGP-1, pCU-RVGP-2, y pCRU-RVGP-3. Como alternativa, estos tres vectores pueden carecer de ADN que codifica la región V_L, que puede seguidamente codificarse en un cuarto vector de expresión, separado, que no codifica una cadena pesada. También es posible tener secuencias de V_L presentes en la totalidad de los tres o en dos de los tres vectores que comprenden las diferentes secuencias V_H.

Se generan cepas de células derivadas de PER.C6™, estables, de acuerdo con métodos conocidos de la persona con pericia en la especialidad (véase, por ejemplo, WO 00/63403), las cepas de células que expresan anticuerpos codificados mediante información genética sobre sea pCRU-RVGP-1, pCRU-RVGP-2 o pCRU-RVGP-3 y una cepa de células que expresa anticuerpos codificados por la totalidad de los tres plásmidos. Para ello se siembran células PER.C6™ en platos para cultivo de tejidos con DMEM plus FBS al 10% FBS (diámetro 10 cm) o en frascos T80 con aproximadamente 2.5×10^6 células por plato, y se mantiene durante la noche bajo sus condiciones de cultivo normales (concentración de CO₂:10%, y 37 °C). Al día siguiente, se llevan a cabo transfecciones en platos separados a 37°C para lo cual se utiliza Lipofectamine (Invitrogen Life Technologies) de acuerdo con protocolos estándar provistos por el fabricante, con 1-2 µg de pCRU-RVGP-1, 1-2 µg de pCRU-RVGP-2, 1-2 µg de pCRU-RVGP-3 o 1 µg de una mezcla de pCRU-RVGP-1, pCRU-RVGP-2 y pCRU-RVGP-3. A título de control para la eficiencia de la transfección, unos pocos platos son transfectados con un factor de control LacZ, mientras que unos pocos platos no serán transfectados y sirven como controles negativos.

Después de 4 a 5 horas, se lavan las células dos veces con DMEM y se las realimenta con medio fresco sin selección. Al día siguiente, se reemplaza el medio por medio fresco que contiene 500 µg/ml G418. Se refrescan las células cada 2 ó 3 días con medio que contiene las mismas concentraciones de G418. Aproximadamente 20-22 días después del sembrado, puede observarse una gran cantidad de colonias, y de cada transfección se recoge por lo menos 300 y se las cultiva mediante placas de 98 pocillos y se lleva a frascos T25 mediante placas de 24 y 6 pocillos. En esta etapa, se congelan las células (por lo menos 1, pero usualmente 4 ampollas por cada colonia

subcultivada) y se determinan los niveles de producción de anticuerpo IgG humana recombinante en el material sobrenadante, para lo cual se utiliza un ELISA específico para IgG₁ humana (descrito en el documento WO 00/63403). Asimismo, en esta etapa se retira el G418 del medio de cultivo y no se lo vuelve a utilizar. Para una cantidad representativa de colonias se cultivarán volúmenes más grandes para purificar la fracción de IgG₁ humana recombinante del material sobrenadante acondicionado, mediante una cromatografía de afinidad de Proteína A de acuerdo con procedimientos estándar. La IgG₁ humana purificada de los diversos clones se analiza EN SDS-PAGE, IEF (Iso-electric focusing) y ligación al RVGP objetivo, para los cual se utiliza un transfectante RVGP PER.C6 arriba descrito.

Las colonias obtenidas a partir de la cotransfección con pCRU-RVGP-1, pCRU-RVGP-2 y pCRU-RVGP-3 se seleccionan mediante PCR sobre ADN genómico de manera de establecer la presencia o ausencia de cada uno de los tres constructos. La identidad de los productos de PCR es objeto de una confirmación adicional mediante secuenciado de ADN.

Un cantidad limitada de colonias, que en la selección dieron positivo en cuanto a la producción de cada una de las tres características de ligación (tanto mediante PCR a nivel de ADN como también en los ensayos de ligación especificados frente a RVGP), es sometida a una clasificación simple de células para lo cual se utiliza un FACS (fluorescence activated cell sorter, clasificador de células activado por fluorescencia) (Becton Dickinson FACS VANTAGE SE). Como alternativa, se siembran colonias a razón de 0.3 células/pocillo para asegurar un desarrollo clonal completo. Las poblaciones de células clonales, que en lo que sigue llevan la designación de subclones, son refrescadas una vez por semana con medio fresco. Se cultivan los subclones y se los transfiere de placas de 96 pocillos a frascos de T25 por intermedio de placas de 24 y 6 pocillos. En esta etapa, se congelan los subclones (por lo menos 1, pero usualmente 4 ampollas por subclon) y se determinan los niveles de producción de anticuerpo IgG₁ humano recombinante en el material sobrenadante, para lo cual se utiliza un ELISA específico para IgG₁ humana. Para una cantidad representativa de subclones, se cultivan volúmenes más grandes para purificar la fracción de IgG₁ humana recombinante a partir del material sobrenadante acondicionado, para lo cual se utiliza una cromatografía de afinidad de Proteína A de acuerdo con procedimientos estándar. Seguidamente se analiza la IgG₁ humana purificada de los diversos subclones como se describió con anterioridad para establecer la IgG₁ humana obtenida a partir de los clones progenitores, es decir mediante SDS-PAGE, IEF (Iso-electric focusing) y ligación al RVGP objetivo. También se seleccionan subclones mediante PCR sobre ADN genómico para establecer la presencia o ausencia de cada uno de los tres constructos pCRU-RVGP-1, pCRU-RVGP-2 y pCRU-RVGP-3. La identidad de los productos de PCR es objeto de una confirmación adicional mediante secuenciado de ADN. También es posible utilizar otros métodos tales como Southern blot y/o FISH para determinar si cada uno de los tres constructos se halla presente en la cepa clonal de células.

Los subclones que han demostrado ser transgénicos para cada uno de los tres constructos son puestos en cultivo durante un periodo de tiempo prolongado para determinar si la presencia de los transgenes permanece estable y si la expresión de la mezcla de anticuerpos sigue siendo la misma, no solamente en términos de niveles de expresión, sino también en cuanto a la relación entre las diversas isoformas de anticuerpo que son segregadas desde la célula. Para ello se mantiene el cultivo de subclones durante por lo menos 25 tiempos de duplicación de la población sea como un cultivo adherente sea como un cultivo de suspensión. A cada 4-6 duplicaciones de la población, se lleva a cabo un ensayo de producción específico para el que se utiliza un ELISA específico para IgG humana y se cultivan volúmenes más grandes para obtener las pellas de células y el material sobrenadante. Las pellas de células se utilizan para evaluar la presencia de los tres constructos en el ADN genómico, sea por PCR, Southern blot y/o FISH. Se utiliza el material sobrenadante para purificar la fracción de IgG₁ humana recombinante como se describió con anterioridad. Se analiza como se describió con anterioridad la IgG₁ humana purificada obtenida en las diversas duplicaciones de la población, es decir mediante SDS-PAGE, IEF (Iso-electrofocusing) por ligación al RTVGP objetivo.

Se verifica la eficacia de las mezclas de anticuerpos contra la rabia mediante ensayos de cultivos de células in vitro en los que se mide la disminución de la dispersión del virus de la rabia, así como también en modelos animales in vivo infectados por rabia. Tales métodos son conocidos de la persona con pericia en la especialidad, y se han descrito por ejemplo en el documento EP0402029.

Ejemplo 9. Producción de una mezcla de anticuerpos con una cadena liviana común y tres regiones variables de cadena pesada variable en una célula individual.

En la presente se ejemplifica y en la Figura 6 se muestra esquemáticamente un método para producir una mezcla de anticuerpos de acuerdo con la invención, para lo cual se utiliza la expresión en una célula hospedante recombinante de una sola cadena liviana y tres cadenas pesadas diferentes capaces de aparearse a la única cadena liviana de manera de formar anticuerpos funcionales.

En el Ejemplo 1 se describen las IgG humanas UBS54 y K53 contra la molécula de adhesión homotípica EP-CAM (Huls et al., 1999) y la proteína cofactor de membrana CD46 (documento WO 02/18948), respectivamente. Otro clon identificado por ligarse a la proteína cofactor CD46 fue el clon 02-237 (en la Figura 12 se provee la secuencia de VH). El secuenciado de ADN de este clon reveló que contenía la misma cadena liviana que UBS54 y K53, pero también una secuencia variable de cadena pesada única (véase la alineación en la Figura 3). Como resultado de

ello, el CDR3 de la cadena pesada de 02-237 difiere en cuatro posiciones de la de K53 (véase la alineación en la Figura 13). Las secuencias de cadena pesada y liviana del fago 02-237 fueron clonados en el plásmido de expresión pCRU-K01, (pCRU-K01 ha sido registrado en la European Collection of Cell Cultures (ECACC) bajo el número 03041601), que contiene los dominios constantes de cadena pesada y pesada para un anticuerpo IgG1. El plásmido resultante fue designado pgG102-237. Debido a la estrategia de clonación seguida, el terminal N resultante de la cadena liviana de 02-237 codificado por pgG102-237 difería ligeramente del terminal N de UBS54 y K53 como presente por pUBS3000Neo, pCD46_3000(Neo), respectivamente (Figura 3). El plásmido pgG102-237 se produjo transitoriamente en células humanas 293(T) células o establemente en células PER.C6. Pareció que la 02-237 IgG purificada tenía una afinidad mucho más elevada para CD46 purificado (Figura 14) que el K53 IgG, es decir la afinidad había aumentado de 9.1×10^{-7} M a 2.2×10^{-8} M para K53 y 02-237, respectivamente. Asimismo, el 02-237 se ligó mucho mejor a CD46 sobre el células de carcinoma de colon humano LS174T que el K53 (Figura 15).

Se generaron cepas de células estables derivadas de PER.C6[™] que expresan una combinación de los plásmidos pUBS3000Neo, pCD46_3000(Neo) y pgG102-237 que codifica IgG 02-237 humano, de acuerdo con métodos conocidos de una persona con pericia en la especialidad (véase, por ejemplo, el documento WO 00/63403). Para ello se sembraron unas células PER.C6[™] en DMEM más FBS al 10% FBS en platos de cultivo de tejidos (diámetro 10 cm) con aproximadamente 2.5×10^6 células por plato y se mantuvo durante la noche bajo sus condiciones de cultivo normales (concentración de CO₂ al 10%, y 37°C). Al día siguiente, se llevaron a cabo transfecciones en platos separados a 37 °C para lo cual se utilizó Lipofectamina (Invitrogen Life Technologies) de acuerdo con protocolos estándar provistos por el fabricante, con 2 µg de una mezcla equimolar de pUBS3000Neo, pCD46_3000(Neo) y pgG102-237. Como control negativo para la selección, unos pocos platos no fueron transfectados. Después de 4 a 5 horas, las células fueron lavadas dos veces con DMEM y se las realimenta con medio fresco sin selección. Al día siguiente, se reemplazó e medio con medio fresco que contiene 500 µg/ml de G418. Las células fueron refrescadas cada 2 ó 3 días con un medio fresco que contiene las mismas concentraciones de G418. Aproximadamente 20-22 días después del sembrado, pudo observarse una gran cantidad de colonias y aproximadamente 300 fueron recogidas mediante placas de 96-pocillo y/o 24-pocillo vía 6-pocillo a frascos T25. Durante el subcultivo se determinaron los niveles de producción de anticuerpo IgG humana recombinante en el material sobrenadante para lo cual se utilizó un ELISA específico para IgG1 humana (descrito en el documento WO 00/63403). Aproximadamente 25% de todas las colonias parecieron ser positivos en este ensayo altamente específico. Los niveles de producción medidos en esta etapa eran comparables con los niveles cuando un se expresa una sola IgG en células PER.C6[™] (expresión de una única IgG descrita en Jones et al., 2003). Es importante destacar que se obtuvieron elevados niveles de expresión sin ningún método para la amplificación del transgén y que se presentan con una cantidad baja de copias del transgén.

Se congelaron las 30 colonias más productoras en ampollas y se seleccionaron las 19 colonias más productoras para la purificación de la IgG (Tabla 1). Se las subcultivó en frascos T80 y seguidamente se purificó IgG humana de cada clon mediante cromatografía de afinidad de Proteína A. Para ello se introdujeron 15-25 ml de medio condicionado en una columna de de sefarosa FF de 5 ml de Proteína (Amersham Biosciences). Se lavó la columna con solución salina tamponada de fosfato 4 M, pH 7.4 (PBS) antes de elución con citrato 0.1 M pH 3.0. La fracción eluida fue subsiguientemente desalinizada en una columna Sephadex G25 Fine HiPrep Desalting (Amersham Biotech) con respecto a PBS. La concentración de la fracción de igG purificada fue determinada mediante medición de la absorción a 280 nm para lo cual se utiliza un coeficiente 1.4 para una solución al 0.1% (peso/volumen) (Tabla 1).

Las muestras de IgG purificadas fueron analizadas sobre SDS-PAGE no reducido y reducido e IEF. El SDS-PAGE no reducido (Figura 16A) mostró que todas las muestras de IgG migraron de manera comparable con el control K53 o 02-237, como una molécula de igG ensamblada, intacta, de aproximadamente 150 kDa. En el SDS-PAGE reducido (Figura 16B), las muestras de IgG migraron como cadenas pesada y liviana de aproximadamente 50 y 25 kDa, respectivamente, de manera comparable con la cadena pesada y liviana del control K53 o 02-237.

En el IEF, las fracciones de IgG purificadas fueron primero comparadas con una mezcla de iguales cantidades de K53, UBS54 y 02-237 (Figura 17). Es evidente que algunas de las muestras contenían isoformas con un perfil pI único, en comparación con un perfil pI único, en comparación con la mezcla que contiene K53, UBS54 y 02-237 purificados. Algunas isoformas mayores únicas tienen un pI entre el pI de K53 y 02-237 por una parte y UBS54 por otra parte. Esto también se anticipa sobre la base del pI teórico cuando se calcula con la herramienta ProtParam provista en el homepage de ExPasy (<http://www.expasy.ch>; Appel et al., 1994). K53, 02-237 y UBS54 tienen un pI teórico de 8.24, 8.36 y 7.65, respectivamente, mientras que una isoforma que represente un heterodímero de una cadena pesada de UBS54 y una cadena pesada de K53 tiene un pI teórico de 8.01. El ensamble de un heterodímero de este tipo puede tener lugar solamente cuando una célula simple traduce tanto la cadena pesada de K53 como la cadena pesada de UBS54 y ensambla las mismas en forma de una molécula de IgG de longitud completa junto con la cadena liviana común. Por ello estos resultados sugieren que determinados clones por lo menos expresan dos anticuerpos funcionales. Para confirmar la identidad única de algunas de de las isoformas, se hicieron pasadas con las muestras de los clones más interesantes en paralelo con K53, UBS54 y 02-237, sea solos sea en una mezcla (Figura 18). Esto demostró además que algunos clones expresaban por lo menos dos anticuerpos (241, 282, 361). Por otra parte, proveyó una evidencia que algunos clones expresan la totalidad de los tres anticuerpos funcionales (280 y 402).

Para confirmar que los clones expresaban mezclas de IgG que comprenden la totalidad de las tres cadenas pesadas, se utilizó el mapeo de péptidos (Garnick, 1992; Gelpi, 1995) para analizar la fracción de IgG policlonal. Anteriormente empleamos el mapeo de péptidos para recuperar el 99% de la secuencia de proteína del K53. Sobre la base de la secuencia de proteínas provista en la Figura 12, se calculó la masa de los péptidos tripticos teóricos de K53, UBS54 y 02-237 (Tablas II y III). Fue posible identificar unos pocos péptidos únicos para cada IgG, es decir por ejemplo los péptidos CDR3 para K53, 02-237 y UBS54 con un Mw de 2116.05, 2057.99 y 2307.15 Da, respectivamente. Seguidamente se preparó un digesto triptico de Poli1-280, y esto fue analizado para lo cual se utiliza LC-MS (Figura 19). Se detectaron péptidos con un Mw de 2116, 2057 y 2308 Da, que representan los péptidos CDR3 únicos de K53, 02-237 y UBS54, respectivamente. La secuencia precisa de aminoácidos de estos péptidos (tal como se han listado en la Tabla III) fue confirmada mediante análisis MS-MS (Tablas IV, V y VI). También hemos confirmado la presencia de los dos péptidos de cadena liviana N-terminal con Mw de 2580 y 2554 Da, respectivamente. Los datos de mapeo de los péptidos mostraron de manera inequívoca que una mezcla de anticuerpos que comprende una cadena liviana común y tres cadenas pesadas diferentes era expresada mediante el clon Poli1-280 de PER.C6[™]. Asimismo, los clones 055, 241 y 402 fueron seleccionados mediante mapeo de péptidos. Los clones 241 y 402 fueron confirmados como positivos para la totalidad de las tres secuencias de cadena pesada, mientras que el clon 055 solamente mostró la expresión de las cadenas pesadas de K53 y 02-237, y no de UBS54. Esto confirma la selección por IEF (Figura 18), donde en la muestra 055 no se observó ninguna banda relacionada con UBS54.

Se analizó el Poli1-280 mediante BIACORE para establecer la ligación a CD46 (Figura 20). La afinidad del Poli1-280 para CD46 era de 10^{-8} M, lo que demuestra que la mezcla de IgG contiene moléculas de ligación CD46 que tienen la misma afinidad que la 02-237 IgG sola.

Tomado en su conjunto, este experimento muestra que es posible expresar una mezcla de moléculas de IgG funcionales que comprenden tres cadenas pesadas únicas en una célula individual y además de los homodímeros también se forman heterodímeros consistentes en dos características de ligación. Por otra parte, la frecuencia de los clones que expresa *n* tres cadenas pesadas diferentes sugiere que será también posible obtener clones que expresan por lo menos 4, 5 o más cadenas pesadas, para lo cual se utiliza el mismo procedimiento. En el caso en que sería difícil obtener clones que expresan mayores números de cadenas pesadas, es posible utilizar un clon que expresa por lo menos 3 cadenas pesadas de acuerdo con la invención para introducir más cadenas pesadas en una ronda separada de transfección, por ejemplo, para lo cual se utiliza a marcador de selección diferente.

Seguidamente se demostró que una célula individual tiene la capacidad de producir una mezcla de más de dos IgG humanas funcionales. Para ello, los clones 241, 280 y 402, que en la selección dieron positivo para la producción de cada uno de los tres IgG, tanto por IEF como por MS, fueron sometidos una dilución limitantes, es decir se los sembró a razón de 0.3 células/pocillo en placas de 96-pocillos para asegurar un desarrollo clonal completo.

Las poblaciones de células clonales, que en lo que sigue llevan la designación de subclones, fueron refrescadas una vez por semana con medio fresco. Se cultivaron los subclones y se los transfirió a frascos T25, T80 y T175 por intermedio de placas de 96, 24 y 6 pocillos. En la etapa T80 se congelaron los subclones. Se determinaron los niveles de producción de anticuerpo IgG₁ humano recombinante y el material sobrenadante para lo cual se utilizó un ELISA específico para IgG₁ humana. Para cada clon progenitor se eligieron 3 subclones y se los cultivó en unos pocos frascos T175 de manera de obtener un medio suficientemente acondicionado para la purificación, para lo cual se utiliza cromatografía de afinidad de Proteína A. como se describió con anterioridad.

Seguidamente se analizó IgG₁ humana purificada de los subclones como se describió con anterioridad para IgG₁ humana obtenida a partir de los clones progenitores, mediante IEF (Iso-electric focusing). El resultado se muestra en la Figura 21. Los subclones del clon ply 1-241 tienen, cada uno de ellos, el mismo patrón, pero difieren del clon progenitor en que parecen carecer de determinadas bandas. Los subclones del clon Poli 1-280 parecen, todos ellos, diferir entre sí y del clon progenitor. Los patrones obtenidos por IEF para los subclones del clon progenitor Poli 1-402 son idénticos para la totalidad de los tres subclones y para el clon progenitor. De estos datos puede llegarse a la conclusión que el clon 402 está produciendo de manera estable una mezcla de anticuerpos. Esto demuestra que es factible producir una mezcla de anticuerpos de acuerdo con la invención a partir de una clon de célula individual. Los clones han experimentado aproximadamente 25 duplicaciones de su población (divisiones celulares) desde el procedimiento de transfección hasta el primer análisis (mostrado en la Figura 18) bajo presión de selección, y a partir de este momento han experimentado aproximadamente 30 duplicaciones de población durante el procedimiento de subclonación en la ausencia de presión de selección antes de cosecharse el material analizado en la Figura 21. Por ello, la producción de una mezcla de anticuerpos a partir de un clon tomado de una célula individual puede ser estable a lo largo de por lo menos 30 generaciones.

También se analizaron muestras de los clones progenitores 241, 280 y 402, y los subclones, para establecer la reactividad de ligación con respecto a los antígenos CD46- y EpCAM. A tal efecto, el cDNA de EpCAM, CD46 y el antígeno de control CD38 fueron clonados en vectores de expresión pcDNA (Invitrogen). Estos vectores fueron transfectados en células CHO (dhfr-), para lo cual se utilizó Fugene (Roche) de acuerdo con el protocolo suministrado por el fabricante. Las células fueron cultivadas en medio *Iscove's* que contiene FBS al 10% y suplemento HT (Gibco). Después de cultivo durante 2 días, se cosecharon las células por tripsinización y se las suspendió en PBS-1%BSA (PBSB) para su uso en análisis según FACS (fluorescence activated cell sorter,

clasificador de células activado por fluorescencia) (Becton Dickinson FACS VANTAGE SE).

5 La IgG1 purificada de los clones que producen las mezclas de anticuerpos y muestras de IgG1 de control de anti-GBSIII, un anticuerpo anti-CD72 (02-004), como también anticuerpos del clon anti-EpCAM UBS54 y de los clones anti-CD46 K53 y 02-237 fueron diluidos en PBSB hasta una concentración de 20 µg de 1 /ml. Se añadieron 20 µg/ml a 200.000 células transfectadas y se incubó sobre hielo durante 1 hora. Seguidamente se lavaron las células una vez en PBSB helado. A continuación se detectó la IgG ligada, para lo cual se utilizó incubación con IgG-biotina cabra-antihumano seguido por estreptavidina-PE. Después de un paso final de lavado, las células fueron suspendidas en PBSB que contiene 1 µg/ml de yoduro de propicio. Las muestras se analizaron sobre un FACS (fluorescence activated cell sorter, clasificador de células activado por fluorescencia) (Becton Dickinson FACS VANTAGE SE). Las células vivas fueron excluidas y se calcularon las MFI (Mean Fluorescent Intensities, Intensidades Fluorescentes Medias) a partir de los gráficos de FACS. Los resultados se han representado en la Figura 22. Como se preveía, el UBS54 se ligó de manera selectiva a las células transfectadas con EpCAM y el 02-237 y K53 se ligó de manera selectiva a los transfectantes CD46, mientras que los anticuerpos no relacionados no se ligaban a estos transfectantes.

15 Los resultados demuestran que las actividades de ligación con respecto a EpCAM y CD46 se hallaban presentes en los preparados de IgG1 purificados de la mayoría de los clones que expresan una mezcla de anticuerpos de acuerdo con la invención, lo que demuestra que se produjo una mezcla de anticuerpos funcionales mediante subclones que habían experimentado más de 30 divisiones celulares, y que resultan de una célula individual. En el subclon 280-015 los patrones de ligación con respecto a CD46 y EpCAM eran similares a los del clon progenitor Poli 1-280, a diferencia de otros clones. Debe tenerse presente que el aspecto cuantitativo de este ensayo no está completamente claro. La selección rutinaria, por ejemplo mediante un ensayo funcional, puede utilizarse para hallar un clon con el perfil de expresión deseado. Los aspectos cuantitativos también pueden incluir tales selecciones. Dicha selección permite la identificación de clones deseados, que expresan la mezcla de anticuerpos con una dada funcionalidad de una manera cuantitativamente estable.

25 **Tabla I.** Visión general de los clones utilizados para la purificación de la IgG.

Clon Poli1-	Control de ELISA (µg/ml)	Purificación	
		Conc. en alimentación (µg/ml)	Purificado (mg)
209	6,1	98	1,37
233	10,0	53	0,75
234	8,0	51	0,71
241	6,6	91	1,42
250	12,5	117	2,10
280	6,3	36	0,80
282	8,5	67	1,48
289	8,2	33	0,64
304	7,2	161	3,91
320	6,3	43	0,83
322	15,2	168	3,27
340	6,0	109	2,64
361	10,4	71	1,73
379	9,5	78	1,75

Clon Poli1-	Control de ELISA (µg/ml)	Purificación	
		Conc. en alimentación (µg/ml)	Purificado (mg)
402	39,9	135	3,14
022	16,2	83	1,69
040	7,8	67	1,43
048	6,5	43	0,94
055	11	55	1,04

Tabla II. Péptidos trípticos de los dominios variables de la cadena liviana de K53/UBS54 y 02-237.

Péptido	Primer AA ¹⁾	Último AA	M _w monoisotópico	M _w monoisotópico
			(Da)	(Da)
			K53/UBS54	02-237
L1	1	24	2580,31 ⁽²⁾	2554,28 ⁽²⁾
L2	25	59	4039,02	4039,02
L3	60	66	700,35	700,35
L4	67	79	1302,61	1302,61
L5	80	82	374,23	374,23
L6	83	107	2810,29 ⁽²⁾	2810,29 ⁽²⁾
L7	108	111	487,30	487,30
L8	112	112	174,11	174,11

¹⁾ AA, aminoácido

²⁾ Un residuo de cisteína alquilado

5 **Tabla III.** Péptidos trípticos de dominios variables de cadenas pesadas de K53, 02-237 y UBS54.

K53				02-237				UBS54			
A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
H1	1	12	1267,68	H1	1	12	1267,68	H1	1	12	1267,68
H2	13	19	685,41	H2	13	19	685,41	H2	13	19	729,41

ES 2 368 733 T3

K53				02-237				UBS54			
A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
H3	20	23	492,24	H3	20	23	492,24	H3	20	23	492,24
H4	24	38	1693,81	H4	24	38	1693,81	H4	24	38	1587,77
H5	39	63	2783,28	H5	39	63	2783,28	H5	39	63	2646,33
H6	64	67	472,28	H6	64	67	472,28	H6	64	67	506,26
H7	68	84	1906,87	H7	68	84	1906,87	H7	68	87	2174,04
H8	85	87	374,23	H8	85	87	374,23	-	-	-	-
H9	88	98	1319,55	H9	88	98	1319,55	H8	88	98	1333,56
H10	99	102	493,21	H10	99	102	475,25	H9	99	119	2307,15
H11	103	122	2116,05	H11	103	122	2057,99	-	-	-	-

Clave:

A: péptido

B: primer aminoácido

C: último aminoácido

D: M_w monoisotópico (Da)

Observaciones:

1) para H1, residuo de aminoácido 1 es un ácido piroglutámico

2) péptidos H3 y H9 de K53 y 02-237, y péptidos H3 y H8 de UBS54 contienen un residuo de cisteína alquilado

3) Péptidos exclusivos que se pueden usar para confirmar la presencia de las respectivas IgG se indican en **bastardilla y negrita**

Tabla IV. Datos de MS/MS de péptido CDR3 (H11) de K53, obtenidos por disociación inducida por *colisión* de m/z de carga doble 1059,06.

Ion	m/z		Ion	m/z
Y₁	147,12		B₁	n.d.
Y₂	248,18		B₂	157,10
Y₃	335,21 (1)		B₃	304,18
Y₄	406,25		B₄	419,22
Y₅	507,30		B₅	582,31

ES 2 368 733 T3

Ion	m/z		Ion	m/z
Y ₆	594,33		B ₆	768,38
Y ₇	693,40		B ₇	825,39
Y ₈	794,46		B ₈	953,43
Y ₉	893,54		B ₉	n.d.
Y ₁₀	1006,63		B ₁₀	n.d.
Y ₁₁	1107,67		B ₁₁	1224,65
Y ₁₂	1164,68		B ₁₂	1323,68
Y ₁₃	1292,81		B ₁₃	1424,79
Y ₁₄	1349,77		B ₁₄	1523,86
Y ₁₅	1535,85		B ₁₅	n.d.
Y ₁₆	1698,95		B ₁₆	n.d.
Y ₁₇	1813,95		B ₁₇	1782,96
Y ₁₈	1960,97		B ₁₈	n.d.
Y ₁₉	n.d. (2)		B ₁₉	n.d.

¹ Valores de m/z subrayados son picos principales en el espectro de MS/MS.

² n.d. es no detectado.

Tabla V. Datos de MS/MS de péptido CDR3 (H11) de 02-237, obtenidos por disociación inducida por colisión de m/z de carga doble 1030,02.

Ion	m/z		Ion	m/z
Y ₁	147,12		B ₁	n.d.
Y ₂	248,18		B ₂	189,09
Y ₃	335, 20		B ₃	n.d.
Y ₄	406,24		B ₄	451,22
Y ₅	493,30		B ₅	n.d.
Y ₆	580,32		B ₆	n.d.
Y ₇	679,40		B ₇	n.d.

Ion	m/z		Ion	m/z
Y ₈	780,44		B ₈	n.d.
Y ₉	879,53		B ₉	n.d.
Y ₁₀	992,60		B ₁₀	n.d.
Y ₁₁	1093,65		B ₁₁	n.d.
Y ₁₂	1150,67		B ₁₂	n.d.
Y ₁₃	1278,80		B ₁₃	n.d.
Y ₁₄	1335,80		B ₁₄	n.d.
Y ₁₅	1521,83		B ₁₅	n.d.
Y ₁₆	1608,90		B ₁₆	n.d.
Y ₁₇	1724,00		B ₁₇	n.d.
Y ₁₈	n.d.		B ₁₈	n.d.
Y ₁₉	n.d.		B ₁₉	n.d.

¹ Valores de m/z subrayados son picos principales en el espectro de MS/MS.

² n.d. es no detectado.

Tabla VI. Datos de MS/MS de péptido CDR3 (H9) de UBS54, obtenidos por disociación inducida por colisión de m/z de triple carga 770,09.

Ion	m/z		Ion	m/z
Y ₁	n.d.		B ₁	n.d.
Y ₂	248,17		B ₂	213,17
Y ₃	335,20		B ₃	360,16
Y ₄	406,25		B ₄	473,27
Y ₅	507,30		B ₅	610,32
Y ₆	594,33		B ₆	773,41
Y ₇	693,42		B ₇	959,48
Y ₈	794,45		B ₈	1016,50
Y ₉	893,53		B ₉	1144,57

Ion	m/z		Ion	m/z
Y ⁿ ₁₀	1006,64		B ₁₀	1201,59
Y ⁿ ₁₁	1107,67		B ₁₁	1302,68
Y ⁿ ₁₂	1164,68		B ₁₂	1415,72
Y ⁿ ₁₃	n. d.		B ₁₃	1514,78
Y ⁿ ₁₄	n.d.		B ₁₄	n.d.
Y ⁿ ₁₅	n.d.		B ₁₅	n.d.
Y ⁿ ₁₆	n.d.		B ₁₆	n.d.
Y ⁿ ₁₇	n.d.		B ₁₇	n. d.
Y ⁿ ₁₈	n.d.		B ₁₈	n.d.
Y ⁿ ₁₉	n.d.		B ₁₉	n.d.
Y ⁿ ₂₀	n.d.		B ₂₀	n.d.

¹ Valores de m/z subrayados son picos principales en el espectro de MS/MS.

² n.d. es no detectado.

Referencias

- 5 Appel RD, Bairoch A, Hochstrasser DF. 1994. A new generation of information retrieval tools for biologists: the example of the ExpASY WWW server. *Trends Biochem. Sci.* 19: 258-260.
- Bendig MM. 1988. The production of foreign proteins in mammalian cells. *Genet Eng* 7: 91-127.
- Boel E, Verlaan S, Poppelier MJ, Westerdal NA, Van Strijp JA, Logtenberg T. 2000. Functional human monoclonal antibodies of all isotypes constructed from phage display library-derived single-chain Fv antibody fragments. *J Immunol Methods* 239:153-166.
- 10 Brink MF, Bishop MD, Pieper FR. 2000. Developing efficient strategies for the generation of transgenic cattle which produce biopharmaceuticals in milk. *Theriogenology* 53: 139-148.
- Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I. 1996. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 380: 64-66.
- 15 Casellas R, Shih TA, Kleinewietfeld M, Rakoniac J, Nemazee D, Rajewski K, Nussenzweig MC. 2001. Contribution of receptor editing to the antibody repertoire. *Science* 291: 1541-1544.
- Cockett MI, Bebbington CR, Yarranton GT. 1990. High level expression of tissue inhibitor of metalloproteinases in Chinese hamster ovary cells using glutamate synthetase gene amplification. *Bio/technology* 8: 662-667.
- De Kruif J, Terstappen L, Boel E and Logtenberg T (1995a) Rapid selection of cell subpopulation-specific human monoclonal antibodies from a synthetic phage antibody library. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:3938
- 20 De Kruif J, Boel E and Logtenberg T (1995b) Selection and application of human single chain Fv antibody fragments from a semi-synthetic phage antibody display library with designed CDR3 regions. *J Mol Biol* 248:97
- Dinnyes A, De Sousa P, King T, Wilmut I. 2002. Somatic cell nuclear transfer: recent progress and challenges. *Cloning Stem Cells* 4: 81-90.

- Flavell DJ, Noss A, Pulford KA, Ling N, Flavell SU. 1997. Systemic therapy with 3BIT, a triple combination cocktail of anti-CD19, -CD22, and -CD38-saporin immunotoxins, is curative of human B-cell lymphoma in severe combined immunodeficient mice. *Cancer Res* 57: 4824-4829.
- 5 Fishwild DM, O'Donnell SL, Bengoechea T, Hudson DV, Harding F, Bernhard SL, Jones D, Kay RM, Higgins KM, Schramm SR, Lonberg N. 1996. High-avidity human IgG kappa monoclonal antibodies from a novel strain of minilocus transgenic mice. *Nat Biotechnol*,14: 845-51.
- Garnick RL. 1992. Peptide mapping for detecting variants in protein products. *Develop. Biol. Standard* 76: 117-130.
- Gelpi E. 1995. Biomedical and biochemical applications of liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatography A* 703: 59-80.
- 10 Ghetie M-A, Podar EM, Ilgen A, Gordon BE, Uhr JW, Vitetta, ES. 1997. Homodimerization of tumor-reactive monoclonal antibodies markedly increases their ability to induce growth arrest or apoptosis of tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 7509-7514.
- Giddings G, Allison G, Brooks D, Carter A. 2000. Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nat. Biotechnol.* 18: 1151-1155.
- 15 Gorman C, Bullock C. 2000. Site-specific gene targeting for gene expression in eukaryotes. *Curr Opin Biotechnol* 11: 455-460.
- Hiatt A, Cafferkey R, Bowdish K (1989) Production of antibodies in transgenic plants. *Nature.* 342: 76-78.
- Huls, G. A., Heijnen, I. A., Cuomo, M. E., Koningsberger, J. C., Wiegman, L., Boel, E., van der Vuurst de Vries, A. R., Loyson, S. A., Helfrich, W., van Berge Henegouwen, G. P., van Meijer, M., de Kruif, J. & Logtenberg, T. 1999. A recombinant, fully human monoclonal antibody with antitumor activity constructed from phage-displayed antibody fragments. *Nat Biotechnol* 17: 276-281.
- 20 Jespers LS, Roberts A, Mahler SM, Winter G, Hoogenboom HR. 1994. Guiding the selection of human antibodies from phage display repertoires to a single epitope of an antigen. *Biotechnology (N Y)* 12: 899-903.
- Jones, D., Kroos, N., Anema, R., Van Montfort, B., Vooys, A., Van Der Kraats, S., Van Der Helm, E., Smits, S., Schouten, J., Brouwer, K., Lagerwerf, F., Van Berkel, P., Opstelten, D-J., Logtenberg, T., Bout, A. (2003). High-level expression of recombinant IgG in the human cell line PER.C6™. *Biotechnol Prog.* 19, 163-168.
- 25 Kim SJ, Kim Ns, Ryu CJ, Hong HJ, Lee GM. 1998. Characterization of chimeric antibody producing CHO cells in the course of dihydrofolate reductase-mediated gene amplification and their stability in the absence of selective pressure. *Biotechnol Bioeng* 58: 73-84.
- 30 Kohler G and Millstein C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497.
- Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. 1994. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84: 1415-1420. Larrick JW, Thomas DW. 2001. Producing proteins in transgenic plants and animals. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12: 411-418.
- 35 Massengale WT, McBurney E, Gurtler J. 2002. CD20-negative relapse of cutaneous B-cell lymphoma after anti-CD20 monoclonal antibody therapy. *J. Am. Acad. Dermatol.* 46: 441-443.
- Mendez MJ, Green LL, Corvalan JR, Jia XC, Maynard-Currie CE, Yang XD, Gallo ML, Louie DM, Lee DV, Erickson KL, Luna J, Roy CM, Abderrahim H, Kirschenbaum F, Noguchi M, Smith DH, Fukushima A, Hales JF, Klapholz S, Finer MH, Davis CG, Zsebo KM, Jakobovits A. 1997. Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice. *Nat Genet.* 15: 146-56.
- 40 Merchant AM, Zhu Z, Yuan JQ, Goddard A, Adams CW, Presta LG, Carter P. 1998. An efficient route to human bispecific IgG. *Nat. Biotech.* 16: 677-681.
- Nemazee D. 2000. Receptor editing in B cells. *Adv. Immunol.* 74: 89-126.
- 45 Nissim A, Hoogenboom HR, Tomlinson IM, Flynn G, Midgley C, Lane D, Winter G. 1994. Antibody fragments from a "single pot" phage display library as immunological reagents. *EMBO J.* 13: 692-698.
- Nowakowski A, Wang C, Powers DB, Amersdorfer P, Smith TJ, Montgomery VA, Sheridan R, Blake R, Smith LA, Marks JD. 2002. Potent neutralization of botulinum neurotoxin by recombinant oligoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 11346-11350.
- 50 Patel AK, Boyd PN. 1995. An improved assay for antibody dependent cellular cytotoxicity based on time resolved fluorometry. *Journal of Immunological Methods* 184: 29-38.

- Peeters K, De Wilde C, De Jaeger G, Angenon G, Depicker A. 2001. Production of antibodies and antibody fragments in plants. *Vaccine* 19: 2756-2761.
- Pollock DP, Kutzko JP, Birck-Wilson E, Williams JL, Echelard Y, Meade HM. 1999. Transgenic milk as a method for the production of recombinant antibodies. *J Immunol Methods*. 231: 147-157.
- 5 Radic MC, Mascelli MA, Shan H, Weigert M. 1991. Ig H and L chain contributions to autoimmune specificities. *J. Immunol*. 146: 176-182.
- Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA, Mycock K, Scott AR, Ritchie M, Wilmut I, Colman A, Campbell KH. 1997. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science*. 278: 2130-2133.
- Segal DM, Weiner GJ, Weiner LM. 2001. Introduction: bispecific antibodies. *J Immunol Methods*. 248:1-6.
- 10 Shields, RL, Namenuk AK, Hong K, Gloria Meng Y, Rae J, Biggs J, Xie D, Lai J, Stadlen A, Li B, Fox JA and Presta LG. 2001. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for FcγRI, FcγRII, FcγRIII and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the FcγR. *J Biol Chem* 276: 6591-6604.
- Spiridon CI, Ghetie MA, Uhr J, Marches R, Li JL, Shen GL, Vitetta ES. 2002. Targeting multiple her-2 epitopes with monoclonal antibodies results in improved antigrowth activity of a human breast cancer cell line in vitro and in vivo. *Clin. Cancer Res*. 8: 1720-1730.
- 15 Van der Vuurst de Vries A, Logtenberg T. 1999. Dissecting the human peripheral B-cell compartment with phage display-derived antibodies. *Immunology* 98: 55-62.
- Vaughan TJ, Williams AJ, Pritchard K, Osbourn JK, Pope AR, Earnshaw JC, McCafferty J, Hodits RA, Wilton J, Johnson KS. 1996. Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. *Nat. Biotech*. 14: 309-314.
- 20 Wilmut I, Clark AJ. 1991. Basic techniques for transgenesis. *J Reprod Fertil Suppl* 43: 265-275.
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385: 810-813.
- Wilson TJ, Kola I. 2001. The LoxP/CRE system and genome modification. *Methods Mol Biol*. 158:83-94.
- 25 Yelverton E, Norton S, Obijeski JF, Goeddel DV. 1983. Rabies virus glycoprotein analogs: biosynthesis in *Escherichia coli*. *Science* 219: 614-620.
- Yoo EM, Coloma MJ, Trinh KR, Nguyen TQ, Vuong LU, Morrison SL, Chintalacheruvu KR. 1999. Structural requirements for polymeric immunoglobulin assembly and association with J chain. *J Biol Chem*. 274: 33771-33777.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 30 <110> CRUCELL HOLLAND B.V.
- <120> Producción recombinante de mezclas de anticuerpos
- <130> 0079 WO 00 ORD
- <160> 18
- <170> PatentIn versión 3.2
- 35 <210> 1
- <211> 333
- <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- 40 <223> Secuencia VL de UBS54 (anti-EpCAM) y K53 (anti-CD46)
- <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(333)

ES 2 368 733 T3

<400> 1

gaa att gag ctc act cag tct cca ctc tcc ctg ccc gtc acc cct gga 48
 Glu Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

gag ccg gcc tcc atc tcc tgc agg tct agt cag agc ctc ctg cat agt 96
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

aat gga tac aac tat ttg gat tgg tac ctg cag aag cca ggg cag tct 144
 Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

cca cag ctc ctg atc tat ttg ggt tct aat cgg gcc tcc ggg gtc cct 192
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggc aca gat ttt aca ctg aaa atc 240

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

agc aga gtg gag gct gag gat gtt ggg gtt tat tac tgc atg caa gct 288
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95

cta caa act ttc act ttc ggc cct ggg acc aag gtg gag atc aaa 333
 Leu Gln Thr Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 2

5 <211> 111

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia VL de UBS54 (anti-EpCAM) y K53 (anti-CD46)

10 <400> 2

ES 2 368 733 T3

Glu Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95

Leu Gln Thr Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 3

<211> 333

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia VL de 02-237 (anti-CD46)

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(333)

<400> 3

ES 2 368 733 T3

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95

Leu Gln Thr Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 5

<211> 345

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia VH de UBS54 (anti-EpCAM)

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(395)

<400> 5

ES 2 368 733 T3

```

cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg tcc      48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1           5           10           15

tcg gtg agg gtc tcc tgc aag gct tct gga ggc acc ttc agc agc tat      96
Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
           20           25           30

gct atc agc tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg      144
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
           35           40           45

gga ggg atc atc cct atc ttt ggt aca gca aac tac gca cag aag ttc      192
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
           50           55           60

cag ggc aga gtc acg att acc gcg gac gaa tcc acg agc aca gcc tac      240
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65           70           75           80

atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gct gtg tat tac tgt      288
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
           85           90           95

gca aga gac ccg ttt ctt cac tat tgg ggc caa ggt acc ctg gtc acc      336
Ala Arg Asp Pro Phe Leu His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
           100           105           110

gtc tcg aca
Val Ser Thr
           115

```

<210> 6

<211> 115

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia VH de UBS54 (anti-EpCAM)

<400> 6

ES 2 368 733 T3

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

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

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Pro Phe Leu His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Thr
 115

<210> 7

<211> 354

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia VH de K53 (anti-CD46)

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(359)

<400> 7

ES 2 368 733 T3

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

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

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Met Met Arg Gly Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Thr
 115

<210> 9

<211> 354

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia VH de 02-237 (anti-CD46)

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(354)

<400> 9

cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg gcc
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

48

ES 2 368 733 T3

tca gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct ggt tac acc ttt acc agc tat 96
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

ggt atc agc tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg 144
 Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

gga tgg atc agc gct tac aat ggt aac aca aac tat gca cag aag ctc 192
 Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
 50 55 60

cag ggc aga gtc acc atg acc aca gac aca tcc acg agc aca gcc tac 240
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

atg gag ctg agg agc ctg aga tct gac gac acg gcc gtg tat tac tgt 288
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gca agg ggc ttt ccg cgt acg tcg ttt gac tcc tgg ggc cag ggc acc 336
 Ala Arg Gly Phe Pro Arg Thr Ser Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

ctg gtg acc gtc tcc tca 354
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 10

<211> 118

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia VH de 02-237 (anti-CD46)

<400> 10

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

ES 2 368 733 T3

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

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Phe Pro Arg Thr Ser Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 11

<211> 369

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia VH de clon B28 (-anti-fago CD22)

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(369)

<400> 11

atg gcc gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggt gtg gta cgg cct 48
 Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro
 1 5 10 15

gga ggg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttt gat 96
 Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp

ES 2 368 733 T3

20	25	30	
gat tat ggc atg agc tgg gtc cgc caa gct cca ggg aag ggg ctg gag			144
Asp Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu			
35	40	45	
tgg gtc tct ggt att aat tgg aat ggt ggt agc aca ggt tat gca gac			192
Trp Val Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp			
50	55	60	
tct gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac tcc			240
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser			
65	70	75	80
ctg tat ctg caa atg aac agt ctg aga gcc gag gac acg gcc gtg tat			288
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr			
85	90	95	
tac tgt gca aga ggc ttt ctt cgt ttt gct tcc tcc tgg ttt gac tat			336
Tyr Cys Ala Arg Gly Phe Leu Arg Phe Ala Ser Ser Trp Phe Asp Tyr			
100	105	110	
tgg ggc caa ggt acc ctg gtc acc gtc tcg aga			369
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Arg			
115	120		

<210> 12

<211> 123

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia VH de clon B28 (anti-fago CD22)

<400> 12

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

Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Asp
	20							25					30		

ES 2 368 733 T3

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

Trp Val Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser
 65 70 75 80

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

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

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Arg
 115 120

<210> 13

<211> 369

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia VH de clon II-2 (anti-fago CD72)

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(369)

<400> 13

atg gcc cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct 48
 Met Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
 1 5 10 15

ggg gcc tca gtg aag gtt tcc tgc aag gca tct gga tac acc ttc acc 96
 Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20 25 30

agc tac tat atg cac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag 144

ES 2 368 733 T3

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

tgg atg gga ata atc aac cct agt ggt ggt ggc aca agc tac gca cag 192
 Trp Met Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Gly Thr Ser Tyr Ala Gln
 50 55 60

aag ttc cag ggc aga gtc acc atg acc agg gac acg tcc acg agc aca 240
 Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr
 65 70 75 80

gtc tac atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg tat 288
 Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95

tac tgt gca aga gac tac tat gtt acg tat gat tcc tgg ttt gac tcc 336
 Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr Tyr Val Thr Tyr Asp Ser Trp Phe Asp Ser
 100 105 110

tgg ggc caa ggt acc ctg gtc acc gtc tcg aga 369
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Arg
 115 120

<210> 14

<211> 123

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia VH de clon II-2 (anti-fago CD72)

<400> 14

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

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

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

ES 2 368 733 T3

Trp Met Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Gly Thr Ser Tyr Ala Gln
 50 55 60

Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr
 65 70 75 80

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

Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr Tyr Val Thr Tyr Asp Ser Trp Phe Asp Ser
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Arg
 115 120

<210> 15

<211> 360

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia VH de clon I-2 (anti-fago de clase II)

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(360)

<400> 15

atg gcc gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct 48
 Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
 1 5 10 15

ggc agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttt gat 96
 Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp
 20 25 30

gat tat gcc atg cac tgg gtc cgg caa gct cca ggg aag ggc ctg gag 144
 Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

ES 2 368 733 T3

tgg gtc tca ggt att agt tgg aat agt ggt agc ata ggc tat gcg gac 192
 Trp Val Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp
 50 55 60

tct gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac tcc 240
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser
 65 70 75 80

ctg tat ctg caa atg aac agt ctg aga gct gag gac acg gcc gtg tat 288
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95

tac tgt gca agg gac ctt tat ctt gcg cat ttt gac tac tgg ggc caa 336
 Tyr Cys Ala Arg Asp Leu Tyr Leu Ala His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

ggt acc ctg gtc acc gtc tcg aga 360
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Arg
 115 120

<210> 16

<211> 120

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia VH de clon I-2 (anti-fago de clase II)

<400> 16

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

Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp
 20 25 30

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

Trp Val Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp

ES 2 368 733 T3

50

55

60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser
65 70 75 80

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Arg
115 120

<210> 17

<211> 336

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia VL común de clones B28 (anti-fago CD22), II-2 (anti-fago CD72) y I-2 (anti-fago de clase II)

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(336)

<400> 17

tcg tct gag ctg act cag gac cct gct gtg tct gtg gcc ttg gga cag 48
Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
1 5 10 15

aca gtc agg atc aca tgc caa gga gac agc ctc aga agc tat tat gca 96
Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
20 25 30

agc tgg tac cag cag aag cca gga cag gcc cct gta ctt gtc atc tat 144
Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

ggc aaa aac aac cgg ccc tca ggg atc cca gac cga ttc tct ggc tcc 192

ES 2 368 733 T3

```

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
  50                      55                      60

agc tca gga aac aca gct tcc ttg acc atc act ggg gct cag gcg gaa      240
Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
  65                      70                      75                      80

gat gag gct gac tat tac tgt aac tcc cgg gac agc agt ggt aac cat      288
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His
                      85                      90                      95

gtg gta ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta ggt gcg gcc gca      336
Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala
                      100                      105                      110

```

<210> 18

<211> 112

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia VL común de clones B28 (anti-fago CD22), II-2 (anti-fago CD72) y I-2 (anti-fago de clase II)

<400> 18

```

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

Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
                      20                      25                      30

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

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
  50                      55                      60

Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
  65                      70                      75                      80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His
                      85                      90                      95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala
                      100                      105                      110

```

10

REIVINDICACIONES

1. Un método para la producción de una mezcla de anticuerpos en un huésped recombinante, que comprende las etapas de:
 - 5 expresar en una célula huésped recombinante una secuencia de ácidos nucleicos o secuencias de ácidos nucleicos que codifican una cadena liviana común y al menos tres diferentes cadenas pesadas que son capaces de aparearse con una cadena liviana común.
 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, que también comprende la etapa de:
 - recuperar los anticuerpos de la célula huésped o el cultivo de células huésped.
 3. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde al menos dos anticuerpos que comprenden un dímero de cadena pesada-liviana en dicha mezcla de anticuerpos tienen diferentes especificidades y/o afinidades.
 4. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicha célula huésped recombinante es capaz de expresión de alto nivel de proteínas recombinantes sin la necesidad de amplificación del ácido nucleico que codifica dichas proteínas en dicha célula.
 - 15 5. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde dicha célula se deriva de una célula retiniana embrionaria humana que fue inmortalizada o transformada por secuencias adenovirales E 1.
 6. Un método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde dicha célula huésped se deriva de una célula PER.C6.
 7. Una mezcla de al menos tres anticuerpos recombinantes diferentes, en donde dichos al menos tres diferentes anticuerpos tienen una cadena liviana común, en donde al menos tres diferentes cadenas pesadas están representadas en dicha mezcla que se puede obtener por medio de un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
 - 20 8. Una mezcla de acuerdo con la reivindicación 7, en donde los anticuerpos presentes en dicha mezcla se unen con diferentes epitopos del mismo antígeno y/o con diferentes antígenos presentes en una mezcla que comprende antígeno.
 - 25 9. Una mezcla de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en donde dicha mezcla comprende un anticuerpo biespecífico.
 10. Una mezcla de acuerdo con la reivindicación 7, 8 ó 9, en donde dichas cadenas pesadas difieren en sus regiones constantes de modo suficiente como para reducir el apareamiento entre las diferentes cadenas pesadas.
 11. Una célula huésped recombinante que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena liviana y secuencias de ácidos nucleicos que codifican al menos tres diferentes cadenas pesadas de un anticuerpo, en donde dichas cadenas liviana y pesada son capaces de aparearse.
 - 30 12. Una composición farmacéutica que comprende una mezcla de anticuerpos producidos de modo recombinante de acuerdo con la reivindicación 7 y un portador apropiado,
 13. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 12, en donde dicha mezcla de anticuerpos fue producida por células huésped recombinantes de acuerdo con la reivindicación 9.
 - 35 14. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-13, en donde al menos dos de dichos anticuerpos tienen diferentes especificidades.
 15. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 14, en donde dichas diferentes especificidades se refieren a diferentes epitopos en el mismo antígeno.
 - 40 16. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 14, en donde dichas diferentes especificidades se refieren a diferentes antígenos presentes en una mezcla que comprende antígeno.
 17. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-13, en donde al menos dos de dichos anticuerpos tienen diferentes afinidades por el mismo epitopo.
 18. Una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-17, en donde dicha composición tiene un efecto que es mayor que el efecto de cada anticuerpo individual presente en dicha composición, en donde dicho efecto se mide en un ensayo funcional.
 - 45 19. Un método para preparar una célula huésped recombinante para la producción de una mezcla de anticuerpos, que comprende las etapas de:
 - introducir en dicha célula huésped una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena liviana y secuencias de ácidos nucleicos que codifican al menos tres diferentes cadenas pesadas que son capaces de aparearse con

dicha cadena liviana, en donde dichas secuencias de ácidos nucleicos se introducen de forma consecutiva o concomitante.

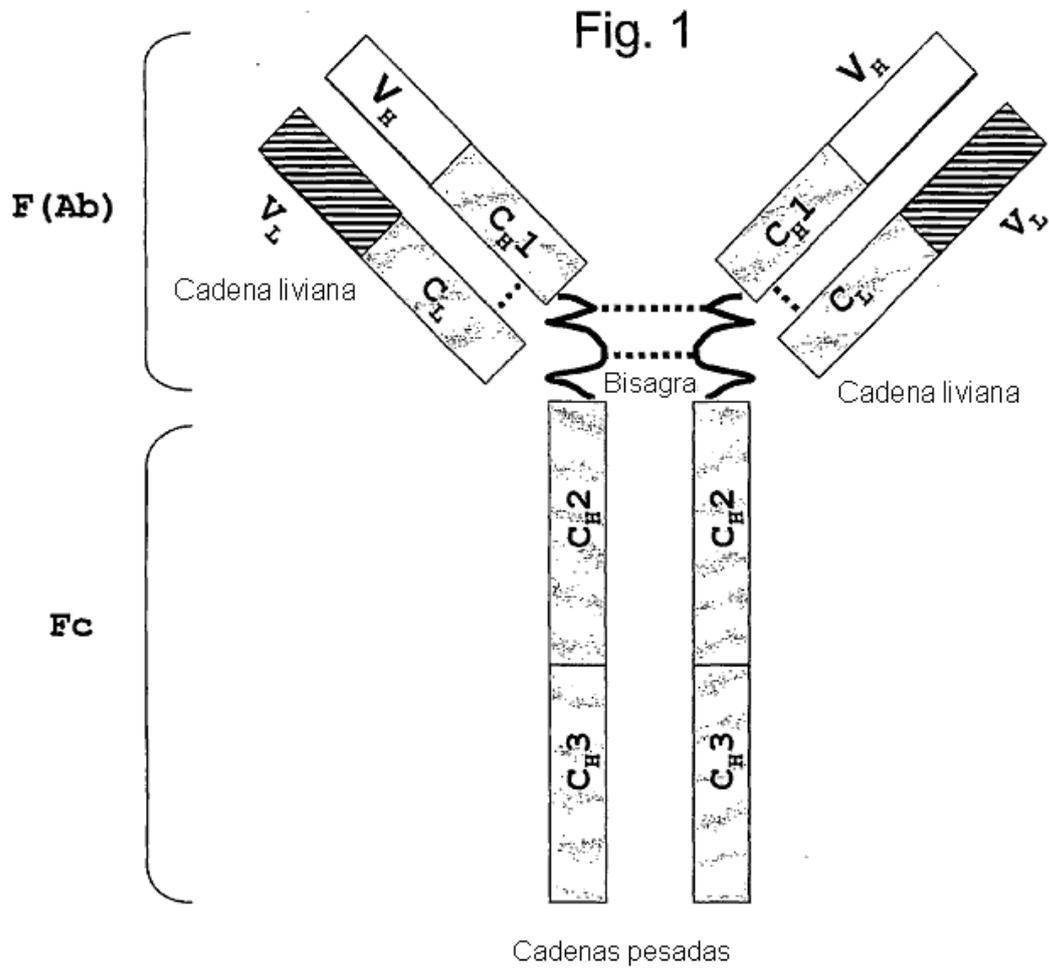
20. Un método para preparar una célula huésped recombinante para la producción de una mezcla de anticuerpos, que comprende la etapa de:

5 introducir secuencias de ácidos nucleicos que codifican al menos tres diferentes cadenas pesadas en una célula huésped recombinante que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena liviana capaz de aparearse con al menos tres de dichas cadenas pesadas.

10 **21.** Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o una célula huésped recombinante de acuerdo con la reivindicación 9, o un método de preparación de una célula huésped recombinante de acuerdo con la reivindicación 19 ó 20, en donde la secuencia de ácidos nucleicos o secuencias que codifican al menos una de dichas cadenas livianas y/o pesadas fueron obtenidas por medio de un método que comprende al menos una etapa de selección de muestra de anticuerpos.

15 **22.** Un cultivo de células huésped recombinantes de acuerdo con la reivindicación 9, que producen una mezcla de anticuerpos a partir de una célula individual dentro de la célula, donde dicha mezcla comprende al menos una cadena liviana y al menos tres diferentes cadenas pesadas.

23. Un cultivo de acuerdo con la reivindicación 22, en donde dicho cultivo produce dicha mezcla de anticuerpos a partir de una célula individual dentro del cultivo para más de 20 duplicaciones de población.



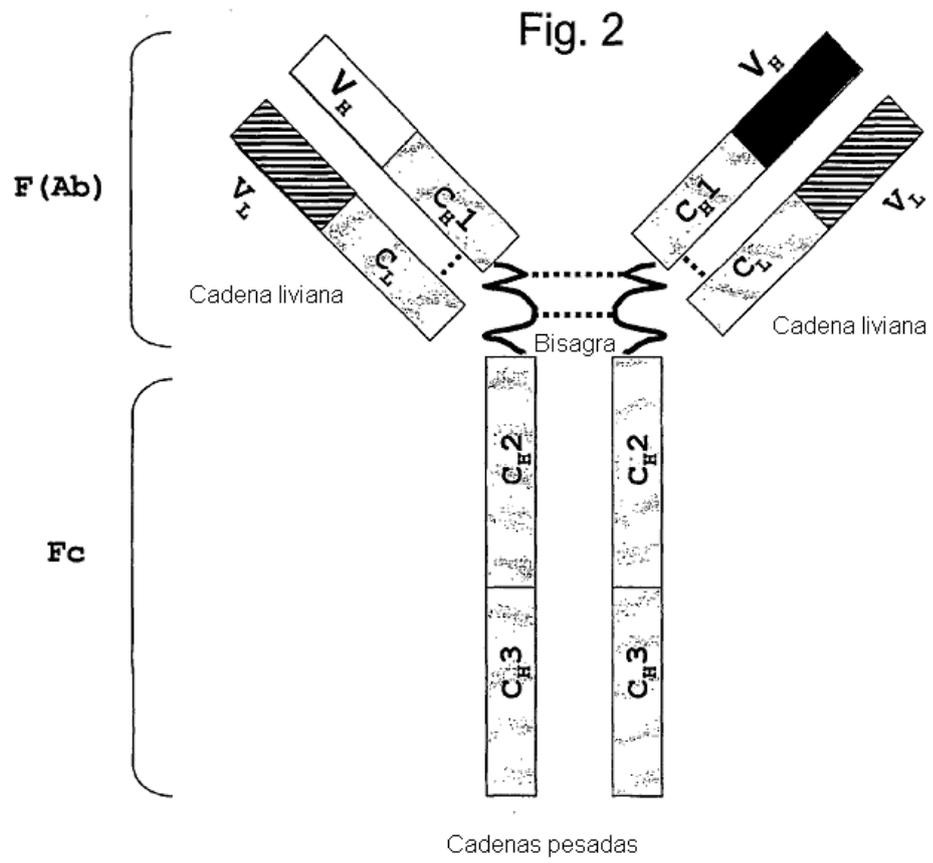
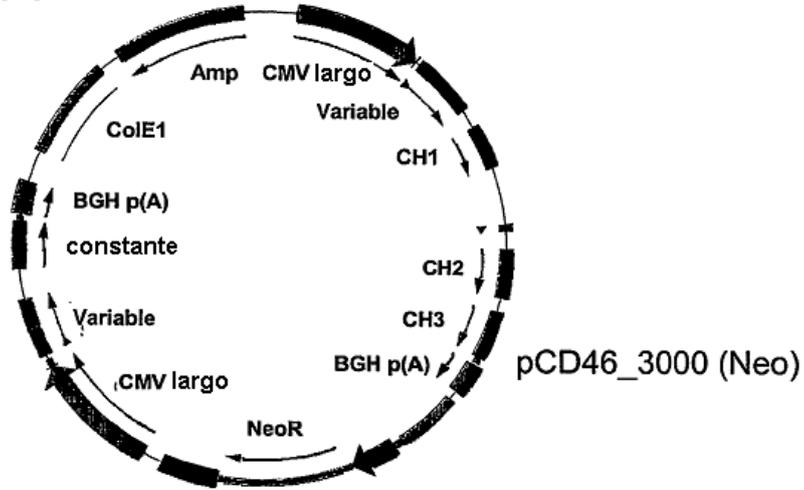
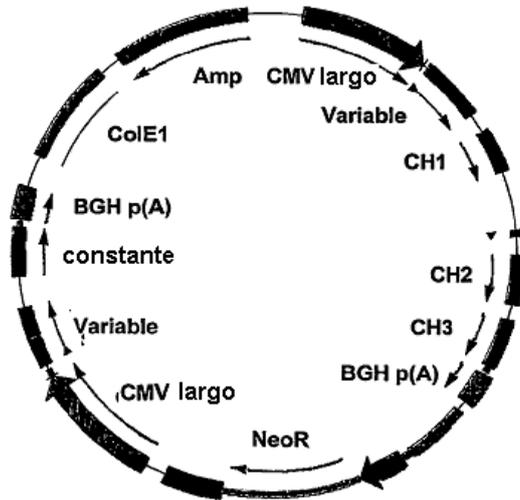


Fig. 4



pCD46_3000 (Neo)



pUBS3000Neo

Fig. 5

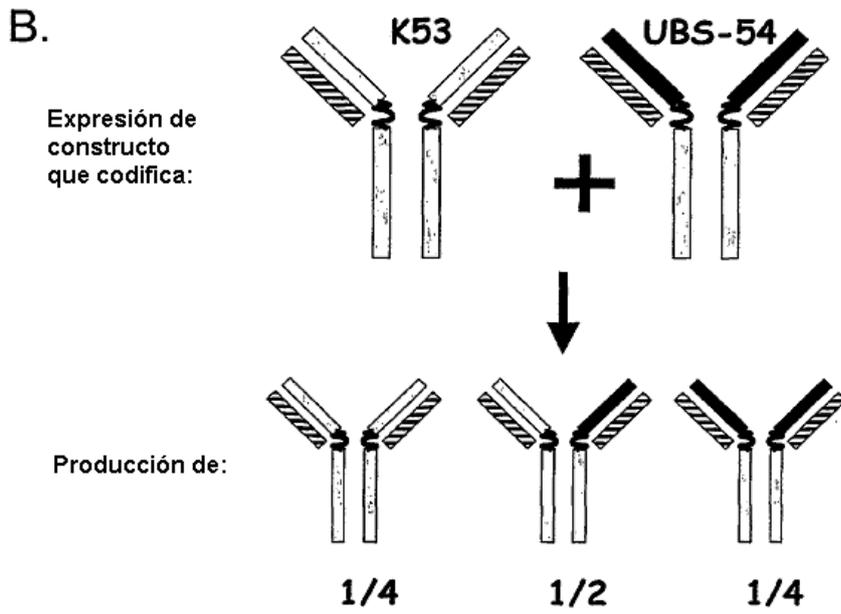
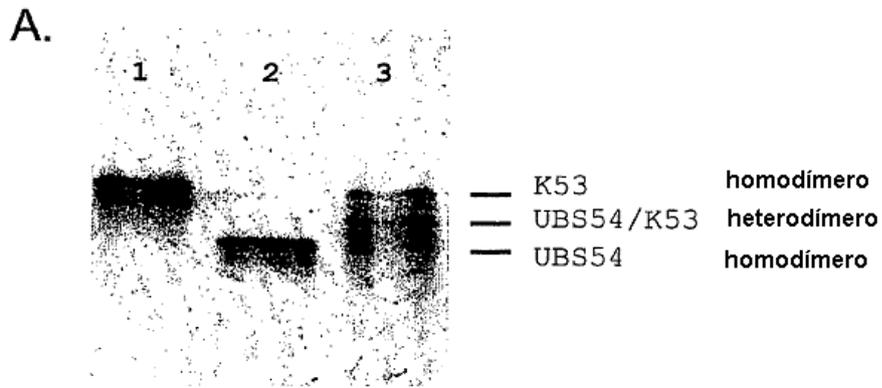


Fig. 6

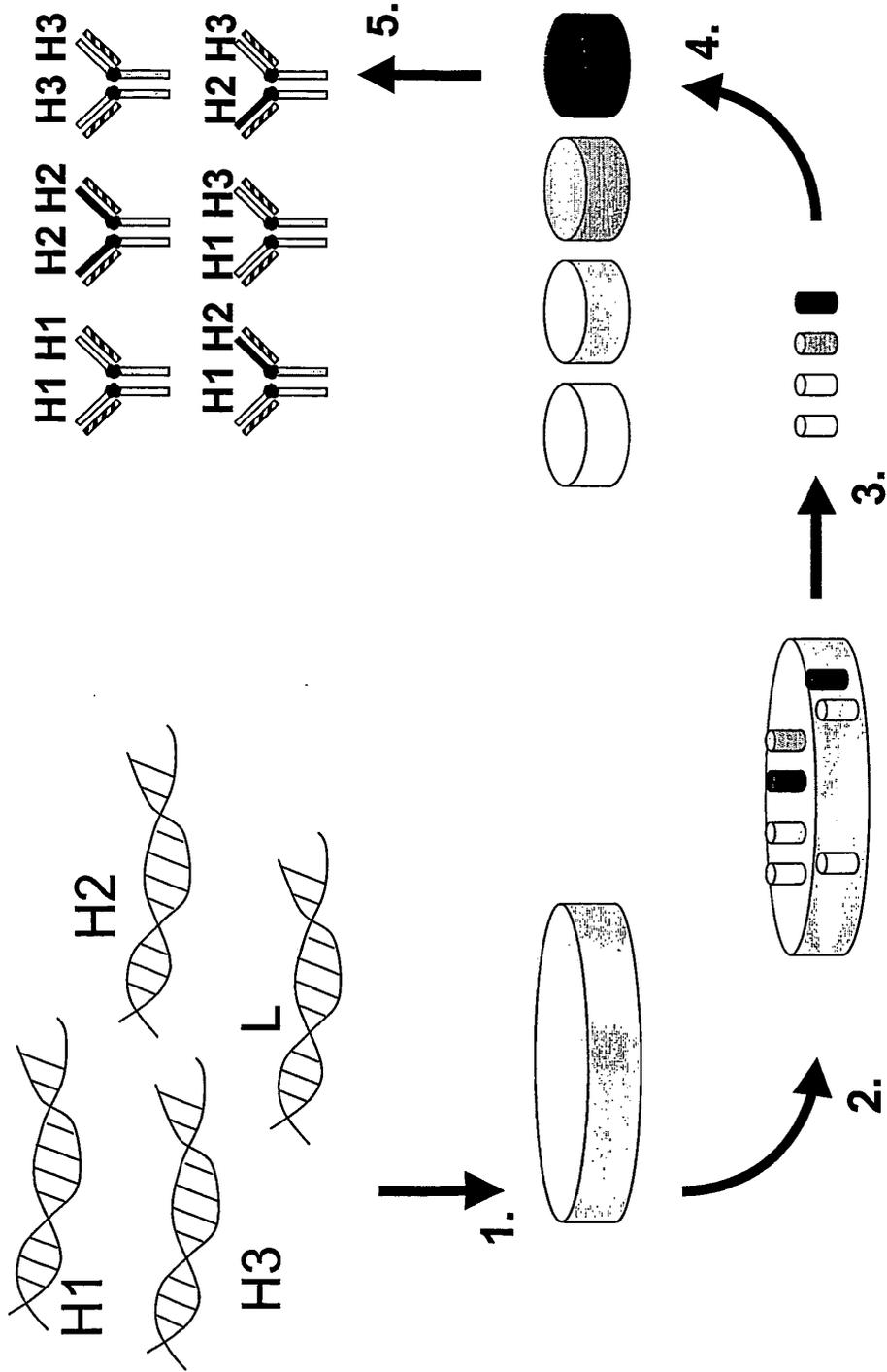


Fig. 7

Fragmento Anti-CD22 V_H (fago B28)
 M A E V Q L V E S G G G V V R P G G S L R L S C .
 1 ATGGCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGTGTGTACGGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCCTG
 . A A S G F T F D D Y G M S W V R Q A P G K G L E .
 72 TGCAGCCTCTGGATTACCTTTGATGATATGGCATGAGCTGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCTGG
 . W V S G I N W N G G S T G Y A D S V K G R F T
 143 AGTGGTCTCTGGTATTAAATGGAAATGGTGTAGCACAGGTATGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACACC
 I S R D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D T A V .
 214 ATCTCCAGACAAACGCAAGAACTCCCTGTATCTGCAATGAACAGTCTGAGAGCCGAGGACACGGCCCGT
 . Y Y C A R G F L R F A S S W F D Y W G Q G T L V .
 285 GTATTACTGTGCAAGAGGCTTTCTCGTTTTGCTTCCCTCCCTGGTTGACTATTGGGGCCCAAGGTACCCCTGG
 . T V S R
 356 TCACCGTCTCGAGA

Fragmento Anti-CD72 V_H (fago II-2)
 M A Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C .
 1 ATGGCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTG
 . K A S G Y T F T S Y Y M H W V R Q A P G Q G L E .
 72 CAAGGCATCTGGATAACCTTCACCAGCTACTATATGCACCTGGGTGGACAGGCCCTGGACAAAGGCTTG
 . W M G I I N P S G G T S Y A Q K F Q G R V T
 143 AGTGGATGGGAATAATCAACCCCTAGTGGTGGCCACAAGCTACGCACAGAAGTTCAGGGCAGAGTCACC
 M T R D T S T S T V Y M E L S S L R S E D T A V .
 214 ATGACCAGGACACGTCACAGGACAGTCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCCGT
 . Y Y C A R D Y Y V T Y D S W F D S W G Q G T L V .
 285 GTATTACTGTGCAAGAGACTACTATGTACGTATGATTCCTGGTTGACTCTGGGGCCCAAGGTACCCCTGG
 . T V S R
 356 TCACCGTCTCGAGA

Fig. 7, continuaciónFragmento anti-clase II V_H (fago I-2)

```

M A E V Q L V E S G G L V Q P G R S L R L S C .
1  ATGGCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTG
. A A S G F T F D D Y A M H W V R Q A P G K G L E .
72  TGCAGCCTCTGGATTACCTTTGATGATTATGCCATGCACTGGTCCGGCAAGCTCCAGGAAAGGCCCTGG
. W V S G I S W N S G S I G Y A D S V K G R F T
143  AGTGGTCTCAGGTATTAGTTGGAATAGTGGTAGCATAGGCTATGCCGACTCTGTGAAGGCCGATTCAACC
I S R D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D T A V .
214  ATCTCCAGAGACAACCCAAAGAACTCCCTGTATCTGCAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCGT
. Y Y C A R D L Y L A H F D Y W G Q G T L V T V S .
285  GTATTACTGTGCAAGGACCTTTATCTTGGCATTGTGACTACTGGGGCCAAGGTACCCTGGTCAACCGTCT
. R
356  CGAGA

```

Secuencia V_L compartida de fagos I-2, II-2 y B28

```

S S E L T Q D P A V S V A L G Q T V R I T C Q G .
1  TCGTCTGAGCTGACTCAGGACCCCTGCTGTCTGTGGCCCTTGGACAGACAGTCAGGATCACATGCCAAGG
. D S L R S Y Y A S W Y Q Q K P G Q A P V L V I Y .
72  AGACAGCCTCAGAAGCTATTATGCAAGCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGCCCTGTACTTGTCACTCT
. G K N N R P S G I P D R F S G S S S G N T A S
143  ATGGTAAAACAACCCGCTCAGGGATCCCAGACCCGATTCTCTGGCTCCAGTCCAGGAAACACAGCTTCC
L T I T G A Q A E D E A D Y Y C N S R D S S G N .
214  TTGACCATCACTGGGGCTCAGCGGGAAGATGAGGCTGACTATTACTGTAACCTCCCGGACAGCAGTGGTAA
. H V V F G G G T K L T V L G A A A
285  CCATGTGGTATTCCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCCGTCCTAGGTGCGGCCCGCA

```

Fig. 8

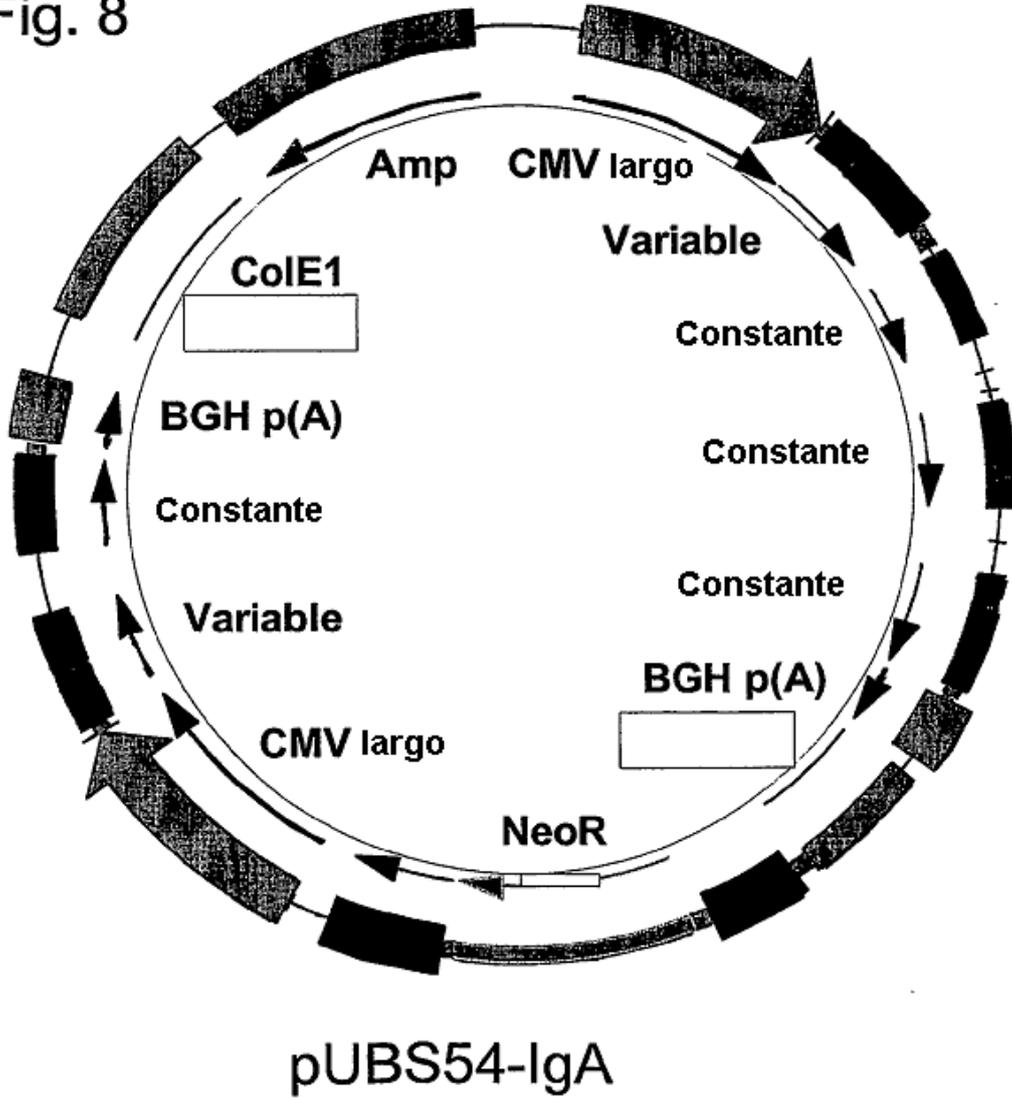


Fig. 9

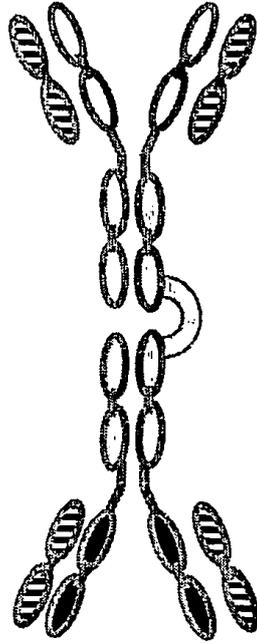


Fig. 10

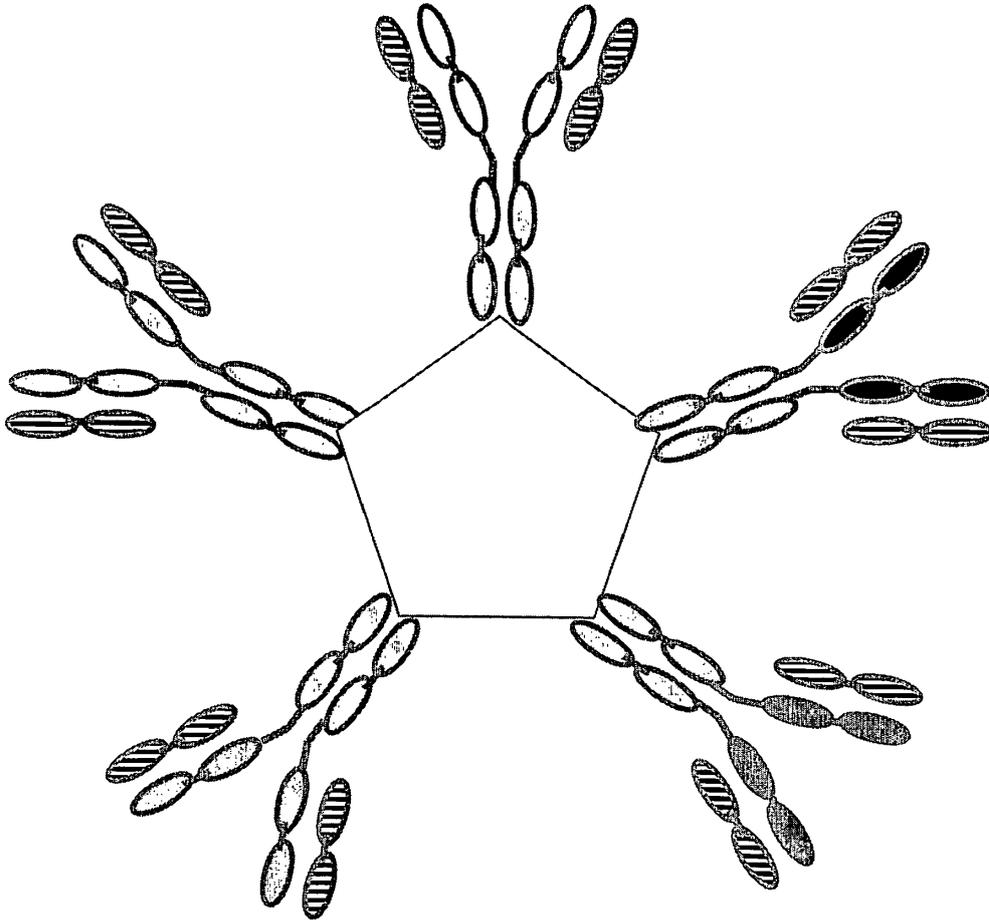


Fig. 11

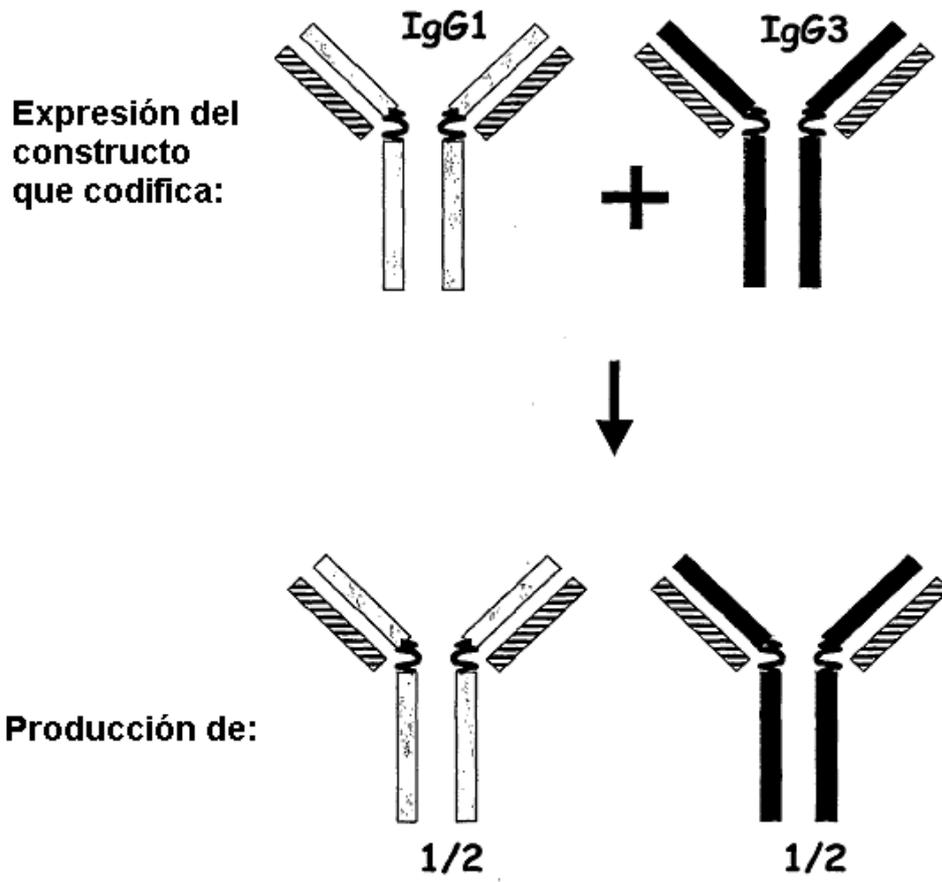


Fig. 12Secuencia V_H de K53 IgG

1 Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V
 CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTC

61 S C K A S G Y T F T S Y G I S W V R Q A
 TCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTACCAGCTATGGTATCAGCTGGGTGGACAGGCC

121 P G Q G L E W M G W I S A Y N G N T N Y
 CCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTTACAATGGTAACACAAACTAT

181 A Q K L Q G R V T M T T D T S T S T A Y
 GCACAGAAGCTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGCCTAC

241 M E L R S L R S D D T A V Y Y C A R G M
 ATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGGGGCATG

301 M R G V F D Y W G Q G T L V T V S T
 ATGAGGGTGTGTTGACTACTGGGGCCAAGGTACCCTGGTCCCGTCTCGACA

Fig. 12, continuaciónSecuencia V_H de 02-237 IgG

1 Q V Q L V Q S G A E .. K P G A S V K V
 CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTC

 61 S C K A S G Y T F T S Y G I S W V R Q A
 TCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTACCAGCTATGGTATCAGCTGGTGGTGACAGGCC

 121 P G Q G L E W M G W I S A Y N G N T N Y
 CCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTTACAATGGTAACACAAAACCTAT

 181 A Q K L Q G R V T M T T D T S T S T A Y
 GCACAGAAGCTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGCCTAC

 241 M E L R S L R S D D T A V Y Y C A R G F
 ATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGGTGTATTACTGTGCAAGGGGCTTT

 301 P R T S F D S W G Q G T L V T V S S
 CCGGTACGTCGTTTGACTCCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCCGTCCTCCTCA

Fig. 12, continuaciónSecuencia V_H de UBS54 IgG

1 Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V R V
 CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCCTCGGTGAGGGTC

 61 S C K A S G G T F S S Y A I S W V R Q A
 TCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCC

 121 P G Q G L E W M G G I I P I F G T A N Y
 CCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGATCATCCCCTATCTTTGGTACAGCAAACCTAC

 181 A Q K F Q G R V T I T A D E S T S T A Y
 GCACAGAAGTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGGGACGAATCCACGAGCACAGCCCTAC

 241 M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R D P
 ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACCGGTGTGTATTACTGTGCAAGAGACCCCG

 301 F L H Y W G Q G T L V T V S T
 TTTCTTCACTATTGGGGCCAAGGTACCCTGGTCAACCGTCTCGACA

Fig. 12, continuaciónSecuencia V_L de K53 y UBS54 IgG

1 E I E L T Q S P L S L P V T P G E P A
 GAAATTGAGCTCACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCC

 58 S I S C R S S Q S L L H S N G Y N Y L D
 TCCATCTCCTGCAGGCTAGTCAGAGCCCTCCTGCATAGTAATGGATACAACACTATTGGAT

 118 W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y L G S N R
 TGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTGGGTTCTAATCGG

 178 A S G V P D R F S G S G S G T D F T L K
 GCCTCCGGGTCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAA

 238 I S R V E A E D V G V Y C M Q A L Q T
 ATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTCTACAAACT

 298 F T F G P G T K V E I K
 TTCACCTTTCGGCCCTGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

Fig. 12, continuaciónSecuencia V_L de 02-237 IgG

1 D I V M T Q S P L S L P V T P G E P A
 GACATCGTGACTCAGTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCC

58 S I S C R S S Q S L L H S N G Y N Y L D
 TCCATCTCCTGCAGGCTFAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTAATGGATACAACATTTGGAT

118 W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y L G S N R
 TGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCCTGATCTATTTGGGTTCTAATCGG

178 A S G V P D R F S G S G S G T D F T L K
 GCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAA

238 I S R V E A E D V G V Y Y C M Q A L Q T
 ATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTCTACAAACT

298 F T F G P G T K V E I K
 TTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

Fig. 14

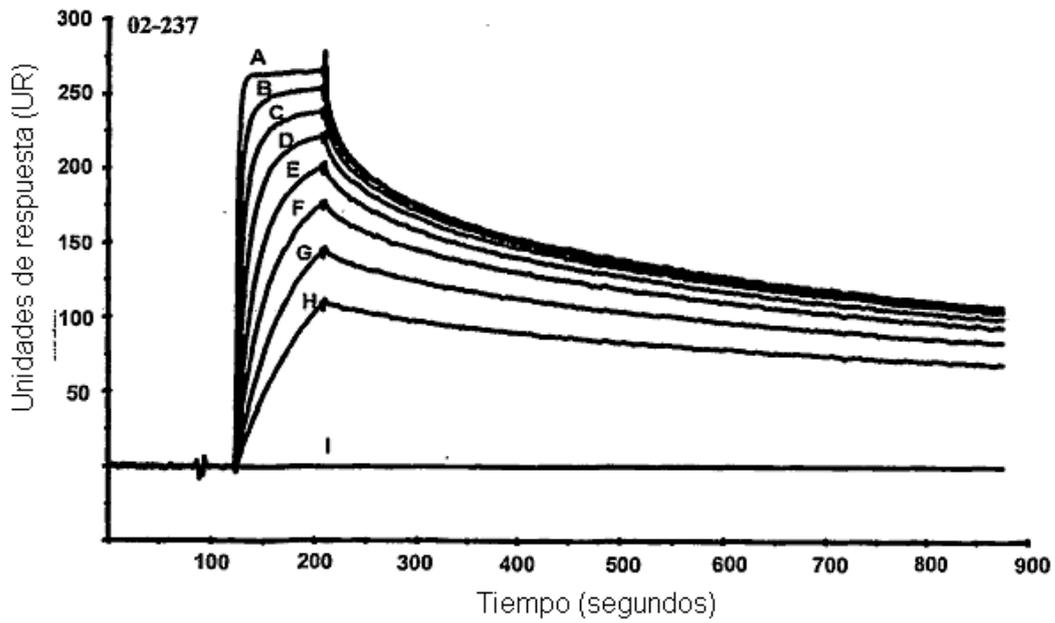
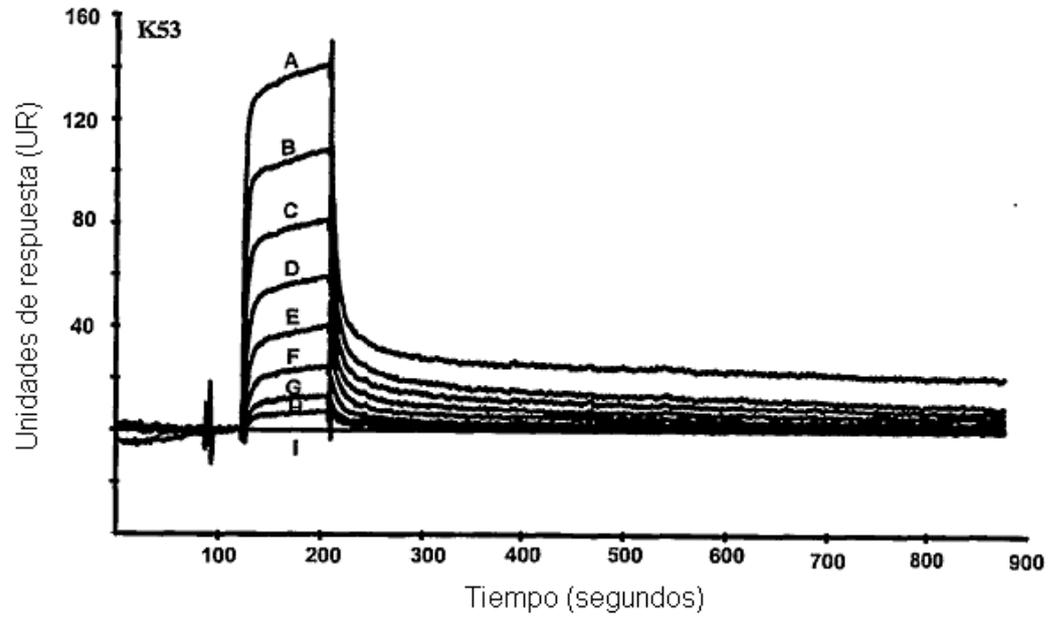


Fig. 15

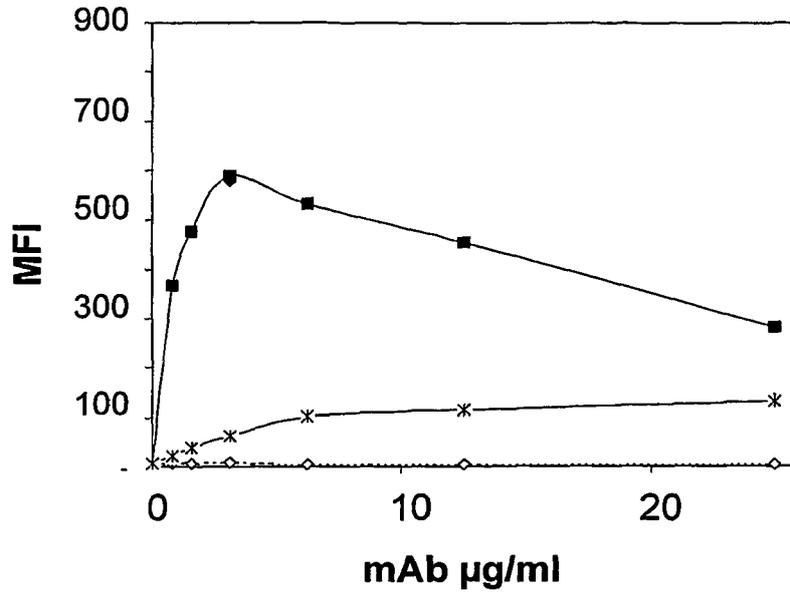


Fig. 16A

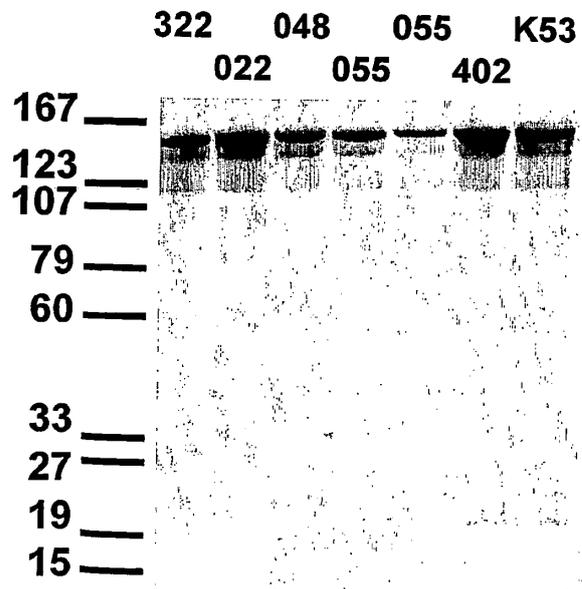
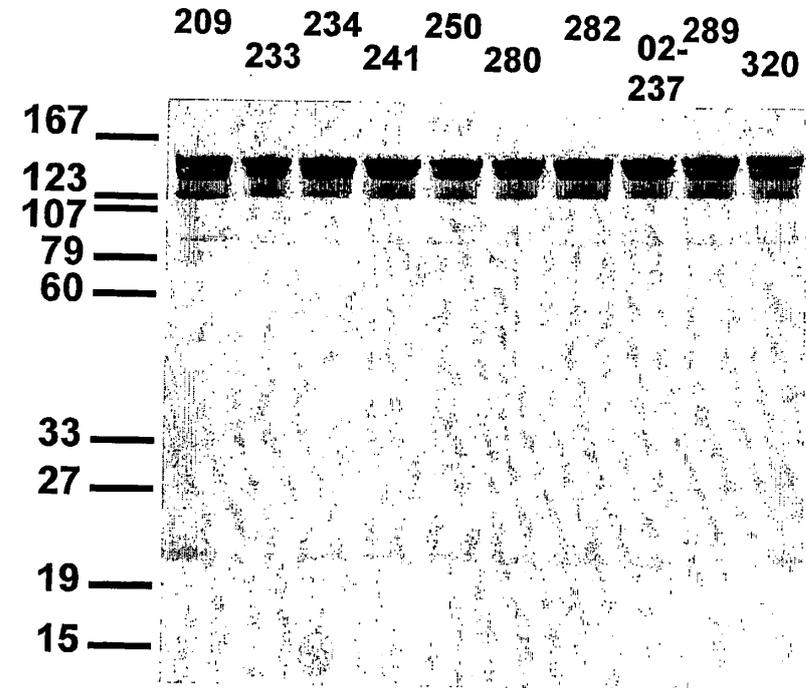


Fig. 16A, continuación

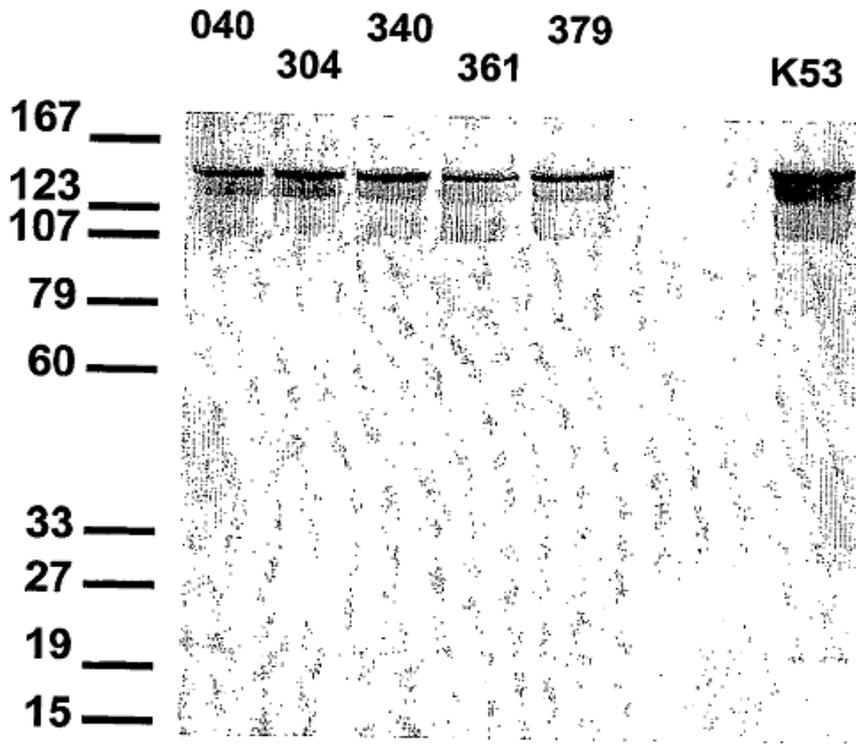


Fig. 16B

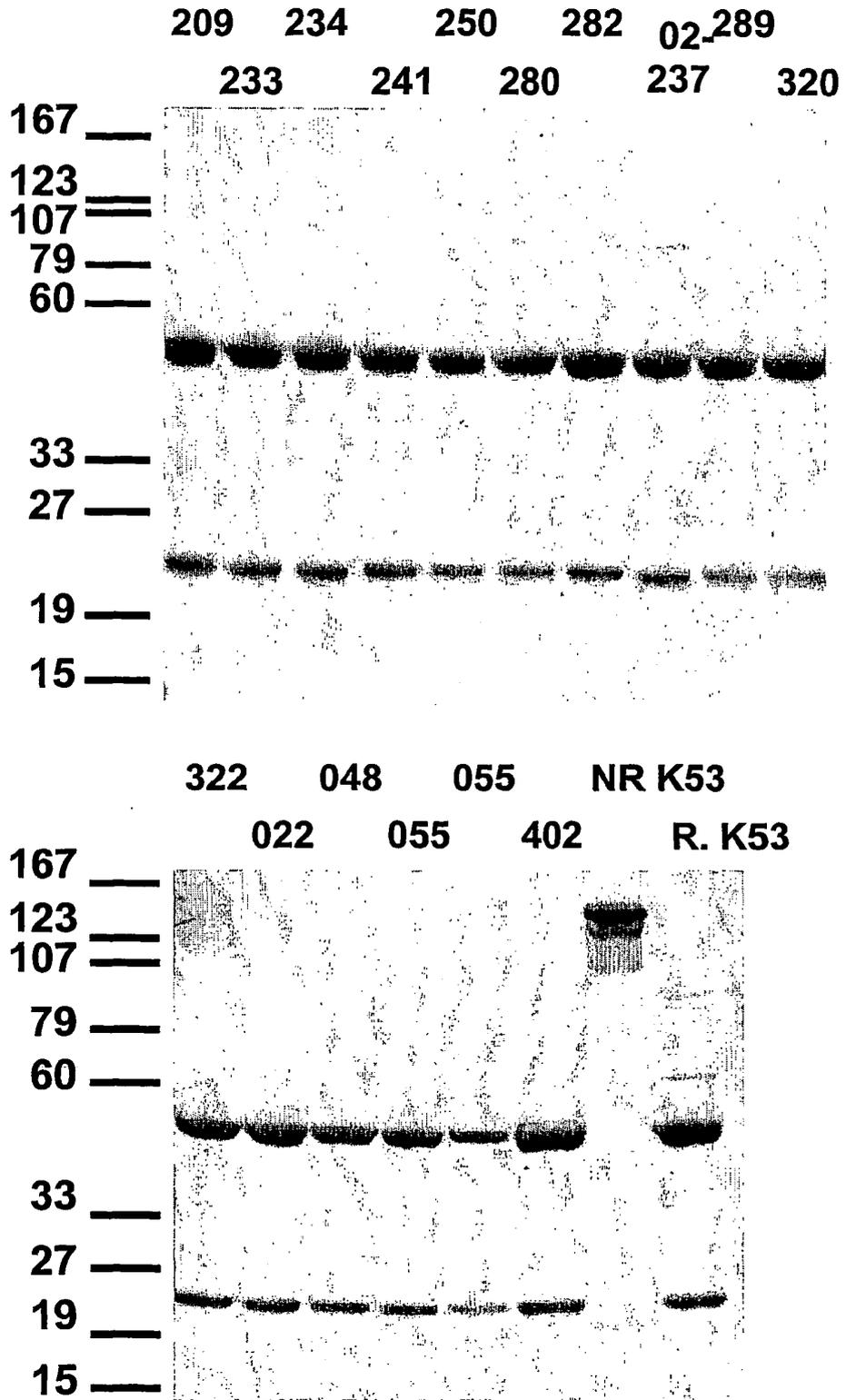


Fig. 16B, continuación

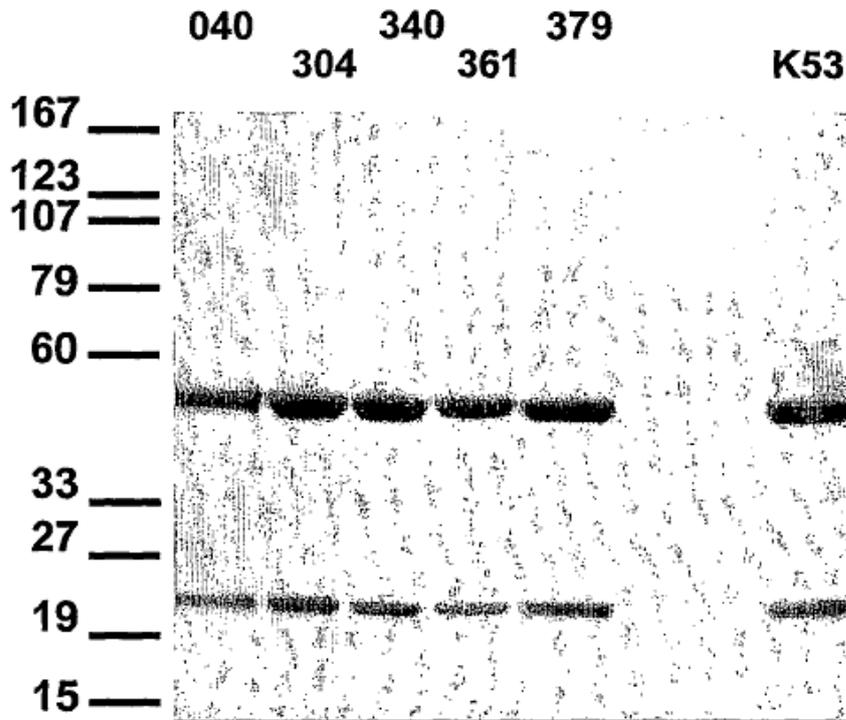


Fig. 17

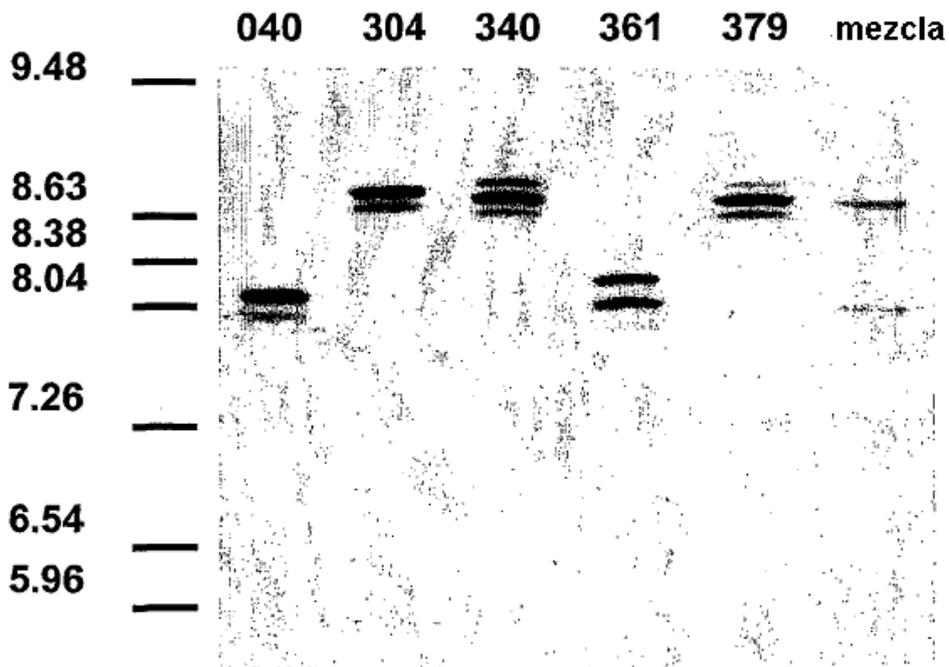
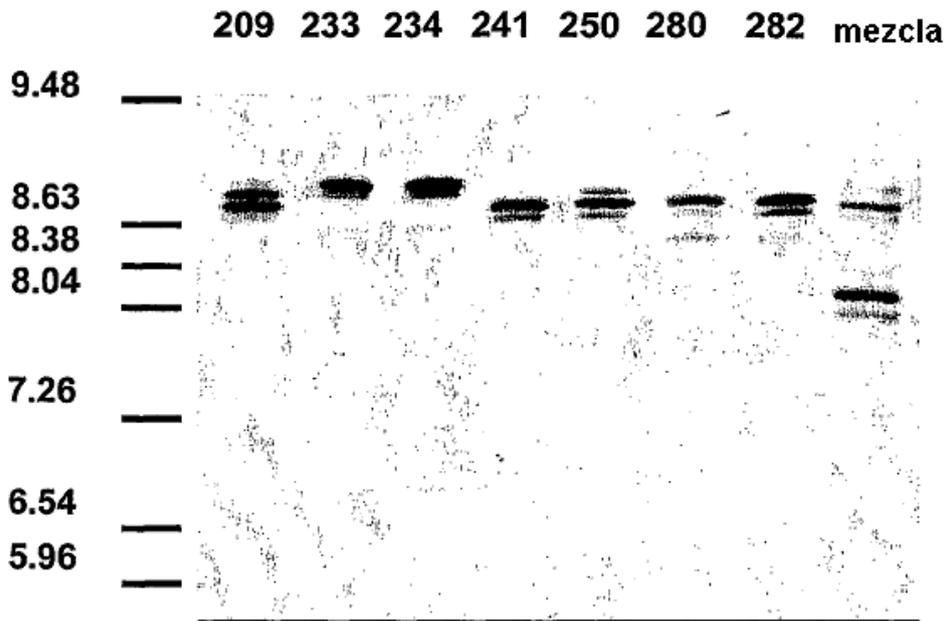


Fig. 17, continuación

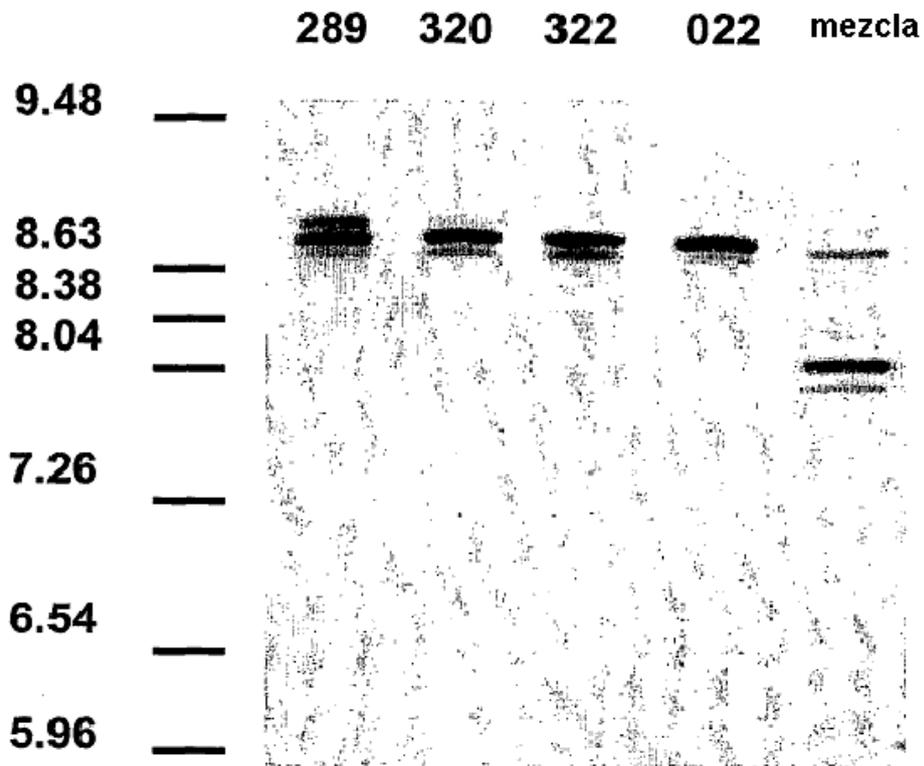


Fig. 17, continuación

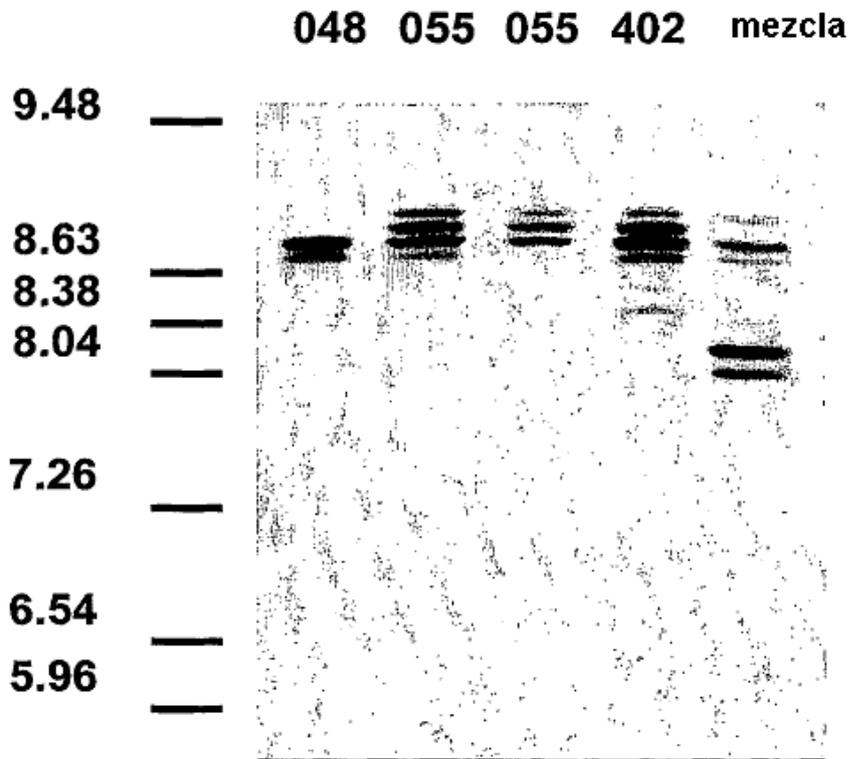


Fig. 18

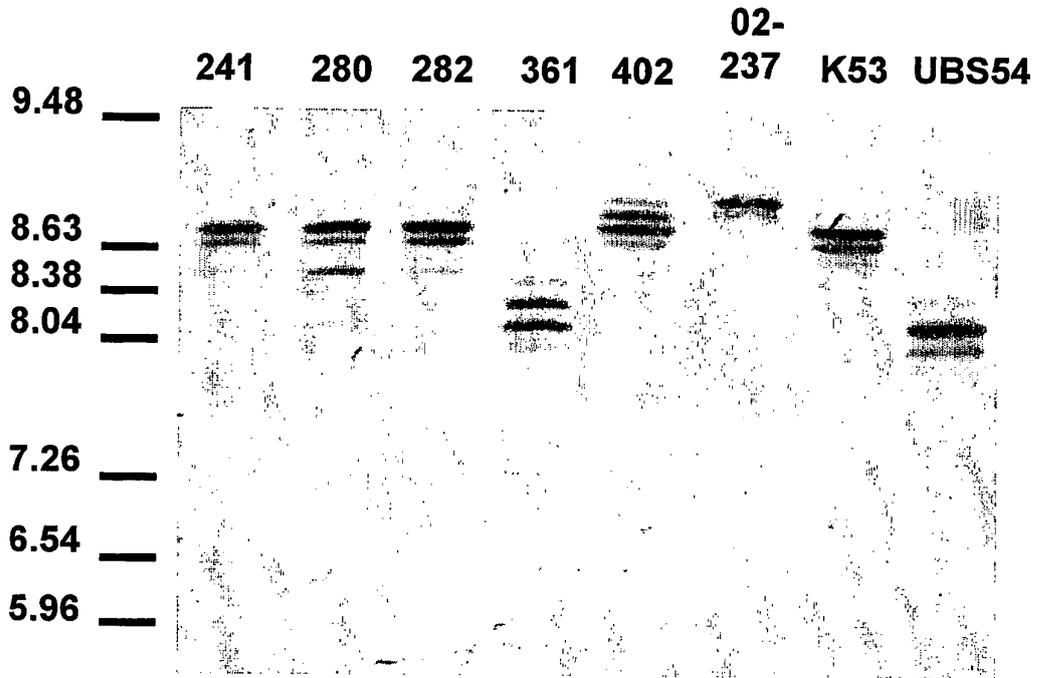


Fig. 19 Mapeo de péptidos de Poli1-280 policional

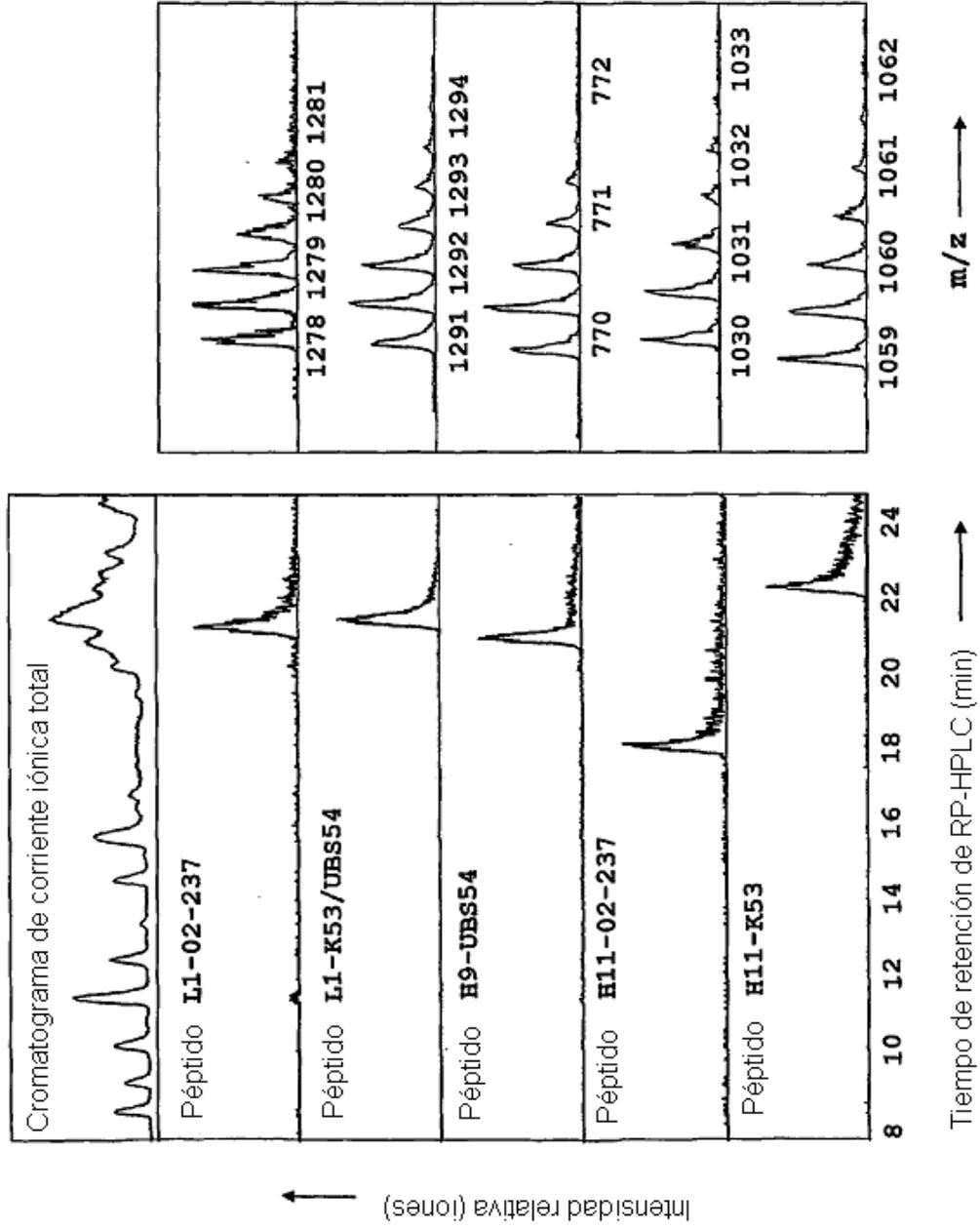


Fig. 20

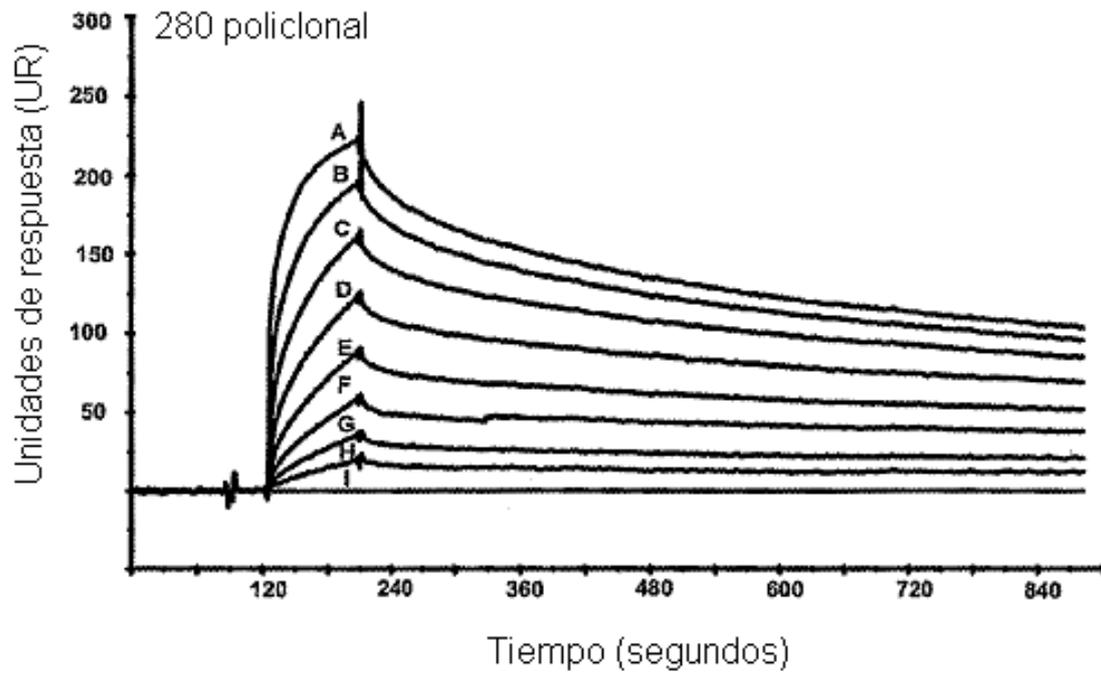


Fig. 21

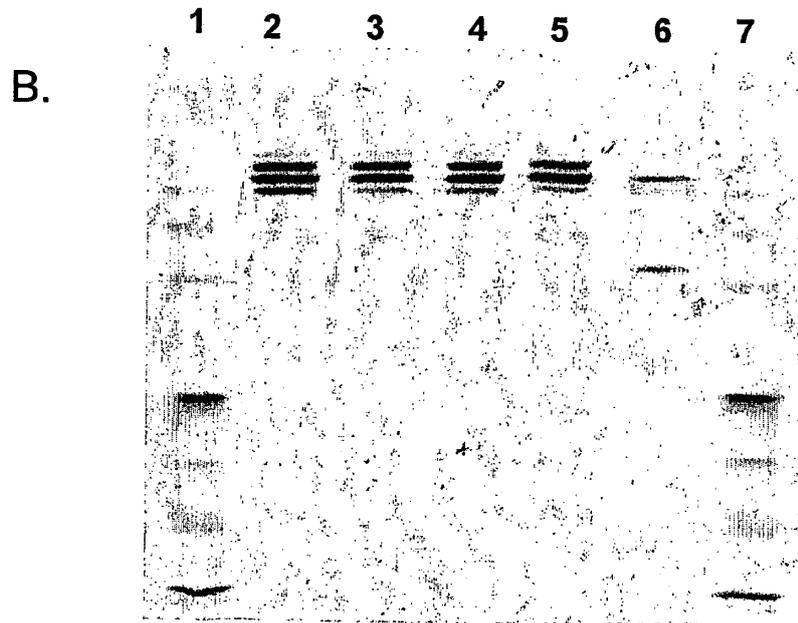
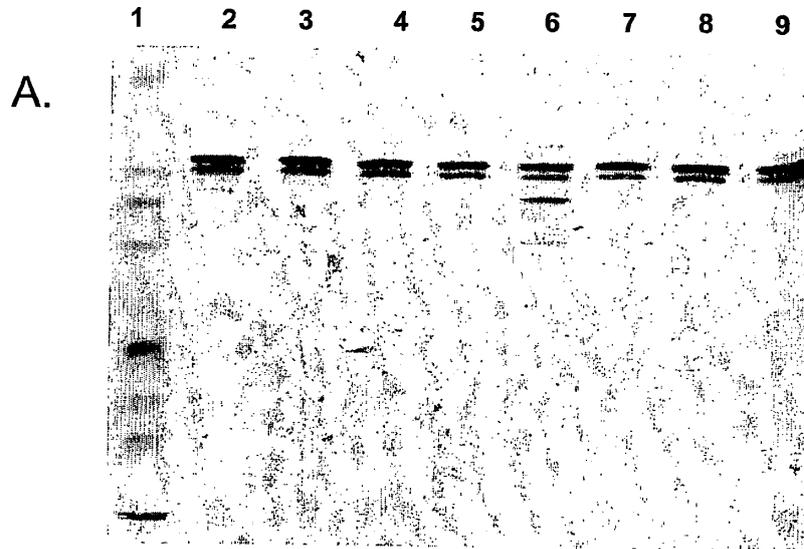
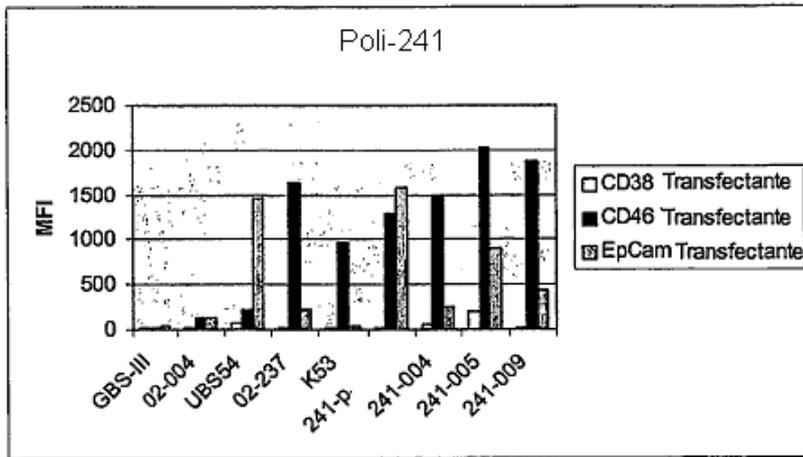
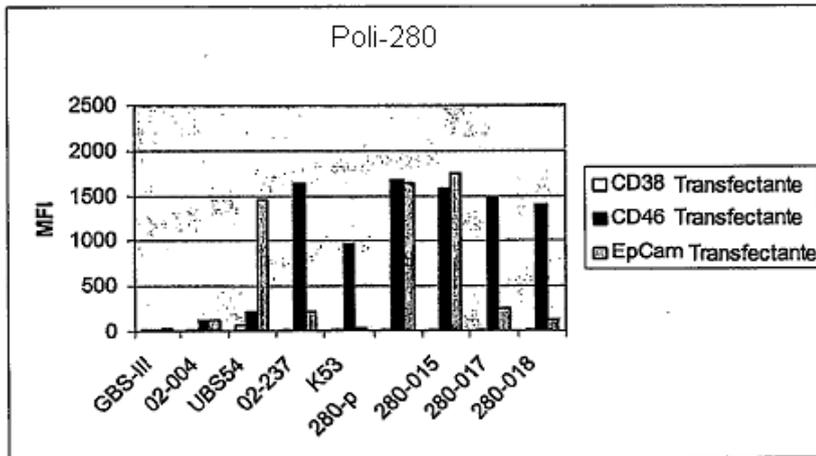


Fig. 22

A.



B.



C.

