(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 384 569**

(51) Int. Cl.:
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **04814762 .3**
(96) Fecha de presentación: **17.12.2004**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1718677**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **08.11.2006**

(54) Título: **Fragmentos de anticuerpos monovalentes útiles como agentes terapéuticos**

(30) Prioridad:
19.12.2003 US 531409 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.07.2012

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.07.2012

(73) Titular/es:
GENENTECH, INC.
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990, US

(72) Inventor/es:
HUANG, Arthur Jyh-Yen;
SCHWALL, Ralph H. y
YANSURA, Daniel G.

(74) Agente/Representante:
Ponti Sales, Adelaida

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).

ES 2 384 569 T3

DESCRIPCIÓN

Fragmentos de anticuerpos monovalentes útiles como agentes terapéuticos

CAMPO TÉCNICO

[0001] La presente invención se refiere generalmente a los campos de la biología molecular y los agentes terapéuticos de anticuerpos. Más específicamente, la invención se refiere a novedosas formas de fragmentos de anticuerpos monovalentes con características únicas para su uso como agentes terapéuticos y a usos de dichos fragmentos de anticuerpos.

ANTECEDENTES

[0002] En los últimos años se han observado cada vez más promesas de uso de anticuerpos como agentes de diagnóstico y terapéuticos para diversos trastornos y enfermedades. La importancia de los anticuerpos en general para fines de diagnóstico, investigación y terapéuticos se refleja en la cantidad significativa de esfuerzo que se ha gastado en estudiar y modificar secuencias de anticuerpos y estructuras de aquellas encontradas en los anticuerpos naturales para lograr características deseadas.

[0003] La opinión prevalente es que un anticuerpo terapéutico ideal poseería ciertas características mínimas que incluyen especificidad por diana, bioestabilidad y biodisponibilidad tras la administración a un paciente sujeto y afinidad de unión a diana suficiente para maximizar los efectos terapéuticos. Desafortunadamente, ha habido un éxito limitado en los esfuerzos para generar agentes terapéuticos de anticuerpos que posean todas, o incluso la mayoría, de estas características mínimas. Por ejemplo, los anticuerpos de longitud completa tales como IgG presentan farmacocinética deseable (por ejemplo, semividas sustanciales *in vivo*) y buenas afinidades de unión a diana debido a los efectos de avidez derivados de la presencia de dos brazos de unión a antígeno en una única molécula de anticuerpo. Sin embargo, tales anticuerpos de longitud completa sufren problemas de biodisponibilidad como consecuencia de su mayor tamaño molecular. Además, un anticuerpo de longitud completa puede presentar en algunos casos efectos agonistas (que no es deseable) tras la unión a un antígeno diana aún cuando sea un anticuerpo antagonista como un fragmento Fab. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 6.468.529. Este fenómeno es desafortunado cuando el efecto antagonista es la función terapéutica deseada. En algunos casos, este fenómeno puede ser debido al efecto de “reticulación” de un anticuerpo bivalente que cuando se une a un receptor de la superficie celular promueve la dimerización de receptores que conduce a la activación de receptores.

[0004] Aunque no cabría esperar que un anticuerpo monovalente tuviera el efecto de “reticulación”, los anticuerpos monovalentes no han sido deseables hasta la fecha como agentes terapéuticos debido a ciertas limitaciones inherentes en su estructura/arquitectura. Por ejemplo, el anticuerpo monovalente en forma de Fab posee menor farmacodinámica (por ejemplo, inestable *in vivo* y rápida eliminación tras la administración) con respecto al uso como agentes terapéuticos. Además, en comparación con sus homólogos multivalentes, los anticuerpos monovalentes generalmente tienen menor afinidad de unión aparente debido a la ausencia de efectos de unión por avidez.

[0005] En general, la elección de la forma de anticuerpo para su uso como agentes terapéuticos ha estado gobernada por una aceptación de la realidad de que cada uno tiene limitaciones no deseables. Sin embargo, es evidente que la forma de anticuerpo de longitud completa ha sido la forma de elección en los últimos años, probablemente debido al menos en parte a su bioestabilidad *in vivo.* Los anticuerpos monovalentes pueden ser aceptables cuando, a fin de cuentas, la bioestabilidad no sea un factor tan crítico para la eficacia terapéutica como la biodisponibilidad. Por ejemplo, debido en parte a la mejor penetración en tejido en comparación con anticuerpos de longitud completa, los anticuerpos monovalentes Fab pueden ser mejores vehículos para la administración de moléculas heterólogas tales como toxinas a las células o tejidos diana en los que la molécula heteróloga ejerce una función terapéutica. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.169.939. Otros ejemplos de intentos por desarrollar anticuerpos monovalentes como agentes terapéuticos incluyen parámetros en los que la monovalencia es crítica para obtener un efecto terapéutico, por ejemplo, cuando hay preocupaciones de que la bivalencia de un anticuerpo pueda inducir una célula diana para que experimente modulación antigénica que, por consiguiente, podría proporcionar un medio para que la célula diana evitara agentes citotóxicos, efectores y complemento. Ejemplos de tales anticuerpos se describen en Cobbold & Waldmann, Nature (1984), 308:460-462; documento EP 0131424; Glennie & Stevenson, Nature (1982), 295:712-714; Nielsen & Routledge, Blood (2002), 100:4067-4073; Stevenson y col., Anticancer Drug Des. (1989), 3(4):219-230; Routledge y col., Transplantation (1995), 60:847-853; Clark y col., Eur. J. Immunol. (1989), 19:381-388; Bolt y col., Eur. J. Immunol. (1993), 23:403-411; Routledge y col., Eur. J. Immunol. (1991), 21:2717-2725; Staerz y col., Nature (1985), 314:628-631; y la patente de EE.UU. nº 5.968.509. Notablemente, estos fragmentos de anticuerpos monovalentes contienen secuencias de Fc funcionales que están incluidas debido a que sus funciones efectoras (tales como lisis mediada por complemento de linfocitos T) son necesarias para la función terapéutica. A diferencia de los escenarios descritos, parece que la materia no ha reconocido una necesidad o utilidad que incluya una región Fc en anticuerpos monovalentes que se usan y/o se han

desarrollado como agentes terapéuticos. La reticencia a incluir una región Fc en anticuerpos monovalentes en los que la región Fc no es necesaria para la función terapéutica se ha puesto de relieve por las dificultades prácticas para obtener tales anticuerpos. La tecnología de producción de anticuerpos existente no proporciona un procedimiento eficiente para obtener en altas cantidades y en forma suficientemente purificada heterodímeros que comprendan un único componente de unión a antígeno (es decir, monovalencia) y una región Fc.

[0006] Notablemente, se han hecho algunos esfuerzos para aumentar la estabilidad *in vivo* de fragmentos de anticuerpos con grados variables de éxito. Por ejemplo, un fragmento Fab puede unirse a restos de estabilidad tales como polietilenglicol u otras moléculas estabilizantes tales como péptidos heterólogos. Véanse, por ejemplo, Dennis y col., J. Biol. Chem. (2002), 277:35035-35043; publicación PCT nº WO01/45746.

[0007] En vista de lo anterior, existe una necesidad significativa de formas de anticuerpo mejoradas y procedimientos de producción y uso de tales anticuerpos, por ejemplo, como agentes terapéuticos o profilácticos. La invención descrita en este documento trata esta necesidad y proporciona otros beneficios.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

[0008] La invención proporciona una forma de anticuerpo que proporciona diversas ventajas con respecto a la utilidad terapéutica, funcionalidad y procedimientos de producción del mismo. La invención proporciona un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a c-met según la reivindicación adjunta 1. En un aspecto, un anticuerpo de la invención proporciona una característica monovalente que es esencial para ciertas respuestas no inmunitarias basadas en esquemas terapéuticos. Por ejemplo, en afecciones patológicas que requieren una función antagonista, y cuando la bivalencia de un anticuerpo produce un efecto agonista no deseable, el rasgo monovalente de un anticuerpo de la invención produce y/o garantiza una función antagonista tras la unión del anticuerpo a una molécula diana. Además, un anticuerpo de la invención se caracteriza por atributos farmacocinéticos superiores (tales como una semivida potenciada y/o tasa de eliminación reducida *in vivo*) en comparación con formas de Fab que tienen características de unión a antígeno similares/sustancialmente idénticas, venciéndose así un inconveniente importante en el uso de anticuerpos monovalentes Fab convencionales. En un aspecto, un anticuerpo de la invención comprende de poca a ninguna función efectora inmunitaria, un rasgo que es particularmente útil en el tratamiento de afecciones patológicas en las que una respuesta efectora inmunitaria es perjudicial. En otro aspecto, un anticuerpo de la invención se caracteriza por alteraciones que mejoran enormemente el rendimiento de producción. Además, a diferencia de ciertos procedimientos convencionales para producir fragmentos de anticuerpos monovalentes (por ejemplo, digestión enzimática, seguida en algunos casos de acoplamientos químicos), la naturaleza recombinante de los procedimientos de producción de la invención hace posible obtener poblaciones de anticuerpos que son de un grado suficientemente alto de homogeneidad y/o pureza útiles para el desarrollo y/o la comercialización como agentes terapéuticos.

[0009] Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona un fragmento de anticuerpo monovalente que comprende un único brazo de unión a molécula diana y una región Fc (es decir, un complejo de polipéptidos de Fc) en el que el fragmento de anticuerpo monovalente es más estable *in vivo* que un fragmento de anticuerpo homólogo que carece de dicha región Fc. En un aspecto, la invención proporciona un fragmento de anticuerpo que comprende un único brazo de unión a antígeno y una región Fc que aumenta la estabilidad del fragmento de anticuerpo (es decir, es más estable, por ejemplo, presenta una semivida *in vivo* prolongada) en comparación con una molécula de Fab que comprende dicho brazo de unión a antígeno, en el que dicha región Fc comprende un complejo de un primer y un segundo polipéptido de Fc, en el que uno, pero no ambos de los polipéptidos de Fc, es una cadena pesada truncada del extremo N. En una realización, una cadena pesada truncada del extremo N consiste o consiste esencialmente en una secuencia bisagra contiguamente ligada a al menos una parte de un dominio CH2 y/o CH3 de la cadena pesada suficiente para formar un complejo con el primer polipéptido de Fc y conferir dicho aumento de estabilidad. En una realización, una cadena pesada truncada del extremo N consiste o consiste esencialmente de una secuencia bisagra contiguamente ligada a un dominio CH2 y/o CH3 de la cadena pesada que puede formar un complejo con el primer polipéptido de Fc y conferir dicho aumento de estabilidad. En una realización, la secuencia del extremo N de la cadena pesada truncada del extremo N es parte de o toda una secuencia bisagra (es decir, la cadena pesada truncada comprende un extremo N que comprende o es parte de o toda una secuencia bisagra). En una realización, la cadena pesada truncada del extremo N es de una cadena pesada de IgG. En una realización, la región Fc puede unirse a FcRn. En una realización, la región Fc no posee una función efectora inmunitaria distinta de la unión a FcRn. Generalmente y preferentemente, la cadena pesada truncada del extremo N no se une específicamente a un antígeno.

[0010] Como se describe en este documento, un fragmento de anticuerpo de la invención se caracteriza por estabilidad significativamente potenciada en comparación con su homólogo del fragmento Fab. En algunas realizaciones, un fragmento de anticuerpo de la invención presenta al menos aproximadamente 2X, al menos aproximadamente 5X, al menos aproximadamente 10X, al menos aproximadamente 25X, al menos aproximadamente 50X, al menos aproximadamente 100X, al menos aproximadamente 200X, al menos aproximadamente 300X, al menos aproximadamente 350X, al menos aproximadamente 400X, al menos

aproximadamente 450X, al menos aproximadamente 500X la semivida *in vivo* de su homólogo del fragmento Fab. La semivida *in vivo* puede medirse por cualquiera de una variedad de procedimientos conocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen en este documento. En una realización, la semivida *in vivo* se mide administrando a un mamífero adecuado (tal como ratón) una cantidad de un anticuerpo y midiendo la tasa de disminución en la cantidad de anticuerpo administrada en el mamífero.

[0011] Las funciones efectoras inmunitarias son innecesarias o incluso perjudiciales en ciertos parámetros clínicos. En algunas realizaciones, un anticuerpo de la invención está aglicosilado. Tales anticuerpos no presentan funciones efectoras inmunitarias sustanciales que dependan de la glicosilación de la región Fc. Generalmente y preferentemente, un anticuerpo aglicosilado de la invención no presenta funciones efectoras inmunitarias sustanciales, excepto para unirse a FcRn. En algunas realizaciones, un fragmento de anticuerpo de la invención no posee funciones efectoras sustancialmente o completamente ausentes distintas de la unión a FcRn. En una realización, dicha función efectora es lisis del complemento. En una realización, dicha función efectora es citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). En una realización, el fragmento de anticuerpo se une a FcRn. Los anticuerpos aglicosilados pueden producirse mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Un procedimiento conveniente comprende expresar el anticuerpo en una célula huésped procariota tal como *E. coli.*

[0012] En una realización, un fragmento de anticuerpo de la invención está glicosilado. La glicosilación puede lograrse mediante procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, produciendo el anticuerpo en una célula huésped de mamífero tal como célula de ovario de hámster chino (CHO).

[0013] El fragmento de anticuerpo de la invención no elige como diana un componente de la respuesta inmunitaria y, por tanto, su mecanismo de acción terapéutica no comprende la regulación y/o compromiso de una respuesta inmunitaria. Por ejemplo, en una realización, un fragmento de anticuerpo de la invención tiene de poca a ninguna propiedad inmunosupresora. Por ejemplo, dichas propiedades inmunosupresoras pueden comprender la capacidad para efectuar directamente o indirectamente el agotamiento de linfocitos T. El fragmento de anticuerpo no se une específicamente al antígeno de la superficie de linfocitos T, que en algunas realizaciones es CD3 o CD4.

[0014] El fragmento de anticuerpo no se une específicamente a un polipéptido de inmunoglobulina, por ejemplo, no se une específicamente a determinantes constantes sobre la cadena lambda de inmunoglobulinas de superficie o determinantes idiotípicos sobre inmunoglobulinas de superficie.

[0015] Un fragmento de anticuerpo de la invención puede unirse específicamente a la molécula diana de interés que es c-met. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un fragmento de anticuerpo se une específicamente a un antígeno de tumor. El fragmento de anticuerpo se une específicamente a un receptor de la superficie celular que se activa tras la multimerización del receptor (por ejemplo, dimerización). En algunas realizaciones, la unión de un anticuerpo de la invención a una molécula diana inhibe la unión de otra molécula (tal como un ligando, en el que la molécula diana es un receptor) a dicha molécula diana. Por tanto, en un ejemplo, un fragmento de anticuerpo de la invención, cuando se une a una molécula diana, inhibe la unión de un componente de unión relacionado a la molécula diana. Un componente de unión relacionado puede ser un ligando, o una molécula hetero u homodimerizante. En una realización, un fragmento de anticuerpo de la invención, cuando se une a una molécula diana, inhibe la multimerización de moléculas diana. Por ejemplo, en algunas realizaciones en las que un fragmento de anticuerpo de la invención es un antagonista, la unión del fragmento de anticuerpo a un receptor de la superficie celular puede inhibir la dimerización del receptor con otra unidad del receptor, por lo que la activación del receptor se inhibe (debido al menos en parte a una falta de dimerización del receptor). Numerosas moléculas de receptor se conocen en la técnica por poder y/o requerir la dimerización (tanto homo- como heterodimerización) para efectuar sus funciones normales. Tales receptores incluyen receptor tirosina cinasas tales como receptores del factor de crecimiento de fibroblastos y el receptor de HGF, c-met. Otras interacciones proteína-proteína incluyen interacciones receptor-ligando tales como VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) que se une a flt, flk, etc., y factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) que se une a c-met. En una realización, un fragmento de anticuerpo de la invención puede competir con HGF para unirse a c-met.

[0016] En un aspecto, la invención proporciona un fragmento de anticuerpo que es un antagonista en la forma de un único brazo (como se describe en este documento), pero es un agonista o tiene actividad de agonista en una forma de dos brazos (es decir, en la que los dos brazos tiene la misma capacidad de unión a antígeno).

[0017] En un aspecto, la invención proporciona un fragmento de anticuerpo que comprende: (i) un primer polipéptido que comprende un dominio variable de la cadena ligera (y en algunas realizaciones que comprende además un dominio constante de la cadena ligera), (ii) un segundo polipéptido que comprende un dominio variable de la cadena pesada, una primera secuencias de polipéptidos de Fc (y en algunas realizaciones que comprende además una secuencia del dominio constante de la cadena pesada de no Fc), y (iii) un tercer polipéptido que comprende una segunda secuencia de polipéptidos de Fc. Generalmente, el segundo polipéptido es un único polipéptido que comprende un dominio variable de la cadena pesada, dominio constante de la cadena pesada (por

ejemplo, todo o parte de CH1) y el primer polipéptido de Fc. Por ejemplo, la primera secuencia de polipéptidos de Fc está generalmente ligada al dominio constante de la cadena pesada por un enlace peptídico (es decir, no un enlace de no peptidilo]. En una realización, el primer polipéptido comprende un dominio variable de la cadena ligera no humana fusionado con un dominio constante de la cadena ligera humana. En una realización, el segundo polipéptido comprende un dominio variable de la cadena pesada no humano fusionado con un dominio constante de la cadena pesada humano. En una realización, el tercer polipéptido comprende una cadena pesada truncada del extremo N que comprende al menos una parte de una secuencia bisagra en su extremo N. En una realización, el tercer polipéptido comprende una cadena pesada truncada del extremo N que no comprende una secuencia bisagra funcional o natural en su extremo N. En algunas realizaciones, los dos polipéptidos de Fc de un fragmento de anticuerpo de la invención están covalentemente unidos. Por ejemplo, los dos polipéptidos de Fc pueden unirse mediante enlaces disulfuro intermoleculares, por ejemplo, mediante enlaces disulfuro intermoleculares entre residuos de cisteína de la región bisagra.

[0018] En un aspecto, la invención proporciona una composición que comprende una población de inmunoglobulinas en la que al menos (o al menos aproximadamente) el 50%, 75%. 85%, 90%, 95% de las inmunoglobulinas son fragmentos de anticuerpos de la invención. Una composición que comprende dicha población de inmunoglobulinas puede estar en cualquiera de una variedad de formas que incluyen, pero no se limitan a, lisado de células huésped, medio de cultivo celular, pasta de células huésped o formas semipurificadas o purificadas de los mismos. Los procedimientos de purificación son muy conocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen en este documento.

[0019] En un aspecto, la invención proporciona un fragmento de anticuerpo que comprende al menos una característica que promueve la heterodimerización, a la vez que minimiza la homodimerización, de las secuencias de Fc dentro del fragmento de anticuerpo. Tal(es) característica(s) mejora(n) el rendimiento y/o pureza y/u homogeneidad de las poblaciones de inmunoglobulina obtenibles mediante procedimientos de la invención como se describen en este documento. En una realización, un primer polipéptido de Fc y un segundo polipéptido de Fc se encuentran/interactúan en una superficie de separación. En algunas realizaciones en las que el primer y segundo polipéptidos de Fc se encuentran en una superficie de separación, la superficie de separación del segundo polipéptido de Fc (secuencia) comprende una protuberancia que es posicionable en una cavidad en la superficie de separación del primer polipéptido de Fc (secuencia). En una realización, el primer polipéptido de Fc ha sido alterado a partir de un polipéptido molde/original para codificar la cavidad o el segundo polipéptido de Fc ha sido alterado a partir de un polipéptido molde/original para codificar la protuberancia, o ambos. En una realización, el primer polipéptido de Fc ha sido alterado a partir de un polipéptido molde/original para codificar la cavidad y el segundo polipéptido de Fc ha sido alterado a partir de un polipéptido molde/original para codificar la protuberancia. En una realización, la superficie de separación del segundo polipéptido de Fc comprende una protuberancia que es posicionable en una cavidad en la superficie de separación del primer polipéptido de Fc, en la que la cavidad o la protuberancia, o ambas, se han introducido en la superficie de separación del primer y segundo polipéptidos de Fc, respectivamente. En algunas realizaciones en las que el primer y segundo polipéptidos de Fc se encuentran en una superficie de separación, la superficie de separación del primer polipéptido de Fc (secuencia) comprende una protuberancia que es posicionable en una cavidad en la superficie de separación del segundo polipéptido de Fc (secuencia). En una realización, el segundo polipéptido de Fc ha sido alterado a partir de un polipéptido molde/original para codificar la cavidad o el primer polipéptido de Fc ha sido alterado a partir de un polipéptido molde/original para codificar la protuberancia, o ambos. En una realización, el segundo polipéptido de Fc ha sido alterado a partir de un polipéptido molde/original para codificar la cavidad y el primer polipéptido de Fc ha sido alterado a partir de un polipéptido molde/original para codificar la protuberancia. En una realización, la superficie de separación del primer polipéptido de Fc comprende una protuberancia que es posicionable en una cavidad en la superficie de separación del segundo polipéptido de Fc, en la que la protuberancia o cavidad, o ambas, se han introducido en la superficie de separación del primer y segundo polipéptidos de Fc, respectivamente.

[0020] En una realización, la protuberancia y la cavidad comprenden cada una un residuo de aminoácido natural. En una realización, el polipéptido de Fc que comprende la protuberancia se genera reemplazando un residuo original de la superficie de separación de un polipéptido molde/original con un residuo de importación que tiene un volumen de cadena lateral mayor que el residuo original. En una realización, el polipéptido de Fc que comprende la protuberancia se genera mediante un procedimiento que comprende una etapa en la que el ácido nucleico que codifica un residuo original de la superficie de separación de dicho polipéptido se reemplaza con ácido nucleico que codifica un residuo de importación que tiene un volumen de cadena lateral mayor que el original. En una realización, el residuo original es treonina. En una realización, el residuo original es T366. En una realización, el residuo de importación es arginina (R). En una realización, el residuo de importación es fenilalanina (F). En una realización, el residuo de importación es tirosina (Y). En una realización, el residuo de importación es triptófano (W). En una realización, el residuo de importación es R, F, Y o W. En una realización, una protuberancia se genera reemplazando dos o más residuos en un polipéptido molde/original. En una realización, el polipéptido de Fc que comprende una protuberancia comprende la sustitución de treonina en la posición 366 con triptófano, numeración de aminoácidos según el esquema de numeración de EU de Kabat y col. (pág. 688-696 en Sequences of proteins of immunological interest, 5ª ed., vol. 1 (1991; NIH, Bethesda, MD)).

[0021] En algunas realizaciones, el polipéptido de Fc que comprende una cavidad se genera reemplazando un residuo original en la superficie de separación de un polipéptido molde/original con un residuo de importación que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño que el residuo original. Por ejemplo, el polipéptido de Fc que comprende la cavidad puede generarse mediante un procedimiento que comprende una etapa en la que el ácido nucleico que codifica un residuo original de la superficie de separación de dicho polipéptido se reemplaza con ácido nucleico que codifica un residuo de importación que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño que el original. En una realización, el residuo original es treonina. En una realización, el residuo original es leucina. En una realización, el residuo original es tirosina. En una realización, el residuo de importación es no cisteína (C). En una realización, el residuo de importación es alanina (A). En una realización, el residuo de importación es serina (S). En una realización, el residuo de importación es treonina (T). En una realización, el residuo de importación es valina (V). Una cavidad puede generarse reemplazando uno o más residuos originales de un polipéptido molde/original. Por ejemplo, en una realización, el polipéptido de Fc que comprende una cavidad comprende la sustitución de dos o más aminoácidos originales seleccionados del grupo que consiste en treonina, leucina y tirosina. En una realización, el polipéptido de Fc que comprende una cavidad comprende dos o más residuos de importación seleccionados del grupo que consiste en alanina, serina, treonina y valina. En algunas realizaciones, el polipéptido de Fc que comprende una cavidad comprende la sustitución de dos o más aminoácidos originales seleccionados del grupo que consiste en treonina, leucina y tirosina, y en el que dichos aminoácidos originales se reemplazan con residuos de importación seleccionados del grupo que consiste en alanina, serina, treonina y valina. En algunas realizaciones, un aminoácido original que está reemplazado es T366, L368 y/o Y407. En una realización, el polipéptido de Fc que comprende una cavidad comprende la sustitución de treonina en la posición 366 con serina, numeración de aminoácidos según el esquema de numeración de EU de Kabat y col., arriba. En una realización, el polipéptido de Fc que comprende una cavidad comprende la sustitución de leucina en la posición 368 con alanina, numeración de aminoácidos según el esquema de numeración de EU de Kabat y col., arriba. En una realización, el polipéptido de Fc que comprende una cavidad comprende la sustitución de tirosina en la posición 407 con valina, numeración de aminoácidos según el esquema de numeración de EU de Kabat y col., arriba. En una realización, el polipéptido de Fc que comprende una cavidad comprende dos o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en T366S, L368A y Y407V, numeración de aminoácidos según el esquema de numeración de EU de Kabat y col., arriba. En algunas realizaciones de estos fragmentos de anticuerpos, el polipéptido de Fc que comprende la protuberancia comprende la sustitución de treonina en la posición 366 con triptófano, numeración de aminoácidos según el esquema de numeración de EU de Kabat y col., arriba.

[0022] En un aspecto, un fragmento de anticuerpo de la invención comprende una región Fc cuya presencia es requerida para aumentar la estabilidad del fragmento de anticuerpo con respecto a un fragmento Fab que comprende el mismo brazo de unión a antígeno (secuencias). Dicha región Fc se forma mediante el complejamiento (multimerización) de secuencias de polipéptidos de Fc separadas. Dichas secuencias de polipéptidos de Fc separadas pueden o pueden no contener las mismas secuencias y/o dominios, siempre que puedan dimerizarse para formar una región Fc (como se define en este documento). Un primer polipéptido de Fc está generalmente contiguamente ligado a uno o más dominios de una cadena pesada de la inmunoglobulina en un único polipéptido, por ejemplo, con secuencias de dominios bisagra, constantes y/o variables. En una realización, el primer polipéptido de Fc comprende al menos una parte de una secuencia bisagra, al menos una parte de un dominio CH2 y/o al menos una parte de un dominio CH3. En una realización, el primer polipéptido de Fc comprende la secuencia bisagra y los dominios CH2 y CH3 de una inmunoglobulina. En una realización, el segundo polipéptido de Fc (es decir, el polipéptido de Fc que es parte de una cadena pesada truncada del extremo N) comprende al menos una parte de una secuencia bisagra, al menos una parte de un dominio CH2 y/o al menos una parte de un dominio CH3. En una realización, el segundo polipéptido de Fc comprende la secuencia bisagra y los dominios CH2 y CH3 de una inmunoglobulina. En una realización, un fragmento de anticuerpo de la invención comprende el primer y segundo polipéptidos de Fc cada uno de los cuales comprende al menos una parte de al menos un dominio constante de anticuerpo. En una realización, el dominio constante de anticuerpo es un dominio CH2 y/o CH3. En cualquiera de las realizaciones de un fragmento de anticuerpo de la invención que comprende un dominio constante, el dominio constante de anticuerpo puede ser de cualquier clase de inmunoglobulina, por ejemplo, una IgG. La fuente de inmunoglobulina puede ser de cualquier especie adecuada de origen (por ejemplo, una IgG puede ser IgG_1 humana) o de forma sintética.

[0023] Un anticuerpo de la invención comprende un único brazo de unión a antígeno. La unión a un único antígeno puede implicar la unión a una o más dianas de unión (por ejemplo, determinantes/epítopes). En una realización, un anticuerpo de la invención es monoespecífico. En otra realización, un anticuerpo de la invención es una inmunoadhesina, que en una realización es monoespecífica.

[0024] Un fragmento de anticuerpo de la invención puede conjugarse con un resto heterólogo. Cualquier resto heterólogo sería adecuado mientras que su conjugación con el anticuerpo no reduzca sustancialmente una función y/o característica deseada del anticuerpo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un inmunoconjugado comprende un resto heterólogo que es un agente citotóxico. En algunas realizaciones, dicho agente citotóxico se selecciona del grupo que consiste en un isótopo radiactivo, un agente quimioterapéutico y una toxina. En algunas realizaciones, dicha toxina se selecciona del grupo que consiste en caliqueamicina, maitansina y tricoteno. En algunas

realizaciones, un inmunoconjugado comprende un resto heterólogo que es un marcador detectable. En algunas realizaciones, dicho marcador detectable se selecciona del grupo que consiste en un isótopo radiactivo, un miembro de un par ligando-receptor, un miembro de un par enzima-sustrato y un miembro de un par de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia.

[0025] En una variedad de entornos es altamente deseable obtener una composición que comprenda una población altamente homogénea de fragmentos de anticuerpos de la invención. Esto pueden lograrse mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los polipéptidos que representan un fragmento de anticuerpo de la invención se expresan generalmente recombinantemente (a diferencia de, por ejemplo, la digestión enzimática de inmunoglobulinas de longitud completa). En algunas realizaciones, una composición de la invención comprende fragmentos de anticuerpos que son sustancialmente homogéneos con respecto al extremo N del brazo de unión y/o extremo C de la región Fc. Una composición es “sustancialmente homogénea” si al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98% de los fragmentos de anticuerpos de la invención contenidos en su interior tienen el mismo residuo de aminoácido en el extremo N del brazo de unión y/o extremo C de la región Fc. Dicha composición puede ser formas sin purificar, semipurificadas o purificadas de una composición fuente en la que se generan inicialmente los fragmentos de anticuerpos.

[0026] En un aspecto, la invención proporciona composiciones que comprenden un fragmento de anticuerpo de la invención y un vehículo, que en una realización es un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización, el fragmento de anticuerpo está conjugado con un resto heterólogo.

[0027] En otro aspecto, la invención proporciona artículos de fabricación que comprenden un recipiente y una composición contenida en su interior, en los que la composición comprende un fragmento de anticuerpo de la invención. En algunas realizaciones, estos artículos de fabricación comprenden además instrucción para usar dicha composición. En una realización, el fragmento de anticuerpo se proporciona en una cantidad terapéuticamente eficaz.

[0028] En otro aspecto más, la invención proporciona polinucleótidos que codifican un fragmento de anticuerpo de la invención. Los componentes de un fragmento de anticuerpo de la invención pueden codificarse por un único polinucleótido o (múltiples) polinucleótidos separados. En una realización, un único polinucleótido codifica (a) los componentes de la cadena ligera y pesada del brazo de unión a antígeno, y (b) el polipéptido de la cadena pesada truncada del extremo N. En una realización, un único polinucleótido codifica los componentes de la cadena ligera y pesada del brazo de unión a antígeno, y un polinucleótido separado codifica el polipéptido de la cadena pesada truncada del extremo N. En una realización, polinucleótidos separados codifican el componente de la cadena ligera del brazo de unión a antígeno, el componente de la cadena pesada del brazo de unión a antígeno y el polipéptido de la cadena pesada truncada del extremo N, respectivamente.

[0029] En un aspecto, la invención proporciona vectores recombinantes para expresar un anticuerpo de la invención.

[0030] En un aspecto, la invención proporciona células huésped que comprenden un polinucleótido o vector recombinante de la invención. En una realización, la célula huésped es una célula procariota, por ejemplo, *E. coli*. En una realización, una célula huésped es una célula eucariota, por ejemplo, una célula de mamífero tal como célula de ovario de hámster chino (CHO).

[0031] En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento de generación de un fragmento de anticuerpo de la invención, comprendiendo dicho procedimiento expresar en una célula huésped adecuada (por ejemplo, *E. coli* o CHO) ácido nucleico que codifica el fragmento de anticuerpo en condiciones que permitan la heteromultimerización que produce la formación del fragmento de anticuerpo. En una realización, al menos el 50%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95% de los polipéptidos de inmunoglobulina generados en el cultivo de células huésped son un fragmento de anticuerpo de la invención. En una realización, el fragmento de anticuerpo generado mediante un procedimiento de la invención comprende una protuberancia en un polipéptido de Fc y una cavidad en otro polipéptido de Fc como se describen en este documento. En una realización, la invención proporciona un procedimiento que comprende expresar tres polinucleótidos en una célula huésped, en el que un primer polinucleótido codifica un primer componente de un brazo de unión a antígeno (por ejemplo, secuencia(s) de CDR de la cadena pesada o dominio variable (y que en algunos ejemplos comprende además una secuencia del dominio constante de la cadena pesada de no Fc)) y un primer polipéptido de Fc, un segundo polinucleótido codifica un segundo componente del brazo de unión a antígeno (por ejemplo, secuencia(s) de CDR de la cadena ligera o dominio variable (y que en algunos ejemplos comprende además un dominio constante de la cadena ligera)) y un tercer polinucleótido codifica una cadena pesada truncada del extremo N que comprende un segundo polipéptido de Fc, en el que el fragmento de anticuerpo del brazo de la invención se forma por heteromultimerización de estos polipéptidos. En una realización, el procedimiento comprende introducir dichos polinucleótidos en una célula huésped adecuada. En una realización, el procedimiento comprende recuperar el fragmento de anticuerpo de la invención del cultivo celular, por ejemplo, de lisados celulares o medio de cultivo.

[0032] En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento que comprende expresar en célula huésped adecuada ácido nucleico que codifica componentes de un fragmento de anticuerpo de la invención, en el que cada cistrón que codifica un componente comprende una región de iniciación de la traducción (TIR) operativamente ligada a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica dicho componente, y en el que la fuerza de cada TIR se ajusta para obtener una relación adecuada de niveles de expresión de los componentes, por lo que se genera una cantidad deseada de dicho fragmento de anticuerpo. En una realización, las TIR son de fuerza aproximadamente igual. En una realización, la TIR relativa es 1, por ejemplo, según Simmons & Yansura, Nature Biotechnol. (1996), 14:629-634 y Simmons y col., J. Immunol. Methods (2002), 263:133-147. En algunas realizaciones, la TIR comprende una secuencia señal de secreción procariota o variante de la misma. En algunas realizaciones, la secuencia señal de secreción procariota se selecciona del grupo que consiste en las secuencias señal de secreción STII, OmpA, PhoE, LamB, MBP y PhoA.

[0033] Los anticuerpos de la invención encuentran una variedad de usos en una variedad de entornos. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención es generalmente un anticuerpo terapéutico. Un anticuerpo de la invención puede ejercer su efecto terapéutico por cualquiera de una variedad de mecanismos. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede ser un anticuerpo agonista. En otro ejemplo, un anticuerpo de la invención puede ser un anticuerpo antagonista. En otro ejemplo más, un anticuerpo de la invención puede ser un anticuerpo bloqueante. En otro ejemplo, un anticuerpo de la invención es un anticuerpo neutralizante.

[0034] En un aspecto, la invención proporciona procedimientos para tratar o retardar la progresión de una enfermedad que comprende administrar a un sujeto que tiene la enfermedad una cantidad eficaz de un fragmento de anticuerpo de la invención eficaz en el tratamiento de o el retardo de la progresión de la enfermedad. En una realización, la enfermedad es un tumor o cáncer. En una realización, la enfermedad es un trastorno inmunológico, por ejemplo, una enfermedad autoinmunitaria, por ejemplo, artritis reumatoide, púrpura trombocitopénica inmunitaria, lupus eritematoso sistémico, psoriasis, síndrome de Sjogren, diabetes mellitus dependiente de insulina, etc. En otra realización, la enfermedad está asociada a vascularización anormal (tal como angiogénesis). En otra realización más, la enfermedad está asociada a desregulación de la señalización de receptores de factores de crecimiento. En un ejemplo, dicha señalización de receptores de factores de crecimiento está asociada a una tirosina cinasa. En un ejemplo, dicha señalización de receptores de factores de crecimiento está asociada al eje HGF-c-met.

[0035] Un anticuerpo de la invención es adecuado para tratar o prevenir distintas afecciones patológicas resultantes de distintas anomalías celulares, genéticas y/o bioquímicas. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención es particularmente adecuado para tratar y/o prevenir afecciones patológicas asociadas a anomalías dentro de la ruta de señalización HGF/c-met. En una realización, un anticuerpo de la invención es un antagonista de c-met. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, por ejemplo, un anticuerpo que comprende secuencias de unión a antígeno de un donante no humano injertado en una secuencia no humana, humana o humanizada heteróloga (por ejemplo, secuencias de la región estructural y/o dominio constante). En una realización, el donante no humano es un ratón. En una realización, un secuencia de unión a antígeno es sintética, por ejemplo, obtenida por mutagénesis (por ejemplo, cribado por expresión en fago, etc.). En una realización, un anticuerpo quimérico de la invención tiene regiones V murinas y región C humana. En una realización, la región V de la cadena ligera murina está fusionada con una cadena ligera kappa humana. En una realización, la región V de la cadena pesada murina está fusionada con una región C de IgG1 humana. En una realización, las secuencias de unión a antígeno comprenden al menos una, al menos dos o las tres CDR de una cadena ligera y/o pesada. En una realización, las secuencias de unión a antígeno comprenden una CDR3 de la cadena pesada. En una realización, las secuencias de unión a antígeno comprenden parte o toda las secuencias de CDR y/o del dominio variable del anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada en la Colección americana de cultivos tipo número de acceso ATCC HB-11894 (hibridoma 1A3.3.13) o HB-11895 (hibridoma 5D5.11.6). En una realización, las secuencias de unión a antígeno comprenden al menos CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma 1A3.3.13 ó 5D5.11.6. Los anticuerpos humanizados de la invención incluyen aquellos que tienen sustituciones de aminoácidos en la FR y variantes de maduración por afinidad con cambios en las CDR injertadas. Los aminoácidos sustituidos en CDR o FR no se limitan a aquellos presentes en el anticuerpo donante o receptor. En otras realizaciones, los anticuerpos de la invención comprenden además cambios en residuos de aminoácidos en la región Fc que conducen a mejorar la función efectora que incluye potenciación de la función de CDC y/o ADCC y destrucción de linfocitos B. Otros anticuerpos de la invención incluyen aquellos que tienen cambios específicos que mejoran la estabilidad. Los anticuerpos de la invención también incluyen variantes deficientes en fucosa que tienen función de ADCC mejorada *in vivo*.

[0036] En una realización, un fragmento de anticuerpo de la invención comprende un brazo de unión a antígeno que comprende una cadena pesada que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de CDR seleccionadas del grupo que consiste en SYWLH (SEQ ID NO: 1), MIDPSNSDTRFNPNFKD (SEQ ID NO: 2) y YGSYVSPLDY (SEQ ID NO: 3). En una realización, el brazo de unión a antígeno comprende CDR-H1 de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos SYWLH. En una realización, el brazo de unión a antígeno comprende la CDR-H2 de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos MIDPSNSDTRFNPNFKD. En una realización, el brazo de unión a antígeno comprende la CDR-H3 de la cadena pesada que tiene la secuencia de

aminoácidos YGSYVSPLDY. En una realización, un fragmento de anticuerpo de la invención comprende un brazo de unión a antígeno que comprende una cadena ligera que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de CDR seleccionadas del grupo que consiste en KSSQSLLYTSSQKNYLA (SEQ ID NO: 4), WASTRES (SEQ ID NO: 5) y QQYYAYPWT (SEQ ID NO: 6). En una realización, el brazo de unión a antígeno comprende la CDR-L1 de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos KSSQSLLYTSSQKNYLA. En una realización, el brazo de unión a antígeno comprende la CDR-L2 de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos WASTRES. En una realización, el brazo de unión a antígeno comprende la CDR-L3 de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos QQYYAYPWT. En una realización, un fragmento de anticuerpo de la invención comprende un brazo de unión a antígeno que comprende una cadena pesada que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de CDR seleccionadas del grupo que consiste en SYWLH (SEQ ID NO: 1), MIDPSNSDTRFNPNFKD (SEQ ID NO: 2) y YGSYVSPLDY (SEQ ID NO: 3) y una cadena ligera que comprende al menos una, al menos dos o las tres de las secuencias de CDR seleccionadas del grupo que consiste en KSSQSLLYTSSQKNYLA (SEQ ID NO: 4), WASTRES (SEQ ID NO: 5) y QQYYAYPWT (SEQ ID NO: 6).

[0037] La invención proporciona un anticuerpo humanizado que se une a c-met humano, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo es eficaz para inhibir actividad de HGF/c-met *in vivo*, comprendiendo el anticuerpo en la región variable de la cadena H (V_H) al menos una secuencia de CDR3 del anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada en la Colección americana de cultivos tipo número de acceso ATCC HB-11894 (hibridoma 1A3.3.13) o HB-11895 (hibridoma 5D5.11.6) y sustancialmente una secuencia consenso humana (por ejemplo, sustancialmente los residuos de la región estructural (FR) consenso humana del subgrupo III de la cadena pesada humana (V_HIII)). En una realización, el anticuerpo comprende además la secuencia de CDR1 de la cadena H y/o la secuencia de CDR2 del anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada en la Colección americana de cultivos tipo número de acceso ATCC HB-11894 (hibridoma 1A3.3.13) o HB-11895 (hibridoma 5D5.11.6). En otra realización, el anticuerpo precedente comprende la secuencia de CDR1, secuencia de CDR2 y/o secuencia de CDR3 de la cadena L del anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma depositada en la Colección americana de cultivos tipo número de acceso ATCC HB-11894 (hibridoma 1A3.3.13) o HB-11895 (hibridoma 5D5.11.6) con sustancialmente los residuos de la región estructural (FR) consenso humana del subgrupo I de la cadena ligera κ humana (VκI).

[0038] En una realización, un fragmento de anticuerpo de la invención comprende un brazo de unión a antígeno que comprende un dominio variable de la cadena pesada que tiene la secuencia:

QVQLQQSGPELVRPGASVKMSCRASGYTFTSYWLHWVKQRPGQGLE WIGMIDPSNSDTRFNPNFKDKATLNVDRSSNTAYMLLSSLTSADSAVY YCATYGSYVSPLDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO:7)

[0039] En una realización, un fragmento de anticuerpo de la invención comprende un brazo de unión a antígeno que comprende un dominio variable de la cadena ligera que tiene la secuencia:

DIMMSQSPSSLTVSVGEKVTVSCKSSQSLLYTSSQKNYLAWYQQKPGQ SPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTITSVKADDLAVYYCQQY YAYPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:8)

[0040] En un aspecto, la invención proporciona el uso de un fragmento de anticuerpo de la invención (por ejemplo, un fragmento del anticuerpo antagonista de c-met de la invención) en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad tal como un cáncer, un tumor, un trastorno de células proliferativas, un trastorno inmunitario (tal como autoinmunitario) y/o un trastorno relacionado con la angiogénesis.

[0041] En un aspecto, la invención proporciona el uso de un ácido nucleico de la invención (por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un fragmento del anticuerpo antagonista de c-met de la invención) en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad tal como un cáncer, un tumor, un trastorno de células proliferativas, un trastorno inmunitario (tal como autoinmunitario) y/o un trastorno relacionado con la angiogénesis.

[0042] En un aspecto, la invención proporciona el uso de un vector de expresión de la invención (por ejemplo, un vector que codifica un fragmento del anticuerpo antagonista de c-met de la invención) en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad tal como un cáncer, un tumor, un trastorno de células proliferativas, un trastorno inmunitario (tal como autoinmunitario) y/o un trastorno relacionado con la angiogénesis.

[0043] En un aspecto, la invención proporciona el uso de una célula huésped de la invención (por ejemplo,

una célula huésped que comprende un vector que codifica un fragmento del anticuerpo antagonista de c-met de la invención) en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad tal como un cáncer, un tumor, un trastorno de células proliferativas, un trastorno inmunitario (tal como autoinmunitario) y/o un trastorno relacionado con la angiogénesis.

[0044] En un aspecto, la invención proporciona el uso de un artículo de fabricación de la invención (por ejemplo, un artículo de fabricación que comprende un fragmento del anticuerpo antagonista de c-met de la invención y/o un ácido nucleico que codifica un fragmento del anticuerpo antagonista de c-met de la invención) en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad tal como un cáncer, un tumor, un trastorno de células proliferativas, un trastorno inmunitario (tal como autoinmunitario) y/o un trastorno relacionado con la angiogénesis.

[0045] En un aspecto, la invención proporciona el uso de un kit de la invención (por ejemplo, un kit que comprende un fragmento del anticuerpo antagonista de c-met de la invención y/o un ácido nucleico que codifica un fragmento del anticuerpo antagonista de c-met de la invención) en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad tal como un cáncer, un tumor, un trastorno de células proliferativas, un trastorno inmunitario (tal como autoinmunitario) y/o un trastorno relacionado con la angiogénesis.

[0046] En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para inhibir la proliferación celular activada por c-met, comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto una célula o tejido con una cantidad eficaz de un fragmento del anticuerpo antagonista de c-met de la invención, por lo que se inhibe la proliferación celular asociada a activación de c-met.

[0047] En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para tratar una afección patológica asociada a desregulación de la activación de c-met en un sujeto, comprendiendo dicho procedimiento administrar al sujeto una cantidad eficaz de un fragmento del anticuerpo antagonista de c-met de la invención, por lo que dicha afección se trata.

[0048] En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para inhibir el crecimiento de una célula que expresa c-met o factor de crecimiento de hepatocitos, o ambos, comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto dicha célula con un fragmento del anticuerpo antagonista de c-met de la invención, provocando así una inhibición del crecimiento de dicha célula. En una realización, la célula se pone en contacto por HGF expresado por una célula diferente (por ejemplo, mediante un efecto paracrino).

[0049] En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento de tratar terapéuticamente un mamífero que tiene un tumor cancerígeno que comprende una célula que expresa c-met o factor de crecimiento de hepatocitos, o ambos, comprendiendo dicho procedimiento administrar a dicho mamífero una cantidad eficaz de un fragmento del anticuerpo antagonista de c-met de la invención, tratándose así eficazmente dicho mamífero. En una realización, la célula se pone en contacto por HGF expresado por una célula diferente (por ejemplo, mediante un efecto paracrino).

[0050] En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para tratar o prevenir un trastorno de células proliferativas asociado a un aumento de la expresión o actividad de c-met o crecimiento de hepatocitos, o ambos, comprendiendo dicho procedimiento administrar a un sujeto en necesidad de tal tratamiento una cantidad eficaz de un fragmento del anticuerpo antagonista de c-met de la invención, tratándose así eficazmente o previniéndose dicho trastorno de células proliferativas. En una realización, dicho trastorno proliferativo es cáncer.

[0051] En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para inhibir el crecimiento de una célula, en el que el crecimiento de dicha célula es al menos en parte dependiente de un efecto potenciador del crecimiento de c-met o factor de crecimiento de hepatocitos, o ambos, comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto dicha célula con una cantidad eficaz de un fragmento del anticuerpo antagonista de c-met de la invención, inhibiéndose así el crecimiento de dicha célula. En una realización, la célula se pone en contacto por HGF expresado por una célula diferente (por ejemplo, mediante un efecto paracrino).

[0052] En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento de tratar terapéuticamente un tumor en un mamífero, en el que el crecimiento de dicho tumor es al menos en parte dependiente de un efecto potenciador del crecimiento de c-met o factor de crecimiento de hepatocitos, o ambos, comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto dicha célula con una cantidad eficaz de un fragmento del anticuerpo antagonista de c-met de la invención, tratándose así eficazmente dicho tumor. En una realización, la célula se pone en contacto por HGF expresado por una célula diferente (por ejemplo, mediante un efecto paracrino).

[0053] Los procedimientos de la invención pueden usarse para afectar cualquier estado patológico adecuado, por ejemplo, células y/o tejidos asociados a desregulación de la ruta de señalización de HGF/c-met. En una realización, una célula que es elegida como diana en un procedimiento de la invención es una célula cancerosa. Por ejemplo, una célula cancerosa puede ser una seleccionada del grupo que consiste en una célula de cáncer de mama, una célula de cáncer colorrectal, una célula de cáncer de pulmón, una célula de carcinoma papilar (por

ejemplo, de la glándula tiroides), una célula de cáncer de colon, una célula de cáncer pancreático, una célula de cáncer de próstata, una célula de cáncer de ovario, una célula de cáncer de cuello uterino, una célula de cáncer del sistema nervioso central, una célula de sarcoma osteogénico, una célula de carcinoma renal, una célula de carcinoma hepatocelular, una célula de cáncer de vejiga, una célula de carcinoma gástrico, una célula de carcinoma escamoso de cabeza y cuello, una célula de melanoma, una célula de linfoma, una célula de mieloma (por ejemplo, mieloma múltiple), una célula de glioma/glioblastoma (por ejemplo, astrocitoma anaplásico, glioblastoma multiforme, oligodendroglioma anaplásico, oligodendroastrocitoma anaplásico) y una célula de leucemia. En una realización, una célula que es elegida como diana en un procedimiento de la invención es una célula hiperproliferativa y/o hiperplásica. En una realización, una célula que es elegida como diana en un procedimiento de la invención es una célula desplásica. En otra realización más, una célula que es elegida como diana en un procedimiento de la invención es una célula metastásica.

[0054] Los procedimientos de la invención pueden comprender adicionalmente etapas de tratamiento adicionales. Por ejemplo, en una realización, un procedimiento comprende además una etapa en la que una célula y/o tejido elegido como diana (por ejemplo, una célula cancerosa) se expone a tratamiento con radiación o un agente quimioterapéutico.

[0055] La activación de c-met es un proceso biológico importante cuya desregulación conduce a numerosas afecciones patológicas. Por consiguiente, en una realización de los procedimientos de la invención, una célula que es elegida como diana (por ejemplo, una célula cancerosa) es una en la que la activación de c-met es potenciada con respecto a una célula normal del mismo origen de tejido. En una realización, un procedimiento de la invención produce la muerte de una célula elegida como diana. Por ejemplo, el contacto con un fragmento de anticuerpo antagonista de la invención puede producir una incapacidad de la célula para señalizar mediante la ruta de c-met, que produce muerte celular.

[0056] La desregulación de la activación de c-met (y por tanto, la señalización) puede resultar de varios cambios celulares que incluyen, por ejemplo, expresión en exceso de HGF (ligando relacionado de c-met) y/o el propio c-met. Por consiguiente, en algunas realizaciones, un procedimiento de la invención comprende elegir como diana una célula en la que c-met o el factor de crecimiento de hepatocitos, o ambos, es expresado más abundantemente por dicha célula (por ejemplo, una célula cancerosa) con respecto a una célula normal del mismo origen de tejido. Una célula que expresa c-met puede regularse por HGF a partir de una variedad de fuentes, es decir, de un modo autocrino o paracrino. Por ejemplo, en una realización de procedimientos de la invención, una célula elegida como diana se pone en contacto/es unida por factor de crecimiento de hepatocitos expresado en una célula diferente (por ejemplo, mediante un efecto paracrino). Dicha célula diferente puede ser del mismo origen de tejido o de origen de tejido diferente. En una realización, una célula elegida como diana se pone en contacto/es unida por HGF expresado por la propia célula elegida como diana (por ejemplo, mediante un efecto/bucle autocrino). En una realización, la actividad de c-met (o activación) en una célula elegida como diana es dependiente de ligando. En una realización, la actividad de c-met (o activación) es independiente de ligando.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0057]

La FIGURA 1 muestra los resultados de transferencia Western de anti-Fab para la expresión de anticuerpo Fab/c anti-c-met (anticuerpo de un solo brazo).

La FIGURA 2 muestra los resultados de transferencia Western anti-Fc para la expresión de anticuerpo Fab/c anti-c-met (anticuerpo de un solo brazo).

La FIGURA 3 muestra los resultados de transferencia Western de anti-Fab para la expresión de anticuerpo Fab/c anti-c-met (anticuerpo de un solo brazo) que comprende una protuberancia y cavidad en la región Fc.

La FIGURA 4 muestra los resultados de transferencia Western anti-Fc para la expresión de anticuerpo Fab/c anti-c-met (anticuerpo de un solo brazo) que comprende una protuberancia y cavidad en la región Fc.

La FIGURA 5 muestra resultados de un ensayo de unión competitiva en el que el anticuerpo anti-c-met de un solo brazo bloqueó la unión de HGF a c-met.

La FIGURA 6 muestra los resultados de un ensayo KIRA en células U87 tratadas con o sin HGF y/o anticuerpo SDS anti-c-met de un solo brazo.

La FIGURA 7 muestra la proliferación celular de células BaF3-hMet en presencia de cantidades variables de anticuerpo 5D5 anti-c-met.

La FIGURA 8 muestra un ensayo de migración celular en el que el anticuerpo anti-c-met de un solo brazo bloqueó la función de HGF.

Las FIGURAS 9A-B muestran resultados de análisis farmacocinéticos de anticuerpo anti-c-met de un solo brazo.

Las FIGURAS 10A-B muestran resultados de tratamiento de tumores con anticuerpo anti-c-met de un solo brazo. En la Figura 10B, "UB" indica de un solo brazo.

MODOS PARA LLEVAR A CABO LA INVENCIÓN

[0058] La invención proporciona procedimientos, composiciones, kits y artículos de fabricación para usar fragmentos de anticuerpos monovalentes que se unen específicamente a c-met y que tienen características únicas que los hace que sean particularmente ventajosos para su uso en el tratamiento de ciertas afecciones patológicas. Además, los fragmentos de anticuerpos pueden prepararse fácilmente con rendimientos pragmáticos y pureza deseable. Los fragmentos de anticuerpos de la invención se caracterizan por capacidades fisicoquímicas y/o terapéuticas superiores con respecto a los anticuerpos monovalentes existentes. En general, los fragmentos de anticuerpos monovalentes de la invención comprenden un único brazo de unión a antígeno y una región Fc, en los que el fragmento de anticuerpo presenta estabilidad potenciada *in vivo* en comparación con un fragmento Fab de anticuerpo que comprende dicho brazo de unión a antígeno, pero que carece de dicha región Fc. En algunas realizaciones, un fragmento de anticuerpo de la invención comprende una alteración en uno o más residuos de cada una de las secuencias de Fc que forman la superficie de separación de multimerización entre los polipéptidos de Fc que representan la región Fc. La invención proporciona procedimientos de preparación y uso de fragmentos de anticuerpos de la invención. La invención hace posible la producción eficiente y comercialmente viable de novedosos fragmentos de anticuerpos de la invención. Los fragmentos de anticuerpos pueden usarse para tratar afecciones patológicas en las que el uso de un anticuerpo terapéutico que es de naturaleza monovalente y altamente estable es altamente deseable y/o requerido. Detalles de procedimientos, composiciones, kits y artículos de fabricación de la invención se proporcionan en este documento.

Técnicas generales

[0059] La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología que están dentro de la habilidad de la materia. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía, tales como "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición (Sambrook y col., 1989); "Oligonucleotides Synthesis" (M. J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R. L Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Current Protocols in Molecular Biology" (F. M. Ausubel y col., eds., 1987, y revisiones periódicas); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis y col., ed., 1994); "A Practical Guide to Molecular Cloning" (Perbal Bernard V., 1988).

Definiciones

[0060] El término "vector", como se usa en este documento, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico que puede transportar otro ácido nucleico con el que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que se han ligado segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector de fago. Otro tipo de vector es un vector vírico, en el que segmentos de ADN adicionales pueden ligarse en el genoma vírico. Ciertos vectores pueden replicarse autónomamente en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores de mamífero episómicos). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episómicos) pueden integrarse en el genoma de una célula huésped tras la introducción en la célula huésped, y así se replican junto con el genoma huésped. Además, ciertos vectores pueden dirigir la expresión de genes a los que están operativamente ligados. Tales vectores se denominan en este documento "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente "vectores recombinantes"). En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están frecuentemente en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" pueden usarse indistintamente ya que el plásmido es la forma más comúnmente usada de vector.

[0061] "Polinucleótido", o "ácido nucleico", como se usan indistintamente en este documento, se refieren a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificados, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que pueda incorporarse en un polímero por ADN o ARN polimerasa, o por una reacción sintética. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si está presente, la modificación a la estructura del nucleótido puede conferirse antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede interrumpirse por componentes de no nucleótido. Un polinucleótido puede modificarse adicionalmente después de la síntesis, tal como por conjugación con una marca. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, "tapas", sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales con un análogo,

modificaciones de internucleótidos tales como, por ejemplo, aquellas con enlaces sin carga (por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y con enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), aquellos que contienen restos laterales tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, ply-L-lisina, etc.), aquellos con intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), aquellos que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radiactivos, boro, metales oxidativos, etc.), aquellos que contienen alquilantes, aquellos con enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa-anoméricos, etc.), además de formas sin modificar del (de los) polinucleótido(s). Además, cualquiera de los grupos hidroxilo generalmente presente en los azúcares puede reemplazarse, por ejemplo, con grupos fosfonato, grupos fosfato, protegerse por grupos protectores convencionales o activarse para preparar enlaces adicionales a nucleótidos adicionales, o pueden conjugarse con soportes sólidos o semisólidos. Los OH del extremo 5' y 3' pueden fosforilarse o sustituirse con aminas o restos de grupos de remate orgánicos de 1 a 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también pueden derivatizarse a grupos protectores convencionales. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares de ribosa o desoxirribosa que generalmente son conocidos en la técnica que incluyen, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alil-, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcares carbocíclicos, azúcares alfa-anoméricos, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósidos abásicos tales como metilrribósido. Uno o más enlaces fosfodiéster pueden reemplazarse con grupos de enlace alternativos. Estos grupos de enlace alternativos incluyen, pero no se limitan a, realizaciones en las que el fosfato es reemplazado con P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), "(O)NR_2 ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH_2 ("formacetal"), en las que cada R o R' es independientemente H o alquilo (C1-20) sustituido o sin sustituir que opcionalmente contiene un enlace éter (-O-), arilo, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo o araldilo. No todos los enlaces en un polinucleótido necesitan ser idénticos. La descripción precedente se aplica a todos los polinucleótidos citados en este documento, que incluyen ARN y ADN.

[0062] "Oligonucleótido", como se usa en este documento, generalmente se refiere a polinucleótidos cortos, generalmente monocatenarios, generalmente sintéticos, que tienen generalmente, pero no necesariamente, menos de aproximadamente 200 nucleótidos de longitud. Los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido" no son mutuamente exclusivos. La descripción anterior para polinucleótidos es igualmente y completamente aplicable a oligonucleótidos.

[0063] El término "factor de crecimiento de hepatocitos" o "HGF", como se usa en este documento, se refiere, a menos que se indique específicamente o contextualmente de otro modo, a cualquier polipéptido de HGF nativo o variante (tanto si es nativo/natural como sintético) que puede activar la ruta de señalización de HGF/c-met en condiciones que permitan que se produzca tal proceso. El término "HGF natural" generalmente se refiere a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de una proteína de HGF natural. El término "secuencia de HGF natural" generalmente se refiere a una secuencia de aminoácidos encontrada en un HGF natural.

[0064] Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se usan indistintamente en el sentido más amplio e incluyen anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpos monoclonales de longitud completa o intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos monovalentes, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos en tanto que presenten la actividad biológica deseada) y fragmentos de anticuerpos como se describe en este documento. Un anticuerpo puede ser humano, humanizado y/o madurado por afinidad.

[0065] "Fragmentos de anticuerpos" comprende sólo una parte de un anticuerpo intacto, en los que la porción retiene preferentemente al menos una, preferentemente la mayoría o todas, de las funciones normalmente asociadas a esa porción cuando está presente en un anticuerpo intacto.

[0066] El término "brazo de unión a antígeno", como se usa en este documento, se refiere a una parte de componente de un fragmento de anticuerpo de la invención que tiene una capacidad para unirse específicamente a una molécula diana de interés. Generalmente y preferentemente, el brazo de unión a antígeno es un complejo de secuencias de polipéptidos de inmunoglobulina, por ejemplo, secuencias de CDR y/o del dominio variable de una cadena ligera y pesada de la inmunoglobulina.

[0067] El término "cadena pesada truncada del extremo N", como se usa en este documento, se refiere a un polipéptido que comprende partes, pero no toda una cadena pesada de la inmunoglobulina de longitud completa, en el que las partes ausentes son aquellas normalmente localizadas en la región del extremo N de la cadena pesada. Las partes ausentes pueden incluir, pero no se limitan a, el dominio variable, CH1, y parte o todo de una secuencia bisagra. Generalmente, si la secuencia bisagra natural no está presente, el (los) dominio(s) constante(s) restante(s) en la cadena pesada truncada del extremo N comprendería(n) un componente que puede enlazarse con otra secuencia de Fc (es decir, el "primer" polipéptido de Fc como se describe en este documento). Por ejemplo, dicho componente puede ser un residuo modificado o un residuo de cisteína añadido que puede formar un enlace disulfuro.

[0068] El término “anticuerpo monoclonal”, como se usa en este documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único antígeno. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopes), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante sobre el antígeno.

[0069] Los anticuerpos monoclonales en este documento incluyen específicamente anticuerpos “quiméricos” en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpos particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntica a u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, además de fragmentos de tales anticuerpos, en tanto que presenten la actividad biológica deseada (patente de EE.UU. nº 4.816.567; y Morrison y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)).

[0070] Formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En general, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable del receptor son reemplazadas con residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región estructural (FR) de la inmunoglobulina humana son sustituidos con residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se hacen para refinar adicionalmente el rendimiento de los anticuerpos. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en el que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables se corresponden con los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones y col., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann y col., Nature 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992). Véanse también los siguientes artículos de revisión y referencias citadas en su interior: Vaswani y Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038 (1995); Hurle y Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994).

[0071] Un “anticuerpo humano” es uno que posee una secuencia de aminoácidos que se corresponde con la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o ha sido preparado usando cualquiera de las técnicas para preparar anticuerpos humanos como se ha desvelado en este documento. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos.

[0072] Un anticuerpo “madurado por afinidad” es uno con una o más alteraciones en una o más CDR del mismo que producen una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee aquella(s) alteración (alteraciones). Los anticuerpos madurados por afinidad preferidos tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Los anticuerpos madurados por afinidad se producen mediante procedimientos conocidos en la técnica. Marks y col. Bio/Technology 10:779-783 (1992) describe la maduración por afinidad por barajado de dominios de VH y VL. La mutagénesis al azar de residuos de CDR y/o de regiones estructurales se describe por: Barbas y col. Proc Nat. Acad Sci, USA 91:3809-3813 (1994); Schier y col. Gene 169:147-155 (1995); Yelton y col. J. Immunol. 155:1994-2004 (1995); Jackson y col., J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995); y Hawkins y col., J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992).

[0073] Como se usa en este documento, el término “inmunoadhesina” designa moléculas similares a anticuerpo que combinan el “dominio de unión” de una proteína heteróloga (una “adhesina”, por ejemplo, un receptor, ligando o enzima) con el componente efector de dominios constantes de inmunoglobulinas. Estructuralmente, las inmunoadhesinas comprenden una fusión de la secuencia de aminoácidos de adhesina con la especificidad de unión deseada que es distinta del sitio de reconocimiento y de unión de antígeno (sitio de combinación de antígeno) de un anticuerpo (es decir, es “heterólogo”) y una secuencia del dominio constante de inmunoglobulina. La secuencia del dominio constante de inmunoglobulina en la inmunoadhesina puede obtenerse a partir de cualquier inmunoglobulina tal como los subtipos IgG_1, IgG_2, IgG_3 o IgG_4, IgA, IgE, IgD o IgM.

[0074] Un “heteromultímero”, “complejo heteromultimérico” o “polipéptido heteromultimérico” es una molécula que comprende al menos un primer polipéptido y un segundo polipéptido, en el que el segundo polipéptido se diferencia en la secuencia de aminoácidos del primer polipéptido por al menos un residuo de aminoácido. El heteromultímero puede comprender un “heterodímero” formado por el primer y segundo polipéptidos o puede formar estructuras terciarias de orden superior en las que, además del primer y segundo polipéptidos, están presentes

polipéptidos.

[0075] Como se usa en este documento, “polipéptido” se refiere generalmente a péptidos y proteínas que tienen más de aproximadamente diez aminoácidos.

[0076] El término “propiedades inmunosupresoras”, o variantes del mismo, como se usan en este documento, se refiere a propiedades de un anticuerpo que producen directamente o indirectamente la inhibición de una o más actividades y/o funciones normales que implican el sistema inmunitario que incluyen, pero no se limitan a, inmunidad humoral y mediada por células.

[0077] El término “región Fc”, como se usa en este documento, generalmente se refiere a un complejo dimérico que comprende las secuencias del extremo C de polipéptidos de una cadena pesada de la inmunoglobulina, en el que una secuencia de polipéptidos del extremo C es la que es obtenible por digestión con papaína de un anticuerpo intacto. La región Fc puede comprender secuencias nativas o variantes de Fc. Aunque los límites de la secuencia de Fc de una cadena pesada de la inmunoglobulina podrían variar, la cadena pesada humana de la secuencia de Fc de IgG se define normalmente por extenderse de un residuo de aminoácido en aproximadamente la posición Cys226, o a partir de aproximadamente la posición Pro230, hacia el extremo carboxilo de la secuencia de Fc. La secuencia de Fc de una inmunoglobulina generalmente comprende dos dominios constantes, un dominio CH2 y un dominio CH3, y opcionalmente comprende un dominio CH4. Por “polipéptido de Fc” se indica en este documento uno de los polipéptidos que representan una región Fc. Un polipéptido de Fc puede obtenerse a partir de cualquier inmunoglobulina adecuada tal como subtipos IgG_1, IgG_2, IgG_3 o IgG_4, IgA, IgE, IgD o IgM. En algunas realizaciones, un polipéptido de Fc comprende parte o toda una secuencia bisagra natural (generalmente en su extremo N). En algunas realizaciones, un polipéptido de Fc no comprende una secuencia bisagra funcional o natural.

[0078] La “citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpos” y “ADCC” se refiere a una reacción mediada por célula en la que células citotóxicas no específicas que expresan receptores de Fc (FcR) (por ejemplo, células asesinas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen el anticuerpo unido sobre una célula diana y posteriormente producen lisis de la célula diana.

[0079] Los términos “receptor de Fc” y “FcR” se usan para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. Por ejemplo, un FcR puede ser un FcR humano de secuencia nativa. Generalmente, un FcR es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, que incluyen variantes alélicas y formas alternativamente cortadas y empalmadas de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un “receptor activante”) y FcγRIIB (un “receptor inhibidor”) que tienen secuencias de aminoácidos similares que se diferencian principalmente en los dominios citoplásmicos del mismo. Las inmunoglobulinas de otros isotipos también pueden unirse por ciertos FcR (véase, por ejemplo, Janeway y col., Immuno Biology: the immune system in health and disease (Elsevier Science Ltd., NY) (4ª ed., 1999)). El receptor activante FcγRIIA contiene un motivo de activación basado en tirosina inmunoreceptora (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición basado en tirosina inmunoreceptora (ITIM) en su dominio citoplásmico (revisado en Daëron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)). Los FcR son revisados en Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991); Capel y col., Immunomethods 4:25-34 (1994); y de Haas y col., J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995). Otras FcR, que incluyen aquellos que van a identificarse en el futuro, están englobados por el término “FcR” en este documento. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer y col., J. Immunol. 117:587 (1976); y Kim y col., J. Immunol. 24:249 (1994)).

[0080] La “región bisagra”, “secuencia de bisagra”, y variaciones de las mismas, como se usa en este documento, incluyen el significado conocido en la técnica, que se ilustra en, por ejemplo, Janeway y col., Immuno Biology: the immune system in health and disease (Elsevier Science Ltd., NY) (4ª ed., 1999); Bloom y col., Protein Science (1997), 6:407-415; Humphreys y col., J. Immunol. Methods (1997), 209:193-202.

[0081] El término “cistrón”, como se usa en este documento, pretende referirse a un elemento genético ampliamente equivalente a una unidad de traducción que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica una cadena de polipéptidos y regiones de control adyacentes. “Regiones de control adyacentes” incluyen, por ejemplo, una región de iniciación de la traducción (TIR; como se define en este documento más adelante) y una región de terminación.

[0082] La “región de iniciación de la traducción” o TIR, como se usa en este documento, se refiere a una región de ácidos nucleicos que proporciona la eficiencia de iniciación de la traducción de un gen de interés. En general, una TIR dentro de un cistrón particular engloba el sitio de unión a ribosoma (RBS) y las secuencias 5' y 3' para RBS. Se define que el RBS contiene, mínimamente, la región de Shine-Dalgarno y el codón de iniciación (AUG). Por consiguiente, una TIR también incluye al menos una parte de la secuencia de ácidos nucleicos que va a traducirse. En algunas realizaciones, una TIR de la invención incluye una secuencia señal de la secreción que

codifica un péptido señal que precede a la secuencia que codifica la cadena ligera o pesada dentro de un cistrón. Una variante de TIR contiene variantes de secuencia (particularmente sustituciones) dentro de la región de TIR que alteran la propiedad de la TIR, tal como su fuerza de traducción como se define en este documento más adelante. Preferentemente, una variante de TIR de la invención contiene sustituciones de secuencia dentro de los 2 primeros a aproximadamente 14, preferentemente aproximadamente 4 a 12, más preferentemente aproximadamente 6 codones de la secuencia señal de la secreción que precede a la secuencia que codifica la cadena ligera o pesada dentro de un cistrón.

[0083] El término “fuerza de traducción” como se usa en este documento se refiere a un medicamento de un polipéptido secretado en un sistema de control en el que una o más variantes de una TIR se usan para dirigir la secreción de un polipéptido y comparar los resultados con la TIR natural o algún otro control bajo las mismas condiciones de cultivo y ensayo. Sin limitarse a una teoría cualquiera, “fuerza de traducción” como se usa en este documento puede incluir, por ejemplo, una medida de estabilidad de ARNm, eficiencia de la unión de ribosoma al sitio de unión a ribosoma y modo de translocalización a través de una membrana.

[0084] “Secuencia señal de la secreción” o “secuencia señal” se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un péptido señal corto que puede usarse para dirigir una proteína de interés recientemente sintetizada a través de una membrana celular, por ejemplo, la membrana interna o tanto las membranas internas como externas de procariotas. Como tal, la proteína de interés, tal como polipéptido de la cadena ligera o pesada de la inmunoglobulina, puede secretarse en el periplasma de células huésped procariotas o en el medio de cultivo. El péptido señal codificado por la secuencia señal de la secreción puede ser endógeno para las células huésped, o puede ser exógeno, que incluye péptidos señal nativos para el polipéptido que va a expresarse. Las secuencias señal de secreción están normalmente presentes en el extremo amino de un polipéptido que va a expresarse, y normalmente son eliminadas enzimáticamente entre la biosíntesis y la secreción del polipéptido del citoplasma. Por tanto, el péptido señal normalmente no está presente en un producto de proteína madura.

[0085] Un anticuerpo “bloqueante” o un anticuerpo “antagonista” es uno que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno con el que se une (por ejemplo, receptor de c-met).

[0086] Un “anticuerpo agonista”, como se usa en este documento, es un anticuerpo que imita al menos una de las actividades funcionales de un polipéptido de interés (por ejemplo, HGF).

[0087] Un “antígeno de tumor”, como se usa en este documento, incluye el significado conocido en la técnica, que incluye cualquier molécula que se expresa diferencialmente sobre una célula de tumor en comparación con una célula normal. En algunas realizaciones, la molécula se expresa a un nivel detectablemente o significativamente mayor o menor en una célula tumoral en comparación con una célula normal. En algunas realizaciones, la molécula presenta un nivel de actividad biológica detectablemente o significativamente mayor o menor en una célula tumoral en comparación con una célula normal. En algunas realizaciones, se sabe o se cree que la molécula contribuye a una característica tumorigénica de la célula tumoral. En la técnica se conocen numerosos antígenos de tumor. Si una molécula es un antígeno de tumor también puede determinarse según técnicas y ensayos muy conocidos para aquellos expertos en la materia tales como, por ejemplo, ensayos clonogénicos, ensayos de transformación, ensayos de formación de tumores *in vitro* o *in vivo*, ensayos de migración en gel, análisis de inactivación de genes, etc.

[0088] Un “trastorno” es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento con un anticuerpo o procedimiento de la invención. Éste incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas que incluyen aquellas afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Ejemplos no limitantes de trastornos que van a tratarse en este documento incluyen tumores malignos y benignos; tumores malignos no leucémicos y linfoides; trastornos neuronales, de la glía, astrocíticos, hipotalámicos y otros glandulares, macrofágicos, epiteliales, del estroma y blastocélicos; y trastornos inflamatorios, inmunológicos y otros trastornos relacionados con la angiogénesis.

[0089] Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren a o describen la afección fisiológica en mamíferos que normalmente se caracteriza por crecimiento/proliferación celular no regulado. Ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma escamoso de pulmón, cáncer de peritoneo, mieloma (por ejemplo, mieloma múltiple), cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma/glioma (por ejemplo, astrocitoma anaplásico, glioblastoma multiforme, oligodendroglioma anaplásico, oligodendroastrocitoma anaplásico), cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio uterino, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello.

[0090] Una “enfermedad autoinmunitaria” en este documento es una enfermedad o trastorno no maligno que se produce a partir de y va dirigida contra los propios tejidos de un individuo. Las enfermedades autoinmunitarias en este documento excluyen específicamente enfermedades o afecciones malignas o cancerosas, excluyendo especialmente linfoma de linfocitos B, leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia de células pilosas y leucemia mieloblástica crónica. Ejemplos de enfermedades autoinmunitarias o trastornos incluyen, pero no se limitan a, respuestas inflamatorias tales como enfermedades inflamatorias de la piel que incluyen psoriasis y dermatitis (por ejemplo, dermatitis atópica); esclerodermia y esclerosis sistémica; respuestas asociadas a enfermedad inflamatoria del intestino (tales como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa); síndrome disneico (incluyendo síndrome disneico del adulto; SDA); dermatitis; meningitis; encefalitis; uveítis; colitis; glomerulonefritis; afecciones alérgicas tales como eccema y asma y otras afecciones que implican infiltración de linfocitos T y respuestas inflamatorias crónicas; aterosclerosis; deficiencia de la adhesión de leucocitos; artritis reumatoide; lupus eritematoso sistémico (LES); diabetes mellitus (por ejemplo, diabetes mellitus de tipo I o diabetes mellitus dependiente de insulina); esclerosis múltiple; síndrome de Reynaud; tiroiditis autoinmunitaria; encefalomielitis alérgica; síndrome de Sjorgen; diabetes juvenil; y respuestas inmunitarias asociadas a hipersensibilidad aguda y retardada mediada por citocinas y linfocitos T normalmente encontrados en tuberculosis, sarcoidosis, polimiositis, granulomatosis y vasculitis; anemia perniciosa (enfermedad de Addison); enfermedades que implican diapédesis de leucocitos; trastorno inflamatorio del sistema nervioso central (CNS); síndrome por lesión multiorgánica; anemia hemolítica (que incluye, pero no se limita a, crioglobulinemia o anemia positiva de Coombs); miastenia grave; enfermedades mediadas por el complejo antígeno-anticuerpo; enfermedad anti-membrana basal glomerular; síndrome antifosfolípido; neuritis alérgica; enfermedad de Graves; síndrome miasténico de Lambert-Eaton; pénfigo bulloso; pénfigo; poliendocrinopatías autoinmunitarias; enfermedad de Reiter; síndrome de la persona rígida; enfermedad de Behcet; arteritis de células gigantes; nefritis de complejos inmunes; nefropatía por IgA; polineuropatías por IgM; púrpura trombocitopénica inmunitaria (PTI) o trombocitopenia autoinmune, etc.

[0091] Como se usa en este documento, “tratamiento” se refiere a la intervención clínica en un intento por alterar el curso natural del individuo o célula que está tratándose, y puede realizarse tanto para la profilaxis como durante el curso de la patología clínica. Efectos del tratamiento deseables incluyen prevención de la manifestación o reaparición de enfermedad, alivio de síntomas, disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevención de metástasis, disminución de la tasa de progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de enfermedad y remisión o mejora del pronóstico. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención se usan para retardar el desarrollo de una enfermedad o trastorno. En una realización, los anticuerpos y procedimientos de la invención efectúan la regresión del tumor. En una realización, los anticuerpos y procedimientos de la invención efectúan la inhibición del crecimiento del tumor/cáncer.

[0092] Una “cantidad eficaz” se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado. Una “cantidad terapéuticamente eficaz” de un anticuerpo de la invención puede variar según factores tales como el estado de enfermedad, edad, sexo y peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo es superado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una “cantidad profilácticamente eficaz” se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Normalmente, pero no necesariamente, como una dosis profiláctica se usa en sujetos antes de o en un estadio temprano de enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será inferior a la cantidad terapéuticamente eficaz.

[0093] El término “no posee función efectora sustancial” con respecto a un fragmento de anticuerpo de la invención, como se usa en este documento, significa que la diferencia entre la cantidad de la actividad de la función efectora detectable de un fragmento de anticuerpo de la invención y la cantidad de la actividad presentada por un homólogo glicosilado natural del anticuerpo es estadísticamente significativa como es evidente para un experto en la materia, siendo la cantidad de actividad del fragmento de anticuerpo de la invención menor que la cantidad de actividad presentada por el homólogo natural. En una realización, un fragmento de anticuerpo de la invención no presenta un nivel de actividad de la función efectora (distinta de unión a FcRn) que esté por encima del nivel de referencia que es de significancia estadística. El término “poca a ninguna propiedad inmunosupresora” con respecto a un fragmento de anticuerpo de la invención, como se usa en este documento, significa que el anticuerpo no provoca una cantidad biológicamente significativa de inmunosupresión tras la administración a un sujeto. Como se entendería en la materia, la cantidad de una actividad puede determinarse cuantitativamente o cualitativamente, mientras que pueda hacerse una comparación entre un anticuerpo de la invención y un homólogo de referencia. La actividad puede medirse o detectarse según cualquier ensayo o técnica conocida en la técnica que incluye, por ejemplo, aquellos descritos en este documento. La cantidad de actividad para un anticuerpo de la invención y su homólogo de referencia pueden determinarse en ejecuciones paralelas o separadas.

[0094] El término “sustancialmente similar”, “sustancialmente idéntico”, “sustancialmente el mismo” y variaciones de los mismos, como se usan en este documento, denotan un grado suficientemente alto de similitud entre dos valores numéricos (generalmente uno asociado a un anticuerpo de la invención y el otro asociado a su homólogo de referencia), de forma que un experto en la materia consideraría la diferencia entre los dos valores para

que fueran de poca o ninguna significancia biológica dentro del contexto de las características biológicas, físicas o de cuantificación medidas por dichos valores. La diferencia entre dichos dos valores es preferentemente inferior a aproximadamente el 50%, preferentemente inferior a aproximadamente el 40%, preferentemente inferior a aproximadamente el 30%, preferentemente inferior a aproximadamente el 20%, preferentemente inferior a aproximadamente el 10% en función del valor para el homólogo de referencia.

[0095] Un fragmento de anticuerpo de la invención es “más estable” o tiene “estabilidad elevada” en comparación con otra forma de anticuerpo (tal como un homólogo del fragmento Fab), y variaciones del mismo, como se usa en este documento, significa que el fragmento de anticuerpo de la invención presenta un aumento detectable/medible en la estabilidad *in vivo* en comparación con un anticuerpo de referencia (tal como un homólogo del fragmento Fab). La estabilidad puede basarse en semivida, tasa de eliminación y/o cualquier otro parámetro visto en la materia como indicativo de cuánto del fragmento de anticuerpo de la invención queda en un sujeto en momentos de tiempo particulares tras la administración del fragmento de anticuerpo al sujeto. Los procedimientos de determinación de los parámetros de estabilidad, tales como semivida y/o tasa de eliminación, son muy conocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen en este documento.

[0096] “Citotoxicidad dependiente del complemento” y “CDC” se refieren a la lisis de una diana en presencia de complemento. La vía de activación del complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema de complemento (C1q) a una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) complejada con un antígeno relacionado.

[0097] “Afinidad de unión” se refiere generalmente a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su componente de unión (por ejemplo, un antígeno o receptor FcRn). La afinidad de una molécula X por su componente Y puede presentarse generalmente por la constante de disociación (Kd). La afinidad puede medirse por procedimientos comunes conocidos en la técnica que incluyen aquellos descritos en este documento. Los anticuerpos de baja afinidad se unen débilmente a antígeno (o receptor FcRn) y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad se unen a antígeno (o receptor FcRn) más estrechamente y permanecen unidos más tiempo.

[0098] El término “agente citotóxico” como se usa en este documento se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de células y/o produce la destrucción de células. El término está previsto que incluya isótopos radiactivos (por ejemplo, At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32} e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos y toxinas tales como toxinas de moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, que incluyen fragmentos y/o variantes de los mismos.

[0099] Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico útil en el tratamiento de cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y la ciclofosfamida CYTOXAN®; alquilsulfonatos tales como busulfano, improsulfano y piposulfano; aziridinas tales como benzodopa, carbocuona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolmelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapacol; colcicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecan (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecan, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina y 9-aminocamptotecina); briostatina; calmentestatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos de adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalan, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediína (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma1I y caliqueamicina omegaI1 (véase, por ejemplo, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)); dinemicina, que incluye dinemicina A; una esperamicina; además de cromóforo de neocarzinostatina y la cromoproteína relacionada cromóforos antibióticos de enediína), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluyendo ADRIAMYCIN®, morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina, inyección de liposomas de doxorubicina·HCl (DOXIL®) y desoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos tales como metrotrexato, gemcitabina (GEMZAR®), tegafur (UFTORAL®), capecitabina (XELODA®), una epotilona y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metrotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitiostanol, mepitiostano, testolactona; antiadrenérgicos tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; recuperador de ácido fólico tal

como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansanutocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazina; complejo de polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®), formulación de nanopartículas manipuladas con albúmina de paclitaxel (ABRAXANE™) y doxetaxel (TAXOTERE®); cloranbucilo; 6-tioguanina; mercaptopurina; metrotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina (VELBAN®); platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN®); oxaliplatino; leucovovina; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; además de combinaciones de dos o más de los anteriores tales como CHOP, una abreviatura para una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona, y FOLFOX, una abreviatura para una pauta de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovovina.

[0100] En esta definición también se incluyen agentes antihormonales que actúan para regular, reducir, bloquear o inhibir los efectos de hormonas que pueden promover el crecimiento de cáncer, y están frecuentemente en forma de tratamiento sistémico, o de cuerpo completo. Pueden ser las propias hormonas. Ejemplos incluyen antiestrógenos y moduladores de receptores de estrógenos selectivos (SERM) que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo el tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno (VISTA®), droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (FARESTON®); antiprogesteronas; reguladores por disminución de receptores de estrógenos (ERD); antagonistas de receptores de estrógenos tales como fulvestrant (FASLODEX®); agentes que funcionan para suprimir o cerrar los ovarios, por ejemplo, agonistas de la hormona liberadora de hormona leutinizante (LHRH) tales como acetato de leuprolida (LUPRON® y ELIGARD®), acetato de goserelina, acetato de buserelina y tripterelina; otros antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida; e inhibidores de aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol (MEGASE®), exemestano (AROMASIN®), formestano, fadrozol, vorozol (RIVISOR®), letrozol (FEMARA®) y anastrozol (ARIMIDEX®). Además, tal definición de agentes quimioterapéuticos incluye bisfosfonatos tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® o OSTAC®), etidronato (DIDROCAL®), NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato (ZOMETA®), alendronato (FOSAMAX®), pamidronato (AREDIA®), tiludronato (SKELID®) o risedronato (ACTONEL®); además de troxacitabina (un análogo de citosina de nucleósido de 1,3-dioxolano); oligonucleótidos antisentido, particularmente aquellos que inhiben la expresión de genes en las rutas de señalización implicadas en la proliferación celular anómala tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras y receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas tales como la vacuna THERATOPE® y vacunas de terapia génica, por ejemplo, la vacuna ALLOVECTIN®, la vacuna LEUVECTIN® y la vacuna VAXID®; inhibidor de la topoisomerasa 1 (por ejemplo, LURTOTECAN®); rmRH (por ejemplo, ABARELIX®); ditosilato de lapatinib (un inhibidor de moléculas pequeñas de tirosina cinasa dual ErbB-2 y EGFR también conocido como GW572016); inhibidores de la COX-2 tales como celecoxib (CELEBREX®; 4-(5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il)bencenosulfonamida; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

[0101] Excepto cuando se indique de otro modo por el contexto, los términos "primer" polipéptido y "segundo" polipéptido, y variaciones de los mismos, son únicamente identificadores genéricos, y no debe considerarse que identifican polipéptidos o componentes de anticuerpos de la invención.

[0102] Una "protuberancia" se refiere a al menos una cadena lateral de aminoácidos que se proyecta de la superficie de separación de un primer polipéptido y que, por tanto, es posicionable en una cavidad compensatoria en la superficie de separación adyacente (es decir, la superficie de separación de un segundo polipéptido) de manera que se estabilice el heteromultímero y así se favorezca, por ejemplo, la formación de heteromultímeros con respecto a la formación de homomultímeros. La protuberancia puede existir en la superficie de separación original o puede introducirse sintéticamente (por ejemplo, alterando el ácido nucleico que codifica la superficie de separación). Normalmente, el ácido nucleico que codifica la superficie de separación del primer polipéptido es alterado para codificar la protuberancia. Para lograr esto, el ácido nucleico que codifica al menos un residuo de aminoácido "original" en la superficie de separación del primer polipéptido se reemplaza con ácido nucleico que codifica al menos un residuo de aminoácido de "importación" que tiene un volumen de cadena lateral mayor que el residuo de aminoácido original. Se apreciará que puede haber más de un residuo original y de importación correspondiente. El límite superior para el número de residuos originales que están sustituidos es el número total de residuos en la superficie de separación del primer polipéptido. Los volúmenes de la cadena lateral de los diversos residuos amino se muestran en la siguiente tabla.

TABLA 1

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

[a] peso molecular del aminoácido menos el del agua. Valores de Handbook of Chemistry and Physics, 43ª ed. Cleveland, Chemical Rubber Publishing Co., 1961.
[b] Valores de A.A. Zamyatnin, Prog. Biophys. Mol. Biol. 24:107-123, 1972.
[c] Valores de C. Chothia, J. Mol. Biol. 105:1-14, 1975. El área superficial accesible se define en las Figuras 6-20 de esta referencia.

[0103] Los residuos de importación preferidos para la formación de una protuberancia son generalmente residuos de aminoácidos naturales y se seleccionan preferentemente de arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W). Los más preferidos son triptófano y tirosina. En una realización, el residuo original para la formación de la protuberancia tiene un volumen de la cadena lateral pequeño, tal como alanina, asparagina, ácido aspártico, glicina, serina, treonina o valina.

[0104] Una “cavidad” se refiere a al menos una cadena lateral de aminoácidos que está retranqueada de la superficie de separación de un segundo polipéptido y, por tanto, acomoda una protuberancia correspondiente sobre la superficie de separación adyacente de un primer polipéptido. La cavidad puede existir en la superficie de separación original o puede introducirse sintéticamente (por ejemplo, alterando el ácido nucleico que codifica la superficie de separación). Normalmente, el ácido nucleico que codifica la superficie de separación del segundo polipéptido es alterado para codificar la cavidad. Para lograr esto, el ácido nucleico que codifica al menos un residuo de aminoácido “original” en la superficie de separación del segundo polipéptido se reemplaza con ADN que codifica al menos un residuo de aminoácido de “importación” que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño que el residuo de aminoácido original. Se apreciará que puede haber más de un residuo original y de importación correspondiente. El límite superior para el número de residuos originales que son sustituidos es el número total de residuos en la superficie de separación del segundo polipéptido. Los volúmenes de la cadena lateral de los diversos residuos de amino se muestran en la Tabla 1 anterior. Los residuos de importación preferidos para la formación de una cavidad son normalmente residuos de aminoácidos naturales y se seleccionan preferentemente de alanina (A), serina (S), treonina (T) y valina (V). Los más preferidos son serina, alanina o treonina. En una realización, el residuo original para la formación de la cavidad tiene un volumen de la cadena lateral grande, tal como tirosina, arginina, fenilalanina o triptófano.

[0105] Un residuo de aminoácido “original” es uno que es reemplazado con un residuo de “importación” que puede tener un volumen de cadena lateral menor o mayor que el residuo original. El residuo de aminoácido de importación puede ser un residuo de aminoácido natural o no natural, pero preferentemente es el primero. Residuos de aminoácidos “naturales” son aquellos residuos codificados por el código genético y enumerados en la Tabla 1 anterior. Por residuo de aminoácido “no natural” se indica un residuo que no está codificado por el código genético, pero que puede unirse covalentemente a residuo(s) de aminoácido(s) adyacente(s) en la cadena de polipéptidos. Ejemplos de residuos de aminoácidos no naturales son norleucina, ornitina, norvalina, homoserina y otros análogos de residuos de aminoácidos tales como aquellos descritos, por ejemplo, en Ellman y col., Meth. Enzym. 202:301-336

(1991). Para generar tales residuos de aminoácidos no naturales pueden usarse los procedimientos de Noren y col. Science 244: 182 (1989) y Ellman y col., arriba. Brevemente, esto implica activar químicamente un ARNt supresor con un residuo de aminoácido no natural, seguido de transcripción *in vitro* y traducción del ARN. El procedimiento de la presente invención implica sustituir al menos un residuo de aminoácido original, pero puede reemplazarse más de un residuo original. Normalmente, no más de los residuos totales en la superficie de separación del primer o segundo polipéptido comprenderán residuos de aminoácidos originales que son sustituidos. Normalmente, los residuos originales para la sustitución están "enterrados". Por "enterrado" se indica que el residuo está esencialmente inaccesible al disolvente. Generalmente, el residuo de importación no es cisteína para prevenir la posible oxidación o desapareamiento de enlaces disulfuro.

[0106] La protuberancia es "posicionable" en la cavidad significa que la localización espacial de la protuberancia y la cavidad sobre la superficie de separación de un primer polipéptido y segundo polipéptido, respectivamente, y los tamaños de la protuberancia y la cavidad son de forma que la protuberancia pueda localizarse en la cavidad sin perturbar significativamente la asociación normal del primer y segundo polipéptidos en la superficie de separación. Como las protuberancias tales como Tyr, Fe y Trp no se extienden normalmente perpendicularmente del eje de la superficie de separación y tienen conformaciones preferidas, el alineamiento de una protuberancia con una cavidad correspondiente se basa en modelar el par protuberancia/cavidad basándose en una estructura tridimensional tal como la obtenida por cristalografía de rayos X o resonancia magnética nuclear (RMN). Esto pueden lograrse usando técnicas ampliamente aceptadas en la materia.

[0107] Por "ácido nucleico original o molde" se indica el ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés que puede estar "alterado" (es decir, manipulado o mutado genéticamente) para codificar una protuberancia o cavidad. El ácido nucleico original o de partida puede ser un ácido nucleico natural o puede comprender un ácido nucleico que ha sido sometido a alteración previa (por ejemplo, un fragmento de anticuerpo humanizado). Por "alterar" el ácido nucleico se indica que el ácido nucleico original se muta insertando, delecionando o sustituyendo al menos un codón que codifica un residuo de aminoácido de interés. Normalmente, un codón que codifica un residuo original es sustituido por un codón que codifica un residuo de importación. Técnicas para modificar genéticamente un ADN de este modo se han revisado en Mutagenesis: a Practical Approach, MJ. McFerson, Ed., (IRL Press, Oxford, UK. (1991), e incluyen, por ejemplo, mutagénesis dirigida a sitio, mutagénesis en casete y mutagénesis por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Por tanto, mutando un ácido nucleico original/molde, un polipéptido original/molde codificado por el ácido nucleico original/molde es correspondientemente alterado.

[0108] La protuberancia o cavidad puede "introducirse" en la superficie de separación de un primer o segundo polipéptido por medios sintéticos, por ejemplo, por técnicas recombinantes, síntesis de péptidos *in vitro*, aquellas técnicas para introducir residuos de aminoácidos no naturales previamente descritos, por acoplamiento enzimático o químico de péptidos o alguna combinación de estas técnicas. Por consiguiente, la protuberancia o cavidad que es "introducida" es "no natural" o "no nativa", que significa que no existe en la naturaleza o en el polipéptido original (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal humanizado).

[0109] Generalmente, el residuo de aminoácido de importación para formar la protuberancia tiene un número relativamente pequeño de "rotámeros" (por ejemplo, aproximadamente 3-6). Un "rotámero" es una conformación energéticamente favorable de una cadena lateral de aminoácidos. El número de rotámeros de los diversos residuos de aminoácidos se revisa en Ponders y Richards, J. Mol. Biol. 193: 775-791 (1987).

[0110] Heteromultímero "aislado" significa heteromultímero que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su entorno de cultivo celular natural. Componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con los usos de diagnóstico o terapéuticos para el heteromultímero, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteináceos o no proteináceos. En algunas realizaciones, el heteromultímero se purificará (1) a más del 95% en peso de proteína como se ha determinado por el procedimiento de Lowry, o a más del 99% en peso, (2) a un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos del extremo N o interna usando un secuenciador de taza giratoria, o (3) a homogeneidad por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras o no reductoras usando tinción con azul de Coomassie o con plata.

[0111] Los heteromultímeros de la presente invención se purifican generalmente a homogeneidad sustancial. Los términos "sustancialmente homogénea", "forma sustancialmente homogénea" y "homogeneidad sustancial" se usan para indicar que el producto está sustancialmente carente de subproductos originados a partir de las combinaciones de polipéptidos no deseadas (por ejemplo, homomultímeros). Expresado en términos de pureza, homogeneidad sustancial significa que la cantidad de subproductos no supera el 10%, o está por debajo del 5%, o está por debajo del 1%, o está por debajo del 0,5%, siendo los porcentajes en peso.

[0112] La expresión "secuencias de control" se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante operativamente ligada en un organismo huésped particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariotas incluyen, por ejemplo, un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, un sitio de unión a ribosoma y posiblemente otras secuencias poco entendidas hasta ahora. Las células eucariotas son

conocidas por utilizar promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

[0113] El ácido nucleico está "operativamente ligado" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o conductor secretor está operativamente ligado a ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está operativamente ligado a una secuencia codificante si afecta la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está operativamente ligado a una secuencia codificante si está posicionado de manera que facilite la traducción. Generalmente, "operativamente ligadas" significa que las secuencias de ADN que están ligadas están contiguas y, en el caso de un conductor secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. El enlace puede llevarse a cabo por ligación en sitios de restricción convenientes. Si tales sitios no existen, los adaptadores o ligadores de oligonucleótidos sintéticos se usan de acuerdo con la práctica convencional.

Vectores, células huésped y procedimientos recombinantes

[0114] Para la producción recombinante de un anticuerpo de la invención, el ácido nucleico que codifica se aísla y se inserta en un vector replicable para la posterior clonación (amplificación del ADN) o para la expresión. El ADN que codifica el anticuerpo se aísla fácilmente y se secuencia usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo). Están disponibles muchos vectores. La elección de vector depende en parte de la célula huésped que va a usarse. Generalmente, células huésped preferidas son de origen tanto procariota como eucariota (generalmente de mamífero).

Generación de anticuerpos usando células huésped procariotas:

Construcción de vectores

[0115] Las secuencias de polinucleótidos que codifican componentes de polipéptido del anticuerpo de la invención pueden obtenerse usando técnicas convencionales. Las secuencias de polinucleótidos deseadas pueden aislarse y secuenciarse a partir de células productoras de anticuerpos tales como células de hibridoma. Alternativamente, los polinucleótidos pueden sintetizarse usando sintetizador de nucleótidos o técnicas de PCR. Una vez obtenidas, las secuencias que codifican los polipéptidos se insertan en un vector recombinante que puede replicarse y expresar polinucleótidos heterólogos en huéspedes procariotas. Muchos vectores que están disponibles y son conocidos en la técnica pueden usarse con el fin de la presente invención. La selección de un vector apropiado dependerá principalmente del tamaño de los ácidos nucleicos que van a insertarse en el vector y de la célula huésped particular que va a transformarse con el vector. Cada vector contiene diversos componentes, dependiendo de su función (amplificación o expresión de polinucleótido heterólogo, o ambos) y su compatibilidad con la célula huésped particular en la que reside. Los componentes de vector generalmente incluyen, pero no se limitan a: un origen de replicación, un gen marcador de selección, un promotor, un sitio de unión a ribosoma (RBS), una secuencia señal, el inserto de ácido nucleico heterólogo y una secuencia de terminación de la transcripción.

[0116] En general, los vectores de plásmido que contienen secuencias de replicón y de control que se derivan de especies compatibles con la célula huésped se usan a propósito de estos huéspedes. El vector generalmente lleva un sitio de replicación, además de marcar las secuencias que pueden proporcionar selección fenotípica en células transformadas. Por ejemplo, *E. coli* se transforma normalmente usando pBR322, un plásmido derivado de una especie de *E. coli*. pBR322 contiene genes que codifican resistencia a ampicilina (Amp) y tetraciclina (Tet) y, por tanto, proporciona medios fáciles para identificar células transformadas. pBR322, sus derivados, u otros plásmidos microbianos o bacteriófago también puede contener, o modificarse para contener, promotores que pueden ser usados por el organismo microbiano para la expresión de proteínas endógenas. Ejemplos de derivados de pBR322 usados para la expresión de anticuerpos particulares se describen en detalle en Carter y col., patente de EE.UU. nº 5.648.237.

[0117] Además, los vectores de fago que contienen secuencias de replicón y de control que son compatibles con el microorganismo huésped pueden usarse como vectores transformantes a propósito de estos huéspedes. Por ejemplo, el bacteriófago tal como λGEM.TM.-11 puede utilizarse en la preparación de un vector recombinante que puede usarse para transformar células huésped susceptibles tales como LE392 de *E. coli*.

[0118] El vector de expresión de la invención puede comprender dos o más pares de promotor-cistrón que codifican cada uno los componentes del polipéptido. Un promotor es una secuencia reguladora sin traducir localizada en la dirección 5' con respecto a un cistrón que modula su expresión. Los promotores procariotas normalmente se clasifican en dos clases, inducibles y constitutivos. El promotor inducible es un promotor que inicia niveles elevados de transcripción del cistrón bajo su control en respuesta a cambios en la condición de cultivo, por ejemplo, la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura.

[0119] Son muy conocidos un gran número de promotores reconocidos mediante una variedad de posibles células huésped. El promotor seleccionado puede estar operativamente ligado a ADN de cistrón que codifica la cadena ligera o pesada eliminando el promotor de la fuente ADN por una digestión con enzima de restricción e insertando la secuencia promotora aislada en el vector de la invención. Tanto la secuencia promotora nativa como muchos promotores heterólogos pueden usarse para dirigir la amplificación y/o expresión de los genes diana. En algunas realizaciones se utilizan promotores heterólogos, ya que generalmente permiten mayor transcripción y mayores rendimientos del gen diana expresado con respecto al promotor de polipéptido diana nativo.

[0120] Promotores adecuados para su uso con huéspedes procariotas incluyen el promotor PhoA, los sistemas de promotores de β-galactamasa y lactosa, un sistema promotor de triptófano (trp) y promotores híbridos tales como el promotor *tac* o *trc*. Sin embargo, también son adecuados otros promotores que son funcionales en bacterias (tales como otros promotores bacterianos o de fago conocidos). Sus secuencias de nucleótidos han sido publicadas, permitiendo así que un experto los ligue operablemente a cistrones que codifican las cadenas ligeras y pesadas diana (Siebenlist y col. (1980) Cell 20: 269) usando ligadores o adaptadores para suministrar cualquier sitio de restricción requerido.

[0121] En un aspecto de la invención, cada cistrón dentro del vector recombinante comprende un componente de secuencia señal de la secreción que dirige la translocalización de los polipéptidos expresados a través de una membrana. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN de polipéptido diana que se inserta en el vector. La secuencia señal seleccionada con el fin de la presente invención debería ser una que es reconocida y procesada (es decir, escindida por una peptidasa señal) por la célula huésped. Para células huésped procariotas que no reconocen y procesan las secuencias señal nativas para los polipéptidos heterólogos, la secuencia señal está sustituida por una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo que consiste en los conductores de fosfatasa alcalina, penicilinasa, Ipp o enterotoxina estable al calor II (STII), LamB, PhoE, PelB, OmpA y MBP. En una realización de la invención, las secuencias señal usadas en ambos cistrones del sistema de expresión son secuencias señal de STII o variantes de las mismas.

[0122] En otro aspecto, la producción de las inmunoglobulinas según la invención puede producirse en el citoplasma de la célula huésped y, por tanto, no requiere la presencia de secuencias señal de secreción dentro de cada cistrón. En ese aspecto, las cadenas ligeras y pesadas de la inmunoglobulina se expresan, se pliegan y se ensamblan para formar inmunoglobulinas funcionales dentro del citoplasma. Ciertas cepas huésped (por ejemplo, las cepas *trxB*$^-$ de *E. coli*) proporcionan condiciones de citoplasma que son favorables para la formación de enlaces disulfuro, permitiéndose así el plegamiento y ensamblaje apropiado de subunidades de proteína expresada. Proba y Pluckthun Gene, 159:203 (1995).

[0123] La presente invención proporciona un sistema de expresión en el que la relación cuantitativa de componentes de polipéptido expresados puede modularse con el fin de maximizar el rendimiento de anticuerpos secretados y apropiadamente ensamblados de la invención. Tal modulación se lleva a cabo al menos en parte modulando simultáneamente las fuerzas de traducción para los componentes de polipéptido.

[0124] Una técnica para modular la fuerza de traducción se desvela en Simmons y col., patente de EE.UU. nº 5.840.523. Se utilizan variantes de la región de iniciación de la traducción (TIR) dentro de un cistrón. Para una TIR dada puede crearse una serie de variantes de secuencias de aminoácidos o de ácidos nucleicos con un intervalo de fuerzas de traducción, proporcionándose así un medio conveniente por el cual se ajusta este factor para el nivel de expresión deseado de la cadena específica. Las variantes de TIR pueden generarse por técnicas de mutagénesis convencionales que producen cambios de codones que pueden alterar la secuencia de aminoácidos, aunque se prefieren cambios silenciosos en la secuencia de nucleótidos. Las alteraciones en la TIR pueden incluir, por ejemplo, alteraciones en el número o la separación de las secuencias de Shine-Dalgamo, junto con alteraciones en la secuencia señal. Un procedimiento para generar secuencias señal mutantes es la generación de un “banco de codones” al principio de una secuencia codificante que no cambia la secuencia de aminoácidos de la secuencia señal (es decir, los cambios son silenciosos). Esto puede llevarse a cabo cambiando la tercera posición de los nucleótidos de cada codón; adicionalmente, algunos aminoácidos tales como leucina, serina y arginina tienen múltiples primeras y segundas posiciones que pueden añadir complejidad en la preparación del banco. Este procedimiento de mutagénesis se describe en detalle en Yansura y col. (1992) METHODS: A Companion to Methods in Enzymol. 4:151-158.

[0125] Preferentemente, un conjunto de vectores se genera con un intervalo de fuerzas de TIR para cada cistrón en su interior. Este conjunto limitado proporciona una comparación de niveles de expresión de cada cadena, además del rendimiento de los productos de anticuerpo deseados bajo diversas combinaciones de fuerzas de TIR. Las fuerzas de TIR pueden determinarse cuantificando el nivel de expresión de un gen indicador como se describe en detalle en Sinunons y col., patente de EE.UU. nº 5.840.523. Basándose en la comparación de fuerzas de traducción, las TIR individuales deseadas se seleccionan para combinarse en las construcciones de vector de expresión de la invención.

[0126] Células huésped procariotas adecuadas para expresar anticuerpos de la invención incluyen *Archaebacteria* y *Eubacteria*, tales como organismos Gram-negativos o Gram-positivos. Ejemplos de bacterias útiles incluyen *Escherichia* (por ejemplo, *E. coli*), bacilos (por ejemplo, *B. subtilis*), *Enterobacteria*, especies de *Pseudomonas* (por ejemplo, *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescans*, *Klebsiella, Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla* o *Paracoccus*. En una realización se usan células Gram-negativas. En una realización se usan células de *E. coli* como huéspedes para la invención. Ejemplos de cepas de *E. coli* incluyen la cepa W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pág. 1190-1219; depósito de ATCC nº 27.325) y derivados de las mismas, que incluyen la cepa 33D3 que tiene genotipo W3110 Δ*fhuA (*Δ*tonA) ptr3 lac Iq lacL8* Δ*ompT*Δ*(nmpc-fepE) degP41 kan*^{R} (patente de EE.UU. nº 5.639.635). También son adecuadas otras cepas y derivados de las mismas, tales como 294 de *E. coli* (ATCC 31.446), B de *E. coli, λ*1776 de *E. coli* (ATCC 31.537) y RV308 de *E. coli* (ATCC 31.608). Estos ejemplos son ilustrativos en vez de limitantes. Los procedimientos para construir derivados de cualquiera de las bacterias anteriormente mencionadas que tienen genotipos definidos se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo, Bass y col., Proteins, 8:309-314 (1990). Es generalmente necesario seleccionar bacterias apropiadas teniendo en cuenta la replicabilidad del replicón en las células de una bacteria. Por ejemplo, pueden usarse adecuadamente especies de *E. coli, Serratia*, o *Salmonella* como huésped cuando se usan plásmidos muy conocidos tales como pBR322, pBR325, pACYC177 o pKN410 para suministrar el replicón. Normalmente, la célula huésped debería secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas, e inhibidores de proteasas adicionales pueden incorporarse deseablemente en el cultivo celular.

Producción de anticuerpos

[0127] Las células huésped se transforman con los vectores de expresión anteriormente descritos y se cultivan en medios nutritivos convencionales modificados según convenga para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar genes que codifican las secuencias deseadas.

[0128] Transformación significa introducir ADN en el huésped procariota de manera que el ADN sea replicable, tanto como un elemento extracromosómico como por integrante cromosómico. Dependiendo de la célula huésped usada, la transformación se hace usando técnicas convencionales apropiadas para tales células. El tratamiento con calcio empleando cloruro de calcio es generalmente usado para células bacterianas que contienen barreras sustanciales de las paredes celulares. Otro procedimiento para la transformación emplea polietilenglicol/DMSO. Todavía otra técnica usada es la electroporación.

[0129] Las células procariotas usadas para producir los polipéptidos de la invención se cultivan en medios conocidos en la técnica y adecuados para el cultivo de las células huésped seleccionadas. Ejemplos de medios adecuados incluyen caldo Luria (LB) más complementos nutritivos necesarios. En algunas realizaciones, los medios también contiene un agente de selección elegido basándose en la construcción del vector de expresión, para permitir selectivamente el crecimiento de células procariotas que contienen el vector de expresión. Por ejemplo, se añade ampicilina al medio para el crecimiento de células que expresan gen de resistencia da ampicilina.

[0130] También puede incluirse cualquier complemento necesario, además de fuentes de carbono, nitrógeno y fosfato inorgánico, a concentraciones apropiadas introducido solo o como una mezcla con otro complemento o medio tal como una fuente de nitrógeno compleja. Opcionalmente, el medio de cultivo puede contener uno o más agentes reductores seleccionados del grupo que consiste en glutatión, cisteína, cistamina, tioglicolato, ditioeritritol y ditiotreitol.

[0131] Las células huésped procariotas se cultivan a temperatura adecuadas. Para el crecimiento de *E. coli*, por ejemplo, la temperatura preferida oscila de aproximadamente 20ºC a aproximadamente 39ºC, más preferentemente de aproximadamente 25ºC a aproximadamente 37ºC, incluso más preferentemente a aproximadamente 30ºC. El pH del medio puede ser cualquier pH que oscile de aproximadamente 5 a aproximadamente 9, dependiendo principalmente del organismo huésped. Para *E. coli,* el pH es preferentemente de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,4, y más preferentemente aproximadamente 7,0.

[0132] Si se usa un promotor inducible en el vector de expresión de la invención, la expresión de proteínas se induce en condiciones adecuadas para la activación del promotor. En un aspecto de la invención, los promotores PhoA se usan para controlar la transcripción de los polipéptidos. Por consiguiente, las células huésped transformadas se cultivan en un medio limitante con fosfato para la inducción. Preferentemente, el medio limitante de fosfato es el medio C.R.A.P (véase, por ejemplo, Simmons y col., J. Immunol. Methods (2002), 263:133-147). Puede usarse una variedad de otros inductores según la construcción de vectores empleada, como se conoce en la técnica.

[0133] En una realización, los polipéptidos expresados de la presente invención son secretados en y recuperados del periplasma de las células huésped. La recuperación de proteínas normalmente implica romper el microorganismo, generalmente por medios tales como choque osmótico, sonicación o lisis. Una vez se han roto las células, el residuo de células o las células completas pueden eliminarse por centrifugación o filtración. Las proteínas pueden purificarse adicionalmente, por ejemplo, por cromatografía en resina de afinidad. Alternativamente, las

proteínas pueden transportarse en los medios de cultivo y aislarse en su interior. Las células pueden eliminarse del cultivo y el sobrenadante de cultivo filtrarse y concentrarse para más purificación de las proteínas producidas. Los polipéptidos expresados pueden aislarse adicionalmente e identificarse usando procedimientos comúnmente conocidos tales como electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y ensayo de transferencia Western.

[0134] En un aspecto de la invención, la producción de anticuerpos se realiza en gran cantidad por un proceso de fermentación. Diversos procesos de fermentación de lotes alimentados a gran escala están disponibles para la producción de proteínas recombinantes. Las fermentaciones a gran escala tienen al menos 1000 litros de capacidad, preferentemente aproximadamente 1.000 a 100.000 litros de capacidad. Estos fermentadores usan hélices agitadoras para distribuir el oxígeno y nutrientes, especialmente glucosa (la fuente de carbono/energía preferida). Fermentación a pequeña escala se refiere generalmente a la fermentación en fermentador que no tiene más de aproximadamente 100 litros en capacidad volumétrica y puede oscilar de aproximadamente 1 litro a aproximadamente 100 litros.

[0135] En un procedimiento de fermentación, la inducción de expresión de proteínas es normalmente iniciada después de que las células se hayan cultivado bajo condiciones adecuadas a una densidad deseada, por ejemplo, una DO_{550} de aproximadamente 180-220, en cuyo estadio las células están en la fase estacionaria temprana. Puede usarse una variedad de inductores, según la construcción de vector empleada, como se conoce en la técnica y se describe anteriormente. Las células pueden cultivarse durante periodos más cortos antes de la inducción. Las células se inducen normalmente durante aproximadamente 12-50 horas, aunque puede usarse un tiempo de inducción más largo o más corto.

[0136] Para mejorar el rendimiento de producción y la calidad de los polipéptidos de la invención pueden modificarse diversas condiciones de fermentación. Por ejemplo, para mejorar el ensamblaje y plegamiento apropiado de los polipéptidos de anticuerpo secretados, vectores adicionales que expresan en exceso proteínas de chaperona tales como proteínas Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD y o DsbG) o FkpA (una peptidilprolil cis,trans-isomerasa con actividad de chaperona) pueden usarse para co-transformar las células procariotas huésped. Se ha demostrado que las proteínas de chaperona facilitan el plegamiento apropiado y la solubilidad de proteínas heterólogas producidas en células huésped bacterianas. Chen y col. (1999) J Bio Chem 274:19601-19605; Georgiou y col., patente de EE.UU. nº 6.083.715; Georgiou y col., patente de EE.UU. nº 6.027.888; Ambosmann y Pluckthun (2000) J. Biol. Chem 275:17100-17105; Ramm y Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17106-17113; Arie y col. (2001) Mol. Microbiol. 39:199-210.

[0137] Para minimizar la proteólisis de proteínas heterólogas expresadas (especialmente aquellas que son proteolíticamente sensibles), ciertas cepas huésped deficientes para enzimas proteolíticas pueden usarse para la presente invención. Por ejemplo, las cepas de células huésped pueden modificarse para efectuar mutación (mutaciones) genética(s) en los genes que codifican proteasas bacterianas conocidas tales como proteasa III, OmpT, DegP, Tsp, proteasa I, proteasa Mi, proteasa V, proteasa VI y combinaciones de las mismas. Algunas cepas deficientes para proteasas de *E. coli* están disponibles y se describen en, por ejemplo, Joly y col. (1998), arriba; Georgiou y col., patente de EE.UU. nº 5.264.365; Georgiou y col., patente de EE.UU. nº 5.508.192; Hara y col., Microbial Drug Resistance, 2:63-72 (1996).

[0138] En una realización, las cepas de *E. coli* deficientes para enzimas proteolíticas y transformadas con plásmidos que expresan en exceso una o más proteínas de chaperona se usan como células huésped en el sistema de expresión de la invención.

Purificación de anticuerpos

[0139] En una realización, la proteína de anticuerpos producida en este documento se purifica adicionalmente para obtener preparaciones que son sustancialmente homogéneas para ensayos y usos adicionales. Pueden emplearse los procedimientos de purificación de proteínas convencionales conocidos en la técnica. Los siguientes procedimientos son a modo de ejemplo de procedimientos de purificación adecuados: fraccionamiento sobre columnas de inmunoafinidad o intercambio de iones, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía sobre sílice o sobre una resina de intercambio catiónico tal como DEAE, cromatoenfoque, SDS-PAGE, precipitación con sulfato de amonio y filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75.

[0140] En un aspecto, la proteína A inmovilizada sobre una fase sólida se usa para la purificación por inmunoafinidad de los productos de anticuerpo de longitud completa de la invención. La proteína A es una proteína de la pared celular de 41 kD de *Staphylococcus aureas* que se une con alta afinidad a la región Fc de anticuerpos. Lindmark y col. (1983) J. Immunol. Meth. 62:1-13. La fase sólida a la que la proteína A se inmoviliza es preferentemente una columna que comprende una superficie de vidrio o sílice, más preferentemente una columna de vidrio de poro controlado o una columna de ácido silícico. En algunas aplicaciones, la columna se ha recubierto con un reactivo, tal como glicerol, en un intento por prevenir la adherencia no específica de contaminantes.

[0141] Como primera etapa de purificación, la preparación derivada del cultivo celular como se ha descrito anteriormente se aplica sobre la proteína A inmovilizada sobre la fase sólida para permitir la unión específica del anticuerpo de interés a la proteína A. Entonces, la fase sólida se lava para eliminar contaminantes no específicamente unidos a la fase sólida. Finalmente, el anticuerpo de interés se recupera de la fase sólida por elución.

Generación de anticuerpos usando células huésped eucariotas:

[0142] Los componentes de vector generalmente incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

(i) Componente de secuencia señal

[0143] Un vector para su uso en una célula huésped eucariota también puede contener una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína madura o polipéptido de interés. La secuencia señal heteróloga preferentemente seleccionada es una que es reconocida y procesada (es decir, escindida por una peptidasa señal) por la célula huésped. En la expresión de células de mamífero están disponibles secuencias señal de mamífero, además de conductores secretores víricos, por ejemplo, la señal gD del herpes simple.

[0144] El ADN para tal región precursora está ligado en el marco de lectura al ADN que codifica el anticuerpo.

(ii) Origen de replicación

[0145] Generalmente, un componente de origen de replicación no es necesario para vectores de expresión de mamífero. Por ejemplo, el origen de SV40 puede usarse normalmente sólo debido a que contiene el promotor temprano.

(iii) Componente de gen de selección

[0146] Los vectores de expresión y de clonación pueden contener un gen de selección, también llamado un marcador de selección. Genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metrotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas, cuando sean relevantes, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles de medios complejos.

[0147] Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula huésped. Aquellas células que son satisfactoriamente transformadas con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia a fármaco y, por tanto, sobrevive a la pauta de selección. Ejemplos de tal selección dominante usan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

[0148] Otro ejemplo de marcadores de selección adecuados para células de mamífero son aquellos que permiten la identificación de células competentes para la captación del ácido nucleico de anticuerpo, tal como DHFR, timidina cinasa, metalotioneína-I y -II, preferentemente genes de metalotioneína de primate, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc.

[0149] Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección de DHFR son primero identificadas cultivando todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metrotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Una célula huésped apropiada cuando se emplea DHFR natural es la línea de células de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en actividad de DHFR (por ejemplo, ATCC CRL-9096).

[0150] Alternativamente, células huésped (particularmente huéspedes naturales que contienen DHFR endógeno) transformadas o co-transformadas con secuencias de ADN que codifican un anticuerpo, proteína de DHFR natural y otro marcador de selección tal como aminoglucósido 3'-fosfotransferasa (APH) pueden seleccionarse por crecimiento celular en medio que contiene un agente de selección para el marcador de selección tal como un antibiótico aminoglucosídico, por ejemplo, kanamicina, neomicina o G418. Véase la patente de EE.UU. nº 4.965.199.

(iv) Componente de promotor

[0151] Los vectores de expresión y de clonación normalmente contienen un promotor que es reconocido por el organismo huésped y está operativamente ligado al ácido nucleico de polipéptidos del anticuerpo. Se conocen secuencias promotoras para eucariotas. Prácticamente todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente 25 a 30 bases en la dirección 5' del sitio en el que se inicia la transcripción. Otra

secuencia encontrada 70 a 80 bases en la dirección 5' desde el inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT en la que N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucariotas está una secuencia AATAAA que es la señal para la adición de la cola poli A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias están adecuadamente insertadas en vectores de expresión eucariotas.

[0152] La transcripción de polipéptidos del anticuerpo de vectores en células huésped de mamífero está controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus tales como virus del polioma, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y virus simio 40 (SV40), de promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, de promotores de choque térmico, siempre que tales promotores sean compatibles con los sistemas de células huésped.

[0153] Los promotores tempranos y tardíos del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación vírico de SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción de HindIII E. Un sistema para expresar ADN en huéspedes de mamífero usando el virus del papiloma bovino como vector se desvela en la patente de EE.UU. nº 4.419.446. Una modificación de este sistema se describe en la patente de EE.UU. nº 4.601.978. Véase también Reyes y col., Nature 297:598-601 (1982) sobre la expresión de ADNc de β-interferón humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina cinasa del virus del herpes simple. Alternativamente, como promotor puede usarse la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous.

(v) Componente de elemento potenciador

[0154] La transcripción de ADN que codifica el polipéptido de anticuerpo de la presente invención por eucariotas superiores aumenta frecuentemente insertando una secuencia potenciadora en el vector. Muchas secuencias potenciadoras se conocen ahora de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina, α-fetoproteína e insulina). Normalmente, sin embargo, se usará un potenciador de un virus de células eucariotas. Ejemplos incluyen el potenciador del SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador del promotor temprano del citomegalovirus, el potenciador del polioma en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, Nature 297:17-18 (1982) sobre elementos potenciadores para la activación de promotores eucariotas. El potenciador puede cortarse y empalmarse en el vector en una posición 5' o 3' con respecto a la secuencia codificante de polipéptidos del anticuerpo, pero preferentemente está localizado en un sitio 5' desde el promotor.

(vi) Componente de terminación de la transcripción

[0155] Los vectores de expresión usados en células huésped eucariotas normalmente también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Tales secuencias están comúnmente disponibles de las regiones sin traducir de 5' y, ocasionalmente 3', de ADN eucariotas o víricos o ADNc. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción sin traducir del ARNm que codifica un anticuerpo. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Véase el documento WO94/1102 y el vector de expresión desvelado en su interior.

(vii) Selección y transformación de células huésped

[0156] Células huésped adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores en este documento incluyen células eucariotas superiores descritas en este documento, que incluyen células huésped de vertebrado. La propagación de células de vertebrado en cultivo (cultivo de tejido) se ha vuelto un procedimiento rutinario. Ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles son la línea de riñón de mono CV1 transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham y col., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); células de riñón de hámster bebé (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma de cuello de útero humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather y col., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

[0157] Las células huésped se transforman con los vectores de expresión o de clonación anteriormente descritos para la producción de anticuerpos y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según convenga para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

(viii) Cultivo de células huésped

[0158] Las células huésped usadas para producir un anticuerpo de la presente invención pueden cultivarse en una variedad de medios. Medios comercialmente disponibles tales como Ham F10 (Sigma), medio mínimo esencial ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y medio Eagle modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para cultivar las células huésped. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham y col., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes y col., Anal. Biochem, 102:255 (1980), las patentes de EE.UU. nº 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; documentos WO 90/03430; WO 87/00195; o la patente de EE.UU. Re. 30.985 puede usarse como medio de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios puede complementarse según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro sódico, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMYCIN™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos normalmente presentes a concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También puede incluirse cualquier otro complemento necesario a concentraciones apropiadas que serían conocidas para aquellos expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son aquellas previamente usadas con la célula huésped seleccionada para expresión, y serán evidentes para el experto.

(ix) Purificación de anticuerpo

[0159] Si se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo puede producirse intracelularmente, o directamente secretarse en el medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como una primera etapa, el residuo particulado, tanto células huésped como fragmentos lisados, se eliminan, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Si el anticuerpo es secretado en el medio, los sobrenadantes de tales sistemas de expresión son generalmente primero concentrados usando un filtro de concentración de proteínas comercialmente disponible, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Un inhibidor de proteasa tal como PMSF puede incluirse en cualquiera de las anteriores etapas para inhibir la proteólisis y pueden incluirse antibióticos para prevenir el crecimiento de contaminantes fortuitos.

[0160] La composición de anticuerpo preparada a partir de las células puede purificarse usando, por ejemplo, cromatografía con hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y el isotipo de cualquier dominio de Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A puede usarse para purificar anticuerpos que se basan en cadenas pesadas γ1, γ2 o γ4 humanas (Lindmark y col., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para γ3 humana (Guss y col., EMBO J. 5:15671575 (1986)). La matriz a la que está unida el ligando de afinidad es casi siempre agarosa, pero están disponibles otras matrices. Matrices mecánicamente estables tales como vidrio de poro controlado o poli(estirenodivinil)benceno permiten flujos de velocidad más rápida y tiempos de procesamiento más cortos que los que pueden lograrse con agarosa. Si el anticuerpo comprende un dominio CH3, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas tales como fraccionamiento sobre una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía sobre heparina SEPHAROSE™, cromatografía sobre una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatoenfoque, SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio también están disponibles dependiendo del anticuerpo que vaya a recuperarse.

[0161] Tras cualquier etapa de purificación preliminar, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y los contaminantes pueden someterse a cromatografía de interacción hidrófoba a bajo pH usando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5-4,5, realizado preferentemente a bajas concentraciones de sales (por ejemplo, sal de aproximadamente 0-0,25 M).

Ensayos de actividad

[0162] Los anticuerpos de la presente invención pueden caracterizarse por sus propiedades físicas/químicas y funciones biológicas por diversos ensayos conocidos en la técnica.

[0163] Las inmunoglobulinas purificadas pueden caracterizarse adicionalmente por una serie de ensayos que incluyen, pero no se limitan a, secuenciación del extremo N, análisis de aminoácidos, cromatografía líquida de alta presión (HPLC) por exclusión de tamaño no desnaturalizante, espectrometría de masas, cromatografía de intercambio iónico y digestión con papaína.

[0164] En ciertas realizaciones de la invención, las inmunoglobulinas producidas en este documento se analizan para su actividad biológica. En algunas realizaciones, las inmunoglobulinas de la presente invención se prueban para su actividad de unión a antígeno. Los ensayos de unión a antígeno que se conocen en la técnica y

pueden usarse en este documento incluyen, sin limitación, cualquier ensayo de unión directo o competitivo que use técnicas tales como transferencias Western, radioinmunoensayos, ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción), inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, inmunoensayos fluorescentes e inmunoensayos de proteína A. Un ensayo de unión a antígeno ilustrativo se proporciona más adelante en la sección de ejemplos.

[0165] En una realización, la presente invención contempla un anticuerpo alterado que posee algunas funciones efectoras, pero no todas, que hacen que sea un candidato deseado para muchas aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante; sin embargo, ciertas funciones efectoras (tales como complemento y ADCC) son innecesarias o perjudiciales. En ciertas realizaciones, las actividades de Fc de la inmunoglobulina producida se miden para garantizar que sólo se mantengan las propiedades deseadas. Los ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* pueden realizarse para confirmar la reducción/agotamiento de actividades de CDC y/o ADCC. Por ejemplo, los ensayos de unión a receptor de Fc (FcR) pueden realizarse para garantizar que el anticuerpo carece de unión a FcγR (de ahí que probablemente carezca de actividad de ADCC), pero retiene capacidad de unión a FcRn. Las células primarias para mediar en ADCC, las células NK, sólo expresan FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR sobre células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991). Un ejemplo de un ensayo *in vitro* para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés se describe en la patente de EE.UU. nº 5.500.362 ó 5.821.337. Células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células asesinas naturales (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo,* por ejemplo, en un modelo animal tal como el desvelado en Clynes y col. PNAS (USA) 95:652-656 (1998). Los ensayos de unión a C1q también pueden llevarse a cabo para confirmar que el anticuerpo no puede unirse a C1q y de ahí que carezca de actividad de CDC. Para evaluar la activación del complemento puede realizarse un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro y col., J. Immunol. Methods 202:163 (1996). Las determinación de la unión a FcRn y la eliminación/semivida *in vivo* también pueden realizarse usando procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, aquellos descritos en la sección de ejemplos.

Anticuerpos humanizados

[0166] La presente invención engloba anticuerpos humanizados. En la técnica se conocen diversos procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado puede tener uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él de una fuente que es no humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se denominan frecuentemente en lo sucesivo residuos de "importación", que se toman normalmente de un dominio variable de "importación". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones y col. (1986) Nature 321:522-525; Riechmann y col. (1988) Nature 332:323-327; Verhoeyen y col. (1988) Science 239:1534-1536) sustituyendo las secuencias de la región hipervariable por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de EE.UU. nº 4.816.567) en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido con la secuencia correspondiente de un especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de la región hipervariable y posiblemente algunos residuos de FR están sustituidos con residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

[0167] La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que van a usarse en la preparación de anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. Según el llamado procedimiento "de mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba contra la biblioteca completa de secuencias de dominio variable humano conocido. La secuencia humana que está más próxima a la del roedor es entonces aceptada como la región estructural humana para el anticuerpo humanizado (Sims y col. (1993) J. Immunol. 151:2296; Chothia y col. (1987) J. Mol. Biol. 196:901. Otro procedimiento usa una región estructural particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. La misma región estructural puede usarse para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter y col. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285; Presta y col. (1993) J. Immunol., 151:2623.

[0168] Es adicionalmente importante que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, según un procedimiento, anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están comúnmente disponibles y son familiares para aquellos expertos en la materia. Están disponibles programas informáticos que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas visualizaciones permite el análisis de la probable función de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta forma, los residuos de FR pueden seleccionarse y combinarse a partir

de las secuencias del receptor y de importación de manera que se logre la característica de anticuerpo deseada, tal como aumento de la afinidad por el (los) antígeno(s) diana. En general, los residuos de la región hipervariable están directamente y principalmente sustancialmente implicados en influir la unión a antígeno.

Variantes de anticuerpo

[0169] En un aspecto, la invención proporciona fragmento de anticuerpo que comprende modificaciones en la superficie de separación de polipéptidos de Fc que comprenden la región Fc, en el que las modificaciones facilitan y/o promueven la heterodimerización. Estas modificaciones comprenden la introducción de una protuberancia en un primer polipéptido de Fc y una cavidad en un segundo polipéptido de Fc, siendo la protuberancia posicionable en la cavidad de manera que se promueva la complejación del primer y segundo polipéptidos de Fc. Los procedimientos de generación de anticuerpos con estas modificaciones se conocen en la técnica, por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. nº 5.731.168.

[0170] En algunas realizaciones se contemplan modificación (modificaciones) de secuencias de aminoácidos de los anticuerpos descritos en este documento. Por ejemplo, puede desearse mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo se preparan introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ácido nucleico del anticuerpo, o por síntesis de péptidos. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de, residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución se hace para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Las alteraciones de aminoácidos pueden introducirse en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo objeto en el momento de producirse la secuencia.

[0171] Un procedimiento útil para la identificación de ciertos residuos o regiones del anticuerpo que son las localizaciones preferidas para mutagénesis se llama “mutagénesis por barrido de alanina” como se describe por Cunningham y Well (1989) Science, 244:1081-1085. Aquí se identifica un residuo o grupo de residuos diana (por ejemplo, residuos cargados tales como arg, asp, his, lys y glu) y se sustituyen con un aminoácido neutro o negativamente cargado (lo más preferentemente alanina o polialanina) para afectar la interacción de los aminoácidos con antígeno. Entonces, aquellas localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan introduciendo más u otras variantes en, o para, los sitios de sustitución. Por tanto, mientras que el sitio para la introducción de una variación de la secuencia de aminoácidos está predeterminado, la naturaleza de la mutación por sí misma no necesita predeterminarse. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, el barrido de ala o la mutagénesis al azar se realiza en el codón o región diana y las inmunoglobulinas expresadas se criban para la actividad deseada.

[0172] Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones de extremos amino y/o carboxilo que oscilan en longitud de un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, además de inserciones secuencia dentro de la secuencia de un único o múltiples residuos de aminoácidos. Ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo de metionilo en el extremo N o el anticuerpo fusionado con un polipéptido citotóxico. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al extremo N o C del anticuerpo a una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.

[0173] Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen al menos un residuo de aminoácido en la molécula de anticuerpo sustituida con un residuo diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones de FR. Las sustituciones conservativas se muestran en la Tabla 2 bajo el encabezamiento de “Sustituciones preferidas”. Si tales sustituciones producen un cambio en la actividad biológica, entonces cambios más sustanciales, denominados “Sustituciones a modo de ejemplo” en la Tabla 2, o como se describen adicionalmente más adelante en referencia a clases de aminoácidos, pueden introducirse y cribarse los productos.

TABLA 2

Residuo original	Sustituciones a modo de ejemplo	Sustituciones preferidas
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	gln
Asp(D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu(E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; fe; norleucina	leu
Leu (L)	norleucina; ile; val; met; ala; fe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; fe; ile	leu
Fe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr; cys	cys
Thr(T)	ser	ser
Trp(W)	tyr; fe	tyr
Tyr (Y)	trp; fe; thr; ser	fe
Val (V)	ile; leu; met; fe; ala; norleucina	leu

[0174] Modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo se llevan a cabo seleccionando sustituciones que se diferencian significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura del esqueleto de polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de hoja o helicoidal, (b) la carga o hidrofobia de la molécula en el sitio diana, o (c) la masa de la cadena lateral. Residuos naturales se dividen en grupos basados en las propiedades de las cadenas laterales comunes:

(1) hidrófobos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
(2) hidrófilos neutros: cys, ser, thr;
(3) ácidos: asp, glu;
(4) básicos: asn, gln, his, lys, arg;
(5) residuos que influyen en la orientación de cadenas: gly, pro; y
(6) aromáticos: trp, tyr, fe.

[0175] Las sustituciones no conservativas supondrán el intercambio de un miembro de una de estas clases con otra clase.

[0176] Un tipo de variante de sustitución implica sustituir uno o más residuos de la región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para el desarrollo posterior tendrá(n) propiedades biológicas mejoradas con respecto al anticuerpo parental del que se generan. Una forma conveniente de generar tales variantes de sustitución implica maduración por afinidad usando expresión en fago. Brevemente, varios sitios de la región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) se maduran para generar todas las posibles sustituciones de aminoácidos en cada sitio. Por tanto, los anticuerpos generados se expresan en partículas de fago filamentoso como fusiones con el producto génico III de M13 encapsidado dentro de cada partícula. Entonces, las variantes expresadas en fago se criban para su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) como se desvela en este documento. Con el fin de identificar sitios de la región hipervariable candidatos para la modificación, la mutagénesis por barrido de alanina puede realizarse para identificar residuos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión a antígeno. Alternativamente, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Tales residuos de contacto y residuos vecinos son candidatos para la sustitución según las técnicas elaboradas en este documento. Una vez se generan tales variantes, el panel de variantes se somete a cribado como se describe en este documento y los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes pueden seleccionarse para el posterior desarrollo.

[0177] Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican variantes de secuencias de aminoácidos del anticuerpo se preparan mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencias de aminoácidos que se producen naturalmente) o preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótido (o dirigida a sitio), mutagénesis por PCR y mutagénesis en casete de una versión de variante o de no variante anteriormente preparada del anticuerpo.

[0178] Puede desearse introducir una o más modificaciones de aminoácidos en una región Fc de los polipéptidos de inmunoglobulina de la invención, generándose así una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácido (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos que incluyen la de una cisteína bisagra.

[0179] Según esta descripción y las enseñanzas de la materia, se contempla que en algunas realizaciones un anticuerpo usado en los procedimientos de la invención pueda comprender una o más alteraciones con respecto al anticuerpo homólogo natural, por ejemplo, en la región Fc. Sin embargo, estos anticuerpos retendrían sustancialmente las mismas características requeridas para la utilidad terapéutica con respecto a su homólogo natural. Por ejemplo, se cree que pueden hacerse ciertas alteraciones en la región Fc que producirían unión de C1q alterada (es decir, tanto mejorada como disminuida) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), por ejemplo, como se describe en el documento WO99/51642. Véase también Duncan & Winter Nature 322:738-40 (1988); patente de EE.UU. nº 5.648.260; patente de EE.UU. nº 5.624.821; y documento WO94/29351 referente a otros ejemplos de variantes de la región Fc.

Inmunoconjugados

[0180] La invención también se refiere a inmunoconjugados, o conjugados anticuerpo-fármaco (ADC), que comprenden un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, un fármaco, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radiactivo (es decir, un origen radioconjugado).

[0181] El uso de conjugados anticuerpo-fármaco para la administración local de agentes citotóxicos o citostáticos, es decir, fármacos para destruir o inhibir células tumorales en el tratamiento de cáncer (Syrigos y Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614; Niculescu-Duvaz y Springer (1997) Adv. Drg Del. Rev. 26:151-172; la patente de EE.UU. 4.975.278) permite teóricamente la elección de tumores como diana por el resto de fármaco, y la acumulación intracelular en su interior, en el que la administración sistémica de estos agentes de fármaco sin conjugar puede producir niveles inaceptables de toxicidad para células normales, además de las células tumorales buscadas para ser eliminadas (Baldwin y col., (1986) Lancet pp. (Mar. 15, 1986):603-05; Thorpe, (1985) “Antibody Carriers of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review”, en Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications, A. Pinchera y col. (ed.s), pág. 475-506). Así se busca la eficacia máxima con toxicidad mínima. Se ha informado que tanto los anticuerpos policlonales como los anticuerpos monoclonales son útiles en estas estrategias (Rowland y col., (1986) Cancer Immunol. Immunother., 21:183-87). Los fármacos usados en estos procedimientos incluyen daunomicina, doxorubicina, metrotrexato y vindesina (Rowland y col., (1986) arriba). Las toxinas usadas en los conjugados de anticuerpo-toxina incluyen toxinas bacterianas tales como toxina diftérica, toxinas de las plantas tales como ricina, toxinas de moléculas pequeñas tales como geldanamicina (Mandler y col. (2000) Jour. de the Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581; Mandler y col. (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028; Mandler y col. (2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791), maitansinoides (documento EP 1391213; Liu y col., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623) y caliqueamicina (Lode y col. (1998) Cancer Res. 58:2928; Hinman y col. (1993) Cancer Res. 53:3336-3342). Las toxinas pueden efectuar sus efectos citotóxicos y citostáticos por mecanismos que incluyen unión a tubulina, unión a ADN o inhibición de topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tienden a ser inactivos o menos activos cuando se conjugan con anticuerpos o ligandos de receptores de proteínas grandes.

[0182] ZEVALIN® (tiuxetano de ibritumomab, Biogen/Idec) es un conjugado de anticuerpo-radioisótopo compuesto por un anticuerpo monoclonal IgG1 kappa murina dirigido contra el antígeno CD20 encontrado sobre la superficie de linfocitos B normales y malignos y unido al radioisótopo ^{111}In o ^{90}Y por un ligador-quelante de tiourea (Wiseman y col. (2000) Eur. Jour. Nucl. Med. 27(7):766-77; Wiseman y col. (2002) Blood 99(12):4336-42; Witzig y col. (2002) J. Clin. Oncol. 20(10):2453-63; Witzig y col. (2002) J. Clin. Oncol. 20(15):3262-69). Aunque ZEVALIN tiene actividad contra linfoma no Hodgkin (LNH) de linfocitos B, la administración produce citopenias graves y prolongadas en la mayoría de los pacientes. MYLOTARG™ (ozogamicina de gemtuzumab, Wyeth Pharmaceuticals), un conjugado anticuerpo-fármaco compuesto por un anticuerpo CD33 humano ligado a caliqueamicina, fue autorizado en 2000 para el tratamiento de leucemia mieloide aguda mediante inyección (Drugs in the Future (2000) 25(7):686; patentes de EE.UU. nº 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001). Cantuzumab mertansina (Immunogen, Inc.), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto por el anticuerpo C242 humano ligado por el ligador de disulfuro SPP al resto del fármaco maitansinoide, DM1, está avanzando en ensayos de fase II para el tratamiento de cánceres que expresan CanAg, tales como colon, pancreático, gástrico y otros. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto por el anticuerpo monoclonal dirigido contra el antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) ligado al resto del fármaco maitansinoide, DM1, está en desarrollo para el posible tratamiento de tumores de próstata. Los péptidos de auristatina, auristatina E (AE) y monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de dolastatina, se conjugaron con anticuerpos monoclonales quiméricos cBR96 (específicos para Lewis Y en carcinomas) y cAC10 (específico

para CD30 en tumores malignos hematológicos) (Doronina y col. (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784) y están en desarrollo terapéutico.

[0183] Agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de tales inmunoconjugados se han descrito anteriormente. La toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen cadena A de la difteria, fragmentos activos de no unión de la toxina diftérica, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modecina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993. Una variedad de radionúclidos están disponibles para la producción de anticuerpos radioconjugados. Ejemplos incluyen ^{212}Bi, ^{131}I, ^{131}In, ^{90}Y y ^{186}Re. Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se preparan usando una variedad de agentes de acoplamiento a proteína bifuncionales tal como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno-2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina puede prepararse como se describe en Vitetta y col., Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentriaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante a modo de ejemplo para la conjugación de radionucleótido con el anticuerpo. Véase el documento WO94/11026.

[0184] En este documento también se contemplan conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de moléculas pequeñas tales como una caliqueamicina, maitansinoides, un tricoteceno y CC1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad de toxina.

Maitansina y maitansinoides

[0185] En una realización, un anticuerpo (longitud completa o fragmentos) de la invención está conjugado con una o más moléculas de maitansinoide.

[0186] Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de tubulina. La maitansina se aisló por primera vez del arbusto del África oriental *Maytenus serrata* (patente de EE.UU. nº 3.896.111). Posteriormente se descubrió que ciertos microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres de maitansinol C-3 (patente de EE.UU. nº 4.151.042). El maitansinol sintético y los derivados y análogos del mismo se desvelan, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. nº 4.137.230; 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663; y 4.371.533.

Conjugados de maitansinoide-anticuerpo

[0187] En un intento por mejorar su índice terapéutico, la maitansina y los maitansinoides se han conjugado con anticuerpos que se unen específicamente a antígenos de células tumorales. Los inmunoconjugados que contienen maitansinoides y su uso terapéutico se desvelan, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. nº 5.208.020, 5.416.064 y la patente europea EP 0 425 235 B1. Liu y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996) describieron inmunoconjugados que comprenden un maitansinoide designado DM1 ligado con el anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra cáncer colorrectal humano. Se encontró que el conjugado era altamente citotóxico hacia células de cáncer de colon cultivadas y mostró actividad antitumoral en un ensayo de crecimiento tumoral *in vivo*. Chari y col., Cancer Research 52:127-131 (1992) describen inmunoconjugados en los que un maitansinoide se conjugó mediante un ligador de disulfuro al anticuerpo A7 murino que se une a un antígeno sobre líneas de células de cáncer de colon humano, o a otro anticuerpo monoclonal murino TA.1 que se une al oncogén HER-2/neu. La citotoxicidad del conjugado de TA.1-maitansinoide se probó *in vitro* en la línea de células de cáncer de mama humano SK-BR-3, que expresa 3 x 10^5 antígenos de superficie de HER-2 por célula. El conjugado de fármaco alcanzó un grado de citotoxicidad similar al fármaco de maitansinoide libre, que podría aumentarse aumentando el número de moléculas de maitansinoide por molécula de anticuerpo. El conjugado de A7-maitansinoide mostró baja citotoxicidad sistémica en ratones.

Conjugados de anticuerpo-maitansinoide (inmunoconjugados)

[0188] Se preparan conjugados de anticuerpo-maitansinoide uniendo químicamente un anticuerpo con una molécula de maitansinoide sin disminuir significativamente la actividad biológica de tanto el anticuerpo como la molécula de maitansinoide. Un promedio de 3-4 moléculas de maitansinoide conjugado por molécula de anticuerpo ha mostrado eficacia en potenciar la citotoxicidad de células diana sin afectar negativamente la función o solubilidad del anticuerpo, aunque se esperaría que incluso una molécula de toxina/anticuerpo potenciara la citotoxicidad con

respecto al uso de anticuerpo desnudo. Los maitansinoides son muy conocidos en la técnica y pueden sintetizarse por técnicas conocidas o aislarse a partir de fuentes naturales. Maitansinoides adecuados se desvelan, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 5.208.020 y en las otras patentes y publicaciones de no patente citadas anteriormente en este documento. Los maitansinoides preferidos son maitansinol y análogos de maitansinol modificados en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula de maitansinol, tales como diversos ésteres de maitansinol.

[0189] Hay muchos grupos de enlace conocidos en la técnica para la preparación de conjugados de anticuerpo-maitansinoide que incluyen, por ejemplo, los desvelados en la patente de EE.UU. nº 5.208.020 o la patente EP 0 425 235 B1, y Chari y col., Cancer Research 52:127-131 (1992). Los grupos de enlace incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles de ácido, grupos fotolábiles, grupos lábiles de peptidasa o grupos lábiles de esterasa como se ha desvelado en las patentes anteriormente identificadas, prefiriéndose grupos disulfuro y tioéter.

[0190] Los conjugados de anticuerpo y maitansinoide pueden prepararse usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno-2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Agentes de acoplamiento particularmente preferidos incluyen N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) (Carlsson y col., Biochem. J. 173:723-737 [1978]) y N-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato (SPP) para proporcionar un enlace disulfuro.

[0191] El ligador puede unirse a la molécula de maitansinoide en diversas posiciones dependiendo del tipo de enlace. Por ejemplo, puede formarse un enlace éster mediante reacción con un grupo hidroxilo usando técnicas de acoplamiento convencionales. La reacción puede producirse en la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo. En una realización preferida, el enlace se forma en la posición C-3 de maitansinol o un análogo de maitansinol.

Caliqueamicina

[0192] Otro inmunoconjugado de interés comprende un anticuerpo conjugado con una o más moléculas de caliqueamicina. La familia de antibióticos de la caliqueamicina puede producir roturas de ADN bicatenario a concentraciones inferiores a picomolares. Para la preparación de conjugados de la familia de la caliqueamicina véanse las patentes de EE.UU. 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001, 5.877.296 (todas a American Cyanamid Company). Los análogos estructurales de la caliqueamicina que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, γ_1^I, α_2^I, α_3^I, N-acetil-γ_1^I, PSAG y θ^I_1 (Hinman y col., Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode y col., Cancer Research 58:2925-2928 (1998) y las patentes de EE.UU. anteriormente mencionadas a American Cyanamid). Otro fármaco antitumoral con el que puede conjugarse el anticuerpo es QFA que es un antifolato. Tanto la caliqueamicina como QFA tienen sitios de acción intracelular y no atraviesan fácilmente la membrana plasmática. Por tanto, la captación celular de estos agentes por la internalización mediada por anticuerpos potencia enormemente sus efectos citotóxicos.

Otros agentes citotóxicos

[0193] Otros agentes antitumorales que pueden conjugarse con los anticuerpos de la invención incluyen BCNU, estreptozoicina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocida conjuntamente el complejo LL-E33288 descrito en las patentes de EE.UU. 5.053.394, 5.770.710, además de esperamicinas (patente de EE.UU. 5.877.296).

[0194] Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen cadena A de la difteria, fragmentos activos de no unión de toxina diftérica, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modecina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993.

[0195] La presente invención contempla adicionalmente un inmunoconjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una endonucleasa de ADN tal como una desoxirribonucleasa; ADNsa).

[0196] Para la destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo altamente radiactivo. Están disponibles una variedad de isótopos radiactivos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Ejemplos incluyen At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212},P^{32}, Pb^{212} e isótopos radiactivos de Lu. Si el conjugado se usa para la detección, puede comprender un átomo radiactivo para estudios escintigráficos,

por ejemplo, Ttc^{99m} o I^{123}, o una marca de espín para la obtención de imágenes de resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como obtención de imágenes de resonancia magnética, irm), tal como yodo-123 de nuevo, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

[0197] Las radiomarcas u otras marcas pueden incorporarse en el conjugado de formas conocidas. Por ejemplo, el péptido puede biosintetizarse o puede sintetizarse por síntesis química de aminoácidos usando precursores de aminoácidos adecuados que implican, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Marcas tales como Tc^{99m} o I^{123}, Re^{186}, Re^{188} e In^{111} pueden unirse por un residuo de cisteína en el péptido. Itrio-90 puede unirse por un residuo de lisina. El procedimiento IODOGEN (Fraker y col. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57 puede usarse para incorporar yodo-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describe otros procedimientos en detalle.

[0198] Los conjugados de anticuerpo y agente citotóxico pueden prepararse usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno-2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina puede prepararse como se describe en Vitetta y col., Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentriaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante a modo de ejemplo para la conjugación de radionucleótido con el anticuerpo. Véase el documento WO94/11026. El ligador puede ser un "ligador escindible" que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, puede usarse un ligador lábil de ácido, ligador sensible a peptidasa, ligador fotolábil, ligador de dimetilo o ligador que contiene disulfuro (Chari y col., Cancer Research 52:127-131 (1992); patente de EE.UU. nº 5.208.020).

[0199] Los compuestos de la invención contemplan expresamente, pero no se limitan a, ADC preparado con reactivos de ligador cruzado: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) que están comercialmente disponibles (por ejemplo, de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., EE.UU.). Véanse las páginas 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog.

Preparación de conjugados de anticuerpo-fármaco

[0200] En los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) de la invención, un anticuerpo (Ab) está conjugado con uno o más restos de fármaco (D), por ejemplo, aproximadamente 1 a aproximadamente 20 restos de fármaco por anticuerpo, mediante un ligador (L). El ADC de fórmula I puede prepararse por varias rutas empleando reacciones de química orgánica, condiciones y reactivos conocidos para aquellos expertos en la materia que incluyen: (1) reacción de un grupo nucleófilo de un anticuerpo con un reactivo de ligador bivalente para formar Ab-L, mediante un enlace covalente, seguido de reacción con un resto de fármaco D; y (2) reacción de un grupo nucleófilo de un resto de fármaco con un reactivo ligador de bivalente, para formar D-L, mediante un enlace covalente, seguido de reacción con el grupo nucleófilo de un anticuerpo.

$$Ab\text{-}(L\text{-}D)_p \qquad I$$

[0201] Los grupos nucleófilos en anticuerpos incluyen, pero no se limitan a: (i) grupos amina del extremo N, (ii) grupos amina de la cadena lateral, por ejemplo, lisina, (iii) grupos tiol de la cadena lateral, por ejemplo, cisteína, y (iv) grupos hidroxilo o amino de azúcar en los que el anticuerpo está glicosilado. Los grupos amina, tiol e hidroxilo son nucleófilos y pueden reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en restos de ligador y reactivos de ligador que incluyen: (i) ésteres activos tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformiatos y haluros de ácido; (ii) haluros de alquilo y bencilo tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, grupos carboxilo y maleimida. Ciertos anticuerpos tienen disulfuros entre cadenas reducibles, es decir, puentes de cisteína. Los anticuerpos pueden hacerse reactivos para la conjugación con reactivos de ligador mediante tratamiento con un agente reductor tal como DTT (ditiotreitol). Por tanto, cada puente de cisteína formará teóricamente dos nucleófilos de tiol reactivos. Grupos nucleófilos adicionales pueden introducirse en anticuerpos mediante la reacción de lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) produciendo la conversión de una amina en un tiol.

[0202] Los conjugados de anticuerpo-fármaco de la invención también puede producirse por modificación del anticuerpo para introducir restos electrófilos que pueden reaccionar con sustituyentes nucleófilos en el reactivo de ligador o fármaco. Los azúcares de anticuerpos glicosilados pueden oxidarse, por ejemplo, con reactivos oxidantes de peryodato para formar grupos aldehído o cetona que pueden reaccionar con el grupo amina de reactivos o restos de ligador de fármaco. Los grupos de base de Schiff de iminas resultantes pueden formar un enlace estable, o pueden reducirse, por ejemplo, por reactivos de borohidruro para formar enlaces de amina estables. En una realización, la reacción de la porción de hidrato de carbono de un anticuerpo glicosilado con tanto galactosa oxidasa

como meta-peryodato de sodio pueden dar grupos carbonilo (aldehído y cetona) en la proteína que pueden reaccionar con grupos apropiados en el fármaco (Hermanson, Bioconjugate Techniques). En otra realización, las proteínas que contienen residuos de serina o treonina del extremo N pueden reaccionar con meta-peryodato de sodio, produciendo la producción de un aldehído en lugar del primer aminoácido (Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146; documento US 5362852). Tal aldehído puede hacerse reaccionar con un resto de fármaco o nucleófilo ligador.

[0203] Asimismo, los grupos nucleófilos en un resto de fármaco incluyen, pero no se limitan a: grupos amina, tiol, hidroxilo, hidrazida, oxima, hidracina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidracina y arilhidrazida que pueden reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en restos de ligador y reactivos de ligador que incluyen: (i) ésteres activos tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformiatos y haluros de ácido; (ii) haluros de alquilo y bencilo tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, grupos carboxilo y maleimida.

[0204] Alternativamente, una proteína de fusión que comprende el anticuerpo y agente citotóxico puede prepararse, por ejemplo, por técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. La longitud del ADN puede comprender regiones respectivas que codifican las dos porciones del conjugado tanto adyacentes entre sí como separadas por una región que codifica un péptido ligador que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

[0205] En otra realización más, el anticuerpo puede conjugarse con un “receptor” (como estreptavidina) para la utilización en la elección previa como diana de tumores en el que el conjugado de anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de la eliminación del conjugado sin unir de la circulación usando un agente de limpieza y luego administración de un “ligando” (por ejemplo, avidina) que está conjugado con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

Derivados de anticuerpos

[0206] Los anticuerpos de la presente invención pueden modificarse adicionalmente para contener restos no proteináceos adicionales que se conocen en la técnica y están fácilmente disponibles. Preferentemente, los restos adecuados para la derivatización del anticuerpo son polímeros solubles en agua. Ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (tanto homopolímeros como copolímeros al azar) y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)-polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol), poli(alcohol vinílico) y mezclas de los mismos. El polietilenglicol-propionaldehído puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular, y puede estar ramificada o sin ramificar. El número de polímeros unidos al anticuerpo puede variar, y si está unido más de un polímero, pueden ser moléculas iguales o diferentes. En general, el número y/o tipo de polímeros usados para la derivatización pueden determinarse basándose en consideraciones que incluyen, pero no se limitan a, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo que va a mejorarse, si el anticuerpo derivado se usará o no en una terapia en condiciones definidas, etc.

Especificidad por antígenos

[0207] La presente invención es aplicable a anticuerpos que se unen específicamente a c-met. Los anticuerpos usados en los procedimientos de la invención son específicos para antígenos que son polipéptidos biológicamente importantes. Preferentemente, los anticuerpos de la invención son útiles para terapia o diagnóstico de enfermedades o trastornos en un mamífero. Los anticuerpos de la invención incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos bloqueantes, anticuerpos neutralizantes o anticuerpo conjugados.

[0208] Los antígenos solubles o fragmentos de los mismos, opcionalmente conjugados con otras moléculas, pueden usarse como inmunógenos para generar anticuerpos. Para moléculas transmembrana tales como receptores, los fragmentos de estas moléculas (por ejemplo, el dominio extracelular de un receptor) pueden usarse como inmunogén. Alternativamente, las células que expresan la molécula transmembrana pueden usarse como inmunogén. Tales células pueden derivarse de una fuente natural (por ejemplo, líneas de células cancerosas) o pueden ser células que se han transformado por técnicas recombinantes para expresar la molécula transmembrana. Otros antígenos y formas de los mismos útiles para preparar anticuerpos serán evidentes para aquellos en la materia.

Formulaciones farmacéuticas

[0209] Las formulaciones terapéuticas que comprenden un anticuerpo de la invención se preparan para almacenamiento mezclando el anticuerpo que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizadores fisiológicamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A.

Ed. (1980)), en forma de disoluciones acuosas, liofilizadas u otras formulaciones secas. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables son no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, histidina y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; alcohol fenólico, butílico o bencílico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

[0210] La formulación en este documento también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que está tratándose, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan adversamente entre sí. Tales moléculas están adecuadamente presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el fin previsto.

[0211] Los principios activos también pueden estar atrapados en una microcápsula preparada, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsula de hidroximetilcelulosa o de gelatina y microcápsula de poli-(metacilato de metilo), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

[0212] Las formulaciones que van a usarse para administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se realiza por filtración a través de membranas de filtración estériles.

[0213] Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen la inmunoglobulina de la invención, matrices que están en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas o microcápsula. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente de EE.UU. nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de γ-etilo, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Aunque polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Si las inmunoglobulinas encapsuladas siguen en el cuerpo durante un tiempo largo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a humedad a 37ºC, produciendo una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Pueden idearse estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares mediante intercambio tio-disulfuro, la estabilización puede lograrse modificando residuos sulfhidrilo, liofilizando a partir de disoluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matriz de polímero específicas.

Usos

[0214] Una inmunoglobulina de la presente invención puede usarse, por ejemplo, en procedimientos terapéuticos *in vitro, ex vivo* e *in vivo*. La invención proporciona diversos procedimientos basados en el uso de fragmentos de anticuerpos monovalentes que tienen propiedades superiores en comparación con anticuerpos monovalentes convencionales. En ciertas afecciones patológicas es necesario y/o deseable utilizar anticuerpos monovalentes. Por tanto, en algunos casos, un anticuerpo terapéutico puede efectuar su acción terapéutica sin que implique actividades mediadas por el sistema inmunitario tales como las funciones efectoras ADCC, fagocitosis y CDC. En tales situaciones se desea generar formas de anticuerpos en las que tales actividades sean sustancialmente reducidas o eliminadas. También es ventajoso si el anticuerpo es de una forma que pueda prepararse eficientemente y con alto rendimiento. La presente invención proporciona estos anticuerpos, que pueden usarse para una variedad de fines, por ejemplo, como agentes terapéuticos, profilácticos y diagnósticos. Por ejemplo, la invención proporciona procedimientos para tratar una enfermedad, comprendiendo dichos procedimientos administrar a un sujeto en necesidad de tratamiento un fragmento de anticuerpo altamente estable que comprende un único brazo de unión a antígeno, mediante el cual se trata la enfermedad. Cualquiera de los fragmentos de anticuerpos de la invención descritos en este documento pueden usarse en procedimientos terapéuticos (o profilácticos o de diagnóstico) descritos en este documento.

[0215] Los anticuerpos de la invención pueden usarse como un antagonista para bloquear parcialmente o completamente la actividad de antígeno específica *in vitro, ex vivo* y/o *in vivo*. Además, al menos algunos de los anticuerpos de la invención pueden neutralizar la actividad de antígeno de otras especies. Por consiguiente, los anticuerpos de la invención pueden usarse para inhibir una actividad de antígeno específica, por ejemplo, en un cultivo de células que contiene el antígeno, en sujetos humanos o en otros sujetos mamíferos que tienen el antígeno con el que un anticuerpo de la invención reacciona de forma cruzada (por ejemplo, chimpancé, babuino, tití, cinomolgo y rhesus, cerdo o ratón). En una realización, el anticuerpo de la invención puede usarse para inhibir actividades de antígeno poniendo en contacto el anticuerpo con el antígeno de forma que se inhiba la actividad de antígeno. Preferentemente, el antígeno es una molécula de proteína humana.

[0216] En una realización, un anticuerpo de la invención puede usarse en un procedimiento para inhibir un antígeno en un sujeto que padece un trastorno en el que la actividad de antígeno es perjudicial que comprende administrar al sujeto un anticuerpo de la invención de forma que se inhiba la actividad de antígeno en el sujeto. Preferentemente, el antígeno es una molécula de proteína humana y el sujeto es un sujeto humano Alternativamente, el sujeto puede ser un mamífero que expresa el antígeno con el que se une un anticuerpo de la invención. Todavía adicionalmente, el sujeto puede ser un mamífero en el que el antígeno se ha introducido (por ejemplo, por administración del antígeno o por expresión de un transgén de antígeno). Un anticuerpo de la invención puede administrarse a un sujeto humano para fines terapéuticos. Además, un anticuerpo de la invención puede administrarse a un mamífero no humano que expresa un antígeno con el que la inmunoglobulina reacciona de forma cruzada (por ejemplo, un primate, cerdo o ratón) para fines veterinarios o como un modelo animal de enfermedad humana. Con respecto a esto último, tales modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de anticuerpos de la invención (por ejemplo, prueba de dosificaciones y transcursos de tiempo de administración). Los anticuerpos bloqueantes anti-c-met de la invención son terapéuticamente útiles. Los anticuerpos de la invención pueden usarse para tratar, inhibir, retardar la progresión de, prevenir/retardar la reaparición de, mejorar o prevenir enfermedades, trastornos o afecciones asociadas a la expresión y/o actividad anormal de una o más moléculas de antígeno que incluyen, pero no se limitan a, tumores malignos y benignos; tumores malignos no leucémicos y linfoides; trastornos neuronales, de la glía, astrocíticos, hipotalámicos y otros glandulares, macrofágicos, epiteliales, del estroma y blastocélicos; y trastornos inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos.

[0217] En un aspecto, un anticuerpo bloqueante de la invención es específico para un antígeno de ligando e inhibe la actividad de antígeno bloqueando o interfiriendo con la interacción de ligando-receptor que implica el antígeno de ligando, inhibiéndose así la ruta de señalización correspondiente y otros eventos moleculares o celulares. La invención también caracteriza anticuerpos específicos de receptor que no previenen necesariamente la unión a ligando, pero interfieren con la activación de receptores, inhibiéndose así cualquier respuesta que normalmente sería iniciada por la unión a ligando. La invención también engloba anticuerpos que se unen tanto preferentemente como exclusivamente a complejos de ligando-receptor. Un anticuerpo de la invención también puede actuar de agonista de un receptor de antígeno particular, potenciándose, mejorándose o activándose así tanto todas las actividades como actividades parciales de la activación de receptores mediada por ligando.

[0218] En ciertas realizaciones, un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico se administra al paciente. En algunas realizaciones, el inmunoconjugado y/o antígeno al que está unido es/son internalizado(s) por la célula, produciéndose un aumento de la eficacia terapéutica del inmunoconjugado en la destrucción de la célula diana a la que se une. En una realización, el agente citotóxico elige como diana o interfiere con ácido nucleico en la célula diana. Ejemplos de tales agentes citotóxicos incluyen cualquiera de los agentes quimioterapéuticos observados en este documento (tales como un maitansinoide o una caliqueamicina), un isótopo radiactivo o una ribonucleasa o una ADN endonucleasa.

[0219] Los anticuerpos de la invención pueden usarse tanto solos como en combinación con otras composiciones en una terapia. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede coadministrarse con otro anticuerpo, agente(s) quimioterapéutico(s) (incluyendo mezclas de agentes quimioterapéuticos), otro(s) agente(s) citotóxico(s), agente(s) antiangiogénico(s), citocinas y/o agente(s) inhibidor(es) del crecimiento. Si un anticuerpo de la invención inhibe el crecimiento tumoral, puede ser particularmente deseable combinarlo con uno o varios agentes terapéuticos que también inhiben el crecimiento tumoral. Alternativamente, o adicionalmente, el paciente puede recibir radioterapia combinada (por ejemplo, irradiación con haces externos o terapia con un agente marcado radiactivo tal como un anticuerpo). Tales terapias combinadas observadas anteriormente incluyen administración combinada (en la que los dos o más agentes están incluidos en la misma formulación o en formulaciones separadas) y administración separada, en cuyo caso la administración del anticuerpo de la invención puede producirse antes de, y/o tras, la administración de la terapia o terapias complementarias.

[0220] El anticuerpo de la invención (y agente terapéutico complementario) se administra(n) por cualquier vía adecuada, que incluye administración parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal y, si se desea, para tratamiento local, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. Además, el anticuerpo se administra adecuadamente por infusión por pulsos, particularmente con dosis decrecientes del anticuerpo. La dosificación

puede ser por cualquier vía adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica.

[0221] La composición de anticuerpo de la invención se formulará, dosificará y administrará en un modo de acuerdo con la buena práctica médica. Los factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno particular que está tratándose, el mamífero particular que está tratándose, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el procedimiento de administración, el programa de administración y otros factores conocidos para los médicos generales. El anticuerpo no necesita estar formulado, pero está opcionalmente formulado, con uno o más agentes actualmente usados para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de tales otros agentes depende de la cantidad de anticuerpos de la invención presentes en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento, y otros factores tratados anteriormente. Éstos se usan generalmente en las mismas dosificaciones y con vías de administración como se usan anteriormente en este documento o aproximadamente del 1 al 99% de las dosificaciones empleadas hasta ahora.

[0222] Para la prevención o el tratamiento de enfermedad, la dosificación apropiada de un anticuerpo de la invención (cuando se usa solo o en combinación con otros agentes tales como agentes quimioterapéuticos) dependerá del tipo de enfermedad que va a tratarse, el tipo de anticuerpo, la gravedad y transcurso de la enfermedad, si el anticuerpo se administra o no para fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, la historia clínica del paciente y la respuesta al anticuerpo, y el criterio del médico adjunto. El anticuerpo se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1 mg/kg-10 mg/kg) de anticuerpo es una dosificación candidata inicial para administración al paciente, tanto si es, por ejemplo, por una o más administraciones separadas como por infusión continua. Una dosificación diaria típica podría oscilar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento es sostenido hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas de enfermedad. Una dosificación a modo de ejemplo del anticuerpo estaría en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Por tanto, una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas) puede administrarse al paciente. Tales dosis pueden administrarse intermitentemente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de forma que el paciente reciba de aproximadamente dos a aproximadamente veinte, por ejemplo, aproximadamente seis dosis del anticuerpo). Puede administrarse una dosis de carga mayor inicial, seguida de una o más dosis inferiores. Una pauta de dosificación a modo de ejemplo comprende administrar una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguida de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg de anticuerpo. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación. El progreso de esta terapia es fácilmente monitorizada por técnicas y ensayos convencionales.

Artículos de fabricación

[0223] En otro aspecto de la invención se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto sobre o asociado al recipiente. Recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringuillas, etc. Los recipientes pueden formarse a partir de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es por sí misma, o cuando se combina con otras composiciones, eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de disolución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo de la invención. La etiqueta o prospecto indica que la composición se usa para tratar la afección de elección, tal como cáncer. Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en su interior, en el que la composición comprende un anticuerpo de la invención; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en su interior, en el que la composición comprende otro agente citotóxico. El artículo de fabricación en esta realización de la invención puede comprender adicionalmente un prospecto que indica que la primera y segunda composiciones de anticuerpo pueden usarse para tratar una afección particular, por ejemplo, cáncer. Alternativamente, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender adicionalmente un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI), solución salina tamponada con fosfato, disolución de Ringer y disolución de dextrosa. Adicionalmente puede incluir otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario que incluyen otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringuillas.

[0224] Lo que sigue son ejemplos de los procedimientos y composiciones de la invención. Se entiende que diversas otras realizaciones pueden ponerse en práctica, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: Generación y caracterización de un fragmento de anticuerpo de la invención (también

denominado más adelante “anticuerpo de un solo brazo” o “anticuerpo Fab/c”)

Construcción de vectores de expresión

[0225] Todos los plásmidos para la expresión de anticuerpos anti-c-met de longitud completa o Fab/c se basaron en un sistema de cistrón separado (Simmons y col., J. Immunol. Methods, 263: 133-147 (2002)) que se basó en promotores *phoA* separados (AP) (Kikuchi y col., Nucleic Acids Res., 9: 5671-5678 (1981)) para la transcripción de cadenas pesadas y ligeras y el fragmento de Fc, seguido de la secuencia de Shine-Dalgarno de *trp* para la iniciación de la traducción (Yanofsky y col., Nucleic Acids Res., 9: 6647-6668 (1981) y Chang y col., Gene, 55: 189-196 (1987)). Adicionalmente, la secuencia señal de la enterotoxina II estable al calor (STII) (Picken y col., Infect. Immun., 42: 269-275 (1983) y Lee y col., Infect. Immun., 42: 264-268 (1983)) se usó para la secreción periplásmica de cadenas pesadas y ligeras y el fragmento de Fc. El fino control de la traducción para ambas cadenas y el fragmento de Fc se logró con variantes de la secuencia señal de STII previamente descrita de fuerzas de traducción relativas medidas que contenían cambios de codones silenciosos en la región de iniciación de la traducción (TIR) (Simmons y Yansura, Nature Biotechnol., 14: 629-634 (1996) y Simmons y col., J. Immunol. Methods, 263: 133-147 (2002)). Finalmente, el terminador de la transcripción λ_{t0} (Schlosstissek y Grosse, Nucleic Acids Res., 15: 3185 (1987)) se colocó en la dirección 3' de las secuencias codificantes para ambas cadenas y el fragmento de Fc. Todos los plásmidos usan la región estructural de un sistema de vector basado en pBR322 (Sutcliffe, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 43: 77-90 (1978)). El anticuerpo anti-c-met fuente fue el anticuerpo 5D5 descrito en las patentes de EE.UU. nº 5.686.292; 5.646.036; 6.207.152; 6.214.344 y 6.468.529. La línea celular de hibridoma para el anticuerpo 5D5 fuente se depositó previamente en la Colección americana de cultivos tipo, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Md., EE.UU., como ATCC nº HB-11895 (hibridoma 5D5.11.6) (fecha del depósito: 23 de mayo de 1995).

Plásmido pxcM11C

[0226] Se requirieron dos plásmidos intermedios para generar el plásmido pxcM11C deseado que codifica un anticuerpo anti-c-met5D5 quimérico. Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras de 5D5 se transfirieron primero por separado sobre plásmidos basados en pBR322 para la expresión de cada cadena. Lo siguiente describe la preparación de estos plásmidos intermedios pxcMLC y pxcMHC seguido de la construcción de pxcm11C.

pxcMLC

[0227] Este plásmido se construyó con el fin de transferir el dominio variable ligero murino del anticuerpo 5D5 a una región estructural de la cadena ligera humana compatible para generar el anticuerpo de longitud completa. La construcción de este plásmido implicó la ligación de tres fragmentos de ADN. El primero fue el vector pPho51 (Simmons y Yansura, Nature Biotechnol, 14: 629-634 (1996), variante 1) en el que se había eliminado el fragmento MluI-BamHI pequeño. La segunda parte de la ligación fue un fragmento AlwNI-BamHI de aproximadamente 516 pares de bases de pST7LC que codifica los 15 últimos aminoácidos de la cadena ligera, el terminador λ_{t0} y el inicio del gen *tet*. El plásmido pST7LC es un derivado de la variante 6 (véase la referencia anterior) con una cadena ligera kappa humana en la dirección 3' de la secuencia señal de STII. La tercera parte de la ligación fue un fragmento de PCR MluI-AlwNI de aproximadamente 623 pares de bases generado a partir de un plásmido que contiene secuencias del Fab 5D5 (descrito en el Ejemplo 2 más adelante en “Clonación y expresión recombinante de Fab 5D5”) usando los siguientes cebadores:

5'-TAAATTTAACGCGTACGCTGACATTATGATGTCCCAGTCTCCATCC (SEQ ID NO: 9)

5'- GGGCGAGCTCAGGCCCTGATGGGTGACTTCGCAGGC (SEQ ID NO: 10)

pxcMHC

[0228] Este plásmido se construyó para introducir el dominio variable pesado murino del anticuerpo 5D5 en una región estructural de cadena pesada humana compatible para generar el anticuerpo de longitud completa. La construcción de pxcMHC implicó la ligación de dos fragmentos de ADN. El primero fue el vector pST2HC en el que se había eliminado el fragmento MluI-BstEII pequeño. El plásmido pST2HC es un derivado de la variante 3 (véase la referencia anterior) en el que una cadena pesada de IgG1 humana se fusionó en la dirección 3' de la secuencia señal de STII. La segunda parte de la ligación fue un fragmento de PCR MluI-BstEII de aproximadamente 346 pares de bases generado a partir de un plásmido que contiene secuencias de Fab 5D5 (descritas en el Ejemplo 2 más adelante en “Clonación y Expresión recombinante de Fab 5D5”) usando los siguientes cebadores:

5'-GCTACAAACGCGTACGCTCAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGG (SEQ ID NO: 11)

5'- AAGAGACGGTGACCGAGGTTCCTTGACC (SEQ ID NO: 12)

pxcM11C

[0229] El plásmido pxcM11C se construyó para expresar un anticuerpo 5D5 quimérico de longitud completa. La construcción del plásmido implicó la ligación de cuatro fragmentos de ADN. El primero fue el vector paTF20 (Simmons y col., J. Immunol. Methods, 263: 133-147 (2002), paTF20 es el vector policistrónico con TIR de 1-ligera y 1-pesada) en el que se había eliminado el fragmento MluI-BstEII pequeño. La segunda parte de la ligación fue un fragmento MluI-AlwNI de aproximadamente 623 pares de bases de pxcMLC. La tercera parte fue un fragmento AlwIVI-BsiWI de aproximadamente 547 pares de bases de paTF50 (véase la referencia anterior; paTF50 es un vector cistrónico separado con TIR de 1-ligera y 1-pesada). La parte final de la ligación fue el fragmento BsiWI-BstEII de aproximadamente 349 pares de bases de pxcMHC.

Plásmido pxcM11C-Fc

[0230] Para la construcción de pxcM11C-Fc, el casete que codifica la expresión del fragmento de Fc con todos los elementos de control descritos anteriormente que incluyen el promotor AP, la secuencia señal de STII y el terminador de la transcripción λ_{t0} se añadió al plásmido pxcM11C. Primero necesitan describirse dos plásmidos, pBR322.VNERK.HC y pBR322.Fc, que conducen a la construcción de pxcM11C-Fc.

pBR322.VNERK.HC

[0231] El plásmido pBR322.VNERK.HC es un derivado de la variante 1 (Simmons y Yansura, Nature Biotechnol, 14: 629-634 (1996)) con una cadena pesada humana en la dirección 3' de la secuencia señal de STII. Este plásmido se construyó ligando juntos dos fragmentos de ADN. El primero fue el vector pBR322 en el que se había eliminado el fragmento EcoRI-ClaI pequeño. La segunda parte en la ligación fue un fragmento de PCR EcoRI-ClaI de aproximadamente 1885 pares de bases generado a partir de pVG11.VNERK que codifica el promotor AP, secuencia señal de STII, cadena pesada, el terminador λ_{t0} y el inicio del gen *tet* usando los siguientes cebadores:

5'-TTTCCCTTTGAATTCTTGGTTGTTAACGTTGCCGACGCGCATC (SEQ ID NO: 13)

5' –

TTTCCCTTTATCGATGATAAGCTGTCAAACATGAGTAAACAATAAAAAACG

CCC (SEQ ID NO: 14)

[0232] El plásmido pVG11.VNERK es un derivado del vector de cistrón separado con TIR de 1-ligera y 1-pesada (Simmons y col., J. Immunol. Methods, 263: 133-147 (2002)) en el que los dominios variables ligeros y pesados se han cambiado a un anticuerpo anti-VEGF (VNERK).

pBR322.Fc

[0233] El plásmido pBR322.Fc es un derivado del plásmido pBR322.VNERK.HC que codifica la expresión del fragmento de Fc con todos los elementos de control descritos anteriormente.

[0234] El plásmido pBR322.Fc se construyó ligando juntos dos fragmentos de ADN. El primero fue el vector pBR322.VNERK.HC en el que se había eliminado el fragmento MluI-NsiI pequeño. La segunda parte en la ligación fue un fragmento MluI-NsiI de aproximadamente 1319 pares de bases de pJAL226 que codifica los aminoácidos SGTT seguido de los aminoácidos 221 a 429 de una IgG1. pJAL226 humano es un derivado de la variante 3 (Simmons y Yansura, Nature Biotechnol, 14: 629-634 (1996)) con un fragmento de Fc humana en la dirección 3' de la secuencia señal de STII.

pxcM11C-Fc

[0235] pxcM11C-Fc se construyó ligando juntos dos fragmentos de ADN. El primero fue el vector pxcM11C en el que se había eliminado el fragmento HpaI-ClaI pequeño. La segunda parte en la ligación fue un fragmento HpaI-ClaI de aproximadamente 1198 pares de bases de pBR322.Fc. Esta ligación produjo el plásmido deseado designado pxcM11C-Fc.

Plásmido pxcM11C.H-Fc.K

[0236] El plásmido pxcM11C.H-Fc.K es un derivado de pxcM11C-Fc en que el dominio CH3 de la cadena pesada de pxcM11C se sustituyó con un dominio CH3 con las mutaciones de “agujero” (también denominado este documento “cavidad”) (T366S, L368A, Y407V) (Merchant y col., Nature Biotechnology, 16:677-681 (1998)). Además, el dominio CH3 del fragmento de Fc se sustituyó con un dominio CH3 con la mutación de “bulto” (también

denominada este documento “protuberancia”) (T366W) (véase la referencia anterior).

pxcM11C.H

[0237] El plásmido se construyó en dos etapas. En la primera etapa, las mutaciones de “bulto” se introdujeron ligando juntos dos fragmentos de ADN. El primero fue el vector pxcM11C en el que se había eliminado el fragmento SacII-NsiI pequeño. La segunda parte en la ligación fue un fragmento SacII-NsiI de aproximadamente 411 pares de bases de pBR322.VNERK.HC.H. pBR322.VNERK.HC.H es un derivado del plásmido pBR322.VNERK.HC (véase anteriormente) en el que se introdujeron las mutaciones de “bulto” (T366S, L368A, Y407V) (Merchant y col., Nature Biotechnology, 16:677-681 (1998)). Este plásmido se designa pxcM11C.H.

pxcm11C.H-Fc.K

[0238] La segunda etapa introduce la mutación de “bulto” en el fragmento de Fc, e implicó la ligación de dos fragmentos de ADN. El primero fue el vector pxcM11C.H en el que se había eliminado el fragmento ClaI-HpaI pequeño. La segunda parte de la ligación fue un fragmento ClaI-HpaI de aproximadamente 1198 pares de bases de pBR322.Fc.K que codifica el casete de expresión para el fragmento de Fc con la mutación de “bulto”. pBR322.Fc.K es un derivado del plásmido pBR322.Fc (véase anteriormente) que codifica la expresión del fragmento de Fc con la mutación de “bulto” (T366W) (Merchant y col., Nature Biotechnology, 16:677-681 (1998)) y todos los elementos de control descritos anteriormente. Esta ligación produjo el plásmido deseado designado pxcM11C.H-Fc.K.

Expresión y caracterización de anticuerpo Fab/c de un solo brazo anti-c-met

[0239] Se llevaron a cabo inducciones a pequeña escala de los anticuerpos usando la construcción parental (pxcM11C para 5D5 anti-c-Met) y la construcción de anticuerpo Fab/c de un solo brazo (pxcm11C-Fc). Para la expresión a pequeña escala de cada construcción, la cepa 33D3 de *E. coli* (W3110 ΔfhuA (ΔtonA) ptr3 lac Iq lacL8 ΔompT Δ(nmpc-fepE) degP41 kan^r) se usó como células huésped. Tras la transformación, elecciones de transformantes seleccionados se inocularon en 5 ml de medio Luria-Bertani complementado con carbenicilina (50 µg/ml) y se cultivaron a 30ºC en una rueda de cultivo durante la noche. Entonces, cada cultivo se diluyó (1:100) en medio limitante de fosfato C.R.A.P. (Simmons y col., J. Immunol. Methods 263:133-147 (2002)). Luego se añadió carbenicilina al cultivo de inducción a una concentración de 50 µg/ml y el cultivo se cultivó durante aproximadamente 24 horas a 30ºC en una rueda de cultivo. A menos que se indique lo contrario, todas las inducciones en matraz agitado se realizaron en un volumen de 5 ml.

[0240] Los lisados celulares completos no reducidos de cultivos se prepararon del siguiente modo: (1) muestras de 1 DO_{600}-ml de inducción se centrifugaron en un tubo de microcentrífuga; (2) cada sedimento se resuspendió en 90 µl de TE (Tris 10 mM a pH 7,6, EDTA 1 mM); (3) se añadieron 10 µl de ácido yodoacético 100 mM (Sigma I-2512) a cada muestra para bloquear cualquier cisteína libre y prevenir el barajado de disulfuro; (4) 20 µl de 10% de SDS se añadieron a cada muestra. Las muestras se agitaron con vórtex, se calentaron a aproximadamente 90ºC durante 3 minutos y luego se agitaron de nuevo con vórtex. Después de enfriarse las muestras hasta temperatura ambiente se añadieron 750 µl de acetona para precipitar la proteína. Las muestras se agitaron con vórtex y se dejaron a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 minutos. Tras la centrifugación durante 5 minutos en una microcentrífuga, el sobrenadante de cada muestra se separó por aspiración y cada sedimento de proteína se resuspendió en 50 µl de dH_2O + 50 µl 2X tampón de muestra NOVEX SDS. Entonces, las muestras se calentaron durante 4 minutos a aproximadamente 90ºC, se agitaron bien con vórtex y se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente. Luego se hizo una centrifugación de 5 minutos final y los sobrenadantes se transfirieron a tubos limpios.

[0241] Los lisados celulares completos reducidos de cultivos inducidos se prepararon del siguiente modo: (1) muestras de 1 DO_{600}-ml de inducción se centrifugaron en un tubo de microcentrífuga; (2) cada sedimento se resuspendió en 90 µl de TE (Tris 10 mM a pH 7,6, EDTA 1 mM); (3) se añadieron 10 µl de ditiotreitol 1 M (Sigma D-5545) a cada muestra para reducir enlaces disulfuro; (4) se añadieron 20 µl de 10% de SDS a cada muestra. Las muestras se agitaron con vórtex, se calentaron a aproximadamente 90ºC durante 3 minutos y luego se agitaron de nuevo con vórtex. Después de enfriarse las muestras hasta temperatura ambiente se añadieron 750 µl de acetona para precipitar la proteína. Las muestras se agitaron con vórtex y se dejaron a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 minutos. Tras la centrifugación durante 5 minutos en una microcentrífuga, el sobrenadante de cada muestra se separó por aspiración y cada sedimento de proteína se resuspendió en10 µl de ditiotreitol 1 M + 40 µl de dH_2O + 50 µl 2X tampón de muestra NOVEX SDS. Entonces, las muestras se calentaron durante 4 minutos a aproximadamente 90ºC, se agitaron bien con vórtex y se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente. Luego se hizo una centrifugación de 5 minutos final y los sobrenadantes se transfirieron a tubos limpios.

[0242] Tras la preparación, 5 - 8 µl de cada muestra se cargaron sobre NOVEX de 10 pocillos, 1,0 mm, fabricada con 12% de Tris-glicina SDS-PAGE y se sometieron a electroforesis a -120 voltios durante 1,5 - 2 horas Entonces, los geles resultantes o bien se tiñeron con azul de Coomassie o bien se usaron para análisis de

transferencia Western.

[0243] Para el análisis de transferencia Western, los geles de SDS-PAGE se electrotransfirieron sobre una membrana de nitrocelulosa (NOVEX) en tampón CAPS 10 mM, pH 11 + 3% de metanol. Entonces, la membrana se bloqueó usando una disolución de 1X NET (NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, Tris 50 mM a pH 7,4, 0,05% de Triton X-100) + 0,5% de gelatina durante aproximadamente 30 min - 1 horas balanceando a temperatura ambiente. Tras la etapa de bloqueo, la membrana se colocó en una disolución de 1X NET + 0,5% de gelatina + anticuerpo anti-Fab (fracción de IgG de cabra conjugada con peroxidasa para Fab IgG humana; CAPPEL nº 55223) para un análisis de transferencia Western de anti-Fab. La dilución del anticuerpo anti-Fab osciló de 1:50.000 a 1:1.000.000 dependiendo del lote de anticuerpo. Alternativamente, la membrana se colocó en una disolución de 1X NET + 0,5% de gelatina + anticuerpo anti-Fc (fracción de IgG de cabra conjugada con peroxidasa para fragmento de Fc humana; METHYL nº A80-104P-41) para un análisis de transferencia Western anti-Fc. La dilución del anticuerpo anti-Fc osciló de 1:50.000 a 1:250.000 dependiendo del lote del anticuerpo. La membrana se dejó en cada caso en la disolución de anticuerpo durante la noche a temperatura ambiente con balanceo. A la siguiente mañana, la membrana se lavó un mínimo de 3 x 10 minutos en 1X NET + 0,5% de gelatina y luego 1 x 15 minutos en TBS (Tris 20 mM a pH 7,5, NaCl 500 mM). Las bandas de proteína unidas por el anticuerpo anti-Fab y el anticuerpo anti-Fc se visualizaron usando detección de Amersham Pharmacia Biotech ECL y exponiendo la membrana a película de rayos X.

[0244] Los resultados de transferencia Western de anti-Fab para la expresión de anticuerpo Fab/c anti-c-met se muestran en la Figura 1. Revelan la expresión de anticuerpo de longitud completa completamente plegado y ensamblado en el carril 1 y el anticuerpo Fab/c de un solo brazo en el carril 2. Obsérvese que el anticuerpo anti-Fab no puede unirse al fragmento de Fc y, por tanto, no es detectado. Para las muestras no reducidas, la co-expresión del fragmento de Fc con el anticuerpo anti-c-Met de longitud completa produce un desplazamiento sustancial del anticuerpo de longitud completa completamente plegado y ensamblado a anticuerpo Fab/c de un solo brazo completamente plegado y ensamblado. Para las muestras reducidas, hay cantidades similares de cadena pesada y ligera detectada para el anticuerpo anti-c-Met de longitud completa y el anticuerpo Fab/c anti-c-met de un solo brazo. Hay un ligero aumento en la cantidad de precursor de cadena ligera con la construcción de Fab/c anti-c-Met de un solo brazo, posiblemente debido a un ligero retroceso en la ruta secretora.

[0245] De modo similar, los resultados de transferencia Western anti-Fc se muestran en la Figura 2 y también revelan la expresión de anticuerpo Fab/c de un solo brazo completamente plegado y ensamblado en el carril 2. El anticuerpo anti-Fc no puede unirse a la cadena ligera y, por tanto, no es detectado. Para las muestras no reducidas, la coexpresión de la región Fc con anticuerpo anti-c-Met de longitud completa muestra el desplazamiento de anticuerpo de longitud completa completamente plegado y ensamblado a anticuerpo Fab/c de un solo brazo completamente plegado y ensamblado. Además, el monómero y el dímero del polipéptido de Fc también son detectados en la transferencia Western anti-Fc. Para las muestras reducidas hay cantidades similares de cadena pesada detectada para la expresión del anticuerpo anti-c-Met de longitud completa y el anticuerpo Fab/c anti-c-met de un solo brazo. También hay una pequeña cantidad de fragmento del precursor Fc, posiblemente debido a algún retroceso en la ruta secretora con la construcción de anticuerpo Fab/c de un solo brazo.

[0246] Como es evidente de los datos descritos anteriormente, es posible generar una población de inmunoglobulinas en la que la especie del anticuerpo primario sea el anticuerpo Fab/c de un solo brazo deseado. Sin embargo, la forma intacta del anticuerpo (es decir, el anticuerpo anti-c-Met de longitud completa completamente plegado y ensamblado) todavía fue detectable por tanto análisis de transferencia Western de anti-Fab como anti-Fc. Como la forma intacta del anticuerpo 5D5 anti-c-Met es un agonista del receptor de c-met, que no es deseable en un esquema terapéutico que requiere un efecto antagonista, generalmente es deseable minimizar la cantidad de forma intacta de anticuerpo que se genera.

Expresión y caracterización de anticuerpo Fab/c anti-c-Met de un solo brazo que comprende protuberancia y cavidad (también denominados más adelante "bultos en agujeros")

[0247] Para minimizar adicionalmente la formación de anticuerpo anti-c-Met de longitud completa en la preparación del anticuerpo Fab/c anti-c-met se hicieron mutaciones "bultos en agujeros" en el dominio CH3 del Fc esencialmente como se describe por Merchant y col. (Nature Biotechnology, 16:677-681 (1998)). Se preparó una construcción para el anticuerpo Fab/c anti-c-Met de un solo brazo (pxcM11C.H-Fc.K) introduciendo las mutaciones de "bulto" (T366S, L368A, Y407V) en la cadena pesada de longitud completa y la mutación de "bulto" (T366W) en el fragmento de Fc.

[0248] Entonces, las construcciones de anticuerpo anti-c-Met de longitud completa (pxcM11C), anticuerpo Fab/c anti-c-Met de un solo brazo (pxcM11C-Fc) y anticuerpo anti-c-Met de "bultos en agujeros Fab/c" de un solo brazo (pxcM11C.H.Fc.K) se expresaron del mismo modo que se ha descrito anteriormente. Se prepararon lisados celulares completos, se separaron por SDS-PAGE, se transfirieron a nitrocelulosa y se detectaron con el anticuerpo de cabra dirigido contra Fab humano conjugado previamente descrito y anticuerpo de cabra dirigido contra Fc humana conjugada.

[0249] Los resultados de transferencia Western de anti-Fab se muestran en la Figura 3, y muestran una mejora significativa en el plegamiento y ensamblaje del anticuerpo anti-c-Met de "bultos en agujeros" Fab/c de un solo brazo. Además, los resultados de transferencia Western de anti-Fab muestran la reducción de anticuerpo anti-c-Met de longitud completa a niveles indetectables. De nuevo, es importante observar que el anticuerpo anti-Fab no puede unirse al fragmento de Fc. Para las muestras no reducidas, la expresión del anticuerpo anti-c-Met de "bultos en agujeros" de un solo brazo produce un desplazamiento sustancial del anticuerpo de longitud completa completamente plegado y ensamblado a anticuerpo Fab/c de un solo brazo completamente plegado y ensamblado. También hay una mejora significativa en el plegamiento y ensamblaje de anticuerpo Fab/c de un solo brazo que se mueve del Fc natural al Fc de "bultos en agujeros". Para las muestras reducidas hay cantidades similares de cadena pesada detectada para la longitud completa, Fab/c de un solo brazo y los anticuerpos anti-c-Met de "bultos en agujeros" Fab/c de un solo brazo. También parece haber un aumento en la cantidad de cadena ligera procesada y una disminución en el precursor de cadena ligera con la construcción anti-c-Met de "bultos en agujeros" Fab/c de un solo brazo.

[0250] De modo similar, los resultados de transferencia Western de anti-Fc en la Figura 4 muestran una mejora significativa en el plegamiento y ensamblaje del anticuerpo de "bultos en agujeros" Fab/c de un solo brazo con respecto al anticuerpo anti-c-Met Fab/c de un solo brazo natural. De nuevo, los resultados de transferencia Western anti-Fc muestran la reducción de anticuerpo anti-c-Met de longitud completa a niveles indetectables. El anticuerpo anti-Fc no puede unirse a cadena ligera y, por tanto, no es detectado. Para las muestras reducidas hay cantidades similares de cadena pesada detectada para la longitud completa, el Fab/c de un solo brazo natural y los anticuerpos anti-c-Met de "bultos en agujeros" Fab/c de un solo brazo.

EJEMPLO 2: <u>Características farmacocinéticas y eficacia terapéutica de los anticuerpos de la invención</u>

<u>Material y procedimientos</u>

[0251] <u>Materiales</u> - Se produjeron HGF y c-Met-IgG en Genentech, como se ha descrito previamente (8;14). Se compraron placas de microtitulación Maxisorb de NUNC (Rosklide, Dinamarca). Se compró anti-hFc de Jackson Immunochemical (West Grove, PA). Se compró HRP-estreptavidina de Zymed (South San Francisco, CA). Se compró ^{3}H-timidina de Amersham, Inc. (Arlington Heights, IL). Se obtuvieron células MDA-MB-435 de ATCC (Rockville, MD). Se obtuvo piroglutamato aminopeptidasa de Takara Biochemicals (Berkeley, CA). Se compró NHS-X-biotina de Research Organics (Cleveland, OH). Se compró Immobilon-PSQ PVDF de Millipore (Marlborough, MA). La transcriptasa inversa Superscript II RNase H fue de Gibco-BRL (Gaithersburg, MD). La Taq polimerasa fue de Perkin Elmer-Cetus (Foster City, CA). Bakerbond ABX, 40 µ de tamaño de partícula, fue de J. T. Baker (Phillipsburg, NJ) y la resina de alto rendimiento SP-Sepharose fue de Pharmacia Biotech, Inc. (Piscataway, NJ). Biotina-anti-P-Tyr fue de Upstate Biotech (Lake Placid, NY), el sustrato de TMB-peroxidasa se compró de KPL (Gaithersburg, MD).

<u>Generación de anticuerpos y fragmentos Fab</u>

<u>Producción de anticuerpos monoclonales anti-c-Met</u>

[0252] Se ha descrito la producción de anticuerpos monoclonales anti-c-Met, que incluyen el anticuerpo 5D5. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 5.686.292; 5.646.036; 6.207.152; 6.214.344 y 6.468.529. Ratones BALB/c se inmunizaron en cada almohadilla de la pata trasera con 2,5 ug de c-Met-IgG soluble (Mark y col., J. Biol. Chem. (1992), 267:26166-26171) suspendido en adyuvante MPI/TDM en el día 0, 7, 14, 21, 28, 266; 273 y 279. Cuatro días después de la última inmunización, las células del ganglio linfático se recogieron y se fusionaron con células de mieloma P3/X63-Ag8U1 (Yelton y col., Curr. Top. Microbio. Immunol. (1978), 81:1) usando 35% de polietilenglicol como se ha descrito (Laskov y col., Cell. Immunol. (1980), 55:251). Líneas celulares de hibridoma que secretan el anticuerpo específico para c-Met se seleccionaron inicialmente por una ELISA de captura, luego se cribaron posteriormente por citometría de flujo usando células BAF3 transfectadas que expresan c-Met. Los hibridomas seleccionados se probaron adicionalmente para su capacidad para inhibir biotina-HGF que se une a c-Met-IgG, como se describe más adelante. Los hibridomas se clonaron dos veces por dilución limitante y luego se caracterizaron adicionalmente para sus capacidades antagonistas y agonistas. Se produjo ascitis en ratones balb/c y los anticuerpos monoclonales se purificaron usando una columna de afinidad de proteína G. La concentración de proteína se determinó por la absorbancia a 280 nm usando un coeficiente de extinción de 1,4.

<u>Generación y purificación de Fab nativo</u>

[0253] Se dializó anticuerpo 5D5 durante la noche en fosfato 20 mM, tampón EDTA 10 mM y luego se concentró a 7 mg/ml en un Centricon 30. Medio ml de papaína inmovilizada (Pierce, Rockford, Il) se lavó con tampón de digestión, luego se añadieron 10 mg de 5D5 y se incubó durante la noche a 37ºC con agitación a 200 rpm. Se añadió un ml y medio de tampón de unión a la mezcla, luego se separó el sobrenadante de las perlas y se pasó sobre una columna de proteína A que se había equilibrado previamente con tampón de unión. Se pasó tampón de unión adicional sobre la columna y el eluato se recogió en fracciones de 1 ml. La absorbancia de cada fracción se

leyó a 280 nm y se reunieron los eluatos que contenían el fragmento Fab. La proteína se dializó durante la noche en PBS y la concentración de proteína se determinó por su absorbancia a 280 nm usando un coeficiente de extinción de 1,53. El fragmento Fab se purificó adicionalmente por filtración en gel para eliminar $F(ab')_2$ residual.

Secuenciación del extremo N de Fab 5D5

[0254] Una alícuota de Fab 5D5 se redisolvió en un gel de SDS del 4-20% de gradiente y se eletrotransfirió sobre membrana de PVDF (Immobilon-PSQ) durante 1 h a 250 mA de corriente constante en una celda de transferencia BioRad Trans-Blot (Matsudaira, J.Biol.Chem. (1987), 262:10035-10038). La membrana se tiñó con 0,1% de azul de Coomassie R-250 en 50% de metanol, 0,5 minutos, y se destiñó durante 2-3 minutos con 10% de ácido acético en 50% de metanol. La membrana se lavó minuciosamente con agua y se dejó secar antes de la secuenciación en un secuenciador de proteínas automatizado modelo 473A usando un cartucho Blott® (Applied Biosystem). Los picos se integraron con el software Justice Innovation usando interfaces Nelson Analytical 760. La interpretación de secuencias se realizó en un DEC alpha (Henzel y col., J. Chromatog. (1996), 404:41-52).

[0255] La obtención de la secuencia de la cadena pesada de 5D5 requirió el desbloqueo, que se realizó del siguiente modo. El fragmento Fab se redujo con DTT 7 mM a 45ºC durante 1 h y se alquiló con isopropilacetamida 180 mM a 25ºC durante 20 minutos (Krutzsch & Inman, Anal. Biochem. (1993), 209:109-116). Entonces, el fragmento Fab alquilado se intercambió 3X en un Microcon-10 con fosfato de sodio 0,1 M que contenía DTT 10 mM (tampón de digestión) y se digirió con 1 mU de piroglutamato aminopeptidasa a 45ºC durante 3 h en 20 µl de tampón de digestión. Entonces, el Fab desbloqueado se transfirió a PVDF y se secuenció como se ha descrito anteriormente.

Clonación y expresión recombinante de Fab 5D5

[0256] Se usaron los datos de la secuencia del extremo N para diseñar cebadores de PCR específicos para los extremos 5' de las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas, mientras que se diseñaron cebadores de 3' para hibridarse con la región estructural consenso 4 de cada cadena (Kabat y col., Sequences of proteins of immunological interest (1991), Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD). Los cebadores también se diseñaron para añadir sitios de enzimas de restricción para la clonación. El ARN total, extraído de 10^8 células de hibridoma 5D5 con un kit de aislamiento de ARN de Stratagene, se usó como sustrato para RT-PCR. La transcripción inversa se realizó bajo condiciones estándar (Kawasaki, Amplification of RNA. En PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, pág. 21-27 (M.A. Innis, D.H. Gelfand, JJ. Sninsky y TJ. White, editores) (Academic Press, Inc., San Diego; 1990)) usando los cebadores específicos para la región estructural 4 y la transcriptasa inversa Superscript II RNase H. La amplificación por PCR empleó Taq polimerasa, como se ha descrito (Kawasaki, Amplification of RNA. En PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, pág. 21-27 (M.A. Innis, D.H. Gelfand, JJ. Sninsky, y TJ. White, editores) (Academic Press, Inc., San Diego; 1990)), excepto que se incluyó 2% de DMSO en la mezcla de reacción. Los fragmentos de ADN amplificado se digirieron con enzimas de restricción *Sfi I* y *Rsr II* (cadena ligera) o ml*u I* y *Apa I* (cadena pesada), se purificaron en gel y se clonaron en un derivado de plásmido de expresión pAK19 (Carter y col., Bio/Technol. (1992), 10:163-167). Este vector, pXCA730, se ha modificado por mutagénesis dirigida a sitio (Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985), 82:488) para contener sitios de restricción únicos entre las secuencias señal de STII y los dominios variables, y en la unión de los dominios variables y constantes de cada cadena. Los ADNc del dominio variable de la cadena ligera y pesada se insertaron en la dirección 5' y en marco con los dominios Cκ y CH1 humanos. La cisteína del extremo C de la cadena pesada en pAK19, que podría formar un puente disulfuro para dar moléculas $F(ab')_2$, se eliminó para permitir la expresión de sólo la forma Fab del anticuerpo.

[0257] Se expresó Fab 5D5 recombinante en la cepa de K12 de *E. coli* 33B6 (W3110 *tonAphoA* E15 *deoc* KanR *ilv*GR degPD)*arg*F-*lac*)169) (Rodriques y col., Cancer Res. (1995), 55:63-70) como se describe por Carter y col. (Carter y col., Bio/Technol. (1992), 10:163-167). El sedimento de células de una fermentación de 10 l se recogió por centrifugación con alimentación continua, se congeló y se guardó a -70ºC. Una parte del sedimento se suspendió en tampón de extracción, que consistió en MES 120 mM, pH 6, y EDTA 5 mM (5 ml/gramo de pasta). La suspensión se mezcló minuciosamente usando Ultraturrax (Janke and Kunkel) durante aproximadamente 15 minutos a 4ºC. Entonces, las células intactas se rompieron usando 2 pases a través de un homogeneizador de células (Microfluidizer, por Microfluidics Corporation, Newton, MA) equipado con una espiral de refrigeración. Entonces, la suspensión se ajustó al 0,1% (v/v) de polietilenimina usando una disolución madre del 5% (v/v) que se había ajustado a pH 6. Las células intactas y el residuo floculado con PEI se separaron de la fracción soluble por centrifugación a 25.400 x g durante 30 minutos. El sobrenadante se ajustó a una conductividad inferior a 4 mS mediante adición de agua purificada y se cargó en una columna (1 x 10 cm) de Bakerbond ABX, 40 µ de tamaño de partícula. La columna se había equilibrado en MES 50 mM, EDTA 5 mM, pH 6. Todas las etapas se hicieron a una velocidad de flujo lineal de 100 cm/h. Después de cargarse el sobrenadante acondicionado, la columna se lavó con tampón de equilibrio hasta que la absorbancia del efluente de la columna fue equivalente al nivel inicial. La elución se realizó usando un volumen de 16 columnas, gradiente lineal de sulfato de amonio 0 a 100 mM en tampón de equilibrio. Las fracciones de columna se analizaron por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida y las fracciones

que contuvieron el Fab se reunieron. La conductividad del conjunto de la columna ABX se redujo a menos de 4 mS y se cargó en una columna (1 x 10 cm) de resina de alto rendimiento SP-Sepharose que se había equilibrado en tampón MOPS 25 mM, pH 6,9. Todas las etapas se realizaron a una velocidad de flujo lineal de 100 cm/h. Tras la carga, la columna se lavó con un volumen de columna de tampón de equilibrio. Entonces, Fab 5D5 se eluyó de la columna usando un volumen de 16 columnas, gradiente lineal de acetato sódico 0 a 200 mM en tampón de equilibrio. Las fracciones de columna se analizaron por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida y se reunieron las fracciones que contenían el FAb.

Producción a pequeña escala de proteína de 5D5 de un solo brazo

[0258] El plásmido de expresión pxcM11C.H-Fc.K (como se ha descrito anteriormente) se usó para transformar la cepa de *E. coli* 33D3 (W3110 kanR ΔfhuA (ΔtonA) ptr3 lacIq lacL8 ompTΔ (nmpc-fepE) degP), y luego se cultivaron transformantes durante la noche a 30ºC en medio LB con carbenicilina añadida (50 ug/ml). El cultivo de LB se diluyó 100 veces en medio C.R.A.P. (1) que contiene carbenicilina (50 ug/ml) y se cultivó durante aproximadamente 24 horas con agitación a 30ºC. Se extrajeron pequeñas alícuotas para verificar la expresión del anticuerpo por análisis de SDS-PAGE y Western usando tanto un anticuerpo anti-Fab (fracción de IgG de cabra conjugada con peroxidasa para Fab IgG humana; CAPPEL nº 55223) o un anticuerpo anti-Fc (fracción de IgG de cabra conjugada con peroxidasa para fragmento de Fc humana; Bethyl nº A08-104P-41). Entonces, el cultivo restante se centrifugó, y la pasta de células se congeló a -70ºC hasta el inicio de la etapa de purificación de anticuerpos.

[0259] Purificación de 5D5 de un solo brazo. Se descongeló pasta de células congelada y se resuspendió en 10 volúmenes (peso/volumen) de tampón de lisis (Tris-HCl 25 mM, EDTA 5 mM, pH 7,5), luego se centrifugó. El sedimento insoluble se resuspendió en tampón de lisis usando un homogeneizador Polytron (Kinematica A.G, Suiza) y las células se rompieron por pase a través de un Microfluidizer (Microfluidics, Newton, Mass). Se añadió 0,1% (v/v) de polietilenimina (Sigma) al lisado, seguido de agitación a 4ºC durante una hora, luego centrifugación a 15.000 x g. El sobrenadante resultante se mezcló con una resina de afinidad por proteína A y se agitó durante la noche a 4ºC. Se dejó que la resina se sedimentara, el sobrenadante se separó vertiéndolo y la resina se vertió en una columna unida a un sistema de cromatografía líquida (Varian Inc, Palo Alto, CA). La columna se lavó con Tris-HCl 10 mM, tampón EDTA 1 mM, pH 7,5, seguido de NaCl 0,5 M en el mismo tampón, luego se eluyó con un gradiente de pH 6 a pH 2 en citrato de sodio 50 mM, tampón NaCl 0,1 M. Las fracciones eluidas se ajustaron inmediatamente a una concentración final de urea 2 M y pH 5,4 y se analizaron por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE). Se reunieron las fracciones que contenían anti-c-Met de un solo brazo y se sometieron a cromatografía de intercambio catiónico en una columna SP Sepharose (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) equilibrada con MES 25 mM, urea 2 M a pH 5,4. La columna se eluyó con un gradiente de NaCl 0-1 M en MES 25 mM, pH 5,4. Tras el análisis de SDS-PAGE, el eluato reunido se ajustó a sulfato de sodio 0,4 M, pH 6, y se cargó sobre una columna Hi-Propyl (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ) equilibrada con sulfato de sodio 0,4 M, MES 25 mM a pH6. La columna se eluyó con un gradiente de sulfato de sodio 0,4 M – 0 M en MES 25 mM, pH6. El eluato resultante, tras el análisis de SDS-PAGE, se concentró usando CentriPrep 10 (Millipore Corp, Bedford, MA), luego se sometió a cromatografía de exclusión por tamaño sobre una columna Superdex 200 (Amersham Biosciences) equilibrada con succinato de sodio 10 mM, NaCl 0,15 M, pH 5,0.

[0260] Las concentraciones de proteína se determinaron por análisis cuantitativo de aminoácidos. Los niveles de endotoxina se determinaron por ensayo LAL. Estas preparaciones de anticuerpo se usaron para el posterior análisis.

Ensayos

Cultivo celular

[0261] Se cultivaron células de carcinoma de pulmón A549 en MEM complementado con 10% de SBF. Células BaF3-cMet, que se transfectaron con cMet humano como se ha descrito previamente (Schwall y col., J.Cell Biol. (1996), 133:709-718), y células BaF3-neo, que se transfectaron con el vector, se cultivaron en RPMI 1640 complementado con 10% de SBF, 5% de medio WEIR-231 acondicionado con cultivo celular (contiene IL-3), glutamina 2 mM, β-mercaptoetanol (4 µl/l), 0,5 mg/ml de G418. Células de glioblastoma U87 y U118, células de carcinoma renal 786-0 se cultivaron en RPMI 1640 que contenía 10% de SBF.

Unión de HGF-cMet

[0262] Se realizaron estudios de unión a HGF usando biotina-HGF en un sistema de fase sólida en el que c-Met-IgG es capturado por el dominio de IgG sobre placas de microtitulación. HGF se biotiniló incubando con un exceso molar de 20 veces de NHS-X-biotina en $NaHCO_3$ 0,1 M, pH 8,5. La NHS-X-biotina se dividió en 4 incrementos que se añadieron a intervalos de 15 minutos, con agitación a temperatura ambiente. La biotina no conjugada se eliminó por diálisis y el material marcado se almacenó a 4ºC. Las placas de microtitulación se

recubrieron con 2 µg/ml de Fc de conejo dirigido contra IgG humana AffiniPure (Jackson ImmunoResearch) en tampón de recubrimiento (carbonato/bicarbonato 0,05 M, pH 9,6) durante la noche a 4ºC. Las placas se bloquearon por PBS que contenía 0,5% de BSA, pH 7,4, a temperatura ambiente (TA) durante 1 hora, seguido de 2 horas de incubación con 2 µg/ml de cMet-IgG. Entonces, 53 ng/ml de HGF marcado con biotina con o sin competidores 0,01-1,000 nM de HGF frío, mAb 5D5 anti-cMet, anticuerpo Fab o de un solo brazo se añadieron a TA durante 1 hora. Las placas se añadieron con peroxidasa de rábano picante (HRP)-estreptavidina (dilución 1:10.000, Amersham) a TA durante 1 hora, seguido de sustrato de fosfatasa CP-fosfato de nitrofenilo (Kirkegaard & Perry Laboratories), y la absorbancia se midió a 405 nm.

[0263] Los resultados se muestran en la Figura 5. El anticuerpo anti-c-Met 5D5 de un solo brazo rindió de modo similar a Fab anti-c-met en el ensayo de unión competitiva.

Fosforilación por tirosina de c-Met por KIRA

[0264] La fosforilación por tirosina de c-Met se midió por un ELISA de sándwich, basado en los procedimientos de Sadick y col., en el que el receptor solubilizado es capturado sobre una placa recubierta con anticuerpo anti-receptor y detectado con anti-P-Tyr (Sadick y col., Anal. Biochem. (1996), 235:207-214). Se sembraron células U87 a 10^6/ml en placa de 96 pocillos a 37ºC durante la noche. Entonces, el medio se cambió a MEM, 0,1% de SBF, con HGF y/o anticuerpos durante 10 min. Entonces, las células se extrajeron en 100 µl de tampón de lisis de células (Tris 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, Na_2EDTA 1 mM, EGTA 1 nM, 1% de Triton, 1x mezcla de inhibidores de proteasa (Sigma), 1x mezcla de inhibidores de fosfatasa II (Sigma)) durante 30 min a TA sobre un agitador de placas y se guardaron sobre hielo o 70ºC. Los lisados se añadieron a placas que habían sido recubiertas con mAb anti-c-Met 1949 (Genentech) durante la noche. Se detectó fosfo-tirosina cMet con 1:4000 de anti-fosfotirosina biotinilada diluida (4G10, Upstate), seguido de HRP-estreptavidina y revelado del color con TMB. cMet total se midió de modo similar usando anticuerpo anti-c-Met 1:10.000.

[0265] Los resultados se muestran en la Figura 6.

Proliferación celular. Ensayos de migración

[0266] BaF3 es un célula linfoide murina dependiente de IL-3 que normalmente no expresa cMet y no responde a HGF. Sin embargo, en BaF3-hMet, derivado por transfección con un ADNc de longitud completa normal para c-Met humana (Schwall y col., J. Cell Biol. (1996), 133:709-718), HGF estimula la proliferación y supervivencia en ausencia de IL-3. Células BaF3-hMet y BaF3-neo se someten a pases rutinariamente en RPMI 1640, 5% de suero bovino fetal, 4 µl/l de β-ME, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de sulfato de estreptomicina, L-glutamina 2 mM y 5% de medio acondicionado con WEHI como fuente de IL-3. Para medir la proliferación dependiente de HGF, el número de células después de 3 días de tratamiento se cuantificó añadiendo 25 µl de Alarma Blue (Trek Diagnostic Systems) y midiendo la intensidad de fluorescencia 4 horas después. Como control para la especificidad también se probó 5D5 de un solo brazo en células BaF3-hMet estimuladas con IL-3.

[0267] Los resultados se muestran en la Figura 7.

[0268] La migración de células MDAMB-435-PGL y células U87 se evaluó usando un ensayo en cámara de Boyden modificada. Las células se sembraron ($2x10^4$/pocillo) sobre la cámara superior con filtro de policarbonato de 5 µm de poro recubierto con 10 µg/ml de fibronectina. Se añadieron 100 ng/ml de HGF con o sin Fab 5D5 o anticuerpo de un solo brazo a las cantidades indicadas al medio en la cámara inferior. Las células se cultivaron durante la noche. Las células se rasparon de la parte superior de la membrana de filtro usando hisopo de esponja especial y las células que habían migrado a la superficie inferior del filtro se fijaron y se tiñeron con yoduro YO-PRO-3 (Molecular Probes), luego se contaron por microscopía fluorescente.

[0269] Los resultados se muestran en la Figura 8.

Farmacocinética

[0270] 5D5-UB o Fab 5D5 (5 mg/kg) se inyectó intravenosamente en ratones sin pelo. En los momentos de tiempo indicados se recogieron muestras de suero de 4 ratones y se ensayaron por ELISA de tipo sándwich en el que se capturó sobre una placa recubierta con cMet-IgG y luego se detectó con un anticuerpo secundario específico de cadena ligera.

[0271] Los resultados se muestran en la Figura 9A. La semivida del anticuerpo 5D5 de un solo brazo aumentó significativamente en comparación con su homólogo de Fab.

[0272] Para determinar si 5D5-UB estaba degradando *in vivo* un volumen de suero correspondiente a 40 ng de 5D5-UB por ELISA desde el día 7, muestras de PC se ejecutaron sobre un gel de SDS-PAGE bajo condición

reductora o no reductora. El gel se transfirió sobre nitrocelulosa y se transfirió por anti-Fc humana conjugada con HRP (1:5.000, específico para ser humano, Jackson Labs). Un volumen igual de suero de ratones sin tratamiento previo se ejecutó en paralelo como control.

[0273] Los resultados se muestran en la Figura 9B. El suero del anticuerpo 5D5 de un solo brazo fue intacto en el día 7 tras la administración.

Estudios de eficacia tumoral in vivo

[0274] Los estudios de eficacia se realizaron usando ratones sin pelo atímicos hembra a la edad de 4-6 semanas inoculados subcutáneamente con 2,5 millones de células A549 (carcinoma de pulmón humano) o U87 MG (glioblastoma humano que secreta HGF autocrino y expresa cMet). El tratamiento con el anticuerpo 5D5 de un solo brazo, el anticuerpo Fab 5D5 o un anticuerpo de control (anti-gp120) se empezó tanto en el momento de la inoculación de células tumorales (es decir, tratamiento con adyuvante) como después de que se permitiera que los tumores se cultivaran a ~150 mm^3. Todos los anticuerpos se administraron intraperitonealmente una vez por semana durante 4 semanas. Obsérvese que sólo el anticuerpo 5D5 de un solo brazo se probó en la pauta de tratamiento con adyuvante (con el control anti-gp120).

[0275] La Figura 10 muestra resultados para tumores generados por inoculación con células U87 MG. Como se muestra en la Figura 10A (tratamiento con adyuvante) y la Figura 10B (tratamiento tras el establecimiento de tumores), el anticuerpo 5D5 de un solo brazo pudo inhibir o provocar la regresión de tumores. Como se muestra en la Figura 10B, el anticuerpo 5D5 de un solo brazo tuvo eficacia terapéutica superior en comparación con su homólogo de Fab. (De forma interesante, el anticuerpo 5D5 de un solo brazo a 100 nM presentó efectos mínimos sobre el número de células U87 *in vitro*.)

[0276] Los resultados para el tratamiento de tumores generados a partir de la inoculación con las células A549 fueron negativos, que proporciona un control de especificidad que confirmó que los efectos del anticuerpo anti-c-Met 5D5 de un solo brazo contra los tumores U87 no fueron debidos a toxicidad no específica.

[0277] El anticuerpo anti-c-Met 5D5 de un solo brazo también puede probarse para la capacidad para modular el desarrollo de tumores usando otros modelos de tumor *in vivo* establecidos en la técnica, por ejemplo, el modelo Oncotest descrito en la patente de EE.UU. nº 6.271.342. El crecimiento tumoral de células BxPC-3 (pancreáticas) (ATCC nº CRL-1687) coinoculadas con fibroblastos MRC-5 (ATCC CCL-171) mostró una inhibición del 50% cuando se administró anticuerpo 5D5 de un solo brazo a 30 mg/kg, 2x/semana. Otros datos ilustrativos se enumeran más adelante:

- ~30% de inhibición del crecimiento tumoral en Oncotest RXF1220 (renal) con 10 mg/kg, c7d (es decir, cada 7 días) del anticuerpo 5D5 de un solo brazo;

- <20% de inhibición de crecimiento tumoral en (i) Oncotest PAXF736 (pancreático) con 10 mg/kg, c7d; (ii) Oncotest GXF97 (gástrico) con 10 mg/kg, c7d; (iii) Oncotest LXFA526 (pulmón) con 30 mg/kg, c7d; (iv) Oncotest LSFA297 (pulmón) con 30 mg/kg, c7d;

- No se observó actividad en xenoinjertos A549 con 10 mg/kg, c7d del anticuerpo 5D5 de un solo brazo;

- No se observó actividad en Oncotest LXFA650 (pulmón) con 30 mg/kg, c7d.

REIVINDICACIONES

1. Un fragmento de anticuerpo que comprende un único brazo de unión a antígeno y una región Fc que aumenta la estabilidad de dicho fragmento de anticuerpo en comparación con una molécula de Fab que comprende dicho brazo de unión a antígeno, en el que la región Fc comprende un complejo de un primer y un segundo polipéptidos de Fc, en el que uno, pero no ambos de los polipéptidos de Fc, es una cadena pesada truncada del extremo N, y en el que dicho fragmento de anticuerpo se une específicamente a c-met.

2. El fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1, en el que el fragmento de anticuerpo está aglicosilado.

3. El fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1 ó 2, en el que el fragmento de anticuerpo tiene de pocas a ninguna propiedad inmunosupresora.

4. El fragmento de anticuerpo de la reivindicación 3, en el que dichas propiedades inmunosupresoras comprenden capacidad para efectuar el agotamiento de linfocitos T.

5. El fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 que no posee función efectora sustancial distinta de la unión a FcRn.

6. El fragmento de anticuerpo de la reivindicación 5, en el que dicha función efectora es lisis del complemento.

7. El fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el fragmento de anticuerpo se une a FcRn.

8. El fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el fragmento de anticuerpo comprende un primer polipéptido que comprende un dominio variable de la cadena ligera, un segundo polipéptido que comprende un dominio variable de la cadena pesada y dicho primer polipéptido de Fc, y un tercer polipéptido que comprende dicho segundo polipéptido de Fc.

9. El fragmento de anticuerpo de la reivindicación 8, en el que el primer polipéptido comprende un dominio variable de la cadena ligera no humana fusionado con un dominio constante de la cadena ligera humana.

10. El fragmento de anticuerpo de la reivindicación 8, en el que el primer polipéptido comprende una CDR de una especie no humana fusionada con una secuencia de la región estructural humanizada o humana.

11. El fragmento de anticuerpo de la reivindicación 8, en el que el segundo polipéptido comprende un dominio variable de la cadena pesada no humana fusionado con un dominio constante de la cadena pesada humana.

12. El fragmento de anticuerpo de la reivindicación 8, en el que el segundo polipéptido comprende una CDR de una especie no humana fusionada con una secuencia de la región estructural humanizada o humana.

13. El fragmento de anticuerpo de la reivindicación 8, en el que el tercer polipéptido comprende una cadena pesada truncada del extremo N que comprende al menos una parte de la secuencia bisagra en el extremo N.

14. El fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que los dos polipéptidos de Fc están covalentemente unidos.

15. El fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en el que los dos polipéptidos de Fc están unidos mediante enlaces disulfuro intermoleculares en la región bisagra.

16. El fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en el que el fragmento de anticuerpo cuando se une a una molécula diana inhibe la multimerización de moléculas diana.

17. El fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en el que el fragmento de anticuerpo cuando se une a una molécula diana inhibe la unión de un componente de unión afín a la molécula diana.

18. El fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en el que el primer polipéptido de Fc y el segundo polipéptido de Fc se encuentran en una superficie de separación, y la superficie de separación del segundo polipéptido de Fc comprende una protuberancia que es posicionable en una cavidad en la superficie de separación del primer polipéptido de Fc.

19. El fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-18, en el que el segundo polipéptido de Fc ha sido alterado a partir de un polipéptido molde/original para codificar la protuberancia o el primer polipéptido de Fc ha sido alterado a partir de un polipéptido molde/original para codificar la cavidad, o ambos.

20. El fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-19, en el que el segundo polipéptido de Fc ha sido alterado a partir de un polipéptido molde/original para codificar la protuberancia y el primer polipéptido de Fc ha sido alterado a partir de un polipéptido molde/original para codificar la cavidad, o ambos.

21. El fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-20, en el que el primer polipéptido de Fc y el segundo polipéptido de Fc se encuentran en una superficie de separación, en el que la superficie de separación del segundo polipéptido de Fc comprende una protuberancia que es posicionable en una cavidad en la superficie de separación del primer polipéptido de Fc, y en el que la cavidad o protuberancia, o ambos, se han introducido en la superficie de separación del primer y segundo polipéptidos de Fc, respectivamente.

22. El fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 19-21, en el que la protuberancia y la cavidad se han introducido en la superficie de separación de los polipéptidos de Fc respectivos.

23. El fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 19-22, en el que la protuberancia y la cavidad comprenden cada una un residuo de aminoácido natural.

24. El fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 19-23, en el que el polipéptido de Fc que comprende la protuberancia se genera reemplazando un residuo original de la superficie de separación de un polipéptido molde/original por un residuo de importación que tiene un volumen de cadena lateral mayor que el residuo original.

25. El fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 19-24, en el que el polipéptido de Fc que comprende la protuberancia se genera mediante un procedimiento que comprende una etapa en la que ácido nucleico que codifica un residuo original de la superficie de separación de dicho polipéptido se reemplaza con ácido nucleico que codifica un residuo de importación que tiene un volumen de cadena lateral mayor que el original.

26. El fragmento de anticuerpo de la reivindicación 24 ó 25, en el que el residuo original es treonina.

27. El fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 24-26, en el que el residuo de importación es arginina (R).

28. El fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 24-26, en el que el residuo de importación es fenilalanina (F).

29. El fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 24-26, en el que el residuo de importación es tirosina (Y).

30. El fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 24-26, en el que el residuo de importación es triptófano (W).

31. El fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 18-23, en el que el polipéptido de Fc que comprende la cavidad se genera reemplazando un residuo original en la superficie de separación de un polipéptido molde/original por un residuo de importación que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño que el residuo original.

32. El fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 18-23 y 31, en el que el polipéptido de Fc que comprende la cavidad se genera mediante un procedimiento que comprende una etapa en la que el ácido nucleico que codifica un residuo original de la superficie de separación de dicho polipéptido se reemplaza por ácido nucleico que codifica un residuo de importación que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño que el original.

33. El fragmento de anticuerpo de la reivindicación 31 ó 32, en el que el residuo original es treonina.

34. El fragmento de anticuerpo de la reivindicación 31 ó 32, en el que el residuo original es leucina.

35. El fragmento de anticuerpo de la reivindicación 31 ó 32, en el que el residuo original es tirosina.

36. El fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 31-35, en el que el residuo de importación no es cisteína (C).

37. El fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 31-35, en el que el residuo de importación es alanina (A).

38. El fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 31-35, en el que el residuo de importación es serina (S).

39. El fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 31-35, en el que el residuo de importación es treonina (T).

40. El fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 31-35, en el que el residuo de importación es valina (V).

41. El fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 31-40, en el que el polipéptido de Fc que comprende la cavidad comprende la sustitución de dos o más aminoácidos originales seleccionados del grupo que consiste en treonina, leucina y tirosina.

42. El fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 31-41, en el que el polipéptido de Fc que comprende la cavidad comprende dos o más residuos de importación seleccionados del grupo que consiste en alanina, serina, treonina y valina.

43. El fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 31-42, en el que el polipéptido de Fc que comprende la cavidad comprende la sustitución de dos o más aminoácidos originales seleccionados del grupo que consiste en treonina, leucina y tirosina, y en el que dichos aminoácidos originales se reemplazan por residuos de importación seleccionados del grupo que consiste en alanina, serina, treonina y valina.

44. El fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 18-43, en el que el polipéptido de Fc que comprende la cavidad comprende la sustitución de treonina en la posición 366 por serina, numeración de aminoácidos según el esquema de numeración de EU de Kabat.

45. El fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 18-43, en el que el polipéptido de Fc que comprende la cavidad comprende la sustitución de leucina en la posición 368 con alanina, numeración de aminoácidos según el esquema de numeración de EU de Kabat.

46. El fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 18-45, en el que el polipéptido de Fc que comprende la cavidad comprende la sustitución de tirosina por valina.

47 El fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 18-46, en el que el polipéptido de Fc que comprende la cavidad comprende dos o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en T366S, L368A y Y407V.

48. El fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 18-47, en el que el polipéptido de Fc que comprende la protuberancia comprende la sustitución de treonina en la posición 366 por triptófano, numeración de aminoácidos según el esquema de numeración de EU de Kabat.

49. El fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-48, en el que el primer y segundo polipéptidos de Fc comprenden cada uno un dominio constante de anticuerpo.

50. El fragmento de anticuerpo de la reivindicación 49, en el que el dominio constante de anticuerpo es un dominio CH2 y/o CH3.

51. El fragmento de anticuerpo de la reivindicación 49 ó 50, en el que el dominio constante de anticuerpo es de una IgG.

52. El fragmento de anticuerpo de la reivindicación 51, en el que la IgG es IgG_1 humana.

53. El fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-52 que es monoespecífico.

54. El fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-53 que es una inmunoadhesina monoespecífica.

55. El fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-54 que es una quimera de anticuerpo-inmunoadhesina.

56. Una composición que comprende una población de inmunoglobulinas en la que al menos el 75% de

las inmunoglobulinas es el fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-55.

57. Un procedimiento de preparación del fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-55 que comprende las etapas de:

(a) cultivar una célula huésped que comprende ácido nucleico que codifica el fragmento de anticuerpo; y
(b) recuperar el fragmento de anticuerpo del cultivo de células huésped.

58. El procedimiento de la reivindicación 57, en el que los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos están operativamente ligados a regiones de iniciación de la traducción (TIR) de fuerza aproximadamente igual.

59. El procedimiento de la reivindicación 57 ó 58, en el que dicha célula huésped es procariota.

60. El procedimiento de la reivindicación 59, en el que la célula huésped es *E. coli*.

61. El procedimiento de la reivindicación 60, en el que la *E. coli* es de una cepa deficiente en actividades de proteasas endógenas.

62. El procedimiento de la reivindicación 57 ó 58, en el que dicha célula huésped es eucariota.

63. El procedimiento de la reivindicación 62, en el que la célula huésped es CHO.

64. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 57-63, en el que el fragmento de anticuerpo se recupera de medio de cultivo.

65. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 57-63, en el que el fragmento de anticuerpo se recupera de lisado celular.

66. Un procedimiento de preparación del fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 18-55 que comprende las etapas de:

(a) cultivar una célula huésped que comprende ácido nucleico que codifica el fragmento de anticuerpo, en el que el ácido nucleico que codifica la superficie de separación del segundo polipéptido de Fc ha sido alterado a partir de ácido nucleico que codifica la superficie de separación original del segundo polipéptido de Fc para codificar la protuberancia, o el ácido nucleico que codifica la superficie de separación del primer polipéptido de Fc ha sido alterado a partir de ácido nucleico que codifica la superficie de separación original del primer polipéptido de Fc para codificar la cavidad o ambos; y

(b) recuperar el fragmento de anticuerpo del cultivo de células huésped.

67. El procedimiento de la reivindicación 66, en el que el ácido nucleico que codifica el segundo polipéptido de Fc ha sido alterado a partir del ácido nucleico original para codificar la protuberancia y el ácido nucleico que codifica el primer polipéptido ha sido alterado a partir del ácido nucleico original para codificar la cavidad.

68. El procedimiento de la reivindicación 66, en el que la etapa (a) va precedida de una etapa en la que el ácido nucleico que codifica un residuo de aminoácido original de la superficie de separación del segundo polipéptido de Fc se reemplaza por ácido nucleico que codifica un residuo de aminoácido de importación que tiene un volumen de cadena lateral mayor que el residuo de aminoácido original, en el que el residuo de importación con el volumen de cadena lateral mayor comprende la protuberancia.

69. El procedimiento de la reivindicación 66, en el que la etapa (a) va precedida de una etapa en la que el ácido nucleico que codifica un residuo de aminoácido original en la superficie de separación del primer polipéptido de Fc se reemplaza por ácido nucleico que codifica un residuo de aminoácido de importación que tiene un volumen de cadena lateral más pequeño que el residuo de aminoácido original de manera que se forme la cavidad.

70. El procedimiento de la reivindicación 66, en el que la etapa (a) va precedida de una etapa en la que el ácido nucleico que codifica el primer y segundo polipéptidos de Fc se introduce en la célula huésped.

71. Un procedimiento de preparación del fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-55 que comprende las etapas de:

(a) preparar polipéptidos que forman el fragmento de anticuerpo; y
(b) permitir que se produzca la heteromultimerización;

mediante lo cual se forma el fragmento de anticuerpo.

72. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 57-71, en el que la etapa (b) comprende acoplar el primer polipéptido de Fc y el segundo polipéptido de Fc *in vitro*.

73. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 57-71, en el que la secuencia de aminoácidos de la superficie de separación original ha sido alterada de manera que se genera la protuberancia y la cavidad en la superficie de separación manipulada.

74. Ácido nucleico aislado que codifica el fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-55.

75. Una composición que comprende dos o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican conjuntamente el fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-55.

76. Una célula huésped que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 74 ó 75.

77. La célula huésped de la reivindicación 76, en la que el ácido nucleico que codifica el brazo de unión a antígeno está presente en un único vector.

78. La célula huésped de la reivindicación 76, en la que el ácido nucleico que codifica el brazo de unión a antígeno está presente en vectores separados.

79. La célula huésped de la reivindicación 76, en la que el ácido nucleico que codifica el brazo de unión a antígeno y la cadena pesada truncada del extremo N estás presentes en un único vector.

80. Un procedimiento de preparación del fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-55 que comprende cultivar una célula huésped que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 74 ó 75 de manera que se expresen polipéptidos, y recuperar el fragmento de anticuerpo del cultivo celular.

81. El procedimiento de la reivindicación 80, en el que el fragmento de anticuerpo se recupera del lisado celular.

82. El procedimiento de la reivindicación 80, en el que el fragmento de anticuerpo se recupera del medio de cultivo celular.

83. El procedimiento de la reivindicación 80, en el que la célula huésped es una célula procariota.

84. El procedimiento de la reivindicación 81, en el que la célula huésped es *E. coli*.

85. El procedimiento de la reivindicación 80, en el que la célula huésped es de mamífero.

86. Una composición que comprende el fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-55 y un vehículo.

87. Un procedimiento de generación de un fragmento de anticuerpo que comprende un único brazo de unión a antígeno y una región Fc que aumenta la estabilidad del fragmento de anticuerpo en comparación con una molécula de Fab que comprende dicho brazo de unión a antígeno, comprendiendo dicho procedimiento expresar en una célula huésped adecuada ácido nucleico que codifica el brazo de unión a antígeno y un primer y segundo polipéptidos de Fc en condiciones que permitan la formación del brazo de unión a antígeno y dimerización del primer y segundo polipéptidos de Fc para formar dicha región Fc, en el que uno, pero no ambos de los polipéptidos de Fc, es una cadena pesada truncada del extremo N, y en el que dicho fragmento de anticuerpo se une específicamente a c-met.

88. Uso de un fragmento de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 55 para la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad o trastorno, en el que dicha enfermedad o trastorno es cáncer; tumores malignos o benignos; tumores malignos no leucémicos o linfoides; o trastornos relacionados con la angiogénesis.

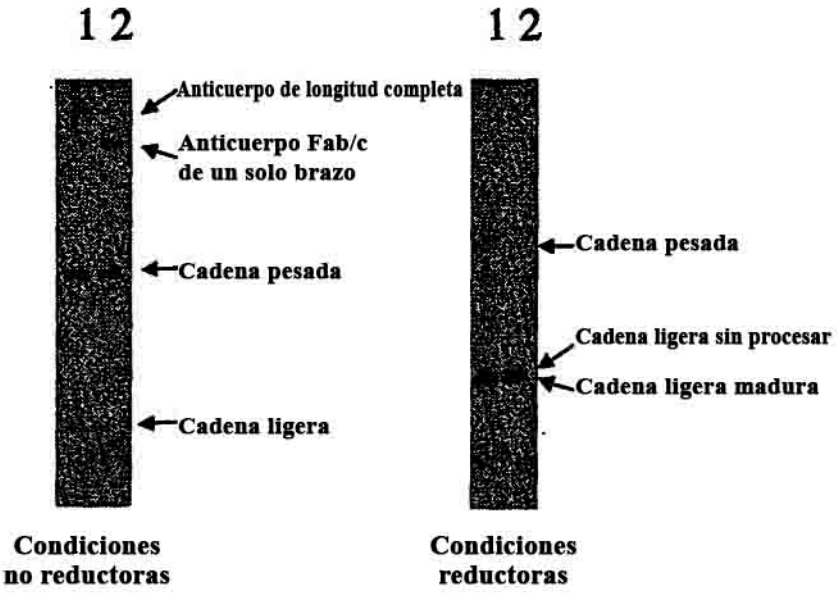
89. Uso según la reivindicación 88, en el que dicha enfermedad o trastorno es cáncer, y en el que dicho cáncer es linfoma, blastoma, sarcoma, leucemia, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer rectal, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer pancreático, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gastrointestinal, cáncer de ovario o mieloma múltiple.

90. Un fragmento de anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 55 para su uso en el

tratamiento o la prevención de una enfermedad o trastorno, en el que dicha enfermedad o trastorno es cáncer; tumores malignos o benignos; tumores malignos no leucémicos o linfoides; o trastornos relacionados con la angiogénesis.

91. Un fragmento de anticuerpo según la reivindicación 90, en el que dicha enfermedad o trastorno es cáncer, y en el que dicho cáncer es linfoma, blastoma, sarcoma, leucemia, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer rectal, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer pancreático, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gastrointestinal, cáncer de ovario o mieloma múltiple.

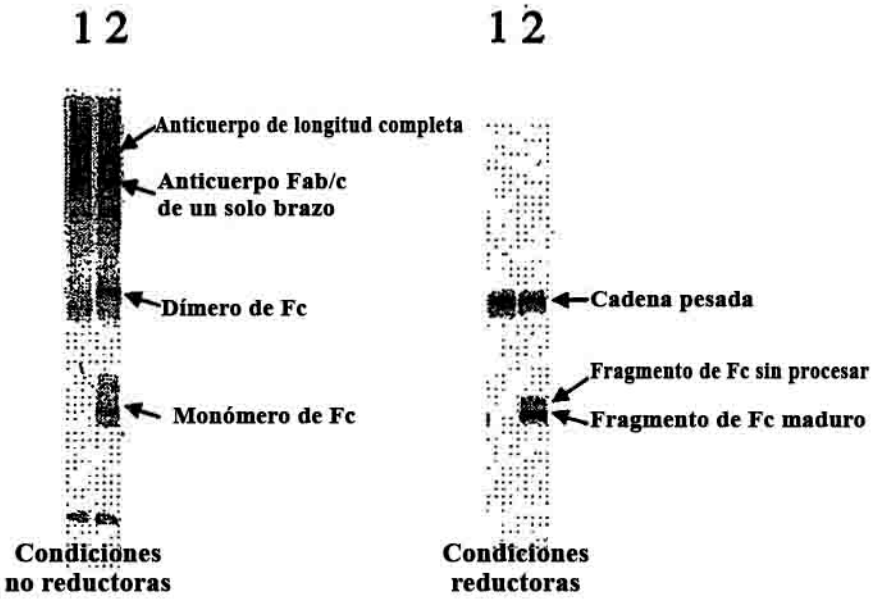
FIG._1



Análisis de transferencia Western de anti-Fab

1) anti-c-Met FL (pxcM11C)
2) anti-c-Met - Fc (pxcM11C-Fc)

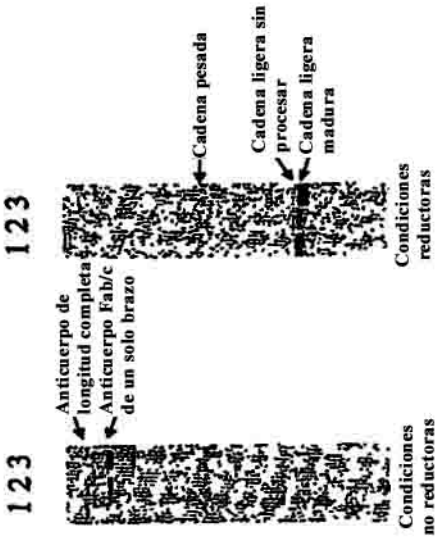
FIG._2



Análisis de transferencia Western de anti-Fab

1) anti-c-Met FL (pxcM11C)
2) anti-c-Met - Fc (pxcM11C-Fc)

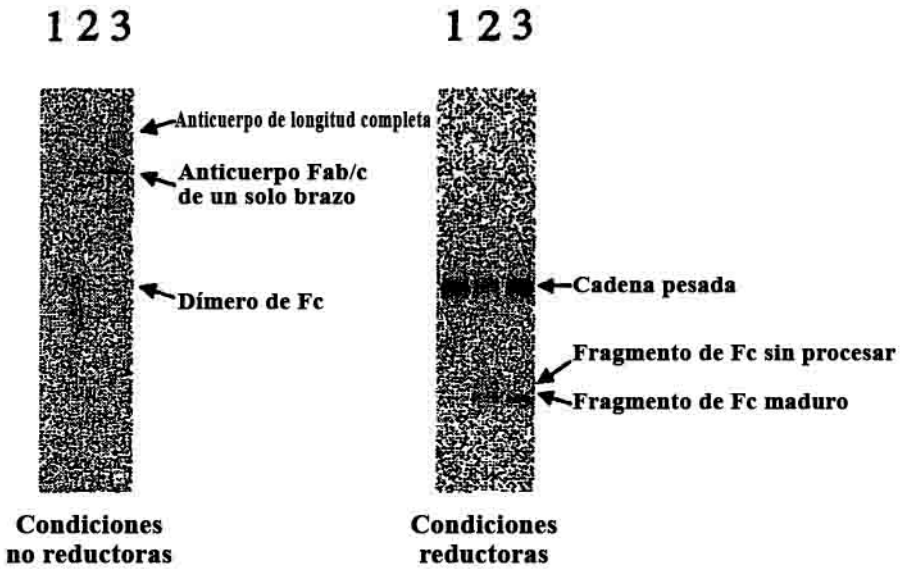
FIG._3



Análisis de transferencia Western de anti-Fab

1) anti-c-Met FL (pxcM11C)
2) anti-c-Met - Fc (pxcM11C-Fc)
3) anti-c-Met.Hole-Fc.Knob (pxcM11C.H-Fc.K)

FIG._4



Análisis de transferencia Western de anti-Fc

1) anti-c-Met FL (pxcM11C)
2) anti-c-Met - Fc (pxcM11C-Fc)
3) anti-c-Met.Hole-Fc.Knob (pxcM11C.H-Fc.K)

FIG._5

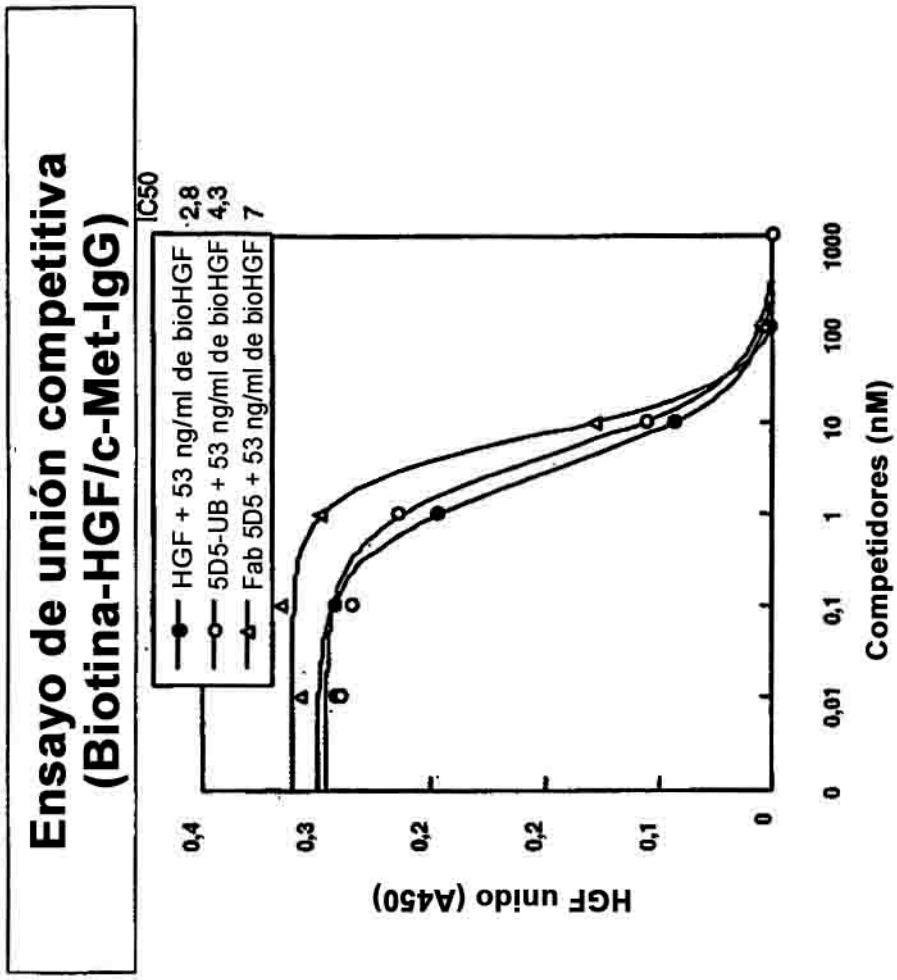

Ensayo de unión competitiva
(Biotina-HGF/c-Met-IgG)
IC50
HGF + 53 ng/ml de bioHGF 2,8
5D5-UB + 53 ng/ml de bioHGF 4,3
Fab 5D5 + 53 ng/ml de bioHGF 7
HGF unido (A450)
0,4
0,3
0,2
0,2
0,1
0
0
0,01
0,1
1
10
100
1000
Competidores (nM)

FIG._6. Células U87, ensayo KIRA

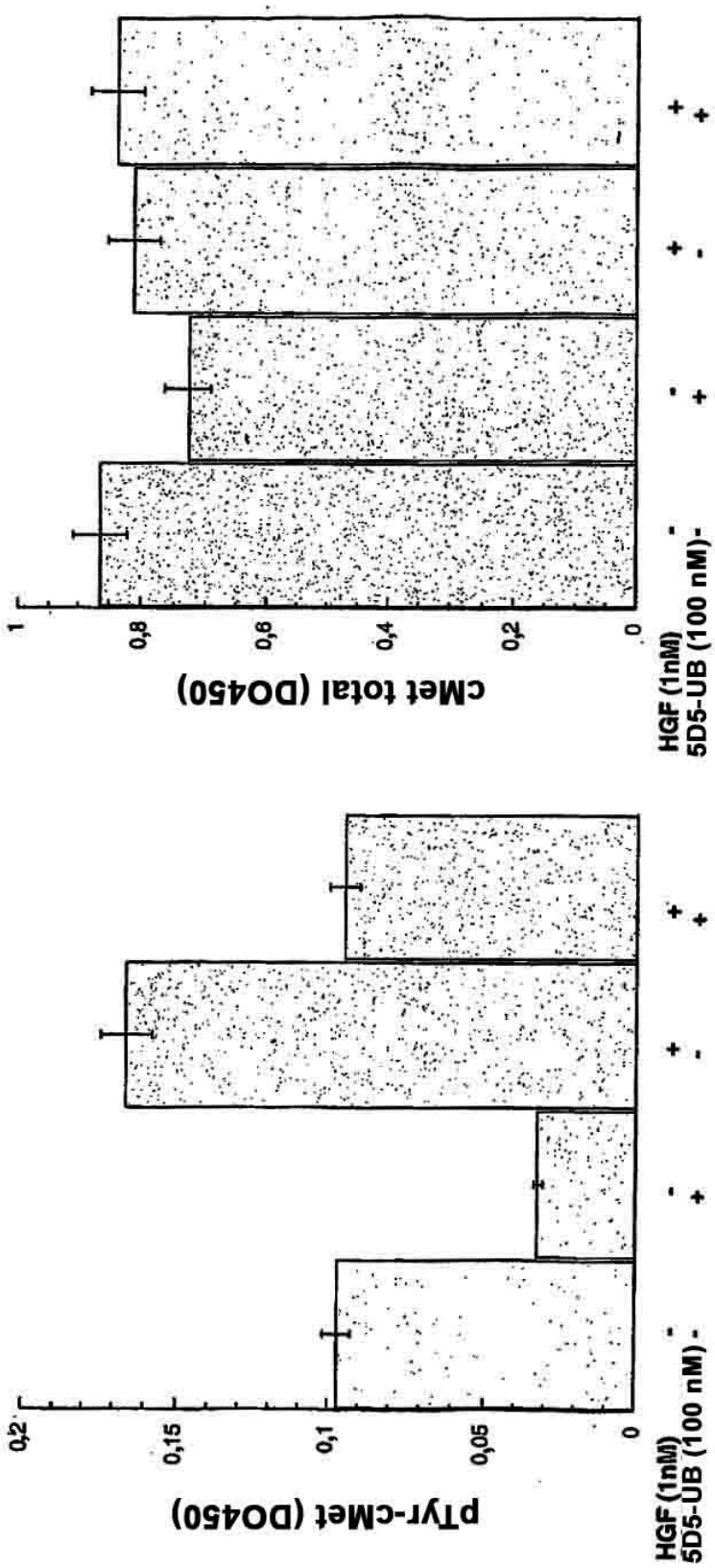


FIG._7. 5D5 de un solo brazo bloquea la proliferación inducida por HGF, pero no por IL-3, en células BaF3-hMet

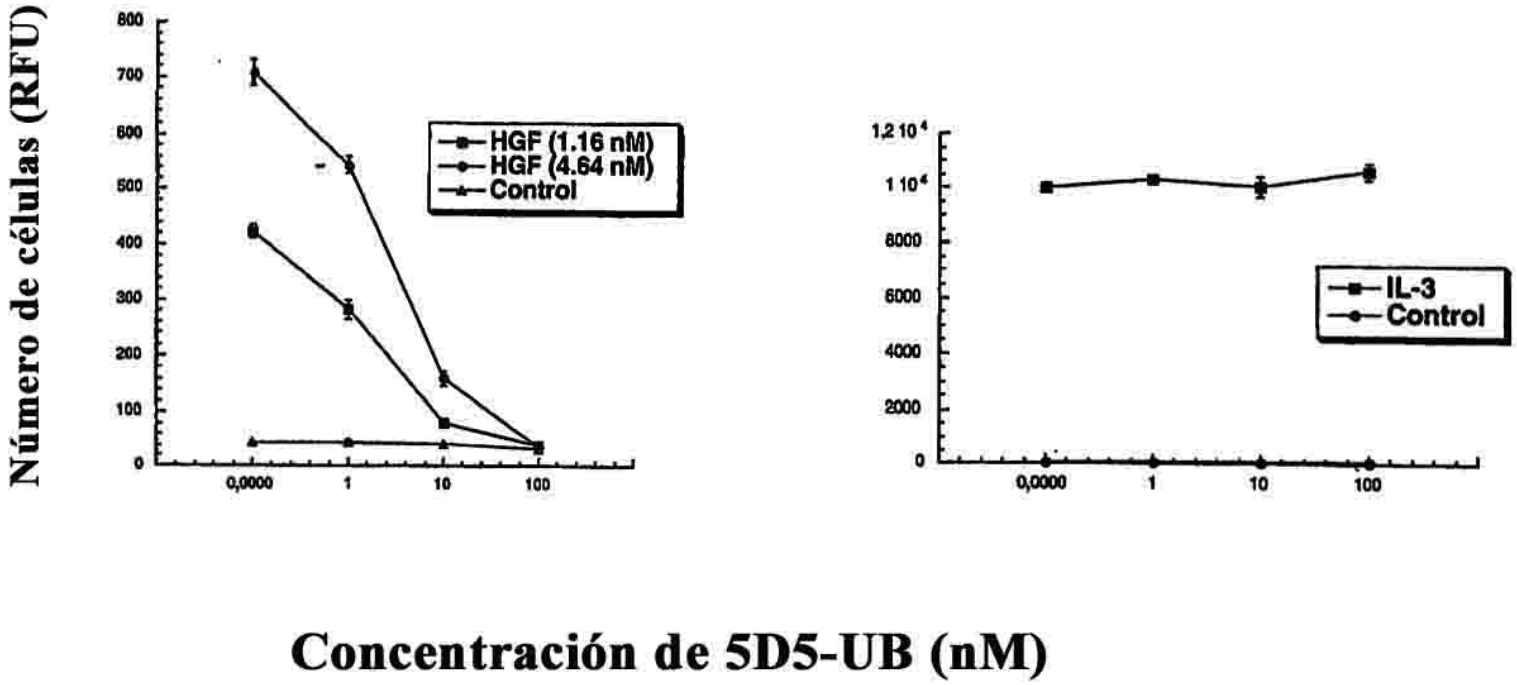


FIG._8

Ensayo de migración
(Cámara de Boyden)

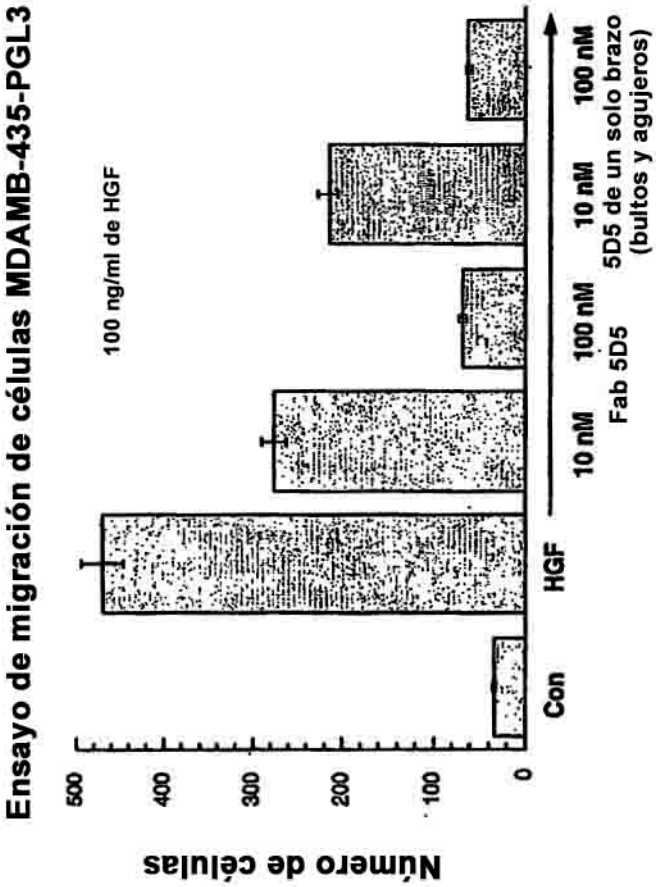


FIG._9A

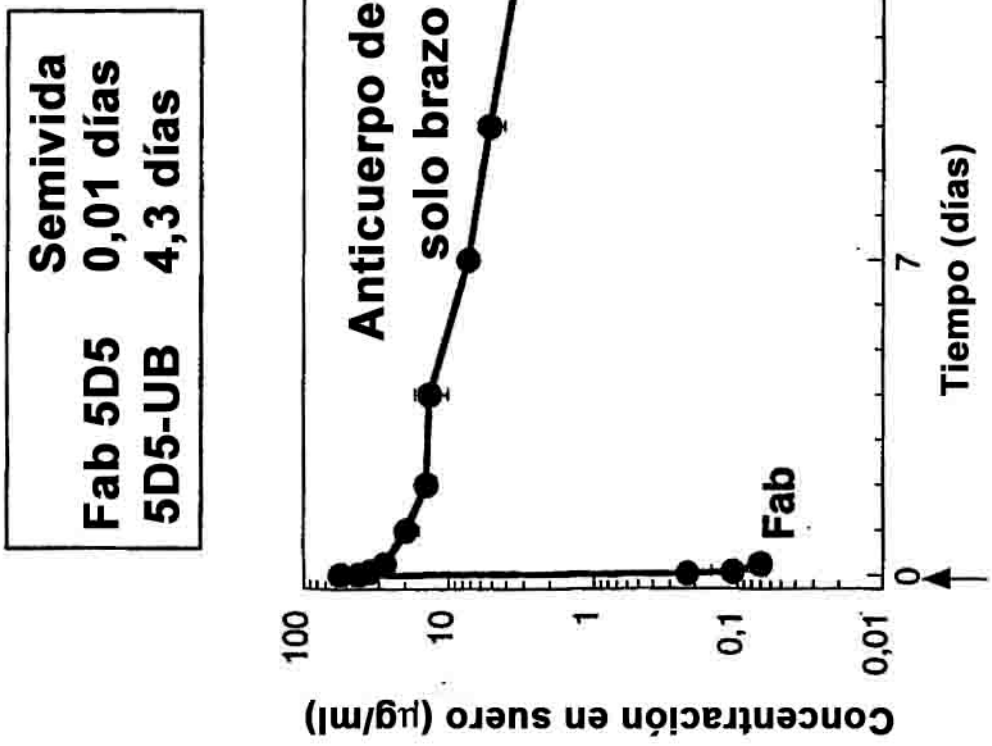

Semivida
Fab 5D5 0,01 días
5D5-UB 4,3 días
Anticuerpo de un solo brazo
Fab
Concentración en suero (µg/ml)
100
10
1
0,1
0,01
0
7
14
Tiempo (días)

FIG._9B

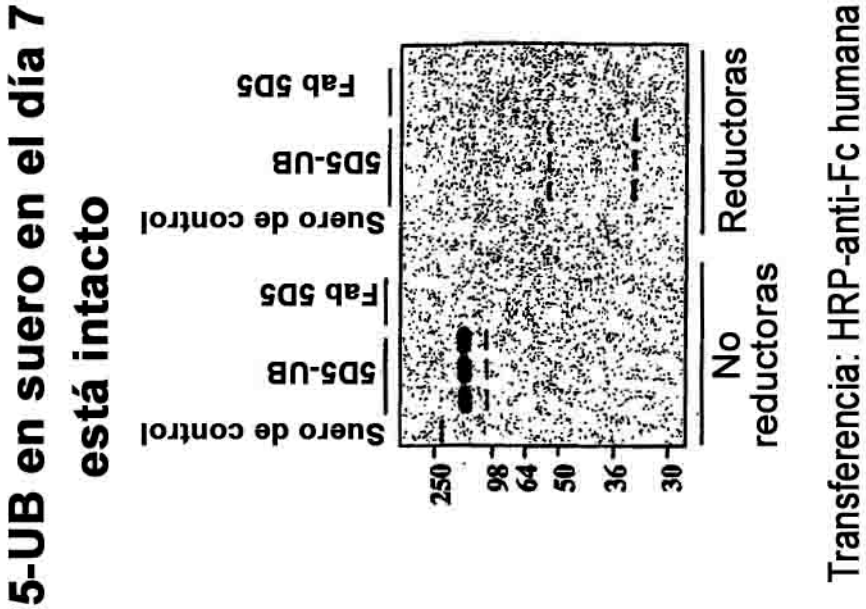

5D5-UB en suero en el día 7 está intacto
Suero de control
5D5-UB
Fab 5D5
Suero de control
5D5-UB
Fab 5D5
250
98
64
50
36
30
No reductoras
Reductoras
Transferencia: HRP-anti-Fc humana

FIG._10A

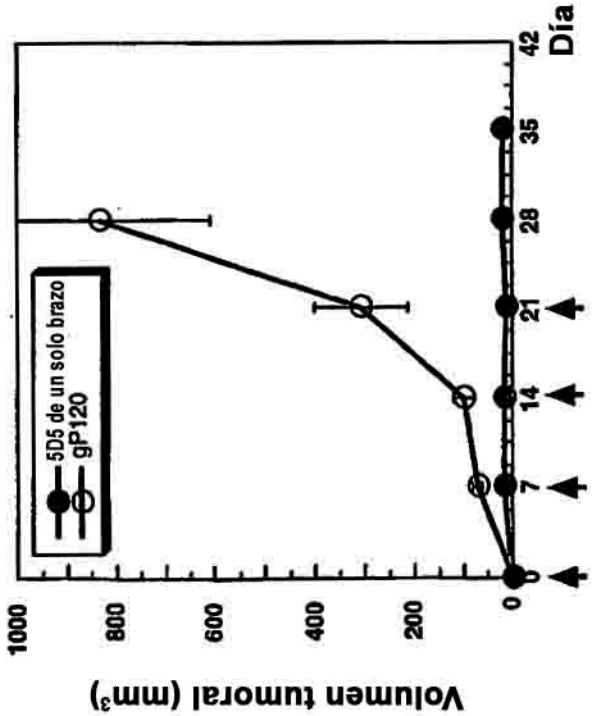
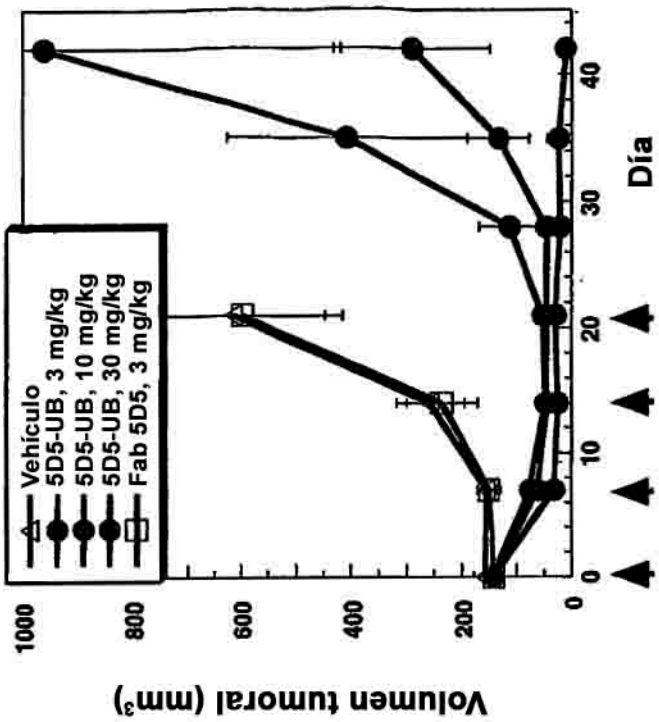



FIG._10B