

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 023**

51 Int. Cl.:  
**C07K 16/00** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61P 37/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07755812 .0**  
96 Fecha de presentación: **20.04.2007**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2027154**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.02.2009**

54 Título: **Dominios de región constante de inmunoglobulina con estabilidad mejorada**

30 Prioridad:  
**21.04.2006 US 794202 P**  
**21.11.2006 US 860774 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**11.09.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**11.09.2012**

73 Titular/es:  
**AMGEN INC.**  
**M/S 27-4-A ONE AMGEN CENTER DRIVE**  
**THOUSAND OAKS, CA 91320-1799, US**

72 Inventor/es:  
**MATSUMURA, Masazumi y**  
**JACOB, Jaby**

74 Agente/Representante:  
**Aznárez Urbieto, Pablo**

ES 2 387 023 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Dominios de región constante de inmunoglobulina con estabilidad mejorada

En general, la presente invención se refiere a medicamentos para el tratamiento de enfermedades y, más específicamente, a productos farmacéuticos polipeptídicos de estabilidad mejorada.

5 Con la llegada de la tecnología de ADN recombinante, los productos terapéuticos basados en proteínas se han ido haciendo cada vez más habituales en el repertorio de fármacos de que disponen los facultativos para tratar una amplia gama de enfermedades, desde cáncer hasta enfermedades autoinmunes. Junto a los avances científicos y técnicos que han tenido lugar en la producción de proteínas recombinantes, otra razón del éxito de los productos terapéuticos basados en proteínas es su alta especificidad con respecto a las moléculas diana. La capacidad para emplear  
10 moléculas biológicas como productos farmacéuticos en el tratamiento de enfermedades ha hecho avanzar de forma significativa la atención médica y la calidad de vida durante el último cuarto de siglo. En el año 2005 había en el mercado más de ciento cincuenta productos farmacéuticos basados en proteínas aprobados, y se espera que esta cantidad aumente en los próximos años.

15 Actualmente se pueden producir algunas proteínas que muestran diversos efectos farmacológicos *in vivo* en grandes cantidades para diferentes aplicaciones farmacéuticas. La estabilidad y homogeneidad de una preparación proteínica farmacéutica es un criterio particularmente ventajoso para lograr tratamientos seguros, coherentes y eficaces. La pérdida de funcionalidad del producto terapéutico dentro de una preparación disminuirá su concentración efectiva en una administración dada. Similarmente, las especies de conformación no deseada de una proteína terapéutica pueden conducir a una pérdida de eficacia y al riesgo de efectos secundarios adversos.

20 Las proteínas son moléculas complejas con estructuras primarias, secundarias, terciarias y en algunos casos cuaternarias definidas, que todas ellas desempeñan un papel en la impartición de funciones biológicas específicas. La complejidad estructural de productos farmacéuticos biológicos tales como proteínas hace que éstas sean susceptibles a diversos procesos que conllevan a una inestabilidad estructural y funcional y a una pérdida de seguridad. Por ejemplo, la producción recombinante de productos terapéuticos de anticuerpos requiere que cada cadena del complejo multimérico se sintetice con exactitud, plegada correctamente y autoensamblada en complejos diméricos o tetraméricos.  
25

El tercer dominio de región constante de anticuerpos (C<sub>H3</sub>) desempeña una función estructural en la estabilidad y la asociación de cadenas pesadas de moléculas de anticuerpos. Aparte de los enlaces disulfuro que mantienen unidas las dos cadenas pesadas en la región bisagra, fuertes interacciones no covalentes entre los dos monómeros del dominio C<sub>H3</sub> estabilizan la región constante (Fc) de las moléculas de anticuerpos. El dominio C<sub>H3</sub> tiene un enlace disulfuro de intradominio insertado que estabiliza dos holas β, una característica común observada en miembros de la superfamilia peptídica de las inmunoglobulinas. Sin embargo, diversos anticuerpos terapéuticos (tanto IgG1 como IgG2) presentan enlaces disulfuro reducidos hasta en un 15% de los dominios C<sub>H3</sub>. Se ha informado de que el dominio C<sub>H3</sub> reducido es mucho menos estable que la molécula oxidada frente al calor, el pH ácido y desnaturalizantes químicos tales como clorhidrato de guanidina. Además, en el estado reducido y desplegado, cuando las cisteínas están expuestas a los  
30 disolventes, estos residuos son susceptibles de formar enlaces disulfuro intermoleculares, que conducen a agregados covalentes irreversibles. La agregación proteínica tiene una importancia particular en la producción biofarmacéutica, ya que, con frecuencia, conduce a una reducción de la bioactividad que influye en la potencia del fármaco, y también puede provocar reacciones inmunológicas o antigénicas no deseables en los pacientes.  
35

40 En este contexto, Demarest, S.J. y col. (Demarest, S.J. y col., J. Mol. Biol. 335(1), 2 de enero de 2004, pp. 41-48) describen la optimización de las características de plegado/replegado del dominio C<sub>H3</sub> de anticuerpos mediante la comparación de secuencias F<sub>c</sub> de 19 especies de mamíferos diferentes, la identificación de sitios específicos para la optimización y la mutación de dichos sitios.

45 Sin embargo, a pesar de los avances realizados en la utilización de proteínas en los tratamientos terapéuticos y sus métodos de producción, sigue existiendo la necesidad de desarrollar productos biofarmacéuticos basados en anticuerpos con mayor homogeneidad de conformación y estabilidad mejorada. La producción de una preparación de anticuerpos terapéuticos próxima a la homogeneidad para una conformación nativa correctamente plegada que posea enlaces disulfuro adecuados aumentaría la eficacia y seguridad del producto terapéutico y reduciría los costes de producción y tratamiento. Numerosos anticuerpos terapéuticos y proteínas terapéuticas basadas en anticuerpos resultarían beneficiados con estas mejoras.

50 Así, existe la necesidad de disponer de preparaciones biofarmacéuticas que demuestren una mayor homogeneidad estructural y estabilidad cuando se producen bajo diversas condiciones diferentes. La presente invención satisface esta necesidad y además proporciona ventajas relacionadas.

55 La invención proporciona un polipéptido aislado que incluye un polipéptido de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina, o un fragmento funcional de éste, que presenta al menos una sustitución Pro a Gly y muestra una estabilidad aumentada, incluyendo una mayor tasa de plegado, en comparación con un dominio C<sub>H3</sub> de tipo salvaje (WT) no sustituido, y donde la o las sustituciones de Pro a Gly comprenden un residuo Pro38 de C<sub>H3</sub> o un dominio C<sub>H3</sub> equivalente al mismo. La invención también proporciona complejos multiméricos de un polipéptido de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina, o un fragmento funcional de éste, que tiene al menos una sustitución Pro a Gly con un

segundo polipéptido de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina. Los complejos multiméricos pueden incluir anticuerpos, fragmentos funcionales de anticuerpos, como Fd, Fv, Fab, F(ab'), F(ab)<sub>2</sub>, F(ab')<sub>2</sub>, Fv monocatenario (scFv), anticuerpos quiméricos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos o minicuerpos y otros polipéptidos de unión que tienen un polipéptido de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina tales como un pepticuerpo o un polipéptido de fusión de Fc. También se proporciona una población aislada de polipéptidos, incluyendo una pluralidad de polipéptidos de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina, o fragmentos funcionales de la misma. Cada polipéptido de dominio de región C<sub>H3</sub> dentro de las poblaciones incluye al menos una sustitución Pro a Gly y muestra una mayor estabilidad, incluyendo una mayor tasa de plegado, en comparación con un dominio C<sub>H3</sub> no sustituido, comprendiendo la o las sustituciones Pro a Gly un residuo Pro38 de C<sub>H3</sub> o un dominio C<sub>H3</sub> equivalente al mismo. La invención también proporciona un método para producir un polipéptido de unión multimérico y un polipéptido de unión para el tratamiento de una afección patológica caracterizada por un crecimiento celular aberrante.

La Figura 1 muestra la secuencia de aminoácidos de un dominio C<sub>H3</sub> de tipo salvaje (WT) representativo (SEQ ID N°: 1), correspondiente a un dominio C<sub>H3</sub> de IgG<sub>1</sub>.

La Figura 2 muestra la alineación de secuencia de los aminoácidos de los dominios de región constante para las IgG subclases IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> e IgG<sub>4</sub> (SEQ ID N°: 2-5, respectivamente). Debajo de la alineación se muestra una secuencia de aminoácidos consenso para el dominio de región constante de estas subclases de IgG (SEQ ID N°: 6). El residuo Pro38 del dominio C<sub>H3</sub> está localizado en el residuo 257 en cada dominio de región constante de esta alineación, que corresponde al residuo 155 en la secuencia de la región Fc humana descrita más abajo (SEQ ID N°: 13).

La Figura 3 muestra la alineación de secuencia de los aminoácidos de los dominios de región constante para las Ig de las clases IgG (representada por IgG<sub>1</sub>), IgA<sub>1</sub>, IgA<sub>2</sub>, IgD, IgE e IgM (SEQ ID N°: 2 y 7-11, respectivamente). Debajo de la alineación se muestra una secuencia de aminoácidos consenso para el dominio de región constante de estas clases de Ig (SEQ ID N°: 12). El residuo Pro38 del dominio C<sub>H3</sub> está localizado en el residuo 381 en cada dominio de región constante de esta alineación, que corresponde al residuo 155 en la secuencia de la región Fc humana descrita más abajo (SEQ ID N°: 13).

La Figura 4 muestra una lista de ejemplos de afecciones patológicas cancerosas.

La Figura 5 muestra las propiedades espectroscópicas de los polipéptidos de dominio C<sub>H3</sub> de tipo salvaje (WT) y P38G correspondientes a datos de dicroísmo circular (CD) de (a) UV cercano y (b) UV lejano de WT (línea continua) y P38G (línea discontinua). La Figura 5 (c) muestra los espectros de emisión de fluorescencia del polipéptido WT plegado (línea continua) y desplegado (línea discontinua).

La Figura 6 muestra los resultados de la desnaturalización inducida por clorhidrato de guanidina (GdmCl) en las formas reducidas de los polipéptidos de dominio C<sub>H3</sub> WT (□) y P38G (Δ).

La Figura 7 muestra ejemplos de la cinética de desplegamiento de los polipéptidos (a) WT y (b) P38G.

La Figura 8 muestra ejemplos de los resultados de la dependencia de las tasas de desplegamiento con respecto a la concentración de GdmCl.

La Figura 9 muestra ejemplos de la cinética de plegamiento de los polipéptidos (a) WT y (b) P38G.

La Figura 10 muestra ejemplos de resultados de la dependencia de las tasas de plegamiento y las amplitudes (recuadro) con respecto al desnaturalizante para los polipéptidos WT y P38G.

La Figura 11 muestra los resultados de la cinética de replegamiento de doble salto de los polipéptidos (a) WT y (b) P38G.

La Figura 12 muestra cromatogramas de fase inversa del polipéptido C<sub>H3</sub> de tipo salvaje con varios estados disulfuro.

La Figura 13 muestra el análisis del replegamiento oxidante de los polipéptidos C<sub>H3</sub> (a) WT y (b) P38G analizados mediante HPLC en fase inversa.

La invención se refiere al descubrimiento de que la sustitución de uno o más residuos de prolina en un dominio de inmunoglobulina puede aumentar la tasa de plegamiento de los dominios y la extensión de los dominios correctamente plegados, aumentando así su estabilidad. Un residuo prolina de un dominio de inmunoglobulina particularmente útil que puede ser modificado para aumentar la tasa y la extensión del plegamiento es la prolina en la posición 38 (Pro38) de un dominio de región C<sub>H3</sub> de la inmunoglobulina. Este residuo está situado muy cerca de un giro β y favorece una conformación *cis*. Sin embargo, el plegamiento de un dominio de inmunoglobulina tal como un dominio C<sub>H3</sub> está asociado con la isomerización *trans* a *cis* de Pro38, que provoca un plegamiento lento. Por consiguiente, la sustitución de Pro38 por un residuo de aminoácido energéticamente favorable puede aumentar la tasa de plegamiento general reduciendo o eliminando este proceso de isomerización lenta de *trans* a *cis* durante el plegamiento del polipéptido, conduciendo a dominios plegados de forma más correcta en un período de tiempo más corto. Los dominios de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina con sustitución de Pro38 de la invención se pueden utilizar de forma ventajosa en la producción de preparaciones más homogéneas de anticuerpos terapéuticos y otros polipéptidos de unión terapéuticos en los que se utiliza un dominio de región constante de inmunoglobulina fusionado con un dominio de unión de ligando.

En una realización específica, la invención se refiere a un dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina donde el residuo Pro38 se ha sustituido por glicina (P38G). Los dominios C<sub>H3</sub> P38G de la invención se incorporan en inmunoglobulinas que tienen la especificidad de unión deseada para aumentar la estabilidad gracias a un aumento de las interacciones no covalentes impartidas por la mayor cantidad de moléculas correctamente plegadas. Estas preparaciones de  
 5 inmunoglobulina que contienen dominios C<sub>H3</sub> P38G también muestran una mayor homogeneidad de conformación, lo que conduce a preparaciones terapéuticas más eficaces y a una mayor seguridad.

Tal como se utiliza aquí, el término “aislado” empleado con referencia a un polipéptido significa que el polipéptido de referencia está libre de al menos un componente asociado al polipéptido en su estado natural. Por consiguiente, un polipéptido aislado incluye un polipéptido esencialmente puro y también una mezcla heterogénea que contiene el  
 10 polipéptido aislado. Un ejemplo de polipéptido esencialmente puro es una preparación esencialmente homogénea que es adecuada para ser administrada a un humano. Un ejemplo específico de mezcla heterogénea incluye un extracto celular que contiene el polipéptido aislado.

Tal como se utiliza aquí, el término “inmunoglobulina” (Ig) se refiere a un anticuerpo que consiste en un complejo polipeptídico formado por cadenas pesadas y ligeras, generalmente unidas por enlaces disulfuro e interacciones no covalentes, y muestra una afinidad de unión específica por una diana o un antígeno molecular. Las inmunoglobulinas tienen una estructura de núcleo común de dos cadenas ligeras y dos pesadas unidas por enlaces disulfuro. Tanto las cadenas ligeras como las pesadas contienen una serie de unidades homólogas que se repiten, cada una de una longitud de aproximadamente 100-110 residuos de aminoácidos, que se pliegan independientemente en un motivo globular común, denominado dominio de inmunoglobulina. En cada cadena, un dominio corresponde a una secuencia de aminoácidos variable (dominio variable, dominio de región variable o V), dependiendo de la especificidad por el anticuerpo de la molécula. Los otros dominios tienen una secuencia constante (dominios constantes, dominio de región constante o C) común entre moléculas del mismo isotipo. Las cadenas pesadas se designan mediante la letra del alfabeto griego correspondiente al isotipo general del anticuerpo: IgA1 contiene cadenas pesadas  $\alpha$ 1; IgA2,  $\alpha$ 2; IgD,  $\delta$ ; IgE,  $\epsilon$ ; IgG1,  $\gamma$ 1; IgG2,  $\gamma$ 2; IgG3,  $\gamma$ 3; IgG4,  $\gamma$ 4; e IgM,  $\mu$ . Cada cadena pesada incluye cuatro dominios: un dominio amino terminal variable o V<sub>H</sub>, que presenta la mayor variación de secuencia entre cadenas pesadas, y tres dominios que forman la región constante (C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub> y C<sub>H3</sub>) ordenados desde el extremo amino hasta el carboxilo de la cadena pesada. Las cadenas pesadas  $\gamma$ ,  $\alpha$  y  $\delta$  presentan una región no globular de secuencia de aminoácidos, conocida como bisagra, que está situada entre el primer y el segundo dominio de región constante ((C<sub>H1</sub> y C<sub>H2</sub>) y permite el movimiento entre estos dos dominios. El dominio C<sub>H3</sub> de las cadenas pesadas se puede homodimerizar, facilitando la estabilidad de un complejo de anticuerpos tetramérico. Las cadenas ligeras tienen una estructura similar, pero son más pequeñas que las cadenas pesadas. Las cadenas ligeras se designan como  $\kappa$  y  $\lambda$  y contienen regiones variables y regiones constantes. En general, la región constante de las cadenas ligeras contiene un dominio único (C<sub>L</sub>).

Tal como se utiliza aquí, el concepto “dominio de inmunoglobulina” se refiere a un dominio polipeptídico que contiene una región homóloga dentro de las inmunoglobulinas conocidas en la técnica, que tienen aproximadamente 80-150 aminoácidos, y se caracterizan como un sándwich  $\beta$ . El sándwich  $\beta$  está organizado en dos capas de hojas  $\beta$  antiparalelas donde las caras hidrófobas planas de las hojas  $\beta$  se empaquetan una contra la otra. Se emplean los dominios de inmunoglobulina como criterios para clasificar los polipéptidos en la superfamilia de las polipéptidos inmunoglobulinas. Los dominios de inmunoglobulina están contenidos en los dominios de región variable y constante, de cadena pesada y ligera, de las inmunoglobulinas. Algunos ejemplos específicos de dominios de inmunoglobulina hallados en anticuerpos son V<sub>H</sub>, V<sub>L</sub>, C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub>, C<sub>H3</sub> y C<sub>L</sub>. Por consiguiente, el concepto “dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina” o “dominio C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina” se refiere al tercer dominio de región constante hallado en las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas.

Los dominios de inmunoglobulina también están contenidos en una gama diversa de otros polipéptidos y se utilizan para clasificar estos polipéptidos en superfamilias diferentes a la superfamilia de las inmunoglobulinas, incluyendo, por ejemplo, la fibronectina de tipo III, cadherina y otras superfamilias. La similitud estructural del dominio de Ig se mantiene entre miembros de diferentes superfamilias, independientemente de una identidad de secuencia significativa. Por ejemplo, en Clarke y col., Structure Fold. Des. 7:1145-53 (1999) y en bases de datos estructurales tales como la URL [pdb.weizmann.ac.il/scop/data/scop.b.c.b.html](http://pdb.weizmann.ac.il/scop/data/scop.b.c.b.html), se puede encontrar una descripción de las diferentes superfamilias que contienen dominios Ig. Ejemplos de miembros de superfamilias que contienen dominios Ig incluyen, por ejemplo, los diversos miembros individuales del grupo de las superfamilias que contienen los dominios de inmunoglobulina arriba descritos. Estos miembros individuales incluyen, por ejemplo, receptores de células T, CD8, CD4, CD2, MHC de clase I, MHC de clase II, CD1, receptor de citoquinas, receptor de GCSF, receptor de GMCSF, receptor de hormonas de crecimiento, receptor de eritropoyetina, receptor de interferón, receptor de interferón gamma, receptor de prolactina, NCAM, VCAM, ICAM, N-cadherina, E-cadherina, fibronectina, tenascina y polipéptidos de dominios que contienen I-set, o un fragmento funcional de éstos. Algunas descripciones de ejemplos de estos y otros miembros de superfamilias que contienen dominios Ig se pueden encontrar, por ejemplo, en Isacke y Horton, The Adhesion Molecule FactsBook, Segunda Ed., Academic Press, San Diego (2000); Fitzgerald y col., The Cytokine FactsBook, Segunda Ed., Academic Press, San Diego (2001), y Marsh y col., The HLA FactsBook, Segunda Ed., Academic Press, San Diego (1999).

Tal como se utiliza aquí, el concepto “residuo Pro38 de C<sub>H3</sub>” significa que el residuo de prolina (Pro o P) situado cerca de un giro beta en la posición del aminoácido 38 es un dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina. La Figura 1 muestra una secuencia de dominio C<sub>H3</sub> representativa, que corresponde a un dominio C<sub>H3</sub> de IgG<sub>1</sub> recombinante expresado en

5 *E. coli*. El residuo Pro38 corresponde a la prolina en la posición del aminoácido 38 en este ejemplo de secuencia de dominio C<sub>H3</sub>. El residuo Pro38 es un residuo de aminoácido relativamente conservado entre dominios de inmunoglobulina, incluyendo dominios de región constante de inmunoglobulina, y en particular entre dominios C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina. La Figura 2 muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos de los dominios de región constante para las IgG de las subclases IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> e IgG<sub>4</sub>. Aunque la posición real del aminoácido varía entre las diferentes subclases de IgG debido a huecos de alineación, el residuo Pro38 del dominio C<sub>H3</sub> está situado en el residuo 257 en todos estos dominios de región constante. El residuo Pro38 situado en el residuo 257 en estas alineaciones corresponde al residuo 155 en la secuencia de región Fc humana descrita más abajo como SEQ ID N°: 13. La Figura 3 muestra una alineación de secuencias de los aminoácidos de los dominios de región constante para las Ig de las clases IgG (representada por IgG<sub>1</sub>), IgA<sub>1</sub>, IgA<sub>2</sub>, IgD, IgE e IgM. Como en el caso de las subclases IgG, la posición real de aminoácido de Pro38 de C<sub>H3</sub> varía entre las diferentes clases de Ig debido a huecos de alineación, pero el residuo Pro38 se conserva en el residuo 381 de C<sub>H</sub>. El residuo Pro38 situado en el residuo 381 en estas alineaciones corresponde al residuo 155 en la secuencia de región Fc humana descrita más abajo como SEQ ID N°: 13. Por consiguiente, los conceptos "residuo Pro38 de dominio C<sub>H3</sub>", "residuo Pro38 de C<sub>H3</sub>", "Pro38 de C<sub>H3</sub>", "Pro38", o equivalentes gramaticales de éstos, se refieren al residuo Pro conservado situado en la posición 38 en la secuencia de dominio C<sub>H3</sub> WT representativa mostrada en la Figura 1, el residuo Pro257 en regiones constantes de subclase IgG, el residuo Pro381 en regiones constantes de clase Ig y el residuo Pro 155 mostrado en la secuencia de región Fc humana de la SEQ ID N°: 13.

20 El concepto "equivalente de dominio C<sub>H3</sub>" referido a un residuo Pro38 se refiere al grupo de residuos Pro38 del dominio de inmunoglobulina tal como se ha definido más arriba, que se alinean con Pro38 dentro de un dominio C<sub>H3</sub> pero que tienen el residuo Pro conservado situado en una posición real diferente a la posición 38 del dominio. Por ejemplo, IgA<sub>1</sub> e IgA<sub>2</sub> contienen un equivalente de dominio C<sub>H3</sub> en la posición 39, ya que estos dominios C<sub>H3</sub> contienen un aminoácido adicional en comparación con, por ejemplo, IgG<sub>1</sub> (correspondiente al residuo N367 en la Figura 3). Por consiguiente, un equivalente de dominio C<sub>H3</sub> se refiere al residuo Pro situado cerca de un giro beta en un dominio de inmunoglobulina y conservado mediante una alineación de secuencia a Pro38 en un dominio de C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina.

30 Tal como se utiliza aquí, el concepto "fragmento funcional" utilizado en referencia a un polipéptido de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina de la invención significa una parte de un polipéptido de dominio C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina que conserva al menos aproximadamente la misma actividad de homodimerización de C<sub>H3</sub> que un polipéptido de dominio C<sub>H3</sub> intacto o de longitud completa. Estos fragmentos funcionales pueden incluir, por ejemplo, residuos de aminoácido truncados, con deleciones o sustituidos de un dominio C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina o de un polipéptido que contiene un dominio C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina, siempre que conserve al menos aproximadamente la misma capacidad de dimerizarse con un segundo polipéptido de dominio C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina o con un segundo polipéptido que contiene un dominio C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina. La actividad de homodimerización se puede conservar, por ejemplo, cuando se conserva esencialmente la estructura tridimensional del dominio C<sub>H3</sub>.

35 Con respecto a los anticuerpos y a diversas formas de los mismos que contienen un polipéptido de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina de la invención, tal como se describe más abajo, se puede producir cualquier anticuerpo, incluyendo anticuerpos monoclonales y diversas proteínas de unión similares a anticuerpos, utilizando métodos bien conocidos en la técnica, de modo que contengan un dominio de región C<sub>H3</sub> de la invención. Por ejemplo, en la técnica se conocen métodos de ingeniería recombinante que pueden ser utilizados para fusionar uno o más dominios de región variable de la inmunoglobulina con uno o más dominios de región constante para producir polipéptidos de unión híbridos característicos de anticuerpos y/o característicos de la superfamilia de las proteínas inmunoglobulinas.

45 Un anticuerpo monoclonal se refiere a un anticuerpo que es el producto de un único clon celular o hibridoma. El concepto "anticuerpo monoclonal" también se refiere a un anticuerpo producido mediante métodos recombinantes a partir de genes de inmunoglobulina que codifican para la cadena pesada y ligera, para producir una especie de inmunoglobulina molecular simple. Las secuencias de aminoácidos para los anticuerpos dentro de una preparación de anticuerpos monoclonales son sustancialmente homogéneas y la actividad de unión de los anticuerpos con dicha preparación presenta esencialmente la misma actividad de unión a antígenos al compararlas en un ensayo de unión igual o similar. Tal como se describe más abajo, en la técnica son bien conocidas las características de los anticuerpos y de los anticuerpos monoclonales.

50 Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar utilizando una gran variedad de métodos conocidos en la técnica, incluyendo el uso de metodologías de hibridoma, recombinantes, de expresión de línea celular de mieloma, de visualización de fagos y de librerías de anticuerpos combinatorias, o una combinación de éstas. Por ejemplo, se pueden producir anticuerpos monoclonales utilizando técnicas de hibridoma, incluyendo las conocidas en la técnica actual y descritas, por ejemplo, en Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Hammerling y col., en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681, Elsevier, N.Y. (1981); Harlow y col., *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999), y *Antibody Engineering: A Practical Guide*, C.A.K. Borrebaeck, Ed., Segunda Ed., Oxford University Press, New York, (1995). En *Antibody Engineering: A Practical Guide*, C.A.K. Borrebaeck, Ed., *supra*, se pueden encontrar descripciones de ejemplos de métodos conocidos para producir anticuerpos monoclonales por métodos recombinantes, de visualización de fagos y de librerías de anticuerpos combinatorias, incluyendo aquellas derivadas de animales inmunizados y naive. El anticuerpo monoclonal a utilizar como producto biofarmacéutico no está limitado a anticuerpos producidos mediante tecnología de

hibridoma. Más bien, tal como se describe más arriba, un anticuerpo monoclonal se refiere a un anticuerpo derivado de un único clon, incluyendo un clon eucariota, procariota o fago, y no al método mediante el cual ha sido producido.

5 Un fragmento funcional de anticuerpo se refiere a una parte de un anticuerpo que conserva toda o parte de su actividad de unión específica a la diana. Estos fragmentos funcionales de anticuerpos que conservan la actividad de unión específica a la diana se pueden producir de modo que contengan un polipéptido de dominio de región C<sub>H</sub>3 de la inmunoglobulina de la invención. Estos fragmentos funcionales de anticuerpo pueden incluir, por ejemplo, fragmentos funcionales de anticuerpo tales como F<sub>d</sub>, F<sub>v</sub>, F<sub>ab</sub>, F(ab'), F(ab)<sub>2</sub>, F(ab')<sub>2</sub>, F<sub>v</sub> monocatenario (scFv), anticuerpos quiméricos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y minicuerpos. Otros fragmentos funcionales pueden incluir, por ejemplo, polipéptidos de cadena pesada (H) o ligera (L), polipéptidos de cadena pesada variable (V<sub>H</sub>) y cadena ligera variable (V<sub>L</sub>), polipéptidos de región determinante de complementariedad (CDR), anticuerpos de dominio simple y polipéptidos que contienen al menos una parte de una inmunoglobulina que es suficiente para conservar la actividad de unión específica a la diana. Por ejemplo, en Harlow y Lane, *supra*; Molec. Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference (Myers, R.A. (ed.), New York: VCH Publisher, Inc.); Huston y col., Cell Biophysics, 22:189-224 (1993); Plückthun y Skerra, Meth. Enzymol., 178:497-515 (1989) y en Day, E.D., Advanced Immunochemistry, Segunda Ed., Wiley-Liss, Inc., New York, NY (1990) se pueden encontrar descripciones de estos fragmentos de unión de anticuerpos.

10 Con respecto a los anticuerpos y fragmentos funcionales de los mismos que presentan características ventajosas de unión a una molécula diana, en la técnica son bien conocidas diversas formas, alteraciones y modificaciones de los mismos. Los anticuerpos monoclonales específicos de diana que contienen un dominio de región C<sub>H</sub>3 de inmunoglobulina de la invención pueden incluir cualquiera de dichas diversas formas, alteraciones y modificaciones de los anticuerpos monoclonales. Más abajo se muestran ejemplos de estas diversas formas y términos tal como son conocidos en la técnica.

25 Un fragmento Fab se refiere a un fragmento monovalente consistente en los dominios V<sub>L</sub>, V<sub>H</sub>, C<sub>L</sub> y C<sub>H</sub>1; un fragmento F(ab')<sub>2</sub> es un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos mediante un puente disulfuro en la región bisagra, pero que carece del Fc; un fragmento F<sub>d</sub> consiste en los dominios V<sub>H</sub> y C<sub>H</sub>1; un fragmento F<sub>v</sub> consiste en los dominios V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> de un brazo simple de un anticuerpo; un fragmento dAb (Ward y col., Nature 341:544-546, (1989)) consiste en un dominio V<sub>H</sub>.

30 Un anticuerpo o un fragmento funcional de un anticuerpo pueden tener uno o más sitios de unión. Si hay más de un sitio de unión, los sitios de unión pueden ser idénticos entre sí o pueden ser diferentes. Por ejemplo, una inmunoglobulina natural tiene dos sitios de unión idénticos, un anticuerpo monocatenario o fragmento Fab tiene un sitio de unión, mientras que un anticuerpo "bispesífico" o "bifuncional" tiene dos sitios de unión diferentes. Por consiguiente, la actividad de unión de los anticuerpos o de los fragmentos funcionales de anticuerpo puede ser, por ejemplo, mono-específica, bispesífica o multiespecífica.

35 Un anticuerpo monocatenario (scFv) se refiere a un anticuerpo donde una región V<sub>L</sub> y una región V<sub>H</sub> están unidas por un enlazante (por ejemplo, una secuencia sintética de residuos de aminoácidos) para formar una cadena de polipéptidos continua donde el enlazante es lo suficientemente largo como para permitir que la cadena proteínica se pliegue sobre sí misma y forme un sitio de unión de antígeno monovalente (véase, por ejemplo, Bird y col., Science 242:423-26 (1988) y Huston y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-83 (1988)). Los diacuerpos se refieren a anticuerpos bivalentes que comprenden dos cadenas de polipéptidos, comprendiendo cada cadena de polipéptidos dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> unidos por un enlazante que es demasiado corto como para permitir un emparejamiento entre dos dominios de la misma cadena, permitiendo así que cada dominio se empareje con un dominio complementario de otra cadena de polipéptidos (véase, por ejemplo, Holliger y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-48 (1993), y Poljak y col., Structure 2:1121-23 (1994)). Si las dos cadenas de polipéptidos de un diacuerpo son idénticas, un diacuerpo resultante de su emparejamiento tendrá dos sitios de unión de antígeno idénticos. Se pueden utilizar cadenas de polipéptidos con diferentes secuencias para producir un diacuerpo con dos sitios de unión a antígeno diferentes. Similarmente, los triacuerpos o tetracuerpos son anticuerpos que comprenden tres y cuatro cadenas de polipéptidos, respectivamente, y que forman tres y cuatro sitios de unión a antígeno, respectivamente, pudiendo ser iguales o diferentes.

40 Una CDR se refiere a una región que contiene uno de tres bucles hipervariables (H1, H2 o H3) dentro de la región no estructural de la estructura en hoja β de V<sub>H</sub> de inmunoglobulina (Ig o anticuerpo), o una región que contiene uno de tres bucles hipervariables (L1, L2 o L3) dentro de la región no estructural de la estructura en hoja β de V<sub>L</sub> de anticuerpo. Por consiguiente, las CDR son secuencias de región variable intercaladas dentro de las secuencias de región estructural. Las regiones CDR son bien conocidas por los expertos en la técnica y, por ejemplo, han sido definidas por Kabat como las regiones de mayor hipervariabilidad dentro de los dominios variables (V) de anticuerpo (Kabat y col., J. Biol. Chem. 252:6609-6616 (1977); Kabat, Adv. Prot. Chem. 32:1-75 (1978)). Las secuencias de región CDR también han sido definidas estructuralmente por Chothia como aquellos residuos que no forman parte de la estructura en hola β conservada y, por consiguiente, se pueden adaptar a diferentes conformaciones (Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Las dos terminologías se reconocen en la técnica. Las posiciones de las CDR dentro de un dominio variable de anticuerpo canónico han sido determinadas por la comparación de numerosas estructuras (Al-Lazikani y col., J. Mol. Biol. 273:927-948 (1997); Morea y col., Methods 20:267-279 (2000)). Dado que la cantidad de residuos dentro de un bucle varía en diferentes anticuerpos, los residuos de bucle adicionales con respecto a las posiciones canónicas se numeran convencionalmente con a, b, c y así sucesivamente al lado del número de residuo en el esquema de

numeración del dominio variable canónico (Al-Lazikani y col., *supra* (1997)). Esta nomenclatura también es bien conocida por los expertos en la técnica.

Por ejemplo, en la siguiente tabla se muestran CDR definidas de acuerdo con las designaciones de Kabat (hipervariable) o Chothia (estructural).

5

**Tabla 1 Definiciones de CDR**

	Kabat <sup>1</sup>	Chothia <sup>2</sup>	Situación del bucle
V <sub>H</sub> CDR1	31-35	26-32	Cadenas de enlace B y C
V <sub>H</sub> CDR2	50-65	53-55	Cadenas de enlace C' y C''
V <sub>H</sub> CDR3	95-102	96-101	Cadenas de enlace F y G
V <sub>L</sub> CDR1	24-34	26-32	Cadenas de enlace B y C
V <sub>L</sub> CDR2	50-56	50-52	Cadenas de enlace C' y C''
V <sub>L</sub> CDR3	89-97	91-96	Cadenas de enlace F y G

<sup>1</sup>La numeración de los residuos sigue la nomenclatura de Kabat y col., *supra*

<sup>2</sup>La numeración de los residuos sigue la nomenclatura de Chothia y col., *supra*

10

Un anticuerpo quimérico se refiere a un anticuerpo que contiene una o más regiones de un anticuerpo y una o más regiones de otro u otros anticuerpos. En un ejemplo específico, una o más de las CDR se derivan de un anticuerpo donante no humano que tiene actividad específica con respecto a una molécula diana y la estructura de región variable se deriva de un anticuerpo receptor humano. En otro ejemplo específico, todas las CDR se pueden derivar de un anticuerpo donante no humano que tiene actividad específica con respecto a una molécula diana y la estructura de región variable se deriva de un anticuerpo receptor humano. En otro ejemplo específico, las CDR de más de un anticuerpo específico de diana no humano se mezclan y ajustan formando un anticuerpo quimérico. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico puede incluir una CDR1 de la cadena ligera de un primer anticuerpo específico diana no humano, una CDR2 y una CDR3 de la cadena ligera de un segundo anticuerpo específico diana no humano y las CDR de cadena pesada de un tercer anticuerpo específico diana. Además, las regiones estructurales se pueden derivar de un mismo anticuerpo humano o de uno o más anticuerpos humanos diferentes o de un anticuerpo humanizado. Se pueden producir anticuerpos quiméricos donde tanto los anticuerpos donantes como los receptores sean humanos.

15

20

Un anticuerpo humanizado o anticuerpo injertado tiene una secuencia que se diferencia de una secuencia de anticuerpo de especie no humana en una o más sustituciones, deleciones y/o adiciones de aminoácidos, de modo que el anticuerpo humanizado es menos propenso a inducir una respuesta inmune y/o induce una respuesta inmune más débil en comparación con el anticuerpo de la especie no humana cuando se administra a un sujeto humano. En un ejemplo específico se cambian determinados aminoácidos de la estructura y los dominios constantes de las cadenas pesadas y/o ligeras del anticuerpo de la especie no humana para producir el anticuerpo humanizado. En otro ejemplo específico, el dominio o los dominios constantes de un anticuerpo humano se fusionan con el dominio o los dominios variables del de una especie no humana. En las Patentes US 6.054.297, 5.886.152 y 5.877.293 se pueden encontrar ejemplos de cómo preparar anticuerpos humanizados. Los anticuerpos humanizados también incluyen anticuerpos producidos utilizando métodos de revestimiento de anticuerpo y similares.

25

30

Un anticuerpo humano se refiere a un anticuerpo que tiene una o más regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, un anticuerpo totalmente humano incluye un anticuerpo en el que todos los dominios variables y constantes se derivan de secuencias de la inmunoglobulina humana. Los anticuerpos humanos se pueden preparar utilizando diversos métodos conocidos en la técnica.

35

También se pueden incorporar una o más CDR en una molécula de forma covalente o no covalente para convertirla en una inmunoadhesina. Una inmunoadhesina puede incorporar la o las CDR como parte de una cadena polipeptídica más grande, puede unir la o las CDR de forma covalente a otra cadena de polipéptidos, o puede incorporar la o las CDR de forma no covalente. Las CDR permiten que la inmunoadhesina se una específicamente a un antígeno particular de interés.

40

Un agente neutralizante o un anticuerpo inhibidor se refiere a un anticuerpo monoclonal específico de la diana que inhibe la unión de la molécula diana a su pareja de unión cuando un exceso del anticuerpo monoclonal específico diana reduce la cantidad de la pareja de unión unida a la diana. La inhibición de la unión se puede producir al menos en un 10%, en particular al menos en aproximadamente un 20%. En diversos ejemplos específicos, el anticuerpo monoclonal puede reducir la cantidad de pareja de unión unida a la diana por ejemplo en al menos un 30%, 40%, 50%, 60%, 70%,

75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% y 99,9%. La reducción de la unión se puede medir por cualquier medio conocido por el experto en la técnica, por ejemplo mediante un ensayo de unión competitiva *in vitro*.

5 Un anticuerpo antagonista se refiere a un anticuerpo que inhibe la actividad de una molécula diana cuando se añade a una célula, tejido u organismo que expresa la molécula diana. La disminución de la actividad puede ser de al menos aproximadamente un 5%, en especial de al menos aproximadamente un 10% y en particular de al menos aproximadamente un 15% o más, en comparación con el nivel de actividad de la molécula diana en presencia únicamente de la pareja de unión. En diversos ejemplos específicos, los anticuerpos monoclonales específicos diana a utilizar como un producto biofarmacéutico de la invención pueden inhibir la actividad de la molécula diana en al menos aproximadamente un 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100%.

10 Un anticuerpo agonista se refiere a un anticuerpo que activa una molécula diana en al menos aproximadamente un 5%, en especial en al menos aproximadamente un 10% y en particular en al menos aproximadamente un 15% cuando se añade a una célula, tejido u organismo que expresa la célula diana, siendo una activación del 100% el nivel de activación logrado bajo condiciones fisiológicas por la misma cantidad molar de la pareja de unión. En diversos ejemplos específicos, los anticuerpos monoclonales específicos diana a utilizar como producto biofarmacéutico de la invención pueden activar la actividad de la molécula diana en al menos aproximadamente un 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 15 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 750% o 1.000%.

20 En relación con los polipéptidos de unión que contienen una región C<sub>H3</sub> u otro dominio de inmunoglobulina, también se puede incorporar un polipéptido de dominio de región C<sub>H3</sub> de la invención que tiene una sustitución P38G en cualquiera de estos polipéptidos de unión para aumentar su estabilidad. Ejemplos de formas de estos polipéptidos de unión incluyen pepticuerpos y polipéptidos de fusión Fc.

25 Un pepticuerpo se refiere a un polipéptido de unión que consiste en un dominio de región constante de inmunoglobulina o la parte Fc de una región constante (Fc) unida a al menos un péptido de unión por el extremo carboxilo o amino del dominio Fc. Los pepticuerpos pueden ser, por ejemplo, monovalentes (un péptido de unión fijado), divalentes (dos péptidos de unión fijados) o multivalentes (más de dos péptidos fijados). Los péptidos de unión enlazados con pepticuerpos divalentes pueden presentar la misma especificidad de unión (monoespecíficos) o pueden presentar una especificidad de unión diferente (diespecíficos). Los pepticuerpos son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en la Patente US 6.660.843 y la solicitud de patente US2003/0176352.

30 Un polipéptido de fusión Fc, o polipéptido de unión de fusión Fc, se refiere a un polipéptido de unión que consiste en un dominio de región constante de inmunoglobulina o la parte Fc de una región constante (Fc) enlazada con al menos un polipéptido de unión. En general, el polipéptido de unión incluye, por ejemplo, una proteína intacta o un dominio de unión intacto de la misma. Los polipéptidos de fusión Fc son bien conocidos en la técnica. Algunos ejemplos específicos de polipéptidos de fusión Fc incluyen, por ejemplo, una región Fc fusionada con una leptina o un derivado de leptina, tales como los descritos en las solicitudes de patente WO 96/40912, WO 96/05309, WO 97/06816, WO 97/18833 y US20070020284.

35 Tal como se utiliza aquí, el término "pluralidad" empleado en relación con una población de polipéptidos de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina se refiere a dos o más polipéptidos de dominio de región C<sub>H3</sub>. Por consiguiente, dicho término incluye poblaciones polipeptídicas de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina con tamaños desde dos polipéptidos hasta grandes librerías polipeptídicas, incluyendo, por ejemplo, 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup>, 10<sup>8</sup>, 10<sup>9</sup>, 10<sup>10</sup> o más. Otras pluralidades incluyen poblaciones que tienen 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 o más polipéptidos de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina. Otras pluralidades incluyen poblaciones que tienen 25, 30, 40 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 o más polipéptidos de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina. Otras pluralidades incluyen poblaciones que tienen 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup> o 10<sup>5</sup> o más polipéptidos de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina. Todos los tamaños de población superiores o inferiores a estas cantidades ilustrativas también están incluidos dentro del significado del término "pluralidad" tal como se utiliza aquí.

45 Tal como se utiliza aquí, el término "selectivo" empleado en relación con la actividad de unión diana de un polipéptido que contiene un dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina de la invención significa que el dominio de unión a la molécula diana presenta una afinidad de unión preferente o avides por el antígeno diana. El dominio de unión a la molécula diana o el dominio de unión diana se refiere a un dominio de unión de antígeno de una inmunoglobulina o un dominio de unión de ligando de un polipéptido de unión. Además, un polipéptido que contiene un dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina de la invención que presenta afinidad de unión selectiva esencialmente no experimenta reacciones cruzadas con moléculas no diana. La unión selectiva incluye actividad de unión específica, tales como cuando un polipéptido que contiene un dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina de la invención no experimenta reacciones cruzadas mensurables con moléculas no diana.

55 Tal como se utiliza aquí, el concepto "molécula diana" significa una molécula a la que se puede unir el dominio de unión de antígeno o ligando de un polipéptido que contiene un dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina de la invención para formar un complejo covalente o no covalente. En el caso específico de los anticuerpos, se forma un complejo no covalente en el sitio de combinación de antígeno de una región variable del anticuerpo. Las moléculas diana incluyen, por ejemplo, antígenos celulares, que se refieren a antígenos que son endógenos con respecto a una célula de un

organismo mamífero. Los antígenos celulares se originan en el organismo mamífero o se derivan de éste o son codificados por el genoma del organismo mamífero. Los antígenos celulares consisten en todo tipo de macromoléculas, incluyendo, por ejemplo, proteínas, glicoproteínas, carbohidratos y lípidos. Las moléculas diana también incluyen, por ejemplo, antígenos heterólogos, que se refieren a antígenos que son originalmente ajenos a un organismo mamífero. Los antígenos heterólogos incluyen, por ejemplo, macromoléculas formadas en el genoma de patógenos como virus, bacterias y parásitos, derivadas de dicho genoma o codificadas por el mismo. Los antígenos celulares y los antígenos heterólogos están destinados similarmente a incluir antígenos inapropiados o expresados de forma aberrante, derivados o codificados por cada uno de sus orígenes en células de mamífero o de patógeno.

Tal como se utiliza aquí, el concepto "condición patológica" empleado en relación con un crecimiento celular aberrante, significa una enfermedad o una anomalía, incluyendo lesiones, en una célula o un tejido de mamífero. Por consiguiente, el concepto "crecimiento celular aberrante" se refiere a aquellas enfermedades o estados anómalos que conducen a un crecimiento, viabilidad o proliferación celular no deseado o anormal. Las afecciones patológicas caracterizadas por un crecimiento celular no deseado o anormal incluyen, por ejemplo, cáncer y otras afecciones neoplásicas, enfermedades infecciosas y enfermedades autoinmunes. Por ejemplo, las células cancerosas proliferan de forma irregular y, en consecuencia, conducen a una destrucción del tejido. Del mismo modo, la proliferación de células que intervienen en enfermedades autoinmunes se regula de forma aberrante, lo que conduce por ejemplo a la proliferación y/o activación continua de mecanismos inmunológicos, con destrucción de las células y el tejido huésped. El crecimiento de las células infectadas por patógenos es anómalo y no deseable debido a la intrusión del organismo extraño, por ejemplo. Algunos ejemplos específicos de cánceres incluyen cáncer de próstata, de mama, pulmón, ovario, útero, cerebro y piel. Ejemplos específicos de enfermedades infecciosas incluyen enfermedades ADN o ARN virales, enfermedades bacterianas, parásitas, mientras que las enfermedades autoinmunes incluyen, por ejemplo, diabetes, artritis reumatoide y esclerosis múltiple.

Mediante la mención específica de las categorías de afecciones patológicas arriba indicadas, los especialistas en la técnica entenderán que dichos términos incluyen todas las clases y tipos de dichas afecciones patológicas. Por ejemplo, el término cáncer incluye todos los cánceres conocidos, estén caracterizados como malignos, benignos, de tejido blando o tumores sólidos. A modo de ejemplo, la Figura 4 proporciona una lista de cánceres conocidos. Del mismo modo y por analogía con las clases y tipos de cánceres mostrados en la Figura 4, los conceptos "enfermedades infecciosas" y "enfermedades autoinmunes" incluyen todas las clases y tipos de estas afecciones patológicas. Los expertos en la técnica conocen las diversas clases y tipos de enfermedades infecciosas y autoinmunes.

Tal como se utiliza aquí, el término "tratar" significa reducir la gravedad o prevenir una afección patológica caracterizada por un crecimiento celular aberrante. La reducción de la gravedad incluye, por ejemplo, detener o disminuir los síntomas clínicos, indicadores fisiológicos, marcadores bioquímicos o indicadores metabólicos. La prevención de la enfermedad consiste, por ejemplo, en impedir la aparición de la enfermedad o devolver a un individuo enfermo a su estado de salud previo a la enfermedad.

Tal como se utiliza aquí, el concepto "cantidad eficaz" significa la cantidad de un polipéptido que contiene un dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina de la invención necesaria para producir una disminución de la extensión, magnitud o tasa de propagación de una afección patológica cuando se administra a un individuo. Por consiguiente, el concepto "cantidad eficaz" utilizado en relación con un polipéptido de unión que contiene un polipéptido de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina que tiene una sustitución Pro a Gly en Pro38 (P38G) significa una cantidad del polipéptido de unión suficiente para mejorar al menos un síntoma asociado a una enfermedad o afección patológica diana caracterizada por un crecimiento celular aberrante.

La dosis necesaria de un polipéptido de unión de la invención para que éste sea terapéuticamente eficaz dependerá, por ejemplo, de la afección patológica a tratar, la afinidad y la avidéz de las moléculas diana, el nivel de abundancia y densidad de los antígenos afines y el peso y estado del individuo, y también de terapias previas o concurrentes. La cantidad apropiada considerada como dosis eficaz para una aplicación particular del método puede ser determinada por los expertos en la técnica utilizando la guía que aquí se proporciona. Por ejemplo, la cantidad se puede extrapolar de ensayos *in vitro* o *in vivo* tal como se describen más abajo. Los expertos en la técnica reconocerán que el estado del paciente ha de ser monitorizado durante toda la terapia y que la cantidad de la composición administrada se puede ajustar en función de la respuesta a la misma.

La invención proporciona un polipéptido aislado que incluye un polipéptido de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina, o un fragmento funcional del mismo, que presenta al menos una sustitución Pro a Gly y con una estabilidad mejorada en comparación con un dominio C<sub>H3</sub> no sustituido, comprendiendo la o las sustituciones Pro a Gly un residuo Pro38 de C<sub>H3</sub> o un dominio C<sub>H3</sub> equivalente al mismo, y comprendiendo dicho polipéptido además una mayor tasa de plegado en comparación con un dominio C<sub>H3</sub> no sustituido.

El dominio C<sub>H3</sub> de una inmunoglobulina desempeña una función en la estabilidad de la molécula, ya que se asocia con otros dominios C<sub>H3</sub> para formar un homodímero de dominio C<sub>H3</sub>. Por ejemplo, el homodímero se mantiene unido por fuertes interacciones no covalentes entre los dominios C<sub>H3</sub>. El enlace disulfuro intramolecular dentro del dominio C<sub>H3</sub> estabiliza el propio dominio. En los procesos de preparación y purificación de anticuerpos terapéuticos, aproximadamente un 15% o más de las moléculas se forman sin enlace disulfuro intramolecular de dominio C<sub>H3</sub>. La falta de este enlace disulfuro intramolecular reduce la estabilidad del dominio C<sub>H3</sub> en aproximadamente 4 kcal/mol y

también puede provocar la formación de agregados, ya que los grupos tiol libres forman enlaces disulfuro con otras moléculas. La conversión del residuo Pro38 de C<sub>H3</sub> en un residuo de aminoácido que reduce o elimina la isomerización de Pro de *trans* a *cis* durante el plegado mejora la cinética de plegado del dominio C<sub>H3</sub> y la formación correcta de los enlaces disulfuro intramoleculares. Un aminoácido particularmente útil para la sustitución por Pro38 es la glicina (gly), ya que sólo contiene un átomo de hidrógeno en una cadena lateral del carbono alfa, lo que reduce al mínimo el impedimento estérico y las transiciones de conformación inhibitoras en comparación con otras cadenas laterales de mayor tamaño.

En una realización específica, la sustitución de Pro38 por Gly en un polipéptido de dominio C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina conduce a un repliegado del dominio P38G a estados nativos de forma considerablemente más rápida bajo condiciones reductoras que en caso de dominios Pro38 de tipo salvaje cuando se diluyen a concentraciones de desnaturizante bajas. En otra realización específica, bajo condiciones de oxidación, la formación de los enlaces disulfuro intramoleculares tiene lugar con mayor rapidez que en caso de un polipéptido de dominio C<sub>H3</sub> de Pro38 de tipo salvaje. Las inmunoglobulinas y otros polipéptidos de unión que contienen un dominio de inmunoglobulina que contienen un polipéptido de dominio C<sub>H3</sub> P38G pueden tener menos susceptibilidad a la formación de agregados debido a la mayor velocidad de plegado. Del mismo modo, estos polipéptidos que contienen un dominio C<sub>H3</sub> P38G también pueden presentar una mayor estabilidad a largo plazo debido a la formación más rápida y completa de enlaces disulfuro intramoleculares.

Los polipéptidos aislados de la invención incluyen un dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina que tiene al menos una sustitución Pro por Gly en la posición del residuo 38 de C<sub>H3</sub>. Por consiguiente, en realizaciones específicas de la invención, un polipéptido de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina aislado de la invención incluye al menos una sustitución P38G o un dominio C<sub>H3</sub> equivalente a la misma.

Tal como se describe más arriba, la sustitución de Gly por Pro promueve ventajosamente el plegado de dominios C<sub>H3</sub>, dado que la isomerización de Pro38 de *trans* a *cis* es una causa del paso de plegado lento. Sin pretender ninguna vinculación con una teoría concreta, se cree que la Gly es energéticamente favorable para aumentar la tasa de plegado cuando está situada cerca de una cadena β, ya que es el aminoácido menos voluminoso. No obstante, en determinadas realizaciones se pueden utilizar aminoácidos diferentes a Gly para la sustitución en la posición del residuo 38 de C<sub>H3</sub>. Con las enseñanzas y la guía aquí proporcionadas, los expertos en la técnica entenderán que la selección de aminoácidos de cadenas laterales de mayor tamaño que Gly también pueden facilitar un aumento de la tasa de plegado en comparación con un residuo Pro, aunque no en la misma medida que un residuo Gly. Otros aminoácidos que contienen cadenas laterales de aminoácidos menos voluminosas o no polares incluyen, por ejemplo, Ala y Val.

Los dominios C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina contienen un residuo Pro38 conservado tal como se ha expuesto anteriormente. La estabilidad, incluyendo la estabilidad cinética, de las inmunoglobulinas que contienen un dominio C<sub>H3</sub> se puede mejorar mediante la sustitución del residuo Pro38 por un residuo Gly, por ejemplo. Del mismo modo, pueden sustituirse otros residuos Pro dentro de un dominio C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina también por un residuo Gly, por ejemplo, para aumentar adicionalmente la tasa y la extensión del plegado de dominio correcto y también la estabilidad del dominio de polipéptido C<sub>H3</sub>. Por ejemplo, la IgG<sub>1</sub> contiene nueve residuos Pro. La sustitución de uno o más residuos Pro además del residuo Pro38 puede aumentar proporcionalmente la tasa y la extensión del plegado, conduciendo a una mayor proporción de dominios correctamente plegados. Los residuos Pro adicionales que pueden ser sustituidos, por ejemplo en la IgG<sub>1</sub>, incluyen Pro7, Pro10, Pro16, Pro17, Pro51, Pro59, Pro60 y Pro109. Otros dominios de región C<sub>H3</sub> de la inmunoglobulina contienen todos o algunos de estos residuos Pro y pueden ser sustituidos de modo similar, además del residuo Pro38 o un dominio C<sub>H3</sub> equivalente al mismo. Por consiguiente, se puede proporcionar un polipéptido de dominio C<sub>H3</sub> aislado que, además de una sustitución de P38G, también tenga uno o más residuos Pro de C<sub>H3</sub> sustituidos por Gly, por ejemplo. La cantidad de sustituciones Pro adicionales incorporadas en un polipéptido de dominio C<sub>H3</sub> puede incluir, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o hasta todos los residuos Pro incluidos en un dominio C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina.

Del mismo modo, en aquellas realizaciones de la invención donde un dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina contiene un dominio C<sub>H3</sub> equivalente a Pro38 y/o contiene un dominio C<sub>H3</sub> equivalente a otros residuos Pro dentro de dicho dominio, en un polipéptido aislado de la invención también se puede incluir la sustitución de uno o más residuos Pro por Gly, por ejemplo, además del residuo Pro38 o su dominio C<sub>H3</sub> equivalente. Estos polipéptidos de dominio C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina con sustitución múltiple también pueden presentar una mejora adicional en su tasa de plegado y/o en la extensión de los polipéptidos correctamente plegados, lo que también conduce a una mayor estabilidad en comparación con dominios C<sub>H3</sub> no sustituidos o de tipo salvaje.

En el Ejemplo I posterior se presentan polipéptidos de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina de la invención que presentan aumentos en la tasa de plegado en un factor de 18 o más. La sustitución del residuo Pro38 por Gly en un dominio de región C<sub>H3</sub> de la inmunoglobulina puede conducir a una mayor tasa de plegado, por ejemplo al menos en un factor de aproximadamente 2 y hasta más de un factor de aproximadamente 30 o superior. Por consiguiente, los polipéptidos de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina de la invención pueden presentar aumentos de las tasas de plegado en un factor de aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más en comparación con un dominio C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina WT que contiene Pro en la posición 38. La sustitución adicional de Gly en posiciones Pro diferentes de Pro38 puede, por ejemplo, incrementar proporcionalmente estos ejemplos de aumento de las tasas de plegado. Por consiguiente, los polipéptidos de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina de la

invención pueden presentar tasas de plegado 25, 30, 35 o 40 veces mayores en comparación con los residuos Pro en la posición sustituida.

Los polipéptidos de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina que tienen una sustitución P38G también pueden presentar mayor estabilidad, impartida, por ejemplo, por la mayor tasa de plegado y/o extensión de plegado que las conformaciones nativas. Una mayor estabilidad y/o extensión de la cantidad de moléculas dentro de una población de polipéptidos de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina que contienen una sustitución P38G es una característica particularmente útil cuando se produce una población de polipéptidos de dominio de región C<sub>H3</sub>, ya que conduce a una población más homogénea. La estabilidad de un dominio de región C<sub>H3</sub> se puede mejorar por ejemplo en un factor 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más mediante la inclusión de una sustitución P38G. La inclusión de una o más sustituciones Pro adicionales puede aumentar adicionalmente la estabilidad de un polipéptido de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina de la invención.

Los polipéptidos que contienen un dominio de inmunoglobulina pueden contener igualmente un equivalente de dominio C<sub>H3</sub> conservado correspondiente a Pro38 en un dominio C<sub>H3</sub> de la inmunoglobulina. Ejemplos de polipéptidos que contienen un dominio de inmunoglobulina y que también contienen dichos equivalentes de dominio C<sub>H3</sub> conservado correspondientes a Pro38 incluyen, por ejemplo, HLA1, receptor gamma Fc y microglobulina  $\beta_2$ . Aunque la secuencia de aminoácidos exacta de estas proteínas de la superfamilia de las inmunoglobulinas y la posición Pro dentro de sus respectivos dominios de inmunoglobulina variarán, la conservación de un equivalente de dominio C<sub>H3</sub> correspondiente a Pro38 se puede demostrar mediante la alineación de la secuencia de aminoácidos utilizando métodos y algoritmos bien conocidos en la técnica. En la técnica se conocen numerosos polipéptidos que contienen un dominio de inmunoglobulina diferente de HLA1, receptor gamma Fc y microglobulina  $\beta_2$  y que contienen un residuo Pro conservado correspondiente a Pro38 en un dominio C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina. Los polipéptidos que contienen estos u otros dominios de inmunoglobulina conocidos y que tienen un residuo Pro conservado correspondiente a Pro38 se pueden estabilizar mediante sustitución del equivalente de dominio C<sub>H3</sub> de Pro38 por un residuo Gly, por ejemplo.

Los dominios C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina pueden formar homodímeros. Del mismo modo, los polipéptidos de dominio C<sub>H3</sub> P38G y fragmentos funcionales de éstos también conservan su capacidad para formar homodímeros con otros dominios C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina. La actividad de homodímero con respecto a un polipéptido de dominio C<sub>H3</sub> P38G incluye la homodimerización con otros polipéptidos P38G y la homodimerización con dominios C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina WT. La estabilidad aumentada de los polipéptidos de dominio C<sub>H3</sub> P38G se puede utilizar ventajosamente para aumentar la estabilidad de todas las clases y subclases de inmunoglobulinas, polipéptidos diméricos dentro de la superfamilia de las inmunoglobulinas y otros polipéptidos de unión diseñados para formar complejos que incluyen asociaciones no covalentes utilizando dominios C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina.

Por ejemplo, los polipéptidos de dominio C<sub>H3</sub> P38G de la invención se pueden incorporar en anticuerpos y en fragmentos funcionales de los mismos, para aumentar la estabilidad de estos complejos multiméricos. Por ejemplo, un polipéptido de dominio de región C<sub>H3</sub> de la invención se puede fusionar con los dominios de unión de región variable de la cadena pesada y ligera de las inmunoglobulinas para producir fragmentos funcionales de anticuerpos, tales como Fab u otros fragmentos funcionales de inmunoglobulina mono- o biespecíficos. Un polipéptido de dominio de región C<sub>H3</sub> de la invención también se puede fusionar con moléculas de unión, tales como un péptido o polipéptido de afinidad, para producir polipéptidos de unión que contienen un dominio de inmunoglobulina, tales como pepticuerpos y/o polipéptidos de fusión Fc. Del mismo modo, los polipéptidos de dominio C<sub>H3</sub> P38G se pueden incorporar en cualquier anticuerpo en lugar de un dominio C<sub>H3</sub> WT o incorporar en cualquier fragmento funcional de anticuerpo o polipéptido de unión como un dominio de región constante simple. Alternativamente, un polipéptido de dominio C<sub>H3</sub> P38G se puede utilizar en combinación con otro u otros dominios de región constante para generar anticuerpos más estables, fragmentos funcionales de anticuerpo, pepticuerpos o polipéptidos de fusión Fc y similares, incluyendo todas las combinaciones y permutaciones de dominios de región constante WT y uno o más polipéptidos de dominio C<sub>H3</sub> P38G.

Ejemplos específicos de anticuerpos para la incorporación de un polipéptido C<sub>H3</sub> P38G de la invención incluyen los descritos más abajo en la Tabla 2. Los ejemplos de anticuerpos enumerados en dicha tabla específicos para EGFR y aplicables para el tratamiento de diversos cánceres incluyen, por ejemplo, panitumumab (Vecibix<sup>TM</sup>, Amgen, Inc.); cetuximab (Erbix<sup>TM</sup>; Imclone Systems, New York City); IMC-11F8 (Imclone Systems); Humax-EGFR (Genmab, Copenhagen, Dinamarca); matuzumab (EMD-7200; Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y nimotuzumab (TheraCIM hR3; YM Biosciences, Mississauga, Ontario, Canadá). Todos estos anticuerpos y los enumerados en la Tabla 2 son bien conocidos en la técnica e igualmente aplicables para su uso con un polipéptido C<sub>H3</sub> P38G de la invención. Por ejemplo, el panitumumab está comercialmente disponible de Amgen y es el objeto del anticuerpo anti-EGFR humano descrito en la Patente US 6.235.883. El IMC-11F8 es el objeto de la Patente US 7.060.808 y el Humax-EGFR es el objeto de las Publicaciones de Patente US 20030091561 y 20030194403.

Otros ejemplos específicos del uso de un dominio C<sub>H3</sub> P38G para aumentar la estabilidad de un fragmento funcional de anticuerpo incluyen su incorporación en diacuerpos, minicuerpos y minianticuerpos. Un diacuerpo es un fragmento funcional de anticuerpo recombinante bivalente o biespecífico que es un dímero no covalente de dos moléculas Fv monocatenarias con enlazantes relativamente cortos, de modo que los dominios V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> de una cadena se emparejan con los dominios V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> complementarios de la segunda cadena para formar dos sitios de unión a antígeno. La estabilidad de los diacuerpos se puede aumentar mediante la incorporación de un dominio C<sub>H3</sub> P38G de la invención entre cada dominio V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>, por ejemplo. Los diacuerpos son bien conocidos en la técnica y están descritos, por

ejemplo, en Holliger y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993) y Carter y Merchant, Curr. Opin. Biotech. 8:449-454 (1997).

5 Otros ejemplos de fragmentos funcionales de anticuerpos conocidos en la técnica que pueden ser utilizados junto con un polipéptido de dominio C<sub>H</sub>3 P38G de la invención incluyen minicuerpos y minianticuerpos. Un minicuerpo es un fragmento funcional de anticuerpo recombinante bivalente o biespecífico producido como un dímero covalente o no covalente de dos polipéptidos que contienen en cada caso una molécula Fv monocatenaria fusionada con un dominio de anticuerpo correspondiente a la tercera región constante de una cadena pesada del anticuerpo. La incorporación de un dominio C<sub>H</sub>3 P38G de la invención en lugar de un dominio C<sub>H</sub>3 WT, o además de éste, puede aumentar adicionalmente la estabilidad de estos minicuerpos. Por ejemplo, en Holliger y Winter, Cur. Op. en Biotechnology 4: 446-449 (1993) y Carter y Merchant, *supra*, se pueden encontrar descripciones de minicuerpos.

10 Un minianticuerpo es un fragmento de anticuerpo bivalente o biespecífico que también es un dímero de dos fragmentos Fv monocatenarios. Sin embargo, cada uno de los fragmentos Fv monocatenarios están unidos a través de una región bisagra con un dominio de dimerización, tal como una cremallera de leucina o un motivo hélice-giro-hélice. La incorporación de un dominio C<sub>H</sub>3 P38G de la invención en lugar del dominio de dimerización, o además de éste, puede aumentar adicionalmente la estabilidad de los minianticuerpos. Por ejemplo, en Pack y col., Biotechnol. 11:1271 (1993) y Holliger y Winter, *supra*, se pueden encontrar descripciones de minianticuerpos.

15 Otros ejemplos específicos del uso de un dominio C<sub>H</sub>3 P38G para aumentar la estabilidad de un polipéptido de unión que contiene un dominio de inmunoglobulina incluyen la incorporación en un pepticuerpo o polipéptido de fusión Fc. Tal como se ha descrito más arriba, el término "pepticuerpo" se refiere a una molécula que tiene un dominio de región constante de inmunoglobulina o una parte Fc del mismo unido al menos a un péptido. Un polipéptido de fusión Fc contiene un polipéptido unido a un dominio de región constante de inmunoglobulina o una parte Fc del mismo. La producción de pepticuerpos es bien conocida en la técnica y se describe en términos generales, por ejemplo, en las publicaciones de patente WO 00/24782; US20030236193; US20030236193, US20070072801 y las publicaciones de patente anteriormente citadas. Del mismo modo, la producción de polipéptidos de fusión Fc también es bien conocida en la técnica y se describe en términos generales, por ejemplo, en las Patentes US 6.936.439; 6.294.170 y la Solicitud de Patente US 20070020284, y en las publicaciones de patente anteriormente citadas. Algunos ejemplos específicos de pepticuerpos incluyen los pepticuerpos dirigidos a la angiopoyetina-2 humana descritos en las publicaciones arriba mencionadas y enumerados más abajo en la Tabla 3. Algunos ejemplos específicos de polipéptidos de fusión Fc incluyen polipéptidos de región Fc fusionados, por ejemplo con leptina o derivados de leptina tal como se han descrito anteriormente, por ejemplo, fusiones Fc con un antagonista del receptor de interleucina (IL), tal como el antagonista del receptor de IL1 (IL1RA), y se enumeran más abajo en la Tabla 4. Estos y otros pepticuerpos de polipéptidos de fusión Fc son bien conocidos en la técnica y se pueden también emplear con un polipéptido C<sub>H</sub>3 P38G de la invención.

20 Más abajo se muestra como SEQ ID N°: 13 un ejemplo de polipéptido de región Fc a utilizar para la construcción de un pepticuerpo o polipéptido de fusión Fc. Esta secuencia de aminoácidos de la región Fc humana se alinea con el ejemplo de secuencia de IgG<sub>1</sub> mostrado en la Figura 2 (SEQ ID N°: 4) comenzando por el residuo 104 de la SEQ ID N°: 4 e incluye una metionina (M) iniciadora. Tal como se ha descrito anteriormente, el residuo P38G correspondiente de este polipéptido Fc está situado en el residuo 155 (en negrita y subrayado). Siguiendo las enseñanzas y la guía aquí proporcionadas, más abajo se muestra como SEQ ID N°: 13 un ejemplo de la conversión de este polipéptido de región Fc en un polipéptido que contiene un dominio C<sub>H</sub>3 P38G de la invención, en el que Pro155 está sustituido por una glicina (G) para obtener G155 (en negrita y subrayado).

40 Secuencia Fc (SEQ ID N°: 13):

**MDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKD<sup>T</sup>LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN  
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA  
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE  
NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS  
PGK**

Secuencia Fc que contiene un polipéptido de dominio C<sub>H</sub>3 P38G (SEQ ID N°: 14):

**MDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKD<sup>T</sup>LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN  
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA  
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYGSDIAVEWESNGQPE  
NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS  
PGK**

Más abajo también se muestran secuencias de aminoácidos para los ejemplos de pepticuerpos y polipéptidos de fusión Fc descritos más arriba que contienen un polipéptido de dominio C<sub>H</sub>3 P38G de la invención. La posición P38G se muestra como un residuo de glicina en negrita y subrayado.

Secuencia de pepticuerpo de angiopoietina-2 humana que contiene un polipéptido de dominio P38G (SEQ ID N°: 15):

MDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN  
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA  
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYGSDIAVEWESNGQPE  
NNYKTTTPVLDSGDFLYSKLTVDKSRWQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLS  
PGKGGGGGAQEECEWDPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECEWDPW  
TCEHMLE

5

Secuencia para una fusión Fc con un polipéptido de leptina que contiene un polipéptido de dominio P38G (SEQ ID N°: 16):

MEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE  
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK  
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYGSDIAVEWESN  
GQPENNYKTTTPVLDSGDFLYSKLTVDKSRWQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLS  
SLSPGKVPVIQK VQDDTKLIKTIIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIPGLHPILTLSKM  
DQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVLAFSKKSCHLPWASGLETLDLGG  
VLEASGYSTEVALSRLQGLQDMLWQLDLSGCG

10

Secuencia para una fusión Fc con un polipéptido IL1RA que contiene un polipéptido de dominio P38G (SEQ ID N°: 17):

MDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN  
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA  
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYGSDIAVEWESNGQPE  
NNYKTTTPVLDSGDFLYSKLTVDKSRWQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLS  
PGKRPSGRKSSKMQAFRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQGPNVNLEEKIDVVPPIEPH  
ALFLGIHGGKMCLSCVKSGETRLQLEAVNITDLSNRKQDKRFAFIRSDSGPTTSFE  
SAACPGWFLCTAMEADQPVSLTNMPDEGVMVTKFYFQEDE

15

20

25

Con las enseñanzas y la guía aquí proporcionadas, los expertos en la técnica entenderán que un polipéptido C<sub>H</sub>3 P38G de la invención es igualmente aplicable a todos los tipos de la familia de las inmunoglobulinas y polipéptidos de unión que contienen un dominio de inmunoglobulina debido a su inclusión de un dominio de inmunoglobulina. Con las enseñanzas y la guía aquí proporcionadas, los expertos en la técnica también entenderán que la selección de, por ejemplo, un dominio de unión de antígeno (Fv), polipéptido u otro dominio de unión de afinidad y la fusión con un polipéptido C<sub>H</sub>3 P38G de la invención se puede realizar en base a las características bien conocidas en la técnica de los polipéptidos de inmunoglobulina, incluyendo anticuerpos, fragmentos funcionales de los mismos, pepticuerpos y/o polipéptidos de fusión Fc. Por consiguiente, los polipéptidos C<sub>H</sub>3 P38G de la invención se ejemplifican aquí y más abajo con referencia a anticuerpos y fragmentos funcionales de anticuerpo. No obstante, el margen de aplicabilidad, las consideraciones y la metodología aplicados a anticuerpos y fragmentos funcionales de los mismos son igualmente aplicables a otros miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas diferentes de los anticuerpos y fragmentos funcionales. Además, con las enseñanzas y la guía aquí proporcionadas, los expertos en la técnica entenderán que esencialmente cualquier péptido o polipéptido de unión se puede incorporar en un dominio de región constante de anticuerpo tal como un polipéptido de unión de fusión Fc y/o pepticuerpo, por ejemplo, para la producción de un polipéptido de unión estable que muestre una unión específica con su pareja de unión afín. Un polipéptido C<sub>H</sub>3 P38G se puede utilizar para aumentar adicionalmente la estabilidad de estos pepticuerpos en comparación con un dominio C<sub>H</sub>3 que tiene un residuo Pro38 de tipo salvaje.

30

Algunos ejemplos de tipos de polipéptidos de unión que se pueden producir en forma de un polipéptido de fusión Fc, por ejemplo, y a utilizar con un polipéptido C<sub>H</sub>3 P38G de la invención, incluyen todos los tipos de polipéptidos terapéuticos,

incluyendo, por ejemplo, la superfamilia de los péptidos inmunoglobulinas tal como se ha descrito más arriba, factores de crecimiento, citoquinas, moléculas de señalización de células y hormonas. Algunos ejemplos de estos polipéptidos de unión a utilizar como una fusión con un polipéptido C<sub>H</sub>3 P38G de la invención incluyen interleucinas, ligandos G-CSF, GM-CSF, TNF y TNFR incluyendo Fhm, ciclinas, eritropoyetina, factores de crecimiento del tejido nervioso (NGF), factor de crecimiento del tejido nervioso de desarrollo regulado VGF, factores neurotróficos, factor neurotrófico NNT-1, ligandos de receptor Eph, ligandos de receptores similares a Eph, inhibidores de proteínas apoptóticas (IAP), proteína específica de Thy-1, ligando Hek (hek-L), ligandos de receptor Elk, STAT, inhibidor de colagenasa, osteoprotegerina (OPG), APRIL/G70, AGP-3/BLYS, BCMA, TACI, Her-2/neu, polipéptidos de apolipoproteína, integrinas, inhibidor tisular de metaloproteinasas, receptor de complemento C3b/C4b, proteína de unión SHC, polipéptidos DKR, polipéptidos de matriz extracelular, anticuerpos de los polipéptidos terapéuticos arriba indicados y fragmentos funcionales de anticuerpos de los mismos, anticuerpos de receptores para los polipéptidos terapéuticos arriba indicados y fragmentos funcionales de anticuerpos de los mismos, fragmentos de polipéptidos funcionales de los mismos, polipéptidos de fusión, polipéptidos quiméricos y similares.

Ejemplos específicos de polipéptidos de unión terapéuticos comercialmente disponibles que se pueden reconstruir como un polipéptido de fusión Fc, por ejemplo, incluyen Epoetina alfa (una glicoproteína expresada en células de mamífero (Amgen, Inc.)); interferón alfacon-1 (una proteína recombinante expresada en *E. Coli* (Amgen, Inc.)); anakinra (una forma no glicosilada, recombinante, expresada en *E. coli*, del antagonista de receptor de interleucina-1 humano (IL-1Ra) (Amgen, Inc.)); darbepoetina alfa (una proteína estimuladora de la eritropoyesis humana recombinante expresada en CHO (Amgen, Inc.)); pegfilgrastim (conjugado covalente de G-CDF humano de metionilo recombinante y 20kD PEG (Amgen, Inc.)); filgrastim (un factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) humano expresado en *E. coli* (Amgen, Inc.)); y ancestim (factor de célula madre; una proteína humana recombinante expresada en *E. Coli* (Amgen, Inc.)). Un ejemplo específico de un polipéptido de fusión Fc comercialmente disponible es Etanercept (Amgen), que consiste en un polipéptido de fusión Fc dimérico expresado en CHO unido al receptor del factor de necrosis tumoral soluble. Por ejemplo, en la Patente US 5.605.690 se describen polipéptidos de fusión solubles de los receptores de TNF y sus métodos de utilización. Estos y todos los otros productos biofarmacéuticos comercialmente disponibles se pueden fusionar, por ejemplo, con un polipéptido C<sub>H</sub>3 P38G de la invención para producir un peptidocuerpo con una estabilidad aumentada en comparación con un peptidocuerpo con un dominio C<sub>H</sub>3 que contiene Pro38.

La incorporación puede incluir el uso de métodos recombinantes bien conocidos en la técnica para cambiar uno o más residuos Pro, incluyendo Pro38, por ejemplo por un residuo Gly. Por ejemplo, el codón Pro38 se puede alterar mediante mutagénesis dirigida y el ácido nucleico codificador de P38G se puede expresar para producir un polipéptido de dominio C<sub>H</sub>3 P38G de la invención. Alternativamente, la incorporación se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante sustitución de los ácidos nucleicos codificadores del dominio C<sub>H</sub>3 completo que contienen al menos una sustitución P38G. Los ácidos nucleicos codificadores de estos polipéptidos de fusión se pueden expresar de modo similar para producir el producto genético P38G codificado. También se pueden emplear otros métodos conocidos en la técnica. Estos métodos son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Tercera Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (2001) y Ansubel y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1999).

Los polipéptidos de dominio C<sub>H</sub>3 P38G de la invención también se pueden incorporar en polipéptidos de unión diferentes a anticuerpos, que están diseñados para complejos diméricos, a través de interacciones de unión no covalentes. Por ejemplo, los polipéptidos de dominio C<sub>H</sub>3 P38G de la invención se pueden utilizar para generar polipéptidos de unión mono-específicos, biespecíficos o multiespecíficos que asocian subunidades a través de un dominio de inmunoglobulina. Como en el caso de los anticuerpos y fragmentos funcionales de anticuerpo arriba ejemplificados, un polipéptido de dominio de región C<sub>H</sub>3 de la invención se puede fusionar igualmente con, por ejemplo, dominios de unión respectivos de polipéptidos de unión diméricos, para producir polipéptidos de unión mono- o biespecíficos de inmunoglobulina que tienen una estabilidad aumentada. Por ejemplo, un polipéptido de dominio C<sub>H</sub>3 P38G se puede fusionar con los dominios de unión para moléculas MHC y utilizar para asociar dominios de unión de las cadenas alfa y β en un polipéptido de unión funcional.

Existe una gran variedad de polipéptidos de unión basados en la asociación de subunidades que contienen dominios de unión dentro de la superfamilia de las inmunoglobulinas y dentro de polipéptidos que contienen un dominio de inmunoglobulina. Por ejemplo, en *Antibody Engineering: A Practical Guide*, C.A.K. Borrebaeck, Ed., *supra*; *Antibody Engineering: Methods and Protocols*, en *Methods in Molecular Biology*, B.K.C. Lo, Ed., Humana Press, Totowa, NJ (2004), y *Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference*, Robert A. Myers, Ed. VCH Publishers, Inc., New York, (1995), se pueden encontrar descripciones de ejemplos específicos de estos polipéptidos de unión. Con las enseñanzas y la guía aquí proporcionadas, los expertos en la técnica entenderán que los polipéptidos de dominio C<sub>H</sub>3 P38G se pueden incorporar en cualquiera de estos polipéptidos de unión diméricos y/o multiméricos para asociar de forma estable o aumentar la estabilidad de las subunidades del dominio de unión que forman conjuntamente un dominio de unión a la molécula diana.

Por consiguiente, la invención proporciona una inmunoglobulina aislada que incluye un polipéptido de dominio de región C<sub>H</sub>3 de inmunoglobulina de la invención, o un fragmento funcional del mismo. También se proporciona un complejo de polipéptido de unión dimérico o multimérico asociado a través de la dimerización de un polipéptido de dominio C<sub>H</sub>3 P38G de la invención con un segundo polipéptido de dominio de región C<sub>H</sub>3 de inmunoglobulina. El segundo polipéptido de dominio de región C<sub>H</sub>3 de inmunoglobulina también puede incluir un polipéptido de dominio C<sub>H</sub>3 P38G de la

invención. Los polipéptidos de unión diméricos o multiméricos se pueden producir a partir de la fusión de subunidades de dominio de unión diana con un polipéptido de dominio C<sub>H3</sub> P38G de la invención.

La invención proporciona además una población aislada de polipéptidos, incluyendo una pluralidad de polipéptidos de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina, o fragmentos funcionales de los mismos, teniendo cada polipéptido de dominio de región C<sub>H3</sub> al menos una sustitución de Pro por Gly y mostrando una tasa de plegado aumentada en comparación con un dominio C<sub>H3</sub> no sustituido, y comprendiendo la o las sustituciones de Pro por Gly un residuo Pro38 de C<sub>H3</sub> o un dominio C<sub>H3</sub> equivalente al mismo.

Cualquiera de los polipéptidos de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina que contienen al menos la sustitución P38G arriba descritos se puede producir como una población de polipéptidos que contienen un dominio de región C<sub>H3</sub> P38G. Por ejemplo, una inmunoglobulina, o un fragmento funcional de la misma, que contiene un polipéptido de dominio C<sub>H3</sub> P38G se puede producir como una población de anticuerpos monoclonales. Esta población de anticuerpos monoclonales P38G incluirá una pluralidad de moléculas que presentarán esencialmente la misma especificidad de unión. La población monoclonal se puede aislar, por ejemplo, de células que expresan polipéptidos de dominio C<sub>H3</sub> P38G mediante cualquiera de los diversos métodos conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, la actividad de unión específica utilizando el dominio de unión a la molécula diana. Las poblaciones aisladas se pueden emplear en diversos procedimientos diagnósticos y terapéuticos.

Cualquiera de los polipéptidos de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina que contienen al menos una sustitución P38G arriba descritos también se puede producir como una población diversa de diferentes polipéptidos que contienen un dominio de región C<sub>H3</sub> P38G. Por ejemplo, una librería de inmunoglobulinas, o fragmentos funcionales de éstas, que contienen un polipéptido de dominio C<sub>H3</sub> P38G se pueden producir como una pluralidad de diferentes especies de anticuerpos. Una población de anticuerpos P38G de este tipo contendrá una pluralidad de moléculas que presenta una gama de diferentes especificidades de unión. La generación y el screening de librerías y anticuerpos que tienen una amplia gama de diversidad son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en *Antibody Engineering: A Practical Guide*, C.A.K. Borrebaeck, Ed., *supra*; *Antibody Engineering: Methods and Protocols*, en *Methods in Molecular Biology*, B.K.C. Lo, *supra*, y *Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference*, R.A. Myers, *supra*. La población se puede aislar, por ejemplo, de un fago o librería celular que expresa los polipéptidos de dominio C<sub>H3</sub> P38G con diferentes actividades de unión conferidas por fusión con diferentes dominios de unión diana mediante cualquiera de los varios métodos conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, el aislamiento de fagos o células que expresan una pluralidad de polipéptidos de dominio C<sub>H3</sub> de la invención o el aislamiento de sobrenadantes que contienen dichos polipéptidos expresados a partir de fagos o células. También se pueden rastrear pluralidades de polipéptidos que contienen un dominio C<sub>H3</sub> P38G para identificar y aislar anticuerpos que contienen un dominio C<sub>H3</sub> P38G, fragmentos funcionales de anticuerpo u otros polipéptidos de unión, mediante métodos conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, screening e inmunopurificación (*panning*) de fagos utilizando librerías de visualización en superficie. Las poblaciones aisladas de librerías de polipéptidos de dominio C<sub>H3</sub> P38G de la invención son particularmente útiles para identificar y/u optimizar preferentes terapéuticos.

Como en el caso de los polipéptidos de dominio C<sub>H3</sub> P38G aislados de la invención arriba descritos, múltiples polipéptidos de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina que contienen una sustitución P38G pueden incluir la sustitución de uno o más residuos Pro dentro del dominio C<sub>H3</sub> además de Pro38. Como en el caso de la sustitución P38G, la incorporación de Gly es particularmente útil en estas posiciones Pro adicionales, dado que la Gly contiene la cadena lateral más pequeña de todos los 20 aminoácidos naturales. Otros aminoácidos que contienen cadenas laterales de aminoácidos menos voluminosas o no polares incluyen, por ejemplo, Ala y Val. Por consiguiente, una pluralidad de polipéptidos de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina se puede sustituir, por ejemplo, en los residuos Pro7, Pro10, Pro16, Pro17, Pro51, Pro59, Pro60 y Pro109, o en un dominio C<sub>H3</sub> equivalente a los mismos.

Una pluralidad de polipéptidos de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina que contiene al menos una sustitución Pro38 por Gly, por ejemplo, presentará tasas de plegado aumentadas en comparación con los polipéptidos de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina WT. Más abajo, en el Ejemplo I, se describen ejemplos específicos de tasas de plegado aumentadas, donde poblaciones correspondientes a una sola especie P38G mostraron aumentos de la tasa de plegado en un factor de aproximadamente 12 o 18 o más en comparación con una población WT de polipéptidos de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina. Como en el caso de los polipéptidos que contienen un dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina arriba descritos, las poblaciones de polipéptidos de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina P38G que incluyen, por ejemplo, una pluralidad de polipéptidos con esencialmente la misma secuencia de aminoácidos y/o una pluralidad de polipéptidos de diversas secuencias de aminoácidos, pueden mostrar tasas de plegado aumentadas en un factor de al menos entre aproximadamente 2 y 30 o más. Todos los valores por encima, por debajo y entre los ejemplos de factores de aumento arriba descritos también se pueden lograr mediante la sustitución de Pro38 y/o uno o más residuos Pro de C<sub>H3</sub> adicionales o un dominio C<sub>H3</sub> equivalente al mismo, por ejemplo por Gly.

La fracción de polipéptidos de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina correctamente plegados y la estabilidad de los mismos también se pueden aumentar mediante inclusión de una sustitución P38G o mediante inclusión de una sustitución P38G y uno o más residuos Pro de C<sub>H3</sub> o un dominio C<sub>H3</sub> equivalente a los mismos. Por ejemplo, la estabilidad de una población P38G se puede aumentar por ejemplo en un factor 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más tal como se describe más arriba. La inclusión de una o más sustituciones Pro adicionales puede aumentar aún más la estabilidad de un polipéptido de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina de la invención.

Del mismo modo, la fracción de polipéptidos de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina que contiene una sustitución P38G o un dominio C<sub>H3</sub> equivalente al mismo puede resultar en poblaciones con más de un 90% de polipéptidos de dominio C<sub>H3</sub> correctamente plegados. Con un polipéptido de dominio de región C<sub>H3</sub> P38G de la invención también se pueden lograr poblaciones resultantes, por ejemplo, en aproximadamente un 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% o porcentajes mayores de polipéptidos de dominio C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina correctamente plegados. La inclusión de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más sustituciones del residuo Pro en el dominio C<sub>H3</sub> además de P38G, por ejemplo por un residuo Gly, puede conducir a aumentos proporcionales en la extensión de los polipéptidos de dominio de región C<sub>H3</sub> correctamente plegados con una población de la invención. Por consiguiente, los polipéptidos de dominio de región C<sub>H3</sub> P38G de la invención son particularmente útiles para producir poblaciones homogéneas y/o esencialmente homogéneas de polipéptidos que contienen un dominio C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina P38G. Estas poblaciones homogéneas y esencialmente homogéneas muestran una mayor estabilidad que los dominios que contienen Pro WT y pueden ser particularmente útiles en una gran variedad de aplicaciones terapéuticas.

Tal como se ha descrito más arriba, los polipéptidos de dominio de región C<sub>H3</sub> P38G se pueden utilizar para aumentar la estabilidad de poblaciones de inmunoglobulina, incluyendo fragmentos funcionales de anticuerpo, mediante la homodimerización de polipéptidos que contienen un dominio C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina P38G de la invención y mediante la homodimerización de un polipéptido que contiene un dominio C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina P38G con otros polipéptidos que contienen un dominio C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina, incluyendo, por ejemplo, polipéptidos que contienen un dominio C<sub>H3</sub> WT. Los polipéptidos de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina P38G también se pueden utilizar para aumentar la estabilidad de una gran variedad de otros polipéptidos de unión dentro de la superfamilia de las inmunoglobulinas y dentro de otras superfamilias de polipéptidos de unión que contienen un dominio de inmunoglobulina mediante un incremento de la homodimerización debido a los mayores porcentajes de moléculas correctamente plegadas. Por consiguiente, la estabilidad de las subunidades de dominio de unión diana tales como V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>, por ejemplo, dentro de una población se puede aumentar mediante la inclusión de uno o más polipéptidos de dominio de región C<sub>H3</sub> P38G fusionados con estas u otras subunidades de los dominios de unión.

Por tanto, la invención proporciona una población aislada de polipéptidos de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina P38G, o fragmentos funcionales de los mismos, que incluyen un complejo dimérico asociado a través de interacciones no covalentes entre un polipéptido de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina P38G y un segundo polipéptido de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina. El segundo polipéptido de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina puede incluir un polipéptido de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina, o un fragmento funcional del mismo, que tiene al menos una sustitución P38G y muestra una tasa de plegado aumentada en comparación con un dominio C<sub>H3</sub> no sustituido. El segundo polipéptido de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina puede incluir una o más sustituciones Pro adicionales o incluir un polipéptido de dominio C<sub>H3</sub> WT. La población aislada puede consistir en una población de inmunoglobulinas o una población de polipéptidos de fusión con un polipéptido de dominio de región C<sub>H3</sub> P38G fusionado con un dominio de unión diana.

La invención también proporciona un método para producir un polipéptido de unión dimérico. El método incluye la combinación de un primer polipéptido que comprende un polipéptido de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina, o un fragmento funcional del mismo, con una sustitución de Pro por Gly en la posición 38 (P38G) del dominio C<sub>H3</sub> y un dominio de unión diana, con un segundo polipéptido que comprende un polipéptido de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina, o un fragmento funcional del mismo, y un dominio de unión diana, presentando el dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina con una sustitución P38G una tasa de plegado aumentada en comparación con un dominio C<sub>H3</sub> no sustituido.

Los polipéptidos diméricos y poblaciones de polipéptidos diméricos de la invención se pueden producir por autoensamblaje de un polipéptido de dominio C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina P38G con un segundo polipéptido de dominio C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina. El segundo polipéptido de dominio C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina puede ser, por ejemplo, un polipéptido de dominio C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina P38G, un polipéptido de dominio C<sub>H3</sub> WT y cualquiera de una variedad de clases o subclases de inmunoglobulina. Los polipéptidos se pueden producir como una fusión con un dominio de unión diana tal como se describe más arriba, para producir polipéptidos de unión diméricos estabilizados mediante interacciones no covalentes entre un dominio C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina P38G y un segundo dominio C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina.

Para generar un polipéptido de unión dimérico de la invención se pueden utilizar diversos métodos y vías de construcción. El resultado final de cualquier vía consiste en la acumulación de secuencias de los dominios de unión heterólogas con una secuencia de dominio C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina P38G para dos subunidades y la asociación de las subunidades de fusión incluyendo la dimerización de los dominios C<sub>H3</sub>. La asociación o unión de secuencias heterólogas se puede conseguir, por ejemplo, mediante la inserción de una sustitución de aminoácidos al menos en Pro38 en una inmunoglobulina o, por ejemplo, la fusión de un dominio de unión heterólogo en un extremo de un dominio C<sub>H3</sub> de la inmunoglobulina P38G. En los polipéptidos de unión diméricos de la invención también se pueden incluir dominios de región constante de inmunoglobulina adicionales, tales como C<sub>H1</sub> y/o C<sub>H2</sub>. Las secuencias de cualquiera de los dos componentes de un polipéptido de unión dimérico de la invención se pueden derivar, por ejemplo total o parcialmente, de otros polipéptidos o dominios, generados *de novo* o de una combinación de los mismos.

La asociación del primer y el segundo polipéptido se puede llevar a cabo utilizando cualquiera de los diversos métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las subunidades de polipéptido de unión se pueden producir por separado y

combinar en una mezcla simple para permitir que las subunidades se autoensamblen en especies diméricas. Alternativamente, las subunidades de polipéptido de unión se pueden coexpresar utilizando cualquiera de los sistemas de expresión recombinante bien conocidos. La coexpresión de ácidos nucleicos codificadores resultará en el autoensamblaje concomitante de los polipéptidos de las subunidades. Los vectores, métodos y células huésped para la coexpresión de polipéptidos de unión de la subunidad, incluyendo inmunoglobulinas y fragmentos funcionales de los mismos, son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en *Antibody Engineering: A Practical Guide*, C.A.K. Borrebaeck, Ed., *supra*; *Antibody Engineering: Methods and Protocols*, en *Methods in Molecular Biology*, B.K.C. Lo, *supra*, y *Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference*, R.A. Myers, *supra*. Más abajo también se describen ejemplos de métodos y sistemas.

Con respecto a los métodos para construir polipéptidos de unión diméricos, las posibles vías pueden incluir inserción, sustitución o cambios dirigidos de las secuencias de aminoácidos. Las vías para la inclusión de características funcionales secundarias pueden incluir, por ejemplo, la fusión o unión de dominios funcionales, polipéptidos u otras fracciones. Los métodos para poner en práctica dichas vías pueden incluir, por ejemplo, construcción recombinante y síntesis *in vitro* o *in vivo*, síntesis química, conjugación, enlazantes y también el uso de dominios correspondientes a parejas de unión por afinidad. Otras vías y métodos conocidos en la técnica se pueden utilizar igualmente para diseñar y construir un polipéptido de unión dimérico de la invención.

Los métodos para sustituir residuos de aminoácidos se pueden aplicar a nivel del ácido nucleico codificador o directamente a nivel del polipéptido. En el primer método se genera un ácido nucleico codificador del polipéptido deseado y después se produce el polipéptido, por ejemplo mediante traducción *in vitro* o biosíntesis *in vivo* en una célula u organismo huésped, ambas bien conocidas en la técnica. En el segundo método, se puede sintetizar directamente la secuencia de aminoácidos correspondiente a un polipéptido de unión dimérico de interés.

En la técnica también se conocen métodos para construir un ácido nucleico codificador. Por ejemplo, los ácidos nucleicos codificadores se pueden producir mediante cualquier método de síntesis de ácidos nucleicos conocido por los expertos en la técnica. Estos métodos incluyen, por ejemplo, síntesis química, síntesis recombinante, polimerización enzimática y combinaciones de las mismas. Estos y otros métodos de síntesis son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Métodos para sintetizar polinucleótidos se describen, por ejemplo, en *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, Gate, ed., IRL Press, Oxford (1984); Weiler y col., *Anal. Biochem.* 243:218 (1996); Maskos y col., *Nucleic Acids Res.* 20:1679 (1992); Atkinson y col., *Solid-Phase Synthesis of Oligodeoxyribonucleotides by the Phosphitriester Methods*, en *Oligonucleotide Synthesis 35* (M.J. Gait ed., 1984); Blackburn and Gait (eds.), *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*, Second Edition, New York: Oxford University Press (1996), y en Ansubel y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1999).

Por ejemplo, en Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Tercera Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (2001) y en Ansubel y col., (1999), *supra*, se pueden encontrar descripciones de síntesis recombinantes y enzimáticas, incluyendo la reacción en cadena de la polimerasa y otras metodologías de amplificación.

Por ejemplo, en Pirrung y col., Patente US 5.143.854 (véase también la Solicitud PCT nº WO 90/15070), Fodor y col., Solicitud PCT WO 92/10092; Fodor y col., *Science* (1991) 251:767-777, y Winkler y col., US 6.136.269; Southern y col., Solicitud PCT WO 89/10977, y Solicitud PCT Blanchard nº WO 98/41531, se pueden encontrar descripciones de métodos de síntesis en fase sólida para generar numerosos polinucleótidos diferentes y otras secuencias poliméricas. Estos métodos incluyen la síntesis y la impresión de matrices utilizando *micropins*, fotolitografía y síntesis de chorro de tinta de matrices de polinucleótidos. Por ejemplo, en la Patente US 6.521.437, de Evans, se describen métodos para lograr una síntesis eficiente de polímeros de ácidos nucleicos mediante reasociación secuencial de polinucleótidos.

Del mismo modo, la síntesis química de polipéptidos también es conocida por los expertos en la técnica. Por consiguiente, un polipéptido de unión dimérico de la invención se puede sintetizar directamente utilizando cualquiera de los diversos métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, por ejemplo, los anteriormente expuestos y descritos en Roberts y Vellaccio (*Academic Press, Inc.*), *supra*; Wilson y Czamik (*John Wiley & Sons Inc.*), *supra*; Manfred E. Wolff (*John Wiley & Sons Inc.*), *supra*; Patentes US 5.420.109; 5.849.690; 5.686.567; 5.990.273; en la publicación PCT WO 01/00656, *supra*, y en M. Bodanzsky (*Editorial Springer*), *supra*, y Stewart y Young (*Pierce Chemical Co.*), *supra*.

Alternativamente, la actividad de unión y/o las sustituciones de los residuos Pro del dominio C<sub>H</sub>3 se pueden generar *de novo* alterando una o más regiones dentro de un polipéptido de dominio de unión diana o mediante alteraciones aleatorias de residuos Pro de dominio C<sub>H</sub>3. Los polipéptidos alterados se pueden rastrear después en cuanto a una actividad de unión deseada o en cuanto a un aumento de la tasa de plegado o a un aumento de la formación de disulfuro o la extensión de los dominios C<sub>H</sub>3 sustituidos. La alteración de una secuencia de aminoácidos dentro de un dominio de unión diana o para la sustitución de residuos Pro de dominio C<sub>H</sub>3 pueden incluir, por ejemplo, entre uno y los veinte aminoácidos naturales diferentes, en una o más posiciones. Las alteraciones pueden incluir, por ejemplo, la incorporación de análogos y miméticos de aminoácidos en cualquiera de las posiciones o en todas ellas. La producción de poblaciones de polipéptidos de unión diméricos de la invención con moléculas que tienen secuencias de aminoácidos alteradas y la posterior identificación de la actividad de unión es bien conocida por los expertos en la técnica. Por

consiguiente, mediante el uso de las enseñanzas y la guía aquí proporcionadas se puede generar un polipéptido de unión dimérico *de novo* o mediante la producción de una librería de secuencias de fusión de dominio C<sub>H3</sub> P38G y su screening posterior de una población en cuanto a un aumento de la estabilidad o la tasa de plegado del dominio C<sub>H3</sub> P38G o en cuanto a una actividad de unión deseada.

- 5 Los polipéptidos de unión diméricos generados y ensamblados tal como se describe más arriba se pueden rastrear, por ejemplo, en cuanto a la capacidad para unirse a una molécula diana de interés, en cuando a un aumento de la estabilidad del dominio C<sub>H3</sub> P38G, la tasa de plegado o la formación del enlace disulfuro, o tanto en cuanto a la unión como en cuanto al aumento de la estabilidad, la tasa de plegado o la formación del enlace disulfuro.

- 10 Por ejemplo, los ácidos nucleicos codificadores se pueden clonar en un vector apropiado para la propagación, manipulación y expresión. Estos vectores son conocidos o pueden ser contruidos por los expertos en la técnica y deberían contener suficientes elementos de expresión para la transcripción, traducción, regulación y, si así se desea, la clasificación y/o secreción de los polipéptidos diméricos. Los vectores también se pueden utilizar en sistemas huésped procariontes o eucariontes, siempre que los elementos de expresión y reguladores sean de origen compatible. Los vectores de expresión pueden incluir adicionalmente elementos reguladores para la expresión inducible o específica de un tipo celular. Los expertos en la técnica sabrán qué sistemas huésped son compatibles con un vector particular y qué elementos reguladores o funcionales son suficientes para lograr la expresión de los polipéptidos en formas solubles, segregadas o de superficie celular.

- 15 Las células huésped apropiadas incluyen, por ejemplo, bacterias y sistemas de expresión bacteriófagos correspondientes, levaduras, células de aves, insectos y mamíferos. Los métodos para la expresión recombinante, el screening y la purificación de polipéptidos de unión diméricos en diversos sistemas huésped son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Sambrook y col., *supra*, y en Ansubel y col., *supra*. La selección de un vector y un sistema huésped particulares para la expresión y el screening o para la producción a gran escala de los polipéptidos de unión diméricos de la invención es conocida por los especialistas y dependerá de las preferencias del usuario.

- 20 El screening en cuanto a un aumento de la estabilidad, la tasa de plegado o la formación del enlace disulfuro se puede llevar a cabo empleando métodos tales como los descritos en el Ejemplo I. El screening en cuanto a la especificidad de unión a la molécula diana se puede llevar a cabo utilizando diversos métodos conocidos en la técnica para determinar la afinidad de unión de un polipéptido o compuesto. Adicionalmente, para la identificación de una especie de unión predeterminada se pueden utilizar del mismo modo métodos basados en la determinación de la afinidad relativa de las moléculas de unión con respecto a su equivalente WT comparando la cantidad de unión entre un polipéptido que contiene un dominio C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina P38G y un dominio C<sub>H3</sub> inalterado, por ejemplo. Todos estos métodos se pueden poner en práctica, por ejemplo, en solución o en fase sólida. Además existen diversos formatos de ensayos de unión conocidos en la técnica que incluyen, por ejemplo, inmovilización en filtros, por ejemplo de nylon o nitrocelulosa; matrices bidimensionales, ensayo con sustancias inmunoabsorbentes unidas a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RAI), inmunopurificación (*panning*) y resonancia plasmática. Estos métodos se describen, por ejemplo, en Sambrook y col., *supra*, y Ansubel y col. En la técnica se conocen métodos para medir la afinidad, incluyendo las tasas de asociación y disociación, utilizando resonancia plasmática superficial, descritos, por ejemplo, en Jönsson y Malmquist, *Advances in Biosensors*, 2:291-336 (1992) y Wu y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:6037-6042 (1998). Además, en la técnica es bien conocido un aparato para medir interacciones de unión: un instrumento BIAcore 2000 comercial de Pharmacia Biosensor (Uppsala, Suecia).

- 25 Utilizando cualquiera de los métodos de screening arriba descritos y otros conocidos en la técnica se pueden identificar polipéptidos que contienen un dominio C<sub>H3</sub> P38G mediante la detección de la unión de un polipéptido de unión dimérico de la invención, dentro de una población, a una molécula diana predeterminada. Los expertos en la técnica sabrán, o podrán determinar utilizando las enseñanzas y la guía aquí proporcionadas, qué métodos se pueden utilizar para construir o facilitar la construcción de cualquiera de los diversos polipéptidos de unión diméricos de la invención.

- 30 La invención también proporciona una cantidad eficaz de un polipéptido de unión que comprende un polipéptido de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina, o un fragmento funcional del mismo, para el tratamiento de una afección patológica caracterizada por un crecimiento celular aberrante, teniendo dicho polipéptido de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina, o fragmento funcional del mismo, una sustitución de Pro por Gly en la posición 38 del dominio C<sub>H3</sub> fusionada con un dominio de unión diana selectivo para una molécula diana expresada sobre la superficie de las células que intervienen en la afección patológica, y presentando el dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina que tiene una sustitución P38G una tasa de plegado aumentada en comparación con un dominio C<sub>H3</sub> no sustituido.

- 35 La cantidad eficaz de un polipéptido de unión de la invención para el tratamiento de afecciones caracterizadas por un crecimiento celular aberrante es aplicable a una gran variedad de patologías, ya que el polipéptido de dominio C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina P38G se puede utilizar para formar complejos y/o estabilizar, por ejemplo, los dominios de unión a anticuerpos, fragmentos funcionales de anticuerpos y una variedad de otros dominios de unión de polipéptidos. Uno o más de estos polipéptidos de dominio de unión que tienen actividad de unión selectiva a una molécula diana o célula diana que interviene en una afección patológica se pueden seleccionar y fusionar con uno o más polipéptidos de dominio C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina P38G de la invención tal como se describe más arriba. Una vez contruidos, los polipéptidos de unión C<sub>H3</sub> P38G presentarán, por ejemplo, un aumento de la tasa de plegado y mayor estabilidad debido a la inclusión de un polipéptido de dominio C<sub>H3</sub> P38G. Estos polipéptidos de unión P38G de la invención se

pueden utilizar para tratar la misma afección patológica, o una similar, a la tratada con el donante de los polipéptidos de dominio de unión.

5 Mediante ejemplificación con referencia a productos biofarmacéuticos de anticuerpos actualmente aprobados o en evaluación para ser administrados a humanos, un polipéptido de dominio C<sub>H</sub>3 de inmunoglobulina P38G de la invención se puede sustituir por uno o los dos dominios C<sub>H</sub>3 WT contenidos en cualquiera de estos productos biofarmacéuticos de anticuerpos para aumentar la estabilidad y homogeneidad de la preparación. Alternativamente, un polipéptido de dominio C<sub>H</sub>3 de inmunoglobulina P38G de la invención se puede incluir en uno o más fragmentos de dominio de unión de la cadena pesada o ligera para aumentar la estabilidad y homogeneidad del fragmento funcional del anticuerpo. En la 10 Tabla 2 mostrada más abajo se indican anticuerpos y fragmentos funcionales de anticuerpos actualmente aprobados o en evaluación. En las Tablas 3 y 4 mostradas más abajo se indican ejemplos de pepticuerpos y polipéptidos de fusión Fc, respectivamente, actualmente aprobados o en evaluación. Como muestran estas tablas, esta muestra de ejemplos de polipéptidos de unión biofarmacéuticos son aplicables para el tratamiento de afecciones patológicas que van desde el cáncer y enfermedades autoinmunes hasta la obesidad. La estabilidad de cualquiera de estos productos biofarmacéuticos se puede mejorar mediante la inclusión de un polipéptido de dominio C<sub>H</sub>3 de inmunoglobulina P38G de 15 la invención en una, varias o todas las cadenas de estos polipéptidos de unión multiméricos.

Estos productos biofarmacéuticos mejorados se pueden utilizar para tratar la misma afección patológica tratada con el polipéptido de unión precursor o que no contiene C<sub>H</sub>3 P38G.

**Tabla 2 Productos biofarmacéuticos de anticuerpos**

Nombre	Nombre Genérico	Fabricante	Breve Descripción
HERCEPTIN	Trastuzumab	GlaxoSmith Kline	Anticuerpo monoclonal IgG1 recombinante humanizado expresado en CHO..
Indicación: Tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico cuyos tumores sobreexpresan la proteína HER2			
BEXXAR	Tositumomab	Genentech	Anticuerpo monoclonal lambda IgG2 murino.
Indicación: Tratamiento de pacientes con linfoma no Hodgkin recidivante o refractario, de bajo grado, folicular o transformado, que expresa antígeno CD20.			
HUMIRA	Adalimumab	Abbott	Expresión en células de mamífero de anticuerpo monoclonal IgG1 humano recombinante.
Tratamiento de pacientes con artritis reumatoide (RA) moderada o grave o con artritis psoriásica (PsA). RA es una enfermedad inflamatoria de articulaciones. PsA es una enfermedad inflamatoria de articulaciones y piel.			
RITUXAN	Rituximab	Biogen Idec y Genetech	Anticuerpo monoclonal IgG1 humanizado expresado en CHO.
Tratamiento de pacientes con linfoma no Hodgkin recidivante o refractario, de bajo grado o folicular, CD20-positivo, de células-B, linfoma no Hodgkin difuso de células grandes B (DLBCL), CD20-positivo, en combinación con CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona) u otros regímenes de quimioterapia basados en antraciclina.			
ORTHOCLONE OKT	Muromonab-CD3	Ortho Biotech	Anticuerpo monoclonal murino.
Tratamiento de rechazo de aloinjerto renal agudo y rechazo de aloinjerto cardíaco y hepático agudo.			
REMICADE®	Infliximab	Centocor	Anticuerpo monoclonal IgG I [kgr] quimérico recombinante.
Tratamiento de pacientes con artritis reumatoide activa moderada o grave.			
REOPRO	Abciximab	Eli Lilly	Fragmento Fab de un anticuerpo monoclonal humano-murino quimérico expresado en cultivo de células de mamífero.

Tratamiento de ataque isquémico agudo, como complemento de la intervención coronaria percutánea (PCI) para la prevención de la isquemia cardíaca.			
SIMULEC	Basiliximab	Novartis	IgG1 de anticuerpo monoclonal quimérico, glicoproteína expresada en CHO.
Tratamiento profiláctico del rechazo agudo de órgano en pacientes sometidos a trasplante renal.			
SYNAGIS®	Palivizumab	Medimmune	IgG1 de anticuerpo monoclonal recombinante humanizado.
Prevención de enfermedad del tracto respiratorio inferior causada por el virus sincicial respiratorio (RSV).			
ZENAPAX®	Daclizumab	Roche Laboratories - Genentech	Anticuerpo monoclonal IgG1 humanizado recombinante.
Tratamiento profiláctico del rechazo agudo de órgano en pacientes sometidos a trasplante renal.			
VECIBIX®	Panitumumab	Amgen, Inc	Anticuerpo monoclonal humano recombinante.
Tratamiento de cáncer colorrectal metastásico.			
Erbitux™	Cetuximab	Imclone Systems	Anticuerpo monoclonal humanizado recombinante.
Tratamiento de cáncer colorrectal metastásico.			
IMC-11F8		Imclone Systems	Anticuerpo monoclonal humano recombinante.
Tratamiento de cáncer colorrectal metastásico.			
Human-EGFR		Genmab A/S	Anticuerpo monoclonal humano recombinante.
Tratamiento de cáncer de cabeza y cuello.			
EMD-7200	Matuzumab	Merck KGaA	Anticuerpo monoclonal humanizado recombinante.
Tratamiento de cáncer gástrico y colorrectal.			
THERACIM HR3	Nimotuzumab	YM Biosciences	Anticuerpo monoclonal humanizado recombinante.
Tratamiento de cáncer de cabeza y cuello.			

**Tabla 3 Productos biofarmacéuticos de peptidocuerpos**

Nombre	Nombre Genérico	Fabricante	Breve Descripción
Peptidocuerpo de angiopoyetina-2		Amgen, Inc.	Proteína de fusión Fc-peptido recombinante.
Indicación: Dirigido a angiopoyetinas para el tratamiento de enfermedades mediadas por angiogénesis, como el cáncer.			

Tabla 4 Productos biofarmacéuticos de fusión Fc

Nombre	Nombre Genérico	Fabricante	Breve Descripción
Fc-leptina		Amylin Pharmaceuticals	Fusión de Fc con polipéptido de leptina.
Indicación: Tratamiento de obesidad, nivel alto de lípidos en sangre, arterioesclerosis, placa arterial, formación de piedras en la vesícula, masa insuficiente de tejido magro, sensibilidad insuficiente a la insulina, y apoplejía.			
FcIL 1RA		Amgen, Inc.	Fusión de Fc con receptor $\alpha$ de IL1
Tratamiento de trastornos inflamatorios y de otros tipos.			

5 En otras realizaciones, la administración de la cantidad eficaz de un polipéptido de unión de la invención demuestra que existen dos categorías generales de células o tejidos diana que se pueden fijar como objetivo para su eliminación en el tratamiento o la reducción de la gravedad de una afección patológica. Una categoría consiste en aquellas afecciones patológicas derivadas de células o tejidos que no son esenciales para la supervivencia o el mantenimiento de la calidad de vida de un individuo, o asociadas a dichas células o tejidos. Estos tejidos incluyen, por ejemplo, tejido de próstata y mama. Otra categoría está formada por afecciones derivadas de células o tejidos que desempeñan funciones esenciales para la supervivencia o el mantenimiento de la calidad de vida de un individuo, o asociadas a dichas células o tejidos. Las células y tejidos que desempeñan funciones esenciales incluyen, por ejemplo, cerebro, hígado, pulmón y sistema hematopoyético. La cantidad eficaz de un polipéptido de unión de la invención para tratar una afección patológica se emplea tanto si las células diana asociadas a la afección patológica se encuentran dentro de tejidos esenciales como si se encuentran dentro de tejidos no esenciales.

15 A este respecto, para inhibir el crecimiento celular aberrante, al paciente se le administra una cantidad eficaz de un polipéptido de unión que contiene un dominio C<sub>H3</sub> P38G selectivo para una molécula diana expresada sobre la superficie de células que intervienen en la afección patológica. Las células diana incluyen, por ejemplo, aquellas que intervienen en la afección patológica y/o aquellas que muestran efectos patológicos nocivos. Dichas células se caracterizan por una regulación o crecimiento celular aberrante, por ejemplo. El contacto de estas células mediante la administración al individuo de uno o más polipéptidos de unión que contienen un dominio C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina P38G de la invención selectivo para una molécula de superficie celular conducirá a la inhibición selectiva de estas células por diversos mecanismos conocidos en la técnica, con un tratamiento o reducción concomitante de la gravedad de la enfermedad. Los mecanismos de inhibición del crecimiento celular aberrante incluyen, por ejemplo, la inhibición de las vías de transducción de señales mediante unión al receptor, la inducción de apoptosis mediante unión al receptor, la inducción de citotoxicidad celular mediada por anticuerpos, la citotoxicidad mediada por células T y/o el suministro de agentes citotóxicos y/o citostáticos a la célula o tejido diana.

25 Una cantidad eficaz de un polipéptido de unión que tiene un polipéptido de dominio de región C<sub>H3</sub>, o un fragmento funcional del mismo, que contiene una sustitución P38G es una cantidad de polipéptido de unión suficiente para producir una disminución de la cantidad o la tasa de proliferación de células diana, o una disminución de al menos un síntoma de la afección patológica, cuando se administra a un individuo. La dosis de polipéptido de unión necesaria para que éste sea terapéuticamente eficaz dependerá, por ejemplo, de la afección patológica caracterizada por un crecimiento celular aberrante a tratar, la vía y la forma de administración, el peso y el estado del individuo y las terapias previas o concurrentes. La cantidad apropiada considerada como dosis eficaz para una aplicación particular del método puede ser determinada por los expertos en la técnica utilizando la guía que aquí se proporciona. Por ejemplo, la cantidad se puede extrapolar de ensayos *in vitro* o *in vivo* tal como se describe más arriba. Los expertos en la técnica reconocerán que el estado del paciente puede ser monitorizado durante toda la terapia y que la cantidad del polipéptido de unión que contiene un dominio C<sub>H3</sub> P38G administrado se puede ajustar en consecuencia.

30 En general, un polipéptido de unión de la invención se preparará de acuerdo con las normas farmacéuticas y utilizando reactivos de calidad farmacéutica. Del mismo modo, un polipéptido de unión de la invención se preparará, por regla general, utilizando reactivos estériles en un entorno de producción estéril o se esterilizará después de su preparación. Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar utilizando procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante la incorporación de uno o más polipéptidos de unión en la cantidad necesaria en un tampón de suministro y/o excipiente, seguida de microfiltración esterilizante. En la realización específica en polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, algunos métodos de preparación particularmente útiles incluyen, por ejemplo, secado al vacío y liofilización. Estos métodos de secado darán como resultado un polvo del polipéptido o los polipéptidos de unión junto con cualquier componente deseado adicional de una solución de los mismos previamente filtrada de forma estéril.

- La administración y los regímenes de dosificación se pueden ajustar con el fin de proporcionar una cantidad eficaz para una respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, se puede administrar un bolo simple, se pueden administrar varias dosis divididas en el tiempo, o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente en función de las exigencias de la situación terapéutica. Puede resultar particularmente útil formular un polipéptido de unión de la invención para la inyección intravenosa, parenteral o subcutánea, en forma de dosis única para una mayor facilidad de administración y uniformidad de dosificación, en la administración de una cantidad eficaz de uno o más polipéptidos de unión. El concepto "dosis unitaria" se refiere a una cantidad físicamente discreta de un producto farmacéutico adecuada como dosis unitaria para los sujetos a tratar. Cada unidad contiene una cantidad predeterminada de producto biofarmacéutico activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado.
- Para mayor ilustración, una cantidad eficaz de un polipéptido de unión de la invención, tal como un anticuerpo terapéutico o un fragmento funcional del mismo, que contiene un polipéptido de dominio C<sub>H</sub>3 de inmunoglobulina P38G se puede administrar, por ejemplo, más de una vez, a intervalos programados, a lo largo de un período de tiempo. En determinadas realizaciones, un anticuerpo terapéutico se administra durante un período de al menos un mes o más incluyendo, por ejemplo, uno, dos o tres meses o más. Para el tratamiento de afecciones crónicas, generalmente es más eficaz un tratamiento constante a largo plazo. Períodos de administración más cortos pueden ser suficientes para tratar afecciones agudas, incluyendo, por ejemplo, períodos de una a seis semanas. En general se administra un anticuerpo farmacéutico u otro producto biofarmacéutico hasta que el paciente manifiesta un nivel de mejoría médicamente significativo con respecto a la línea base para el indicador o los indicadores elegidos.
- Dependiendo del polipéptido de unión elegido y de la indicación a tratar, una cantidad terapéuticamente eficaz es suficiente para provocar una disminución de al menos un síntoma de la afección patológica en cuestión en al menos un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60% o más, con respecto a los sujetos no tratados. La capacidad del polipéptido de unión para reducir o inhibir un síntoma se puede evaluar, por ejemplo, en un sistema de modelo animal de predicción en humanos de la eficacia para la afección en cuestión. Alternativamente, la capacidad de una formulación biofarmacéutica para reducir o inhibir un síntoma se puede evaluar, por ejemplo, examinando la función o actividad *in vitro* de la formulación biofarmacéutica, que es indicativa de la actividad terapéutica *in vivo*.
- Los niveles de dosis exactos de uno o más polipéptidos de unión de la invención pueden variarse para obtener una cantidad del producto biofarmacéutico activo eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada en un paciente, formulación y modo de administración particulares, sin ser tóxica para el paciente. Los expertos en la materia podrían determinar las cantidades administradas en base a factores tales como el tamaño del sujeto, la gravedad de sus síntomas y el producto biofarmacéutico y/o la vía de administración elegidos. El nivel de dosis puede depender, por ejemplo, de diversos factores farmacocinéticos, incluyendo la actividad del producto biofarmacéutico empleado, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, estado, salud general e historial médico previo del paciente tratado, y factores similares conocidos en la técnica médica. Algunas realizaciones particulares de la presente invención implican la administración de un polipéptido que contiene un dominio C<sub>H</sub>3 P38G terapéutico tal como un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo en una formulación farmacéuticamente aceptable a una dosis de entre aproximadamente 1 ng de anticuerpo por kg de peso del sujeto al día (1 ng/kg/día) y aproximadamente 10 mg/kg/día, especialmente entre aproximadamente 500 ng/kg/día y aproximadamente 5 mg/kg/día y en particular entre aproximadamente 5 µg/kg/día y aproximadamente 2 mg/kg/día, a un sujeto.
- Un médico o veterinario experto en la materia puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz del polipéptido de unión requerido tal como se ejemplifica más arriba, por ejemplo en la Tabla 2, con referencia a los productos farmacéuticos de polipéptidos de unión actuales. Por ejemplo, el médico o veterinario puede iniciar una dosis de un polipéptido de unión de la invención en niveles inferiores a los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente ésta hasta conseguir el efecto deseado. En general, una dosis diaria adecuada de un polipéptido de unión de la invención consistirá en la cantidad del producto biofarmacéutico que sea la dosis eficaz más baja para producir un efecto terapéutico. Esta cantidad eficaz dependerá en general de los factores arriba descritos. Resulta particularmente útil realizar la administración por vía intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea. Si así se desea, la dosis diaria eficaz para lograr una cantidad eficaz de la formulación biofarmacéutica se puede administrar en forma de dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas por separado, a intervalos apropiados, a lo largo del día, opcionalmente en cantidades de dosis unitaria.
- El polipéptido de unión de la invención se puede administrar, por ejemplo, con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización particularmente útil, se puede administrar una formulación biofarmacéutica de la invención con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja tal como los dispositivos descritos en las Patentes US 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824 o 4.596.556. Algunos ejemplos de implantes y módulos conocidos útiles en la presente invención incluyen: Pat. US 4.487.603, que describe una bomba de microinfusión implantable para administrar medicación a una velocidad controlada; Pat. US 4.486.194, que describe un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; Pat. US 4.447.233, que describe una bomba de infusión de medicación para suministrar medicación a una velocidad de infusión precisa; Pat. US 4.447.224, que describe un aparato de infusión implantable de flujo variable para un suministro continuo de fármaco; Pat. US 4.439.196, que describe un sistema de suministro de fármacos osmótico que tiene compartimentos con múltiples cámaras; y Pat.

US 4.475.196, que describe un sistema de suministro de fármacos osmótico. Los expertos en la técnica conocen muchos otros implantes, sistemas de suministro y módulos.

- 5 En determinadas realizaciones específicas, un polipéptido de unión de la invención se puede formular adicionalmente para facilitar la distribución selectiva *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (*blood-brain barrier* - BBB) excluye muchos compuestos altamente hidrófilos. Si así se desea, para facilitar el paso a través de la BBB, la formulación farmacéutica puede incluir adicionalmente, por ejemplo, liposomas para la encapsulación de uno o más productos biofarmacéuticos. En cuanto a los métodos para producir liposomas, véanse, por ejemplo, Pat. US 4.522.811; 5.374.548 y 5.399.331. Los liposomas también pueden contener una o más fracciones que son transportadas selectivamente a células u órganos específicos, mejorando así el suministro dirigido del producto biofarmacéutico seleccionado (véase, por ejemplo, V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685). Ejemplos de fracciones dirigidas incluyen folato o biotina (véase, por ejemplo, Pat. US 5.416.016 de Low y col.); manósidos (Umezawa y col., (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038); anticuerpos (P. G. Bloeman y col., (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais y col. (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180) o receptor A de proteína tensioactiva (Briscoe y col. (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134).
- 10
- 15 Por consiguiente, la invención proporciona una cantidad eficaz de un polipéptido de unión para tratar una amplia gama de afecciones patológicas caracterizadas por un crecimiento celular aberrante. Una inmunoglobulina u otro polipéptido de unión multimérico que contiene un polipéptido de dominio C<sub>H3</sub> P38G se pueden utilizar para tratar, por ejemplo, el cáncer, incluyendo cáncer de próstata, mama, pulmón y piel. Del mismo modo, una inmunoglobulina u otro polipéptido de unión multimérico que contiene un polipéptido de dominio C<sub>H3</sub> P38G también se pueden utilizar para tratar cualquiera de una variedad de enfermedades infecciosas o enfermedades autoinmunes.
- 20

Se entiende que las modificaciones que no influyen de forma esencial en la actividad de las diversas realizaciones de la invención también están incluidas dentro de la definición de la invención aquí proporcionada. Por consiguiente, los siguientes ejemplos son meramente ilustrativos y no limitan la presente invención.

25 **Ejemplo I: Desestabilización del estado de transición de plegado de un dominio C<sub>H3</sub> de la inmunoglobulina**

Este ejemplo demuestra que la desestabilización de un estado de transición de plegado de C<sub>H3</sub> de la inmunoglobulina mediante la sustitución de prolina (Pro) aumenta la tasa de plegado para los dominios correctamente plegados.

- 30 El dominio C<sub>H3</sub> de anticuerpos desempeña un papel importante en la estabilidad y la asociación de las cadenas pesadas de las moléculas del anticuerpo. En el estado nativo o plegado, un dominio C<sub>H3</sub> tiene el pliegue de inmunoglobulina (pliegue Ig) caracterizado por dos hojas β estabilizadas por un enlace disulfuro intracatenario conservado. Se ha comprobado que en diversos anticuerpos terapéuticos, incluyendo, por ejemplo, IgG1 e IgG2, hasta un 15% de los dominios C<sub>H3</sub> pueden tener enlaces disulfuro reducidos. Este ejemplo muestra la cinética de plegado de la forma reducida del tipo salvaje (WT) y una forma alterada del dominio C<sub>H3</sub> de IgG1 humano.

- 35 Más abajo se describen estudios que caracterizan la estabilidad de equilibrio y la cinética de plegado de formas oxidadas y reducidas de un dominio C<sub>H3</sub> en comparación con una forma alterada donde el residuo Pro en la posición 38 se sustituye por Gly (P38G). En general, un dominio C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina contiene aproximadamente 100-120 residuos. En estos estudios se ha utilizado un dominio C<sub>H3</sub> de IgG1 que contiene 114 residuos y que es característico de dominios C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina (Figura 1; SEQ ID N°: 1). Esta secuencia también contiene cuatro aminoácidos adicionales en el extremo amino (MGSS) y seis aminoácidos en el extremo carboxi (HHHHHH) para expresión en *Escherichia coli* y purificación, respectivamente. La glicina en la posición 5 corresponde a la posición de aminoácido 224 de la cadena gamma-1 de la inmunoglobulina humana (nombre de entrada en Swiss-Prot IGHG1\_HUMAN; número de acceso P01857). Tanto las formas de tipo salvaje (P38) como las formas alteradas P38G se expresaron en *E. coli* y se purificaron utilizando procedimientos estándar. En pocas palabras, los polipéptidos recombinantes se expresaron en *E. coli* y se purificaron utilizando resina Ni-NTA de Abgent, Inc. (San Diego, California). Los polipéptidos purificados (aproximadamente 1 mg/ml) se guardaron en tampón de acetato 10 mM a pH 5,0 a -80°C.
- 40
- 45

- 50 Tal como se describe más abajo, las formas reducidas de los polipéptidos se prepararon desplegando el polipéptido en clorhidrato de guanidina (GdmCl) y añadiendo ditioneitol (DTT) 2 mM. En pocas palabras, el desplegado se inició mediante la mezcla manual del polipéptido nativo (1,2 mg/ml polipéptido, acetato 10 mM, DTT 2 mM, pH 5,0) con el mismo tampón con contenido en diferentes concentraciones de GdmCl a 10°C. El polipéptido se replegó mediante dialización extensa contra acetato 10 mM, tampón pH 5,0 conteniendo DTT 2 mM. Para caracterizar las especies reducidas y oxidadas y confirmar la reducción completa tal como se describe más abajo, se utilizó un método de cromatografía en fase inversa.

- 55 Las mediciones de fluorescencia, excepto la desnaturalización de GdmCl de equilibrio, se llevaron a cabo utilizando un fluorómetro PTI (Birmingham, NJ) equipado con dos canales de detección. La longitud de onda de excitación se ajustó a 280 nm con una anchura de banda de 1 nm y la emisión se controló a 357 nm con una anchura de banda ajustada a 20 nm y 10 nm en los canales A y B, respectivamente. Los datos cinéticos obtenidos de los dos canales dieron como resultado tasas idénticas. Todas las mediciones se llevaron a cabo a 21°C. En el caso de los experimentos de mezcla manuales, el tiempo muerto (intervalo de tiempo entre la mezcla y la adquisición del primer punto de datos) de medición

osciló entre 9 y 11 segundos y se midió en cada estudio. Las muestras se agitaron de forma continua durante la adquisición de datos para reducir al mínimo el fotoblanqueo. Los datos de desnaturalización de equilibrio se obtuvieron en un espectropolarímetro AVIV (Lakewood, NJ) con un ajuste de los instrumentos similar al utilizado en el fluorómetro PTI. Los espectros CD se midieron utilizando un espectropolarímetro JASCO-J810 en una célula de trayectoria de 1 cm para los datos de UV cercano y una trayectoria de 0,1 cm para los datos de UV lejano. La concentración de polipéptido era de 0,23 mg/ml y el tampón consistió acetato 2 mM con un pH 5,0.

Se llevaron a cabo estudios de desnaturalización para evaluar la estabilidad de los dominios C<sub>H3</sub> de tipo salvaje y P38G. Se ha demostrado que, en el estado nativo, la forma oxidada de los dominios C<sub>H3</sub> de tipo salvaje (WT) es dimérica en concentraciones tan bajas como 0,1 mM (Isenman y col., *Biochemistry* 18:3327-36 (1979)). Estudios anteriores realizados por los inventores han demostrado que incluso la forma reducida del dominio C<sub>H3</sub> de tipo salvaje existe como un dímero plegado bajo condiciones nativas, aunque con una estructura secundaria y terciaria algo diferente en comparación con la forma oxidada. Del mismo modo, también se comprobó que tanto las formas oxidadas como las reducidas de P38G son diméricas bajo condiciones nativas.

La Figura 5 muestra una comparación de las propiedades espectroscópicas para evaluar las estructuras secundarias y terciarias de las formas reducidas de WT y P38G obtenidas de mediciones de dicroísmo circular (CD) de UV cercano (Figura 5a) y UV lejano (Figura 5b). Los resultados muestran que los espectros de CD de UV cercano eran idénticos en WT y P38G, lo que indica que tienen una estructura terciaria similar. Los resultados también muestran que los datos de UV lejano de las dos moléculas parecen cualitativamente similares. No obstante, la magnitud de la señal era más débil que entre 220 nm y 240 nm para P38G. Estas mediciones CD indican que el enlace peptídico Tyr37-Pro38 en la conformación *cis* en la molécula WT puede cambiar a un enlace peptídico Tyr37-Gly38 *trans* en P38G, ya que los enlaces peptídicos *cis* no prolijo son energéticamente desfavorables (Ramachandran, G.N. & Mitra, A.K., *J. Mol. Biol.* 107:85-92 (1976); Odefey y col., *J. Mol. Biol.* 245, 69-78 (1995)). Dado que la mutación P38G está localizada en una región de giro entre dos cadenas β, un cambio de conformación esquelética *cis* a *trans* en esta posición en P38G puede ir acompañado de cambios estructurales locales para mantener una estructura terciaria similar a la de la molécula WT.

Debido a que la magnitud de la señal CD de UV lejano era pequeña en el estudio arriba indicado para el estado nativo (-1400 deg cm<sup>2</sup> dmol<sup>-1</sup> a 218 nm para WT), también se empleo espectroscopía de emisión de fluorescencia para distinguir entre las formas plegadas y desplegadas de WT y los dominios C<sub>H3</sub> P38G alterados. Las mediciones de fluorescencia se determinaron tal como se describe más arriba. Las condiciones del tampón eran acetato 10 mM, pH 5,0, DTT 2 mM y Gdm 0 M y Gdm 4,5 M para los estados plegado y desplegado, respectivamente. La longitud de onda de emisión era de 280 nm y la temperatura de la muestra era de 21°C. En la Figura 5 se muestran los resultados de estos espectros de emisión de fluorescencia del dominio WT plegado (línea continua) y desplegado (línea discontinua), que indican que, en el estado plegado, el valor máximo de emisión se produjo a una longitud de onda de 325 nm, que cambió a 350 nm en el estado desplegado tanto para WT (Figura 5c) como para P38G (datos no mostrados).

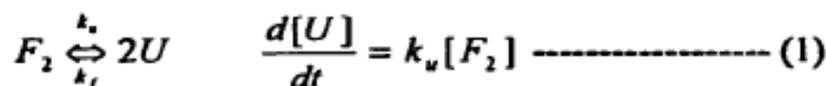
Para determinar la estabilidad de equilibrio de la forma WT y la forma alterada P38G se utilizó la desnaturalización inducida por GdmCl. Las condiciones del tampón fueron acetato 10 mM, pH 5,0, y DTT 2 mM. La concentración de polipéptido era de 50 µg/ml en ambos casos. Las muestras se incubaron en las concentraciones GdmCl apropiadas durante ~24 horas a temperatura ambiente antes de las mediciones de fluorescencia. La longitud de onda de excitación se ajustó a 280 nm y la emisión se controló a 357 nm. Los resultados de las formas reducidas WT (□) y P38G (Δ) se muestran en la Figura 6, donde las líneas continuas indican ajustes a los datos suponiendo un modelo de dos estados (F<sub>2</sub> ⇌ 2U).

Aunque los datos de fluorescencia mostrados en la Figura 6 indican una transición simple de dos estados entre el dímero plegado y el monómero desplegado tanto para WT como para P38G, los datos de ultracentrifugación analítica de equilibrio muestran indicios de que un monómero plegado puede estar poblado de concentraciones intermedias de GdmCl en el caso del WT (datos no mostrados). Dado que los dos residuos de triptófano de la molécula no están situados cerca de la superficie de contacto del dímero, las mediciones de fluorescencia no pueden distinguir entre un monómero plegado y un dímero plegado. A partir de los datos mostrados en la Figura 6 se determinó que los valores C<sub>m</sub> (punto medio de la transición) eran de GdmCl 1,3 y 1,1 M para WT y P38G, respectivamente. Aunque para obtener las energías libres de disociación y desplegado se requiere un análisis global de los datos utilizando un modelo de tres estados que implica un monómero plegado estable, el análisis de los datos de fluorescencia utilizando un modelo de dos estados (dímero plegado ← → monómero desplegado) dio como resultado valores ΔG de 14,4 ± 0,2 y 12,9 ± 0,6 kcal/mol para WT y P38G, respectivamente, que son coherentes con los valores obtenidos para polipéptidos diméricos (Neet, K. E. & Timm, D. E., *Protein Science* 3:2167-74 (1994)).

Estudios previos sobre la forma reducida y alquilada del dominio C<sub>H3</sub> de IgG1 humana (fragmento péptico) indicaban que esta molécula no se pliega de forma significativa bajo condiciones nativas de GdmCl 0,5 M, a diferencia de los resultados arriba descritos (Isenman y col., *supra*). La alquilación de residuos de cisteína insertados en el núcleo hidrófobo del dominio C<sub>H3</sub> pueden introducir un impedimento estérico que evita el plegado de esta molécula de modo similar al notificado en relación con un fragmento C<sub>L</sub> de una molécula de anticuerpo (Ashikari y col., *Biochem (Tokyo)* 97:517-28 (1985)). Los estudios realizados en el dominio C<sub>H3</sub> murino indicaban estructuras terciarias similares para la forma reducida y oxidada del polipéptido, pero estructuras secundarias algo alteradas (Thies y col., *J. Mol. Biol.* 319, 1267-77 (2002)). Los resultados arriba descritos indican que, mientras que la estructura secundaria resultaba afectada en cierta medida tanto por la reducción del enlace disulfuro como por la mutación de prolina a glicina, la estructura

5 terciara era resistente a cualquiera de estos dos cambios. Los datos de desnaturalización química de equilibrio en la forma reducida del dominio C<sub>H3</sub> murino indicaban que la molécula se pliega al estado nativo, aunque con una estabilidad considerablemente reducida en comparación con la forma oxidada (Thies y col., *supra*). La estabilidad de equilibrio estimada de la molécula murina era ~2 kcal/mol, que es aproximadamente 7 veces menor que la estabilidad obtenida para el dominio humano WT reducido arriba descrito, aunque las formas reducidas de los dominios C<sub>H3</sub> murino y humano son bastante similares estructuralmente (Saphire y col., J. Mol. Biol. 319: 9-18 (2002)).

La cinética de desplegado bajo condiciones desnaturalizantes se puede describir mediante el modelo de dos estados dímeros simples:



10 y los datos se pueden ajustar con la siguiente ecuación exponencial:

$$A = A_0 + A_1(1 - e^{-k_u t}) \text{ ----- (2)}$$

15 donde [F<sub>2</sub>] y [U] son las concentraciones de dímero nativo y monómero desnaturalizado, k<sub>u</sub> es la constante de tasa de desplegado, k<sub>f</sub> es la constante de la tasa de pliegue (k<sub>u</sub> >> k<sub>f</sub> bajo fuertes condiciones de desplegado), A es la señal de fluorescencia en el tiempo t, A<sub>0</sub> es la señal de fluorescencia en t = 0 y A<sub>1</sub> corresponde a la carga de fluorescencia durante la reacción de desplegado.

20 La Figura 7 muestra datos de la cinética de desplegado representativos y su ajuste en el modelo arriba mostrado. En pocas palabras, el desplegado se inicia mezclando el polipéptido nativo en un tampón que contiene acetato 10 mM, pH 5,0 y DTT 2 mM con el mismo tampón con contenido en diferentes concentraciones de GdmCl a 21°C. En la mayoría de los casos, la concentración final de polipéptido resultante era de 0,015 mg/ml. Con el fin de comprobar en qué medida el desplegado dependía de la concentración, se llevaron a cabo algunas mediciones con una concentración final de polipéptido de 144 µg/ml. En este estudio, un tampón altamente desnaturalizante se mezcló con el polipéptido nativo para obtener unas condiciones finales de GdmCl 3,5 M, DTT 2 mM y 0,015 mg/ml de polipéptido. La longitud de onda de excitación era de 280 nm y la emisión se controló a 357 nm. La mezcla se agitó de forma continua durante la medición a una temperatura de 21°C tal como se ha indicado anteriormente.

25 El recuadro inferior de cada panel de la Figura 7 representa restos obtenidos al ajustar los datos en la ecuación (2) (cuadrados vacíos) y la ecuación (3) (triángulos vacíos). Los resultados indican que, en el caso de la molécula WT, los datos de la cinética de desplegado obtenidos con todas las concentraciones de GdmCl se ajustaban bien utilizando la ecuación (2) (Figura 7a). Sin embargo, en el caso de P38G, el ajuste de los datos utilizando la ecuación (2) dio como resultado restos sistemáticos ligeramente mayores, y el ajuste de los datos en la siguiente ecuación, que incluye una segunda fase cinética, mejoró la calidad de dicho ajuste (Figura 7b).

$$A = A_0 + A_1(1 - e^{-k_1 t}) + A_2(1 - e^{-k_2 t}) \text{ ----- (3)}$$

35 Como muestra la Figura 7, la amplitud correspondiente a la fase rápida (A<sub>1</sub>) se mantuvo constante entre el 90 y el 95% en todas las concentraciones de GdmCl. Normalmente no se observa una cinética de desplegado exponencial doble y la fuente de la segunda fase cinética para P38G no se caracterizó adicionalmente. El desplegado hasta concentraciones de GdmCl finales menores de 2,5 M no se investigó debido a las escalas temporales extremadamente largas que ello implica (más de 3 horas).

40 También se caracterizó la dependencia de las tasas de desplegado de la concentración de GdmCl mediante la evaluación del logaritmo natural de las tasas de desplegado para WT y P38G. Los resultados se muestran en la Figura 8 e indican una dependencia lineal de la concentración de GcmCl. La tasa de desplegado de WT se muestra mediante los cuadrados rellenos, mientras que la fase de desplegado principal y la fase secundaria de P38G se muestran mediante triángulos rellenos y vacíos, respectivamente. Las amplitudes de las dos fases de desplegado eran independientes de la concentración de GdmCl, contribuyendo la fase de desplegado principal en un 90-95% al cambio de fluorescencia observado. La extrapolación lineal de las tasas de desplegado a una concentración de desnaturalizante cero dio como resultado tasas de desplegado de 4,2·10<sup>-8</sup> y 1,7·10<sup>-6</sup> para WT y P38G, respectivamente. La segunda fase de desplegado no caracterizada para P38G se muestra como la amplitud 5-10%. Dado que la estabilidad de equilibrio de la molécula WT es relativamente similar a la de P38G, la mayor velocidad de desplegado observada en el caso de P38G indica que el estado de transición de desplegado se desestabiliza en el polipéptido de dominio C<sub>H3</sub> alterado.

50 Dado que la reacción de desplegado representada mediante el modelo de la ecuación (1) indica una reacción unimolecular, la cinética de desplegado es independiente de la concentración. Las tasas de desplegado tanto de WT como de P38G también se midieron en dos concentraciones diferentes, con una concentración final 3,5 M. En pocas palabras, el polipéptido nativo en acetato 10 mM, pH 5,0, DTT 2 mM, en ausencia de GdmCl se desplegó mezclándolo

con tampones de GdmCl apropiados para obtener las condiciones finales indicadas. Los resultados de este análisis se resumen en la Tabla 3 y corroboran que la cinética de desplegamiento es independiente de la concentración. La dependencia del desplegamiento de la concentración con GdmCl 2,5 M se estudió únicamente en el caso de la molécula WT debido a las escalas temporales relativamente largas que ello implica.

5 **Tabla 3 Amplitudes y tasas de desplegamiento de WT y P38G con dos concentraciones de polipéptido bajo fuertes condiciones de desplegamiento**

	GdmCl (M)	Concentración (mg/ml)	$k_{u1}$ (s <sup>-1</sup> ) ( $\cdot 10^3$ )	$k_{u2}$ (s <sup>-1</sup> ) ( $\cdot 10^3$ )	A <sub>1</sub> (%)	A <sub>2</sub> (%)
WT	3,5	0,015	8,6	-	1	-
		0,144	8,6	-	1	-
P38G	3,5	0,015	30,5	5,7	94	6
		0,144	30,3	4,2	95	5
WT	2,5	0,015	0,26	-	1	-
		0,144	0,28	-	1	-

10 En comparación, el desplegamiento de la molécula C<sub>H3</sub> murina reducida parecía producirse aproximadamente cien veces más rápido que el desplegamiento del dominio C<sub>H3</sub> WT humano arriba descrito, lo que es coherente con la estabilidad de equilibrio considerablemente más baja notificada en el caso de la molécula murina. Dado que también se han observado dos fases cinéticas de desplegamiento (amplitudes del 64% y el 36%) en el desplegamiento de la forma reducida de la molécula de C<sub>H3</sub> murina (Thies y col., *supra*), estos resultados indican una destrucción secuencial de la superficie de contacto del dominio del dímero y el posterior desplegamiento del monómero. La cinética de desplegamiento exponencial simple arriba descrita indica que el desplegamiento de la molécula de C<sub>H3</sub> humana se produjo en un solo paso, donde la destrucción de la superficie de contacto del dominio y el desplegamiento tienen lugar simultáneamente.

15 La comparación de los dominios de C<sub>H3</sub> WT y P38G también se evaluó mediante caracterización de la cinética de plegado de cada polipéptido. En pocas palabras, el polipéptido se desplegó por completo mediante incubación a temperatura ambiente durante ~24 horas en acetato 10 mM, GdmCl 4,5 M y DTT 2 mM a pH 5,0. Los polipéptidos se replegaron mezclándolos con soluciones tampón que contenían concentraciones bajas de GdmCl, de modo que las concentraciones finales de GdmCl eran de 0,06 - 0,5 M.

Dado que la forma reducida del dominio C<sub>H3</sub> humano es dimerica bajo condiciones fuertemente nativas, el plegado de este polipéptido puede depender de la concentración. Bajo fuertes condiciones de plegado ( $k_f \gg k_u$ ), la reacción de replegado se puede describir mediante la siguiente ecuación:

$$2U \xrightleftharpoons[k_r]{k_f} F_2 \quad ; \quad \frac{d[F_2]}{dt} = k_f [U]^2 \dots\dots\dots (5)$$

25 Por tanto, la cinética de plegado es de segundo orden en la concentración de polipéptido y, en consecuencia, se describe mediante la ecuación hiperbólica mostrada más abajo (Milla, M. E. & Sauer, R. T., *Biochemistry* 33:1125-33 (1994); Gloss, L. M. & Matthews, C. R., *Biochemistry* 37:15990-15999(1998)).

$$F_2 = A_0 + A_1 \left( \frac{1}{1 + k_{app} t} \right) ; k_{app} = k_f c \dots\dots\dots (6)$$

30 En la ecuación (6), A<sub>0</sub> es la amplitud de fluorescencia en el tiempo cero, A<sub>1</sub> es el cambio de fluorescencia durante la reacción de replegado, k<sub>app</sub> es la constante de tasa aparente, k<sub>f</sub> es la constante de tasa de segundo orden real y c es la concentración total de polipéptido. En la mayoría de los casos, el ajuste de los datos utilizando la ecuación (6) dio como resultado grandes restos sistemáticos. Este resultado indica que el plegado del dominio C<sub>H3</sub> puede estar influido por la presencia de la gran cantidad de residuos de prolina, que puede conducir a múltiples fases cinéticas debido a la isomerización de la prolina. El análisis de los datos utilizando la siguiente ecuación, que incorpora una fase cinética adicional, dio como resultados restos dentro de un 0,5%.

$$F_2 = A_0 + A_1 \left( \frac{1}{1 + k_{f1}t} \right) + A_2 \left( \frac{1}{1 + k_{f2}t} \right) \dots \dots \dots (7)$$

La Figura 9 muestra ejemplos de cinéticas de plegado aplicadas a la ecuación (7). En pocas palabras, los datos de la cinética de plegado obtenidos en caso de (a) WT y en caso de (b) P38G con una concentración final de GdmCl de 0,06 M, DTT 2 mM y 0,015 mg/ml de concentración de polipéptido en acetato 10 mM y pH 5,0 a 21°C. Las líneas continuas son los ajustes de los datos utilizando la ecuación (7) y el recuadro inferior de cada panel indica los restos obtenidos de dichos ajustes. El polipéptido desplegado en acetato 10 mM, DTT 2 mM, pH 5,0, y GdmCl 5 M se incubó a temperatura ambiente durante ~24 horas y se replegó diluyéndolo a GdmCl 0,06 M.

Los datos de la cinética de plegado también se analizaron mediante cinética exponencial convencional. Se requirieron tres fases cinéticas para obtener ajustes comparables a los obtenidos utilizando la ecuación (7). Además, dado que el análisis de las cinéticas de plegado obtenidas con diferentes concentraciones de polipéptido indicaba que el plegado dependía de la concentración (véase, por ejemplo, la Tabla 4), la ecuación (7) era más apropiada para describir la cinética de plegado del dominio C<sub>H3</sub> humano. Este análisis mostró que, en el caso de la molécula WT, con las concentraciones de GdmCl más bajas (0,06 y 0,15 M), los datos de la cinética de plegado se describían bien utilizando la ecuación (7), mientras que, con las dos concentraciones de GdmCl más altas (0,26 y 0,36 M), los datos se describían bien utilizando una fase cinética simple (ecuación 6).

Si bien las dos fases cinéticas estaban bien separadas en las bajas concentraciones de desnaturalizante, estas tasas pueden ser similares para concentraciones de GdmCl mayores, como muestra la Figura 10, y puede no ser posible obtener cuantitativamente las dos tasas a partir de los datos. La Figura 10 muestra la dependencia de las tasas y amplitudes de plegado (recuadro) en los polipéptidos de dominio C<sub>H3</sub> WT y P38G. Los cuadrados rellenos y los cuadrados vacíos indican las velocidades rápidas y lentas observadas en la molécula WT y los triángulos rellenos y vacíos indican las velocidades rápidas y lentas observadas en el caso de P38G. Los cuadrados rellenos del recuadro muestran las amplitudes de la fase rápida en el caso de WT y los triángulos rellenos representan las amplitudes de la fase rápida en el caso de P38G.

Este análisis indica que, en el caso de P38G, los datos con todas las concentraciones de GdmCl se ajustaban bien utilizando la ecuación (7). Las dos tasas estaban bien separadas y la amplitud de la fase rápida disminuye de ~50-60% y aproximadamente el 25% con GdmCl 0,36 M (Figura 10). Tanto en el caso de WT como en el caso de P38G, la velocidad rápida depende linealmente de la concentración de GdmCl, mientras que la velocidad lenta parece ser independiente de la concentración de GdmCl. La falta de dependencia de la fase lenta de la concentración de desnaturalizante indica que esta fase es el resultado de la isomerización de la prolina (Odefey y col., *supra*). La tasa menor para la fase lenta de P38G en comparación con WT no se caracterizó adicionalmente. Sin embargo, una comparación de las tasas rápidas con bajas concentraciones de desnaturalizante indicaba que la velocidad rápida es aproximadamente 2 veces más rápida en el caso de P38G que en el caso de la molécula WT.

También se obtuvieron datos de la cinética de plegado bajo fuertes condiciones de plegado (Gdm 0,06 M) con dos concentraciones de polipéptido diferentes (0,015 y 0,14 mg/ml) tanto para WT como para P38G. La Tabla 4 resume estas tasas y amplitudes de plegado. En pocas palabras, un polipéptido desplegado en acetato 10 mM, pH 5,0, DTT 2 mM, y GdmCl 5,0 M se replegó tal como se describe más arriba mediante la dilución apropiada de la concentración de GdmCl para obtener las condiciones finales indicadas.

**Tabla 4 Amplitudes y tasas de plegado de WT y P38G con dos concentraciones de polipéptido**

	GdmCl (M)	Concentración (mg/ml)	$k_{r1}$ (s <sup>-1</sup> ) (·10 <sup>3</sup> )	$k_{r2}$ (s <sup>-1</sup> ) (·10 <sup>3</sup> )	A <sub>1</sub> (%)	A <sub>2</sub> (%)
WT	0,06	0,015	11,8	0,86	65	35
		0,144	44,5	0,52	64	36
P38G	0,06	0,015	27,3	0,44	52	48
		0,144	73,8	0,40	44	56

Los resultados mostrados en la Tabla 4 indican que el plegado tanto de WT como de P38G alterado depende de la concentración, lo que indica una reacción bimolecular de acuerdo con la ecuación (5). La fase rápida (amplitud ~65%) era aproximadamente 3,5 veces más rápida con la concentración de polipéptido más alta en el caso de la molécula WT, mientras que en el caso de P38G era aproximadamente 2,7 veces más rápida (amplitud ~52%). La fase rápida también era aproximadamente 2 veces más rápida en el caso de P38G en comparación con la molécula WT (Tabla 4). La fase

- lenta mostró una dependencia débil de la concentración de polipéptido en el caso de la molécula WT, mientras que en el caso de P38G las velocidades lentas eran idénticas en las dos concentraciones. La dependencia de la concentración de polipéptido observada indica que el plegado y la dimerización se producían de forma concurrente. Una dependencia de la concentración de polipéptido de las tasas de plegado no sería esperable si el plegado de moléculas monómeras se produjera antes de la dimerización, ya que no se espera ningún cambio de fluorescencia por dimerización. La fase lenta, que muestra una ausencia de dependencia de la concentración de polipéptido, puede resultar de una vía de plegado alterna en la que la tasa de plegado puede estar limitada por la isomerización de la prolina y el plegado de los monómeros puede avanzar de forma significativa antes de que se produzca la dimerización.
- Aproximadamente un 40% y 55% del cambio de intensidad de fluorescencia total entre el estado plegado y el estado desplegado en el caso de WT y en el caso de P38G, respectivamente, se produjo dentro del tiempo muerto (~12-13 segundos) de los experimentos de mezcla manual realizados en este estudio. A pesar de este gran cambio de fluorescencia observado dentro del tiempo muerto (12-13 segundos) de la medición, el resto del cambio de fluorescencia se produjo a lo largo de una escala temporal mucho mayor (> 1 hora). El gran cambio de fluorescencia dentro de la fase de ráfaga puede ser el resultado de la formación de un producto intermedio de plegado específico.
- El dominio C<sub>H</sub>3 de IgG1 humana contiene nueve prolinas. Las estructuras cristalinas de este dominio de moléculas de IgG murina y humana muestran que todas las prolinas, excepto la prolina correspondiente a la posición 38, están en una conformación *trans* en el estado nativo (Thies y col., J. Mol. Biol. 293:67-79 (1999); Saphire y col., *supra*). Esta posición de prolina (correspondiente a la prolina 38 en el dominio C<sub>H</sub>3 de IgG1 humana) en la conformación *cis* en el estado nativo está altamente conservada entre la familia de las inmunoglobulinas. Con el fin de investigar el efecto de la isomerización de la prolina en la cinética de plegado, se llevaron a cabo experimentos de replegado de doble salto en los que el polipéptido nativo se desplegó bajo altas concentraciones de desnaturante durante tiempos variables antes del replegado (Brandts y col., Biochemistry 14:4953-63 (1975)). En pocas palabras, en el primer paso el desplegado se inició mezclando el polipéptido nativo en acetato 10 mM, pH 5,0, con tampón de desplegado tal como se describe más arriba, para obtener unas condiciones finales de GdmCl 5 M, DTT 2 mM, pH 5,0, y una concentración de polipéptido de 0,375 mg/ml. Se dejó que el polipéptido se desplegara durante intervalos de tiempo variables tal como muestra la Figura 11 antes de iniciar el replegado mediante dilución del desnaturante hasta una concentración de GdmCl final de 0,2 M en DTT 2 mM y una concentración final de polipéptido de 0,015 mg/ml. Durante la reacción de replegado se controló la intensidad de fluorescencia. En las condiciones de desplegado utilizadas en estos estudios (GdmCl 5 M), la intensidad de fluorescencia alcanzó un valor de equilibrio correspondiente al estado desplegado dentro del tiempo muerto (12-13 segundos) de la medición. Durante el replegado se controló la emisión de fluorescencia. En general, dado que las condiciones de replegado final eran iguales en todos los tiempos de retraso, la intensidad de la fluorescencia al final del replegado debería ser igual en todas las muestras. Sin embargo, debido al tiempo de replegado relativamente largo (~ 60 min) y la inestabilidad instrumental, las intensidades de fluorescencia después del replegado no se correspondían con exactitud en los diferentes tiempos de retraso.
- La Figura 11 muestra las intensidades de fluorescencia relativa tanto en el caso de WT (panel a) como en el caso de P38G (panel b) con diferentes tiempos de retraso. Las líneas discontinuas de la Figura 11 también muestran la intensidad de fluorescencia medida en el caso de las muestras desplegadas correspondientes en GdmCl 5 M (0,015 mg/ml polipéptido desplegado). Los resultados indican que, en el caso de la molécula WT, la disminución inicial de la intensidad de fluorescencia dependía del tiempo de retraso, mientras que, en el caso de P38G, el cambio inicial de la intensidad de fluorescencia no dependía del tiempo de retraso. El análisis de los datos utilizando la ecuación (7) dio como resultado restos sistemáticos más altos que los obtenidos a partir del análisis de los datos de cinética de plegado a diferentes concentraciones de GdmCl. Cualitativamente, en el caso de P38G se obtuvieron tasas de plegado similares con todos los tiempos de retraso. Sin embargo, en el caso de la molécula WT, las tasas obtenidas mostraban cierta dependencia del tiempo de retraso.
- La comparación de la dependencia de las amplitudes de la "fase de ráfaga" de los tiempos de retraso entre las moléculas WT y P38G mostró que la isomerización de la prolina en la posición 38 desempeña una función importante en el plegado de esta molécula. Dado que las amplitudes de la fase de ráfaga no cambiaron con los tiempos de retraso en el caso de P38G, la isomerización de todas las demás prolinas aparte de P38 no pareció afectar al plegado. La amplitud de fase de ráfaga en el caso de P38G permaneció constante en el 55% en todos los tiempos de retraso. Por otro lado, la amplitud de la fase de ráfaga con tiempos de retraso largos era de aproximadamente el 40% y se acercó a aproximadamente el 55% en tiempos de retraso cortos (40 segundos) en el caso de la molécula WT. En la molécula de WT con tiempos de retraso de desplegado cortos, la prolina en la posición 38 puede seguir manteniendo la conformación *cis* nativa, aunque bajo las condiciones de desplegado aquí empleadas, la molécula se despliega durante los primeros 10 s (datos no mostrados). Con tiempos de retraso más largos, la prolina en la posición 38 experimentó una isomerización a la conformación *trans* y reisomerización a la conformación *cis*, lo que condujo a cambios más pequeños en las amplitudes de fase de ráfaga. Los resultados indican que el enlace peptídico correspondiente en P38G adopta una conformación *trans* en el estado nativo y esta conformación *trans* condujo a amplitudes de fase de ráfaga constantes en todos los tiempos de retraso. Las amplitudes de fase de ráfaga observadas tanto para las moléculas WT como para las moléculas P38G eran ligeramente más altas que las que se pueden observar en el plegado de otros polipéptidos de este tamaño. La amplitud de fase de ráfaga observada puede corresponder a la formación de un producto intermedio de plegado específico o a una respuesta no específica de la molécula desplegada a las condiciones también similares a las nativas (Qi y col., Nature Struct. Biol. 5:882-84 (1998)). Sin embargo, la dependencia de las

amplitudes de fase de ráfaga de los tiempos de retraso en el caso de la molécula WT era indicativa de la formación de un producto intermedio de plegado específico.

5 Para investigar el efecto de la alteración de P38G en el plegado oxidante de C<sub>H3</sub> humano, el plegado de WT y P38G en presencia de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG) se controló mediante HPLC en fase inversa. Antes de estudiar el plegado oxidante, se analizó el efecto de potenciales redox en la oxidación de polipéptido C<sub>H3</sub>. El potencial redox se controló cambiando la relación molar entre GSH y GSSG en el tampón redox. La Figura 12 muestra los cromatogramas de polipéptido WT desplegado con GdmCl con diversas relaciones de GSH y GSSG. En pocas palabras, SH y SS en la figura representan las formas reducidas (SH) y oxidadas (SS), respectivamente. I1 e I2 representan el polipéptido C<sub>H3</sub> con una y dos moléculas de glutatión unidas por disulfuro, respectivamente. Los polipéptidos C<sub>H3</sub> (11,5 µg/ml) se incubaron en Tris 10 mM, GdmCl 4 M, pH 8,2, en diferentes relaciones, tal como se indica en la figura, de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG) a temperatura ambiente antes de la cromatografía.

10 Los resultados mostrados en la Figura 12 ponen de manifiesto que en todos los casos se observaban cuatro picos. Los picos de elución a 25,2 minutos y 26,5 minutos se identificaron como la forma oxidada y la forma reducida, respectivamente. No obstante, en este estudio también se observaron picos de elución entre la forma oxidada y la forma reducida (designados I1 e I2 en las dos Figuras 12 y 13). Para identificar estas especies intermedias de oxidación se determinaron sus masas moleculares mediante espectrometría de masas. La masa molecular medida de I1 era mayor que la de la forma SH en 306 Da, lo que indicaba que I1 contenía una molécula de glutatión que estaba unida por disulfuro a uno o a los dos residuos de cisteína libres del polipéptido C<sub>H3</sub> reducido. De forma similar, la especie I2 se identificó como una especie que contenía dos moléculas de glutatión unidas por disulfuro.

15 La Figura 12 también muestra que estas cuatro especies estaban pobladas en diferentes niveles dependiendo del potencial redox. Por ejemplo, cuando la relación molar GSH:GSSG era 10:1, el tampón redox era reductor, mientras que cuando GSH:GSSG era 1:10, el tampón era oxidante. Bajo condiciones reductoras (cromatograma con GSH:GSSG = 10:1 en la Figura 12), la forma reducida era la más dominante, seguida por la especie I1. Cuando el tampón redox se hacía más oxidante (cromatograma con GSH:GSSG = 1:10), la fracción de la forma reducida disminuía e I2 aumentaba. En todos los casos, la forma oxidada era una población menor, ya que un gran exceso de GSH (~ 1.000 veces más que el polipéptido C<sub>H3</sub>) promovía el enlace disulfuro intermolecular entre el polipéptido C<sub>H3</sub> y GSH frente a la formación del disulfuro intramolecular dentro del polipéptido C<sub>H3</sub>.

20 Después de las determinaciones del potencial redox arriba indicadas, también se evaluó el replegado oxidante de WT y la forma alterada P38G en presencia de GSH y GSSG a una relación molar de 2:1. En pocas palabras, tanto el polipéptido WT como el polipéptido P38G a una concentración de 230 µg/ml (dímero 8,7 µM) se desplegaron en un tampón que contenía acetato 10 mM, GdmCl 4 M a pH 5. El volumen total de la solución era de 70 µl. Las soluciones de polipéptido se incubaron después durante 40 minutos a temperatura ambiente para completar la desnaturalización. Para iniciar el replegado oxidante, cada polipéptido desnaturalizado se diluyó en una solución sumamente fría que contenía Tris 100 mM, pH 8,2, glutatión reducido 5 mM (GSH) y glutatión oxidado 2,5 mM (GSSG). El factor de dilución era igual a 20 y el volumen total para el replegado era de 1,4 ml. Las concentraciones finales del polipéptido y GdmCl eran de 11,5 µg/ml y 0,2 M, respectivamente. La solución se mantuvo en agua sumamente fría durante todo el replegado. Después de 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16 y 30 minutos de replegado, se retiró una parte alícuota de 135 µl de la solución de replegado. Las muestras se mezclaron inmediatamente con 15 µl de ácido trifluoroacético al 10% (TAF) para detener la reacción de intercambio de disulfuro reduciendo el pH por debajo de 2. Se llevó a cabo una cromatografía de alta resolución en fase inversa (HPLC) en un sistema Agilent 1100. Aproximadamente 100 µl de la muestra se inyectaron en una columna Agilent ZOBAX 300SB-C18 (2,1 x 100 mm, tamaño de poro 3,5 µm, tamaño de poro xxx A) y el cromatograma se reveló a 0,5 ml/min utilizando un gradiente de 16,2%-43,2% de acetonitrilo en presencia de TFA al 0,1%. Las áreas del pico se analizaron utilizando un *software* Agilent Chemstation.

25 La Figura 13 muestra los resultados del replegado oxidante, correspondiendo los símbolos clave a: (x) SH, (□) I1, (Δ) I2 y (●) SS. Para los dos polipéptidos, al comienzo de la oxidación la forma totalmente reducida (x) desapareció con rapidez. Después de 8 minutos, la disminución observada en el C<sub>H3</sub> reducido continuó muy lentamente. El producto intermedio I1 aumentó rápidamente en los primeros 8 minutos y disminuyó lentamente con el tiempo. La especie I2 también aumentó rápidamente en los primeros 8 minutos, pero no cambió de modo apreciable después de ese momento. Sin embargo, el pico I2 no es productivo, ya que los dos residuos de cisteína estaban unidos por disulfuro con glutatión, impidiendo la formación del disulfuro intramolecular entre los residuos de cisteína. La forma completamente oxidada aumentó de forma constante a lo largo del tiempo y las especies SH e I1 disminuyeron. Posteriormente, la forma SS se hizo más abundante. Treinta minutos después, el WT representaba ~45% de la forma SS, mientras que P38G representaba ~55% de la forma SS. Estas observaciones indican que el P38G también se pliega más rápidamente que el WT bajo condiciones oxidantes. La especie I1, que es un precursor directo de la forma SS, se acumuló de forma transitoria más en el WT (~35%) que en P38G (~30%). Sin embargo, la cinética de conversión de I1 a SS era más rápida en P38G que en WT, indicando de nuevo que la cinética de plegado de P38G es más rápida que la de WT.

30 En conclusión, los estudios arriba descritos demuestran que las estabildades de equilibrio de las formas reducidas tanto de WT como de P38G eran comparables, siendo la forma WT ligeramente más estable. Sin embargo, las estabildades determinadas en dichos estudios eran considerablemente más altas que las de la molécula C<sub>H3</sub> murina reducida. La forma P38G se desplegaba más rápidamente que la forma WT y la cinética de despliegado de las dos moléculas mostraba un comportamiento simple de dos estados. La cinética de plegado de las dos moléculas indicaba que el

5 plegado del monómero se puede acoplar para dimerización. La prolina en la posición 38 desempeña una función importante en el plegado de este polipéptido, como muestran los estudios de doble salto, aunque la isomerización de esta prolina no parece ser el principal paso limitador de la tasa de plegado. Los estudios de plegado realizados bajo condiciones oxidantes también indicaban que la formación de enlaces disulfuro y el plegado son más rápidos en el caso de la molécula P38G que en el caso de la molécula WT.

Aunque la invención ha sido descrita con referencia a las realizaciones descritas, los expertos en la técnica entenderán fácilmente que los ejemplos y estudios específicos arriba detallados sólo ilustran la invención.

En consecuencia, la invención solo está limitada por las siguientes reivindicaciones.

## REIVINDICACIONES

1. Polipéptido aislado que incluye un polipéptido de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina o un fragmento funcional de éste, que tiene al menos una sustitución de Pro por Gly y muestra una estabilidad aumentada en comparación con un dominio C<sub>H3</sub> no sustituido, comprendiendo dicha o dichas sustituciones de Pro por Gly un residuo Pro38 de C<sub>H3</sub>, comprendiendo dicho polipéptido aislado además una tasa de plegado aumentada en comparación con un dominio C<sub>H3</sub> no sustituido, y comprendiendo opcionalmente dicha tasa de plegado aumentada un aumento en un factor de 3 o más en comparación con un dominio C<sub>H3</sub> de tipo salvaje.
2. Péptido aislado según la reivindicación 1, caracterizado porque dicha tasa de plegado aumentada comprende un aumento en un factor de aproximadamente 6, aproximadamente 12 o aproximadamente 18 o más.
3. Inmunoglobulina aislada que incluye el polipéptido de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina o un fragmento funcional de éste según la reivindicación 1.
4. Polipéptido de unión aislado que incluye el polipéptido de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina o un fragmento funcional de éste según la reivindicación 1 fusionado con un dominio de unión diana.
5. Población aislada de polipéptidos, incluyendo dicha población una pluralidad de polipéptidos según la reivindicación 1 o la reivindicación 2.
6. Población aislada de polipéptidos según la reivindicación 5, incluyendo dicha población una pluralidad de polipéptidos según la reivindicación 1, y comprendiendo dicha pluralidad de polipéptidos de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina o fragmentos funcionales de los mismos más de aproximadamente un 92% de polipéptidos de dominio C<sub>H3</sub> correctamente plegados y opcionalmente más de aproximadamente un 94%, 96%, 98% o 99% de polipéptidos de dominio C<sub>H3</sub> correctamente plegados.
7. Población aislada de inmunoglobulinas que incluye la pluralidad de polipéptidos de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina o fragmentos funcionales de los mismos según la reivindicación 5, comprendiendo dicha población de la reivindicación 5 una pluralidad de polipéptidos según la reivindicación 1.
8. Población aislada de polipéptidos de unión que incluye la pluralidad de polipéptidos de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina o fragmentos funcionales de los mismos según la reivindicación 5, comprendiendo dicha población de la reivindicación 5 una pluralidad de polipéptidos según la reivindicación 1, fusionados con un dominio de unión diana.
9. Método para producir un polipéptido de unión dimérico, que incluye la combinación de un primer polipéptido que comprende un polipéptido de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina o un fragmento funcional del mismo, que tiene una sustitución de Pro por Gly en la posición 38 (P38G) del dominio C<sub>H3</sub> y un dominio de unión diana, con un segundo polipéptido que comprende un polipéptido de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina o un fragmento funcional del mismo y un dominio de unión diana, presentando dicho dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina que tiene una sustitución P38G una estabilidad aumentada en comparación con un dominio C<sub>H3</sub> no sustituido.
10. Método según la reivindicación 9, caracterizado porque dicho polipéptido de dominio C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina que tiene una sustitución P38G o fragmento funcional del mismo incluye además dos o más sustituciones de Pro por Gly; o porque dicho polipéptido de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina comprende además una tasa de plegado aumentada en comparación con un dominio C<sub>H3</sub> no sustituido, comprendiendo opcionalmente dicha tasa de plegado aumentada un incremento seleccionado entre incrementos en un factor de aproximadamente 3, un factor 6, aproximadamente un factor 12 y aproximadamente un factor 18 o más; o porque dicho polipéptido de dominio C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina que tiene una sustitución P38G incluye adicionalmente un complejo dimérico que tiene un segundo polipéptido de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina, comprendiendo opcionalmente dicho segundo polipéptido de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina un polipéptido de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina o fragmento funcional del mismo que tiene una sustitución de Pro por Gly en la posición 38 del dominio C<sub>H3</sub> y presenta una tasa de plegado aumentada en comparación con un dominio C<sub>H3</sub> no sustituido, y comprendiendo opcionalmente dicho polipéptido de dominio C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina que tiene una sustitución P38G una inmunoglobulina.
11. Cantidad eficaz de un polipéptido de unión que incluye un polipéptido de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina, o un fragmento funcional del mismo, para su utilización en el tratamiento de una afección patológica caracterizada por un crecimiento celular aberrante, teniendo dicho polipéptido de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina, o fragmento funcional del mismo una sustitución de Pro por Gly en la posición 38 del dominio C<sub>H3</sub> fusionada con un dominio de unión diana selectivo para una molécula diana expresada sobre la superficie de las células que intervienen en la afección patológica, y presentando dicho dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina que tiene una sustitución P38G una estabilidad aumentada en comparación con un dominio C<sub>H3</sub> no sustituido.
12. Cantidad eficaz de un polipéptido de unión según la reivindicación 11, caracterizada porque dicho polipéptido de dominio C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina que tiene una sustitución P38G o fragmento funcional del mismo comprende adicionalmente dos o más sustituciones de Pro por Gly.

- 5 **13.** Cantidad eficaz de un polipéptido de unión según la reivindicación 11, caracterizada porque dicho polipéptido de dominio C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina presenta además una tasa de plegado aumentada en comparación con un dominio C<sub>H3</sub> no sustituido, comprendiendo opcionalmente dicha tasa de plegado aumentada un incremento seleccionado de entre incrementos en un factor de aproximadamente 3, un factor 6, aproximadamente un factor 12 y aproximadamente un factor 18 o más.
- 10 **14.** Cantidad eficaz de un polipéptido de unión según la reivindicación 11, caracterizada porque dicho polipéptido de dominio C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina que tiene una sustitución P38G comprende adicionalmente un complejo dimérico que tiene un segundo polipéptido de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina; comprendiendo opcionalmente dicho segundo polipéptido de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina un polipéptido de dominio de región C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina o un fragmento funcional del mismo que tiene una sustitución de Pro por Gly en la posición 38 del dominio C<sub>H3</sub> y presenta una tasa de plegado aumentada en comparación con un dominio C<sub>H3</sub> no sustituido; y comprendiendo opcionalmente dicho polipéptido de dominio C<sub>H3</sub> de inmunoglobulina que tiene una sustitución P38G una inmunoglobulina.
- 15 **15.** Cantidad eficaz de un polipéptido de unión según la reivindicación 11, caracterizada porque dicha afección patológica comprende adicionalmente cáncer; o se selecciona de entre el grupo consistente en cáncer de próstata, mama, pulmón y piel; o comprende adicionalmente una enfermedad infecciosa; o comprende adicionalmente una enfermedad autoinmune.



(continuación)

```

Prim.cons.  ST2RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK2LPAPIEKTISK2KGGQPREPQVYITLPPSRBE
              250      260      270      280      290      300
IGHG2_HUMAN MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRW
IGHG4_HUMAN MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGDSFFLYSRLTVDKSRW
IGHG1_HUMAN LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGDSFFLYSKLTVDKSRW
IGHG3_HUMAN MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRW
:*****:*****:*****:*****:*****:*****
Prim.cons.  MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP2LDSGDSFFLYSKLTVDKSRW
              310      320      330
IGHG2_HUMAN QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
IGHG4_HUMAN QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
IGHG1_HUMAN QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
IGHG3_HUMAN QQGNIFSCSVMHEALHNRPTQKSLSLSPGK
*:**:*:*****:***** **
Prim.cons.  QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
    
```

Fig. 3

	10	20	30	40	50	60
IGHG1_HUMAN						
IGHE_HUMAN						
IGHA1_HUMAN						
IGHA2_HUMAN						
MUC_HUMAN						
IGHD_HUMAN						
Prim. cons.						
	70	80	90	100	110	120
IGHG1_HUMAN						
IGHE_HUMAN						
IGHA1_HUMAN						
IGHA2_HUMAN						
MUC_HUMAN						
IGHD_HUMAN						
Prim. cons.						
	130	140	150	160	170	180
IGHG1_HUMAN						
IGHE_HUMAN						
IGHA1_HUMAN						
IGHA2_HUMAN						
MUC_HUMAN						
IGHD_HUMAN						
Prim. cons.						
	190	200	210	220	230	240
IGHG1_HUMAN						
IGHE_HUMAN						
IGHA1_HUMAN						
IGHA2_HUMAN						
MUC_HUMAN						
IGHD_HUMAN						
Prim. cons.						

F(continuación)

	250	260	270	280	290	300
IGHG1_HUMAN						
IGHE_HUMAN	G	P	S	V	F	L
IGHA1_HUMAN	-----	P	A	E	D	L
IGHA2_HUMAN	-----	P	A	E	D	L
MUC_HUMAN	T	A	I	R	V	F
IGHD_HUMAN	---	V	Y	L	L	T
Prim.cons.	G	S	S	V	L	4

	310	320	330	340	350	360
IGHG1_HUMAN						
IGHE_HUMAN	R	N	G	T	L	T
IGHA1_HUMAN	L	C	G	C	Y	S
IGHA2_HUMAN	L	C	G	C	Y	S
MUC_HUMAN	P	N	A	T	F	S
IGHD_HUMAN	S	N	G	S	Q	S
Prim.cons.	L	N	G	T	Y	S

	370	380	390	400	410	420
IGHG1_HUMAN						
IGHE_HUMAN	R	E	L	T	K	-
IGHA1_HUMAN	S	E	E	L	A	L
IGHA2_HUMAN	S	E	E	L	A	L
MUC_HUMAN	R	E	Q	L	N	L
IGHD_HUMAN	D	P	P	E	A	A
Prim.cons.	2	E	E	L	A	L

	430	440	450	460	470
IGHG1_HUMAN					
IGHE_HUMAN	K	L	T	V	D
IGHA1_HUMAN	I	L	R	V	A
IGHA2_HUMAN	I	L	R	V	A
MUC_HUMAN	I	L	T	V	S
IGHD_HUMAN	V	L	R	V	P
Prim.cons.	I	L	R	V	A

**AFECCIONES PATOLÓGICAS CANCEROSAS**

**NEOPLASIAS HEMATOPOYÉTICAS**

Neoplasias linfoides	Linfoma angiocéntrico (linfoma cél.T/NK)
Neoplasias mieloides	Linfoma de células T intestinal
Histiocitosis	Leucemia/linfoma células T del adulto
Leucemia / linfoma linfoblástico (ALL) precursor B	Linfoma anaplásico de células grandes
Leucemia / linfoma linfoblástico (ALL) precursor T	<i>Enfermedades de Hodgkin (HD)</i>
Leucemia linfocítica crónica / linfoma linfocítico pequeño (SLL)	Leucemia mielógena aguda (AML)
Linfoma linfoplasmacítico	Síndromes mielodisplásicos
Linfoma de células del manto	Trastornos microproliferativos crónicos
Linfoma folicular	Leucemia mielógena crónica (CML)
Linfoma de zona marginal	Policitemia vera
Leucemia de células pilosas	Trombocitosis esencial
Plasmacitoma / mieloma plasmocítico	Mielofibrosis con metaplasia mieloide
Linfoma de células B grandes difuso	Hemangioma
Linfoma de Burkitt	Linfangioma
Leucemia linfocítica crónica de células B	Glomangioma
Leucemia linfocítica granular de células grandes	Sarcoma de Kaposi
Micosis fungoide y síndrome de Sézary	Hemangioendotelioma
Linfoma de células T periférico, no especificado	Angiosarcoma
Linfoma de células T angioinmunoblástico	Hemangiopericitoma

**CABEZA Y CUELLO**

Carcinoma de células basales	Condrosarcoma
Carcinoma de células escamosas	Melanoma
Ceruminoma	Neuroblastoma olfatorio
Osteoma	Plasmacitoma aislado
Paraganglioma no cromafínico	Papilomas invertidos
Neurinoma acústico	Carcinoma no diferenciado
Carcinoma quístico adenoide	Carcinoma mucoepidermoide
Carcinoma mucoepidermoide	Carcinoma de células acínicas
Tumores mixtos malignos	Tumor mixto maligno
Adenocarcinoma	Otros carcinomas
Linfoma	Ameloblastoma
Fibrosarcoma	Odontoma
Osteosarcoma	

**TIMO**

Timoma maligno	Carcinoma de células escamosas
Tipo I (timoma invasivo)	Linfoepitelioma
Tipo II (carcinoma tímico)	

**FIGURA 4**

**PULMÓN**

Carcinoma de células escamosas	Carcinoma de células en granos de avena
Adenocarcinoma	Células intermedias
Bronquial derivado	Carcinoma de células grandes
Acinar; papilar; sólido	No diferenciado; células gigantes; células claras
Bronquioalveolar	Mesotelioma maligno
Carcinoma de células pequeñas	Tipo sarcomatoide
	Tipo epitelial

**TRACTO GASTROINTESTINAL**

Carcinoma de células escamosas	Tumores de células del estroma gástrico
Adenocarcinoma	Linfoma
Carcinoide	Sarcoma de Kaposi
Melanoma maligno	Tumores de células del estroma intestinal
Adenocarcinoma	Carcinoides
Carcinoma gástrico	Mesotelioma maligno
Linfoma gástrico	Adenocarcinoma no productor de mucina

**HÍGADO Y TRACTO BILIAR**

Carcinoma hepatocelular	Carcinoma de la vesícula biliar
Colangiocarcinoma	Adenocarcinoma
Hepatoblastoma	Carcinoma de células escamosas
Angiosarcoma	Papilar poco diferenciado
Carcinoma fibrolamelar	

**PÁNCREAS**

Adenocarcinoma	Gastrinoma
Cistadenocarcinoma	Glucagonoma

**RIÑÓN**

Carcinoma de células renales	Nefroblastoma (tumor de Wilms)
------------------------------	--------------------------------

**TRACTO URINARIO INFERIOR**

Tumores uroteliales	Adenocarcinoma
Carcinoma de células escamosas	Carcinoma de células pequeñas

Carcinoma mixto

Sarcoma

**TRACTO GENITAL MASCULINO**

Carcinoma de células escamosas

Tumor de células de Sertoli

Carcinoma espermatoocítico

Linfoma

Carcinoma embrionario

Adenocarcinoma

Coriocarcinoma

Carcinoma prostático no diferenciado

Teratoma

Carcinoma transicional en conducto

Tumor de células de Leydig

**FIGURA 4 (CONTINUACIÓN)**

**TRACTO GENITAL FEMENINO**

Carcinoma de células escamosas

Carcinosarcoma

Carcinoma de células basales

Leiomiomasarcoma

Melanoma

Sarcoma del estroma endometrial

Fibrosarcoma

Cistadenocarcinoma seroso

Carcinoma intraepitelial

Cistadenocarcinoma mucinoso

Adenocarcinoma embrionario rabdomiosarcoma

Tumores endometrioides

Carcinoma de células grandes

Adenosarcoma

Carcin. neuroendocrino o de cél. en grano avena

Celioblastoma (tumor de Brenner)

Adenocarcinoma

Carcinoma de células claras

Carcinoma adenoescamoso

Carcinoma no clasificado

Carcinoma no diferenciado

Tumor de células de la teca-granulosa

Carcinoma

Tumor de células de Sertoli-Leydig

Adenoacantoma

Disgerminoma

Sarcoma

Teratoma

**MAMA**

Tumor filloide

Carcinoma

Sarcoma

Carcinoma in situ

Enfermedad de Paget

Carcinoma invasivo

**SISTEMA ENDOCRINO**

Adenoma

Adenoma

Carcinoma

Carcinoma

Meningioma

Feocromocitoma

Craneofarignoma

Neuroblastoma

Carcinoma papilar

Paraganglioma

Carcinoma folicular

Pineal

Carcinoma medular

Pineoblastoma

Carcinoma anaplásico

**PIEL**

Melanoma

Carcinoma de células escamosas

Carcinoma de células basales

Carcinoma de células de Merkel

Mieloma múltiple

Linfoma maligno

Condrosarcoma

Condrosarcoma mesenquimal

Osteosarcoma

Tumor de Ewing (sarcoma de Ewing)

Tumor de células gigantes maligno

Adamantinoma

Histiocitoma fibroso maligno

Fibroma desmoplásico

**SISTEMA NERVIOSO**

Schwannoma

Neurofibroma

Tumor maligno de envoltura del nervio periférico

Astrocitoma

Astrocitoma fibrilar

Glioblastoma multiforme

Glioma del tronco encefálico

Astrocitoma pilocítico

Xantastrocitoma pleomórfico

Oligodendroglioma

**OJO**

Carcinoma

Carcinoma de células escamosas

Carcinoma mucoepidermoide

**CORAZÓN**

Mixoma

Fibroma

Lipoma

Pineocitoma

Enfermedad de Paget extramamaria

Enfermedad de Paget del pezón

Sarcoma de Kaposi

Linfoma de células T cutáneo

Fibrosarcoma

Cordoma

Hemangioendotelioma

Hemangiopericitoma

Liposarcoma

Histiocitoma fibroso maligno

Rabdomiosarcoma

Leiomiosarcoma

Angiosarcoma

Ependimoma

Gangliocitoma

Neuroblastoma cerebral

Neurocitoma central

Tumor neuroepitelial disembrionárico

Meduloblastoma

Meningioma maligno

Linfoma cerebral primario

Tumor cerebral primario células germinales

Melanoma

Retinoblastoma

Glioma

Meningioma

Rasboidoma

Angiosarcoma

Otros sarcomas

Fibroelastoma papilar

**HISTIOCITOSIS**

Histiocitosis de células de Langerhans

**FIGURA 4 (CONTINUACIÓN)**

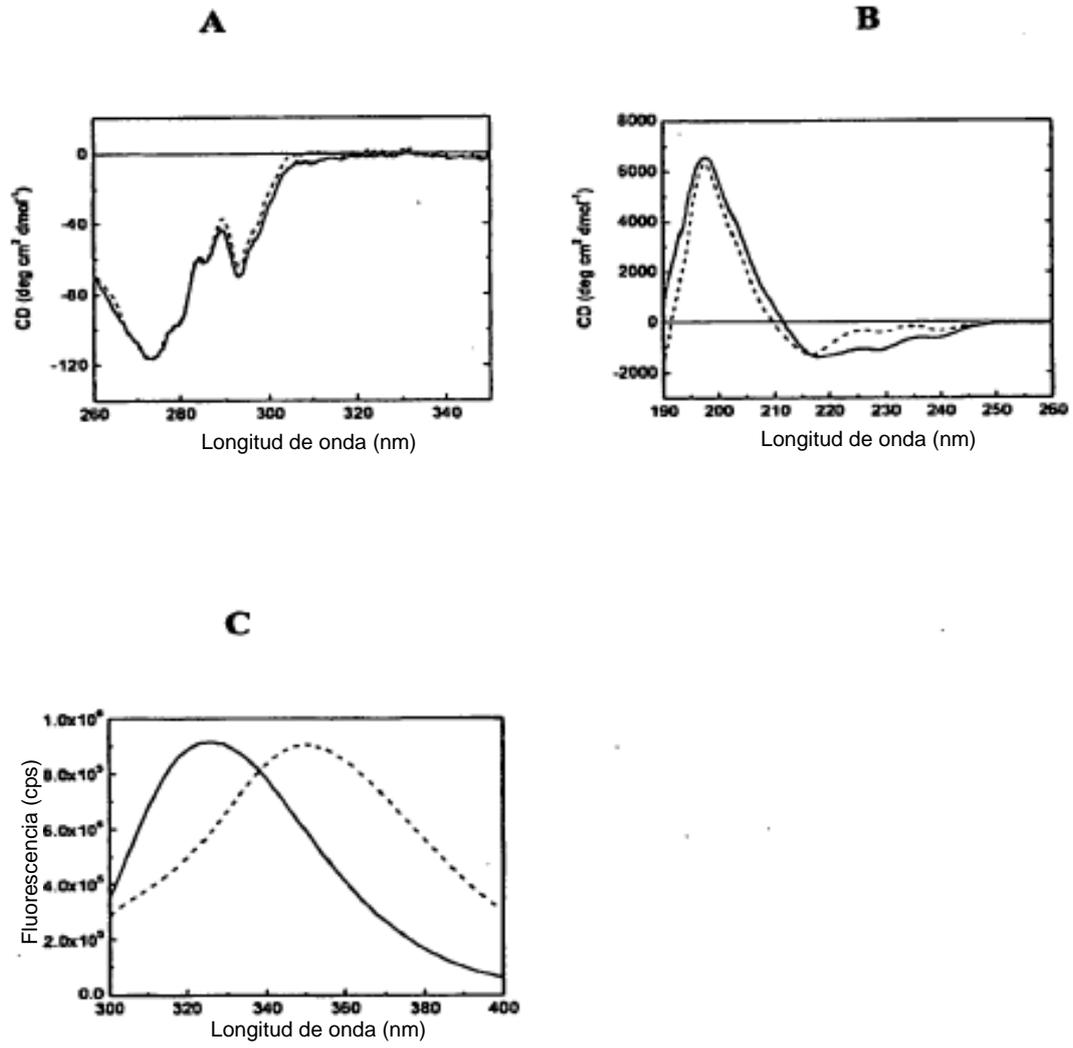


FIGURA 5

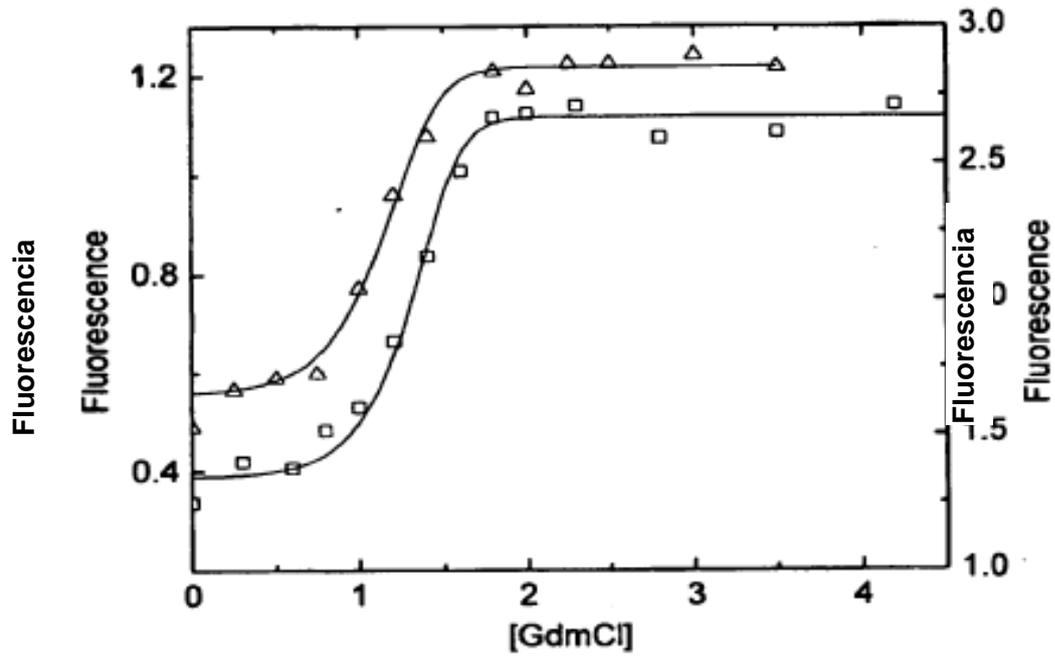
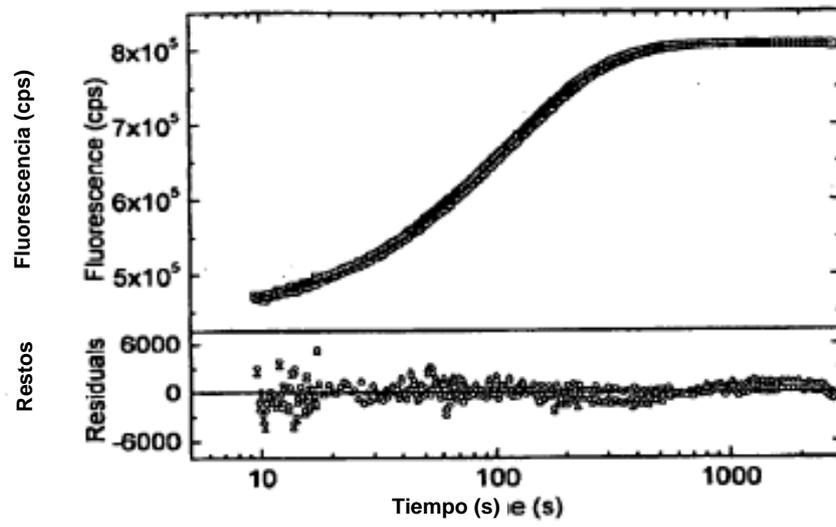


FIGURA 6

**A**



**B**

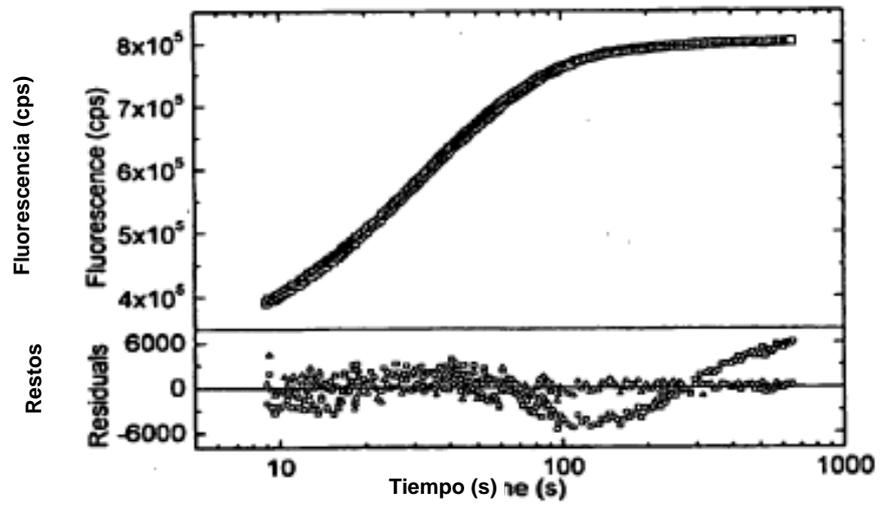


FIGURA 7

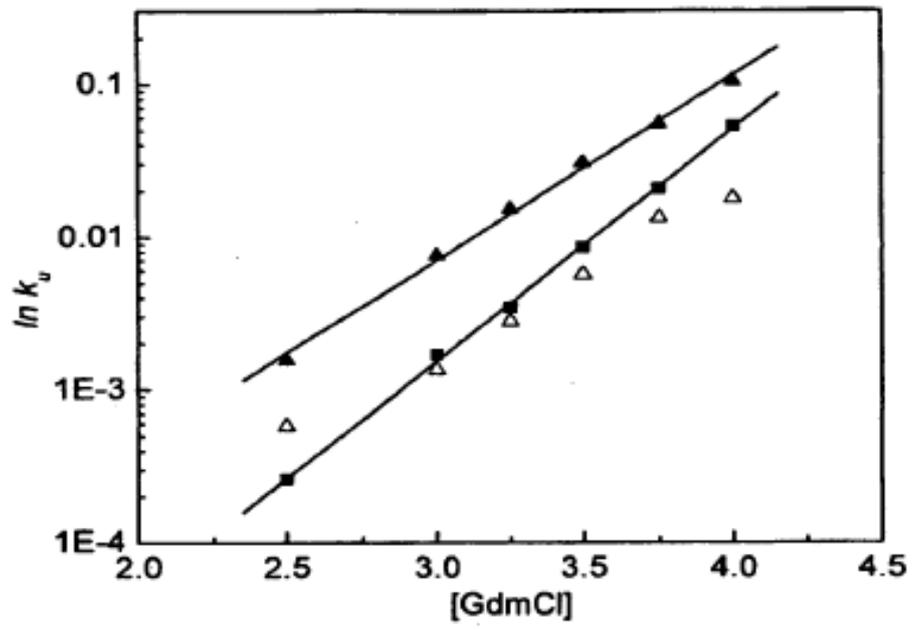
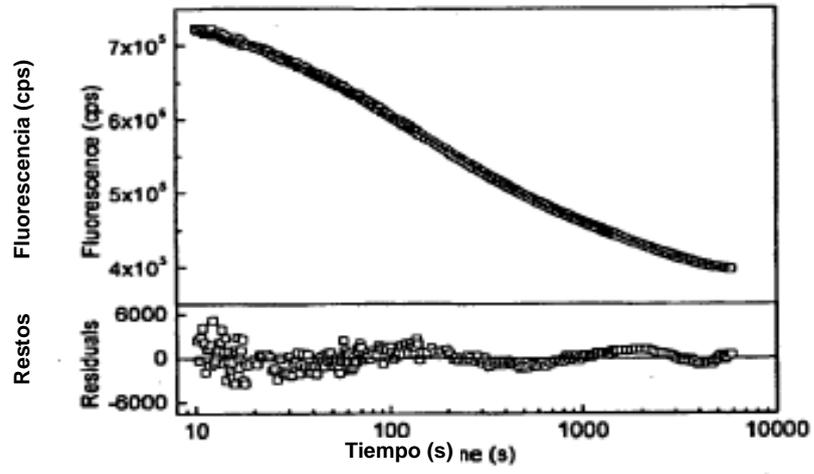


FIGURA 8

**A**



**B**

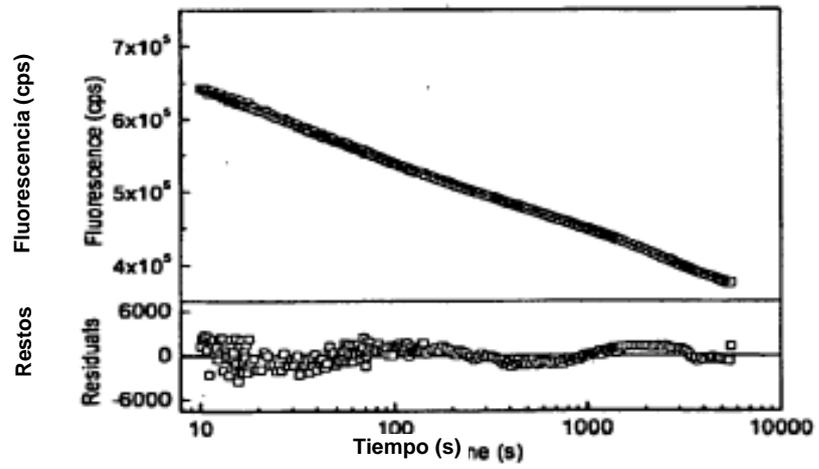


FIGURA 9

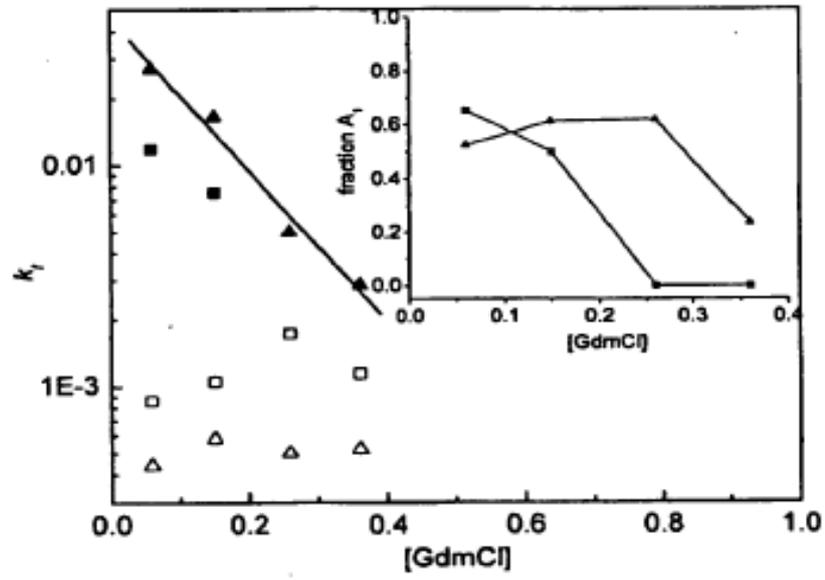
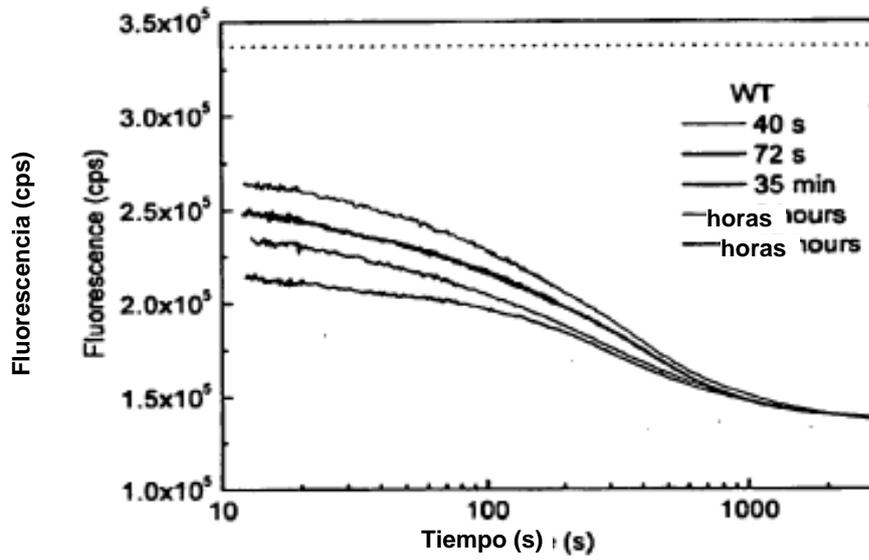


FIGURA 10

**A**



**B**

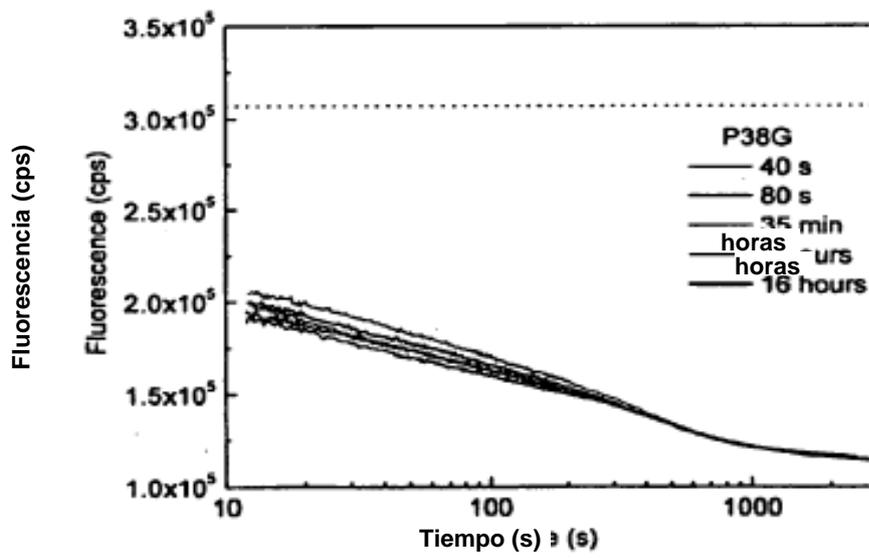


FIGURA 11

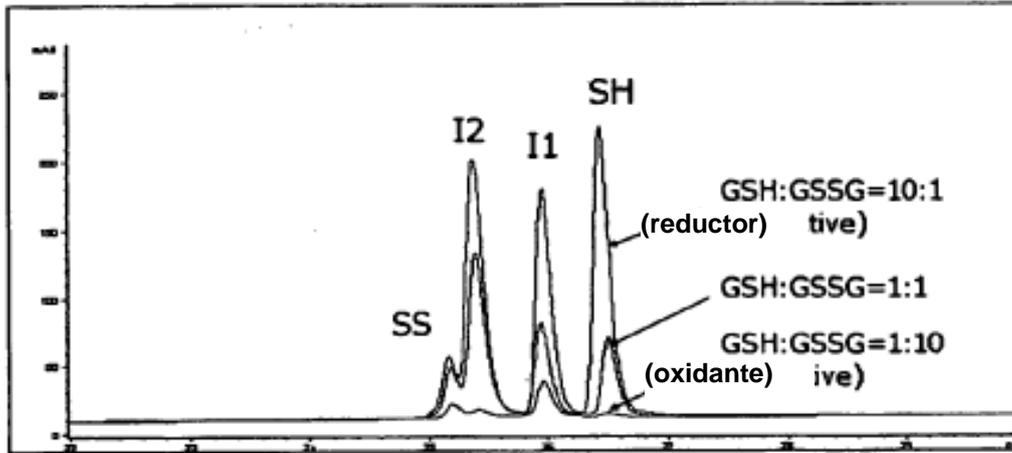


FIGURA 12

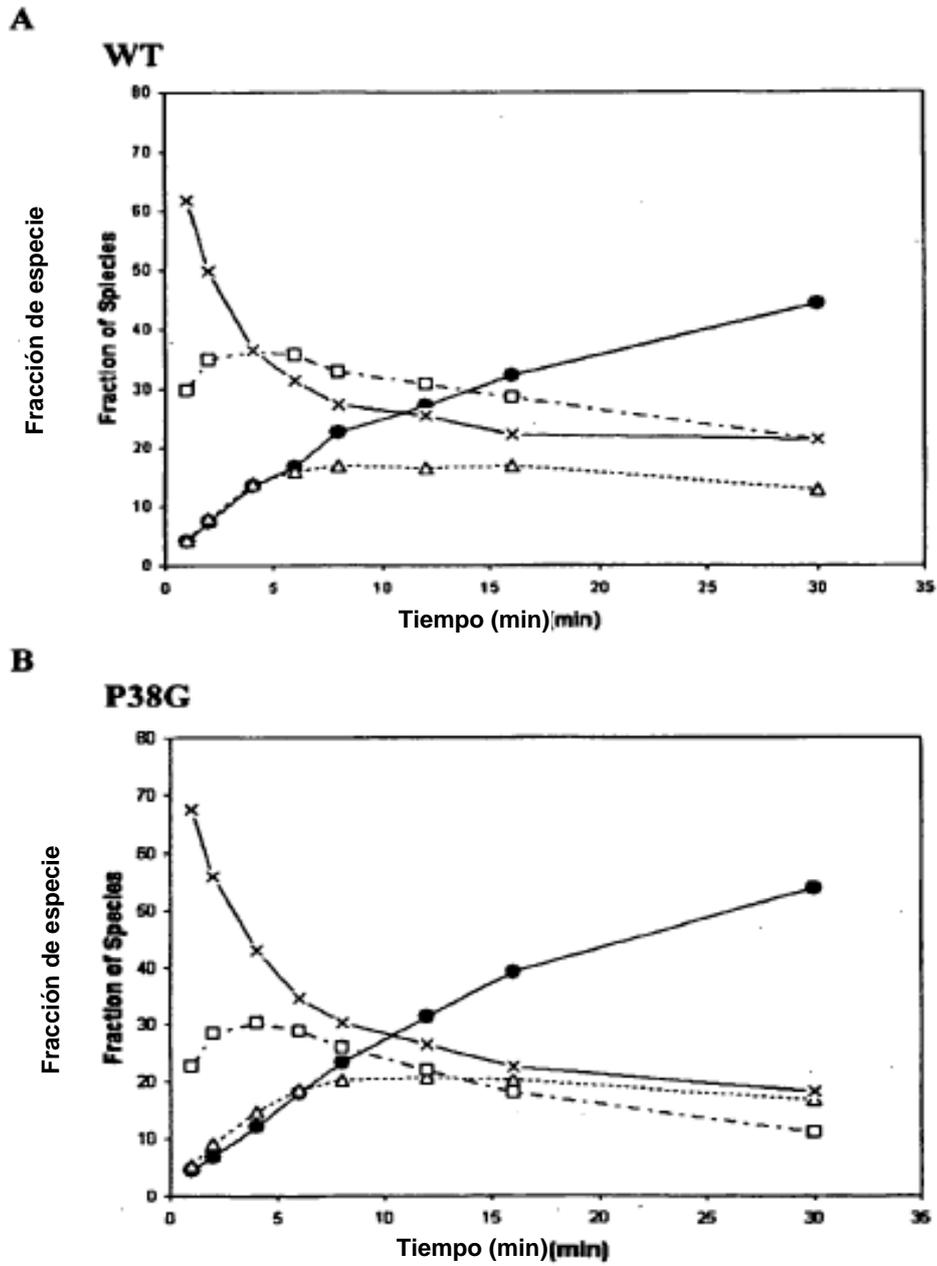


FIGURA 13