

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 733**

51 Int. Cl.:

C07K 16/30 (2006.01)

C07K 14/505 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02717581 .9**

96 Fecha de presentación: **07.03.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1366067**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.12.2003**

54

Título: **Tecnología de expresión para proteínas que contienen una fracción de anticuerpo de isotipo híbrido**

30

Prioridad:

07.03.2001 US 274096 P

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:

27.12.2012

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:

27.12.2012

73

Titular/es:

**MERCK PATENT GMBH (100.0%)
FRANKFURTER STRASSE 250
64293 DARMSTADT, DE**

72

Inventor/es:

**GILLIES, STEPHEN, D.;
WAY, JEFFREY y
LO, KIN-MING**

74

Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 393 733 T3

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

DESCRIPCIÓN

Tecnología de expresión para proteínas que contienen una fracción de anticuerpo de isotipo híbrido.

Área de la invención.

5 La presente invención hace referencia, en general, a métodos y composiciones para anticuerpos con fracciones que derivan de dos o más isotipos, y proteínas de fusión derivadas de los mismos, incluyendo proteínas que contienen una fracción de anticuerpo con funciones efectoras modificadas, expresión de proteínas aumentada y/o oligomerización disminuida. La presente invención hace referencia en particular a anticuerpos y proteínas de fusión en las que una región bisagra se deriva de un isotipo y el dominio CH2 se deriva de un isotipo diferente.

Antecedentes de la invención

10 La eficiencia de la expresión de proteínas a partir de células modificadas por ingeniería genética es una preocupación comercial importante. Algunas proteínas importantes en la industria se obtienen mejor a partir de células eucariotas, tales como células mamíferas, células vegetales, o células de levadura, para asegurar un plegamiento y glicosilación correctos. Sin embargo, el coste de mantener grandes cultivos de células eucariotas significa que las proteínas producidas de esta manera son costosas de fabricar. Por lo tanto, existe la necesidad en el arte de maximizar los niveles de expresión de proteínas a partir de células eucariotas.

15 Un tema relacionado con este hecho, es que las proteínas terapéuticas producidas a partir de células eucariotas deben ser expresadas en el estado conformacional correcto. Habitualmente, los mecanismos de transcripción y traducción aseguran que una célula modificada por ingeniería genética produzca una proteína cuya secuencia se determina mediante el ácido nucleico que codifica la proteína. Sin embargo, tras la transcripción y la traducción, la proteína puede fallar a la hora de plegarse de forma apropiada y puede degradarse. De forma alternativa, una proteína puede ser producida en un estado agregado, de tal manera que la actividad se reduce. Incluso si una proteína agregada se encuentra activa, puede ser farmacéuticamente inaceptable debido a su inmunogenicidad en comparación con una proteína no agregada. Por tanto, una preparación proteica farmacológicamente aceptable debería, por lo general, estar sustancialmente libre de proteínas agregadas.

20 La cantidad de una proteína que se expresa a partir de una célula eucariota modificada por ingeniería genética, es una función de la tasa de transcripción del gen codificador, la eficiencia del empalme de ARNm y de la exportación desde el núcleo, y la eficiencia de la traducción. El papel que juegan estos eventos en la expresión de proteínas se comprende lo suficientemente bien, de manera que una persona experta en el arte de la ingeniería genética y la expresión de proteínas puede incorporar, en general, secuencias de ácidos nucleicos apropiadas en el diseño de un constructo de expresión con transcripción, empalme, exportación de ARNm, y traducción eficientes.

25 Sin embargo, la cantidad de una proteína plegada de forma correcta, no agregada, que es producida a partir de una célula eucariota, es también una función de la secuencia de amino ácidos de la proteína, además de las secuencias de ácido nucleico que determinan la transcripción, traducción, y modificación post-trasduccional. Por ejemplo, se cree que una fracción significativa de proteínas sintetizadas en una célula se degrada. Las características en una proteína que determinan si la misma debe o no degradarse, se encuentran en la actualidad sujetas a un estudio intensivo, pero por el momento no es posible predecir la eficiencia del plegamiento, degradación, o agregación de proteínas simplemente mediante el examen de la secuencia de una proteína. Algunas proteínas de origen natural se pliegan de manera eficiente, son resistentes a la proteólisis, y no se agregan. Por el contrario, otras proteínas se pliegan de manera poco eficiente, se degradan rápidamente, y se agregan.

30 Los anticuerpos y las proteínas artificiales que contienen una porción de un anticuerpo, denominadas proteínas de fusión de anticuerpos o proteínas de fusión de Ig de aquí en adelante, son útiles para una variedad de propósitos relacionados con la capacidad de determinar dianas de los dominios variables de anticuerpos, además de con la habilidad de las regiones constantes para unirse a varias proteínas diferentes. Preparaciones de anticuerpos y de proteínas de fusión de anticuerpos, son particularmente útiles cuando se encuentran correctamente plegadas y no agregadas. Por lo tanto, existe una necesidad en el arte de métodos y composiciones para la producción de preparaciones de anticuerpos y de proteínas de fusión de anticuerpos con agregación reducida.

35 De manera adicional, los anticuerpos y las proteínas de fusión de anticuerpos resultan útiles debido a que su habilidad para unirse a varias proteínas diferentes les posibilita, por ejemplo, para suscitar funciones efectoras específicas. En algunos casos las funciones efectoras resultan deseables, pero a menudo se prefiere la pérdida de dichas funciones efectoras. El componente anticuerpo de una proteína de fusión puede ser modificado para reducir o eliminar las funciones efectoras mediante la utilización de un anticuerpo modificado. Las preparaciones de anticuerpos, y de proteínas de fusión de anticuerpos, resultan también útiles cuando se modifican para cambiar la funcionalidad. Por lo tanto, existe la necesidad en el arte de métodos y composiciones para la producción de anticuerpos modificados y proteínas de fusión de anticuerpos con funciones efectoras modificadas.

Los fármacos proteicos pueden ser degradados por proteasas, de tal manera que sus propiedades de administración y farmacocinéticas se encuentren por debajo de su nivel óptimo. Existe la necesidad en el arte de mejorar los fármacos proteicos que presentan las propiedades de utilidad de ciertas proteínas, pero que tienen mayor resistencia a la proteasa.

5 Resumen de la invención

La presente invención presenta métodos y composiciones útiles para la producción de anticuerpos intactos, inmunocitoquinas, inmunofusinas, inmunoligandos, y otros anticuerpos y proteínas de fusión Fc que aumentan la expresión, oligomerización apropiada, purificación, y resistencia a la proteasa de una proteína de fusión deseada, de manera opcional con funciones efectoras Fc modificadas, combinadas o disminuidas. De manera específica, la invención proporciona fracciones de anticuerpos con isotipos híbridos, que utilizan, de manera opcional, componentes de Ig mutante para su uso en anticuerpos intactos y en proteínas de fusión que contienen una fracción de anticuerpo.

Isotipos híbridos de IgG/IgG

En un conjunto de realizaciones preferentes, la invención proporciona proteínas de fusión con funciones efectoras disminuidas y ensamblaje mejorado. Tales proteínas de fusión son particularmente útiles cuando la fracción de Ig sirve para aumentar la expresión y mejorar la vida media en suero, pero cuando las funciones inmunológicas de la fracción de Ig no se necesitan.

En estas realizaciones, la proteína de fusión comprende, de manera preferente, dominios CH1, CH2, y/o CH3 de una IgG2 combinada con una región bisagra de IgG1. Las proteínas de fusión de esta realización facilitan la expresión de alto nivel y mejoran el correcto ensamblaje de anticuerpos intactos y proteínas de fusión de Ig que contienen regiones Fc.

En una realización más preferente, las proteínas de fusión también contienen una o más mutaciones en la fracción de Ig. Por ejemplo, la fracción de Ig es mutada para reducir aún más cualquier función efectora que quede que no sea deseable. Por ejemplo, el sitio de unión a C1q en el dominio CH2 de la IgG2 es mutante. Por ejemplo, la IgG4 normal no enlaza el complemento porque contiene una serina en lugar de la correspondiente prolina en la posición 331 en la IgG1 (nomenclatura de la UE) (Tao, MA et al (1993) J. Exp. Med. 178:661-667; Brekke, OH et al (1994) Eur. J. Immunol. 24:2542-2547); una mutación similar en la IgG2 reduce la unión a C1q. Otros residuos que se conoce están implicados en la unión a C1q podrían ser modificados, tales como los residuos en las posiciones 318, 320, 322 y 297 (Duncan AR (1988) Nature: 332:738-740), dando como resultado una disminución en la unión a C1q.

En otro grupo de modos de realización preferentes, se encuentra también presente una mutación en la región bisagra. Por ejemplo, en casos en los que una cadena liviana de un anticuerpo se encuentra presente también, resulta preferente una forma de una región bisagra de la IgG1 con los residuos de cisteína en su número habitual en sus posiciones habituales. Sin embargo, en casos en los que la cadena liviana de un anticuerpo no está presente como una cadena polipeptídica distintiva, resulta preferente una región bisagra de la IgG1 en la cual la primera cisteína es mutada a otro residuo. Por ejemplo, resulta de utilidad emplear dicha región bisagra mutada en proteínas Fc-X, y en anticuerpos de cadena única en los que la región variable de la cadena liviana se une a la cadena pesada mediante un conector polipeptídico. La primera cisteína en la región bisagra de la IgG1 es mutada, de manera preferente, a una serina en este contexto.

En una tercera clase de modos de realización que implican una región bisagra mutante, una forma mutante de la región bisagra de la IgG2, en la cual cada una de las primeras dos cisteínas son mutadas a otro aminoácido, se utiliza en un anticuerpo de isotipo híbrido o en una proteína de fusión Ig. Resulta también conveniente utilizar una región bisagra mutante de dichas características en un anticuerpo o proteína de fusión Ig que se derive completamente de la IgG2. Por ejemplo, una región bisagra modificada de la IgG2 con la secuencia ERKSSVECPPCP (SEQ ID NO: 1) se utiliza en el contexto de un anticuerpo o proteína de fusión Ig. Otro tipo útil de región bisagra es un híbrido entre la región bisagra de la IgG2 y la región bisagra de la IgG4, tal como la secuencia ESKYG-VECPPCP (SEQ m NO: 2), en la que los 5 aminoácidos que se encuentran antes del guiñón se derivan de la IgG4, y los aminoácidos restantes se derivan de la IgG2. Estas realizaciones resultan particularmente útiles en el contexto de anticuerpos y de proteínas de fusión expresadas y secretadas a partir de células eucariotas, ya que estas realizaciones de regiones bisagra promueven el correcto ensamblaje de las proteínas. Estas realizaciones pueden ser utilizadas como una alternativa a la región bisagra de la IgG1. Una característica clave de estas realizaciones de la región bisagra de un anticuerpo es que sólo poseen dos residuos de cisteína.

Aún otra clase de modos de realización implica mutaciones en la fracción Ig de las proteínas de fusión de Ig de isotipo híbrido, en la unión entre las fracciones Ig y no Ig. En una realización, las modificaciones en la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión se encuentran, de manera preferente, en la unión de la fracción Ig y la fracción no Ig, y se encuentran dentro de los 10 aminoácidos del punto de unión. De manera más preferente, los cambios de

aminoácidos implican el cambio de la lisina C-terminal de la fracción de anticuerpo a un aminoácido hidrofóbico tal como la alanina o leucina.

- 5 En una realización más preferente de una proteína de fusión Ig, diseñada para tener una vida en suero corta, funciones efectoras reducidas, y un ensamblaje eficiente, se utiliza una región de Ig híbrida en la cual la región bisagra se deriva de la IgG1, el dominio CH2 se deriva de la IgG2, y el dominio CH3 se deriva de la IgG3.

Fracciones no Ig preferentes

El tipo preferente de fracción no Ig en las proteínas de fusión de la invención, es una proteína o fracción que es, normalmente, extracelular cuando no forma parte de una proteína de fusión Ig. Por ejemplo, una hormona, citocina, quimiocina, enzima secretada, o parte extracelular de un receptor transmembrana.

- 10 En un modo de realización preferente, el componente no inmunoglobulina es una proteína tal como por ejemplo una proteína anti-obesidad. Por ejemplo, el componente no inmunoglobulina es leptina, CNTF, CLC/CLF-1 o una parte de Acrp30.

En aún otro modo de realización preferente, el componente no inmunoglobulina es una proteína tal como la eritropoyetina o EPO.

- 15 En un modo de realización alternativo, el componente no inmunoglobulina de la proteína de fusión es una hormona. Por ejemplo, el componente no inmunoglobulina puede ser insulina, hormona del crecimiento, o un péptido similar al glucagón 1 (GLP-1).

- 20 En otro modo de realización, el componente no inmunoglobulina de la proteína de fusión es una citocina. El término "citocina" se utiliza en la presente patente para describir proteínas naturales o recombinantes, análogos de las mismas, y fragmentos de las mismas que provocan una respuesta específica en una célula que tiene un receptor para esa citocina. De manera preferente, las citocinas son proteínas que pueden ser producidas y secretadas por una célula. De manera preferente, las citocinas incluyen interleucinas tales como interleucina-2 (IL-2), IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16 e IL-18, factores hematopoyéticos tales como el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, por sus siglas en inglés), factor estimulante de colonias de granulocitos o G-CSF y eritropoyetina, factores de necrosis tumoral (TNF, por sus siglas en inglés) tal como el TNF α , linfocinas tales como la linfotóxina, reguladores del proceso metabólico tales como la leptina, interferones tales como el interferón α , interferón β , e interferón γ , y quimiocinas. De manera preferente, la proteína de fusión Ig-citocina de la presente invención muestra actividad biológica de la citocina.

- 30 En un modo de realización preferente alternativo, el componente no inmunoglobulina de la proteína de fusión es una proteína de unión al ligando con actividad biológica. Tales proteínas de unión al ligando, por ejemplo, (1) bloquean las interacciones receptor-ligando en la superficie celular; o (2) neutralizan la actividad biológica de una molécula (p.ej., una citocina) en la fase fluida de la sangre, evitando, de ese modo, que alcance su diana celular. Proteínas de unión al ligando preferentes incluyen CD4, CTLA-4, receptores de TNF, o receptores de interleucinas tales como receptores de IL-1 y de IL-4. De manera preferente, la proteína de fusión anticuerpo-receptor de la presente invención muestra la actividad biológica de la proteína de unión al ligando. Una realización altamente preferente comprende el fragmento del dominio TNF-receptor extracelular utilizado en el fármaco proteico Enbrel, en el formato TNFR-bisagra-CH2-CH3 o bisagra-CH2-CH3-TNFR, en el cual los dominios CH2 y CH3 se derivan de la IgG2, y cada una de las dos regiones bisagra en la Fc dimérica tiene tres o menos cisteínas, e incluso de manera más preferente, dos o menos cisteínas.

- 40 Otro tipo de proteína de unión al ligando preferente tiene la capacidad de unirse a moléculas pequeñas en lugar de a proteínas. Por ejemplo, es conveniente fusionar avidina a una fracción Ig de isotipo híbrido, tal como un anticuerpo. La fusión avidina-anticuerpo de isotipo híbrido es entonces administrada a un mamífero tal como, por ejemplo, un ratón o un humano, y se concentra en un tejido diana del cuerpo, según se determina mediante la especificidad de una región V del anticuerpo. Después de que la proteína de fusión anticuerpo-avidina se haya eliminado suficientemente del cuerpo, se administra un conjugado de biotina y una molécula terapéutica. El conjugado de biotina se concentra en el tejido diana en virtud de la unión a la avidina, lo que da como resultado una disminución en los efectos secundarios que pudieran surgir de una concentración de la molécula terapéutica en tejidos no diana. Esta estrategia puede ser utilizada con otros pares de proteínas de unión al ligando/ ligandos.

- 50 Otro tipo de fracción no inmunoglobulina preferente es una enzima. Por ejemplo, una enzima con una especificidad distintiva puede fusionarse a una fracción Ig de isotipo híbrido, tal como un anticuerpo. La fusión enzima-anticuerpo de isotipo híbrido es entonces administrada a un mamífero, tal como por ejemplo un ratón o un humano, y se concentra en un tejido diana del cuerpo, según se determina mediante la especificidad de una región V del anticuerpo. En un método de tratamiento preferente de la invención, después de que la proteína de fusión enzima-anticuerpo se haya eliminado suficientemente del cuerpo, se administra un profármaco que puede ser dividido por la

enzima en una forma activa. El fármaco activado se concentra en el tejido diana, lo que da como resultado una disminución de los efectos secundarios que podrían surgir de una concentración de la molécula del fármaco activado en tejidos no diana. En una forma altamente preferente de esta realización, el fármaco activado es un fármaco contra el cáncer, tal como un agente citotóxico. En una realización alternativa altamente preferente, la propia enzima presenta actividad terapéutica. Por ejemplo, una RNasa tal como la Onconase, se acopla a una proteína de fusión de anticuerpo de isotipo híbrido, y se dirige a un tumor fijado como diana a través de una región V del anticuerpo.

Ácidos nucleicos

La presente invención también proporciona nuevas secuencias de ácidos nucleicos que facilitan la expresión y secreción de proteínas de fusión Ig y anticuerpos intactos con isotipos híbridos, además de métodos para la construcción de dichos ácidos nucleicos.

Una característica particularmente útil de las secuencias genómicas que codifican proteínas de anticuerpos es que las regiones región variable, CH1, región bisagra, CH2, CH3 se encuentran codificadas por exones diferentes. Esta característica facilita la ingeniería de proteínas de fusión de Ig de isotipo híbrido mediante "barajado de exones" (Zuckier et al., Cancer Research [1998] 58:3905-8; Poon et al., J. Biol. Chem. [1995] 270:8571-7; Jefferis R, et al., Mol Immunol. [1990] 27:1237-40; Chappel MS, Proc Natl Acad Sci USA. [1991] 88:9036-40; Senior BW, et al., Infect Immun. [2000] 68:463-9.).

Para las proteínas de fusión de Fc, las moléculas de ácido nucleico pueden codificar la proteína en varias configuraciones. En un grupo de realizaciones preferentes, una molécula de ácido nucleico codifica, de forma progresiva en dirección de 5' a 3', (i) una secuencia señal, la región Fc de una inmunoglobulina y la secuencia de una proteína diana, o (ii) una secuencia señal, una proteína diana, y la región Fc de una inmunoglobulina, o (iii) una secuencia señal, una primera proteína diana, la región Fc de una inmunoglobulina, y una segunda proteína diana. La molécula de ácido nucleico resultante codifica, de ese modo, una estructura Fc-X, o X-Fc-Y donde X e Y son una proteína o proteínas diana. Por ejemplo, X e Y pueden ser, en sí mismas, proteínas de fusión. De manera opcional, se encuentran conectores codificados entre estas fracciones.

De forma similar, de acuerdo a la invención, los ácidos nucleicos que codifican las proteínas de fusión de Ig del anticuerpo al completo están diseñados para codificar una secuencia señal en el N-terminal de cada fracción de la cadena pesada y cada fracción de la cadena liviana.

El ácido nucleico de la invención puede ser incorporado, en asociación funcional, a un vector de expresión que puede entonces ser introducido en una célula hospedadora eucariota competente para producir una proteína de fusión. Las proteínas de fusión de Ig resultantes son producidas de manera eficiente y secretadas a partir de células hospedadoras eucariotas. Las proteínas de fusión de Ig secretadas pueden ser recogidas del medio de cultivo sin lisis de la célula hospedadora eucariota. El producto proteico puede ser sometido a ensayo para su actividad, y/o purificado utilizando reactivos comunes según se desee, y/o dividirlo de su compañero de fusión, todo ello utilizando técnicas convencionales. De manera alternativa, un ácido nucleico de la invención puede ser introducido en una célula bacteriana, y la proteína de fusión de Ig resultante purificada de acuerdo a técnicas estándar.

La invención proporciona, además, métodos para aumentar los niveles de proteínas de fusión de anticuerpos y de Ig producidos en las células. El método se aplica, de manera preferente, a la producción en células eucariotas, de manera preferente células mamíferas. Por ejemplo, de acuerdo al método, la producción de una proteína de fusión de Ig o de un anticuerpo inicial, resulta mejorada cambiando las secuencias de ácido nucleico que codifican dominios de la fracción Ig por secuencias correspondientes que codifican dominios de otros isotipos de anticuerpos, o con secuencias mutantes, comparando niveles de expresión sometiendo a ensayo la producción de la proteína modificada tal como se describe en la presente patente, y eligiendo constructos de expresión en particular que ofrecen los niveles más altos. Este proceso puede ser utilizado de forma repetida. Resulta particularmente útil intercambiar regiones bisagra.

Tratamiento

La presente invención, además, describe métodos de tratamiento utilizando las proteínas de fusión de Ig y anticuerpos modificados. De este modo, la presente invención proporciona procesos que son a la vez eficientes y de bajo coste, además de proteínas que son menos inmunogénicas.

Lo que antecede y otros objetos, características y ventajas de la presente invención se volverán más evidentes a partir de la descripción detallada, dibujos, y reivindicaciones que siguen a continuación.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A-D son ilustraciones esquemáticas de isotipos híbridos de IgG utilizados para preparar las proteínas de fusión de acuerdo con ciertos aspectos de la presente invención; las líneas gruesas representan enlaces disulfuro que conectan los residuos de cisteína; los dominios de anticuerpos se encuentran indicados en la Figura A; los dominios de la IgG1 se muestran en negro, los dominios de la IgG2 se muestran en blanco, y los dominios de la cadena liviana y variable se muestran a rayas.

La Figura 1A muestra un isotipo de la IgG1.

La Figura 1B muestra un isotipo de la IgG2.

La Figura 1C muestra un híbrido de isotipos, con una región bisagra de IgG2 y de IgG1 que presenta una mutación de la primera cisteína.

10 La Figura 1D muestra un híbrido de IgG γ 1(CH1-H) γ 2(CH2-CH3).

Las Figuras 2A-C son ilustraciones esquemáticas de las proteínas de fusión de Ig que comprenden regiones Fc que contienen isotipos híbridos; "X" e "Y" pueden ser cualquier fracción no Ig.

15 La Figura 2A muestra una proteína de fusión de Ig en la configuración Fc-X que comprende una región bisagra de un isotipo de anticuerpo, y una fracción Fc que consiste en un dominio CH2 y CH3 de un segundo isotipo; en el C-terminal de la fracción Fc se encuentra una fracción de proteína "X".

La Figura 2C muestra una proteína de fusión de Ig en la configuración X-Fc-Y que comprende una región bisagra de un isotipo de anticuerpo, y una fracción Fc que consiste en un dominio CH2 y CH3 de un segundo isotipo; en el N-terminal de la fracción Fc se encuentra "X" que puede ser cualquier proteína, y en el C-terminal de la fracción Fc se encuentra una fracción de proteína "Y".

20 Las Figuras 3A-D son ilustraciones esquemáticas de proteínas de fusión de Ig que comprenden regiones variables y que contienen isotipos híbridos; "X" e "Y" pueden ser cualquier fracción no Ig.

La Figura 3A muestra una proteína de fusión de Ig que comprende una región bisagra de un isotipo de anticuerpo (negro) y regiones CH1, CH2, y CH3 de un isotipo diferente; una proteína no Ig "X" se fusiona en el C-terminal de la cadena pesada.

25 La Figura 3B muestra una proteína de fusión de Ig que comprende una región bisagra de un isotipo de anticuerpo (negro), y regiones CH1, CH2, y CH3 de un isotipo diferente; una proteína no Ig "X" se fusiona en el C-terminal de la cadena pesada; las flechas indican un subgrupo de posibles sitios de mutación en la fracción del anticuerpo, tal como se describe en la presente patente.

30 La Figura 3C muestra una proteína de fusión de Ig que comprende una región bisagra y una región CH1 de un isotipo de anticuerpo (negro), y las regiones CH2, y CH3 de un isotipo diferente; una proteína "X" no Ig se fusiona en el C-terminal de la cadena pesada; la estructura ramificada que surge de la región bisagra representa una fracción de glicosilación.

35 La Figura 3D muestra una proteína de fusión de Ig que comprende una región bisagra de un isotipo de anticuerpo (negro), y las regiones CH1, CH2, y CH3 de un isotipo diferente; una proteína no Ig "X" se fusiona en el C-terminal de la cadena pesada; una segunda proteína no Ig "Y" se fusiona en el N-terminal de la cadena liviana.

La Figura 3E muestra una proteína de fusión de Ig que comprende una región bisagra de un isotipo de anticuerpo (negro), y las regiones CH1, CH2, y CH3 de un isotipo diferente; una proteína no Ig "X" se fusiona en el C-terminal de la cadena pesada; una segunda proteína no Ig "Y" se fusiona en el N-terminal de la cadena pesada.

Definiciones

40 De acuerdo a la invención, por isotipos se entiende la clase de región (C) constante de la cadena pesada de una inmunoglobulina que determina la actividad funcional de un anticuerpo. Existen cinco clases fundamentales que incluyen IgA, IgG, IgM, IgD, e IgE.

Por IgA se entiende la clase de inmunoglobulina caracterizada por cadenas pesadas α .

Por IgD se entiende la clase de inmunoglobulina caracterizada por cadenas pesadas δ .

45 Por IgE se entiende la clase de inmunoglobulina caracterizada por cadenas pesadas ϵ .

Por IgM se entiende la clase de inmunoglobulina caracterizada por cadenas pesadas μ .

Por IgG se entiende la clase de inmunoglobulina caracterizada por cadenas pesadas γ .

"Gamma1" o " γ 1" hace referencia a una cadena pesada o parte de la misma derivada de una IgG1. De manera similar, "gamma2" o " γ 2" deriva de la IgG2, y así sucesivamente.

- 5 De acuerdo con la presente invención, por alotipo se entiende polimorfismos alélicos del mismo gen C de la cadena pesada de una inmunoglobulina. Estos determinantes se encuentran en algunos, pero no en todos, de los miembros de una especie.

De acuerdo con la invención, por idiotipo se entiende determinantes antigénicos que se encuentran en las regiones (V) variables de los anticuerpos y se deben a genes V_H y V_L reordenados en particular.

- 10 De acuerdo con la presente invención, por FcRn, también conocido como FcRp, se entiende el receptor de transporte intestinal neonatal que contiene beta-2 microglobulina, la cual regula la eliminación de la IgG y es importante para la vida media en circulación *in vivo* de los anticuerpos.

- De acuerdo con la presente invención, por Fc γ R se entiende receptores de la superficie celular, incluyendo Fc γ RI, RII, y RIII, que enlazan la porción Fc de las moléculas IgG y provocan funciones celulares efectoras. Los Fc γ R se expresan en fagocitos, linfocitos B, células NK y células dendríticas.
- 15

De acuerdo a la invención, por una "IgG1" o "IgG2", u otra molécula Ig se entiende un anticuerpo completo que incluye una cadena pesada y liviana, o una porción de las mismas.

- De acuerdo a la invención, por "un monómero bivalente" se entiende un anticuerpo, fusión de Fc, o fusión de anticuerpo que se dimeriza de manera habitual mediante la formación de enlaces disulfuro que se forman en un anticuerpo normal. La formación de tales enlaces disulfuro se infiere, por lo general, mediante la habilidad de una proteína que contiene una Fc para migrar en gel de SDS no reductor, desnaturizante como una banda única, con un peso molecular aparente de alrededor del doble del peso molecular aparente observado en condiciones de reducción. La presencia de un monómero bivalente se infiere, además, por la presencia de un pico en un cromatógrafo de exclusión por tamaños que corresponde al peso molecular correcto. Otros métodos de medición de proteínas pueden además ser utilizados para identificar la presencia de monómeros bivalentes.
- 20
- 25

- De acuerdo a la invención, por "una proteína de fusión Ig" se entiende una proteína de fusión que contiene parte de, o todo, un anticuerpo ligado a una segunda fracción que es, de manera preferente, parte de, o toda, una proteína (no Ig) no anticuerpo o no inmunoglobulina. Las inmunocitoquinas, proteínas Fc-X, proteínas X-Fc, y proteínas X-Fc-Y son todos ejemplos de proteínas de fusión de Ig. De igual modo, las proteínas de fusión en las que una fracción no Ig se sitúa entre dos fracciones Ig o dominios, constituyen un tipo de proteína de fusión de Ig.
- 30

- De acuerdo a la invención, por "ensamblaje" de una proteína se entiende el plegamiento apropiado de una proteína, y la oligomerización en un estado multimérico correcto. El ensamblaje puede ser monitorizado de muchas maneras que se encuentran establecidas en el arte. En la práctica, el correcto ensamblaje de una proteína, con respecto a los enlaces disulfuro, puede ser monitoreado de manera conveniente, mediante la comparación de la migración en un gel de SDS reductor y no reductor: si una especie de proteína dada forma múltiples bandas en un gel no reductor, pero forma una única banda en un gel de SDS reductor, puede inferirse que, a lo sumo, tan sólo una de las bandas en el gel de SDS no reductor es la especie ensamblada de manera correcta. De forma alternativa, la cromatografía de exclusión por tamaños puede ser utilizada para distinguir proteínas unitarias de oligómeros de orden superior, y agregados que se pueden formar a partir de enlaces disulfuro incorrectos o interacciones no covalentes.
- 35

- De acuerdo con la invención, por "dominio" de una fracción de anticuerpo se entiende un dominio estructural que corresponde a los segmentos de aminoácidos codificados por exones individuales en genes de anticuerpos en humanos. Por ejemplo, los dominios constantes de una IgG son los dominios CH1, región bisagra, CH2, y CH3. En algunos casos, la región bisagra y los dominios CH2 están codificados por el mismo exón. En tales casos, una unión entre la región bisagra y el dominio CH2 se define por el alineamiento con otras uniones región bisagra/CH2 (ver Paul, *op cit.*, p. 46-49).
- 40
- 45

- De acuerdo a la invención, por dominio, proteína, región, o molécula se entiende un dominio, proteína, región, o molécula completos, o una parte, mutante o forma modificada por ingeniería genética de la misma, o una forma principalmente derivada a partir de la misma. La parte, mutante, o forma modificada por ingeniería genética presenta, de manera preferente, propiedades funcionales características del dominio, proteína, región, o molécula completos. De acuerdo a la invención, por "que se deriva principalmente", se entiende que posee al menos un 95% de sus aminoácidos que se derivan a partir de una secuencia en particular de una proteína o dominio naturales. Por
- 50

ejemplo, una secuencia que principalmente derive del dominio CH2 de la IgG2 humana es, al menos, un 95% idéntico al dominio CH2 de la IgG2 humana en un alineamiento de aminoácidos.

De acuerdo a la invención, por "región bisagra de IgG1 modificada", se entiende una región bisagra de la IgG1 en la que una cisteína, preferentemente la primera cisteína, es mutada a otro aminoácido. Esta cisteína, habitualmente, forma un enlace disulfuro a la cadena liviana del anticuerpo. La región bisagra de la IgG1 modificada resulta particularmente útil en proteínas que o bien carecen de la cadena liviana, o que tienen otra cisteína que puede enlazarse a la cadena liviana.

De acuerdo a la invención, por "una molécula de eritropoyetina" se entiende una molécula que presenta, en general, la misma estructura y una secuencia de aminoácidos similar a la de la eritropoyetina de un vertebrado, incluyendo de manera opcional mutaciones. Por ejemplo, el Ejemplo 18 describe el uso de la eritropoyetina humana sin mutaciones, y de una versión de la eritropoyetina humana con cuatro mutaciones.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona métodos y composiciones para la mejora de la producción de proteínas de fusión de inmunoglobulina *in vivo* e *in vitro*. En particular, la presente invención proporciona métodos útiles para la mejora de las propiedades de expresión, agregación, y/o plegamiento de las proteínas de fusión de inmunoglobulina. La presente invención se basa, en parte, en la sorprendente observación de que una proteína de fusión de inmunoglobulina se expresa a un nivel superior, con menos problemas de agregación y/o plegamiento, cuando se utiliza una inmunoglobulina híbrida como compañero de fusión, en lugar de una inmunoglobulina de tipo silvestre. Las propiedades de producción mejoradas de la proteína de fusión, asociadas con las inmunoglobulinas híbridas, son algo inesperado, ya que se cree que las inmunoglobulinas de tipo silvestre tales como la IgG1 y la IgG2 son proteínas bien plegadas que se expresan de manera eficiente tanto *in vivo* como *in vitro*.

Por consiguiente, un aspecto de la presente invención incluye métodos y composiciones útiles para la expresión de proteínas de fusión de inmunoglobulinas que incluyen una fracción de inmunoglobulina híbrida (o Ig híbrida). Las inmunoglobulinas híbridas preferentes incluyen la región bisagra de una IgG1 y los dominios CH2 y CH3 de una IgG2.

Estructura del anticuerpo

Los anticuerpos son moléculas con forma de Y y están compuestos de dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas livianas (L). Cada cadena pesada está ligada a una cadena liviana mediante un enlace disulfuro y depende de interacciones covalentes y no covalentes para orientar, de forma adecuada, las dos cadenas, una en relación a la otra. Los dominios variables en los terminales amino de estas dos cadenas contienen el sitio de unión al antígeno, y, con los dominios CH1, definen el extremo Fab de la molécula.

Las cuatro cadenas utilizan enlace hidrofóbico entre las cadenas pesadas, y uno o más enlaces disulfuro entre cadenas para estabilizar el complejo. Por tanto, la inmunoglobulina completa es bivalente, con dos sitios de unión al antígeno idénticos. Ciertas inmunoglobulinas experimentan, de manera habitual, multimerización adicional, tal como la IgM y la IgA.

Cada cadena polipeptídica tiene de dos a cinco dominios; las cadenas livianas contienen dos dominios, mientras que las cadenas pesadas contienen cuatro o cinco. El único dominio amino terminal de cada cadena se denomina variable debido a la extensa variación de secuencias, mientras que los diferentes dominios carboxi-terminal se conocen como las regiones constantes. Las regiones de la cadena pesada se numeran CH1, región bisagra, CH2, CH3, CH4 y son responsables de muchas funciones de anticuerpo importantes, que incluyen la unión al receptor Fc (FcR) y la fijación de complemento.

Existen cinco clases muy importantes de isotipo de regiones C de la cadena pesada, clasificadas como IgA, IgG, IgD, IgE, IgM, cada una con funciones efectoras características (la IgG se divide en cuatro subclases γ de isotipos: $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$, $\gamma 4$). Las regiones constantes de la cadena liviana poseen únicamente un dominio C y pueden ser de uno de los dos tipos, C κ y C λ , que no presentan atributos funcionales distintivos conocidos (ver, W. E. Paul, ed., 1993, Fundamental Immunology, Raven Press, New York, N.Y).

Todas las inmunoglobulinas tienen una región bisagra situada C terminal con respecto al dominio CH1 de sus cadenas pesadas, que separa las regiones Fab y Fc de la molécula. En la mayoría de los casos, las regiones bisagra permiten un gran grado de flexibilidad entre los componentes de la molécula de interacción-efectores (Fc) y de unión al antígeno (extremo Fab), ligando de ese modo los dos elementos funcionales clave del anticuerpo. En los isotipos de IgG, los enlaces disulfuro entre cadenas se forman habitualmente en el interior de esta región bisagra, generando la molécula tetramérica final.

Excepto para el caso de la IgM, la región bisagra está dominada por prolinas, serinas y treoninas, aminoácidos que tienden a evitar la formación de estructuras secundarias, y que se cree que ofrecen flexibilidad a las regiones bisagra. El isotipo IgG1, a menudo utilizado para las proteínas de fusión, presenta dos enlaces disulfuro en la región bisagra que liga las cadenas pesadas entre sí. En contraste, el isotipo IgG2 tiene cuatro enlaces disulfuro (Figura 1). De acuerdo con la invención, estos enlaces disulfuro tienden a promover el ensamblaje incorrecto de anticuerpos y de proteínas de fusión de Ig, tal como se muestra en los inesperados resultados en los Ejemplos.

Configuraciones útiles de proteínas de fusión de Ig

Las inmunocitoquinas son tan sólo un ejemplo de una terapia de proteínas de fusión cuya diana es un tumor, para la cual métodos y composiciones de la invención resultan de utilidad. También se pueden utilizar otras moléculas tóxicas para el tumor, cuya diana sean tumores, mediante la fusión a anticuerpos específicos del tumor. Además, las proteínas de fusión de anticuerpos pueden atacar otros tipos de células enfermas, tales como las células infectadas por virus.

Métodos y composiciones de la presente invención son también útiles en combinación con el uso de la tecnología Fc-X. De acuerdo a la invención, el uso de isotipos de anticuerpos híbridos en una proteína de fusión mejora aún más la producción y captación de una proteína diana o polipéptido de interés que esté ligado a la porción Fc de una inmunoglobulina. Para las proteínas de fusión Fc-X, un péptido señal, seguido por el fragmento Fc de un gen de inmunoglobulina, es el compañero de fusión N-terminal a la proteína diana. La proteína de fusión se expresa entonces en una célula hospedadora, por ejemplo una célula mamífera tal como una célula que expresa de forma natural la inmunoglobulina. El fragmento péptido señal- Fc en el compañero de fusión N-terminal, dirige la proteína diana a través de la vía secretora, de tal manera que la proteína de fusión es secretada fácilmente. De forma adicional, el uso del fragmento Fc, que se encuentra habitualmente glicosilado y altamente cargado a un pH neutral, facilita la solubilización de más proteínas hidrofóbicas. Dirigir las proteínas de fusión Fc-X a través de la vía secretora mitiga además los problemas asociados con la toxicidad de la proteína en el interior de la célula, y facilita el aislamiento de líneas celulares estables. El producto de proteína de fusión es sometido a ensayo y purificado a medida que se recoge fácilmente de los medios de cultivo en su conformación nativa con retención de ambas actividades, tanto la biológica como la enzimática. La eficacia de esta tecnología ha sido demostrada con la Fc-leptina y la Fc-eritropoyetina. Algunas de estas ventajas son también inherentes en las proteínas X-Fc.

De acuerdo a la invención, ejemplos de fusiones útiles de fracciones de anticuerpo incluyen proteínas Fc-X, y X-Fc-Y. Tales proteínas contienen una región Fc con una proteína no anticuerpo o fragmento de proteína fusionado en el N-terminal, el C-terminal, o en ambos, el N-terminal y el C-terminal. Un efecto ventajoso de la fusión de la región Fc es que la vida media en suero del compañero de fusión puede extenderse de forma significativa. Un segundo efecto ventajoso es que una 'X' puede ser dimerizada de manera efectiva mediante su unión a la Fc. Por ejemplo, Enbrel es una proteína de fusión que consiste en una porción de un receptor TNF y una región Fc de una IgG1 humana.

De acuerdo a la invención, la utilidad de las proteínas de fusión basadas en anticuerpos recombinantes, aunque mejor que los tratamientos únicamente de proteínas o citocinas, puede estar limitada por su rápida eliminación *in vivo* de la circulación, ya que las proteínas de fusión de anticuerpos presentan una vida media en circulación significativamente menor que el anticuerpo libre. La vida media en circulación reducida es, probablemente, un resultado de la eliminación aumentada a través del receptor Fc (FcR). La conmutación del isotipo ha demostrado ser un mecanismo por el cual pueden modificarse características tales como la vida media. Se ha demostrado las mejoras en la vida media de dos inmunocitoquinas (Cancer Research 59(9):2159-66, 1999) cambiando el isotipo de la región C de la cadena pesada de la IgG γ 1 o IgG γ 3 humana a la IgG γ 4, un isotipo con unión al FcR reducida. Las inmunocitoquinas y las proteínas de fusión basadas en la IgG4 presentan una unión al FcR diez veces más reducida, y funciones efectoras del receptor Fc reducidas, tales como ADCC, pero aún muestran una eficacia similar o mejor en modelos de tumores en ratones que la de las proteínas de fusión basadas en la IgG γ 1 original. Sin embargo, la invención proporciona proteínas de fusión basadas en anticuerpos híbridos que combinan las propiedades estructurales y funcionales de diferentes tipos de anticuerpos en una única molécula.

Por consiguiente, para ciertas aplicaciones, el isotipo IgG2 confiere cualidades superiores a la proteína de fusión de anticuerpo, ya que el isotipo IgG2 presenta una unión al receptor Fc enormemente reducida (Hulett et al. [1994] Adv. Immunol.57:1127). Como ocurre con las proteínas de fusión de anticuerpos completos, resulta en ocasiones ventajoso utilizar un isotipo γ 2 en las proteínas de fusión que contienen solamente una región Fc. La fundamentación racional es la misma que para los anticuerpos completos: resulta deseable a menudo evitar la unión a los receptores Fc que esté mediada por regiones Fc derivadas a partir de otros isotipos.

Sin embargo, el uso del isotipo IgG2 en una proteína de fusión causa, en general, cierto nivel de ensamblaje inapropiado, tal como se describe en la presente patente. Los métodos y composiciones de la presente invención proporcionan proteínas de fusión de anticuerpos que poseen las funciones efectoras minimizadas del isotipo IgG2, pero que no poseen las propiedades de agregación de este isotipo.

De acuerdo a la invención, los anticuerpos de isotipo híbrido y proteínas de fusión nuevos muestran una expresión aumentada y un ensamblaje mejorado sobre el caso de las proteínas de fusión basadas en IgG2. De manera adicional, los anticuerpos de isotipo híbrido y las proteínas de fusión pueden haber aumentado su eficacia en terapéuticas en las que las funciones efectoras del receptor Fc no se deseen.

5 Tipos de regiones bisagra

Los anticuerpos de isotipo híbrido de la invención incluyen también anticuerpos en donde la región bisagra es una región bisagra mutante, de manera preferente una región bisagra con una cantidad reducida de residuos de cisteína, por ejemplo, una región bisagra de IgG1 modificada, en la que la primera cisteína es mutada a serina. La primera cisteína de la región bisagra de la IgG1 se enlaza, de manera habitual, a la cadena liviana. En una proteína Fc-X o cualquier otra proteína de fusión de anticuerpo que carezca de una cadena liviana, esta cisteína no cumple su función natural y por lo tanto puede ser mutada. Sin embargo, de acuerdo a la invención, un anticuerpo de isotipo híbrido con una región bisagra de IgG1, al que le falta la primera cisteína, y un dominio CH1 de IgG2 pueden asociarse con una cadena liviana, porque la cadena liviana, habitualmente, forma un enlace disulfuro con una cisteína dentro del dominio CH1 de la IgG2. Se cree que las cuatro cisteínas dentro de la región bisagra de la IgG2 forman enlaces disulfuro entre sí.

De acuerdo a la invención, las cisteínas en una región bisagra de un anticuerpo o una proteína de fusión de Ig que están implicadas en la homodimerización de cadena pesada- cadena pesada, puede tener efectos significativos sobre la expresión y ensamblaje de anticuerpos o proteínas de fusión de Ig. En particular, una cantidad de cisteínas más elevada puede conducir al incorrecto ensamblaje de un anticuerpo o una proteína de fusión de Ig, debido a la incorrecta formación de un enlace disulfuro. Por tanto, la invención revela que la mutación de una o más cisteínas implicadas en la homodimerización de la cadena pesada, puede causar una mejora en la la expresión o el ensamblaje de un anticuerpo o proteína de fusión de Ig. En un modo de realización preferente, una cisteína con homodimerización de cadena pesada puede ser mutada a, en orden de preferencia general, serina, alanina, treonina, prolina, ácido glutámico, glutamina, lisina, histidina, arginina, asparagina, ácido aspártico, glicina, metionina, valina, isoleucina, leucina, tirosina, fenilalanina, triptofano o selenocisteína.

Resulta particularmente conveniente utilizar una región bisagra de la IgG1 que se encuentra mutada en la cisteína primera, y N-terminal más extrema. La ventaja de esta región bisagra es que sólo tiene dos cisteínas. La primera cisteína en la región bisagra de la IgG1, habitualmente, forma un enlace disulfuro con la cisteína en la cadena liviana. Sin embargo, en las proteínas de fusión de Ig que carecen de una cadena liviana, tales como las proteínas Fc-X, y las X-Fc-Y, la cisteína N-terminal más extrema en la región bisagra de la IgG1 no cumple ningún propósito de ese tipo, y por lo tanto puede ser mutada (Lo et al. Protein Engineering 11:405-500 [1998]). Tal como se encuentra descrito en los Ejemplos, la región bisagra de la IgG1 de dos cisteínas puede, además, ser utilizada en un anticuerpo intacto o en una proteína de fusión de anticuerpo intacto en el que el dominio CH1 se deriva de la IgG2, ya que el dominio CH1 de la IgG2 tiene una cisteína que puede formar un disulfuro con la cadena liviana.

35 Receptores Fc

Las moléculas de IgG interactúan con múltiples clases de receptores celulares que incluyen tres clases de receptores Fc γ (Fc γ R) específicos para la clase IgG del anticuerpo, concretamente Fc γ RI, Fc γ RII, y Fc γ RIII. Estos receptores son responsables de la captación de los complejos antígeno- anticuerpo. El sitio de unión del receptor Fc en la Fc se encuentra en el dominio CH2, cerca de la región bisagra, y se cree que la unión de las regiones V a un antígeno ayuda a desplazar la región constante de la cadena liviana de la posición que bloquea estéricamente la región bisagra. De esta manera, los anticuerpos enlazados al antígeno, son enlazados, de manera preferente, por receptores Fc.

Un cuarto receptor, de manera alternativa denominado 'receptor de protección' (FcRp) o el 'receptor neonatal' (FcRn), es responsable del reciclaje de anticuerpos del endosoma, después de la endocitosis de los complejos anticuerpo- antígeno y su desagregación en el endosoma. El sitio de unión del FcRp se encuentra en la unión entre los dominios CH2 y CH3 en la estructura tridimensional del anticuerpo. La vida media en suero de los anticuerpos de la IgG depende de una interacción productiva con el FcRp. Otros tipos de anticuerpo, tales como IgM, IgD, IgE, e IgA no se unen al FcRp.

Otro tipo de compañero de unión de ciertos anticuerpos es C1q, que media en la fijación de complemento.

50 La interacción con los receptores Fc y FcRp también afecta a la actividad biológica y al metabolismo de las proteínas de fusión que contienen una fracción Fc.

Por ejemplo, las proteínas de fusión con una unión deficiente al FcR, poseen una vida media en suero mayor que las proteínas de fusión correspondientes con buena unión al FcR. Las proteínas de fusión con unión deficiente al FcRp presentan una vida media en suero menor que las proteínas de fusión correspondientes con buena unión al FcRp.

5 Por ejemplo, las proteínas de fusión de Ig que contienen los dominios CH2 y CH3 de la IgG2 presentan una vida media en suero mayor que las proteínas de fusión que contienen una IgG1. De igual manera, las proteínas de fusión que contienen una región Fc derivada a partir de la IgG3 presentan una vida media en suero menor que las proteínas de fusión correspondientes que contienen IgG1 o IgG2. Las proteínas de fusión que contienen los dominios CH2 y CH3 derivadas de IgM, IgD, IgE, e IgA presentan una vida media en suero menor que las correspondientes proteínas de fusión derivadas de la IgG.

10 Para ilustrar los usos de la invención, es conveniente agrupar los anticuerpos y las proteínas de fusión de Ig en dos clases generales: proteínas en las que las funciones efectoras inmunológicas se desean, y las proteínas en las que la fracción Ig sirve como un portador inerte inmunológicamente y carece de funciones efectoras. En la primera categoría de proteínas es conveniente construir proteínas con isotipos híbridos, en los que se crea un conjunto en particular de funciones efectoras. En la última categoría es conveniente construir proteínas con isotipos híbridos que implican regiones de ciertos isotipos con funciones efectoras mínimas, y regiones de otros isotipos que aumentan el ensamblaje de la proteína, según se describe a continuación.

Ensamblaje de anticuerpos y proteínas de fusión de Ig

15 La invención revela el descubrimiento de que la región bisagra de un anticuerpo, o de una proteína de fusión de Ig, juega un papel clave en el ensamblaje adecuado, y carece de la agregación de una proteína de fusión, tal como una proteína de fusión de Ig secretada de una célula mamífera. Por ejemplo, sin ánimo de estar sujetos a la teoría, se cree que el ensamblaje de un anticuerpo y una proteína de fusión de Ig implica un paso en el que las dos cadenas pesadas se asocian, en primer lugar, de manera no covalente mediante un parche hidrofóbico en el dominio CH3. Después de esta asociación, las regiones bisagra se alinean y se forman enlaces disulfuro entre cadenas. La región bisagra es de aproximadamente 50 Angstroms desde el parche hidrofóbico en el dominio CH3.

25 A la hora de diseñar un constructo de un anticuerpo o una proteína de fusión de Ig, resulta de utilidad variar la región bisagra. Por ejemplo, resulta útil reemplazar el ADN que codifica una región bisagra en un constructo de expresión dado, con ADN que codifica una región bisagra diferente, tal como la región bisagra de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA, IgD, IgE, o IgY.

30 De acuerdo a la teoría de la presente invención, por ejemplo, los anticuerpos y las proteínas de fusión de Ig que contienen regiones bisagra con una mayor cantidad de cisteínas no se ensamblan de manera tan eficiente como las proteínas correspondientes con menos cisteínas. Sin ánimo de estar sujetos a la teoría, las regiones bisagra con una cantidad mayor de cisteínas muestran una mayor posibilidad de mal alineamiento de las cisteínas, y una formación incorrecta de enlace disulfuro. Como resultado, se observa que los anticuerpos y las proteínas de fusión de Ig con regiones bisagra que contienen una mayor cantidad de cisteínas, se agregan en mayor medida y existen en múltiples especies electroforéticas, en comparación con los correspondientes anticuerpos y proteínas de fusión de Ig con regiones bisagra que contienen una menor cantidad de cisteínas. Las ilustraciones de este fenómeno se muestran en los Ejemplos.

35 Por ejemplo, los anticuerpos y las proteínas de fusión de Ig que contienen una región bisagra que contiene cuatro cisteínas, se ensamblan de manera menos eficiente que los anticuerpos y las proteínas de fusión que contienen tres o dos cisteínas. Por ejemplo, las proteínas que contienen una región bisagra derivada de una IgG2, se ensamblan de manera menos eficiente que las correspondientes proteínas que contienen una región bisagra derivada de una IgG1. En un ejemplo distinto, las proteínas que contienen una región bisagra derivada de IgG3 se ensamblan de forma deficiente; la región bisagra de IgG3 contiene 11 cisteínas.

45 La utilidad de la invención se encuentra particularmente ilustrada en situaciones en las que se desea una mínima unión al receptor Fc. Por ejemplo, en el contexto de las proteínas de fusión, es conveniente utilizar las regiones CH2 y CH3 de IgG2, ya que la unión al FcR se reduce profundamente, de manera que ADCC se reduce y la vida media en suero se aumenta. Sin embargo, el uso de la región bisagra de la IgG2 causa que el anticuerpo resultante o la fusión de Ig, esté deficientemente ensamblado. Resulta particularmente conveniente utilizar una región CH2 y CH3 de la IgG2 en combinación con una región bisagra de la IgG1, tal como se ilustra en varios ejemplos a continuación.

50 Un descubrimiento paralelo, ilustrado en varios Ejemplos, es que la elección de una región bisagra u otros dominios puede afectar a los niveles de producción de un anticuerpo o una fusión de Ig. Este descubrimiento es de una gran importancia económica, ya que los fármacos proteicos tales como los anticuerpos intactos, necesitan a menudo ser dosificados en grandes cantidades, tales como varios cientos de miligramos por paciente por dosis. Se observa, en general, que la elección de una región bisagra con una mínima cantidad de cisteínas, como por ejemplo tres o cuatro, mejora la producción de un anticuerpo o proteína de fusión de Ig a partir de un sistema de expresión eucariota. La disminución de la cantidad de cisteínas puede lograrse mediante mutación o sustituyendo la región bisagra de un isotipo por otra, o de ambas formas.

55 Aumento de la resistencia a la proteasa

La región bisagra es particularmente sensible a las proteasas. En experimentos clásicos, los anticuerpos fueron divididos en regiones Fab y regiones Fc mediante el corte de la proteasa en la región bisagra.

Es conveniente construir anticuerpos y proteínas de fusión de Ig con una región bisagra de la IgA y otros componentes de otros isotipos de anticuerpos. Por ejemplo, si un anticuerpo o proteína de fusión de Ig va a ser administrada por vía oral, o a través de otra superficie de mucosa, tal como la mucosa nasal, pulmonar, vaginal, o rectal, resulta útil tener una proteína que sea particularmente resistente a la proteasa para proteger el anticuerpo o la proteína de fusión de Ig de las proteasas que se encuentran presentes. Por ejemplo, es de utilidad construir un anticuerpo o proteína de fusión de Ig que contenga una región bisagra de IgA, y los dominios CH2 y CH3 de una IgG, de manera que esta proteína de isotipo híbrido tenga las características de la resistencia a la proteasa y una vida media en suero alargada una vez que la proteína entre en la circulación. La región bisagra de la IgA1 es una región bisagra preferente, ya que los sitios de glicosilación en la región bisagra de IgA1 confieren resistencia a un amplio espectro de proteasas. En contraste, la región bisagra de IgA2 es menor y es resistente a las proteasas bacterianas que dividen específicamente la región bisagra de IgA1.

Otras cadenas pesadas de isotipos contienen además sitios de glicosilación que contribuyen a la resistencia a la proteasa. Por ejemplo, la IgA, IgD, IgE, y la IgM contienen sitios de glicosilación en los dominios constantes que contribuyen a la resistencia a la proteasa. Por ejemplo, el dominio CH1 de la IgE contiene tres sitios de glicosilación N-ligados. Resulta de utilidad combinar el dominio CH1 de la IgE con, por ejemplo, una región bisagra de la IgA y con los dominios CH2 y CH3 de una IgG.

Resulta también de utilidad incorporar sitios de glicosilación de un isotipo a la región CH2 o CH3 de otro isotipo. En tales casos, no resulta suficiente, en general, construir anticuerpos o proteínas de fusión de Ig en los que se encuentren dominios enteros, definidos por regiones codificadas por exones individuales, y por tanto resulta de utilidad construir dominios híbridos. Por ejemplo, resulta útil combinar las características de la unión al FcRp propias de los isotipos de IgG, y las características de resistencia a la proteasa de otros isotipos. Para lograr una combinación de características de ese tipo, es necesario construir dominios individuales con secuencias de aminoácidos de dos isotipos diferentes. Los dominios híbridos resultantes se utilizan entonces para construir fusiones de Ig con fracciones no Ig.

Por ejemplo, es conveniente sustituir una extensión de aminoácidos del dominio CH2 de la IgE que incluye la secuencia VNLTW (SEQ ID NO: 3), por los correspondientes aminoácidos en un dominio CH2 de la IgG. Por ejemplo, en la IgG1 estos aminoácidos son VKFNW (SEQ ID NO: 4) y en la IgG3 estos aminoácidos son VQFKW (SEQ ID NO: 5). De acuerdo a la invención, los correspondientes aminoácidos en otros dominios CH2 pueden determinarse por alineamiento estructural o basado en ordenador de los dominios CH2 de otros isotipos, o a partir de la literatura publicada (Paul, *WE Fundamental Immunology*, Cuarta Edición, capítulo 3, p. 46-47).

De igual modo, resulta también de utilidad incorporar otros sitios de glicosilación en la IgG. Por ejemplo, los segmentos de secuencias que incluyen las secuencias NTSGF (SEQ ID NO: 6) o LNASR (SEQ ID NO: 7) de la IgD se utilizan para reemplazar las secuencias correspondientes de una región Fc derivada de la IgG en un anticuerpo o proteína de fusión. De acuerdo a la invención, otros sitios de glicosilación útiles dentro de las regiones constantes de anticuerpos se revelan en Paul (*Fundamental Immunology*, Cuarta Edición, capítulo 3) y referencias en la misma.

En algunos modos de realización de la invención, la incorporación de un sitio de glicosilación no IgG reduce la interacción con el FcRp. En tales casos, existe una compensación entre la mejora en la resistencia a la proteasa y la disminución en la vida media en suero, y la utilidad de una proteína de isotipo híbrido de ese tipo debe ser evaluada en el contexto de una aplicación en particular.

De acuerdo a la invención, la resistencia a la proteasa de un anticuerpo de isotipo híbrido en particular o de una proteína de fusión de Ig es sometida a ensayo de acuerdo a procedimientos estándar. Las proteasas pueden ser adquiridas a partir de proveedores comerciales, y se incuban en presencia de un anticuerpo de isotipo híbrido en particular, o proteína de fusión de Ig, de acuerdo con las especificaciones del fabricante. La proteólisis se mide, por ejemplo, mediante electroforesis en gel de SDS y cuantificación del material de partida y productos de corte.

De acuerdo con la invención, la habilidad de un anticuerpo de isotipo híbrido o proteína de fusión de Ig, para interactuar con el FcRp se mide también de acuerdo a procedimientos estándar. Por ejemplo, las propiedades farmacocinéticas de un anticuerpo o una proteína de fusión de Ig, se miden en un mamífero tal como un ratón, rata, conejo, perro, primate no humano, o humano. Las propiedades farmacocinéticas de un anticuerpo o una proteína de fusión de Ig, son una indicación práctica de la unión al FcRp, y en general, el propósito de incorporar la característica de unión al FcRp en un anticuerpo o proteína de fusión de Ig es mejorar las propiedades farmacocinéticas de un anticuerpo. Resulta también conveniente examinar la estructura tridimensional del complejo FcRp-Fc para determinar si es probable que un anticuerpo de isotipo híbrido, o una proteína de fusión en particular, interactúe con el FcRp (Martin, W. L., et al.: *Crystal Structure at 2.8Å of an FcRn/Heterodimeric Fc Complex: Mechanism of pH-Dependent Binding*. *Mol. Cell* 7 pp. 867 [2001]; estructura ID IIIA en <http://www.rcsb.org/pdb/>).

De acuerdo con este aspecto de la invención, es particularmente útil construir proteínas de la forma Fc-X, en donde la región Fc contiene una región bisagra de IgA1, una región CH2 y CH3 que contienen aquellos elementos de la IgG2 que median en la unión al FcRp, y aquellos elementos de CH2 que tienen funciones efectoras reducidas en comparación con otras IgGs.

- 5 Construcción de plásmidos de expresión que expresan anticuerpos y proteínas de fusión de Ig con isotipos híbridos.

La invención además proporciona ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos y las proteínas de fusión de la invención. La invención se lleva a la práctica de manera óptima cuando los ácidos nucleicos de codificación también codifican un casete de secreción que, cuando se transcribe y se traduce, da lugar a un péptido señal. El péptido señal se divide, por lo general, del producto maduro. La proteína de fusión secretada puede recogerse de los medios de cultivo sin necesidad de la lisis de la célula hospedadora, y puede ser sometida a ensayo para su actividad o purificada, utilizando reactivos habituales según se desee. En algunos casos, la presencia de ciertos compañeros de fusión, tales como la citocina CNTF, permite la secreción de una proteína de fusión de Ig sin un casete de secreción.

Una persona experta en el arte puede realizar construcciones de ADN recombinante de ese tipo utilizando ADN con intrones, ya que los intrones naturales separan el ADN que codifica la región bisagra del ADN que codifica los dominios CH1 y CH2. Los sitios de restricción en los intrones pueden utilizarse. De manera alternativa, debido a que las regiones bisagra tienen una longitud, en general, de tan solo, aproximadamente, 15 a 70 aminoácidos, es posible construir ADNs sintéticos que codifican una región bisagra completa, por ejemplo con síntesis de oligonucleótidos, PCR, o una combinación de las mismas. La región de codificación de la región bisagra sintética puede entonces situarse en un plásmido de expresión que codifica una proteína de fusión de Ig, que utiliza técnicas de ADN recombinante estándar.

La invención es ilustrada en más detalle mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Construcción de un plásmido que expresa una proteína de fusión Fc-X con una región bisagra y regiones CH2 de diferentes isotipos de anticuerpos.

- 25 La construcción de un plásmido que expresa HuFcyl-Leptina ha sido descrito en la publicación PCT WO00/040615A2.

Un plásmido que expresa una fusión de una Fc derivada de IgG2 y un compañero de fusión C-terminal se construyó tal como sigue a continuación.

En primer lugar, se obtuvo la secuencia genómica de la $\gamma 2$ humana. El ADN genómico que codifica la Fc $\gamma 2$ humana se obtuvo mediante PCR (reacción de la polimerasa en cadena) en el ADN celular aislado de las PBMC (Células mononucleares de sangre periférica). El cebador directo tenía la secuencia 5' CC TTA AGC GAG CGC AAA TGT TGT GTC GAG (SEQ ID NO: 8), donde un sitio de restricción AflIII C TTA AG se introdujo justo aguas arriba (upstream) de la región de codificación de la región bisagra de $\gamma 2$ GAG CGC AAA TGT TGT GTC GAG (SEQ ID NO:9). El cebador inverso tenía la secuencia 5' CCTCGAG TCA TTT ACC CGG GGA CAG GGA G (SEQ ID NO: 10), donde un sitio de restricción XhoI CTCGAG se introdujo inmediatamente después del codón de terminación de la traducción (anticodón TCA). Además, el cebador inverso también introdujo un SmaI CC CGG mediante mutación silenciosa (Sustitución de A por G subrayada). El fragmento 910 bp PCR fue clonado en el vector de clonación TOPO TA (Invitrogen, Carlsbad, CA) para la verificación de secuencias.

En segundo lugar, la Fc de $\gamma 2$ humana fue situada en un vector de expresión. El sitio de restricción SmaI natural en la secuencia de ADN CTG CCC CCA TCC CGG GAG GAG ATG ACC AAG (SEQ ID NO: 11) que codifica la región CH3 superior fue eliminada mediante mutación silenciosa introducida por una técnica PCR de superposición (Daugherty, B.L. et al., Nucleic Acids Res. 19:2471-6, 1991). El cebador directo tenía la secuencia 5' CTG CCC CCA TCA CGG GAG GAG ATG ACC AAG (SEQ ID NO: 12), donde la sustitución de C a A está subrayada; y el cebador inverso tenía la secuencia 5' GGT CAT CTC CTC CCG TGATGG GGG CAG GGT GTA C (SEQ ID NO: 13), donde la sustitución de G con T está subrayada. Después de la verificación de la secuencia, el fragmento de restricción AflIII-XhoI que codifica la Fc de la $\gamma 2$ contenía un sitio SmaI único aguas arriba del codón de terminación de traducción, y un sitio XhoI aguas abajo (downstream) del codón de terminación. El fragmento AflIII-SmaI que codifica la Fc $\gamma 2$ fue entonces utilizado para reemplazar el fragmento de restricción correspondiente que codifica la Fc $\gamma 1$ en pdCs-hu Fcyl-Leptina (publicación PCT WO00/040615A2) para obtener pdCs-huFc $\gamma 2$ -Leptina.

- 50 En tercer lugar, el ADN que codifica la región bisagra de la Fc $\gamma 2$ fue reemplazado por la región bisagra modificada de $\gamma 1$. La región bisagra de $\gamma 2$ contiene cuatro enlaces disulfuro de cisteínas. Se muestra a continuación el fragmento AflIII-StuI que contiene el exón de la región bisagra de $\gamma 2$. El sitio AflIII (C TTA AG) está precedido por la

5 secuencia de ADN que codifica un péptido señal. El ácido glutámico (E) es el primer residuo de aminoácidos de la región bisagra de $\gamma 2$. Las letras en minúscula representan la secuencia del intrón que sigue al de la región bisagra $\gamma 2$. El sitio de restricción *Stul* (*aggcct*) se encuentra C-metilado en la mayoría de las cepas de *E. coli* mediante la metilasa Dcm a causa de la C-metilación en la secuencia ccagg y la cadena inversa cctgg; cuando se encuentra metilado, este sitio no puede ser cortado mediante *Stul*.

E R K C C V E C P P C P (SEQ ID NO: 14)

C TTA AGC GAG CGC AAA TGT TGT GTC GAG TGC CCA CCG TGC CCA G
gtaagccagcccaggcct (SEQ ID NO: 15)

10 El fragmento AfIII que contiene el exón de la región bisagra de $\gamma 2$ en pdCs-huFc $\gamma 2$ -Leptina fue reemplazado por el correspondiente fragmento AfIII-*Stul* que contiene el exón de la región bisagra de $\gamma 1$ de pdCs-huFc $\gamma 1$ -Leptina, que se muestra a continuación:

E P K S S D K T H T C P P C P (SEQ ID NO: 16)

C TTA AGC GAG CCC AAA TCT TCT GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA G
Gtaagccagcccaggcct (SEQ ID NO: 17)

15 La secuencia de la región bisagra $\gamma 1$ en pdCs-huFc $\gamma 1$ contiene una mutación de Cys a Ser (subrayada) que elimina el residuo Cys que forma un enlace disulfuro con la cadena liviana en la IgG1 (Lo et al., (1998) Protein Engineering 11:495-500). Debido a que los sitios *Stul*, tanto en los exones de $\gamma 1$ como en los de $\gamma 2$, están C-metilados, y a que la endonucleasa de restricción *Stul* es sensible a la metilación, ambos plásmidos fueron aislados de una cepa de bacterias negativa en DCM antes de la digestión con la enzima *Stul*. El resultante pdCs-huFc $\gamma 2$ -Leptina con la región bisagra de pdCs-huFc $\gamma 1$ fue designado pdCs-huFc $\gamma 2h$ -Leptina ($\gamma 2h$: $\gamma 2$ con región bisagra modificada).

20 **Ejemplo 2: Caracterización del estado de oligomerización de la inmunofusión de huFc $\gamma 2$ -leptina y huFc $\gamma 2h$ -leptina.**

Se evaluó la expresión de proteínas a partir de célula NS/0 utilizando el vector de expresión pdCs-huFc-huLeptina con los isotipos $\gamma 1$, $\gamma 2$ y $\gamma 2h$. Se evaluó el estado físico de diferentes formas de huFc-huLeptina en las que la fracción huFc se derivaba de los isotipos $\gamma 1$, $\gamma 2$ y $\gamma 2h$.

25 Los constructos de ADN generados tal como se ha descrito con anterioridad, y según se describe en Lo et al., fueron transfectados en células NS/0, y se generaron líneas celulares de expresión estables, de acuerdo a procedimientos estándar.

30 En este y los siguientes Ejemplos, se generaron transfectantes tal como sigue a continuación. Los ADN plasmídicos se introdujeron en las células NS/0 de mieloma de ratón mediante electroporación. Las células NS/0 se cultivaron en un medio Eagle modificado por Dulbecco complementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, 2 mM de glutamina y penicilina/ estreptomycin. Aproximadamente 5×10^6 células se lavaron una con PBS y fueron resuspendidas en 0.5 ml de PBS. A continuación, se incubaron 10 μ g de ADN plasmídico linearizado con las células en una Cubeta Gene Pulser (con una separación de las puntas del electrodo de 0.4 cm, de BioRad), en hielo durante 10 minutos. La electroporación se llevó a cabo utilizando un Gene Pulser (BioRad, Hercules, CA), con ajustes a 0.25 V y 500 μ F. Se permitió que las células se recuperaran durante 10 minutos en hielo, tras lo cual fueron resuspendidas en un medio de cultivo, y colocadas entonces en dos placas de 96 pocillos. Los clones transfectados de manera estable se seleccionaron por su crecimiento en presencia de 100 nM de metotrexato (MTX), el cual fue introducido dos días después de la transfección. Las células se alimentaron cada 3 días de dos a tres veces más, y los clones estables resistentes al MTX aparecieron en un periodo de 2 a 3 semanas. Los sobrenadantes de clones fueron sometidos a ensayo mediante ELISA anti-Fc para identificar los de alta producción. Los clones de alta producción se aislaron y propagaron en un medio de cultivo que contenía 100 nM de MTX.

45 La concentración de huFc-huLeptinas en el sobrenadante se determinó mediante ELISA anti-huFc, utilizando un anticuerpo anti-huFc (anti-hulgG, Fc $\gamma 1$ o Fc $\gamma 2$ de cabra, conjugado con peroxidasa de rábano de Jackson Immuno Research). Se detectaron niveles de expresión relativamente bajos en los sobrenadantes de los constructos de $\gamma 2$, mientras que los constructos de $\gamma 1$ y $\gamma 2h$ dieron altos niveles de expresión tanto en transfecciones estables como en transitorias. En transfecciones transitorias con vectores de expresión equivalentes que codifican huFc $\gamma 2$ -huLeptina y huFc $\gamma 2h$ -huLeptina, se produjo huFc $\gamma 2h$ -huLeptina en niveles 8 veces más elevados.

Para su purificación, las proteínas de fusión en sobrenadantes de cultivo celular fueron enlazadas a Proteína A-Sefarosa, seguido de elución en un tampón de fosfato de sodio (100 mM NaH₂PO₄, pH 3, y 150 mM NaCl). El eluato fue neutralizado, a continuación, con 0.1 de volumen de 2 M Tris-clorhidrato, a un pH 8, y evaluado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés) y Cromatografía de líquidos de alta resolución HPLC (por sus siglas en inglés) – y Cromatografía de exclusión por tamaños (SEC, por sus siglas en inglés).

Las proteínas de fusión fueron examinadas mediante SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras. Las bandas de proteínas, visualizadas mediante tinción con azul Coomassie, mostraron que huFcγ1-huLeptina presentaba un PM (peso molecular) de 96 kD, lo que indica un monómero bivalente. El análisis mediante gel SDS-PAGE mostró que gran parte de la proteína de fusión huFcγ2-huLeptina se encontraba en una forma de peso molecular superior, migrando como una escalera de bandas con pesos moleculares aparentes mucho más elevados que la Fc-Leptina. En contraste, huFcγ2h-huLeptina era principalmente una especie única, migrando a 96 kD.

El análisis de cromatografía por exclusión de tamaños (SEC) del constructo huFcγ2h se puso en correlación con los resultados del análisis con SDS-PAGE, y mostraron que tanto huFcγ2h-Leptina como huFcγ1-leptina son monoméricos en un 83% aproximadamente, mientras que en comparación la proteína de fusión huFcγ2-huLeptina era monomérica en aproximadamente un 55%.

Los estudios con células J774 fijas, que son ricas en la clase FcγR de receptores, mostraron que sólo la proteína huFcγ1-huLeptina muestra unión a Fc. Además, se utilizaron células BAF-3 transfectadas para expresar el receptor de la leptina, de manera que su proliferación pudiera ser estimulada mediante la leptina (Gainsford, T., et al. PNAS [1996] 93:14564-14568). Los estudios con células receptoras BAF3/leptina mostraron que huFcγ1-huLeptina, huFcγ2-huLeptina y huFcγ2h-huLeptina eran equivalentes en la bioactividad de la leptina.

Fueron también identificados clones estables de células mamíferas que expresan huFcγ2-huLeptina y huFcγ2h-huLeptina. Las transfecciones celulares se llevaron a cabo bajo condiciones esencialmente idénticas y un número idéntico de células transfectadas de manera estable fueron clonadas y puestas a prueba para la producción de huFcγ2-huLeptina y huFcγ2h-huLeptina. Los mejores clones de expresión de huFcγ2h-huLeptina realizaron aproximadamente 5 veces más huFc-huLeptina que los mejores clones de expresión de huFcγ2-huLeptina.

Ejemplo 3: Construcción de un plásmido que expresa una proteína de fusión X-Fc con una región bisagra y una región CH2 a partir de diferentes isotipos de anticuerpos.

La secuencia de ADN sintético (SEQ ID NO: 18) que codifica residuos aminoácidos del 7 al 37 (SEQ ID NO: 19) del péptido similar al glucagón 1(GLP-1), se revela a continuación.

H A E G T F T S D V S S Y L E G
C TTA AGC CAT GCT GAA GGG ACC TTT ACT AGT GAT GTA AGT TCT TAT TTG GAA GGC

Q A A K E F I A W L V K G R G
CAA GCT GCC AAG GAA TTC ATT GCT TGG CTG GTG AAA GGC CGA GGA GGA TCC TTA

AGC

El ADN que codifica el péptido GLP-1 estaba precedido por *C TTA AGC*, donde el sitio de restricción AflII fue utilizado para unir este fragmento de ADN que codifica la secuencia señal (Lo et al. Protein Engineering). En el extremo 3', al ADN que codifica GLP-1 le seguía un sitio de restricción BamHI (*GCA TCC*, que codifica los residuos aminoácidos G y S), y un sitio de restricción AflII, que se utilizó para el ligamiento al fragmento de restricción AflII-XhoI que codifica la Fc γ 2 (o Fc γ 2h) con codón de terminación de traducción (ver Ejemplo 1).

Ejemplo 4: Caracterización del estado de oligomerización de inmunofusiones GLP1-huFc γ2 y GLP1-huFc γ2h.

Los vectores resultantes del Ejemplo 3, pdCs GLP-1 huFcγ1, pdCs GLP-1 huFcγ2, y pdCs GLP-1 huFcγ2h, fueron utilizados para transfectar células mamíferas de manera estable y transitoria para la expresión de GLP-1 (7-37) huFc γ1, GLP-1 (7-37) huFc γ2 y GLP-1 (7-37) huFc γ2h.

5 La evaluación del estado de agregación y la expresión de proteína total para cada proteína de fusión GLP-1 huFc, fue realizado mediante análisis con SDS-PAGE y HPLC-SEC después de la purificación mediante Proteína A Sefarosa, utilizando los métodos generales descritos en el Ejemplo 2. Las bandas de proteína se visualizaron mediante tinción con azul Coomassie. GLP-1 huFc γ 2 y GLP-1 huFc γ 2h tenían un peso molecular (PM) aparente de aproximadamente 60 kD, por análisis con SDS-PAGE. La concentración de variantes de GLP-1 huFc en el sobrenadante se determinó mediante ELISA anti-huFc. En transfecciones transitorias con vectores de expresión equivalentes que codifican GLP1-huFc γ 2 y GLP1-huFc γ 2h, el GLP1-huFc γ 2h fue producido en niveles aproximadamente 1.5 veces más elevados.

10 El análisis del total de las células lisadas mediante SDS-PAGE mostró que, aproximadamente la mitad de la proteína de fusión GLP1-huFc γ 2, presentaba enlaces disulfuro incorrectos, tal como se ha ilustrado por la presencia de varias formas de peso molecular elevado migrando con un peso aparente de 100 a 200 kD. En contraste, básicamente todas las proteínas de fusión detectables de GLP1-huFc γ 2h migraron con un peso molecular aparente de aproximadamente 60 kD. Cuando las muestras fueron reducidas antes del SDS-PAGE, las proteínas GLP1-huFc γ 2 y GLP1-huFc γ 2h transcurrían con un peso molecular aparente, básicamente idéntico, de aproximadamente 34 kD.

15 El análisis comparativo mediante HPLC-SEC de las proteínas de fusión de γ 1, γ 2 y γ 2h, demostró que la proteína de fusión de γ 2h resultó significativamente más monomérica que otras proteínas de fusión. La proteína de fusión GLP1-huFc γ 2h, tal como se ilustra mediante un único pico, fue en un 84% un monómero bivalente, mientras que tanto la proteína de fusión GLP1-huFc γ 1 como la GLP1-huFc γ 2 tenían múltiples picos correspondientes a aproximadamente un monómero bivalente en un 42 y un 33%, respectivamente.

20 De ese modo, la proteína de fusión GLP-1-Fc que lleva la región bisagra de IgG1 y los dominios CH2 y CH3 de la IgG2, mostró, de manera sorprendente, mejores propiedades de ensamblaje que las proteínas de fusión GLP-1-Fc en las que la región Fc al completo se derivó bien de IgG1 o de IgG2.

Ejemplo 5: Construcción de un anticuerpo intacto específico para células enfermas que contiene dominios CH1, CH2 y CH3 de IgG2 y una región bisagra de IgG1.

25 El ADN genómico que codifica las regiones constantes de la inmunoglobulina γ 2 (CH1, región bisagra, CH2 y CH3) fue obtenido mediante PCR, utilizando ADN celular aislado de células PBMC humanas. El cebador directo tenía la secuencia 5' CA AGCTTTCTGGGCGCAGC (SEQ ID NO: 20), donde un sitio de restricción HindIII A AGCTT fue introducido en la secuencia del intrón aproximadamente 200 bp aguas arriba del exón CH1. El cebador inverso tiene la secuencia 5' CCTCGAG TCA TTT ACC CGG GGA CAG GGA G (SEQ ID NO: 21), donde un sitio de restricción XhoI CTCGAG fue introducido inmediatamente después del codón de terminación de traducción (anti-codón TCA), y se creó un SmaI CC CGGG mediante mutación silenciosa, como ya se ha descrito en el Ejemplo 1. El sitio de restricción natural SmaI en la secuencia de ADN que codifica la región CH3 superior, fue también eliminado mediante una mutación silenciosa introducida por superposición de PCR, tal como se ha descrito en el Ejemplo 1. Una persona experta en el arte, también reconocería que mediante tomar ventaja de los fragmentos de restricción que codifican el Fc γ 2 obtenido en el Ejemplo 1, un fragmento de restricción HindIII-XhoI de ~ 1810 (bp) pares de base que codifica las regiones CH1, región bisagra, CH2 y CH3 y que contienen un sitio de restricción SmaI único podría construirse fácilmente. Después de la verificación de secuencias, el fragmento HindIII-XhoI que codifica las regiones constantes de γ 2 fue utilizado para reemplazar el fragmento HindIII-XhoI que codifica las regiones constantes de IL2 de γ 1 en pdHL7-huKS γ 1-IL2 para dar un anticuerpo pdHL7-huKS γ 2.

40 El vector de expresión para el anticuerpo huKS γ 2h se construyó tal como sigue a continuación. El plásmido pdCs-huFc γ 2h-Leptina fue utilizado como una plantilla de PCR para crear un fragmento de restricción de ~ 130 bp PstI-PvuII que codifica, únicamente, la región bisagra de γ 1 con modificación de cisteína a serina. El cebador directo tenía la secuencia 5' CTGCAGAGCCCAAATCTTC (SEQ ID NO: 22), que restauró el sitio de restricción (CTGCAG) PstI al principio del exón de la región bisagra de γ 1 (con la mutación C a S descrita anteriormente). El cebador inverso tenía la secuencia 5' CAGCTGGGGCCTGTCCCTG (SEQ ID NO: 23), que correspondía al sitio PvuII (CAGATG) en el intrón entre la región bisagra y los exones de CH2. Después de la verificación de la secuencia, este fragmento de restricción de ~ 130 bp PstI-PvuII fue utilizado para reemplazar el fragmento correspondiente en el anticuerpo pdHL7-huKS γ 2 para obtener el anticuerpo pdHL7-huKS γ 2h.

50 **Ejemplo 6: Caracterización del estado no reducido de un anticuerpo de γ 2 y un anticuerpo correspondiente de γ 2h dirigido contra células enfermas.**

Para la transfección transitoria, los vectores, pdHL7 de anticuerpo de KS con los isotipos IgC γ 1, γ 2, y γ 2h fueron introducidos en células mamíferas mediante lipofección, utilizando Lipofectamina Plus (de Life Technologies, Gaithersburg, MD), según el protocolo establecido por el proveedor. Se generaron transfectantes estables, tal como se ha descrito en el Ejemplo 2.

Los anticuerpos de KS en el medio condicionado (10% en suero), fueron capturados en Proteína A Sepfariosa (Repligen, Cambridge, MA), y entonces se eluyeron por ebullición en el tampón de muestra de proteína con o sin 2-mercaptoetanol, previamente a la caracterización por SDS-PAGE. La visualización mediante tinción con azul Coomassie mostró que el anticuerpo de KS $\gamma 2$ no reducido, migra como varias especies con pesos moleculares de aproximadamente 150 kD. En contraste, el anticuerpo KS $\gamma 2$ h migró como una banda principal con un peso molecular aparente de 150 kD. Cuando el anticuerpo KS $\gamma 2$ y el anticuerpo KS $\gamma 2$ h fueron reducidos con mercaptoetanol antes del análisis con SDS-PAGE, se observó un patrón de bandas idéntico correspondiente a las cadenas liviana y pesada tanto para el anticuerpo KS $\gamma 2$ y el anticuerpo KS $\gamma 2$ h.

Sin ánimo de estar sujetos a la teoría, estas observaciones sugieren que las especies que migran marcadamente, que se han observado con KS $\gamma 2$, eran debido a las variaciones en los patrones de los enlaces disulfuro.

Clones estables de células de mamíferos que expresan un anticuerpo KS $\gamma 2$ y un anticuerpo KS $\gamma 2$ h, fueron también identificados. Las transfecciones de células se llevaron a cabo bajo condiciones básicamente idénticas, y una cantidad similar de células transfectadas de manera estable se clonaron y se sometieron a prueba para la producción de un anticuerpo KS $\gamma 2$ y un anticuerpo KS $\gamma 2$ h. Los cuatro mejores clones de expresión para un anticuerpo KS $\gamma 2$ h realizaron aproximadamente 114, 98, 85, y 49 microgramos de anticuerpos por ml de sobrenadante de cultivo tisular, mientras que bajo las mismas condiciones los cuatro mejores clones de expresión para un anticuerpo huFc KS $\gamma 2$ realizaron alrededor de 36, 34, 15, y 13 microgramos de anticuerpos por ml de sobrenadante de cultivo tisular.

Ejemplo 7: Construcción de una proteína de fusión que incluye un anticuerpo completo que contiene dominios CH1, CH2, y CH3 de IgG2 y una región bisagra de IgG1.

En este ejemplo, se examinó la utilidad de una proteína de fusión de anticuerpo en la cual la fracción del anticuerpo tenía un isotipo híbrido.

El vector de expresión para huKS $\gamma 2$ -IL2, pdHL7-huKS $\gamma 2$ -IL2, se construyó reemplazando el fragmento de restricción Smal-XhoI en el anticuerpo de pdHL7-huKS $\gamma 2$, el cual contiene la secuencia GGGTAAATGA (SEQ ID NO: 24) seguido por el extremo cohesivo XhoI, por el fragmento de restricción Smal-XhoI aislado de pdHL7-huKS-IL2. Este último fragmento contiene la secuencia GGGTAAA, seguida inmediatamente por la secuencia de ADN que codifica la IL2 madura que incluye el codón de terminación de traducción. El vector de expresión resultante, pdHL7-huKS $\gamma 2$ -IL2, fue utilizado para transfectar células para la expresión de proteínas.

De igual modo, el vector de expresión para huKS $\gamma 2$ h-IL2, pdHL7-huKS $\gamma 2$ h-IL2, se construyó reemplazando el fragmento de restricción Smal-XhoI en el anticuerpo de pdHL7-huKS $\gamma 2$ h, el cual contiene la secuencia GGGTAAATGA (SEQ ID NO: 24) seguida de el extremo de cohesión XhoI, por el fragmento de restricción Smal-XhoI aislado de pdHL7-huKS-IL2, tal como se describe en el párrafo precedente. El vector de expresión resultante, pdHL7-huKS $\gamma 2$ h-IL2, fue utilizado para transfectar células para la expresión de proteínas.

Ejemplo 8: Caracterización del estado no reducido de una proteína de fusión de $\gamma 2$ -anticuerpo y una proteína de fusión correspondiente de anticuerpo $\gamma 2$ h.

Para la transfección transitoria, los plásmidos que codifican KS $\gamma 2$ -IL2 y KS $\gamma 2$ h-IL2 fueron introducidos en células de mamíferos mediante lipofección utilizando Lipofectamina Plus (Life Technologies, Gaithersburg, MD), de acuerdo con el protocolo del proveedor.

Para obtener clones transfectados de manera estable, los ADN plasmídicos fueron introducidos en células NS/O de mieloma de ratón mediante electroporación tal como se ha descrito en el Ejemplo 2.

Las proteínas de fusión KS-IL2 con los isotipos $\gamma 2$ y $\gamma 2$ h fueron caracterizados mediante análisis con SDS-PAGE, tal como se describe en el ejemplo 6. Las proteínas de fusión de anticuerpo en el medio condicionado (10% en suero) fueron capturados en Proteína A Sepfariosa (Repligen, Cambridge, MA) y entonces se eluyeron por ebullición en el tampón de muestra de proteína, con o sin 2-mercaptoetanol, previamente a la caracterización por SDS-PAGE. La visualización mediante tinción con azul Coomassie mostró que el anticuerpo de KS $\gamma 2$ -IL2 no reducido migra como varias especies con pesos moleculares de aproximadamente 180 kD. En contraste, el anticuerpo KS $\gamma 2$ h-IL2 migró como una banda principal con un peso molecular aparente de 180 kD. Cuando el KS $\gamma 2$ -IL2 y KS $\gamma 2$ h-IL2 fueron reducidos con mercaptoetanol antes del análisis con SDS-PAGE, se observó un patrón de bandas idéntico correspondiente a las cadenas pesada de IL2 y liviana, tanto para KS $\gamma 2$ -IL2 como para KS $\gamma 2$ h-IL2.

Sin ánimo de estar sujetos a la teoría, estas observaciones sugieren que las especies que migran marcadamente, que se han observado con KS γ 2-IL2 eran debido a variaciones en los patrones de enlaces disulfuro.

Las inmunocitoquinas de γ 2h modificadas se someten a prueba en animales, y presentan vidas medias alargadas con mejor eficacia en modelos tumorales animales, en relación a las inmunocitoquinas basadas en la IgG1 original.

- 5 Se identificaron además clones estables de células de mamíferos que expresan KS γ 2-IL2 y KS γ 2h-IL2. Las transfecciones de células se llevaron a cabo bajo condiciones básicamente idénticas, y cantidades similares de células transfectadas de forma estable se clonaron y se sometieron a prueba para la producción de KS γ 2-IL2 y KS γ 2h-IL2. Los cuatro mejores clones de expresión para un anticuerpo KS γ 2h-IL2 realizó aproximadamente 52, 37, 31, y 30 microgramos de proteína de fusión por ml de sobrenadante de cultivo tisular, mientras que bajo las mismas condiciones los cuatro mejores clones de expresión para KS γ 2-IL2 realizaron alrededor de 31, 27, 27, y 17 microgramos de proteína de fusión por ml de sobrenadante de cultivo tisular.

Ejemplo 9: Construcción de plásmidos que expresan proteínas de fusión de anticuerpos con un isotipo híbrido y una mutación secundaria que afecta a la actividad de la proteína de fusión.

HuKS γ 2-Ala-IL2 vs HuKS γ 2h-Ala-IL2

- 15 Los vectores de expresión pdHL7-huKS γ 2-Ala-IL2 y pdHL7-huKS γ 2h-Ala-IL2 (descritos con anterioridad) se construyeron reemplazando el fragmento de restricción SmaI-XhoI en el anticuerpo de pdHL7-huKS γ 2 y el anticuerpo pdHL7-huKS γ 2h, respectivamente, el cual contiene la secuencia GGGTAAATGA (SEQ ID NO: 24) seguido por el extremo cohesivo XhoI, por el fragmento de restricción SmaI-XhoI aislado de pdHL7-huKS γ 1-Ala-IL2. Este último fragmento contiene la secuencia GGGTGCA, seguida inmediatamente por la secuencia de ADN que codifica la IL2 madura que incluye el codón de terminación de traducción. La GCA codifica la sustitución de lisina a alanina en la unión de la proteína de fusión. Los vectores resultantes fueron utilizados para transfectar células para la producción de huKS γ 2-Ala-IL2 y huKS γ 2h-Ala-IL2.

- 25 **Ejemplo 10: Caracterización del estado no reducido de una proteína de fusión de γ 2-anticuerpo y una proteína de fusión correspondiente de anticuerpo γ 2h que porta una mutación secundaria que afecta a la función de la proteína de fusión.**

Para la transfección transitoria, los plásmidos que codifican KS γ 2-Ala-IL2 y KS γ 2h-Ala-IL2 fueron introducidos en células de mamíferos mediante lipofección utilizando Lipofectamina Plus (Life Technologies, Gaithersburg, MD), de acuerdo con el protocolo del proveedor.

- 30 Se identificaron también clones estables de células de mamíferos que expresan KS γ 2-Ala-IL2 y KS γ 2h-Ala-IL2, al igual que en el Ejemplo 2. Las transfecciones de células se llevaron a cabo bajo condiciones básicamente idénticas, y cantidades similares de células transfectadas de forma estable se clonaron y se sometieron a prueba para la producción de KS γ 2-Ala-IL2 y KS γ 2h-Ala-IL2. Los tres mejores clones de expresión para KS γ 2h-Ala-IL2 realizaron aproximadamente 39, 38, y 29 microgramos de proteína de fusión por ml de sobrenadante de cultivo tisular, mientras que bajo las mismas condiciones los tres mejores clones de expresión para KS γ 2-Ala-IL2 realizaron alrededor de 22, 17, y 6 microgramos de proteína de fusión por ml de sobrenadante de cultivo tisular. Las proteínas de fusión de KS-Ala-IL2 con los isotipos γ 2h y 2 fueron caracterizadas mediante análisis en SDS-PAGE, tal como se describe en el Ejemplo 6. Las proteínas de fusión KS-Ala-IL2 en el medio condicionado (10% en suero) fueron capturadas en Proteína A Sefarosa (Repligen, Cambridge, MA), y entonces se eluyeron por ebullición en el tampón de muestra de proteína con o sin 2-mercaptoetanol, previamente a la caracterización por SDS-PAGE. La visualización mediante tinción con azul Coomassie mostró que KS γ 2-Ala-IL2 no reducido migra como varias especies. En contraste, KS γ 2h-Ala-IL2 migró como una especie principal. Cuando el KS γ 2-Ala-IL2 y KS γ 2h-Ala-IL2 son reducidos con mercaptoetanol antes del análisis con SDS-PAGE, se observó un patrón de bandas idéntico correspondiente a las cadenas pesada de IL2 y liviana, tanto para KS γ 2-Ala-IL2 como para KS γ 2h-Ala-IL2.

- 45 Sin ánimo de estar sujetos a la teoría, estas observaciones sugieren que las especies que migran marcadamente, que se han observado con KS γ 2-Ala-IL2 se debieron a las variaciones en los patrones de los enlaces disulfuro.

Ejemplo 11: Expresión de una proteína de fusión de anticuerpo con regiones constantes derivadas a partir de diferentes isotipos.

- 50 En algunos casos, resulta deseable construir una proteína de fusión de Ig en la que regiones constantes diferentes, además de la región bisagra, se deriven de diferentes isotipos de cadena pesada. Para examinar las propiedades de esta clase de moléculas, se realizaron los siguientes experimentos.

La proteína huKS(γ 1:CH1-H)(γ 2:CH2-CH3)-Ala-IL2, que es una proteína de fusión anticuerpo-IL2 con la cadena pesada de la IgG que comprende las regiones KS VH, CH1 y región bisagra de la IgG1 y las regiones CH2-CH3 de la IgG2 (con la sustitución de lisina a alanina en la unión de fusión, tal como se describe con anterioridad), seguida de IL-2, se expresó como sigue a continuación. El vector de expresión pdHL7-huKS(γ 1:CH1-H)(γ 2:CH2-CH3)-Ala-IL2 se construyó reemplazando el fragmento de restricción HindIII-AfIII en pdHL7-KS- γ 2-Ala-IL2, con el correspondiente fragmento de restricción HindIII-AfIII que contiene las regiones CH1 y bisagra de pdHL7-KS-IL2. Este vector de expresión fue transfectado en células de mamíferos cultivadas tal como se ha descrito con anterioridad para producir una proteína de fusión de anticuerpo con un isotipo híbrido.

Las proteínas de fusión citocina-anticuerpo HuKS(γ 1:CH1-H)(γ 2:CH2-CH3)(Ala)-IL2 híbrida y la HuKS γ 2(Ala)-IL2, fueron caracterizadas mediante análisis en gel SDS-PAGE no reductor, tal como se describe en el Ejemplo 6. La proteína de fusión de isotipo híbrido HuKS(γ 1:CH1-H)(γ 2:CH2-CH3)(Ala)-IL2 migró como una banda principal con un peso molecular de aproximadamente 180 kD. En contraste, la proteína de fusión de anticuerpo-citocina HuKS γ 2(Ala)-IL2 migró como múltiples bandas en el rango de medición de 180 kD.

Cuando las proteínas de fusión HuKS(γ 1:CH1-H)(γ 2:CH2-CH3)(Ala)-IL2 híbrida y la HuKS(γ 2)(Ala)-IL2 fueron caracterizadas por SDS-PAGE de reducción, ambas proteínas dieron un patrón idéntico de bandas, correspondientes a los polipéptidos de fusión de la IL2 de cadena liviana y pesada.

Sin ánimo de estar sujetos por la teoría, parecía que la proteína de fusión anticuerpo-citocina HuKS(γ 2)(Ala)-IL2 existía en al menos dos configuraciones isoméricas diferentes, en las que la diferencia era debido a una diferencia en el patrón de los enlaces disulfuro.

Ejemplo 12: Expresión de proteínas de fusión de anticuerpo de isotipo híbrido con una especificidad del antígeno no proteico y un compañero de fusión de múltiples subunidades.

El anticuerpo 14.18 se une al antígeno glicolípido GD2. La interleucina-12 es una citocina heterodimérica que incluye una subunidad p35 y p40, unidas de forma covalente mediante un enlace disulfuro.

Tal como se ha descrito con anterioridad, el uso de un isotipo híbrido, tal como por ejemplo un híbrido de IgG1/IgG2, conduce a un ensamblaje aumentado en comparación con un isotipo natural, tal como la IgG2. El ensamblaje aumentado puede manifestarse por niveles de expresión aumentados.

En un caso, los plásmidos de expresión 14.18(γ 2)(Ala)-IL12 y 14.18(γ 2h)(Ala)-IL12 fueron construidos y transfectados de manera transitoria en células en paralelo bajo condiciones idénticas, tal como se ha descrito con anterioridad en Gillies et al. (WO09929732). Se utilizó la IL-12 humana. El nivel de proteína en el sobrenadante del cultivo tisular fue aproximadamente un 40% más elevado en el procedente de los cultivos transfectados con el plásmido de expresión 14.18(γ 2h)-Ala-IL12, que del procedente de los cultivos transfectados con el plásmido de expresión 14.18(γ 2)-Ala-IL12.

Los plásmidos de expresión 14.18(γ 2)-Ala-IL12 y 14.18(γ 2h)-Ala-IL12 fueron también transfectados en células tal como se ha descrito con anterioridad, y se estudiaron en mayor detalle los cuatro clones de expresión más elevada de cada transfección. Para 14.18(γ 2h)-Ala-IL12, la media de los cuatro clones de expresión fue aproximadamente un 45% más elevada que para los cuatro mejores clones de expresión derivados del plásmido de expresión 14.18(γ 2)-Ala-IL12.

En un segundo caso, los plásmidos de expresión 14.18(γ 2)-IL12 y 14.18(γ 2h)-IL12 fueron construidos y transfectados de manera transitoria en células en paralelo bajo condiciones idénticas, tal como se ha descrito con anterioridad. Se utilizó IL-12 de ratón. El nivel de proteína en el sobrenadante de cultivo tisular fue aproximadamente un 40% más elevado en el procedente de cultivos transfectados con el plásmido de expresión 14.18(γ 2h)-IL12 que en el procedente de los cultivos transfectados con el plásmido de expresión 14.18(γ 2)-IL12.

Los plásmidos de expresión 14.18(γ 2)-IL12 y 14.18(γ 2h)-IL12 que utilizan IL-12 murina fueron también transfectados de manera estable en células, tal como se ha descrito con anterioridad, y los cuatro mejores clones de expresión de cada transfección se estudiaron en mayor detalle. Para 14.18(γ 2h)-IL12, la media de los cuatro mejores clones de expresión fue de alrededor de un 35% más elevada que para los cuatro mejores clones de expresión derivados del plásmido de expresión 14.18(γ 2)-IL12.

Estos resultados indicaron que el uso de un isotipo híbrido en una proteína de fusión conduce a una expresión aumentada, incluso cuando se utiliza un anticuerpo diferente y una fracción no Ig diferente que en los ejemplos anteriores. En este Ejemplo, se esperaba que el uso de la IL-12 como la fracción no Ig complique, de manera

significativa, el ensamblaje de la proteína de fusión de Ig, ya que la IL-12 es un heterodímero. Sin embargo, el uso de un isotipo híbrido tuvo un efecto beneficioso.

Ejemplo 13: Expresión de proteínas de fusión de anticuerpo de isotipo híbrido que utilizan una región bisagra de la IgA.

5 Para construir una proteína de fusión de Ig con resistencia a la proteasa aumentada, se produce una proteína de fusión de IgA/IgG.

Por ejemplo, se construye una proteína de fusión Fc-X que contiene la región bisagra de una IgA1 humana y las regiones CH2 y CH3 de la IgG2.

10 Un ejemplo de la construcción de un vector de expresión para producir una proteína de fusión Fc-X, que comprenda la región bisagra de la la IgA1 humana y las regiones CH2 y CH3 de la IgG2 es tal como sigue a continuación. El plásmido pdCs-huFcγ2-Leptina del Ejemplo 1 se utiliza como un vector.

El fragmento AflII-StuI que contiene el exón de la región bisagra de γ2 en pdCs-huFcγ2-Leptina es reemplazado por el correspondiente fragmento AflII-StuI (SEQ ID NO: 25) que contiene el exón de la región bisagra de la IgA1, el cual se muestra a continuación:

(AflII) P S T P P T P S P S T P
 CTTAAG T CCC TCA ACT CCA CCT ACC CCA TCT CCC TCA ACT CCA

P T P S P S C C H (SEQ ID NO:26) (StuI)
 CCT ACC CCA TCT CCC TCA TGC TGC CAC Ggtaagccagcccaggcct

15

De manera específica, se sintetizan los siguientes oligonucleótidos: cadena superior:

5' -
TTAAGTCCCTCAACTCCACCTACCCCATCTCCCTCAACTCCACCTACCCCATCTCCC
TCATGCTGCCACGGTAAGCCAGCCAGG-3' (SEQ ID NO: 27)

Cadena inferior:

5' -
CCTGGGCTGGCTTACCGTGGCAGCATGAGGGAGATGGGGTAGGTGGAGTTGAGGGAGA
TGGGGTAGGTGGAGTTGAGGGAC-3' (SEQ ID NO: 28)

20 Estos oligonucleótidos están alineados, y se utilizan para reemplazar el correspondiente fragmento en pdCs-huFcγ2-Leptina.

Debido a que los sitios StuI en el exón de γ2 se encuentra C-metilado y la endonucleasa de restricción StuI es sensible a la metilación, el plásmido es aislado de una cepa de bacterias negativa en DCM antes de la digestión con la enzima StuI. El resultante pdCs-huFcγ2-Leptina con la región bisagra de la IgA1 es denominado pdCs-huFca1/γ2-Leptina.

25

El plásmido pdCs-huFca1/γ2-Leptina es transfectado en células eucariotas y una proteína Fc-X de la forma α1 (región bisagra)-γ2(CH2, CH3)-leptina se expresa como una proteína secretada. Por ejemplo, se utilizan las células y métodos del Ejemplo 2. La proteína resultante α1- γ2-leptina fue purificada, caracterizada, y se observó que poseía actividad de la leptina y que era relativamente insensible al corte de la proteasa en la región bisagra.

30 **Ejemplo 18: Expresión de las proteínas de fusión Fc de isotipo híbrido que utilizan componentes de la IgG1**

5 Para generar una proteína de fusión Fc-eritropoyetina que esté mínimamente agregada cuando se expresa a partir de células mamíferas, se construyó el siguiente plásmido de expresión utilizando técnicas estándar de biología molecular. Se utilizó un fragmento de ADN de Xmal-XhoI que contiene una forma de la secuencia de codificación de la eritropoyetina humana con mutaciones que dan como resultado las sustituciones His32Gly, Cys33Pro, Trp88Cys, y Pro90Ala, tal como se revela en la patente WO01/36489. La correspondiente secuencia de proteína se muestra en SEQ ID NO: 47:

**APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTC AEGPSLNENITVPDTKVN FYAWKRMEV GQQA VE V W QGLAL
LSEAVLRGQALLVNSSQPCEGLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPDAASAAPLRTITADTF
RKLFRVYSNFLRGKLLKLYTGACRTGDR**

10 Este fragmento de ADN de Xmal-XhoI se insertó en un vector plasmídico que codifica una región bisagra a partir de la IgG1, y una región CH2 y CH3 a partir de la IgG2 que era básicamente idéntico al vector construido en el Ejemplo 1, excepto porque existían dos grupos de mutaciones que dieron como resultado sustituciones de aminoácidos en la región del C-terminal de CH3, de tal manera que la secuencia en la unión del C-terminal de CH3 y el N-terminal de Epo es de la siguiente manera:

.... TQKSATATPGA-APPRLI....(SEQ ID NO: 48)

15 El primer grupo de mutaciones, que cambia la secuencia KSLSLSPG (SEQ ID NO: 49) de la región CH3 de la IgG2 a KSATATPG (SEQ ID NO: 45), se revela en la solicitud de patente estadounidense con nº de serie 60/280,625. El efecto de la sustitución de Leu-Ser-Leu-Ser (posición 3 a posición 6 de la SEQ ID NO: 49) con Ala-Thr-Ala-Thr (posición 3 a posición 6 de SEQ ID NO: 50) es eliminar los epítopos de linfocitos T no propios humanos que puedan surgir debido a que la unión entre la Fc humana y la eritropoyetina humana contiene secuencias de péptidos no propios. El segundo grupo que consiste en una única sustitución de aminoácidos de K a A en el aminoácido C-terminal de la región CH3, se revela en la solicitud de patente estadounidense con nº de serie 09/780,668.

20 El plásmido resultante fue transfectado en células NS/O, y la proteína de fusión Fc-Epo fue expresada y purificada de acuerdo a los procedimientos de los Ejemplos 1 y 2. Después de la purificación basada en la unión a la proteína A, la proteína huFcγ2h-huEpo que contiene la CH3 de la IgG2 y las sustituciones de eritropoyetina descritas con anterioridad, fue caracterizada por cromatografía de exclusión por tamaños, y se observó que consistía en un 97% de monómero y un 90% de monómero en dos preparaciones independientes. Se observó que la proteína huFcγ2h-huEpo que contiene la CH3 de la IgG2 y las sustituciones descritas anteriormente, era tan activa, en una base molar, como la eritropoyetina en un ensayo basado en células que medían la habilidad de una proteína eritropoyetina para estimular la división celular TF-1. El ensayo fue realizado tal como se describe en WO01/36489.

25 Además, las fusiones de la eritropoyetina humana no mutante al C-terminal de una región Fc que consiste en o bien IgG1 (bisagra-CH2-CH3), IgG2(bisagra-CH2-CH3), o IgG1(bisagra)-IgG2(CH2-CH3) fueron caracterizadas. Los plásmidos de expresión que comprenden secuencias de Fc humana no mutante y secuencias de eritropoyetina no mutante, fueron construidos de forma análoga al plásmido descrito con anterioridad en el Ejemplo 1. Las células NS/O fueron transfectadas con los plásmidos de expresión de Fcγ1-Epo, Fcγ2-Epo, y Fcγ2h-Epo, y se aislaron clones estables después de cribar una cantidad aproximadamente igual de clones para cada plásmido. Los mejores clones de producción produjeron 50 µg/ml para Fcγ1-Epo, 20 µg/ml para Fcγ2-Epo, y 120 µg/ml para Fcγ2h-Epo.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Lexigen Pharmaceuticals Corp. Gillies, Stephen Way, Jeffrey

<120> Tecnología de Expresión para Proteínas que contienen una fracción de anticuerpo de isotipo híbrido

<130> LEX-016PC

5 <150> US 60/274,096

<151> 2001-03-07

<160> 50

<170> PatentIn versión 3.0

<210> 1

10 <211> 12

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de la región bisagra de IgG2

15 <400> 1

Glu Arg Lys Ser Ser Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

20 <213> secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de la región bisagra híbrida de IgG2-IgG4

<400> 2

Glu Ser Lys Tyr Gly Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

25 <210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> secuencia artificial

ES 2 393 733 T3

<220>

<223> secuencia del dominio IgE-CH2

<400> 3

Val Asn Leu Thr Trp
1 5

5 <210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

10 <223> secuencia del dominio CH2 de IgG1

<400> 4

Val Lys Phe Asn Trp
1 5

<210> 5

<211> 5

15 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> secuencia del dominio CH2 de IgG3

<400> 5

Val Gln Phe Lys Trp
1 5

20

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> secuencia artificial

25 <220>

<223> sitio de glicosilación de la IgD

<400> 6

Asn Thr Ser Gly Phe
1 5

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> sitio de glicosilación de la IgD

<400> 7

Leu Asn Ala Ser Arg
1 5

10 <210> 8

<211> 29

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

15 <223> cebador directo para la Fc humana gamma 2

<400> 8

ccttaagcga gcgcaaatgt tgtgtcgag 29

<210> 9

<211> 21

20 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> región bisagra de codificación de Fc gamma 2 humana

<400> 9

25 gagcgcaaat gttgtgtoga g 21

<210> 10

<211> 29

<212> ADN

<213> secuencia artificial

ES 2 393 733 T3

- <220>
- <223> cebador inverso para Fc gamma 2 humana
- <400> 10
- cctcgagtca ttaccggg gacaggag 29
- 5 <210> 11
- <211> 30
- <212> ADN
- <213> secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> secuencia de ADN para la región CH3 superior
- <400> 11
- ctgccccat cccgggagga gatgaccaag 30
- <210> 12
- <211> 30
- 15 <212> ADN
- <213> secuencia artificial
- <220>
- <223> cebador directo para introducir una sustitución de C a A en la región CH3 superior
- <400> 12
- 20 ctgccccat cacgggagga gatgaccaag 30
- <210> 13
- <211> 34
- <212> ADN
- <213> secuencia artificial
- 25 <220>
- <223> cebador inverso reverse para introducir una sustitución de C a A en la región CH3
- <400> 13
- ggcatctcc tccgtgatg gggcagggt gtac 34
- <210> 14
- 30 <211> 12
- <212> PRT

ES 2 393 733 T3

<213> secuencia artificial

<220>

<223> región bisagra de gamma 2

<400> 14

	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro
5	1				5					10		

<210> 15

<211> 62

<212> ADN

<213> secuencia artificial

10 <220>

<223> exón de la región bisagra de gamma 2

<400> 15

cttaagcgag cgcaaagtgt gtgtcgagtg cccaccgtgc ccaggtaagc cagcccaggc 60

ct 62

<210> 16

15 <211> 15

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de la región bisagra de gamma 1 hinge con una mutación de Cys a Ser

20 <400> 16

	Glu	Pro	Lys	Ser	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro
	1				5					10					15

<210> 17

<211> 71

<212> ADN

25 <213> secuencia artificial

<220>

<223> fragmento de ADN que contiene un exón de la región bisagra de gamma 1

ES 2 393 733 T3

<400> 17

cttaagcgag cccaaatctt ctgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc caggtaagcc 60
agcccaggcc t 71

<210> 18

<211> 112

5 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> secuencia que codifica el péptido 1 similar al glucagón

<400> 18

cttaagccat gctgaaggga cctttactag tgatgtaagt tcttatttgg aaggccaagc 60
10 tgccaaggaa ttcattgctt ggctggtgaa aggccgagga ggatccttaa gc 112

<210> 19

<211> 31

<212> PRT

<213> secuencia artificial

15 <220>

<223> péptido 1 similar al glucagón

<400> 19

His	Ala	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Gly
1				5					10					15	
Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg	Gly	
			20					25					30		

<210> 20

20 <211> 19

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador directo para la región constante de la inmunoglobulina gamma 2

25 <400> 20

- Caagctttct ggggcgagc 19
 <210> 21
 <211> 29
 <212> ADN
- 5 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador inverso para la región constante de la inmunoglobulina gamma 2
 <400> 21
- cctcgagtca ttaccggg gacaggag 29
- 10 <210> 22
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
- 15 <223> cebador directo para la región bisagra de gamma 1
 <400> 22
- ctgcagagcc caaatcttc 19
- <210> 23
 <211> 19
- 20 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador inverso para la región bisagra de gamma 1
 <400> 23 19
- 25 cagctggggc ctgtccctg 19
 <210> 24
 <211> 10
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
- 30 <220>
 <223> secuencia en el anticuerpo pDHL2-huKS

ES 2 393 733 T3

<400> 24 10
 gggtaatga 10
 <210> 25
 <211> 89
 5 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> exón de la región bisagra de la IgA1
 <400> 25
 cttaaagtccc tcaactccac ctaccccatc tcctcaact ccactaccc catctccctc 60
 10 atgctgccac ggtaagccag cccaggcct 89
 <210> 26
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 15 <220>
 <223> región bisagra de la IgA1
 <400> 26
 Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser
 1 5 10 15
 Pro Ser Cys Cys His
 20
 <210> 27
 20 <211> 85
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> cadena de reemplazo superior
 25 <400> 27

ttaagtcct caactccacc taacccatct cctcaactc cacctacccc atctccctca 60

tgctgccacg gtaagccagc ccagg 85

<210> 28

<211> 81

<212> ADN

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> cadena de reemplazo inferior

<400> 28

cctgggctgg cttaccgtgg cagcatgagg gagatggggg aggtggagtt gagggagatg 60

gggtaggtgg agttgagga c 81

10 <210> 29

<211> 33

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

15 <223> cebador para la CH3 y CH4 de la IgM

<400> 29

gcagccggcc ctgagcctg gctcccaga gcg 33

<210> 30

<211> 34

20 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador para la CH3 y CH4 de la IgM

<400> 30

25 gctccgggt cagtagcagg tgccagctgt gtcg 34

<210> 31

<211> 33

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador para la IgM para la mutación de Cys a Ser más C-terminal

<400> 31

5 gcagccggcc ctgagccttg gcttcccaga gcg 33

<210> 32

<211> 34

<212> ADN

<213> secuencia artificial

10 <220>

<223> cebador para la IgM para la mutación de Cys a Ser C-terminal

<400> 32

gctcccgggt cagtagctgg tgccagctgt gtcg 34

<210> 33

15 <211> 460

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> región constante para IgG1-IgM híbrida

20 <400> 33

ES 2 393 733 T3

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

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

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

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

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

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

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Asp
210 215 220

Gln Asp Thr Ala Ile Arg Val Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser
225 230 235 240

Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu
 245 250 255

Thr Thr Tyr Asp Ser Val Thr Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu
 260 265 270

Ala Val Lys Thr His Thr Asn Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr
 275 280 285

Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp Asn Ser
 290 295 300

Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Pro
 305 310 315 320

Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro
 325 330 335

Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu
 340 345 350

Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val
 355 360 365

Phe Val Gln Trp Met Gln Arg Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr
 370 375 380

Val Thr Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe
 385 390 395 400

Ala His Ser Ile Leu Thr Val Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu
 405 410 415

Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr
 420 425 430

Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser Thr Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val
 435 440 445

Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly Thr Cys Tyr
 450 455 460

<210> 34

<211> 7

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> secuencia peptídica en la IgG1-IgM híbrida

<400> 34

Ala Ser Ile Cys Glu Asp Asp
1 5

<210> 35

<211> 12

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> región bisagra de IgG4 con una mutación de Ser a Pro

<400> 35

10 Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 36

<211> 56

<212> ADN

<213> secuencia artificial

15 <220>

<223> oligonucleótido doble

<400> 36

acgtctcagg ttataccag ggggtacggg tggaacgggt ccattcgggt ggggcc 56

<210> 37

20 <211> 11

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> región bisagra de IgG4

25 <400> 37

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys
1 5 10

<210> 38

<211> 40

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador para las regiones bisagra, CH2 y CH3 de IgG4

5 <400> 38

cttaagcgag tccaaatatg gtcccccattg cccatcatgc 40

<210> 39

<211> 4

<212> PRT

10 <213> secuencia artificial

<220>

<223> secuencia peptídica cerca del C-terminal de la región de codificación de Fc gamma 4

<400> 39

Ser Leu Gly Lys
1

15 <210> 40

<211> 4

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

20 <223> secuencia peptídica cerca del C-terminal de la región de codificación de Fc gamma 4 con una mutación Leu a Pro

<400> 40

Ser Pro Gly Lys
1

<210> 41

25 <211> 15

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> secuencia cerca del C-terminal de la región de codificación de Fc gamma 4

30 <400> 41

- tctctgggta aatga 15
<210> 42
<211> 15
<212> ADN
- 5 <213> secuencia artificial
<220>
<223> secuencia cerca del C-terminal de la región de codificación de Fc gamma 4 con una mutación Leu a Pro
<400> 42
- tccccgggta aatga 15
- 10 <210> 43
<211> 31
<212> ADN
<213> secuencia artificial
<220>
- 15 <223> cebador sentido IFN beta
<400> 43
- cccggtatg agctacaact tgcttgatt c 31
- <210> 44
<211> 30
- 20 <212> ADN
<213> secuencia artificial
<220>
<223> cebador inverso IFN beta
<400> 44
- 25 ctcgagtcag ttcggaggt aacctgaag 30
<210> 45
<211> 12
<212> PRT
<213> secuencia artificial
- 30 <220>
<223> región bisagra de Fc gamma 4 con una mutación de Ser a Pro

ES 2 393 733 T3

<400> 45

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 46

<211> 58

5 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> oligonucleótido doble que codifica Fc gamma 4 que contiene la mutación de Ser a Pro

<400> 46

10 ttaagcgagt ccaaataatgg tccccatgc ccacctgccc caggtagcc aaccagg 58

<210> 47

<211> 166

<212> PRT

<213> secuencia artificial

15 <220>

<223> secuencia proteica para una forma mutada de la proteína eritropoyetina

<400> 47

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

<210> 48

<211> 17

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> secuencia en la unión de CH3-Epo

<400> 48

Thr Gln Lys Ser Ala Thr Ala Thr Pro Gly Ala Ala Pro Pro Arg Leu
 1 5 10 15

10 Ile

<210> 49

<211> 8

<212> PRT

<213> secuencia artificial

5 <220>

<223> secuencia de IgG2 CH3

<400> 49

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5

<210> 50

10 <211> 8

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> región CH3 de IgG2

15 <400> 50

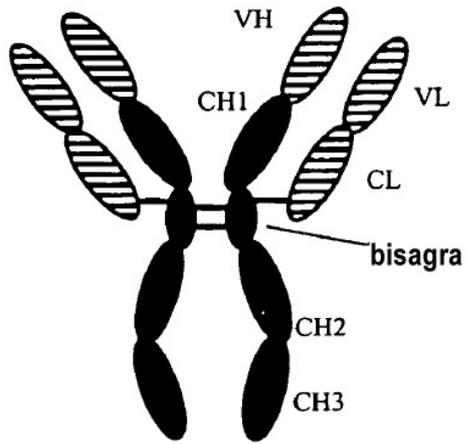
Lys Ser Ala Thr Ala Thr Pro Gly
1 5

REIVINDICACIONES

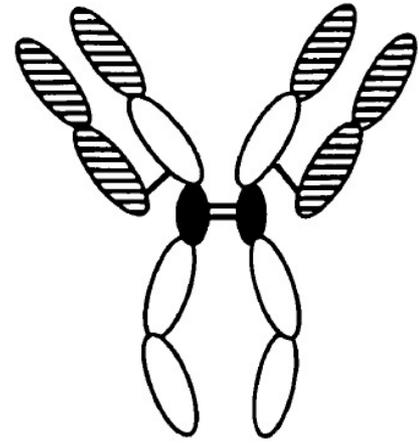
- 5 1. Una proteína de fusión de inmunoglobulina de isotipo híbrido que comprende una fracción de inmunoglobulina fusionada a una fracción no inmunoglobulina; en donde la fracción no inmunoglobulina se fusiona al C-terminal de la fracción de inmunoglobulina, dicha fracción de inmunoglobulina comprende un primer dominio de un primer isotipo de anticuerpo y un segundo dominio de un segundo isotipo de anticuerpo, en donde el primer dominio de dicho primer isotipo de anticuerpo es una región de bisagra de la IgG1, y el segundo dominio de dicho segundo isotipo de anticuerpo es un dominio CH2 y CH3 de la IgG2.
2. Una proteína de fusión de la reivindicación 1, en donde la cisteína más N-terminal de la región bisagra de IgG1 es mutada.
- 10 3. Una proteína de fusión de la reivindicación 1 o 2, en donde la lisina C-terminal de la fracción de inmunoglobulina es mutada a alanina o leucina.
4. Una proteína de fusión de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 – 3, en donde la fracción de inmunoglobulina comprende un dominio CH1.
- 15 5. Una proteína de fusión de la reivindicación 4, en donde la fracción de inmunoglobulina comprende una región bisagra de IgG1, un dominio CH1, CH2 y CH3 de IgG2, y un sitio de unión al antígeno.
6. Una proteína de fusión de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 – 4 que tiene la estructura Fc – X, en donde Fc representa la fracción de inmunoglobulina y la fracción X no inmunoglobulina.
7. Una proteína de fusión de la reivindicación 6 que tiene la estructura Y – Fc – X, en donde Y representa una fracción no inmunoglobulina fusionada en el N-terminal de la cadena pesada de la fracción de inmunoglobulina.
- 20 8. Una proteína de fusión de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 – 7, en donde la fracción no inmunoglobulina es una citocina o una molécula de eritropoyetina.
9. Una proteína de fusión de la reivindicación 8, en donde la citocina es IL-2 fusionada al C-terminal de una fracción de inmunoglobulina, que comprende regiones V que reconocen el antígeno EPCAM (anticuerpo KS) y una región CH1 – CH2 – CH3 de la IgG2 y una región bisagra de la IgG1 con mutación de cisteína a serina en el N-terminal más extremo, en donde la región de unión entre las fracciones inmunoglobulina y no inmunoglobulina es mutada cambiando la lisina C-terminal de la fracción de inmunoglobulina por alanina.
- 25 10. Un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión tal como se especifica en cualquiera de las reivindicaciones 1 – 9.
11. Un vector de expresión replicable que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 10.
- 30 12. Una célula hospedadora eucariota que comprende el vector de la reivindicación 11.
13. Un método in-vitro para aumentar la expresión de una proteína de fusión de inmunoglobulina de un isotipo de Ig de tipo silvestre específico que presenta un ensamblaje incorrecto debido a la formación incorrecta del enlace disulfuro durante la homodimerización de la cadena pesada, donde el método comprende reemplazar la región bisagra de dicha proteína de fusión de inmunoglobulina con una región bisagra de un isotipo de Ig diferente con un número reducido de residuos cisteína, formando de esa manera una proteína de fusión de isotipo híbrido de cualquiera de las reivindicaciones 1 – 9.
- 35

Figura 1.

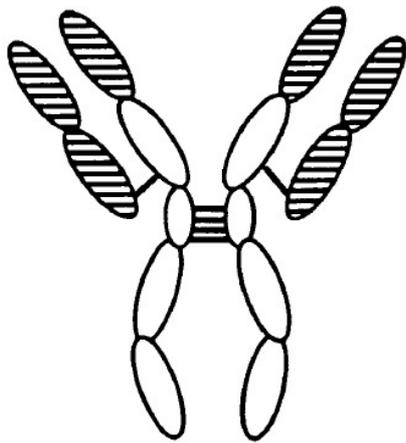
A.



C.



B.



D.

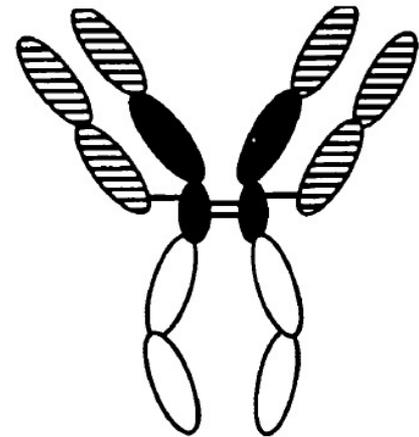
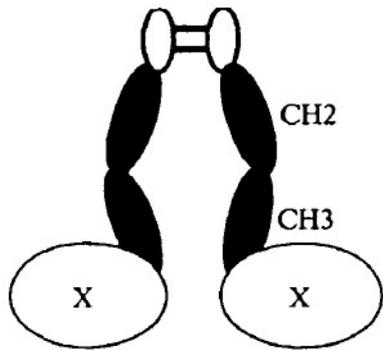
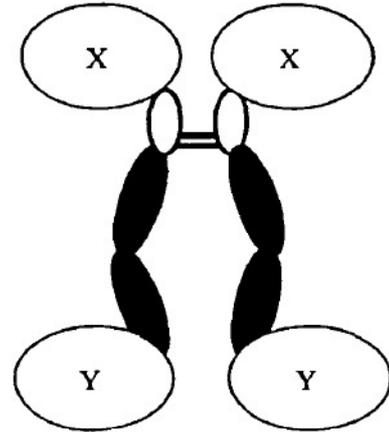


Figura 2.

A.



C.



B.

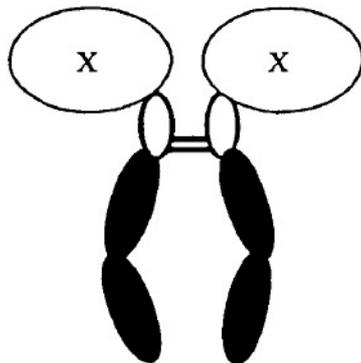
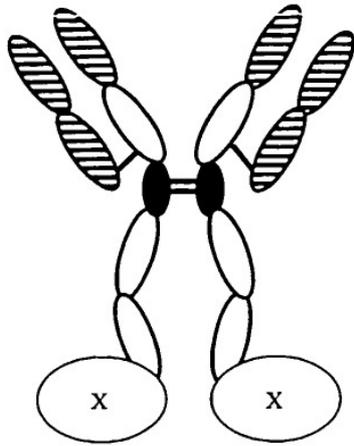
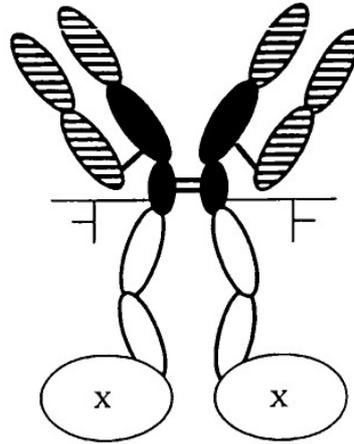


Figura 3.

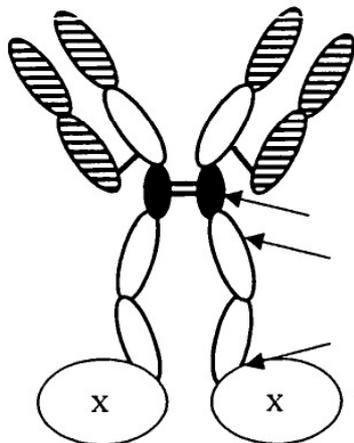
A.



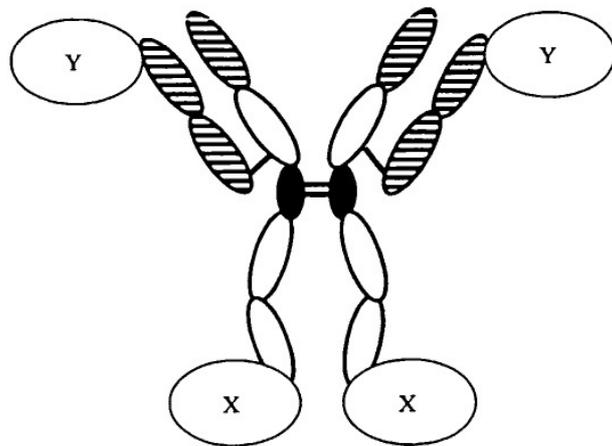
C.



B.



D.



E.

