(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 414 804**

(51) Int. CI.:

C07K 16/18 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.01.2009 E 09731152 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2013 EP 2247617**

(54) Título: **Métodos y composiciones que se dirigen a la poliubiquitina**

(30) Prioridad:

18.01.2008 US 11577
16.05.2008 US 127862

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.07.2013

(73) Titular/es:

GENENTECH, INC. (100.0%)
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080-4990, US

(72) Inventor/es:

KELLEY, ROBERT F. y
MATSUMOTO, MARISSA L.

(74) Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

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

DESCRIPCIÓN

Métodos y composiciones que se dirigen a la poliubiquitina.

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de los anticuerpos anti-poliubiquitina, y más en concreto, a anticuerpos anti-poliubiquitina que no se unen de modo específico a monoubiquitina y que pueden discriminar entre poliubiquitinas que tienen diferentes enlaces isopeptídicos.

Antecedentes

La ubiquitina es una proteína pequeña que tiene importantes papeles reguladores en una amplia variedad de vías celulares. El más conocido es el papel de la ubiquitina en la degradación de proteínas, en la que la unión covalente de la ubiquitina a una proteína diana permite que la proteína diana pueda ser reconocida y destruida por el proteasoma 26S (*véase* Wilkinson, Semin. Cell Devel. Biol., 11(3):141-148 (2000)). La regulación de proteína quinasas de diversas vías de señalización también se ha correlacionado con la ubiquitinación (véase Sun y Chen, Curr. Opin. Cell Biol., 16:119-126 (2004)). Por ejemplo, la fosforilación de IκB por la IκB quinasa permite la ubiquitinación de IκB y su posterior degradación por el proteasoma 26S; debido a que Iκb es un inhibidor de NFκB, la degradación de IκB activa NFκB (Ghosh y Karin, Cell, 109 (supl.): S81-S96 (2002); Palombella *et al.*, Cell, 78:773-785 (1994)). La ubiquitinación también media en la reparación del ADN (*véase* Sun y Chen, Curr. Opin. Cell Biol., 16:119-126 (2004)). Después de que el ADN haya sido dañado, la monoubiquitinación del antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) activa a polimerasas tolerantes al daño que son capaces de sintetizar ADN a pesar de cualquier daño en el ADN (Stelter y Ulrich, Nature, 425:188-191 (2003)). Otros procesos fisiológicos en los que se sabe que está implicada la ubiquitinación incluyen la división celular, el crecimiento celular, el movimiento celular, y la muerte celular/apoptosis (Johnson, Nat. Cell Biol., 4:E295-E298 (2002); Pickart, Mol. Cell., 8:499-504(2001)).

La unión covalente de la ubiquitina, una proteína de 76 aminoácidos, a una proteína diana es un proceso enzimático en tres etapas (Pickart, Annu. Rev. Biochem., 70:503-533 (2001)). En primer lugar, la enzima activadora de ubiquitina E1 forma un tioéster de E1-ubiquitina en una reacción dependiente de ATP. La ubiquitina se traslada desde el tioéster de E1-ubiquitina a un miembro de la familia de enzimas conjugadoras de ubiquitina (E2) en la segunda etapa. En la tercera etapa, con la ayuda de una proteína ligasa de ubiquitina (E3), se forma un enlace isopeptídico entre el extremo terminal carboxilo de la ubiquitina y el grupo ε-amino de un resto lisina sobre la proteína diana. Las enzimas denominadas desubiquitinasas retiran los restos ubiquitina de las proteínas diana (Guterman y Glickman, Curr. Prot. Pep. Sci., 5:201-210 (2004)). Para destacar el papel de la ubiquitina como importante molécula reguladora, el genoma humano contiene muchas proteínas diferentes implicadas en la ubiquitinación o la desubiquitinación: hasta la fecha se han identificado al menos 40 E2 diferentes, 500 E3 diferentes, y 80 desubiquitinasas diferentes (Wong *et al.*, Drug. Discov. Today, 8:746-754 (2003)).

La ubiquitina constiene siete restos lisina (Lys6, Lys11, Lys27, Lys33, Lys29, Lys48, y Lys63), y por tanto la propia ubiquitina pueden actúar como proteína diana para la ubiquitinación (Peng *et al.*, Nat. Biotechnol., 21: 921-926 (2003); Pickart y Fushman, Curr. Opin. Chem. Biol., 8:610-616 (2004)). La molécula producida después de la ubiquitinación de una proteína de ubiquitina se denomina molécula de poliubiquitina, y puede comprender dos o más restos ubiquitina. La ubiquitinación de la ubiquitina puede producirse, en teoría, en cualquiera de los siete restos lisina (Peng *et al.*, Nat. Biotechnol., 21: 921-926 (2003)), de modo que existen diferentes especies de poliubiquitina que tienen enlaces isopeptídicos a diferentes restos lisina dentro de la ubiquitina. Es posible que una única molécula de poliubiquitina con más de dos restos restos ubiquitina tenga más de un tipo de enlace de lisina. Los estudios han demostrado que la enzima E2 influye en el tipo de enlace de lisina creado entre una molécula de ubiquitina y otra (Tenno *et al.*, Genes to Cells, 9:865-875 (2004); Deng *et al.* (2000); Hofmann y Pickart (2001)). La poliubiquitina y la ubiquitina existen ambas como moléculas libres y en unión covalente con una proteína diana.

Al igual que la ubiquitina, se ha descubierto la implicación de la poliubiquitina en muchos procesos celulares, incluyendo el tráfico intracelular, la endocitosis, la expresión/silenciamiento de genes, la proteolisis, la activación de quinasas, la traducción, y la reparación del ADN (Hoege *et al.*, Nature, 419:135-141 (2002); Spence *et al.*, Mol. Cell. Biol., 15:1265-1273 (1995); Hofmann y Pickart, Cell, 96: 645-653 (1999)). Sin embargo, la poliubiquitina y la poliubiquitinación tienen unos papeles fisiológicos notablemente diferentes a los de la monoubiquitina y la monoubiquitinación en las mismas vías. Por ejemplo, mientras que la monoubiquitinación de PCNA después de daños en el ADN produce la activación de ADN polimerasas propensas a errores, la poliubiquitinación de PCNA en el mismo resto en el que se observa la monoubiquitinación produce la activación de la reparación del ADN sin errores (Stelter y Ulrich, Nature, 425:188-191 (2003); Hoege *et al.*, Nature, 419:135-141 (2002); Spence *et al.*, Mol. Cell. Biol., 15:1265-1273 (1995); y Hofmann y Pickart, Cell, 96:645-653 (1999)).

Incluso las poliubiquitinas que tienen diferentes enlaces de lisina parecen desempeñar papeles fisiológicos diferentes. Las dos mejor estudiadas son las poliubiquitinas unidas a Lys48 y unidas a Lys63, y los estudios estructurales de ambas sugieren que las poliubiquitinas con diferentes enlaces de lisina pueden adoptar conformaciones muy diferentes, lo cual permite diferentes interacciones con compañeros de unión seleccionados (Tenno *et al.*, Genes to Cells, 9:865-875 (2004)). La modificación covalente por la poliubiquitina unida a Lys48

generalmente marca a la proteína diana para la degradación proteolítica, aunque existen pruebas de que la poliubiquitina unida a Lys48 también puede regular ciertas proteínas por medios no proteolíticos (Chau *et al.*, Science, 243:1576-1583 (1989); Finley *et al.*, Mol. Cell. Biol., 14: 5501-5509 (1994); Flick *et al.*, Nat. Cell. Biol., 6:634-641 (2004)). Por contraste, las poliubiquitinas unidas a Lys63 se han relacionado con una diversidad de vías intracelulares no proteolíticas, incluyendo la reparación del ADN (las células de levadura que expresan K63R-ubiquitina tienen defectos en la reparación del ADN), la activación de quinasas, el tráfico intracelular, y la traducción (Pickart y Fushman, Curr. Opin, Chem. Biol. 8:610-616 (2004); Hicke y Dunn, Annu Rev. Cell Dev. Biol., 19:141-172 (2003); Spece *et al.*, Mol. Cell Biol., 15:1265-1273 (1995); Ulrich, Eukaryot. Cell, 1:1-10 (2002); Spence *et al.*, Cell, 102: 67-76 (2000); Seibenhener *et al.*, Mol. Cell. Biol., 24(18):8055-8068 (2004)). En un ejemplo específico, la sinfilina 1 normalmente es ubiquitinada con poliubiquitina unida a K63 por la parkina de una manera independiente de proteasomas, pero la sinfilina 1, de modo alternativo, puede ser marcada para la destrucción mediante una ubiquitinación con poliubiquitina unida a K48 (Lim *et al.*, J. Neurosci., 25(8):2002-2009 (2005)). Un análisis de sujetos con enfermedad de Parkinson demuestra que la K63-poliubiquitinación de la sinfilina 1 puede estar implicada en la formación de inclusiones de cuerpos de Lewy asociadas con esta enfermedad (Lim *et al.*, J. Neurosci., 25(8):2002-2009 (2005)).

Otras poliubiquitinas unidas as de lisina no se han estudiado a fondo, en gran medida debido a la dificultad de distinguirlas. Hasta la fecha, los estudios se han basado en células que expresan ubiquitinas mutagenizadas en las que una o más lisinas se han eliminado, en poliubiquitinas sintetizadas de modo enzimático con enlaces concretos, o en técnicas tales como la espectrometría de masas para distinguir entre un tipo u otro de poliubiquitina. Cada una de estas metodologías no está indicada o es incómoda para el análisis del comportamiento fisiológico normal de poliubiquitinas unidas as de lisina concretos. Aunque existen anticuerpos que son específicos para la poliubiquitina, en oposición a la monoubiquitina (Fujimoro *et al.*, FEBS Lett., 349:173-180 (1994)), todavía no existen anticuerpos que puedan distinguir entre las poliubiquitinas con diferentes enlaces de lisina.

De modo poco sorprendente, debido a sus importantes papeles en una diversidad de procesos celulares, la ubiquitina y las poliubiquitinas también se han implicado en muchas enfermedades (*véase* Argiles, Ubiquitin and Disease, R.G. Landes (1998)). Se observa la desregulación de la ubiquitina en el desgaste muscular (Mitch y Goldberg, New Engl. J. Med., 335:1897-905 (1996); Bodine *et al.*, Science, 294:1704-1708 (2001)). Se han relacionado varias enfermedades genéticas con una actividad aberrante de la ubiquitina, incluyendo la fibrosis quística (Ward *et al.*, Cell 83: 121-127 (1995)), el síndrome de Angelman (Kishino *et al.*, Nature Genet., 15:70-73 (1997)), y el síndrome de Liddle (Staub *et al.*, EMBO J., 16:6325-6336 (1997)). La ubiquitina también desempeña un papel en las respuestas inmunológicas e inflamatorias; por ejemplo, se ha descubierto que la ubiquitina extracelular actúa como una especie de citoquina, inhibiendo la respuesta de TNFα a endotoxinas en células mononucleares de sangre periférica y regulando la hiporrespuesta a endotoxinas (Majetschak *et al.*, Blood, 101:1882-1890 (2003); Ciechanover, EMBO J., 17:7151-7160 (1998)). Además se ha descubierto tanto la ubiquitina como la poliubiquitina en suero humano, observándose unos niveles mayores de ambas moléculas en el suero de pacientes que tienen una enfermedad parasitaria y alérgica (Takada *et al.*, Clinical Chem., 43:1188-1195(1997)).

La desregulación de varias vías mediadas por ubiquitina también está implicada en el cáncer (Spataro *et al.*, Br. J. Cancer, 77:448-455 (1998); Beckmann *et al.*. Hum. Mutat., 25:507-512 (2005)). Por ejemplo, las mutaciones en la ubiquitina ligasa heterodimérica BRCA1-BARD1 se han correlacionado con el cáncer de mama (Hashizume *et al.*, J. Biol. Chem., 276:14537-14540 (2001)), las mutaciones que alteran la capacidad de Myc para ser degradado por la vía de la ubiquitina activan el potencial oncogénico de c-Myc (Salghetti *et al.*, EMBO J., 18:717-726 (1999)), y v-Jun transformado es incapaz de ser ubiquitinado y degradado como sí lo es su homólogo no oncogénico c-Jun, produciendo un crecimiento incontrolado (Ciechanover, EMBO J., 17: 7151-7160 (1998); Trier *et al.*, Cell, 78:787-798 (1994)).

La ubiquitina y la poliubiquitina se han estudiado en particular en el contexto de las enfermedades neurológicas (Chung *et al.*, TINS 24(supl. 11), S7-S14 (2001)). Las inclusiones, los cuerpos y las madejas neurofibrilares que se acumulan en la enfermedad de Huntington, la ataxia espinocerebelar, las encefalopatías por priones, la enfermedad de Pick, la enfermedad de los cuerpos de Lewy, la enfermedad de Parkinson, y la enfermedad de Alzheimer se tiñen de modo inmunopositivo para la mono- y/o poliubiquitina (Alves-Rodrigues *et al.*, Trends Neurosci., 21:516-520 (1998); Cammarata *et al.*, Neurosci. Lett., 156:96-98 (1993); Kalchman *et al.*, J. Biol. Chem., 271:19385-19394 (1996); Holmberg *et al.*, Human Mol. Genet., 7:913-918 (1998); Yedidia *et al.*, EMBO J., 20:5383-5391 (2001); Mori *et al.*, Science, 235:1641-1644 (1987); Leigh *et al.*, Acta Neuropathol. (Berl.), 79:61-72 (1989); y Kuzuhara *et al.*, Acta Neuropathologica, 75:345-353 (1988)). Varias formas de la enfermedad de Parkinson se han relacionado con mutaciones en el gen de la ubiquitina carboxi-terminal hidrolasa L1 (UCH-L1), una desubiquitinasa (Leroy *et al.*, Nature, 395:451-452 (1998)), mientras que otras formas de la enfermedad de Parkinson se han relacionado con mutaciones inactivadoras en la parkina, una proteína ligasa de ubiquitina dependiente de E2 conocida por interaccionar con la enzima conjugadora de ubiquitina UbcH7 y que ubiquitina la sinfilina 1 (Shimura *et al.*, Nature Genet., 25:302-305 (2000), Zhang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 97:13354-13359 (2000); Lim *et al.*, J. Neurosci., 25(8):2002-2009 (2005)). Ambos tipos de mutaciones provocan un procesamiento proteolítico aberrante y la agregación inapropiada de proteínas (véase McNaught *et al.*, Nature Rev. Neurosci., 2:589-594 (2001)). También se ha descubierto que las mutaciones en UCH-L1 se segregan con la enfermedad de Huntington (Naze *et al.*, Neurosci. Lett., 328, 1:1-4 (2002)). Se ha identificado una forma mutante de ubiquitina en el cerebro de pacientes con

Alzheimer que se incorpora de modo muy eficaz en las cadenas de poliubiquitina, pero que es refractaria a la desubiquitinación cuando ya se ha formado, conduciendo potencialmente a la inhibición dominante del sistema de procesamiento proteolítico celular normal (Lam *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 97:9902-9906 (2000)).

Es evidente que sería beneficioso contar no sólo con composiciones y métodos que puedan distinguir entre poliubiquitinas con diferentes enlaces de lisina, sino también contar con composiciones y métodos que sean eficaces para dirigirse y modular a las vías mediadas por ubiquitina y poliubiquitina. La invención proporcionada en la presente se refiere a estas composiciones y métodos.

Sumario de la invención

La invención se refiere a nuevos anticuerpos capaces de unirse y/o regular actividades biológicas asociadas con la poliubiquitina.

En una realización, la invención proporciona un anticuerpo aislado, o cualquiera de sus fragmentos de unión al antígeno, que se une de modo específico a la poliubiquitina unida a K63, según se indica en la reivindicación 1.

En la presente se describe un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión al antígeno, que se une de modo específico a la poliubiquitina unida a K63, en el que el anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, no se une de modo específico a la poliubiquitina unida a K48 o a la monoubiquitina, en el que el anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, comprende al menos una secuencia de HVR-H2, en el que HVR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos a b c d e f g h i j k l m n o p (SEQ ID NO:221), y en el que el aminoácido a se selecciona de los aminoácidos tirosina, ácido aspártico y triptófano; el aminoácido b es isoleucina; el aminoácido c se selecciona de los aminoácidos serina, treonina, alanina, fenilalanina, tirosina, y valina; el aminoácido d es prolina; el aminoácido e es tirosina; el aminoácido f se selecciona de los aminoácidos tirosina, fenilalanina, leucina, e histidina; el aminoácido g es glicina; el aminoácido h se selecciona de los aminoácidos serina, glicina, alanina, fenilalanina, y triptófano; el aminoácido i es treonina; el aminoácido j es serina; el aminoácido k es tirosina; el aminoácido l es alanina; el aminoácido m es ácido aspártico; el aminoácido n es serina; el aminoácido o es valina; y el aminoácido p es lisina.

En la presente se describe un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión al antígeno, que se une de modo específico a la poliubiquitina unida a K63, en el que el anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, no se une de modo específico a la poliubiquitina unida a K48 o a la monoubiquitina, y en el que el anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, comprende al menos una secuencia de HVR-H2 seleccionada de las secuencias de HVR-H2 de SEQ ID NO:59-110 y 112. El anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, puede comprender al menos una secuencia de HVR-H2 seleccionada de las secuencias de HVR-H2 DE SEQ ID NO:60, 63, y 66.

En la presente se describe un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión al antígeno, que se une de modo específico a la poliubiquitina unida a K63, en el que el anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, no se une de modo específico a la poliubiquitina unida a K48 o a la monoubiquitina, y en el que el anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, comprende al menos una secuencia de HVR-L2, en el que HVR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos q r s t u v w x (SEQ ID NO:222), en el que el aminoácido q se selecciona de los aminoácidos tirosina y fenilalanina; el aminoácido r se selecciona de los aminoácidos alanina y serina; el aminoácido s es alanina; el aminoácido t se selecciona de los aminoácidos serina, arginina, valina, trenonina, alanina, asparagina, y leucina; el aminoácido u es serina; el aminoácido v es leucina; el aminoácido w es tirosina; y el aminoácido x es serina.

En la presente se describe un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión al antígeno, que se une de modo específico a la poliubiquitina unida a K63, en el que el anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, no se une de modo específico a la poliubiquitina unida a K48 o a la monoubiquitina, y en el que el anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, comprende al menos una secuencia de HVR-L2 seleccionada de las secuencias de HVR-L2 de SEQ ID NO:7-58 y 111. El anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, puede comprender al menos una secuencia de HVR-L2 seleccionada de las secuencias de HVR-L2 de SEQ ID NO:8, 11, y 14.

En la presente se describe un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión al antígeno, que se une de modo específico a la poliubiquitina unida a K63, en el que el anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, no se une de modo específico a la poliubiquitina unida a K48 o a la monoubiquitina, en el que el anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, comprende al menos una secuencia seleccionada de HVR-L2 y HVR-L2, en el que HVR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos a b c d e f g h i j k l m n o p (SEQ ID NO:221), y en el que el aminoácido a se selecciona de los aminoácidos tirosina, ácido aspártico y triptófano; el aminoácido b es isoleucina; el aminoácido c se selecciona de los aminoácidos serina, treonina, alanina, fenilalanina, tirosina, y valina; el aminoácido d es prolina; el aminoácido e es tirosina; el aminoácido f se selecciona de los aminoácidos tirosina, fenilalanina, leucina, e histidina; el aminoácido g es glicina; el aminoácido h se selecciona de los aminoácidos serina, glicina, alanina, fenilalanina, y triptófano; el aminoácido i es treonina; el aminoácido j es serina; el aminoácido k es tirosina; el aminoácido l es alanina; el aminoácido m es ácido aspártico; el aminoácido n es serina; el aminoácido o es valina; y el aminoácido p es lisina; y en el que HVR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos q r s t u v w x (SEQ ID NO:222), en el que el aminoácido q se selecciona de los aminoácidos tirosina y fenilalanina; el aminoácido r se selecciona de los aminoácidos alanina y serina; el aminoácido s es alanina; el aminoácido t se selecciona de los aminoácidos serina, arginina, valina, trenonina, alanina, asparagina, y leucina; el aminoácido u es serina; el

aminoácido v es leucina; el aminoácido w es tirosina; y el aminoácido x es serina.

En la presente se describe un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión al antígeno, que se une de modo específico a la poliubiquitina unida a K63, en el que el anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, no se une de modo específico a la poliubiquitina unida a K48 o a la monoubiquitina, en el que el anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, comprende al menos una secuencia de HVR-L2 y al menos una secuencia de HVR-L2, en el que HVR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos a b c d e f g h i j k l m n o p (SEQ ID NO:221), y en el que el aminoácido a se selecciona de los aminoácidos tirosina, ácido aspártico y triptófano; el aminoácido b es isoleucina; el aminoácido c se selecciona de los aminoácidos serina, treonina, alanina, fenilalanina, tirosina, y valina; el aminoácido d es prolina; el aminoácido e es tirosina; el aminoácido f se selecciona de los aminoácidos tirosina, fenilalanina, leucina, e histidina; el aminoácido g es glicina; el aminoácido h se selecciona de los aminoácidos serina, glicina, alanina, fenilalanina, y triptófano; el aminoácido i es treonina; el aminoácido j es serina; el aminoácido k es tirosina; el aminoácido l es alanina; el aminoácido m es ácido aspártico; el aminoácido n es serina; el aminoácido o es valina; y el aminoácido p es lisina; y en el que HVR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos q r s t u v w x (SEQ ID NO:222), en el que el aminoácido q se selecciona de los aminoácidos tirosina y fenilalanina; el aminoácido r se selecciona de los aminoácidos alanina y serina; el aminoácido s es alanina; el aminoácido t se selecciona de los aminoácidos serina, arginina, valina, trenonina, alanina, asparagina, y leucina; el aminoácido u es serina; el aminoácido v es leucina; el aminoácido w es tirosina; y el aminoácido x es serina.

En la presente se describe un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión al antígeno, que se une de modo específico a la poliubiquitina unida a K63, en el que el anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, no se une de modo específico a la poliubiquitina unida a K48 o a la monoubiquitina, en el que el anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, comprende al menos una secuencia de HVR-H2 seleccionada de las secuencias de HVR-H2 de SEQ ID NO:59-110 y 112, y al menos una secuencia de HVR-L2 seleccionada de las secuencias de HVR-L2 DE SEQ ID NO:7-58 y 111.

En la presente se describe un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión al antígeno, que se une de modo específico a la poliubiquitina unida a K63, en el que el anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, no se une de modo específico a la poliubiquitina unida a K48 o a la monoubiquitina, en el que el anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, comprende al menos una secuencia de HVR-H2 seleccionada de las secuencias de HVR-H2 de SEQ ID NO:60, 63 y 66, y al menos una secuencia de HVR-L2 seleccionada de las secuencias de HVR-L2 DE SEQ ID NO:8, 11, y 14.

En la presente se describe un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión al antígeno, que se une de modo específico a la poliubiquitina unida a K63, en el que el anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, no se une de modo específico a la poliubiquitina unida a K48 o a la monoubiquitina, en el que el anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, comprende secuencias de aminoácidos de HVR seleccionadas de las secuencias de aminoácidos de HVR-H2 y HVR-L2 indicadas para cualquiera de Apu3.A8-Apu3.H10 en la tabla B. Las secuencias de aminoácidos de HVR pueden seleccionarse de las secuencias de aminoácidos de HVR-H2 y HVR-L2 indicadas para cualquiera de Apu3.A8, Apu3.A12, y Apu3.B3 en la tabla B.

En la presente se describe un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, que comprende al menos una secuencia de HVR seleccionada de la secuencia de HVR-H1 de SEQ ID NO:5, la secuencia de HVR-H3 de SEQ ID NO:6, la secuencia de HVR-L1 de SEQ ID NO:3, y la secuencia de HVR-L3 de SEQ ID NO:4. El anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, puede comprender al menos dos secuencias de HVR seleccionadas de la secuencia de HVR-H1 de SEQ ID NO:5, la secuencia de HVR-H3 de SEQ ID NO:6, la secuencia de HVR-L1 de SEQ ID NO:3, y la secuencia de HVR-L3 de SEQ ID NO:4. El anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, puede comprender al menos tres secuencias de HVR seleccionadas de la secuencia de HVR-H1 de SEQ ID NO:5, la secuencia de HVR-H3 de SEQ ID NO:6, la secuencia de HVR-L1 de SEQ ID NO:3, y la secuencia de HVR-L3 de SEQ ID NO:4. El anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, puede comprender la secuencia de HVR-H1 de SEQ ID NO:5, la secuencia de HVR-H3 de SEQ ID NO:6, la secuencia de HVR-L1 de SEQ ID NO:3, y la secuencia de HVR-L3 de SEQ ID NO:4.

El anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, puede tener una afinidad mejorada por la poliubiquitina unida a K63, con relación a la afinidad del Fab de origen Apu2.16 por la poliubiquitina unida a K63. El anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, tiene unos valores K_d para la poliubiquitina unida a K63 menores o iguales que 10 nM, medidos mediante resonancia de plasmón de superficie BIAcore™.

En la presente se describe un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión al antígeno, que se une al mismo determinante antigénico sobre la poliubiquitina que cualquiera de los anteriores anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, en el que el anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, no se une de modo específico a la monoubiquitina. En la presente se describe un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión al antígeno, que compite con cualquiera de los anteriores anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno por la unión a la poliubiquitina, en el que el anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, no se une de modo específico a la monoubiquitina.

En la presente se describe un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión al antígeno, que se une a un epitopo en la poliubiquitina unida a K63. El epitopo puede incluir restos en una primera subunidad de ubiquitina y en una

segunda unidad de ubiquitina de la poliubiquitina unida a K63. El epitopo puede incluir al menos un resto en una primera subunidad de ubiquitina seleccionado de Glu-18, Pro-19, Ser-20, Asp-21, Thr-55, Leu-56, Ser-57, Asp-58, Asn-60, Ile-61, y Gln-62. El epitopo puede incluir al menos un resto en una segunda subunidad de ubiquitina seleccionado de Leu-8, Thr-9, Glu-34, Gly-35, Ile-36, Pro-37, Asp-39, Gln-40, Leu-71, Arg-72, Leu-73, Arg-74, y Gly-75. El epitopo puede incluir al menos un resto en una primera subunidad de ubiquitina seleccionado de Glu-18, Pro-19, Ser-20, Asp-21, Thr-55, Leu-56, Ser-57, Asp-58, Asn-60, Ile-61, y Gln-62, y al menos un resto en una segunda subunidad de ubiquitina seleccionado de Leu-8, Thr-9, Glu-34, Gly-35, Ile-36, Pro-37, Asp-39, Gln-40, Leu-71, Arg-72, Leu-73, Arg-74, y Gly-75. La porción N-terminal de HVR-H3 puede estar en contacto con los restos C-terminales y Q40 de la ubiquitina donante. La parte distal de HVR-H3 puede estar en contacto con el bucle 50s de la ubiquitina aceptora K63. La porción N-terminal de HVR-H3 puede estar en contacto con los restos 72-74 C-terminales y Q40 de la ubiquitina donante, mientras que los restos R102 e Y103 de HVR-H3 están en contacto con el bucle 50s de la ubiquitina aceptora K63. Los restos C-terminales de la ubiquitina donante pueden estar en contacto con el anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno. Los restos de la ubiquitina donante implicados en el contacto pueden ser L73 y R74.

En la presente se describe un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión al antígeno, que comprende una mejor compatiblidad electrostática entre su cadena ligera y la superficie de una ubiquitina aceptora K63. El anticuerpo aislado, o un fragmento de unión al antígeno, puede comprender una Arg en la posición 52 de HVR-L2. El anticuerpo aislado, o un fragmento de unión al antígeno, puede comprender una Arg en la posición 66 de la región estructural de la cadena ligera. El anticuerpo aislado, o un fragmento de unión al antígeno, puede comprender una Arg en la posición 52 de HVR-L2, y una Arg en la posición 66 de la región estructural de la cadena ligera.

Cualquiera de los anteriores anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno, se une de modo específico a una proteína poliubiquitinada unida a K63. El anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, puede inhibir la degradación de la proteína poliubiquitinada unida a K63. El anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, puede modular al menos una vía de señalización mediada por poliubiquitina. El anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, puede inhibir al menos una vía de señalización mediada por poliubiquitina. El anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, puede estimular al menos una vía de señalización mediada por poliubiquitina.

En una realización, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, según la reivindicación 1. En otra realización, la invención proporciona un vector que comprende dicha molécula de ácido nucleico. En otra realización, la invención proporciona una célula hospedante que comprende dicho vector. En otra realización, la invención proporciona una línea celular capaz de producir los anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno, según la reivindicación 1. En otra realización, la invención proporciona un método para producir los anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno, según la reivindicación 1, que comprende cultivar una célula hospedante que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, bajo unas condiciones en las que se produce el anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno.

En otra realización, la invención proporciona una composición que comprende una cantidad eficaz de los anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno, según la reivindicación 1, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición puede comprender dos o más de los anteriores anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno.

En otra realización, la invención proporciona un método para identificar la presencia de poliubiquitina unida a K63 o una proteína poliubiquitinada unida a K63 en una muestra, que comprende poner en contacto la muestra con al menos uno de los anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno, según la reivindicación 1.

En la presente se describe un método para el tratamiento de una enfermedad o un trastorno asociado con la desregulación de la poliubiquitina en un paciente, comprendiendo dicho método la administración a un paciente de una cantidad eficaz de al menos uno de los anteriores anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno. El paciente puede ser un paciente mamífero. El paciente puede ser un ser humano. La enfermedad puede seleccionarse del cáncer, un trastorno muscular, un trastorno genético relacionado con la vía de la ubiquitina, un trastorno inmunológico/inflamatorio, y un trastorno neurológico. La enfermedad puede seleccionarse de carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, leucemia, distrofia muscular, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, fibrosis quística, síndrome de Angelman, síndrome de Liddle, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pick, y enfermedad de Paget.

En otra realización, la invención proporciona un método para determinar la presencia de una poliubiquitina unida a K63 o una proteína poliubiquitinada unida a K63 en una muestra sospechosa de contener una poliubiquitina unida a K63 o una proteína poliubiquitinada unida a K63, que comprende exponer la muestra al menos a uno de los anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno, según la reivindicación 1, y determinar la unión de dicho al menos un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno, a una poliubiquitina unida a K63 o una proteína poliubiquitinada unida a K63 en la muestra.

En otra realización, la invención proporciona un método para separar una proteína poliubiquitinada unida a K63 de una proteína poliubiquitinada sin unión a K63 en una muestra, que comprende poner en contacto la muestra con al

menos uno de los anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno, según la reivindicación 1.

En la presente se describe un método para determinar la función y/o la actividad de la poliubiquitina unida a K63 en una célula, que comprende poner en contacto la célula con al menos uno de los anteriores anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno, y evaluar el efecto de dicha etapa de contacto sobre la célula. En otra realización, la invención proporciona un método para determinar la función y/o la actividad de la poliubiquitina unida a K63 en una muestra, que comprende poner en contacto la muestra con al menos uno de los anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno, según la reivindicación 1, y evaluar el efecto de dicha etapa de contacto sobre la muestra.

Un anticuerpo de la invención puede estar en cualquiera de una serie de formas. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede ser un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano. En una realización, un anticuerpo de la invención no es un anticuerpo humano, por ejemplo no es un anticuerpo producido en un xenorratón (por ejemplo, según se describe en el documento WO 96/337335). Un anticuerpo de la invención puede tener la longitud completa o ser cualquiera de sus fragmentos (por ejemplo, un fragmento que comprende un componente de unión al antígeno). En otra realización, la invención proporciona un fragmento de unión al antígeno de uno cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la estructura primara de la ubiquitina y representaciones esquemáticas de ciertos enlaces isopeptídicos de la poliubiquitina. La figura 1A muestra la secuencia de aminoácidos de la ubiquitina humana (SEQ ID NO:223), indicándose los restos lisina en negrita y subrayado. La figura 1B muestra una representación esquemática del enlace formado entre la lisina 48 o la lisina 63 de una primera molécula de ubiquitina y el resto glicina C-terminal de una segunda molécula de ubiquitina.

Las figuras 2A E muestra las estructuras cristalinas de moléculas pertinentes, según se analiza en el ejemplo 4. La figura 2A muestra el complejo entre la diubiquitina unida a K63 (parte superior de la figura) y el fragmento Fab de Apu2.16 (parte inferior de la figura, con la cadena ligera a la izquierda y la cadena pesada a la derecha), y muestra que la CDR3 de la cadena pesada (“H3”) está en contacto con ambas cadenas de ubiquitina en ambos lados del enlace isopeptídico. La cadena lateral de H3 a 4,2 Å de la diubiquitina, y las cadenas laterales de la ubiquitina a 4,2 Å de H3 se muestran como barras. Los restos marcados en negrita son restos de la ubiquitina, mientras que los otros restos marcados (no con negrita) son restos del Fab. Se muestra la K63 en la ubiquitina aceptora como una esfera. La figura 2B muestra la comparación de las estructuras de la diubiquitina unida a K63 (superior) y unida a K48 (inferior). En ambos casos, la ubiquitina aceptora de lisina está a la izquierda y la ubiquitina donante está a la derecha de la figura. La diubiquitina unida a K48 forma una figura más compacta extendiéndose la cadena en perpendicular al dímero de ubiquitina comparado con el dímero de K63, cuya cadena se extiende de manera más alargada. La figura 2C es una superposición de la estructura cristalina de Apu2.16 mostrada en la figura 2A sobre la estructura cristalina de Apu3.A8, que muestra el emplazamiento de los dos cambios en L2 (S52R) y H3 (S52T) introducidos durante el proceso de maduración de la afinidad para crear Apu3.A8. La figura 2D muestra una comparación de las estructuras de Apu2.16, Apu3.A8 y un variante de 4D5 humanizado (pdb 1FVE). Las regiones Fv de Apu2.16 y Apu3.A8 se muestran como tubos y superpuestos sobre la región Fv del variante del anticuerpo 4D5 anti-Her2 humanizado. En la representación superior, las regiones CDR están marcadas; en la representación inferior, las regiones Fv están rotadas a 90 º para mostrar los N-terminales. La figura 2E muestra la complementariedad de carga entre Apu3.A8 (inferior) y la diubiquitina (superior). Las superficies electrostáticas se calcularon con PyMol. Las regiones de potencial positivo están sombreadas; las regiones con potencial negativa están sombreadas e indicadas con líneas discontinuas.

Las figuras 3A D muestran los resultados de los experimentos de transferencia Western descritos en el ejemplo 1(E). La figura 3A muestra la unión del Fab anti-poliubiquitina unida a K63 de origen Apu2.16 a la diubiquitina unida a K63 inmovilizada y la ausencia de unión a la diubiquitina unida a K48 inmovilizada. La figura 3B muestra la unión del Fab anti-poliubiquitina unida a K63 Apu3.A8 a la diubiquitina unida a K63 inmovilizada y la ausencia de unión a la diubiquitina unida a K48 inmovilizada. La figura 3C muestra la unión del Fab anti-poliubiquitina unida a K63 Apu3.A12 a la diubiquitina unida a K63 inmovilizada y la ausencia de unión a la diubiquitina unida a K48 inmovilizada. La figura 3D muestra la unión del Fab anti-poliubiquitina unida a K63 Apu3.B3 a la diubiquitina unida a K63 inmovilizada y la ausencia de unión a la diubiquitina unida a K48 inmovilizada.

La figura 4 muestra los resultados de los experimentos de transferencia Western descritos en el ejemplo 2. La figura muestra la poca unión de la IgG Apu2.16 de origen a la di- a heptaubiquitina unida a K63 inmovilizada o a la di- a heptaubiquitina unida a K48 inmovilizada. La figura también muestra la unión de cada uno de los anticuerpos anti-poliubiquitina unida a K63 con maduración de la afinidad Apu3.A12, Apu3.B3, y Apu3.A8 a la di- a heptaubiquitina unida a K63 inmovilizada y la ausencia de unión a la di- a heptaubiquitina unida a K48 inmovilizada.

La figura 5 muestra los resultados de los experimentos de transferencia Western descritos en el ejemplo 2. La figura muestra que, aunque el anticuerpo anti-poliubiquitina unida a K63 de origen Apu2.16 no es capaz de detectar Traf6 ubiquitinado unida a K63, los anticuerpos con maduración de la afinidad Apu3.A12, Apu3.B3, y Apu3.A8 fueron capaces de detectar de modo específico a Traf6 ubiquitinado unida a K63 en un formato de transferencia Western.

Las figuras 6A B muestran los resultados de los experimentos de transferencia Western para evaluar la capacidad de diversos anticuerpos anti-poliubiquitina unida a K63 para inmunoprecipitar Traf6 unida a K63 de lisados celulares, según se describe en el ejemplo 2. Los anticuerpos con maduración de la afinidad Apu3.A8, Apu3.B3, y Apu3.A12 fueron más capaces de inmunoprecipitar Traf6 poliubiquitinado unida a K63 que el anticuerpo de origen Apu2.16.

Las figuras 7A K muestran los resultados de experimentos de espectrometría de masas confirmatorios, según se describe en el ejemplo 3. La figura 7A muestra los resultados de experimentos de espectrometría de masas para confirmar que las proteínas inmunoprecipitadas por los anticuerpos con maduración de la afinidad Apu3.A8, Apu3.B3, y Apu3.A12 estaban principalmente ubiquitinadas unida a K63, según se describe en el ejemplo 2. La figura 7B muestra que la unión a K48 no resultaba enriquecido utilizando esta estrategia, y así se demuestra la especificidad del anticuerpo K63 por el enlace de la cadena K63. Las figuras 7C-F muestran gráficas de barras de los datos obtenidos de experimentos de inmunoprecipitación que emplean el anticuerpo anti-poliubiquitina unida a K48 Apu2.07, el anticuerpo anti-poliubiquitina unida a K63 Apu3.A8, o un anticuerpo control de isotipo (anti-Her2), seguido de un análisis espectrométrico de masas para determinar la cantidad total de ubiquitina inmunoprecipitada (figura 7C), así como los tipos de enlaces de poliubiquitina presentes en el lisado (figura 7D) y los inmunoprecipitados específicos de anticuerpo (anti-poliubiquitina unida a K48 en la figura 7E; anti-poliubiquitina unida a K63 en la figura 7F). La figura 7G muestra de modo esquemático las reacciones de autoubiquitinación de MuRF1 realizadas *in vitro* con ubiquitina WT (de tipo salvaje), K48R o K63R, seguido de una inmunoprecipitación con Apu2.07, Apu3.A8, o un anticuerpo control con correspondencia de isotipo. Los números entre paréntesis indican los carriles y las columnas pertinentes en las figuras 7H-K. La figura 7H muestra una transferencia Western que incluye las reacciones representadas de modo esquemático en la figura 7G. La transferencia se sondó con un anticuerpo pan-ubiquitina. Las líneas punteadas horizontales indican la porción del gel que se cortó y se sometió a un análisis mediante espectrometría de masas. Las figuras 7I-K muestras gráficas de barras de los datos de la espectrometría de masas obtenidos a partir de los experimentos para determinar los enlaces de la polubiquitina en las reacciones de autoubiquitinación y las inmunoprecipitaciones representadas de modo esquemático en la figura 7G.

La figura 8A representa de modo esquemático la vía de señalización estimulada por la unión del factor de necrosis tumoral-alfa (TNFα) al receptor del factor de necrosis tumoral 1 (TNFR1) *in vivo*. La figura 8B representa de modo esquemático la vía de señalización estimulada por la unión de IL-1β al IL-1R1 *in vivo*.

La figura 9A muestra análisis de la transferencia Western a partir de los experimentos de inmunoprecipitación para detectar el estado de ubiquitinación de RIP, según se describe en el ejemplo 3. Con el objetivo de describir sólo esta figura, a las transferencias se les asignaron números secuenciales del 1 al 7, asignándose el número 1 a la transferencia superior y asignándose el número 7 a la transferencia inferior. La transferencia 6 incluye las muestras que fueron inmunoprecipitadas con IgG anti-enlace a K48 para capturar las proteínas poliubiquitinadas unida a K48. La transferencia 7 incluye las muestras que fueron inmunoprecipitadas con un cóctel 1:1 de Apu3.A8 y Apu3.B3 para capturar las proteínas poliubiquitinadas unida a K63. Ambas transferencias se tiñeron con un anticuerpo anti-RIP. Las transferencias 1-3 muestran análisis de la transferencia Western para demostrar que los niveles de RIP y tubulina permanecen relativamente constantes durante el tratamiento con TNFα (transferencias 1 y 3), mientras que los niveles de IκBα disminuyen tras el tratamiento con TNFα (transferencia 2). Las transferencias 4 y 5 muestran análisis de la transferencia Western control para demostrar que RIP es coprecipitado durante una inmunoprecipitación para TNFR1 (transferencia 4), y que los niveles de TNFR1 permanecen constantes durante el tratamiento con TNFα (transferencia 5). La figura 9B representa de modo esquemático la vía celular mediante la cual la poliubiquitina unida a K63 se añade a RIP y es reemplazada por poliubiquitina unida a K48 por A20.

La figura 10 muestra los resultados de los experimentos descritos en el ejemplo 3(B) que evalúan el estado de poliubiquitinación de IRAK1 después de una estimulación con IL-1β de células. Los niveles totales de IRAK1, IκBα y tubulina se muestran en las figura 10A y 10B. La figura 10C muestra análisis de la transferencia Western que evalúan a IRAK1 que está modificado con poliubiquitina unida a K48 (panel superior) o poliubiquitina unida a K63 (panel inferior). La figura 10D muestra un análisis de la transferencia Western que indica el efecto del inhibidor de proteasas MG-132 sobre la degradación de IRAK1 poliubiquitinado.

La figura 11 muestra imágenes de microscopía de inmunofluorescencia de células HeLa teñidas sólo con un anticuerpo anti-poliubiquitina unida a K48 o sólo con un anticuerpo anti-poliubiquitina unida a K63 (figura 11A o figura 11D, respectivamente), o que incluyen también un anticuerpo policlonal que reconoce las subunidades de proteasoma 20S (figuras 11B y 11E, respectivamente), según se describe en el ejemplo 5. La flecha indica la tinción entre cuerpos. En las imágenes fusionadas (figuras 11C y 11F), una tinción muy brillante indica la colocalización potencial, y la tinción menos brillante se corresponde con los núcleos marcados con DAPI. Las barras en cada figura representan 50 μm.

Las figuras 12A y 12B y la figura 13 muestran ejemplos de secuencias estructurales consenso humanas aceptoras para su uso en la práctica de la presente invención con los siguientes identificadores de secuencia:

Regiones estructurales consenso del dominio variable de la cadena pesada (VH) (figuras 12A y 12B)

Región estructural consenso del subgrupo I de VH humano menos las CDR de Kabat (SEQ ID NO:113-116)

Región estructural consenso del subgrupo I de VH humano menos las regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NO:117-128)

Región estructural consenso del subgrupo II de VH humano menos las CDR de Kabat (SEQ ID NO:129-132)

Región estructural consenso del subgrupo II de VH humano menos las regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NO:133-144)

Región estructural consenso del subgrupo III de VH humano menos las CDR de Kabat (SEQ ID NO:145-148)

Región estructural consenso del subgrupo III de VH humano menos las regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NO:149-160)

Región estructural aceptora de VH humano menos las CDR de Kabat (SEQ ID NO:161-164)

Región estructural aceptora de VH humano menos las regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NO:165-172)

Región estructural aceptora 2 de VH humano menos las CDR de Kabat (SEQ ID NO:173-176)

Región estructural aceptora 2 de VH humano menos las regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NO:177-188)

Regiones estructurales consenso del dominio variable de la cadena ligera (VL) (figura 13)

Región estructural consenso del subgrupo I de VL kappa humano (SEQ ID NO:189-192)

Región estructural consenso del subgrupo II de VL kappa humano (SEQ ID NO:193-196)

Región estructural consenso del subgrupo III de VL kappa humano (SEQ ID NO:197-200)

Región estructural consenso del subgrupo IV de VL kappa humano (SEQ ID NO:201-204)

La figura 14 muestra las secuencias de la región estructural de las cadenas ligera y pesada de huMAb4D5-8. Los números en superíndice/negrita indican las posiciones de los aminoácidos según Kabat.

La figura 15 muestra las secuencias de la región estructural modificadas/variantes de las cadenas ligera y pesada de huMAb4D5-8. Los números en superíndice/negrita indican las posiciones de los aminoácidos según Kabat.

Modos para realizar la invención

Técnicas generales

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica, e inmunología, que están dentro de los conocimientos de la técnica. Estas técnicas se explican a fondo en la bibliografía, tal como "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3ª edición (Sambrook *et al.*, 2001); "Oligonucleotide Synthesis" (M.J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R.I. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Current Protocols in Molecular Biology" (F.M. Ausubel *et al.*, eds., 1987, y actualizaciones periódicas); "PCR: The Polymerase Chain Reaction" (Mullis *et al.*, ed., 1994); PCR 2: A Practical Approach (M.J. MacPherson, B.D. Hames y G.R. Taylor, eds. (1995)); Harlow y Lane, eds. (1988), Antibodies, A Laboratory Manual; "A Practical Guide to Molecular Cloning" (Perbal Bemard V., 1988); y "Phage Display: A Laboratory Manual" (Barbas *et al.*, 2001).

Definiciones

Tal como se emplean en la presente, los términos “ubiquitina” y “monoubiquitina” se utilizan de modo intercambiable, y se definen como todas las especies de ubiquitina humana nativa y sintética sustancialmente similares a una proteína de 76 aminoácidos que tiene al menos un resto lisina en el aminoácido 6, aminoácido 11, aminoácido 27, aminoácido 29, aminoácido 33, aminoácido 48 y/o aminoácido 63.

Tal como se emplea en la presente, el término “poliubiquitina” se define como todas las especies de cadenas poliméricas de ubiquitina humana nativa y sintética que se encuentran dentro de las clases humanas y sintéticas de diferentes enlaces poliméricos de la ubiquitina que incluyen, pero no se limitan a poliubiquitina unida a K6, poliubiquitina unida a K11, poliubiquitina unida a K27, poliubiquitina unida a K29, poliubiquitina unida a K33, poliubiquitina unida a K48, y poliubiquitina unida a K63. La poliubiquitina puede tener cualquier longitud, e incluye al menos dos restos ubiquitina. La poliubiquitina se distingue de las repeticiones en tándem de la ubiquitina en que se expresa originariamente como una única proteína.

Tal como se emplean en la presente, las expresiones “poliubiquitina unida a K*” y “poliubiquitina unida a Lys*” se utilizan de modo intercambiable, y se refieren a una molécula de poliubiquitina que comprende al menos un enlace isopeptídico entre el C-terminal de un resto ubiquitina y una lisina en la posición * de otro resto ubiquitina. Por ejemplo, una “poliubiquitina unida a K63” se emplea de modo intercambiable con una “poliubiquitina unida a Lys63”,

y ambos términos se refierena a una molécula de poliubiquitina que comprende un enlace isopeptídico entre el C-terminal de uno de los restos ubiquitina en la molécula y la lisina en la posición 63 de otro resto ubiquitina en la molécula.

Tal como se emplea en la presente, la afirmación de que un primer enlace de lisina “es diferente” de un segundo enlace de lisina indica que el primer enlace de lisina entre un resto ubiquitina y otro resto ubiquitina implica un resto lisina diferente (por ejemplo, K6, K11, K27, K29, K33, K48 y/o K63) que el segundo enlace de lisina entre un resto ubiquitina y otro resto ubiquitina.

Tal como se emplea en la presente, la expresión “vía de la ubiquitina” se refiere a una vía bioquímica en una célula o reconstituida *in vitro* que incluye la ubiquitina y/o la poliubiquitina.

Un anticuerpo “aislado” es un anticuerpo que ha sido identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con los usos de investigación, diagnóstico o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En una realización, el anticuerpo se purifica (1) hasta más del 95% en peso del anticuerpo según se determina, por ejemplo, mediante el método de Lowry, y en algunas realizaciones en más del 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de la secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso, por ejemplo, de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE bajo condiciones reductoras o no reductoras utilizando, por ejemplo, tinción de plata o de azul de Coomassie. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes, puesto que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Sin embargo, normalmente el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

Tal como se emplean en la presente, las expresiones “anticuerpo anti-ubiquitina” y “anticuerpo anti-monoubiquitina” se emplean de modo intercambiable, y se refieren a un anticuerpo que es capaz de unirse de modo específico a una molécula de ubiquitina.

Tal como se emplea en la presente, la expresión “anticuerpo anti-poliubiquitina” se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse de modo específico a una molécula de poliubiquitina.

Tal como se emplea en la presente, la expresión “anticuerpo anti-poliubiquitina unida a K48” se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse de modo específico a una molécula de poliubiquitina unida a K48.

Tal como se emplea en la presente, la expresión “anticuerpo anti-poliubiquitina unida a K63” se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse de modo específico a una molécula de poliubiquitina unida a K63.

Las expresiones “sustancialmente similar”, “sustancialmente igual”, “equivalente”, o “sustancialmente equivalente”, tal como se emplean en la presente, indican un grado suficientemente algo de similitud entre dos valores numéricos (por ejemplo, uno asociado con una molécula y el otro asociado con una molécula de referencia/comparativa), de forma que los expertos en la técnica considerarían la diferencia entre los dos valores pequeña o sin importancia biológica y/o estadística dentro del contexto de las características biológicas medidas por dichos valores (por ejemplo, valores de Kd, efectos antivíricos, etc.). La diferencia entre dichos dos valores es, por ejemplo, menor que aproximadamente 50%, menor que aproximadamente 40%, menor que aproximadamente 30%, menor que aproximadamente 20%, y/o menor que aproximadamente 10%, como función del valor para la molécula de referencia/comparativa.

Las expresiones “sustancialmente reducido”, o “sustancialmente diferente”, tal como se emplean en la presente, indican un grado suficientemente algo de diferencia entre dos valores numéricos (en general, uno asociado con una molécula y el otro asociado con una molécula de referencia/comparativa), de forma que los expertos en la técnica considerarían que la diferencia entre los dos valores es estadísticamente significativa dentro del contexto de las características biológicas medidas por dichos valores (por ejemplo, valores de Kd). La diferencia entre dichos dos valores es, por ejemplo, mayor que aproximadamente 10%, mayor que aproximadamente 20%, mayor que aproximadamente 30%, mayor que aproximadamente 40%, y/o mayor que aproximadamente 50%, como función del valor para la molécula de referencia/comparativa.

La “afinidad de unión” en general se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, tal como se emplea en la presente, la “afinidad de unión” se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de una pareja de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañero Y en general puede ser representada medianta la constante de disociación (Kd). La afinidad puede medirse por medio de métodos habituales en la técnica, incluyendo los descritos en la presente. Los anticuerpos de baja afinidad en general se unen con lentitud al antígeno y tienden a disociarse con facilidad, mientras que los anticuerpos de alta afinidad en general se unen al antígeno con más rapidez y tienden a permanecer más tiempo unidos. En la técnica se conoce una diversidad de métodos para medir la afinidad de unión, cualquiera de los cuales puede utilizarse para los objetivos de la presente invención. A continuación se describen realizaciones ilustrativas específicas.

La “Kd” o el “valor de Kd” puede medirse mediante un ensayo de unión a un antígeno radiomarcado (RIA) realizado con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno, según se describe en el siguiente ensayo. Se mide la afinidad de unión en disolución de los Fab por sus antígenos equilibrando los Fab con una concentración mínima de antígeno marcado con ^{125}I en presencia de una serie de titulación de antígeno no marcado, después capturando el antígeno unido con una placa revestida con anticuerpo anti-Fab (Chen, *et al.* (1999), *J. Mol. Biol*., 293:865-881). Para establecer las condiciones para el ensayo, se revistieron placas de microtitulación (Dynex) durante la noche con 5 μg/ml de anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) en carbonato de sodio 50 mM (pH 9,6), y después se bloqueó con albúmina de suero bovino al 2% (en p/v) en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23 ºC). En una placa no adsorbente (Nunc nº 269620) se mezclaron 100 pM o 26 pM de [^{125}I]-antígeno con diluciones en serie de un Fab de interés (por ejemplo, en coherencia con la evaluación de un anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta *et al.* (1997), Cancer Res., 57:4593-4599). El Fab de interés entonces se incuba durante la noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un periodo de tiempo más largo (por ejemplo, 65 horas) para asegurarse de que se alcanza el equilibrio. Después, las mezclas se trasladan a la placa de captura para una incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). Después se retira la disolución y la placa se lava ocho veces con Tween-20 al 0,1% en PBS. Cuando las placas se han secado se añaden 150 μl/pocillo de líquido de centelleo (MicroScint-20, Packard), y las placas se cuentan en un contador gamma Topcount (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de cada Fab que producen menos del 20%, o el mismo valor de unión máxima se eligen para su uso en ensayos de unión competitivos. Según otra realización, la Kd o el valor de Kd se mide utilizando ensayos de resonancia de plasmón de superficie con BIAcore™-2000 o BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 ºC con chips CM5 de antígeno inmovilizado a aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU). Brevemente, se activan chips biodetectores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) con clorhidrato de *N*-etil-*N*'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) según las instrucciones del suministrador. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, hasta 5 μg/ml (aproximadamente 0,2 μM) antes de la inyección a un caudal de 5 μl/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear a los grupos sin reaccionar. En cada experimiento se activa un punto y se bloquea con etanolamina sin proteína inmovilizada, para ser utilizado como resta de referencia. Para las mediciones cinéticas, se inyectaron diluciones en serie en dos veces de Fab (de 0,78 nM a 500 nM) en PBS con Tween 20 al 0,05% (PBST) a 25 ºC a un caudal de aproximadamente 25 μl/min. Se calculan las constantes de asociación (k_{on}) y las constantes de disociación (k_{off}) utilizando un modelo de unión de Langmuir de uno a uno sencillo (BIAcore Evaluation Software, versión 3.2) mediante el ajuste simultáneo de los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación en el equilibrio (Kd) se calcula como la proporción k_{on}/k_{off}. Véase, por ejemplo, Chen, *et al.* (1999), *J. Mol. Biol*., 293:865-881. Si la constante de asociación es mayor que 10^6 M^{-1} s^{-1} mediante el anterior ensayo de resonancia de plasmón de superficie, entonces la constante de asociación puede determinarse utilizando una técnica de extinción de fluorescencia que mide el aumento o la disminución en la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda de 16 nm) a 25 ºC de un anticuerpo anti-antígeno (forma Fab) 20 nM en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno, según se mide en un espectrómetro, tal como un espectrómetro equipado con detención del flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-Aminco serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta en agitación.

Una “constante de asociación” o “k_{on}” según esta invención también puede determinarse con la misma técnica de resonancia de plasmón de superficie descrita anteriormente utilizando BIAcore™-2000 o BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 ºC con chips CM5 de antígeno inmovilizado a aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU). Brevemente, se activan chips biodetectores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) con clorhidrato de *N*-etil-*N*'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) según las instrucciones del suministrador. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, hasta 5 μg/ml (aproximadamente 0,2 μM) antes de la inyección a un caudal de 5 μl/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear a los grupos sin reaccionar. Para las mediciones cinéticas, se inyectaron diluciones en serie en dos veces de Fab (de 0,78 nM a 500 nM) en PBS con Tween 20 al 0,05% (PBST) a 25 ºC a un caudal de aproximadamente 25 μl/min. Se calculan las constantes de asociación (k_{on}) y las constantes de disociación (k_{off}) utilizando un modelo de unión de Langmuir de uno a uno sencillo (BIAcore Evaluation Software, versión 3.2) mediante el ajuste simultáneo de los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación en el equilibrio (Kd) se calcula como la proporción k_{off}/k_{on}. Véase, por ejemplo, Chen, *et al.* (1999), *J. Mol. Biol*., 293:865-881. Sin embargo, si la constante de asociación es mayor que 10^6 M^{-1} s^{-1} mediante el anterior ensayo de resonancia de plasmón de superficie, entonces la constante de asociación puede determinarse utilizando una técnica de extinción de fluorescencia que mide el aumento o la disminución en la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda de 16 nm) a 25 ºC de un anticuerpo anti-antígeno (forma Fab) 20 nM en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno, según se mide en un espectrómetro, tal como un espectrómetro equipado con detención del flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-Aminco serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta en agitación.

El término “vector”, tal como se emplea en la presente, significa una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual se ha unido. Un tipo de vector es un “plásmido”, que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular al que pueden acoplarse otros segmentos de ADN. Otro tipo de vector es un vector de fago. Otro

tipo de vector es un vector vírico, en el que pueden acoplarse otros segmentos de ADN al genoma vírico. Ciertos vectores son capaces de una replicación autónoma en una célula hospedante en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de la replicación bacteriano y vectores de mamífero episómicos). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episómicos) pueden integrarse en el genoma de una célula hospedante tras su introducción en la célula hospedante, y así se replican junto con el genoma del hospedante. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los cuales están unidos operablemente. Estos vectores se denominan en la presente "vectores de expresión recombinantes" (o sencillamente "vectores recombinantes"). En general, los vectores de expresión útiles en las técnicas de ADN recombinante a menudo están en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" pueden utilizarse de modo intercambiable, puesto que el plásmido es la forma de vector que se emplea de modo más habitual.

Un "polinucleótido" o un "ácido nucleico", tal como se emplean de modo intercambiable en la presente, se refieren a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucléotidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificadas y/o sus análogos, o cualquier sustrato que pueda ser incorporado a un polímero por la ADN o ARN polimerasa, o por medio de cualquier reacción. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si está presente una modificación en la estructura de los nucleótidos, esta puede impartirse antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede estar interrumpida por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido puede modificarse también después de la síntesis, tal como mediante conjugación con un marcador. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, "casquetes", la sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales por un análogo, modificaciones internucleotídicas tales como, por ejemplo, modificaciones con enlaces sin carga (por ejemplo, metilfosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y con enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), modificaciones que contienen restos colgantes tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, ply-L-lisina, etc.), modificaciones con intercalantes (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), modificaciones que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radiactivos, boro, metales oxidativos, etc.), modificaciones que contienen alquilantes, modificaciones con enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.), así como formas no modificadas de uno o más polinucleótidos. Además, cualquiera de los grupos hidroxilo que normalmente están presentes en los azúcares puede reemplazarse, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, puede protegerse con grupos protectores convencionales, o puede activarse para preparar otros enlaces a otros nucleótidos, o puede conjugarse con soportes sólidos o semisólidos. El OH 5'- y 3'-terminal puede fosforilarse o sustituirse con aminas o restos de grupos de formación de casquete orgánicos de 1 a 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también pueden derivatizarse para obtener grupos protectores convencionales. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares de ribosa o desoxirribosa que son conocidas, en general, en la técnica que incluyen, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alil-, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcares carbocíclicos, azúcares α-anoméricos, azúcares epiméricos, tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósidos básicos, tales como metil-ribosa. Uno o más enlaces fosfodiéster pueden reemplazarse por otros grupos conectores. Estos otros grupos conectores incluyen, pero no se limitan a realizaciones en las que el fosfato es reemplazado por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), (O)NR_2 ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH2 ("formacetal"), en los que cada R o R' es independientemente H o alquilo(1-20 C) sustituido o no sustituido que contiene opcionalmente un enlace éter (-O-), arilo, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo o araldilo. No es necesario que todos los enlaces en un polinucleótido sean iguales. La anterior descripción se aplica a todos los polinucleótidos indicados en la presente, incluyendo ARN y ADN.

Un "oligonucleótido", tal como se emplea en la presente, en general se refiere a polinucleótidos cortos, en general monocatenarios y sintéticos, que general, pero no necesariamente, tienen una longitud menor que aproximadamente 200 nucleótidos. Los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido" no son mútuamente excluyentes. La anterior descripción para los polinucleótidos es igual y totalmente aplicable a los oligonucleótidos.

Los "anticuerpos" (Ab) y las "inmunoglobulinas" (Igs) son glicoproteínas que tienen las mismas características estructurales. Mientras que los anticuerpos muestran especificidad de unión por un antígeno específico, las inmunoglobulinas incluyen anticuerpos y otras moléculas similares a anticuerpos que en general carecen de especificidad por un antígeno. Los polipéptidos de este último tipo son producidos, por ejemplo, a niveles bajos por el sistema linfático y a niveles mayores por los mielomas.

Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se utilizan de modo intercambiable en el sentido más amplio e incluyen anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpos monoclonales intactos o de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos monovalentes, multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos con la condición de que muestren la actividad biológica deseada), y también pueden incluir ciertos fragmentos de anticuerpos (según se describe con más detalle en la presente). Un anticuerpo puede ser quimérico, humano, humanizado y/o con maduración de la afinidad.

La "región variable" o "dominio variable" de un anticuerpo se refiere a los dominios amino-terminales de cadena pesada o ligera del anticuerpo. Estos dominios en general son las partes más variables de un anticuerpo y contienen los sitios de unión al antígeno.

El término “variable” se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables se diferencian mucho en secuencia entre los anticuerpos, y se utilizan para la unión y la especificidad de cada anticuerpo concreto por su antígeno concreto. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente a lo largo de los dominios variables e los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados regiones determinantes de la coomplementariedad (CDR) o regiones hipervariables en los dominios variables de la cadena ligera y de la cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se denominan regiones estructurales (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, que casi siempre adoptan una configuración en lámina beta, conectadas por tres CDR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de la estructura en lámina beta. Las CDR en cada cadena se mantienen juntas y muy cercanas entre sí por las regiones FR y, junto con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª edición, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no están directamente implicados en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero muestran diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpos.

La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión al antígeno idénticos, denominados fragmentos “Fab”, cada uno con un único sitio de unión al antígeno, y un fragmento “Fc” residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar con facilidad. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab’)2 que tiene dos sitios de combinación con el antígeno y sigue siendo capaz de entrecruzarse con el antígeno.

“Fv” es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento y de unión al antígeno completo. En una especie Fv bicatenaria, esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera en asociación muy cercana y no covalente. En una especie Fv monocatenaria, un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera pueden estar unidos covalentemente por un conector peptídico flexible, de modo que las cadenas ligera y pesada pueden asociarse en una estructura “dimérica” análoga a la que se encuentra en una especie Fv bicatenaria. Es en esta configuración en la que las tres CDR de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión al antígeno sobre la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, las seis CDR confieren la especificidad de unión al antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende sólo tres CDR específicas para el antígeno) tiene la capacidad para reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completo.

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab’ se diferencian de los fragmentos Fab por la adición de unos cuantos restos al extremo carboxi-terminal del dominio CH1 de cadena pesada que incluyen una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab’-SH es la denominación en la presente para Fab’ en el que el resto o restos cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab’)2 originariamente se produjeron como parejas de fragmentos Fab’ que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

Las “cadenas ligeras” de los anticuerpos (inmunoglobulinas) procedentes de cualquier especie de vertebrado pueden clasificarse en uno de dos tipos claramente diferenciados, denominados kappa (κ) y lambda (λ), basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

Dependiendo de las secuencias de aminoácidos de los dominios constantes de sus cadenas pesadas, los anticuerpos (inmunoglobulinas) puede clasificarse en diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas pueden también dividirse en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1, e IgA_2. Los dominios constantes de cadena pesada que se corresponden con las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan, α, δ, ε, γ, y μ, respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son muy conocidas y se describen, en general, por ejemplo en Abbas *et al.*, Cellular and Mol. Immunology, 4ª ed. (2000). Un anticuerpo puede ser parte de una molécula de fusión más grande, formada por la asociación covalente o no covalente del anticuerpo con una o más proteínas o péptidos distintos.

Las expresiones “anticuerpo de longitud completa”, “anticuerpo intacto” y “anticuerpo completo” se emplean en la presente de modo intercambiable, para indicar un anticuerpo en su forma sustancialmente intacta, no los fragmentos de anticuerpo según se definen a continuación. Las expresiones se refieren en particular a un anticuerpo con cadenas pesadas que contienen la región Fc.

Los “fragmentos de anticuerpo” comprenden sólo una porción de un anticuerpo intacto, en los que la porción conserva al menos una, y tantas como la mayoría o todas las funciones que normalmente están asociadas con esa porción cuando está presente en un anticuerpo intacto. En una realización, un fragmento de anticuerpo comprende un sitio de unión al antígeno del anticuerpo intacto y, así, conserva la capacidad de unirse al antígeno. En otra realización, un fragmento de anticuerpo, por ejemplo un fragmento que comprenda la región Fc, conserva al menos una de las funciones biológicas que normalmente están asociadas con la región Fc cuando está presente en un anticuerpo intacto, tal como la unión a FcRn, la modulación de la semivida del anticuerpo, la función ADCC y la unión al complemento. En una realización, un fragmento de anticuerpo es un anticuerpo monovalente que tiene una

semivida *in vivo* sustancialmente similar a un anticuerpo intacto. Por ejemplo, este fragmento de anticuerpo puede comprende un brazo de unión al antígeno unido a una secuencia Fc capaz de conferir estabilidad al fragmento.

La expresión “anticuerpo monoclonal”, tal como se emplea en la presente, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que puedan estar presentes en cantidades pequeñas. Así, el adjetivo “monoclonal” indica que el carácter del anticuerpo no es una mezcla de anticuerpos discretos. Este anticuerpo monoclonal generalmente incluye un anticuerpo que comprende una secuencia polipeptídica de unión a la diana, en el que la secuencia polipeptídica de unión a la diana se obtiene mediante un proceso que incluye la selección de una única secuencia polipeptídica de unión a la diana a partir de una pluralidad de secuencias polipeptídicas. Por ejemplo, el proceso de selección puede ser la selección de un clon exclusivo a partir de una pluralidad de clones, tal como una agrupación de clones de hibridoma, clones de fagos o clones de ADN recombinante. Debe entenderse que la secuencia de unión a la diana seleccionada puede alterarse más tarde, por ejemplo, para mejorar la afinidad por la diana, para humanizar la secuencia de unión a la diana, para mejorar su producción en un cultivo celular, para reducir su inmunogenicidad *in vivo*, para crear un anticuerpo multiespecífico, etc. y que un anticuerpo que comprende la secuencia de unión a la diana alterada también es un anticuerpo monoclonal de esta invención. En contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales, que generalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epitopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige contra un único determinante sobre un antígeno. Además de su especificidad, las preparaciónes de anticuerpos monoclonales son ventajosas porque generalmente no están contaminadas por otras inmunoglobulinas. El adjetivo “monoclonal” indica que el anticuerpo ha sido obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que requiera la producción del anticuerpo por medio de cualquier método concreto. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para ser utilizados según la presente invención pueden prepararse mediante una diversidad de técnicas que incluyen, por ejemplo, el método del hibridoma (por ejemplo, Kohler *et al.*, Nature, 256:495 (1975); Harlow *et al.*, Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed., 1988); Hammerling *et al.*, en: Monoclonal Antibodies and T-Cell hybridomas, 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EEUU nº 4.816.567), tecnologías de presentación de fagos (véase, por ejemplo, Clackson *et al.*, Nature, 352:624-628 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1992); Sidhu *et al.*, J. Mol. Biol., 338(2):299-310 (2004); Lee *et al.*, J. Mol. Biol., 340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101(34):12467-12472 (2004); y Lee *et al.*, J. Immunol. Methods, 284(1-2):119-132(2004), y las tecnologías para producir anticuerpos humanos o similares a humanos en animales que tienen partes o todos los loci de inmunoglobulina humana o los genes que codifican secuencias de inmunoglobulina humana (véanse, por ejemplo, los documentos WO 98/24893; WO 96/34096; WO 96/33735; WO 91/10741; Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature, 362:255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, Year in Immunol., 7:33 (1993); patentes de EEUU nº 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016; Marks *et al.*, Bio.Technology, 10:779-783 (1992); Lonberg *et al.*, Nature, 368:856-859 (1994); Morrison, Nature, 368:812-813 (1994); Fishwild *et al.*, Nature Biotechnol., 14:845-851 (1996); Neuberger, Nature Biotechnol., 14: 826 (1996); y Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol., 13:65-93 (1995).

Los anticuerpos monoclonales en la presente incluyen de modo específico anticuerpos “quiméricos”, en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga con secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie concreta o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpos concreta, mientras que el resto de la cadena o cadenas son idénticas u homólogas a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como los fragmentos de estos anticuerpos, con la condición de que muestren la actividad biológica deseada (patente de EEUU nº 4.816.567; y Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)).

Las formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contiene una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. En una realización, un anticuerpo humanizado es una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor), en la que restos de una región hipervariable del receptor están reemplazados por restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como un ratón, una rata, un conejo o un primate no humano, que tiene la especificidad, la afinidad y/o la capacidad deseadas. En algunos casos, restos de la región estructural (FR) de la inmunoglobulina humana son reemplazados por los correspondientes restos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar aún más la actuación del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de al menos uno, y generalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables se corresponden con los de una inmunoglobulina no humana, y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), generalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992). Véanse también los siguientes artículos y las referencias citadas en ellos: Vaswani y Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.*, 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions*, 23:1035-1038 (1995); Hurle y Gross, *Curr. Op. Biotech.*, 5:428-433 (1994).

La expresión “región hipervariable” y los términos “HVR” o “HV” cuando se utilizan en la presente se refieren a las regiones de un dominio variable de un anticuerpo que son hipervariables en su secuencia y/o forman bucles definidos desde el punto de vista estructural. En general, los anticuerpos comprenden seis regiones hipervariables; tres en VH (H1, H2, H3), y tres en VL (L1, L2, L3). Se utiliza una serie de delineaciones de regiones hipervariables y se incluyen en la presente. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de Kabat se basan en la variabilidad de la secuencia y son las que se utilizan de modo más habitual (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Chothia se refiere, por su parte, a la localización de los bucles estructurales (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917 (1987)). Las regiones hipervariables AbM representan un compromiso entre la CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y son utilizadas por el programa informático de formación de modelos de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. Las regiones hipervariables de “contacto” se basan en el análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles. Los restos de cada una de estas regiones hipervariables se indican a continuación.

Bucle	Kabat	AbM	Chothia	Contacto
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
	(Numeración de Kabat)			
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
	(Numeración de Chothia)			
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

Las regiones hipervariables pueden comprender “regiones hipervariables extendidas” como sigue: 24-36 o 24-34 (L1), 46-56 o 50-56 o 49-56 (L2), y 89-97 o 89-96 (L3) en VL, y 26-35 (H1), 50-65 o 49-65 (H2), y 93-102, 94-102, o 95-102 (H3) en VH. Los restos del dominio variable se numeran según Kabat *et al.*, *supra*, para cada una de estas definiciones.

Los restos de “región estructural” o “FR” son los restos del dominio variable que son distintos de los restos de la región hipervariable según se define en la presente.

Las expresiones “numeración de los restos del dominio variable según Kabat” o “numeración de la posición de los aminoácidos según Kabat” y sus variaciones, se refieren al sistema de numeración utilizado para los dominios variables de cadena pesada o los dominios variables de cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Utilizando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o más aminoácidos, que corresponden con un acortamiento o una inserción en una FR o HVR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir una inserción de un solo aminoácido (resto 52a según Kabat) después del resto 52 de H2 y restos insertados (por ejemplo, restos 82a, 82b y 82c, etc., según Kabat) después del resto 82 de la FR de la cadena pesada. La numeración de los restos de Kabat puede determinarse para un anticuerpo concreto mediante el alineamiento en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada según Kabat “convencional”.

Los fragmentos de anticuerpos “Fv monocatenarios” o “scFv” comprenden los dominios VH y VL del anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. En general, el polipéptido scFv comprende también un conector polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para un análisis de scFv, véase Pluckthun, en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994).

El término “diacuerpos” se refiere a fragmentos pequeños de anticuerpos con dos sitios de unión al antígeno, comprendiendo dichos fragmentos un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Mediante el uso de un conector que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios sobre la misma cadena, se obliga a los dominios a aparearse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión al antígeno. Los diacuerpos se describen más a fondo, por ejemplo, en los documentos EP 404.097; WO 93/1161; y Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993).

Un “anticuerpo humano” es un anticuerpo que posee una secuencia de aminoácidos que se corresponde con la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o que se ha preparado utilizando cualquiera de las técnicas para

preparar anticuerpos humanos según se describe en la presente. Esta definición de un anticuerpo humano excluye de modo específico un anticuerpo humanizado que comprende restos de unión al antígeno no humanos.

Un anticuerpo “con maduración de la afinidad” es un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más de sus HVR que producen una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno, comparado con un anticuerpo de origen que no posee esta alteración o alteraciones. En una realización, un anticuerpo con maduración de la afinidad tiene afinidades nanomolares e incluso picomolares por el antígeno diana. Los anticuerpos con maduración de la afinidad se producen mediante procedimientos conocidos en la técnica. Marks *et al.*, *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992), describen la maduración de la afinidad mediante reordenamiento de los dominios de VH y VL. La mutagénesis aleatoria de las CDR y/o restos de la región estructural se describe en Barbas *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 91:3809-3813 (1994); Schier *et al.*, *Gene*, 169:147-155 (1995); Yelton *et al.*, *J. Immunol*., 155:1994-2004 (1995); Jackson *et al.*, J. Immunol., 154(7):3310-3319 (1995); y Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol*., 226:889-896 (1992).

Un anticuerpo de “bloqueo” o un anticuerpo “antagonista” es un anticuerpo que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno al que se une. Ciertos anticuerpos de bloqueo o anticuerpos antagonistas inhiben sustancial o completamente la actividad biológica del antígeno.

Un “anticuerpo agonista”, según se emplea en la presente, es un anticuerpo que imita al menos una de las actividades funcionales de un polipéptido de interés.

Un “trastorno” es cualquier condición que podría beneficiarse de un tratamiento con un anticuerpo de la invención. Este incluye enfermedades o trastornos crónicos y agudos que incluyen las condiciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Los ejemplos no limitantes de trastornos que pueden tratarse en la presente incluyen cáncer, trastornos musculares, trastornos genéticos relacionados con la vía de la ubiquitina, trastornos inmunológicos/inflamatorios, trastornos neurológicos, y otros trastornos relacionados con la vía de la ubiquitina.

Las expresiones “trastorno proliferativo celular” y “trastorno proliferativo” se refieren a trastornos que están asociados con algún grado de proliferación celular anómala. En una realización, el trastorno proliferativo celular es el cáncer.

Un “tumor”, tal como se emplea en la presente, se refiere a cualquier crecimiento y proliferación de células neoplásicas, tanto maligno como benigno, y cualquier tejido y célula percancerosa y cancerosa. Los términos y las expresiones “cáncer”, “canceroso”, “trastorno proliferativo celular”, “trastorno proliferativo” y “tumor” no son mútuamente excluyentes tal como se mencionan en la presente.

Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren o describen el trastorno fisiológico en mamíferos que se caracteriza generalmente por un crecimiento/proliferación celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a carcinoma, linfoma (por ejemplo, linfoma Hodgkin o no linfoma Hodgkin), balstoma, sarcoma, y leucemia. Los ejemplos más concretos de estos cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer pulmonar microcítico, cáncer pulmonar no microcítico, adenocarcinoma del pulmón, carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándulas salivares, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, leucemia y otros trastornos linfoproliferativos, y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello.

La expresión “trastorno muscular” se refiere o describe el trastorno fisiológico en animales que tienen músculo, que se caracteriza generalmente por el deterioro o el debilitamiento del músculo esquelético y/o liso, de modo que la función muscular normal se reduce significativamente. Los ejemplos de trastornos musculares incluyen, pero no se limitan a distrofia muscular, esclerosis múltiples, esclerosis lateral amiotrófica, síndrome de Isaac, síndrome de la persona rígida, parálisis periódica familiar, miopatía, miotonia, rabdomiolisis, atrofia muscular, y diversos tipos de debilidad muscular y rigidez muscular.

La expresión “trastorno genético relacionado con la vía de la ubiquitina” se refiere o describe un trastorno con base genética que se caracteriza generalmente por el funcionamiento aberrante de la vía de ubiquitina, o este funcionamiento contribuye al trastorno. Los ejemplos de trastornos genéticos relacionados con la vía de la ubiquitina incluyen, pero no se limitan a fibrosis quística, síndrome de Angelman, y síndrome de Liddle.

Las expresiones “trastorno neurológico” o “enfermedad neurológica” se refieren o describen una enfermedad o un trastorno del sistema nervioso central y/o periférico en mamíferos que se caracteriza generalmente por el deterioro del tejido nervioso o el deterioro de la comunicación entre células en el tejido nervioso. Los ejemplos de trastornos neurológicos incluyen, pero no se limitan a enfermedades neurodegenerativas que incluyen, pero no se limitan a enfermedad de cuerpos de Lewy, síndrome postpoliomielitis, síndrome de Shy-Draeger, atrofia olivopontocerebelar, enfermedad de Parkinson, atrofia de múltiples sistemas, degeneracion estriatonigral, tauopatías (que incluyen pero no se limitan a enfermedad de Alzheimer y parálisis supranuclear), enfermedades priónicas (que incluyen, pero no se limitan a encefalopatía espongiforme bovina, tembladera, síndrome de Creutzfeldt-Jakob, kuru, enfermedad de

Gerstmann-Straussler-Scheinker, enfermedad de desgaste crónica, e insomnio familiar letal), parálisis bulbar, enfermedad de neuronas motoras, y trastornos heterodegenerativos del sistema nervioso (que incluyen, pero no se limitan a enfermedad de Canavan, enfermedad de Huntington, lipofuscinosis ceroide neuronal, enfermedad de Alexander, síndrome de Tourette, síndrome de pelo ensortijado de Menkes, síndrome de Cockayne, síndrome de Halervorden-Spatz, enfermedad de lafora, síndrome de Rett, degeneración hepatolenticular, síndrome de Lesch-Nyhan, y síndrome de Unverricht-Lundborg), demencia (que incluye, pero no se limita a enfermedad de Pick), y ataxia espinocerebelar.

Las expresiones “trastorno inflamatorio” y “trastorno inmunológico” se refieren o describen trastornos provocados por mecanismos inmunológicos aberrantes y/o señalización de citoquinas aberrante. Los ejemplos de trastornos inflamatorios e inmunológicos incluyen, pero no se limitan a enfermedades autoinmunológicas, síndromes de deficiencia inmunológica, e hipersensibilidad. Una “enfermedad autoinmunológica” en la presente es una enfermedad o un trastorno no maligno que surge de los propios tejidos del individuo y se dirige contra estos. Las enfermedades autoinmunológicas en la presente excluyen específicamente las enfermedades o los trastornos malignos o cancerosos, en especiel excluye el linfoma de células B, la leucemia linfoblástica aguda (ALL), la leucemia linfocítica crónica (CLL), la leucemia de células pilosas, y la leucemia mieloblástica crónica. Los ejemplos de enfermedades o trastornos autoinmunológicos incluyen, pero no se limitan a respuestas inflamatorias, tales como enfermedades de la piel inflamatorias que incluyen psoriasis y dermatitis (por ejemplo, dermatitis atópica); esclerosis y escleroderma sistémicas; respuestas asociadas con la enfermedad del intestino inflamatoria (tales como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa); síndrome de insuficiencia respiratoira (incluyendo síndrome de insuficiencia respiratoria en adultos, ARDS), dermatitis; meningitis; encefalitis; uveitis; colitis; glomerulonefritis; trastornos alérgicos, tales como eccema y asma y otros trastornos que implican la infiltración de células T y respuestas inflamatorias crónicas; aterosclerosis; deficiencia en la adhesión de leucocitos; artritis reumatoide; lupus eritematoso sistémico (SLE) (que incluye, pero no se limita a nefritis de lupus, lupus cutáneo); diabetes mellitus (por ejemplo, diabetes mellitus de tipo I o diabetes mellitus dependiente de insulina); esclerosis múltiples; síndrome de Reynaud; tiroiditis autoinmunológica; tiroiditis de Hashimoto; encefalomielitis alérgica; síndrome de Sjogren; diabetes de aparición juvenil; y respuestas inmunológicas asociadas con una hipersensibilidad aguda y retrasada mediada por citoquinas y linfocitos T que se encuentra generalmente en la tuberculosis, sarcoidosis, polimiositis, granulomatosis y vasculitis; anemia perniciosa (enfermedad de Addison); enfermedades que implican la diapedesis de leucocitos; trastorno inflamatorio del sistema nervioso central (SNC); síndrome de daños en múltiples órganos; anemia hemolítica (que incluye, pero no se limita a crioglobinemia o anemia positiva a Coombs); miastenia grave; enfermedades mediadas por complejos de antígeno-anticuerpo; enfermedad anti-membrana basal glomerular; síndrome antifosfolípidos; neuritis alérgica; enfermedad de Graves; síndrome miasténico de Lambert-Eaton; penfigoide bulloso; pénfigo; poliendocrinopatías autoinmunológicas; enfermedad de Reiter; síndroma de la persona rígida; enfermedad de Behcet; arteritis de células gigantes; nefritis de complejo inmunológico; nefropatía de IgA; polineuropatías de IgM; púrpura trombocitopénica inmunológica (ITP) o trombocitopenia autoinmunológica, etc.

Los ejemplos de síndromes de deficiencia inmunológica incluyen, pero no se limitan a ataxia telangiectasia, síndrome de deficiencia en la adhesión de leucocitos, linfopenia, disgammaglobulinemia, VIH o infecciones por delta retrovirus, inmunodeficiencia variable común, inmunodeficiencia combinada grave, disfunción bactericida de fagocitos, agammaglobulinemia, síndrome de DiGeorge, y síndrome de Wiskott-Aldrich. Los ejemplos de hipersensibilidad incluyen, pero no se limitan a alergias, asma, dermatitis, urticaria, anafilaxis, síndrome de Wissler, y púrpura trombocitopénica.

Tal como se emplea en la presente, un “tratamiento” se refiere a una intervención clínica para intentar alterar el curso natural del individuo o de la célula que se está tratando, y puede realizarse como profilaxis o durante el curso de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen prevenir la aparición o la recurrencia de la enfermedad, el alivio de los síntomas, la disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevenir o disminuir la inflamación y/o los daños en tejidos/órganos, disminuir la velocidad de avance de la enfermedad, mejorar o paliar el estado de la enfermedad, y la remisión o la mejora en la prognosis. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención se emplean para retrasar el desarrollo de una enfermedad o un trastorno.

Un “individuo” es un vertebrado. En ciertas realizaciones, el vertebrado es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a animales de granja (tales como vacas), animales para deportes, mascotas (tales como gatos, perros y caballos), primates, ratones y ratas. En ciertas realizaciones, el vertebrado es un ser humano.

Un “mamífero”, para los objetivos de un tratamiento, se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, para deportes o mascotas, tales como perros, caballos, gatos, vacas, etc. En ciertas realizaciones, el mamífero es un ser humano.

Una “cantidad eficaz” se refiere a una cantidad eficaz, en las dosificaciones y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

Una “cantidad terapéuticamente eficaz” de una sustancia/molécula de la invención puede variar según factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad de la sustancia/molécula para producir una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una cantidad

para la cual cualquier efecto tóxico o perjudicial de la sustancia/molécula es sobrepasado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una “cantidad profiláctimente eficaz” se refiere a una cantidad eficaz, en las dosificaciones y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. En general, pero no necesariamente, puesto que una dosis profiláctica se emplea en sujetos antes o en una etapa temprana de la enfermedad, la cantidad profiláctimente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

La expresión “agente citotóxico”, tal como se emplea en la presente, se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de células y/o provoca la destrucción de células. La expresión pretende incluir isótopos radiactivos (por ejemplo, At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212} e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, metotrexato, adriamicina), vinca alcaloides (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorrubicina, melfalano, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina u otros agentes intercalantes, enzimas y sus fragmentos, tales como nucleoliticenzimas, antibióticos, y toxinas, tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo sus fragmentos y/o variantes, y los diversos agentes antitumorales o anticáncer descritos a continuación. Otros agentes citotóxicos se describen a continuación. Un agente tumoricida provoca la destrucción de las células tumorales.

Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico útil para el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes, tales como tiotepa y ciclofosfamida CYTOXAN®; sulfonatos de alquilo, tales como busulfano, improsulfano y piposulfano; aziridinas, tales como benzodopa, carboquona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas, que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (en especial bulatacina y bulatacinona); delta 9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta lapachona; lapachol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecano (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecano, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina, y 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotixina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (en particular criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos KW-2189 y CBl-TMl); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongistatina; gases mostaza, tales como clorambucilo, clomafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalano, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, y ranimnustina; antibióticos, tales como antibióticos de enedina (por ejemplo, caliqueamicina, en especial caliqueamicina gamma ll y caliqueamicin omega ll (véase, por ejemplo, Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994)); dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; así como cromóforo de neocarzinostatina y antibióticos de cromoproteínas de enedina relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorrubicina ADRIAMYCIN® (incluyendo morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y desoxidoxorrubicina), epirrubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos, tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico, tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina, tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina, tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitiostanol, mepitiostano, testolactona; anti-adrenales, tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reponedores del ácido fólico, tales como ácido frolínico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglucid; nitratro de galio; hidroxiurea; lentinanp; lonidainina; maitansinoides, tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazina; complejo de polisacáridos PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxana; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (en especial, toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara C"); tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel TAXOL® (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANETM sin Cremophor, formulación de paclitaxel en nanopartículas modificadas con albúmina (American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, Illinois), y doxetaxel TAXOTERE® (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); cloranbucilo; gemcitabinea (GEMZAR®); 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino, tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina (VELBAN®); platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN®); oxaliplatino; leucovovina; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de topoisomerasas RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides, tales como ácido retinoico; capecitabina (XELODA®); las sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores, tales como CHOP, una abreviatura para una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina, y prednisolona, y FOLFOX, una abreviatura para un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATINTM) combinado con 5-FU y leucovovina.

También se incluyen en esta definición agentes antihormonales que actúan para regular, reducir, bloquear, o inhibir

los efectos de hormonas que pueden estimular el crecimiento del cáncer, y a menudo están en forma de un tratamiento sistémico o de cuerpo entero. Pueden ser en sí mismas hormonas. Los ejemplos incluyen antiestrógenos y moduladores del receptor de estrógeno selectivos (SERM) que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno (que incluyen tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno EVISTA®, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, y toremifeno FARESTON®; antiprogesteronas; infrarreguladores del receptor de estrógeno (ERD); agentes que actúan para reprimir o apagar los ovarios, por ejemplo, agonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH), tales como acetato de leuprolida LUPRON® y ELIGARD®, acetato de goserelina, acetato de buserelina y tripterelina; otros antiandrógenos, tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida; e inhibidores de aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógeno en las glándulas adrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol MEGASE®, exemestano AROMASIN®, formestano, fadrozol, vorozol RIVISOR®, letrozol FEMARA®, y anastrozol ARIMIDEX®. Además, esta definición de agentes quimioterapéuticos incluye bisfosfonatos, tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® u OSTAC®), etidronato DIDROCAL®, NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato ZOMETA®, alendronato FOSAMAX®, pamidronato AREDIA®, tiludronato SKELID®, o risedronato ACTONEL®; así como troxacitabina (un análogo de citosina nucleósido de 1,3-dioxolano); oligonucleótidos antisentido, en particular los que inhiben la expresión de genes en las vías de señalización implicadas en la proliferación celular aberrante tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras, y receptor del factor del crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas, tales como vacuna THERATOPE®, y vacunas de terapia génica, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN®, y vacuna VAXID®; inhibidor de topoisomerasa 1 LURTOTECAN®; ABARELIX® rmRH; ditosilato de lapatinib (un inhibidor de molécula pequeña de tirosina quinasa dual ErbB-2 y EGFR, también conocido como GW572016); y las sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores.

Composiciones y métodos para prepararlas

La presente invención proporciona anticuerpos que se unen de modo específico a la poliubiquitina, pero no a la monoubiquitina. De modo más específico, se proporcionan anticuerpos que son capaces de unirse de modo específico a una poliubiquitina que comprende un enlace-K63 pero no a una poliubiquitina que comprende un segundo enlace de lisina diferente. Los anticuerpos de la invención proporcionan una sorprendente afinidad mejorada por la poliubiquitina unida a K63 con respecto a los anticuerpos previamente conocidos. Esta afinidad mejorada permite su uso amplico en una diversidad de ensayos en los que la unión fuerte del anticuerpo a una proteína poliubiquitinada unida a K63 es un prerrequisito, tales como reacciones de inmunoprecipitación. Los anticuerpos de la invención también están mejor adaptados para su uso como productos teapéuticos que los anticuerpos específicos de poliubiquitina unida a K63 previamente identificados, porque potencialmente pueden administrarse a dosificaciones más bajas o con menos frecuencia que un anticuerpo con menor afinidad por la misma poliubiquitina unida a K63.

En la presente se describe un anticuerpo que comprende una región HVR-H2 que comprende la secuencia de al menos una de SEQ ID NO:60-110, por ejemplo, un anticuerpo que comprende una secuencia consenso de la región HVR-H2 de SEQ ID NO:112.

En la presente se describe un anticuerpo que comprende una región HVR-L2 que comprende la secuencia de al menos una de SEQ ID NO:8-58, por ejemplo, un anticuerpo que comprende una secuencia consenso de la región HVR-L3 de SEQ ID NO:111.

En la presente se describe un anticuerpo que comprende al menos una o al menos dos de las siguientes:

(i) una secuencia de HVR-H2 que comprende al menos una secuencia de SEQ ID NO:60-110;

(ii) una secuencia de HVR-L2 que comprende al menos una secuencia de SEQ ID NO:8-58.

En la presente se describe un anticuerpo que se une de modo específico a la poliubiquitina unida a K63 con alta afinidad, pero que se une a una poliubiquitina unida a K48 con una afinidad sustancialmente reducida, que comprende al menos una o al menos dos de la siguientes:

(i) una secuencia de HVR-H2 que comprende al menos una secuencia de SEQ ID NO:60-110;

(ii) una secuencia de HVR-L2 que comprende al menos una secuencia de SEQ ID NO:8-58.

Las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:8-112 se numeran con respecto a la HVR individual (es decir, H2, L2) según se indica en la tabla B, siendo la numeración coherente con el sistema de numeración de Kabat según se describe a continuación. En la presente se describe un anticuerpo de la invención que comprende una o dos de las secuencias de HVR (i)-(ii) anteriores, y al menos una de HVR-L1 de SEQ ID NO:3, HVR-L3 de SEQ ID NO:4, HVR-H1 de SEQ ID NO:5, y HVR-H3 de SEQ ID NO:6.

En la presente se describen anticuerpos que comprenden secuencias de HVR-H2 de cadena pesada según se indica en la tabla B. En la presente se describen anticuerpos que comprenden también secuencias de HVR-L2 de cadena ligera según se indica en la tabla B.

Los anticuerpos pueden comprender un dominio variable de cadena ligera del anticuerpo 4D5 humanizado (huMAb4D5-8) (HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, EEUU) (también indicado en la patente de EEUU nº 6.407.213, y en Lee *et al.*, J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-1093) según se muestra en la siguiente SEQ ID NO:224:

Asp[1] Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln ***Asp*** Val ***Asn Thr*** Ala
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly ***Lys*** Ala Pro Lys Leu Leu Ile
Tyr Ser Ala Ser ***Phe*** Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
Ser ***Arg*** Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln ***His Tyr Thr Thr Pro***
Pro Thr Phe Gly Gin Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys[107]
(SEQ ID NO:224) (los restos de HVR están subrayados)

Tal como se describe en la presente, la secuencia del dominio variable de cadena ligera de huMAb4D5-8 está modificada en una o más de las posiciones 28, 30, 31, 42, 53, 66, y 91-96 (Asp, Asn, Thr, Lys, Phe, Arg, His, Tyr, Thr, Thr, Pro, y Pro, según se indica en negrita/cursiva arriba, respectivamente). La secuencia de huMAb4D5-8 modificada puede comprender Ser en la posición 28, Ser en la posición 30, Ser en la posición 31, Glu en la posición 42, Ser en la posición 53, Gly en la posición 66, Tyr en la posición 91, Ser en la posición 92, Ser en la posición 93, Tyr en la posición 94, Ser en la posición 95, Ser en la posición 96, y/o una inserción de Leu y Phe entre la Ser en la posición 96 y la Thr en la posición 97. La secuencia de huMAb4D5-8 modificada puede comprender una Ser insertada justo antes de la posición 1 (es decir, en el N-terminal de la proteína), Ser en la position 28, Ser en la posición 30, Ser en la posición 31, Glu en la posición 42, Ser en la posición 53, Gly en la posición 66, Tyr en la posición 91, Ser en la posición 92, Ser en la posición 93, Tyr en la posición 94, Ser en la posición 95, Ser en la posición 96, y/o una inserción de Leu y Phe entre la Ser en la posición 96 y la Thr en la posición 97. El anticuerpo puede comprender un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia mostrada en la siguiente SEQ ID NO:225:

Ser[-1] Asp[1] Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln ***Ser*** Val ***Ser***
Ser Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly ***Glu*** Ala Pro Lys Leu
Leu Ile Tyr Ser Ala Ser ***Ser*** Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
Ser Gly Ser ***Gly*** Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln ***Tyr Ser Ser Tyr***
Ser Ser Leu Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
(SEQ ID NO:225) (los restos de HVR están subrayados)

Los restos sustituidos con respecto a huMAb4D5-8 se indican en negrita/cursiva arriba.

En la presente se describen anticuerpos que comprenden un dominio variable de cadena pesada que tiene la siguiente secuencia:

Glu Ile Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Val
Lys Thr Gly Leu Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
Glu Trp Val Ala Tyr Ile ***Ser*** Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn
Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
(SEQ ID NO:226) (los restos de HVR están subrayados)

La secuencia del dominio variable de cadena pesada puede modificarse en la posición en negrita y cursiva. La Ser en negrita y cursiva pueden modificarse a Thr. Los primeros tres restos de la secuencia del dominio variable de cadena pesada indicada en SEQ ID NO:226 pueden no estar presentes.

En la presente se describe un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene la siguiente secuencia:

Glu Ile Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Val
Lys Thr Gly Leu Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
Glu Trp Val Ala Tyr Ile ***Thr*** Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn
Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
(SEQ ID NO:227) (los restos de HVR están subrayados)

En la presente se describe un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene la siguiente secuencia:

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Val Lys Thr
Gly Leu Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
Val Ala Tyr Ile ***Thr*** Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser
Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
Tyr Cys Ala Arg Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr Trp
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
(SEQ ID NO:228) (los restos de HVR están subrayados)

Los anticuerpos de la invención pueden comprender cualquier secuencia del dominio variable de la región estructural adecuada, con la condición de que se mantenga la actividad de unión a la poliubiquitina que incluye un enlace de lisina concreto. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención comprenden una secuencia consenso de la región estructural de la cadena pesada del subgrupo III humana. En una realización de estos anticuerpos, la secuencia consenso de la región estructural comprende una sustitución en la posición 71, 73 y/o 78. En algunas realizaciones de estos anticuerpos, la posición 71 es A, 73 es T y/o 78 es A. En una realización, estos anticuerpos comprenden secuencias de la región estructural del dominio variable de cadena pesada del huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, EEUU) (también indicada en las patentes de EEUU nº 6.407.213 y 5.821.337, y en Lee *et al.*, J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-1093). En una realización, estos anticuerpos comprenden además una secuencia consenso de la región estructural de la cadena ligera Iκ humana. En una realización, estos anticuerpos comprenden al menos una, dos o más de las secuencias de HVR de cadena ligera de SEQ ID NO:3, 4, 8-58, y 111. En una realización, estos anticuerpos comprenden las secuencias de HVR de cadena ligera de huMAb4D5-8 según se describe en las patentes de EEUU n1 6.407.213 y 5.821.337. En una realización, estos anticuerpos comprenden secuencias del dominio variable de cadena ligera del huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, EEUU) (también indicada en las patentes de EEUU nº 6.407.213 y 5.821.337, y en Lee *et al.*, J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-1093).

En la presente se describe un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada, en el que la secuencia estructural comprende la secuencia de al menos una de SEQ ID NO:113-188, 209-212, y 217-220, la secuencia de HVR-H1 es SEQ ID NO:5, la secuencia de HVR-H2 se selecciona de al menos una de SEQ ID NO:59-110 y 112, y la secuencia de HVR-H3 es SEQ ID NO:6. En la presente se describe un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena ligera, en el que la secuencia estructural comprende la secuencia de al menos una de SEQ ID NO:189-204, 205-208, y 213-216, la secuencia de HVR-L1 es SEQ ID NO:3, la secuencia de HVR-L2 se selecciona de al menos una de SEQ ID NO:8-58 y 111, y la secuencia de HVR-L3 es SEQ ID NO:4.

En la presente se describe un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada, en el que la secuencia estructural comprende al menos una secuencia de SEQ ID NO:113-188, y las secuencias de HVR-H1, H2 y H3 son SEQ ID NO:5, 60, y 6, respectivamente (clon Apu3.A8). De modo similar, los anticuerpos de cada uno de los clones Apu3.A9-H10, según se indica en la tabla B en la presente, pueden comprender un dominio variable de cadena pesada, en los que la secuencia estructural comprende al menos una secuencia de SEQ ID NO:113-188, y HVR-H1 es SEQ ID NO:5, las secuencias de HVR-H2 son las secuencias específicamente enumeradas para cada clón en la tabla B, y HVR-H3 es SEQ ID NO:6.

En la presente se describe un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena ligera, en el que la secuencia estructural comprende al menos una secuencia de SEQ ID NO:189-204, y las secuencias de HVR-L1, L2 y L3 son SEQ ID NO:3, 8, y 4, respectivamente (clon Apu3.A8). De modo similar, los anticuerpos de cada uno de los clones Apu3.A9-H10, según se indica en la tabla B en la presente, pueden comprender un dominio variable de cadena ligera, en los que la secuencia estructural comprende al menos una secuencia de SEQ ID NO:189-204, y HVR-L1 es SEQ ID NO:3, las secuencias de HVR-L2 son las secuencias específicamente enumeradas para cada clón en la tabla B, y HVR-L3 es SEQ ID NO:4.

En la presente se describe un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada, en el que la secuencia estructural comprende al menos una secuencia de SEQ ID NO:209-212, y las secuencias de HVR-H1, H2 y H3 son SEQ ID NO:5, 60, y 6, respectivamente (clon Apu3.A8). Los anticuerpos de cada uno de los clones Apu3.A9-H10 pueden comprender un dominio variable de cadena pesada, en los que la secuencia estructural comprende al menos una secuencia de SEQ ID NO:209-212, y HVR-H1 es SEQ ID NO:5, las secuencias de HVR-H2 son las secuencias específicamente enumeradas para cada clón en la tabla B, y HVR-H3 es SEQ ID NO:6. En la presente se describe un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena ligera, en el que la secuencia estructural comprende al menos una secuencia de SEQ ID NO:205-208, y las secuencias de HVR-L1, L2 y L3 son SEQ ID NO:3, 8, y 4, respectivamente (clon Apu3.A8). De manera similar, los anticuerpos de cada uno de los clones Apu3.A9-H10 mostrados en la tabla B pueden comprender un dominio variable de cadena ligera, en los que la

secuencia estructural comprende al menos una secuencia de SEQ ID NO:205-208, y HVR-L1 es SEQ ID NO:3, las secuencias de HVR-L2 son las secuencias específicamente enumeradas para cada clón en la tabla B, y HVR-L3 es SEQ ID NO:4.

En la presente se describe un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada, en el que la secuencia estructural comprende al menos una secuencia de SEQ ID NO:217-220, y las secuencias de HVR-H1, H2 y H3 son SEQ ID NO:5, 60, y 6, respectivamente (clon Apu3.A8). En la presente se describen anticuerpos de cada uno de los clones Apu3.A9-H10 que comprenden un dominio variable de cadena pesada, en los que la secuencia estructural comprende al menos una secuencia de SEQ ID NO:217-220, y HVR-H1 es SEQ ID NO:5, las secuencias de HVR-H2 son las secuencias específicamente enumeradas para cada clón en la tabla B, y HVR-H3 es SEQ ID NO:6. En la presente se describe un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena ligera, en el que la secuencia estructural comprende al menos una secuencia de SEQ ID NO:213-216, y las secuencias de HVR-L1, L2 y L3 son SEQ ID NO:3, 8, y 4, respectivamente (clon Apu3.A8). De forma similar, los anticuerpos de cada uno de los clones Apu3.A9-H10 mostrados en la tabla B pueden comprender un dominio variable de cadena ligera, en los que la secuencia estructural comprende al menos una secuencia de SEQ ID NO:213-216, y HVR-L1 es SEQ ID NO:3, las secuencias de HVR-L2 son las secuencias específicamente enumeradas para cada clón en la tabla B, y HVR-L3 es SEQ ID NO:4.

En otro ejemplo, un anticuerpo con maduración de la afinidad que se une de modo específico a la poliubiquitina unida a K63 con alta afinidad pero que se une a la poliubiquitina unida a K48 con una afinidad sustancialmente reducida, comprende una sustitución en las posiciones de los aminoácidos 50, 52, 53, 54 y 56 de HVR-H2. En otro ejemplo, un anticuerpo con maduración de la afinidad que se une de modo específico a la poliubiquitina unida a K63 con alta afinidad pero que se une a la poliubiquitina unida a K48 con una afinidad sustancialmente reducida, comprende una sustitución en las posiciones de los aminoácidos 49, 50, 52, y 53 de HVR-L2.

En la presente se describe un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO:5, 60, y 6. En la presente se describe un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO:3, 8, y 4. En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO:5, 60, y 6, y también comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO:3, 8, y 4. En la presente se describe un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO:5, 63, y 6. En la presente se describe un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO:3, 11, y 4. En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO:5, 63, y 6, y también comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO:3, 11, y 4. En la presente se describe un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO:5, 66, y 6. En la presente se describe un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO:3, 14, y 4. En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO:5, 66, y 6, y también comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO:3, 14, y 4.

En la presente se describe un anticuerpo que compite con cualquiera de los anticuerpos mencionados anteriormente por la unión a la poliubiquitina. En la presente se describe un anticuerpo que se une al mismo determinante antigénico sobre la poliubiquitina que cualquiera de los anticuerpos mencionados anteriormente.

Tal como se muestra en la presente, los anticuerpos de la invención se unen de modo específico a una poliubiquitina aislada que tiene un enlace de lisina específico. Tal como se muestra en la presente, los anticuerpos de la invención también se unen de modo específico a una poliubiquitina que tiene un enlace de lisina K63 cuando esa poliubiquitina está unida a una proteína heteróloga (véanse, por ejemplo, los ejemplos 2 y 3).

Se proporcionan composiciones que comprenden al menos un anticuerpo anti-poliubiquitina o al menos un polinucleótido que comprende secuencias que codifican un anticuerpo anti-poliubiquitina. En ciertas realizaciones, una composición puede ser una composición farmacétuica. Tal como se emplean en la presente, las composiciones comprenden uno o más anticuerpos que se unen a una o más poliubiquitinas y/o uno o más polinucleótidos que comprenden secuencias que codifican uno o más anticuerpos que se unen a una o más poliubiquitinas. Estas composiciones también pueden comprender vehículos adecuados, tales como excipientes farmacéuticamente aceptables, que incluyen tampones, que son muy conocidos en la técnica.

También se proporcionan anticuerpos y polinucleótidos aislados. En ciertas realizaciones, los anticuerpos y los polinucleótidos aislados son sustancialmente puros.

En una realización, los anticuerpos anti-poliubiquitina son monclonales. En otra realización, se proporcionan fragmentos de anticuerpos anti-poliubiquitina (por ejemplo, fragmentos Fab, Fab'-SH y F(ab')2). Estos fragmentos de anticuerpos pueden crearse por medios tradicionales, tales como digestión enzimática, o pueden generarse mediante técnicas recombinantes. Estos fragmentos de anticuerpos pueden ser quiméricos, humanizados, o humanos. Estos fragmentos son útiles para los objetivos de diagnóstico y terapéuticos indicados a continuación.

Generación de anticuerpos anti-poliubiquitina utilizando un banco de presentación de fagos

En la técnica se conoce una diversidad de métodos para generar bancos de presentación de fagos a partir de los cuales puede obtenerse un anticuerpo de interés. Un método para generar anticuerpos de interés es mediante el uso de un banco de anticuerpos de fagos, según se describe en Lee *et al.*, J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-1093.

Los anticuerpos anti-poliubiquitina de la invención pueden prepararse utilizando bancos combinatorios para seleccionar clones de anticuerpos sintéticos con la actividad o actividades deseadas. En principio, los clones de anticuerpos sintéticos se seleccionan mediante la selección de bancos de fagos que contienen fagos que presentan diversos fragmentos de regiones variables de anticuerpos (Fv) condensadas con la proteína de la envuelta del fago. Estos bancos de fagos se inmunoadsorben mediante cromatografía de afinidad contra el antígeno deseado. Los clones que expresan los fragmentos Fv capaces de unirse al antígeno deseado se adsorben al antígeno y así se separan de los clones que no se unen del banco. Los clones de unión entonces se eluyen del antígeno, y después pueden enriquecerse mediante ciclos adicionales de adsorción al antígeno/elución. Cualquiera de los anticuerpos anti-poliubiquitina de la invención puede obtenerse diseñando un procedimiento de selección de antígeno adecuado para la selección el clon de fago de interés, seguido de la construcción de un clon de anticuerpo anti-poliubiquitina de longitud completa utilizando las secuencias Fv del clon de fago de interés y las secuencias de la región constante adecuadas (Fc) descritas en Kabat *et al.*, Sequences of *Proteins of Immunological Interest*, 5ª edición, NIH Publication, 91-3242, Bethesda, MD (1991), vol. 1-3.

El dominio de unión al antígeno de un anticuerpo está formado por dos regiones variables (V) de aproximadamente 110 aminoácidos, cada una procedente de la cadena ligera (VL) y pesada (VH), presentando ambas tres bucles hipervariables o regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Los dominios variables pueden presentarse de modo funcional sobre un fago en forma de fragmentos Fv monocatenarios (scFv), en los que VH y VL están unidas covalentemente a través de un péptido corto y flexible, o en forma de fragmentos Fab, en los que cada uno está condensado con un dominio constante e interaccionan de modo no covalente, según se describe en Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol*, 12: 433-455 (1994). Tal como se emplean en la presente, los clones de fagos que codifican scFv y los clones de fagos que codifican Fab se denominan colectivamente “clones de fagos Fv” o “clones de Fv”.

Los repertorios de los genes de VH y VL pueden clonarse por separdo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y recombinarse aleatoriamente en bancos de fagos, que después pueden seleccionarse para clones de unión al antígeno, según se describe en Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol*, **12**: 433-455 (1994). Los bancos procedentes de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad al inmunógeno sin la necesidad de construir hibridomas. Como alternativa, el repertorio sin estimular puede clonarse para proporcionar una única fuente de anticuerpos humanos contra una amplia gama de antígenos no propios y también de antígenos propios sin inmunización, según se describe en Griffiths *et al.*, *EMBO J.*, **12**: 725-734 (1993). Por último, también puede prepararse de modo sintético bancos no estimulados clonando los segmentos de genes-V no redispuestos procedentes de células precursoras, y utilizando cebadores de PCR que contienen secuencias aleatorias para codificar las regiones CDR3 altamente variables y para realizar la redisposición *in vitro* según se describe en Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, **227**:381-388 (1992).

Se emplean fagos filamentosos para presentar fragmentos de anticuerpos mediante la fusión a la proteína de la envuelta menor pIII. Los fragmentos de anticuerpos pueden ser presentados como fragmentos Fv monocatenarios, en los que los dominios VH y VL están conectados a la misma cadena polipeptídica por un espaciador polipeptídico flexible, por ejemplo, según se describe en Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, **222**:581-597 (1991), o como fragmentos Fab, en los que una cadena está condensada a pIII y la otra se segrega hacia el periplasma de la célula hospedante bacteriana en la que se produce el ensamblaje de una estructura de la proteína de la envuelta Fab que se presenta sobre la superficie del fago, desplazando a algunas de las proteínas de la envuelta de tipo salvaje, por ejemplo, como se describe en Hoogenboom *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, **19**:4133-4137 (1991).

En general, los ácidos nucleicos que codifican fragmentos de genes de anticuerpos se obtienen de células inmunológicas extraídas de seres humanos o animales. Si se desea un banco sesgado a favor de clones anti-poliubiquitina, el sujeto se inmuniza con poliubiquitina para generar una respuesta de anticuerpos, y se recuperan las células del bazo y/o células B en circulación u otros linfocitos de sangre periférica (PBL) para la construcción del banco. En una realización, un banco de fragmentos de genes de anticuerpos humanos sesgado a favor de clones anti-poliubiquitina humana se obtiene generando una respuesta de anticuerpos anti-poliubiquitina humana en ratones transgénicos que portan una matriz de genes de inmunoglobulinas humanas funcionales (y que carecen de un sistema de producción de anticuerpos endógeno funcional), de forma que la inmunización con poliubiquitina produce células B que producen anticuerpos humanos contra la poliubiquitina. La generación de ratones transgénicos que producen anticuerpos humanos se describe en la siguiente sección (III)(b).

Puede obtenerse un mayor enriquecimiento en poblaciones de células reactivas a anti-poliubiquitina utilizando un procedimiento de selección adecuado para aislar células B que expresan un anticuerpo unido a membrana específico de poliubiquitina, por ejemplo, mediante separación de células con cromatografía de afinidad de poliubiquitina o la adsorción de células a poliubiquitina marcada con fluorocromo, seguido de una clasificación de células activada por flujo (FACS).

Como alternativa, el uso de células de bazo y/o células B u otros PBL procedentes de un donante no inmunizado proporciona una mejor representación del posible repertorio de anticuerpos, y también permite la construcción de un banco de anticuerpos utilizando cualquier especie animal (humana o no humana) en la que la poliubiquitina no es antigénica. Para los bancos que incorporan la construcción de genes de anticuerpos *in vitro*, las células precursoras se extraen del sujeto para proporcionar ácidos nucleicos que codifican segmentos de genes de anticuerpos no redispuestos. Las células inmunológicas de interés pueden obtenerse a partir de una diversidad de especies animales, tales como ser humano, ratón, rata, especies lagomorfas, lupinas, caninas, felinas, porcinas, bovinas, equinas, y aviares, etc.

Los ácidos nucleicos que codifican segmentos de genes variables de anticuerpos (incluyendo segmentos VH y VL) se recuperan de las células de interés y se amplifican. En el caso de bancos de genes de VH y VL redispuestos, el ADN deseado puede obtenerse aislando ADN genómico o ARNm de linfocitos, seguido de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores que se corresponden con los extremos 5' y 3' de los genes de VH y VL redispuestos, según se describe en Orlandi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **86**:3833-3837 (1989), fabricando así diversos repertorios de genes de V para la expresión. Los genes de V pueden amplificarse a partir de ADNc y ADN genómico, con cebadores inversos en el extremo 5' del exón que codifica el dominio V maduro y con cebadores directos basados en el interior del segmento J, según se describe en Orlandi *et al.* (1989) y en Ward *et al.*, Nature, **341**:544-546 (1989). Sin embargo, para la amplificación a partir de ADNc, los cebadores inversos también pueden basarse en el exón conductor, según se describe en Jones *et al.*, *Biotechnol*., **9**:88-89 (1991), y los cebadores directos dentro de la región constante, según se describe en Sastry *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **86**:5728-5732 (1989). Para maximizar la complementariedad, la degeneración puede incorporarse en los cebadores, según se describe en Orlandi *et al.* (1989) o Sastry *et al.* (1989). En ciertas realizaciones, la diversidad del banco se maximiza utilizando cebadores de PCR dirigidos a cada familia de genes de V para amplificar todas las disposiciones de VH y VL disponibles presentes en la muestra de ácidos nucleicos de células inmunológicas, por ejemplo, según se describe en el método de Marks *et al.*, *J. Mol. Biol*., **222**:581-597 (1991), o según se describe en el método de Orum *et al.*, *Nucleic Acids Res*., **21**:4491-4498 (1993). Para la clonación del ADN amplificado en vectores de expresión, pueden introducirse sitios de restricción raros dentro del cebador de PCR como un marcador en un extremo, según se describe en Orlandi *et al.* (1989), o mediante otra amplificación con PCR con un cebador marcado, según se describe en Clackson *et al.*, *Nature*, **352**:624-628 (1991).

Los repertorios de genes de V sintéticamente redispuestos pueden obtenerse *in vitro* a partir de segmentos de genes de V. La mayoría de los segmentos de genes de VH humanos se han clonado y secuenciado (indicado en Tomlinson *et al.*, *J. Mol. Biol*., **227**:776-798 (1992)), y cartografiado (indicado en Matsuda *et al.*, *Nature Genet*., **3**:88-94 (1993); estos segmentos clonados (incluyendo todas las principales conformaciones del bucle H1 y H2) pueden utilizarse para generar diversos repertorios de genes de VH con cebadores de PCR que codifican bucles H3 de diversas secuencias y longitudes, según se describe en Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol*., **227**:381-388 (1992). Los repertorios de VH también pueden prepararse con toda la diversidad de secuencia concentrada en un bucle H3 largo de una sola longitud, según se describe en Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**:4457-4461 (1992). Se han clonado y secuenciado segmentos Vκ y Vλ humanos (indicado en Williams y Winter, *Eur. J. Immunol*., **23**:1456-1461 (1993)) y pueden emplearse para preparar repertorios de cadena ligera sintéticos. Los repertorios de genes de V sintéticos, basados en una gama de plegamientos de VH y VL, y longitudes de L3 y H3, codificarán anticuerpos con una considerable diversidad estructural. Después de la amplificación de ADN que codifica genes de V, los segmentos de genes de V de la línea germinal pueden redisponerse *in vitro* según los métodos de Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol*., **227**:381-388 (1992).

Pueden construirse repertorios de fragmentos de anticuerpos combinando repertorios de genes de VH y VL de varias maneras. Cada repertorio puede crearse en diferentes vectores, y los vectores pueden recombinarse *in vitro*, por ejemplo, como se describe en Hogrefe *et al.*, *Gene*, **128**:119-126 (1993), o in vivo mediante infección combinatoria, por ejemplo, el sistema loxP descrito en Waterhouse *et al.*, *Nucl. Acids Res*., **21**:2265-2266 (1993). La estrategia de recombinación *in vivo* aprovecha la naturaleza bicatenaria de los fragmentos Fab para superar el límite impuesto en el tamaño del banco por la eficacia de transformación de *E. coli*. Se clonan por separado repertorios de VH y VL sin estimular, uno en un fágmido y el otro en un vector de fago. Los dos bancos entonces se combinan mediante infección con fagos de bacterias que contienen fágmidos, de modo que cada célula contiene una combinación diferente, y el tamaño del banco sólo se ve limitado por el número de células presentes (aproximadamente 10^{12} clones). Ambos vectores contienen señales de recombinación *in vivo*, de modo que los genes de VH y VL se recombinan en un único replicón y se coencapsulan en los viriones del fago. Estos inmensos bancos proporcionan un gran número de diversos anticuerpos con buena afinidad (K_d^{-1} de aproximadamente 10^{-8} M).

Como alternativa, los repertorios pueden clonarse de modo secuencial en el mismo vector, por ejemplo, como se describe en Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**:7978-7982 (1991), o se ensamblan juntos mediante PCR y después se clonan, por ejemplo, como se describe en Clackson *et al.*, *Nature*, **352**:624-628 (1991). También puede utilizarse el ensamblaje con PCR para unir los ADN de VH y VL con ADN que codifica un espaciador peptídico flexible para formar repertorios de Fv monocatenario (scFv). En otra técnica, se emplea el "ensamblaje por PCR dentro de células" para combinar los genes de VH y VL dentro de linfocitos mediante PCR, y después clonar los repertorios de genes ligados, según se describe en Embleton *et al.*, *Nucl. Acids Res*., **20**:3831-3837 (1992).

La selección de los bancos puede realizarse mediante cualquier técnica conocida en la técnica. Por ejemplo, la poliubiquitina puede utilizarse para revestir los pocillos de placas de adsorción, expresarse sobre células hospedantes fijadas a placas de adsorción o utilizadas en clasificaciones celulares, o conjugarse a biotina para la captura con esferas revestidas con estreptavidina, o utilizarse en cualquier otro método conocido en la técnica para la inmunoadsorción de bancos de presentación de fagos.

Las muestras de bancos de fagos se ponen en contacto con poliubiquitina inmovilizada bajo condiciones adecuadas para la unión al menos a una parte de las partículas de fagos con el adosrbente. Normalmente se seleccionan las condiciones, incluyendo el pH, la fuerza iónica, la temperatura y similares, para que imiten las condiciones fisiológicas. Los fagos unidos a la fase sólida se lavan y después se eluyen con un ácido, por ejemplo, según se describe en Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **88**:7978-7982 (1991), o con un álcali, por ejemplo, según se describe en Marks *et al.*, *J. Mol. Biol*., **222**:581-597 (1991), o mediante competición por el antígeno de poliubiquitina, por ejemplo, en un procedimiento similar al método de competición por antígenos de Clackson *et al.*, *Nature*, **352**:624-628 (1991). Los fagos pueden enriquecerse en 20-1.000 veces en una única ronda de selección. Además, los fagos enriquecidos pueden cultivarse en cultivo bacteriano y someterse a otras rondas de selección.

La eficacia de la selección depende de muchos factores, incluyendo la cinética de la disociación durante el lavado, y si pueden unirse al antígeno múltiples fragmentos de anticuerpos sobre un único fago. Los anticuerpos con cinéticas de disociación rápidas (y afinidades de unión débiles) pueden ser retenidos mediante el uso de lavados cortos, presentación de fagos multivalente y alta densidad de revestimiento del antígeno en la fase sólida. La anta densidad no sólo estabiliza al fago durante las interacciones multivalentes, sino que favorece que el fago que se ha disociado se vuelva a unir. La selección de anticuerpos con cinéticas de disociación bajas (y buenas afinidades de unión) puede estimularse mediante el uso de lavados largos y presentación de fagos monovalente, según se describe en Bass *et al.*, *Proteins*, **8**:309-314 (1990), y en el documento WO 92/09690, y una baja densidad de revestimiento del antígeno, según se describe en Marks *et al.*, *Biotechnol*., **10**:779-783 (1992).

Es posible seleccionar entre anticuerpos de fagos con diferente afinidad por la poliubiquitina, incluso con afinidades que se diferencian muy poco. Sin embargo, la mutación aleatoria de un anticuerpo seleccionado (por ejemplo, según se realiza en algunas de las técnicas de maduración de la afinidad descritas anteriormente) puede producir muchos mutantes, la mayoría de unión al antígeno, y unos pocos con mayor afinidad. Limitando la presencia de poliubiquitina, pueden excluirse por competencia los fagos de alta afinidad raros. Para conservar todos los mutantes de mayor afinidad, los fagos pueden incubarse con un exceso de poliubiquitina biotinilada, pero con la poliubiquitina biotinilada a una concentración de molaridad menor que la constante de afinidad molar diana para la poliubiquitina. Los fagos de unión de alta afinidad entonces pueden ser capturados por esferas paramagnéticas revestidas con estreptavidina. Este “captura de equilibrio” permite seleccionar anticuerpos según sus afinidades de unión, con una sensibilidad que permite el aislamiento de clones mutantes con una afinidad tan solo dos veces mayor, a partir de un gran exceso de fagos con menor afinidad. Las condiciones utilizadas para lavar los fagos unidos a una fase sólida también pueden manipularse para discriminar basándose en la cinética de disociación.

Los clones anti-poliubiquitina pueden seleccionarse por la actividad. En una realización, la invención proporciona anticuerpos anti-poliubiquitina que bloquean la unión entre un ligando de poliubiquitina y la poliubiquitina, pero no bloquean la unión entre un ligando de poliubiquitina y una segunda proteína. Los clones Fv correspondientes a dichos anticuerpos anti-poliubiquitina pueden seleccionarse (1) aislando los clones anti-poliubiquitina de un banco de fagos según se describe en la anterior sección B(I) (2), y opcionalmente amplificando la población aislada de clones de fagos mediante el cultivo de la población en un hospedante bacteriano adecuado; (2) seleccionando la poliubiquitina y una segunda proteína para las cuales se desea una actividad de bloqueo y una actividad de no bloqueo, respectivamente; (3) adsorbiendo los clones del fago anti-poliubiquitina a poliubiquitina inmovilizada; (4) utilizando un exceso de la segunda proteína para eluir cualquier clon no deseado que reconozca los determinantes de unión a poliubiquitina que se solapan o son compartidos con los determinantes de unión de la segunda proteína; y (5) eluyendo los clones que permanecen adsorbidos después de la etapa (4). Opcionalmente, los clones con las propiedades de bloqueo/no bloqueo deseadas pueden enriquecerse repitiendo los procedimientos de selección descritos en la presente una o más veces.

El ADN que codifica los clones Fv de la invención puede aislarse y secuenciarse con facilidad utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando cebadores oligonucleotídicos diseñados para amplificar de modo específico las regiones codificadores de cadena pesada y ligera de interés a partir de moldes de ADN de hibrido o de fago). Tras haberse aislado, el ADN puede introducirse en vectores de expresión, que después se transfectan en células hospedantes, tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que, de otra manera, no producen proteínas de inmunoglobulinas, para obtener la síntesis de los anticuerpos monoclonales deseados en las células hospedantes recombinantes. Los artículos sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica anticuerpos incluyen Skerra *et al.*, *Curr. Opinion in Immunol*., **5**:256 (1993) y Pluckthun, *Immunol. Revs*., **130**:151 (1992).

El ADN que codifica los clones Fv de la invención puede combinarse con secuencias de ADN conocidas que codifican las regiones constantes de la cadena pesada y/o la cadena ligera (por ejemplo, las secuencias de ADN apropiadas pueden obtenerse en Kabat *et al.*, *supra*) para formar clones que codifican las cadenas pesada y/o ligera de longitud total o parcial. Se apreciará que pueden utilizarse las regiones constantes de cualquier isotipo para este

fin, incluyendo las regiones constantes de IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE, y que estas regiones constantes pueden obtenerse a partir de cualquier especie humana o animal. Un clon Fv derivado del ADN del dominio variable de una especie animal (tal como un ser humano) y después condensado con el ADN de la región constante de otra especie animal para fomar una secuencia o secuencias codificadoras para una cadena pesada y/o cadena ligera de longitud completa "híbrida" se incluye en la definición de anticuerpo "quimérico" e "híbrido", tal como se emplea en la presente. En una realización, un clon Fv derivado de ADN variable humano se condensa con un ADN de la región constante humana para formar una secuencia o secuencias codificadoras para todas las cadenas pesadas y/o cadenas ligeras de longitud parcial o total humanas.

Los anticuerpos producidos por los bancos sin estimular (naturales o sintéticos) pueden tener una afinidad moderada (K_d^{-1} de aproximadamente 10^6 a 10^7 M^{-1}), pero la maduración de la afinidad también puede imitarse *in vitro* mediante la construcción y la reselección de bancos secundarios, según se describe en Winter *et al.* (1994), *supra*. Por ejemplo, puede introducirse una mutación aleatoriamente *in vitro* utilizando polimerasas propensas a errores (indicado en Leung *et al.*, *Technique*, **1**:11-15 (1989)), en el método de Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol*., **226**:889-896 (1992), o en el método de Gram *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**:3576-3580 (1992). Además, la maduración de la afinidad puede realizarse mediante la mutación aleatoria de una o más CDR, por ejemplo, utilizando PCR con cebadores que portan secuencias aleatorias que abarcan la CDR de interés, en clones Fv individuales seleccionados, y seleccionar para los clones de mayor afinidad. El documento WO 96/07754 (publicado el 14 de marzo de 1996) describe un método para inducir la mutagénesis en una región determinante de la complementariedad de una cadena ligera de inmunoglobulina para crear un banco de genes de la cadena ligera. Otra estrategia eficaz es recombinar los dominios VH o VL seleccionados mediante presentación de fagos con repertorios de variantes de dominios V naturales obtenidos a partir de donantes no inmunizados, y seleccionar para la mayor afinidad en varias rondas de reordenamiento de cadenas, según se describe en Marks *et al.*, *Biotechnol.*, **10**:779-783 (1992). Esta técnica permite la producción de anticuerpos y de fragmentos de anticuerpos con afinidades en la gama de 10^{-9} M.

Otros métodos para generar anticuerpos anti-poliubiquitina

Otros métodos para generar y evaluar la afinidad de anticuerpos son muy conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Kohler *et al.*, Nature, 256:495 (1975); patente de EEUU nº 4.816.567; Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986); Kozbor, *J. Immunol*, **133**:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); Munson *et al.*, *Anal. Biochem*., **107**:220 (1980); Engels *et al.*, *Agnew. Chem. Int. Ed. Engl*., **28**:716-734 (1989); Abrahmsen *et al.*, *EMBO J*., **4**:3901 (1985); *Methods in Enzymology*, vol. 44 (1976); Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**:6851-6855 (1984).

Métodos generales

En general, la invención proporciona anticuerpos anti-poliubiquitina unida a K63 con maduración de la afinidad. Estos anticuerpos tienen mayor afinidad y especificidad por la poliubiquitina unida a K63 con relación a los anticuerpos descritos en la publicación de patente de EEUU nº US2007-0218069. El mejor Fab anti-enlace-K63 identificado en esta publicación (Apu2.16) tiene una Kd de aproximadamente 100 nM y una pequeña cantidad de unión artefactual a la poliubiquitina unida a K48. Los Fab y anticuerpos mejorados proporcionados en la presente son versiones con maduración de la afinidad de Apu2.16, y los que mejor se unen (véanse, por ejemplo, los Fabs Apu3.A8, Apu3.A12, y Apu3.B2 y sus versiones de anticuerpos) tienen un aumento en más de 10 veces en la afinidad frente a Apu2.16 para la poliubiquitina unida a K63 y una unión despreciable a la poliubiquitina unida a K48. Este aumento en la afinidad y la sensibilidad permite utilizar las moléculas de la invención para aplicaciones y métodos que se benefician de (a) la mayor sensibilidad de las moléculas de la invención y/o (b) la unión fuerte de la poliubiquitina unida a K63 por las moléculas de la invención y/o (c) la mayor especificidad de las moléculas de la invención por la poliubiquitina unida a K63 con relación a la poliubiquitina unida a K48, con relación a la molécula de origen Apu2.16.

En una realización, la invención proporciona anticuerpos anti-poliubiquitina unida a K63 que son útiles para el tratamiento de trastornos mediados por la poliubiquitina unida a K63, en el que se desea un bloqueo total o parcial de una o más actividades poliubiquitina unida a K63. En una realización, los anticuerpos anti-poliubiquitina unida a K63 de la invención se emplean para tratar el cáncer. En otra realización, los anticuerpos anti-poliubiquitina unida a K63 proporcionados en la presente se emplean para tratar trastornos musculares, tales como los indicados anteriormente. En otra realización, los anticuerpos anti-poliubiquitina unida a K63 proporcionados en la presente se emplean para tratar trastornos neurológicos, tales como los indicados anteriormente. En otra realización, los anticuerpos anti-poliubiquitina unida a K63 proporcionados en la presente se emplean para tratar una enfermedad genética. En otra realización, los anticuerpos anti-poliubiquitina unida a K63 proporcionados en la presente se emplean para tratar trastornos inmunológicos/inflamatorios.

Las propiedades exclusivas de los anticuerpos anti-poliubiquitina unida a K63 de la invención hacen que sean particularmente útiles para distinguir entre diferentes formas de poliubiquitina unida a de lisina en un sistema celular sin utilizar métodos biofísicos o de manipulación genética incómodos y caros, tales como la espectrometría de masas. Los anticuerpos anti-poliubiquitina unida a K63 de la invención pueden utilizarse para caracterizar la función

o funciones y las actividades de poliubiquitinas unidas a K63 *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, tal como se muestra en la presente, RIP e IRAK1 son modulados, en función y actividad, por un marcaje alternativo con poliubiquitina unida a K48 o unida a 63 debido a una estimulación con TNFα o IL-1β, respectivamente. Los anticuerpos anti-poliubiquitina unida a K63 de la invención permiten la detección sensible y específica de versiones ubiquitinadas-K63, por ejemplo de RIP y/o IRAK1 en ensayos biomoleculares sencillos y habituales, tales como inmunoprecipitaciones, ELISA, o inmunomicroscopía, sin necesidad de utilizar espectrometría de masas o manipulación genética. A su vez, esto proporciona una ventaja significativa para observar y aclarar el funcionamiento normal de estas vías y para detectar cuándo las vías están funcionando de modo aberrante.

Los anticuerpos anti-poliubiquitina unida a K63 de la invención también pueden utilizarse para determinar el papel de las poliubiquitinas unidas a de lisina concreto en el desarrollo y la patogénesis de una enfermedad. Por ejemplo, tal como se describió anteriormente, los anticuerpos anti-poliubiquitina unida a K63 de la invención pueden utilizarse para determinar si RIP o IRAK1 están poliubiquitinadas-K63 de modo aberrante, que a su vez proporciona información acerca del funcionamiento normal o aberrante de la señalización de TNFα o IL-1β, que puede correlacionarse con uno o más estados de enfermedad.

Los anticuerpos anti-poliubiquitina unida a K63 de la invención también pueden utilizarse para tratar enfermedades en las que una o más poliubiquitinas unidas a K63 están reguladas de modo aberrante o están funcionando de modo aberrante sin interferir con la actividad normal de las poliubiquitinas para las cuales los anticuerpos anti-poliubiquitina de la invención no son específicos.

En otro aspecto, los anticuerpos anti-poliubiquitina unida a K63 de la invención son útiles como reactivos para la detección y el aislamiento de la poliubiquitina unida a K63, tal como la detección de la poliubiquitina unida a K63 en diversos tipos celulares y tejidos, incluyendo la determinación de la densidad y la distribución de la poliubiquitina unida a K63 en poblaciones celulares y dentro de una célula concreta, y la clasificación celular basada en la presencia o la cantidad de poliubiquitina unida a K63. Los anticuerpos de la invención son capaces de unirse de modo específico no sólo a la poliubiquitina unida a K63 aislada con diversas longitudes de cadena, sino también a proteínas que han sido poliubiquitinadas con poliubiquitina unida a K63, y así en la presente se contempla la detección y la unión a una proteína libre (es decir, no conjugada con una proteína heteróloga) o poliubiquitinada unida a K63 (es decir, conjugada con una proteína heteróloga) y/o ambas.

En otro aspecto, los presentes anticuerpos anti-poliubiquitina unida a K63 son útiles para el desarrollo de antagonistas de poliubiquitina con patrones de actividad de bloqueo similares a los de los anticuerpos de la invención. Por ejemplo, los anticuerpos anti-poliubiquitina unida a K63 de la invención pueden utilizarse para determinar e identificar otros anticuerpos que tienen las mismas características de unión a poliubiquitina unida a K63 y/o capacidades de bloqueo de las vías mediadas por la poliubiquitina unida a K63.

Como otro ejemplo, los anticuerpos anti-poliubiquitina unida a K63 de la invención pueden utilizarse para identificar otros anticuerpos anti-poliubiquitina que se unen sustancialmente al mismo o a los mismos determinantes antigénicos de la poliubiquitina unida a K63 que los anticuerpos ejemplificados en la presente, incluyendo epitopos lineales y conformacionales.

Los anticuerpos anti-poliubiquitina de la invención pueden utilizarse en ensayos basados en las vías fisiológicas en las que está implicada la poliubiquitina unida a K63 para seleccionar antagonistas de molécula pequeña de la poliubiquitina unida a K63 que muestren efectos farmacológicos similares para bloquear la unión de uno o más compañeros de unión a la poliubiquitina unida a K63, que los anticuerpos. Por ejemplo, se sabe que la poliubiquitina unida a K63 está implicada en la reparación del ADN (véase, por ejemplo, Pickart y Fushman, Curr. Opin. Chem. Biol., 8:610-616 (2004)), y así la actividad de los anticuerpos anti-poliubiquitina unida a K63 para antagonizar una vía de reparación del ADN puede compararse con la actividad de uno o más antagonistas de molécula pequeña de la poliubiquitina unida a K63 potenciales en esa misma vía de reparación del ADN. De modo similar, en otro ejemplo, se sabe que la poliubiquitina unida a K63 está implicada en la formación de cuerpos de Lewy en la enfermedad de Parkinson (véase, por ejemplo, Lim *et al.*, J. Neurosci., 25(8):2002-2009 (2005)), y así la actividad de los anticuerpos anti-poliubiquitina unida a K63 para antagonizar la formación de cuerpos de Lewy puede compararse con la actividad de uno o más antagonistas de molécula pequeña de la poliubiquitina unida a K63 potenciales para antagonizar la formación de cuerpos de Lewy.

La generación de anticuerpos puede lograrse utilizando técnicas habituales en la técnica, incluyendo las descritas en la presente, tales como la técnica de hibridoma y la selección de bancos de moléculas ligantes presentadas por fagos. Estos métodos están bien establecidos en la técnica.

Brevemente, los anticuerpos anti-poliubiquitina de la invención pueden prepararse utilizando bancos combinatorios para seleccionar clones de anticuerpos sintéticos con la actividad o actividades deseadas. En principio, los clones de anticuerpos sintéticos se seleccionan mediante la selección de bancos de fagos que contienen fagos que presentan diversos fragmentos de la región variable de anticuerpo (Fv) condensados con proteínas de la envuelta del fago. Estos bancos de fagos se inmunoadsorben mediante cromatografía de afinidad contra el antígeno deseado. Los clones que expresan fragmentos Fv capaces de unirse al antígeno deseado se adsorben al antígeno y así se separan de los clones del banco que no se unen. Los clones de unión entonces se eluyen del antígeno, y después

pueden enriquecerse mediante ciclos adicionales de adsorción al antígeno/elución. Cualquiera de los anticuerpos anti-poliubiquitina de la invención puede obtenerse diseñando un procedimiento de selección de antígeno adecuado para la selección el clon de fago de interés, seguido de la construcción de un clon de anticuerpo anti-poliubiquitina de longitud completa utilizando las secuencias Fv del clon de fago de interés y las secuencias de la región constante adecuadas (Fc) descritas en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª edición, NIH Publication, 91-3242 Bethesda, MD (1991), vol. 1-3. Véase también la publicación PCT WO 03/102157, y las referencias citadas en ella.

En una realización, los anticuerpos anti-poliubiquitina de la invención son monoclonales. También se incluyen dentro del alcance de la invención fragmentos de anticuerpos, tales como fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH y $F(ab')_2$, y sus variaciones, de los anticuerpos anti-poliubiquitina proporcionados en la presente. Estos fragmentos de anticuerpos pueden crearse por medios tradicionales, tales como digestión enzimática, o pueden generarse mediante técnicas recombinantes. Estos fragmentos de anticuerpos pueden ser quiméricos, humanos o humanizados. Estos fragmentos son útiles para los objetivos experimentales, de diagnóstico y terapéuticos indicados en la presente.

Los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que forman la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que puedan estar presentes en cantidades pequeñas. Así, el adjetivo "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo no es una mezcla de anticuerpos discretos.

Los anticuerpos monoclonales anti-poliubiquitina de la invención pueden prepararse utilizando una diversidad de métodos conocidos en la técnica, incluyendo el método de hibridoma, descrito por primera vez en Kohler *et al.*, Nature, 256:495 (1975) o, como alternativa, pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinante (por ejemplo, patente de EEUU nº 4.816.567).

Vectores, células hospedantes y métodos recombinantes

Para la producción recombinante de un anticuerpo de la invención, el ácido nucleico que lo codifica se aísla y se inserta en un vector recplicable para la posterior clonación (amplificación del ADN) o para la expresión. El ADN que codifica el anticuerpo se aísla y se secuencia con facilidad utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse de modo específico con genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo). Están disponibles muchos vectores. La elección del vector depende en parte de la célula hospedante que se va a utilizar. Las células hospedantes incluyen, pero no se limitan a células de origen procariota o eucariota (en general, de mamífero). Se apreciará que, para este objetivo, pueden utilizarse las regiones constantes de cualquier isotipo, incluyendo las regiones constantes de IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE, y que estas regiones constantes pueden obtenerse a partir de cualquier especie humana o animal.

Generación de anticuerpos utilizando células hospedantes procariotas

Construcción de vectores

Las secuencias polinucleotídicas que codifican componentes polipeptídicos del anticuerpo de la invención pueden obtenerse utilizando técnicas recombinantes convencionales. Las secuencias polinucleotídicas deseadas pueden aislarse y secuenciarse a partir de células productoras de anticuerpos, tales como células de hibridoma. Como alternativa, los polinucleótidos pueden sintetizarse utilizando técnicas de PCR o un sintetizador de nucleótidos. Tras haberse obtenido, las secuencias que codifican los polipéptidos se insertan en un vector recombinante capaz de replicarse y expresar los polinucleótidos heterólogos en hospedantes procariotas. Pueden utilizarse muchos vectores que están disponibles y son conocidos en la técnica para los objetivos de la presente invención. La selección de un vector apropiado dependerá principalmente del tamaño de los ácidos nucleicos que se van a insertar en el vector y de la célula hospedante concreta que va a ser transformada por el vector. Cada vector contiene diversos componentes, dependiendo de su función (amplificación o expresión de un polinucleótido heterólogo, o ambas) y su compatibilidad con la célula hospedante concreta en la cual reside. Los componentes del vector en general incluyen, pero no se limitan a un origen de la replicación, un gen marcador de selección, un promotor, un sitio de unión a ribosomas (RBS), una secuencia señal, el inserto de ácido nucleico heterólogo, y una secuencia de terminación de la transcripción.

En general, se emplean vectores plasmídicos que contienen secuencias de replicones y de control que se derivan de especies compatibles con la célula hospedante, con relación a estos hospedantes. El vector normalmente porta un sitio de replicación, así como secuencias marcadoras que son capaces de proporcionar una selección fenotípica en células transformadas. Por ejemplo, *E. coli* generalmente se transforma utilizando pBR322, un plásmido derivado de una especie de *E. coli*. pBR322 contiene genes que codifican la resistencia a ampicilina (Amp) y tetraciclina (Tet), y así proporcionan un medio fácil para identificar a las células transformadas. pBR322, sus derivados, u otros bacteriófagos o plásmidos microbianos también pueden contener, o pueden modificarse para que contengan promotores que pueden ser empleados por el organismo microbiano para la expresión de proteínas endógenas. Los ejemplos de derivados de pBR322 utilizados para la expresión de anticuerpos concretos se describen en detalle en Carter *et al.*, patente de EEUU nº 5.648.237.

Además, los vectores de fago que contienen secuencias de replicones y de control que son compatibles con el microorganismo hospedante pueden emplearse como vectores transformantes con respecto a estos hospedantes. Por ejemplo, un bacteriófago, tal como λGEM.TM.-11, puede utilizarse para fabricar un vector recombinante que puede utilizarse para transformar células hospedantes susceptibles, tales como *E. coli* LE392.

El vector de expresión de la invención puede comprender dos o más parejas de promotor-cistrón, que codifican cada uno de los componentes del polipéptido. Un promotor es una secuencia reguladora no traducida localizada cadena arriba (5') a un cistrón que modula su expresión. Los promotores procariotas generalmente pertenecen a dos clases: inducibles, y constitutivos. Un promotor inducible es un promotor que da curso a unos mayores niveles de transcripción del cistrón bajo su control, en respuesta a cambios en la condición del cultivo, por ejemplo, la presencia o la ausencia de un nutriente, o un cambio en la temperatura.

Se conoce un gran número de promotores reconocidos por una diversidad de células hospedantes potenciales. El promotor seleccionado puede unirse operablemente a un ADN cistrónico que codifica la cadena ligera o pesada retirando el promotor del ADN de origen mediante digestión con enzimas de restricción, e insertando la secuencia del promotor aislada en el vector de la invención. Puede utilizarse la secuencia de promotor nativa y muchos promotores heterólogos para dirigir la amplificación y/o la expresión de los genes diana. En algunas realizaciones se emplean promotores heterólogos, puesto que en general permiten obtener una mayor transcripción y rendimientos más elevados del gen diana expresado, comparado con el promotor del polipéptido diana nativo.

Los promotores adecuados para su uso con hospedantes procariotas incluyen el promotor PhoA, los sistemas de promotores de β-galactamasa y lactosa, un sistema de promotor de triptófano (trp) y promotores híbridos, tales como el promotor *tac* o *trc*. Sin embargo, también son adecuados otros promotores que son funcionales en bacterias (tales como otros promotores de fagos o bacterianos conocidos). Sus secuencias de nucleótidos se han publicado, permitiendo con ello que los expertos en la técnica puedan acoplarlas a cistrones que codifican las cadenas ligera y pesada diana (Siebenlist *et al.* (1980), Cell, 20:269) utilizando conectores o adaptadores para suministrar los sitios de restricción requeridos.

En un aspecto de la invención, cada cistrón dentro del vector recombinante comprende un componente de secuencia señal de secreción que dirige la translocación de los polipéptidos expresados a través de la membrana. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser parte del ADN del polipéptido diana que se inserta en el vector. La secuencia señal seleccionada para el objetivo de este invención debe ser una secuencia que sea reconocida y procesada (es decir, rota por una peptidasa señal) por la célula hospedante. Para las células hospedantes procariotas que no reconocen ni procesan las secuencias señal nativas para los polipéptidos heterólogos, la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo que consiste en los conductores de la fosfatasa alcalina, penicilinasa, lpp, o enterotoxina II termoestable (STII), LamB, PhoE, PelB, OmpA, y MBP. En una realización de la invención, las secuencias señal utilizadas en ambos cistrones del sistema de expresión son secuencias señal de STII o sus variantes.

En otro aspecto, la producción de las inmunoglobulinas según la invención puede producirse en el citoplasma de la célula hospedante, y así no se requiere la presencia de secuencias señal de secreción dentro de cada cistrón. A este respecto, las cadenas ligera y pesada de la inmunoglobulina se expresan, se pliegan y se ensamblan para formar inmunoglobulinas funcionales dentro del citoplasma. Ciertas cepas hospedantes (por ejemplo, las cepas *trxB*$^-$ de *E. coli*) proporcionan condiciones en el citoplasma que son favorables para la formación de enlaces disulfuro, permitiendo con ello un plegamiento y un ensamblaje apropiados de las subunidad de la proteína expresada (Proba y Pluckthun, Gene, 159:203 (1995)).

Los anticuerpos de la invención también pueden producirse utilizando un sistema de expresión en el que la proporción cuantitativa de los componentes del polipéptido expresados puede modularse para maximizar el rendimiento de los anticuerpos de la invención segregrados y ensamblados de modo adecuado. Esta modulación se logra, al menos en parte, modulando simultáneamente las potencias de traducción para los componentes del polipéptido.

Una técnica para modular la potencia de traducción se describe en Simmons *et al.*, patente de EEUU nº 5.840.523. Emplea variantes de la región de inicio de la traducción (TIR) dentro de un cistrón. Para una TIR concreta, puede crearse una serie de variantes de secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico con una gama de potencias de traducción, proporcionando con ello un medio útil mediante el cual ajustar este factor al nivel de expresión deseado de la cadena específica. Pueden generarse variantes de TIR mediante técnicas de mutagénesis convencionales, que produzcan cambios en los codones que pueden alterar la secuencia de aminoácidos. En ciertas realizaciones, los cambios en la secuencia de nucleótidos son silenciosos. Las alteraciones en la TIR pueden incluir, por ejemplo, alteraciones en el número o el espaciamiento de las secuencias de Shine-Dalgarno, junto con alteraciones en la secuencia señal. Un método para generar secuencias señal mutantes es la generación de un "banco de codones" al principio de una secuencia codificadora que no cambie la secuencia de aminoácidos de la secuencia señal (es decir, los cambios son silenciosos). Esto puede lograrse cambiando el nucleótido en la tercera posición de cada codón; además, algunos aminoácidos, tales como leucina, serina y arginina, tienen múltiples primeras y segundas posiciones que pueden añadir complejidad en la preparación del banco. Este método de mutagénesis se describe en detalle en Yansura *et al.* (1992), *METHODS: A Companion to Methods in Enzymol*., 4:151-158.

En una realización, se genera un conjunto de vectores con una gama de potencias de TIR para cada cistrón incluido. Este conjunto limitado proporciona una comparación de los niveles de expresión de cada cadena, así como el rendimiento de los productos de anticuerpo deseados con diversas combinaciones de potencias de TIR. Las potencias de TIR pueden determinarse cuantificando el nivel de expresión de un gen indicador, según se describe en detalle en Simmons *et al.*, patente de EEUU nº 5.840.523. Basándose en la comparación de la potencia de traducción, las TIR individuales deseadas se seleccionan para ser combinadas en las construcciones de vectores de expresión de la invención.

Las células hospedantes procariotas adecuadas para expresar los anticuerpos de la invención incluyen Archaebacteria y Eubacteria, tales como organismos Gram-negativos o Gram-positivos. Los ejemplos de bacterias útiles incluyen *Escherichia* (por ejemplo, *E. coli*), bacilos (por ejemplo, *B. subtilis*), enterobacterias, especies de *Pseudomonas* (por ejemplo, *P.* aeruginosa), Salmonella typhimurium, Serratia marcescens, Klebsiella, Proteus, Shigella, Rhizobia, Vitreoscilla, o Paracoccus. En una realización, se emplean células Gram-negativas. En una realización, se emplean células de *E. coli* como hospedantes para la invención. Los ejemplos de cepas de *E. coli* incluyen la cepa W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C., American Society for Microbiology, 1987, pp. 1190-1219; ATCC nº de depósito 27.325) y sus derivados, incluyendo la cepa 33D3 que tiene el genotipo W3110 Δ*fhuA* (Δ*tonA*) *ptr3 lac Iq lacL8* Δ*ompT*Δ*(nmpc-fepE) degP4I kan*^{R} (patente de EEUU nº 5.639.635). También resultan adecuadas otras cepas y sus derivados, tales como *E. coli* 294 (ATCC 31.446), *E. coli* B, *E. coli*$_\lambda$ 1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* RV308 (ATCC 31.608). Estos ejemplos son ilustrativos y no limitantes. Los métodos para construir derivados de cualquiera de las bacterias mencionadas anteriormente que tienen genotipos definidos son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Bass *et al.*, Proteins, 8:309-314 (1990). En general es necesario seleccionar las bacterias apropiadas, tomando en consideración la replicabilidad del replicón en las células de una bacteria. Por ejemplo, *E. coli,* y especies de *Serratia* o *Salmonella* pueden utilizarse de modo adecuado como hospedantes cuando se emplean plásmidos conocidos, tales como pBR322, pBR325, pACYC177, o pKN410, para suministrar el replicón. Generalmente, la célula hospedante debería poder segregar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas, y se pueden incorporar de modo deseable otros inhibidores de proteasas en el cultivo celular.

Producción de anticuerpos

Las células hospedantes se transforman con los vectores de expresión descritos anteriormente y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

Los medios de transformación introducen ADN en el hospedante procariota de modo que el ADN pueda replicarse, tanto como un elemento extracromosómico como mediante integración cromosómica. Dependiendo de la célula hospedante utilizada, la transformación se realiza utilizando técnicas convencionales apropiadas para dichas células. En general se utiliza un tratamiento con calcio que emplea cloruro de calcio para células bacterianas que contienen importantes barreras de pared celular. Otro método para la transformación emplea polietilenglicol/DMSO. Otra técnica utilizada es la electroporación.

Las células procariotas utilizadas para producir los polipéptidos de la invención se cultivan en medios conocidos en la técnica y adecuados para el cultivo de las células hospedantes seleccionadas. Los ejemplos de medios adecuados incluyen caldo de cultivo Luria (LB) más los necesarios suplementos de nutrientes. En algunas realizaciones, el medio también contiene un agente de selección, elegido basándose en la construcción del vector de expresión, para permitir el crecimiento selectivo de células procariotas que contienen el vector de expresión. Por ejemplo, se añade ampicilina al medio para el crecimiento de las células que expresan un gen de resistencia a la ampicilina.

También puede introducirse cualquier suplemento necesario, además de fuentes de carbono, nitrógeno y fosfato inorgánico, a concentraciones apropiadas, por sí solo o mezclado con otro suplemento o medio, tal como una fuente de nitrógeno compleja. Opcionalmente, el medio de cultivo puede contener uno o más agentes reductores seleccionados del grupo que consiste en glutatión, cisteína, cistamina, tioglicolato, ditioeritritol y ditiotreitol.

Las células hospedantes procariotas se cultivan a temperaturas adecuadas. Para el crecimiento de *E. coli*, por ejemplo, el crecimiento se produce en un intervalo de temperaturas que incluye, pero no se limita a aproximadamente 20 ºC a aproximadamente 39 ºC, aproximadamente 25 ºC a aproximadamente 37 ºC, y a aproximadamente 30 ºC. El pH del medio puede ser cualquier pH que varíe de aproximadamente 5 a aproximadamente 9, dependiendo principalmente del organismo hospedante. Para *E. coli*, el pH puede ser de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,4, o aproximadamente 7,0.

Si se emplea un promotor inducible en el vector de expresión de la invención, la expresión de las proteínas se induce bajo condiciones adecuadas para la activación del promotor. En un aspecto de la invención, se emplean promotores de la PhoA para controlar la transcripción de los polipéptidos. Por consiguiente, las células hospedantes transformadas se cultivan en un medio limitante de fosfato para la inducción. En una realización, el medio limitante de fosfato es el medio C.R.A.P (véase, por ejemplo, Simmons *et al.*, *J. Immunol. Methods* (2002), 263:133-147). Puede utilizarse una diversidad de otros inductores, según la construcción de vector empleada, tal como se conoce

en la técnica.

En una realización, los polipéptidos expresados de la presente invención se segregan hacia el periplasma de las células hospedantes y se recuperan de este. La recuperación de las proteínas generalmente implica romper el microorganismo, en general por medios tales como el choque osmótico, la sonicación, o la lisis. Tras haber roto las células, los restos celulares o las células enteras pueden retirarse mediante centrifugación o filtración. Las proteínas pueden purificarse aún más, por ejemplo, mediante cromatografía en una resina de afinidad. Como alternativa, las proteínas pueden transportarse hacia el medio de cultivo y aislarse de este. Las células pueden retirarse del cultivo, y el sobrenadante del cultivo se filtra y se concentra para aumentar la purificación de las proteínas producidas. Los polipéptidos expresados después pueden aislarse e identificarse utilizando métodos generalmente conocidos, tales como la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y el análisis de la transferencia Western.

En un aspecto de la invención, la producción de anticuerpo se realiza en grandes cantidades mediante un proceso de fermentación. Están disponibles diversos procedimientos de fermentación discontinua a gran escala para la producción de proteínas recombinantes. Las fermentaciones a gran escala tienen una capacidad de al menos 1000 litros, por ejemplo, una capacidad de aproximadamente 1.000 a 100.000 litros. Estos fermentadores emplean propulsores agitadores para distribuir el oxígeno y los nutrientes, en especial la glucosa (una fuente de carbono/energía habitual). La fermentación a pequeña escala se refiere en general a una fermentación en un fermentador que tiene una capacidad volumétrica no mayor que aproximadamente 100 litros, y que puede variar de aproximadamente 1 litro a aproximadamente 100 litros.

En un proceso de fermentación, la inducción de la expresión de proteínas generalmente se inicia después de que las células hayan sido cultivadas bajo condiciones adecuadas hasta una densidad deseada, por ejemplo, una OD_{550} de aproximadamente 180-220, en cuya etapa las células están en la fase estacionaria temprana. Puede utilizarse una diversidad de inductores, según la construcción de vector empleada, tal como se conoce en la técnica y se describe anteriormente. Las células pueden cultivarse durante periodos más cortos antes de la inducción. Las células generalmente se inducen durante aproximadamente 12-50 horas, aunque puede emplearse un tiempo de inducción más largo o más corto.

Para mejorar el rendimiento de producción y la calidad de los polipéptidos de la invención pueden modificarse diversas condiciones de la fermentación. Por ejemplo, para mejorar el ensamblaje y el plegamiento adecuados de los polipéptidos de anticuerpos segregados, pueden emplearse vectores que sobreexpresan proteínas de chaperona, tales como proteínas Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD y/o DsbG) o FkpA (una peptidilprolil cis,trans-isomerasa con actividad chaperona), para cotransformar las células procariotas hospedantes. Se ha demostrado que las proteínas de chaperona facilitan el plegamiento adecuado y la solubilidad de proteínas heterólogas producidas en células hospedantes bacterianas (Chen *et al.* (1999), *J. Bio. Chem*., 274:19601-19605; Georgiou *et al.*, patente de EEUU nº 6.083.715; Georgiou *et al.*, patente de EEUU nº 6.027.888; Bothmann y Pluckthun (2000), *J. Biol. Chem*., 275:17100-17105; Ramm y Pluckthun (2000), *J. Biol. Chem*., 275:17106-17113; Arie *et al.* (2001), *Mol. Microbiol*., 39:199-210).

Para minimizar la proteolisis de las proteínas heterólogas expresadas (en especial las que son proteolíticamente sensibles), para la presente invención pueden utilizarse ciertas cepas de hospedantes deficientes para enzimas proteolíticas. Por ejemplo, pueden modificarse cepas de células hospedantes para realizar una mutación o mutaciones genéticas en los genes que codifican proteasas bacterianas conocidas, tales como proteasa III, OmpT, DegP, Tsp, proteasa I, proteasa Mi, proteasa V, proteasa VI y sus combinaciones. Algunas cepas deficientes en proteasas de *E. coli* están disponibles y se describen, por ejemplo, en Joly *et al.* (1998), *supra*; Georgiou *et al.*, patente de EEUU nº 5.264.365; Georgiou *et al.*, patente de EEUU nº 5.508.192; Hara *et al.*, *Microbial Drug Resistance*, 2:63-72 (1996).

En una realización, las cepas de *E. coli* deficiente para enzimas proteolíticas y transformadas con plásmidos que sobreexpresan una o más proteínas de chaperona se emplean como células hospedantes en el sistema de expresión de la invención.

Purificación de anticuerpos

En una realización, la proteína de anticuerpo producida en la presente se purifica aún más para obtener preparaciones que son sustancialmente homogéneas para posteriores ensayos y usos. Pueden emplearse los métodos de purificación de proteínas convencionales conocidos en la técnica. Los siguientes procedimientos son ejemplos de procedimientos de purificación adecuados: fraccionamiento sobre columnas de inmunoafinidad o de intercambio iónico, precipitación en etanol, HPLC en fase inversa, cromatografía sobre sílice o sobre una resina de intercambio catiónico, tal como DEAE, cromatoenfoque, SDS-PAGE, precipitación con sulfato de amonio, y filtración en gel empleando, por ejemplo, Sephadex G-75.

En un aspecto, se emplea proteína A inmovilizada sobre una fase sólida para la purificación por inmunoafinidad de los productos de anticuerpo de la invención. La proteína A es una proteína de la pared celular de 41 kD de *Staphylococcus aureus* que se une con alta afinidad a la región Fc de anticuerpos (Lindmark *et al.* (1983), *J. Immunol. Meth.*, 62:1-13). La fase sólida sobre la cual se inmoviliza a la proteína A puede ser una columna que

comprende una superficie de vidrio o sílice, o una columna de vidrio de poro controlado o una columna de ácido silícico. En algunas aplicaciones, la columna se reviste con un reactivo, tal como glicerol, para intentar prevenir la adherencia no específica de contaminantes.

Como primera etapa de purificación, la preparación derivada del cultivo celular, tal como se describió anteriormente, puede aplicarse a una fase sólida con proteína A inmovilizada para permitir la unión específica del anticuerpo de interés a la proteína A. La fase sólida entonces se lava para eliminar los contaminantes unidos de forma no específica a la fase sólida. Por último, el anticuerpo de interés se recupera de la fase sólida mediante elución.

Generación de anticuerpos utilizando células hospedantes eucariotas

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

(i) Componente de secuencia señal

Un vector para su uso en una célula hospedante eucariota también puede contener una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de ruptura específico en el N-terminal de la proteína o el polipéptido maduros de interés. La secuencia señal heteróloga seleccionada en general es una secuencia que es reconocida y procesada (es decir, rota por una peptidasa señal) por la célula hospedante. En la expresión en células de mamífero están disponibles secuencias señal de mamífero, así como conductores de secreción víricos, por ejemplo, la señal gD del herpes simplex.

El ADN para dicha región precursora se acopla en marco de lectura con el ADN que codifica el anticuerpo.

(ii) Origen de la replicación

En general, no es necesario un componente de origen de la replicación para vectores de expresión de mamífero. Por ejemplo, el origen de SV40 puede utilizarse generalmente sólo porque contiene el promotor temprano.

(iii) Componente de gen de selección

Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también denominado marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato, o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas, cuando sea pertinente, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles en un medio complejo.

Un ejemplo de esquema de selección emplea un fármaco para detener el crecimiento de una célula hospedante. Las células que se transforman con éxito con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia al fármaco y, así, sobreviven al régimen de selección. Los ejemplos de esta selección dominante emplean los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Otro ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero son los que permiten la identificación de células competentes para captar el ácido nucleico del anticuerpo, tale como DHFR, timidina quinasa, metalotioneína I y -II (por ejemplo, genes de metalotioneína de primate), adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc.

Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección DHFR pueden identificarse primero mediante el cultivo de todos los transformantes en un medio de cultivo que contenga metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Cuando se emplea DHFR de tipo salvaje, las células hospedantes apropiadas incluyen, por ejemplo, la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en actividad DHFR (por ejemplo, ATCC CRL-9096).

Como alternativa, las células hospedantes (en particular, los hospedantes de tipo salvaje que contienen DHFR endógeno) transformadas o cotransformadas con secuencias de ADN que codifican un anticuerpo, una proteína DHFR de tipo salvaje, y otro marcador seleccionable, tal como aminoglicósido 3'-fosfotransferasa (APH) pueden seleccionarse mediante crecimiento celular en un medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable, tal como un antibiótico aminoglicosídico, por ejemplo, kanamicina, neomicina, o G418. Véase la patente de EEUU nº 4.965.199.

(iv) Componente de promotor

Los vectores de expresión y clonación habitualmente contienen un promotor que es reconocido por el organismo hospedante y que está unido operablemente a un ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés (por ejemplo, un anticuerpo). Las secuencias de promotores son conocidas en eucariotas. Casi todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente 25 a 30 bases cadena arriba del sitio en el que se inicia la

transcripción. Otra secuencia que se encuentra de 70 a 80 bases cadena arriba del inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT, en la que N puede ser cualquiera nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucariotas se encuentra una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola de poliA al extremo 3' de la secuencia codificadora. Todas estas secuencias se insertan de modo adecuado en vectores de expresión eucariotas.

La transcripción de polipéptidos de anticuerpos a partir de vectores en células hospedantes de mamífero puede controlarse, por ejemplo, mediante promotores obtenidos de los genomas de virus, tales como virus de polioma, virus de la viruela aviar, adenovirus (tales como adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y virus de simio 40 (SV40), de promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, o de promotores de choque térmico, con la condición de que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de la célula hospedante.

Los promotores temprano y tardío del virus SV40 se obtienen de modo conveniente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de la replicación vírico de SV40. El promotor inmediato temprano del citomegalovirus humano se obtiene de modo conveniente como un fragmento de restricción HindIIIE. Un sistema para expresar ADN en hospedantes mamíferos que emplea el virus del papiloma bovino es un vector descrito en la patente de EEUU 4.419.446. Una modificación de este sistema se describe en la patente de EEUU nº 4.601.978. Véase también Reyes *et al.*, *Nature*, 297:598-601 (1982) sobre la expresión de ADNc de β-interferón humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina quinasa del virus del herpes simplex. Como alternativa, puede utilizarse como promotor la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous.

(v) Componente de elemento potenciador

La transcripción de ADN que codifica un polipéptido de anticuerpo de la invención en eucariotas superiores a menudo puede aumentarse insertando una secuencia potenciadora en el vector. Se conocen muchas secuencias potenciadoras de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina, α-fetoproteína, e insulina). Sin embargo, generalmente se empleará un potenciador de un virus de célula eucariota. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de la replicación (bp 100-270), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de la replicación, y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, *Nature*, 297:17-18 (1982), sobre elementos potenciadores para la activación de promotores eucariotas. El potenciador puede introducirse en el vector en la posición 5' o 3' a la secuencia codificadora del polipéptido de anticuerpo, pero en general se localiza en un sitio 5' del promotor.

(vi) Componente de terminación de la transcripción

Los vectores de expresión utilizados en células hospedantes eucariotas generalmente también contendrán las secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Estas secuencias habitualmente están disponibles de regiones no traducidas 5', y a veces 3', de ADN o ADNc eucariotas o víricos. Estas regiones contienen segmentos nucleotídicos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm que codifica un anticuerpo. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadeniliación de la hormona del crecimiento bovina. Véase el documento WO 94/11026 y los vectores de expresión descritos en él.

(vii) Selección y transformación de células hospedantes

Las células hospedantes adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores en la presente incluyen las células de eucariotas superiores descritas en la presente, incluyendo células hospedantes de vertebrado. La propagación de células de vertebrado en cultivo (cultivo de tejido) se ha convertido en un procedimiento habitual. Los ejemplos de líneas de células hospedantes de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada con SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (células 293 o células 293 subclonada para el crecimiento en cultivo de suspensión, Graham *et al.*, *J. Gen Virol*., 36:59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub *et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980)); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod*., 23:243-251 (1980)); células de riñón de ratón (CVl ATCC CCL 70); celulas de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón caninas (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células pulmonares humanas (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humanas (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci*., 383:44-68 (1982)); céulas MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

Las células hospedantes se transforman con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente para la producción de anticuerpos y se cultivan en un medio nutriente convencional modificado según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar tranformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

(viii) Cultivar las células hospedantes

Las células hospedantes utilizadas para producir un anticuerpo de esta invención pueden cultivarse en una diversidad de medios. Los medios disponibles en el mercado, tales como medio F10 de Ham (Sigma), medio esencial mínimo (MEM, Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Sigma) son adecuados para cultivar las células hospedantes. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham *et al.*, *Meth. Enz*., 58:44 (1979), Bames *et al.*, *Anal. Biochem*., 102:255 (1980), patentes de EEUU nº 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; los documento WO 90/03430; WO 87/00195; o la patente de EEUU Re. 30.985, puede utilizarse como medio de cultivo para las células hospedantes. Cualquiera de estos medios puede suplementarse, según sea necesario, con hormonas y/u otros factores del crecimiento (tales como insulina, transferrina, o factor del crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio, y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMYCIN™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos que están presentes habitualmente a unas concentraciones finales en el intervalo micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. Cualquier otro suplemento necesario también puede incluirse a concentraciones apropiadas que son conocidas por los expertos en la técnica. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, serán las previamente utilizadas con la célula hospedante seleccionada para la expresión, y serán evidentes para los expertos en la técnica.

(ix) Purificación del anticuerpo

Cuando se emplean técnicas recombinantes, el anticuerpo puede producirse intracelularmente, o puede segregarse directamente al medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como primera etapa, en general se eliminan los restos en partículas, tanto células hospedantes como fragmentos lisados, por ejemplo mediante centrifugación o ultrafiltración. Cuando el anticuerpo se segrega hacia el medio, los sobrenadantes de estos sistemas de expresión generalmente primero se concentran utilizando un filtro de concentración de proteínas disponible en el mercado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Puede incluirse un inhibidor de proteasas, tales como PMSF, en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteolisis y pueden incluirse antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes adventicios.

La composición de anticuerpos preparada a partir de las células puede purificarse utilizando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis, y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad una técnica de purificación aceptable en general. La idoneidad de los reactivos de afinidad, tales como la proteína A, como ligando de afinidad depende de la especie y del isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A puede utilizarse para purificar anticuerpos que se basan en cadenas pesadas γ1, γ2, o γ4 humanas (Lindmark *et al.*, *J. Immunol Meth*., 62:1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para γ3 humana (Guss *et al.*, *EMBO J*., 5:1567-1575 (1986)). Lo más habitual es que la matriz a la que une el ligando de afinidad sea agarosa, pero están disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables, tales como vidrio con poro controlado o poli(estirendivinil)benceno, permiten unos mayores caudales y unos tiempos de procesamiento más cortos que los que pueden lograrse con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio C_H3, la resina Bakerbond ABX™ (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas, tales como fraccionamiento sobre una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC en fase inversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía sobre heparina SEPHAROSE™, cromatografía sobre una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de poli(ácido aspártico)), cromatoenfoque, SDS-PAGE, y precipitación con sulfato de amonio, también están disponibles, dependiendo del anticuerpo que se va a recuperar.

Después de cualquier etapa o etapas de purificación preliminares, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y los contaminantes puede someterse a otras etapas de purificación, según sea necesario, por ejemplo, con una cromatografía de interacción hidrófoba de pH bajo utilizando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5-4,5, en general realizada a bajas concentraciones salinas (por ejemplo, de aproximadamente 0-0,25 M de sal).

Debe advertirse que, en general, las técnicas y las metodologías para preparar anticuerpos para su uso en investigación, ensayos y usos clínicos están bien establecidas en la técnica, son coherentes con lo anterior y/o se consideran apropiadas por los expertos en la técnica para el anticuerpo de interés concreto.

Ensayos de actividad

Los anticuerpos de la invención pueden caracterizarse por sus propiedades físicas/químicas y las funciones biológicas mediante diversos ensayos conocidos en la técnica.

Los anticuerpos purificados pueden caracterizarse aún más mediante una serie de ensayos que incluyen, pero no se limitan a secuenciación N-terminal, análisis de aminoácidos, cromatografía líquida de alta presión de exclusión molecular no desnaturalizante (HPLC), espectrometría de masas, cromatografía de intercambio iónico, y digestión con papaína.

Cuando sea necesario, los anticuerpos se analizarán para su actividad biológica. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención se ensayan para su actividad de unión al antígeno. Los ensayos de unión al antígeno que son conocidos en la técnica y que pueden utilizarse en la presente incluyen, sin limitación, cualquier ensayo de

unión directa o competitiva empleando técnicas tales como transferencias Western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoadsorbente ligado a enzimas), inmunoensayos de “sandwich”, ensayos de inmunoprecipitación, inmunoensayos fluorescentes, e inmunoensayos de proteína A.

En una realización, la invención contempla un anticuerpo alterado que posee algunas, pero no todas las funciones efectoras, que hace que sea un candidato deseable para muchas aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante, pero ciertas funciones efectoras (tales como el complemento y ADCC) son innecesarias o perjudiciales. En ciertas realizaciones, las actividades Fc del anticuerpo se miden para asegurarse de que sólo se mantienen las propiedades deseadas. Pueden realizarse ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/disminución de las actividades CDC y/o ADCC. Por ejemplo, pueden realizarse ensayos de unión al receptor de Fc (FcR) para asegurarse de que el anticuerpo carece de unión a FcγR (y, por tanto, probablemente carece de actividad ADCC), pero conserva la capacida de unión a FcRn. Las principales células que median en ADCC, las células NK, sólo expresan FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol*., 9:457-492 (1991). Un ejemplo de un ensayo *in vitro* para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés se describe en las patentes de EEUU nº 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células asesinas naturales (NK). Como alternativa, o además, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal, tal como el descrito en Clynes *et al.*, *PNAS (USA)*, 95:652-656 (1998). También pueden realizarse ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo no es capaz de unirse a C1q y, por tanto, carece de actividad CDC. Para evaluar la activación del complemento puede realizarse un ensayo de CDC, por ejemplo, según se describe en Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 202:163 (1996). Las determinaciones de la unión a FcRn y la eliminación/semivida *in vivo* también pueden realizarse utilizando métodos conocidos en la técnica.

Fragmentos de anticuerpos

La presente invención incluye fragmentos de anticuerpos. En ciertas circunstancias existen ventajas en la utilización de fragmentos de anticuerpos, en lugar de anticuerpos enteros. El tamaño más pequeño de los fragmentos permite una eliminación rápida, y puede conducir a un mejor acceso a tumores sólidos.

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtuvieron mediante la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto *et al.*, Journal of Biochemical and Biophysical Methods. 24:107-117 (1992); y Brennan *et al.*, Science, 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos ahora pueden ser producidos directamente por células hospedantes recombinantes. Los fragmentos de anticuerpos Fab, Fv y ScFv pueden expresarse y segregarse de *E. coli*, permitiendo con ello la fácil producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpos pueden aislarse a partir de los bancos de fagos de anticuerpos analizados anteriormente. Como alternativa, los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de *E. coli* y conjugarse químicamente para formar fragmentos $F(ab')_2$ (Carter *et al.*, Bio/Technology, 10:163-167 (1992)). Según otra estrategia, los fragmentos $F(ab')_2$ pueden aislarse directamente del cultivo de células hospedantes recombinantes. Se describen fragmentos Fab y $F(ab')_2$ con mayor semivida *in vivo* que comprenden restos del epitopo de unión al receptor de reciclaje en la patente de EEUU nº 5.869.046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para los expertos en la técnica. En otras realizaciones, el anticuerpo elegido es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véase el documento WO 93/16185; patentes de EEUU nº 5.571.894, y 5.587.458. Fv y sFv son las únicas especies con sitios de combinación intactos que no tienen regiones constantes; así, son adecuados para una reducida unión no específica durante el uso *in vivo*. Pueden construirse proteínas de fusión de sFv para conseguir la fusión de una proteína efectora al extremo amino- o carboxilo-terminal de un sFv. Véase, Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, *supra*. El fragmento de anticuerpo también puede ser un “anticuerpo lineal”, por ejemplo, según se describe en la patente de EEUU nº 5.641.870. Estos fragmentos de anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

Anticuerpos humanizados

La invención incluye anticuerpos humanizados. Se conocen diversos métodos para humanizar anticuerpos no humanos en la técnica. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado puede tener introducidos uno o más restos aminoácidos procedentes de una fuente que no es humana. Estos restos aminoácidos no humanos a menudo se denominan restos “importados”, que se obtienen generalmente de un dominio variable “importado”. La humanización puede realizarse fundamentalmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones *et al.* (1986), *Nature*, 321:522-525; Riechmann *et al.* (1988), *Nature*, 332:323-327; Verhoeyen *et al.* (1988), *Science*, 239:1534-1536), sustituyendo las secuencias de la región hipervariable por las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano. Por consiguiente, estos anticuerpos “humanizados” son anticuerpos quiméricos (patente de EEUU nº 4.816.567), en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la correspondiente secuencia de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son generalmente anticuerpos humanos en los que algunos restos de la región hipervarible y quizás algunos restos de FR son reemplazados por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

La elección de los dominios variables humanos, tanto de la cadena ligera como pesada, para ser utilizados en la preparación de los anticuerpos humanizados puede ser importante para reducir la antigenicidad. Según el

denominado método de “mejor ajuste”, la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se selecciona frente al banco completo de secuencias de dominios variables humanos conocidas. La secuencia humana que esté más cercana a la del roedor entonces se acepta como la región estructural humana para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.* (1993), *J. Immunol*., 151:2296; Chothia *et al.* (1987), *J. Mol. Biol*., 196:901). Otro método utiliza una región estructural concreta derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. La misma región estructural puede utilizarse para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter *et al.* (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285; Presta *et al.* (1993), *J. Immunol*., 151:2623).

También es deseable, en general, que los anticuerpos se humanicen manteniendo la alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, según un método, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias de origen y diversos productos humanizados conceptuales que emplean modelos tridimensionales de las secuencias de origen y humanizadas. Los modelos de inmunoglobulinas tridimensionales generalmente están disponibles y son familiares para los expertos en la técnica. Están disponibles programas informáticos que ilustran y presentan estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. El estudio de estas presentaciones permite el análisis del papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, pueden seleccionarse y combinarse restos de FR del receptor e importar secuencia de modo que se logra la característica deseada del anticuerpo, tal como la mayor afinidad por el antígeno o antígenos diana. En general, los restos de la región hipervariable están directa y lo más sustancialmente implicados en influir en la unión al antígeno.

Anticuerpos humanos

Pueden construirse anticuerpos anti-poliubiquitina humanos de la invención mediante la combinación de una secuencia o secuencias de dominios variables de clones Fv seleccionadas de bancos de presentación de fagos derivados de seres humanos, con una secuencia o secuencias de dominios constantes humanos conocidas, según se describió anteriormente. Como alternativa, los anticuerpos anti-poliubiquitina monoclonales humanos de la invención pueden prepararse mediante el método del hibridoma. Se han descrito líneas de células de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano, por ejemplo, en Kozbor, *J. Immunol*., **133**:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Boerner *et al.*, *J. Immunol*, **147**:86 (1991).

Ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que sean capaces, tras una inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulinas endógenas. Por ejemplo, se ha indicado que la deleción homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada del anticurpo (JH) en ratones mutantes de la línea germinal y quiméricos produce la completa inhibición de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de la colección de genes de inmunoglobulinas de la línea germinal humanos a estos ratones mutantes de la línea germinal da como resultado la producción de anticuerpos humanos después de la exposición al antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **90**:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, **362**:255 (1993); Bruggermann *et al.*, *Year in Immunol*., 7:33 (1993).

También puede utilizarse el reordenamiento de genes para obtener anticuerpos humanos a partir de anticuerpos no humanos, por ejemplo, de roedor, en los que el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades similares al del anticuerpo no humano de origen. Según este método, que también se denomina “impronta de epitopos”, la región variable de la cadena pesada o de la cadena ligera de un fragmento de anticuerpo no humano obtenido mediante técnicas de presentación de fagos, según se describió anteriormente, se reemplaza por un repertorio de genes del dominio V humano, creando una población de quimeras de Fab o scFv de cadena no humana/cadena humana. La selección con el antígeno da como resultado el aislamiento de un Fab o scFv quimérico de cadena no humana/cadena humana, en el que la cadena humana restablece el sitio de unión al antígeno destruido tras la eliminación de la correspondiente cadena no humana en el clon de presentación de fago primario, es decir, el epitopo gobierna (establece la impronta) la elección del compañero de cadena humana. Cuando el proceso se repite para reemplazar el resto de las cadenas no humanas se obtiene un anticuerpo humano (véase el documento PCT WO 93/06213, publicado el 1 de abril de 1993). A diferencia de la humanización tradicional de anticuerpos no humanos mediante injerto de CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos, que no tienen restos de FR ni de CDR de origen no humano.

Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión por al menos dos antígenos diferentes. En ciertas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos humanos o humanizados. En ciertas realizaciones, una de las especificidades de unión es para la poliubiquitina que incluye un enlace de lisina específico, y la otra es para cualquier otro antígeno. En ciertas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos pueden unirse a dos poliubiquitinas diferentes que tienen dos enlaces de lisina diferentes. Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o como fragmentos de anticuerpos (*por ejemplo*, anticuerpos biespecíficos $F(ab')_2$).

Los métodos para fabricar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos parejas de cadena pesada cadena ligera de inmunoglobulina, en las que las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein y Cuello, *Nature*, **305**:537 (1983)). Debido a la colección aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpos diferentes, de las cuales sólo una tiene la correcta estructura biespecífica. La purificación de la molécula correcta, que normalmente se realiza mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante incómoda, y los rendimientos del producto son bajos. Se describen procedimientos similares en el documento WO 93/08829, publicado el 13 de mayo de 1993, y en Traunecker *et al.*, *EMBO J*., 10:3655 (1991).

Según una realización diferente, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación antígeno-anticuerpo) se condensan con las secuencias del dominio constante de inmunoglobulinas. La fusión, por ejemplo, es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones de bisagra, CH2, y CH3. En ciertas realizaciones, la primera región constante de cadena pesada (CH1), que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera, está presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión distintos y se cotransfectan en un organismo hospedante adecuado. Esto proporciona una mayor flexibilidad para ajustar las proporciones mútuas de los tres fragmentos polipeptídicos en realizaciones en las que unas proporciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas utilizadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo , es posible insertar las secuencias codificadoras para dos o para las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en proporciones iguales produce altos rendimientos, o cuando las proporciones no tienen importancia significativa.

En una realización de esta estrategia, los anticuerpos biespecíficos están compuestos de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y una pareja de cadena pesada cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se descubrió que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de las combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, puesto que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una manera fácil de separación. Esta estrategia se describe en el documento WO 94/04690. Para mayores detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

Según otra estrategia, la interfase entre una pareja de moléculas de anticuerpos puede modificarse para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinante. La interfase comprende al menos una parte del dominio C_H3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfase de la primer molécula de anticuerpo son reemplazadas por cadenas laterales más largas (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean “cavidades” compensatorias de tamaño idéntico o similar a la cadena o cadenas laterales grandes sobre la interfase de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando cadenas laterales de aminoácidos grandes por otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero frente a otros productos finales no deseados, tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos entrecruzados o “heteroconjugados”. Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse a avidina, el otro a biotina. Se ha propuesto que estos anticuerpos, por ejemplo, dirijan células del sistema inmunológico hacia células no deseadas (patente de EEUU nº 4.676.980), y para el tratamiento de infección por VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/00373, y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden fabricarse utilizando cualquier método de entrecruzamiento conveniente. Los agentes de entrecruzamiento adecuados son muy conocidos en la técnica, y se describen en la patente de EEUU nº 4.676.980, junto con una serie de técnicas de entrecruzamiento.

Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos también se han descrito en la bibliografía. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos biespecíficos utilizando enlaces químicos. Brennan *et al.*, *Science*, **229**:81 (1985) describen un procedimiento en el que los anticuerpos intactos se rompen de modo proteolítico para generar fragmentos $F(ab')_2$. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditiol arsenito de sodio para estabilizar a los ditioles vecinales y evitar la formación de enlaces disulfuro intermoleculares. Los fragmentos Fab’ generados entonces se convierten en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab’-TNB entonces se reconvierte en el Fab’-tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab’-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden utilizarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Los últimos avances han facilitado la recuperación directa de los fragmentos Fab’-SH de *E. coli*, que pueden acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med*., 175:217-225 (1992) describen la producción de una molécula $F(ab')_2$ de anticuerpo biespecífico totalmente humanizada. Cada fragmento Fab’ se segregó por separado de *E. coli* y se sometió a un acomplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de esta manera fue capaz de unirse a células que sobreexpresan el receptor HER2 y células T humanas normales, y también pudo activar la actividad lítica de

linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumor de mama humano.

También se han descrito diversas técnicas para fabricar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente a partir de un cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos utilizando cremalleras de leucina (Kostelny *et al.*, *J . Immunol*., **148(5)**:1547-1553 (1992)). Los péptidos de cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región de bisagra para formar monómeros y después se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpos. Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpos. La tecnología de "diacuerpos", descrita por Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) mediante un conector que es demasiado corto como para permitir el apareamiento entre los dos dominios sobre la misma cadena. Por consiguiente, los dominios VH y VL de un fragmento son obligados a aparearse con los dominios VH y VL complementarios de otro fragmento, formando con ello dos sitios de unión al antígeno. También se ha indicado otra estrategia para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros de Fv monocatenarios (scFv). Véase, Gruber *et al.*, *J. Immunol*., **152**:5368 (1994).

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos triespecíficos (Tutt *et al.*, *J. Immunol*., **147**:60 (1991)).

Anticuerpos multivalentes

Un anticuerpo multivalente pueden ser internalizado (y/o catabolizado) con más rapidez que un anticuerpo bivalente por una célula que expresa un antígeno al cual se une el anticuerpo. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos multivalentes (distintos a los de la clase IgM) con tres o más sitios de unión al antígeno (por ejemplo, anticuerpos tetravalentes), que pueden producirse con facilidad mediante la expresión recombinante del ácido nucleico que codifica las cadenas polipeptídicas del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión al antígeno. El dominio de dimerización comprende (o consiste en), por ejemplo, una región Fc o una región de bisagra. En este escenario, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de unión al antígeno amino-terminales a la región Fc. En una realización, un anticuerpo multivalente comprende (o consiste en), por ejemplo, de tres a aproximadamente ocho, o cuatro sitios de unión al antígeno. El anticuerpo multivalente comprende al menos una cadena polipeptídica (por ejemplo, dos cadenas polipeptídicas), en las que la cadena o cadenas polipeptídicas comprenden dos o más dominios variables. Por ejemplo, la cadena o cadenas polipeptídicas pueden comprender VD1-(X1)n-VD2-(X2)n-Fc, en la que VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena polipeptídica de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o un polipéptido, y n es 0 o 1. Por ejemplo, la cadena o cadenas polipeptídicas pueden comprender: VH-CH1-conector flexible-VH-CH1-cadena de la región Fc; o VH-CH1-VH-CH1-cadena de la región Fc. El presente anticuerpo multivalente puede comprender también al menos dos (por ejemplo, cuatro) polipéptidos del dominio variable de cadena ligera. El presente anticuerpo multivalente puede comprender, por ejemplo, de aproximadamente dos a aproximadamente ocho polipéptidos del dominio variable de cadena ligera. Los polipéptidos del dominio variable de cadena ligera contemplados en la presente comprenden un dominio variable de cadena ligera y, opcionalmente, comprenden también un dominio CL.

Variantes de anticuerpos

En algunas realizaciones, se contempla una modificación o modificaciones de la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos descritos en la presente. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Los variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo se preparan introduciendo cambios de nucleótidos en el ácido nucleico del anticuerpo, o mediante síntesis peptídica. Estas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones y/o inserciones y/o sustituciones de restos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Puede realizarse cualquier combinación de deleciones, inserciones y sustituciones para lograr la construcción final, con la condición de que la construcción final posea las características deseadas. Las alteraciones de aminoácidos pueden introducirse en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo sujeto en el momento en que se fabrica la secuencia.

Un método útil para la identificación de ciertos restos o regiones del anticuerpo que son localizaciones preferidas para la mutagénesis se denomina "mutagénesis de barrido de alanina", según se describe en Cunningham y Wells (1989), *Science*, 244:1081 -1085. En este caso, un resto o un grupo de restos diana se identifica (por ejemplo, restos cargados, tales como Arg, Asp, His, Lys y Glu) y se reemplaza por un aminoácido neutro o cargado negativamente (por ejemplo, alanina o polialanina) para afectar a la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Las localizaciones de aminoácidos que muestra sensibilidad funcional a las sustituciones entonces se refinan introduciendo más variantes u otros variantes para los sitios de sustitución. Así, aunque el sitio para introducir una variación en la secuencia de aminoácidos está predeterminado, la naturaleza de la mutación *per se* no tiene que estar predeterminada. Por ejemplo, para analizar la actuación de una mutación en un sitio dado, se realiza un barrido de alanina o una mutagénesis aleatoria en el codón o la región diana y se seleccionan las inmunoglobulinas expresadas para la actividad deseada.

Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino- y/o carboxi-terminales que varían en longitud de un resto a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones dentro de la secuencia de uno o múltiples restos aminoácidos. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un resto metionilo N-terminal o el anticuerpo condensado con un polipéptido citotóxico. Otros variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al N- o C-terminal del anticuerpo de una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la semivida sérica del anticuerpo.

Otro tipo de variante es un variante de sustitución de aminoácidos. Estos variantes tienen reemplazado al menos un resto aminoácido en la molécula de anticuerpo por un resto diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones en FR. Las sustituciones conservativas se muestran en la tabla A bajo el encabezamiento “Sustituciones preferidas”. Si estas sustituciones producen un cambio en la actividad biológica, entonces pueden introducirse cambios más sustanciales, denominados “Ejemplos de sustituciones” en la tabla A, o como se describe más a fondo a continuación con relación a las clases de aminoácidos, y los productos pueden seleccionarse.

Tabla A

Resto original	**Ejemplos de sustituciones**	**Sustituciones preferidas**
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

Se logran unas modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo seleccionando sustituciones que se diferencian significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura del esqueleto polipeptídico en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o helicoidal; (b) la carga o la hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana; o (c) el volumen de la cadena lateral. Los aminoácidos pueden agruparse según las similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (en A.L. Lehninger, en Biochemistry, 2ª ed., pp. 73-75, Worth Publishers, Nueva York (1975)):

(1) no polares: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

(2) polares no cargados: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

(3) ácidos: Asp (D), Glu (E)

(4) básicos: Lys (K), Arg (R), His (H)

Como alternativa, los restos naturales pueden dividirse en grupos basados en las propiedades comunes de las cadenas laterales:

(1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) ácidos: Asp, Glu;

(4) básicos: His, Lys, Arg;

(5) restos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;

(6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservativas implican intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase. Estos restos sustituidos también pueden introducirse en los sitios de sustitución conservativa, o en el resto de sitios (no conservados).

Un tipo de variante de sustitución implica sustituir uno o más restos de la región hipervariable de un anticuerpo de origen (*por ejemplo*, un anticuerpo humanizado o humano). En general, el variante o variantes resultantes seleccionados para su posterior desarrollo tendrán propiedades biológicas modificadas (por ejemplo, mejoradas) con relación al anticuerpo de origen a partir del cual se generan. Una manera conveniente para generar dichos variantes de sustitución implica la maduración de la afinidad utilizando la presentación de fagos. Brevemente, varios sitios de la región hipervariable (*por ejemplo*, 6-7 sitios) se mutan para generar todas las posibles sustituciones de aminoácidos en cada sitio. Los anticuerpos generados de esta manera son presentados por partículas de fagos filamentosos como fusiones con al menos una parte de una proteína de la envuelta de un fago (por ejemplo, el producto del gen III de M13) encapsulada dentro de cada partícula. Los variantes presentados por fagos entonces se seleccionan para su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) según se describe en la presente. Para identificar los sitios de la región hipervariable candidatos para la modificación, puede realizarse una mutagénesis de barrido (por ejemplo, barrido de alanina) para identificar los restos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión al antígeno. Como alternativa, o además, puede resultar beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo de antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Estos restos de contacto y los restos vecinos son candidatos para la sustitución según técnicas conocidas en la técnica, incluyendo las desarrolladas en la presente. Tras haberse generado estos variantes, el panel de variantes se somete a selección utilizando técnicas conocidas en la técnica, incluyendo las descritas en la presente, y los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos pertinentes pueden seleccionarse para su posterior desarrollo.

Se preparan moléculas de ácidos nucleicos que codifican variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo mediante una diversidad de métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero no se limitan al aislamiento a partir de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencia de aminoácidos naturales), o la preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o específica dirigida a sitio), mutagénesis de PCR, y mutagénesis de módulos de un variante preparado con anterioridad o una versión no variante del anticuerpo.

Puede resultar deseable introducir una o más modificaciones de aminoácidos en una región Fc de los anticuerpos de la invención, generando con ello un variante de la región Fc. El variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácidos (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos que incluyen la posición de una cisteína bisagra.

De acuerdo con esta descripción y las indicaciones de la técnica, se contempla que, en algunas realizaciones, un anticuerpo de la invención pueda comprender una o más alteraciones comparado con el antícuerpo homólogo de tipo salvaje, por ejemplo, en la región Fc. No obstante, estos anticuerpos conservarán sustancialmente las mismas características requeridas para la utilidad terapéutica comparados con sus homólogos de tipo salvaje. Por ejemplo, se cree que pueden realizarse ciertas alteraciones en la región Fc que darían como resultado una unión de C1q alterada (es decir, aumentada o disminuida) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), por ejemplo, según se describe en el documento WO 99/51642. Véase también Duncan y Winter, *Nature*, 322:738-740 (1988); la patente de EEUU nº 5.648.260; la patente de EEUU nº 5.624.821; y el documento WO 94/29351 sobre otros ejemplos de variantes de la región Fc.

En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos que comprenden modificaciones en la interfase de los polipéptidos de Fc que comprenden la región Fc, en los que las modificaciones facilitan y/o estimulan la heterodimerización. Estas modificaciones comprenden la introducción de una protuberancia en un primer polipéptido

de Fc y una cavidad en un segundo polipéptido de Fc, en las que la protuberancia puede colocarse en la cavidad para estimular la formación de un complejo del primer y segundo polipéptido de Fc. Los métodos para generar anticuerpos con estas modificaciones son conocidos en la técnica, por ejemplo, según se describe en la patente de EEUU nº 5.731.168.

Inmunoconjugados

En otro aspecto, la invención proporciona inmunoconjugados, o conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC), que comprenden un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico, tal como un agente quimioterapéutico, un fármaco, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o sus fragmentos), o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado).

El uso de conjugados de anticuerpo-fármaco para la administración local de agentes citotóxicos o citostáticos, es decir, fármacos para matar o inhibir células tumorales en el tratamiento del cáncer (Syrigos y Epenetos (1999), Anticancer Research. 19:605-614; Niculescu-Duvaz y Springer (1997), Adv. Drg. Del. Rev., 26:151-172; patente de EEUU 4.975.278) permite el transporte dirigido del resto de fármaco a los tumores y su acumulación intracelular en ellos, mientras que la administración sistémica de estos agentes de fármacos no conjugados podrían producir unos niveles inaceptables de toxicidad para las células normales, así como para las células tumorales que se busca eliminar (Baldwin *et al.* (1986), Lancet, 15 de marzo de 1986, pp.:603-605; Thorpe (1985), "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, A. Pinchera *et al.* (eds.), pp. 475-506). Con ello la busca la eficacia máxima con la toxicidad mínima. Se ha indicado que los anticuerpos policlonales y los anticuerpos monoclonales son útiles en estas estrategias (Rowland *et al.* (1986), Cancer Immunol. Immunother., 21:183-187). Los fármacos utilizados en estos métodos incluyen daunomicina, doxorrubicina, metotrexato, y vindesina (Rowland *et al.* (1986), *supra*). Las toxinas utilizadas en los conjugados de anticuerpo-toxina incluyen toxinas bacterianas, tales como la toxina de la difteria, toxinas vegetales, tales como la ricina, toxinas de molécula pequeña, tales como la geldanamicina (Mandler *et al.* (2000), Jour. of the Nat. Cancer Inst., 92(19):1573-1581; Mandler *et al.* (2000), Bioorganic & Med. Chem. Letters, 10:1025-1028; Mandler *et al.* (2002), Bioconjugate Chem., 13:786-791), los maitansinoides (documento EP 1391213; Liu *et al.* (1996), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:8618-8623), y la caliqueamicina (Lode *et al.* (1998), Cancer Res., 58:2928; Hinman *et al.* (1993), Cancer Res., 53:3336-3342). Las toxinas pueden ejercer sus efectos citotóxicos y citostáticos a través de mecanismos que incluyen la unión a tubulina, la unión al ADN, o la inhibición de topoisomerasas. Algunos fármacos citotóxicos tienden a ser inactivos o menos activos cuando se conjugan con anticuerpos grandes o ligandos de receptores de proteínas.

ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetano, Biogen/indec) es un conjugado de anticuerpo-radioisótopo compuesto por un anticuerpo monoclonal kappa IgG1 murino dirigico contra el antígeno CD20 que se encuentra sobre la superficie de linfocitos B normales y malignos, y el radioisótopo ^{111}In o ^{90}Y unido por un conector-quelante de tiourea (Wiseman *et al.* (2000), Eur. Jour. Nucl. Med., 27(7):766-777; Wiseman *et al.* (2002), Blood, 99(12):4336-4342; Witzig *et al.* (2002), J. Clin. Oncol., 20(10):2453-2463; Witzig *et al.* (2002), J. Clin. Oncol., 20(15):3262-3269). Aunque ZEVALIN tiene actividad contra el linfoma no hodgkiniano de células B (NHL), su administración produce citopenias graves y prolongadas en la mayoría de los pacientes. MYLOTARG™ (gemtuzumab ozogamicina, Wyeth Pharmaceuticals), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto por un anticuerpo CD33 hu unido a caliqueamicina, fue aprobado en 2000 para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda mediante inyección (Drugs of the Future (2000), 25(7):686; patentes de EEUU nº 4.970.198; 5.079.233; 5.585.089; 5.606.040; 5.693.762; 5.739.116; 5.767.285; 5.773.001). Cantuzumab mertansina (Immunogen, Inc.), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto por un anticuerpo huC242 unido a través del conector de disulfuro SPP a un resto de fármaco maitansinoide, DM1, se ha ensayado para el tratamiento de cánceres que expresan CanAg, tales como de colon, pancreático, gástrico, y otros. MLN-2704 (Millenium Pharm, BZL Biologies, Immunogen Inc.), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto por un anticuerpo monoclonal anti-antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) unido a un resto de fármaco maitansinoide, DM1, se ha ensayado para el tratamiento potencial de tumores de próstata. Los péptidos de auristatina, auristatina E (AE) y monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de la dolastatina, se conjugaron con los anticuerpos monoclonales quiméricos cBR96 (específico de Lewis Y en carcinomas) y cAC10 (específico de CD30 en malignidades hematológicas) (Doronina *et al.* (2003), Nature Biotechnology, 21(7):778-784), y están en desarrollo terapéutico.

Los agentes quimioterapéuticos útiles para la generación de inmunoconjugados se describen en la presente (anteriormente). Las toxinas enzimáticamente activas y sus fragmentos que pueden utilizarse incluyen la cadena A de difteria, los fragmentos activos de no unión de la toxina de la difteria, la cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de ricina, la cadena A de abrina, la cadena A de modecina, alfa sarcina, proteínas de Aluerites fordii, proteínas de diantina, proteínas de Phytolacca americana (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de Momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de Saponaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993. Está disponible una diversidad de radionúclidos para la producción de anticuerpo radioconjugados. Los ejemplos incluyen ^{212}Br, ^{131}I, ^{131}In, ^{90}Y, y ^{186}Re. Los conjugados de anticuerpo y agente citotóxico se fabrican utilizando una diversidad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales, tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de

adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexandiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis(p-diazoniobenzoil)etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno), y compuesto de bis-flúor activo (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricina según se describe en Vitetta *et al.*, Science, 238:1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentriaminapentaacético marcado con carbono-14 (MX-DTPA) es un ejemplo de agente quelante para la conjugación del radionucleótido al anticuerpo. Véase el documento WO 94/11026.

En la presente también se contemplan los conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de molécula pequeña, tales como caliqueamicina, maitansinoides, dolostatinas, aurostatinas, un tricoteceno, y CC1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad tóxica.

Maitansina y maitansinoides

En algunas realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo de la invención conjugado con una o más moléculas de maitansinoides.

Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de la tubulina. La maitansina fue aislada por primera vez del arbusto de África oriental *Maytenus serrata* (patente de EEUU nº 3.896.111). Después se descubrió que ciertos microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres de maitansinol C-3 (patente de EEUU nº 4.151.042). Se describe el maitansinol sintético y sus derivados y análogos, por ejemplo, en las patentes de EEUU nº 4.137.230; 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663; y 4.371.533.

Los restos de fármaco de maitansinoides son restos de fármaco atractivos para los conjugados de anticuerpo-fármaco porque: (i) son relativamente acccesibles de preparar mediante fermentación o modificación química, o derivatización de los productos de la fermentación; (ii) pueden derivarse con grupos funcionales adecuados para la conjugación a través de conectores sin disulfuro a anticuerpos; (iii) son estables en el plasma, y (iv) son eficaces contra una diversidad de líneas de células tumorales.

Los ejemplos de realizaciones de restos de fármaco de maitansinoides incluyen: DM1; DM3; y DM4. Los inmunoconjugados que contienen maitansinoides, los métodos para prepararlos, y su uso terapéutico se describe, por ejemplo, en las patentes de EEUU nº 5.208.020, 5.416.064, y en la patente europea EP 0 425 235 Bl. Liu *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:8618-8623 (1996) describen inmunoconjugados que comprenden un maitansinoide denominado DM1 unido al anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra el cáncer colorrectal humano. Se ha descubierto que el conjugado es muy citotóxico hacia las células del cáncer de colon, y muestra actividad antitumoral en un ensayo de crecimiento de tumor *in vivo.* Chari *et al.*, Cancer Research, 52:127-131 (1992) describen inmunoconjugados en los que un maitansinoide se conjuga, a través de un conector de disulfuro, al anticuerpo murino A7 que se une a un antígeno de líneas celulares de cáncer de colon humano, o a otro anticuerpo monoclonal murino, TA.1, que se une al oncogén HER-2/neu. La citotoxicidad del conjugado de TA.1-maitansinoide se ensayó *in vitro* en la línea de células de cáncer de mama humano SK-BR-3, que expresa 3 x 10^5 antígenos de la superficie HER-2 por célula. El conjugado de fármaco logra un grado de citotoxicidad similar al del fármaco de maitansinoide libre, que puede aumentar aumentando el número de moléculas de maitansinoide por molécula de anticuerpo. El conjugado de A7-maitansinoide muestra una baja citotoxicidad sistémica en ratones.

Los conjugados de anticuerpo-maitansinoide pueden prepararse uniéndo químicamente un anticuerpo a una molécula de maitansinoide sin disminuir significativamente la actividad biológica del anticuerpo o de la molécula de maitansinoide. Véase, por ejemplo, la patente de EEUU nº 5.208.020. Una media de 3-4 moléculas de maitansinoide conjugadas por molécula de anticuerpo ha demostrado eficacia para potenciar la citotoxicidad de células diana sin afectar negativamente a la función o la solubilidad del anticuerpo, aunque se espera que incluso una molécula de toxina/anticuerpo potenciaría la citotoxicidad frente al uso del anticuerpo desnudo. Los maitansinoides son muy conocidos en la técnica y pueden sintetizarse mediante técnicas conocidas o aislarse a partir de fuentes naturales. Se describen maitansinoides adecuados, por ejemplo, en la patente de EEUU nº 5.208.020 y en las otras patentes y publicaciones que no son patentes indicadas en la presente anteriormente. Los maitansinoides incluyen, pero no se limitan al maitansinol y los análogos de maitansinol modificados en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula de maitansinol, tales como diversos ésteres de maitansinol.

Existen muchos grupos conectores conocidos en la técnica para preparar conjugados de anticuerpo-maitansinoide que incluyen, por ejemplo, los descritos en la patente de EEUU nº 5.208.020 o la patente EP 0 425 235 Bl, Chari *et al.*, Cancer Research, 52:127-131 (1992), y el documento WO 2005/037992. Los conjugados de anticuerpo-maitansinoide que comprenden el componente conector SMCC pueden prepararse según se describe en el documento WO 2005/037992. Los grupos conectores incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles frente a ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles frente a peptidasa, o grupos lábiles frente a esterasa, según se desdribe en las patentes indicadas anteriormente. Otros grupos conectores se describen y ejemplifican en la presente.

Los conjugados de anticuerpo y maitansinoide puede prepararse utilizando una diversidad de agentes de

acoplamiento de proteínas bifuncionales, tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditio) (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexandiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis(p-diazoniobenzoil)etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno), y compuesto de bis-flúor activo (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Los agentes de acoplamiento incluyen, pero no se limitan a propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditio) (SPDP) (Carlsson *et al.*, Biochem. J., 173:723-737 (1978)) y N-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato (SPP) para proporcionar un enlace disulfuro.

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

Auristatinas y dolostatinas

En algunas realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo de la invención conjugado con dolastatinas o análogos y derivados peptídicos de dolostatina, y las auristatinas (patentes de EEUU nº 5.635.483; 5.780.588). Se ha demostrado que las dolastatinas y las auristatinas interfieren con la dinámica de los microtúbulos, la hidrólisis de GTP, y la división nuclear y celular (Woyke *et al.* (2001), Antimicrob. Agents and Chemother., 45(12):3580-3584) y tienen actividad anticáncer (documento U.S. 5.663.149) y antifúngica (Pettit *et al.* (1998), Antimicrob. Agents Chemother., 42:2961-2965). El resto de fármaco de dolastatina o auristatina puede unirse al anticuerpo a través del N(amino)-terminal o del C(carboxilo)-terminal del resto de fármaco peptídico (documento WO 02/088172).

Los ejemplos de realizaciones de auristatina incluyen los restos de fármaco de monometilauristatina unidos al N-terminal DE y DF, descritos en "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", documento WO 2005/081711.

Los ejemplos de realizaciones de auristatina incluyen MMAE y MMAF. Otros ejemplos de realizaciones que comprenden MMAE o MMAF y diversos componentes conectores (descritos más a fondo en la presente) incluyen Ab-MC-vc-PAG-MMAF, Ab-MC-vc-PAG-MMAE, Ab-MC-MMAE, y Ab-MC-MMAF.

Generalmente, los restos de fármaco con base peptídica pueden prepararse formando un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos peptídicos. Estos enlaces peptídicos pueden prepararse, por ejemplo, según el método de síntesis en fase líquida (véase, E. Schröder y K. Lübke, "The Peptides", volumen 1, pp 76-136, 1965, Academic Press), que es muy conocido en el campo de la química de péptidos. Los restos de fármaco de auristatina/dolastatina pueden prepararse según los métodos de los documentos U.S. 5.635.483; U.S. 5.780.588; Pettit *et al.* (1989), J. Am. Chem. Soc., 111:5463-5465; Pettit *et al.* (1998), Anti-Cancer Drug Design, 13:243-277; Pettit, G.R., *et al.*, Synthesis, 1996, 719-725; y Pettit *et al.* (1996), J. Chem. Soc. Perkin Trans., 1 5:859-863. Véase también Doronina (2003), Nat. Biotechnol., 21(7):778-784; "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", documento WO 2005/081711 (que describe, por ejemplo, conectores y métodos para preparar compuestos de monometilvalina, tales como MMAE y MMAF conjugados a conectores).

Caliqueamicina

En otras realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo de la invención conjugado con una o más moléculas de caliqueamicina. La familia de antibióticos de la calqueamicina es capaz de producir roturas en el ADN bicatenario a concentraciones subpicomolares. Para la preparación de conjugados de la familia de la caliqueamicina, véanse las patentes de EEUU nº 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001, y 5.877.296 (todas de American Cyanamid Company). Los análogos estructurales de la caliqueamicina que pueden utilizarse incluyen, pero no se limitan a γ_1^1, α_2^1, α_3^1, N-acetil-γ_1^1, PSAG y $\theta^1{}_1$ (Hinman *et al.*, Cancer Research, 53:3336-3342 (1993); Lode *et al.*, Cancer Research, 58:2925-2928 (1998), y las patentes de EEUU mencionadas anteriormente de American Cyanamid). Otro fármaco antitumoral con el que puede conjugarse el anticuerpo es QFA, que es un antifolato. Tanto la caliqueamicina como QFA tienen sitios intracelulares de acción y no atraviesan con facilidad la membrana plasmática. Por tanto, la captación celular de estos agentes a través de una internalización mediada por anticuerpos potencia en gran medida sus efectos citotóxicos.

Otros agentes citotóxicos

Otros agentes antitumorales que pueden conjugarse con los anticuerpos de la invención incluyen BCNU, estreptozoicina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes denominados colectivamente complejo LL-E332888 descrita en las patentes de EEUU 5.053.394, 5.770.710, así como las esperamicinas (patente de EEUU 5.877.296).

Las toxinas enzimáticamente activas y sus fragmentos que pueden utilizarse incluyen la cadena A de difteria, los fragmentos activos de no unión de la toxina de la difteria, la cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de ricina, la cadena A de abrina, la cadena A de modecina, alfa sarcina, proteínas de *Aluerites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricoteceno. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993.

La presente invención contempla también un inmunoconjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una ADN endonucleasa, tal como desoxirribonucleasa; ADNasa).

Para la destrucción selectiva de un tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo muy radiactivo. Está disponible una diversidad de isótopos radiactivos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212}, y los isótopos radiactivos de Lu. Cuando el conjugado se emplea para la detección puede comprender un átomo radiactivo para estudios de centelleo, por ejemplo Tc^{99m} o I^{123}, o un marcador de espín para la formación de imágenes de resonacia magnética nuclear (RMN) (también conocida como formación de imágenes de resonancia magnética, MRI), tales yodo-123, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Los radiomarcadores u otros marcadores pueden incorporarse al conjugado de maneras conocidas. Por ejemplo, el péptido puede biosintetizarse o puede sintetizarse por síntesis de aminoácidos química utilizando los precursores de aminoácidos adecuados que presenten, por ejemplo, flúor-19, en lugar de hidrógeno. Los marcadores tales como Tc^{99m} o I^{123}, Re^{186}, Re^{188} e In^{111} pueden unirse a través de un resto cisteína en el péptido. El itrio-90 puede unirse a través de un resto lisina. Puede utilizarse el método IODOGEN (Fraker *et al.* (1978), Biochem. Biophys. Res. Commun., 80:49-57) para incorporar yodo-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describe otros métodos en detalle.

Los conjugados de anticuerpo y agente citotóxico pueden fabricarse utilizando una diversidad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales, tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexandiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis(p-diazoniobenzoil)etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno), y compuesto de bis-flúor activo (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricina según se describe en Vitetta *et al.*, Science, 238:1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentriaminapentaacético marcado con carbono-14 (MX-DTPA) es un ejemplo de agente quelante para la conjugación del radionucleótido al anticuerpo. Véase el documento WO 94/11026. El conector puede ser un “conector escindible” que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, puede utilizarse un conector lábil frente a ácidos, un conector sensible a peptidasas, un conector fotolábil, un conector de dimetilo o un conector que contiene disulfuro (Chari *et al.*, Cancer Research, 52:127-131 (1992); patente de EEUU nº 5.208.020).

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

Preparación de conjugados de anticuerpo-fármaco

En los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) de la invención, un anticuerpo (Ab) se conjuga con uno o más restos de fármaco (D), por ejemplo de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 restos de fármaco por anticuerpo, a través de un conector (L). El ADC de fórmula I puede prepararse a través de varias vías, empleando reacciones de química orgánica, condiciones, y reactivos conocidos por los expertos en la técnica, que incluyen: (1) la reacción de un grupo nucleófilo de un anticuerpo con un reactivo conector bivalente para formar Ab-L, a través de un enlace covalente, seguido de una reacción con un resto de fármaco D; y (2) la reacción de un grupo nucleófilo de un anticuerpo con un reactivo conector bivalente para formar D-L, a través de un enlace covalente, seguido de una reacción con el grupo nucleófilo de un anticuerpo. Otros métodos para preparar ADC se describen en la presente.

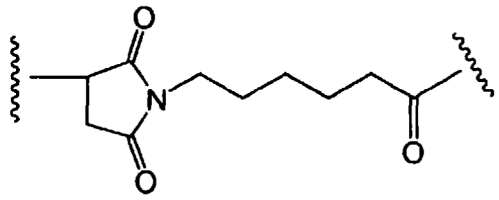
$$Ab\text{-}(L\text{-}D)_p \qquad I$$

El conector puede estar compuesto por uno o más componentes conectores. Los ejemplos de componentes conectores incluyen 6-maleimidocaproílo (“MC”), maleimidopropanoílo (“MP”), valina citrulina (“val-cit”), alanina fenilalanina (“ala phe”), p-aminobenciloxicarbonilo (“PAB”), pentanoato de N-succinimidil-4-(2-piridiltio) (“SPP”), N-succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxilato (“SMCC”), y aminobenzoato de N-succinimidl-(4-yodoacetilo) (“SIAB”). En la técnica se conocen otros componentes conectores y algunos se describen en la presente. Véase también "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", documento WO

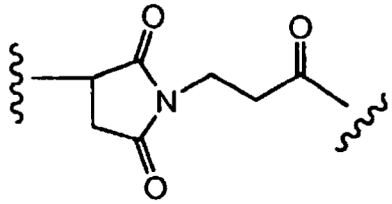
2005/081711.

En algunas realizaciones, el conector puede comprender restos aminoácidos. Los ejemplos de componentes de conectores de aminoácidos incluyen un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido o un pentapéptido. Los ejemplos de dipéptidos incluyen: valina citrulina (vc o val-cit), alanina fenilalanina (af o ala phe). Los ejemplos de tripéptidos incluyen: glicina valina citrulina (gly-val-cit) y glicina glicina glicina (gly-gly-gly). Los restos aminoácidos que comprenden un componente de conector de aminoácidos incluyen los que aparecen en la naturaleza, así como aminoácidos de menor importancia y análogos de aminoácidos no naturales, tales como citrulina. Los componentes de conector de aminoácidos pueden diseñarse y optimizarse en su selectividad para la ruptura enzimática por una enzima concreta, por ejemplo, una proteasa asociada a tumor, catepsina B, C y D, o una plasmina proteasa.

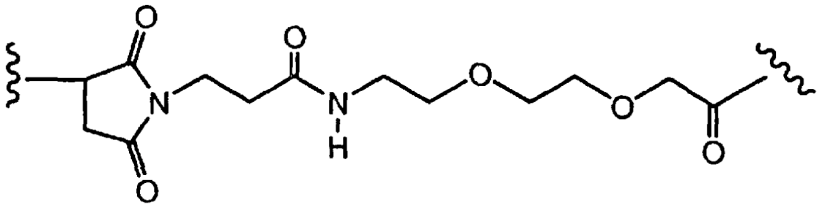
A continuación se muestran ejemplos de estructuras de componentes de conectores (en los que la línea ondulante indica los sitios de unión covalente a otros componentes del ADC):



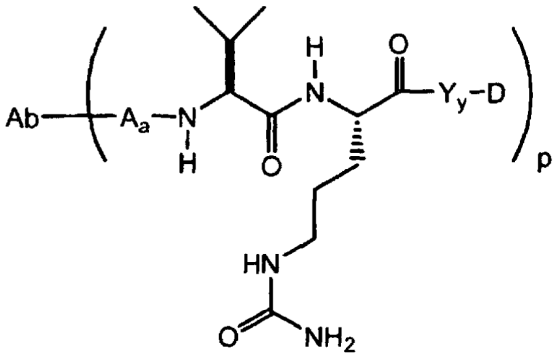
MC



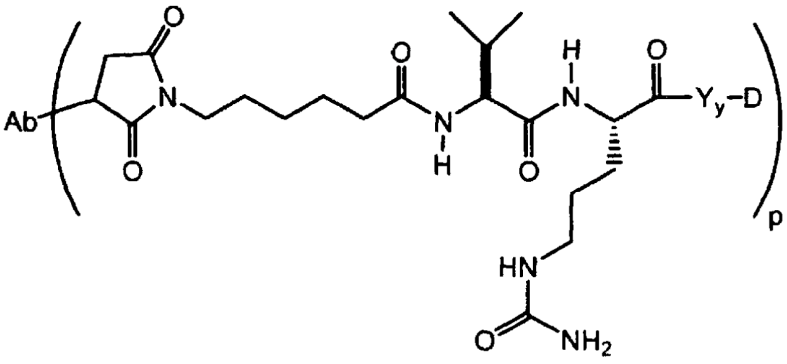
MP



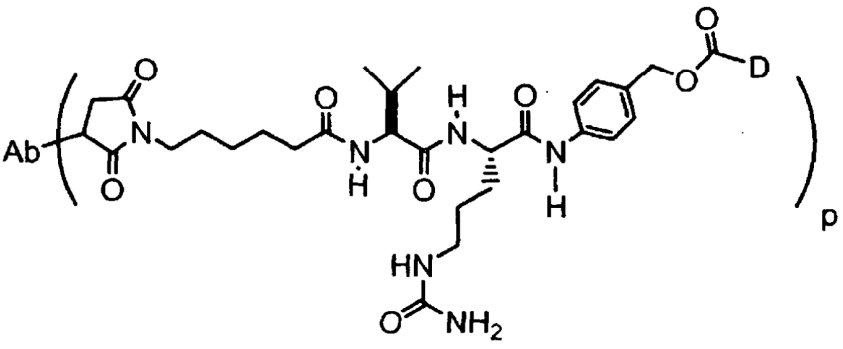
MPEG



Val-cit



MC-val-cit



MC-val-cit-PAB

Otros ejemplos de componentes de conectores y sus abreviaturas incluyen (en los que se representan el anticuerpo (Ab) y el conector, y p es de 1 a aproximadamente 8):

Los grupos nucleófilos sobre los anticuerpos incluyen, pero no se limitan a: (i) grupos de amina N-terminal, (ii) grupos de cadena lateral de amina, por ejemplo, lisina, (ii) grupos de cadena lateral de tiol, por ejemplo, cisteína, y (iv) grupos hidroxilo o amino de azúcar, en los que el anticuerpo está glicosilado. Los grupos amina, tiol e hidroxilo son nucleófilos y son capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos sobre los restos conectores y los reactivos conectores que incluyen: (i) ésteres activos, tales como ésteres NHS, ésteres HOBt, haloformiatos, y haluros de ácido; (ii) haluros de alquilo y bencilo, tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, grupos carboxilo y maleimida. Ciertos anticuerpos tienen disulfuros intercatenarios reducibles, es decir, puentes de cisteína. Los anticuerpos pueden hacerse reactivos para la conjugación con reactivos conectores mediante un tratamiento con un agente reductor, tal como DTT (ditiotreitol). Cada puente de cisteína así formará, en teoría, dos nucleófilos de tiol reactivos. Pueden introducirse otros grupos nucleófilos en los anticuerpos a través de la reacción de las lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) que resulta en la conversión de una amina en un tiol. Los grupos tiol reactivos pueden introducirse en el anticuerpo (o su fragmento) mediante la introducción de uno, dos, tres, cuatro o más restos cisteína (por ejemplo, preparando anticuerpos mutantes que comprenden uno o más restos aminoácidos cisteína no nativos).

Los conjugados de anticuerpo-fármaco de la invención también pueden producirse mediante la modificación del

anticuerpo para introducir restos electrófilos, que pueden reaccionar con sustituyentes nucleófilos sobre el reactivo conector o el fármaco. Los azúcares de los anticuerpos glicosilados pueden oxidarse, por ejemplo, con reactivos oxidantes de peryodato, para formar grupos aldehído o cetona que pueden reaccionar con el grupo amina de los reactivos conectores o los restos de fármaco. Los grupos de base de Schiff de imina resultantes pueden formar un enlace estable, o pueden reducirse, por ejemplo, mediante reactivos de borohidruro para formar enlaces amina estables. En una realización, la reacción de la porción de carbohidrato de un anticuerpo glicosilado con galactosa oxidasa o metaperyodato de sodio puede producir grupos carbonilo (aldehído y cetona) en la proteína que pueden reaccionar con los grupos apropiados en el fármaco (Hermanson, Bioconjugate Techniques). En otra realización, las proteínas que contienen restos serina o treonina N-terminales pueden reaccionar con metaperyodato de sodio, dando como resultado la producción de un aldehído en lugar del primer aminoácido (Geoghegan y Stroh (1992), Bioconjugate Chem., 3:138-146; documentop U.S. 5.362.852). Este aldehído puede reaccionar con un resto de fármaco o un nucleófilo conector.

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

Como alternativa, puede fabricarse una proteína de fusión que comprende al anticuerpo y un agente citotóxico, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes o síntesis peptídica. La longitud del ADN puede comprender las respectivas regiones que codifican las dos porciones del conjugado que están adyacentes entre sí o separadas por una región que codifica un péptido conector que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

En otra realización, el anticuerpo puede conjugarse a un “receptor” (tal como estreptavidina) para su utilización en el pre-transporte dirigido a un tumor, en el que el conjugado de anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de la eliminación del conjugado no unido de la circulación utilizando un agente de eliminación, y después se administra un “ligando” (por ejemplo, avidina) que está conjugado a un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

El anticuerpo (Ab)-MC-MMAE puede prepararse mediante la conjugación de cualquiera de los anticuerpos proporcionados en la presente con MC-MMAE como sigue. El anticuerpo, disuelto en borato de sodio 500 mM y cloruro de sodio 500 mM a pH 8,0 se trata con un exceso de ditiotreitol (DTT) 100 mM. Después de una incubación a 37 ºC durante aproximadamente 30 minutos, el tampón se intercambia mediante elución en la resina Sephadex G25 y se eluye con PBS con DTPA 1 mM. El valor de tiol/Ab se comprueba determinando la concentración de anticuerpo reducido a partir de la absorbancia a 280 nm de la disolución y la concentración de tiol mediante una reacción con DTNB (Aldrich, Milwaukee, WI) y la determinación de la absorbancia a 412 nm. El anticuerpo reducido se disuelve en PBS enfriado en hielo. El reactivo conector de fármaco, la maleimidocaproilmonometilauristatina E (MMAE), es decir, MC-MMAE, disuelto en DMSO, se diluye en acetonitrilo y agua a una concentración conocida, y se añade al anticuerpo reducido enfriado 2H9 en PBS. Después de aproximadamente una hora se añade un exceso de maleimida para extinguir la reacción y bloquear cualquier grupo tiol del anticuerpo que no haya reaccionado. La mezcla de reacción se concentra mediante ultrafiltración centrífuga y se purifica 2H9-MC-MMAE y se desala mediante una elución a través de la resina G25 en PBS, se filtra a través de filtros de 0,2 μm bajo condiciones estériles y se congela para su conservación.

El anticuerpo-MC-MMAF puede prepararse mediante la conjugación de cualquiera de los anticuerpos proporcionados en la presente con MC-MMAF siguiendo el protocolo proporcionado para la preparación de Ab-MC-MMAE.

El anticuerpo-MC-val-cit-PAB-MMAE se prepara mediante la conjugación de cualquiera de los anticuerpos proporcionados en la presente con MC-val-cit-PAB-MMAE siguiendo el protocolo proporcionado para la preparación de Ab-MC-MMAE.

El anticuerpo-MC-val-cit-PAB-MMAF se prepara mediante la conjugación de cualquiera de los anticuerpos proporcionados en la presente con MC-val-cit-PAB-MMAF siguiendo el protocolo proporcionado para la preparación de Ab-MC-MMAE.

El anticuerpo-SMCC-DM1 se prepara mediante la conjugación de cualquiera de los anticuerpos proporcionados en la presente con SMCC-DM1 como sigue. El anticuerpo purificado se derivatiza con succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxilato (SMCC, Pierce Biotechnology, Inc.) para introducir el conector SMCC. De modo específico, el anticuerpo se trata a 20 mg/ml en fosfato de potasio 50 mM/cloruro de sodio 50 mM/EDTA 2 mM, pH 6,5 con 7,5 equivalentes molares de SMCC (20 mM en DMSO, 6,7 mg/ml). Después de agitar durante 2 horas bajo una atmósfera de argón a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtra a través de una columna de Sephadex G25 equilibrada con fosfato de potasio 50 mM/cloruro de sodio 50 mM/EDTA 2 mM, pH 6,5. Las fracciones que contienen anticuerpos se reúnen y se ensayan.

El anticuerpo-SMCC así preparado se diluye con fosfato de potasio 50 mM/cloruro de sodio 50 mM/EDTA 2 mM, pH

6,5, hasta una concentración final de aproximadamente 10 mg/ml, y se hace reaccionar con una disolución 10 mM de DM1 en dimetilacetamida. La reacción se agita a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón durante 16,5 horas. La mezcla de reacción de conjugación se filtra a través de una columna de filtración de Sephadex G25 (1,5 x 4,9 cm) con1 x PBS a pH 6,5. La proporción de fármaco DM1 a anticuerpo (p) puede ser de aproximadamente 2 a 5, medida mediante la absorbancia a 252 nm y a 280 nm.

Se prepara el Ab-SPP-DM1 mediante la conjugación de cualquiera de los anticuerpos proporcionados en la presente con SPP-DM1 como sigue. El anticuerpo purificado se derivatiza con N-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato para introducir grupos ditiopiridilo. El anticuerpo (376,0 mg, 8 mg/ml) en 44,7 ml de tampón fosfato de potasio 50 mM (pH 6,5) que contiene NaCl (50 mM) y EDTA (1 mM) se trata con SPP (5,3 equivalentes molares en 2,3 ml de etanol). Después de una incubación durante 90 minutos bajo una atmósfera de argón a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtra en gel a través de una columna de Sephadex G25 equilibrada con tampón citrato de sodio 35 mM, NaCl 154 mM, EDTA 2 mM. Las fracciones que contienen anticuerpos se reúnen y se ensayan. Se determina el grado de modificación del anticuerpo según se describió anteriormente.

El anticuerpo-SPP-Py (aproximadamente 10 μmoles de grupos 2-tiopiridina liberables) se diluye con el anterior tampón citrato de sodio 35 mM, pH 6,5, hasta una concentración final de aproximadamente 2,5 mg/ml. Entonces se añade DM1 (1,7 equivalentes, 17 μmoles) en dimetilacetamida 3,0 mM (DMA, al 3% en v/v en la mezcla de reacción final) a la disolución de anticuerpo. La reacción se desarrolla a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón durante aproximadamente 20 horas. La reacción se carga sobre una columna de filtración en gel Sephacryl S300 (5,0 cm x 90,0 cm, 1,77 l) equilibrada con citrato de sodio 35 mM, NaCl 154 mM, pH 6,5. El caudal puede ser de aproximadamente 5,0 ml/min y se recogen 65 fracciones (20,0 ml cada una). Se determina el número de moléculas de fármaco DM1 unidas por molécula de anticuerpo (p') midiendo la absorbancia a 252 nm y 280 nm, y puede ser de aproximadamente 2 a 4 restos de fármaco DM1 por anticuerpo 2H9.

El anticuerpo-BMPEO-DM1 se prepara mediante la conjugación de cualquiera de los anticuerpos proporcionados en la presente con BMPEO-DM1 como sigue. El anticuerpo se modifica mediante el reactivo de bis-maleimido BM(PEO)4 (Pierce Chemical), dejando un grupo maleimido sin reaccionar sobre la superficie del anticuerpo. Esto puede lograrse disolviendo BM(PEO)4 en una mezcla de etanol al 50%/agua hasta una concentración de 10 mM y añadiendo un exceso molar en diez veces de una disolución que contiene el anticuerpo en disolución salina tamponada con fosfato a una concentración de aproximadamente 1,6 mg/ml (10 micromolar) y dejando que la reacción se desarrolle durante 1 hora para formar un intermedio de anticuerpo-conector, 2H9-BMPEO. El exceso de BM(PEO)4 se elimina mediante filtración en gel (columna HiTrap, Pharmacia) en citrato 30 mM, pH 6, con tampón NaCl 150 mM. Se disuelve un exceso molar en aproximadamente diez veces de DM1 en dimetilacetamida (DMA) y se añade al intermedio de 2H9-BMPEO. La dimetilformamida (DMF) también puede emplearse para disolver el reactivo de resto de fármaco. Se deja que la mezcla de reacción reaccione durante la noche antes de una filtración en gel o una diálisis en PBS para eliminar el DM1 sin reaccionar. Se emplea una filtración en gel sobre columnas S200 en PBS para eliminar los agregados de alto peso molecular y para producir el 2H9-BMPEO-DM1 purificado.

Derivados de anticuerpos

Los anticuerpos de la invención pueden modificarse aún más para que contengan otros restos no proteicos que son conocidos en la técnica y son fácilmente disponibles. En una realización, los restos adecuados para la derivatización del anticuerpo son polímeros hidrosolubles. Los ejemplos no limitantes de polímeros hidrosolubles incluyen, pero no se limitan a polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o copolímeros aleatorios), y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propropilenglicol, copolímeros de poli(óxido de propileno/óxido de etileno), polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol), poli(alcohol vinílico) y sus mezclas. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede tener cualquier peso molecular y puede estar ramificado o no ramificado. El número de polímeros unidos al anticuerpo puede variar, y si se une más de un polímero, los polímeros pueden ser las mismas moléculas o moléculas diferentes. En general, el número y/o el tipo de polímeros utilizados para la derivatización puede determinarse basándose en consideraciones que incluyen, pero no se limitan a las propiedades o las funciones concretas del anticuerpo que se van a mejorar, si el derivado de anticuerpo se va a utilizar en terapia bajo condiciones definidas, etc.

En otra realizaciones, se proporcionan conjugados de un anticuerpo y un resto no proteico que pueden calentarse selectivamente mediante la exposición a radiación. En una realización, el resto no proteico es un nanotubo de carbono (Kam *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 102:11600-11605 (2005)). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda e incluye, pero no se limita a longitudes de onda que no dañan a las células normales pero que calientan el resto no proteico hasta una temperatura a la cual las células próximas al resto no proteico-anticuerpo se destruyen.

Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo de la invención se preparan para su conservación mezclando el anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizantes

fisiológicamente aceptables opcionales (*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16ª edición, Osol, A. ed. (1980)), en forma de disoluciones acuosas, formulaciones liofilizadas u otras formulaciones secadas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, histidina y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de benzetonio; fenol; alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos, tales como metil- o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, que incluyen glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos, tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

La presente formulación también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación concreta que se está tratando que incluyen, pero no se limitan a los que tienen actividades complementarias que no se vean afectados perjudicialmente por la presencia de los otros. Estas moléculas están presentes de forma adecuada en combinación en unas cantidades que son eficaces para el objetivo previsto.

Los ingredientes activos también pueden estar atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina, y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de transporte de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Estas técnicas se describen en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16ª edición, Osol, A. ed. (1980).

Las formulaciones para ser utilizadas para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se logra con facilidad mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen la inmunoglobulina de la invención, estando estas matrices en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente de EEUU nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ-etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables, tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Aunque los polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberacón de moléculas a lo largo de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas a lo largo de periodos de tiempo más cortos. Cuando las inmunoglobulinas encapsuladas permanecen en el cuerpo durante mucho tiempo pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a humedad a 37 ºC, dando como resultado la pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Pueden diseñarse estrategias lógicas para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través de un intercambio tio-disulfuro, la estabilización puede lograrse modificando los restos sulfhidrilo, liofilizando a partir de disoluciones ácidas, controlando el contenido en humedad, utilizando aditivos apropiados, y desarrollando composiciones de matriz de polímeros específicas.

Usos

Un anticuerpo de la invención puede utilizarse, por ejemplo, en métodos terapéuticos *in vitro, ex vivo* e *in vivo*. Los anticuerpos de la invención pueden utilizarse como antagonistas para bloquear parcial o totalmente la actividad del antígeno específico *in vitro, ex vivo* y/o *in vivo*. Además, al menos algunos de los anticuerpos de la invención pueden neutralizar la actividad del antígeno de otras especies. Por consiguiente, los anticuerpos de la invención pueden utilizarse para inhibir una actividad de un antígeno específico, por ejemplo, en un cultivo celular que contiene el antígeno, en sujetos humanos o en otros sujetos mamíferos que poseen el antígeno con el cual un anticuerpo de la invención presenta reacción cruzada (por ejemplo, chimpancé, babuino, tití, cynomolgus y rhesus, cerdo o ratón). En una realización, un anticuerpo de la invención puede utilizarse para inhibir actividades de un antígeno poniendo en contacto el anticuerpo con el antígeno, de modo que se inhibe la actividad del antígeno. En una realización, el antígeno es una molécula de proteína humana.

En una realización, un anticuerpo de la invención puede utilizarse en un método para inhibir un antígeno en un sujeto que padece un trastorno en el que la actividad del antígeno es perjudicial, que comprende administrar al sujeto un anticuerpo de la invención de modo que se inhibe la actividad del antígeno en el sujeto. En una realización, el antígeno es una molécula de proteína humana, y el sujeto es un sujeto humano. Como alternativa, el sujeto puede ser un mamífero que expresa el antígeno con el que se une un anticuerpo de la invención. Además, el sujeto puede ser un mamífero en el cual se ha introducido el antígeno (por ejemplo, mediante la administración del antígeno o mediante la expresión de un transgén del antígeno). Un anticuerpo de la invención puede administrarse a un sujeto

humano con objetivos terapéuticos. Además, un anticuerpo de la invención puede administrarse a un mamífero no humano que exprese un antígeno con el que el anticuerpo presenta reacción cruzada (por ejemplo, un primate, cerdo o ratón) con fines veterinarios o como un modelo animal de una enfermedad humana. Con respecto a esto último, dichos modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de los anticuerpos de la invención (por ejemplo, ensayo de dosificaciones y programación de la administración). Los anticuerpos de la invención pueden utilizarse para tratar, inhibir, retrasar el avance, prevenir/retrasar la recurrencia, mejorar, o prevenir enfermedades, trastornos o afecciones asociados con la expresión anómala y/o la actividad de poliubiquitinas y proteínas poliubiquitinadas que incluyen, pero no se limitan a cáncer, trastornos musculares, trastornos genéticos relacionados con la vía de la ubiquitina, trastornos inmunológicos/inflamatorios, trastornos neurológicos, y otros trastornos relacionados con la vía de la ubiquitina.

En un aspecto, un anticuerpo de bloqueo de la invención es específico para una poliubiquitina que tiene un enlace de lisina K63, e inhibe la actividad de la poliubiquitina unida a K63 normal bloqueando o interfiriendo con la interacción entre una poliubiquitina unida a K63 y una proteína que interacciona con esta poliubiquitina unida a K63, inhibiendo con ello la correspondiente vía de señales y otros acontecimientos celulares o moleculares asociados. En otro aspecto, un anticuerpo de bloqueo de la invención específico para la poliubiquitina unida a K63 interacciona con una o más proteínas conjugadas con la poliubiquitina unida a K63, inhibiendo con ello la interacción de la proteína con las vías de señales u otros compañeros de unión e interfiriendo con acontecimientos celulares o moleculares asociados.

Tal como se describe en la presente, un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo de la invención conjugado con un agente citotóxico puede administrarse a un paciente. El inmunoconjugado y/o el antígeno al cual está unido puede ser internalizado por células que expresan una o más proteínas sobre su superficie celular que están asociadas con la poliubiquitina unida a K63, dando como resultado una mayor eficacia terapéuticoa del inmunoconjugado para destruir a las células diana con las que está asociado. El agente citotóxico puede dirigirse o interferir con el ácido nucleico en la célula diana. Los ejemplos de dichos agentes citotóxicos incluyen cualquiera de los agentes quimioterapéuticos indicados en la presente (tales como un maitansinoide o una caliqueamicina), un isótopo radiactivo, o una ribonucleasa o una ADN endonucleasa.

Los anticuerpos de la invención pueden utilizarse por sí solos o en combinación con otras composiciones en una terapia. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede coadministrarse con otro anticuerpo y/o agentes adyuvantes/terapéuticos (por ejemplo, esteroides). Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede combinarse con un antiinflamatorio y/o antiséptico en el programa de tratamiento, por ejemplo, para tratar cualquiera de las enfermedades descritas en la presente, incluyendo cáncer, trastornos musculares, trastornos genéticos relacionados con la vía de la ubiquitina, trastornos inmunológicos/inflamatorios, trastornos neurológicos, y otros trastornos relacionados con la vía de la ubiquitina. Estas terapias combinadas indicadas anteriormente incluyen la administración combinada (en la que dos o más agentes se incluyen en la misma formulación o en formulaciones separadas), y la administración separada, en cuyo caso la administración del anticuerpo de la invención puede producirse antes y/o después de la administración de la terapia o terapias adyuntas.

Un anticuerpo de la invención (y el agente terapéutico adjunto) puede administrarse mediante cualquier medio adecuado, incluyendo la administración parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar, e intranasal, y si se desea un tratamiento local, la administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoeneal, o subcutánea. Además, el anticuerpo se administra de modo adecuado mediante infusión de pulsos, en particular con dosis decrecientes de anticuerpo. La dosificación puede realizarse mediante cualquier vía adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de que la administración sea breve o crónica.

La localización de la diana de unión de un anticuerpo de la invención puede tomarse en consideración cuando se prepara y se administra el anticuerpo. Cuando la diana de unión es una molécula intracelular, ciertas realizaciones de la invención facilitan que el anticuerpo, o su fragmento de unión al antígeno, sea introducido en la célula en la que está la diana de unión. En una realización, un anticuerpo de la invención puede expresarse intracelularmente como un intracuerpo. El término “intracuerpo”, tal como se emplea en la presente, se refiere a un anticuerpo, o su fragmento de unión al antígeno, que se expresa intracelularmente y que es capaz de unirse de modo selectivo a una molécula diana, tal como se describe en Marasco, Gene Therapy, 4:11-15 (1997); Kontermann, Methods, 34:163-170 (2004); patentes de EEUU nº 6.004.940 y 6.329.173; publicación de solicitud de patente de EEUU nº 2003/0104402; y publicación PCT nº WO 2003/077945. La expresión intracelular de un intracuerpo se realiza introduciendo un ácido nucleico que codifica el anticuerpo deseado, o su porción de unión al antígeno (que carece de la secuencia conductora y las señales de secreción del tipo salvaje que normalmente están asociadas con el gen que codifica ese anticuerpo o fragmento de unión al antígeno), en una célula diana. Puede emplearse cualquier método convencional para introducir ácidos nucleicos en una célula que incluye, pero no se limita a microinyección, inyección balística, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, liposomas, y transfección con vectores de vaccinia y víricos retrovíricos, adenovíricos y adenoasociados que portan el ácido nucleico de interés. Uno o más ácido nucleicos que codifican todo o una porción de un anticuerpo anti-poliubiquitina de la invención pueden transportarse a una célula diana, de forma que se expresan uno o más intracuerpos que son capaces de una unión intracelular a una poliubiquitina y la modulación de una o más vías celulares mediadas por poliubiquitina.

En otra realización, se proporcionan anticuerpos internalizantes. Los anticuerpos pueden poseer ciertas características que potencian el transporte de los anticuerpos hacia el interior de las células, o pueden modificarse para que posean dichas características. Las técnicas para lograr esto son conocidas en la técnica. Por ejemplo, se sabe que la cationización de un anticuerpo facilita su captación hacia el interior de las células (véase, por ejemplo, la patente de EEUU nº 6.703.019). También pueden utilizarse lipofecciones o liposoma para transportar el anticuerpo hacia el interior de las células. Cuando se emplean fragmentos de anticuerpos, generalmente resulta ventajoso el fragmento inhibidor más pequeño que se une de modo específico al dominio de unión de la proteína diana. Por ejemplo, basándose en las secuencias de la región variable de un anticuerpo, pueden diseñarse moléculas peptídicas que conserven la capacidad de unirse a la secuencia de la proteína diana. Estos péptidos pueden sintetizarse de modo químico y/o producirse mediante tecnología de ADN recombinante. Véase, por ejemplo, Marasco *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:7889-7893 (1993).

La entrada de polipéptidos moduladores en las células diana puede potenciarse mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, ciertas secuencias, tales como las derivadas de Tat de VIH o la proteína de homeodominio de Antennapedia, son capaces de dirigir la captación eficaz de proteínas heterólogas a través de las membranas celulares. Véase, por ejemplo, Chen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999), 96:4325-4329.

Cuando la diana de unión está localizada en el cerebro, ciertas realizaciones de la invención facilitan que el anticuerpo, o su fragmento de unión al antígeno, atraviese la barrera hematoencefálica. Ciertas enfermedades neurodegenerativas están asociadas con un aumento en la permeabildiad de la barrera hematoencefálica, de modo que el anticuerpo, o su fragmento de unión al antígeno, puede introducirse con facilidad en el cerebro. Cuando la barrera hematoencefálica permanece intacta, existen varias estrategias conocidos en la técnica para transportar moléculas a través de ella que incluyen, pero no se limitan a métodos físicos, métodos basados en lípidos, y métodos basados en canales y receptores.

Los métodos físicos para transportar el anticuerpo, o su fragmento de unión al antígeno, a través de la barrera hematoencefálica incluyen, pero no se limitan a soslayar totalmente la barrera hematoencefálica, o crear aberturas en la barrera hematoencefálica. Los métodos para soslayar la barrera hematoencefálica incluyen, pro no se limitan a la inyección directa en el cerebro (véase, por ejemplo, Papanastassiou *et al.*, Gene Therapy, 9:398-406 (2002)), el transporte potenciado por convección/infusión intersticial (véase, por ejemplo, Bobo *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:2076-2080 (1994)), y la implantación de un dispositivo de administración en el cerebro (véase, por ejemplo, Gill *et al.*, Nature Med., 9:589-595 (2003); y Gliadel Wafers™, Guildford Pharmaceutical). Los métodos para crear aberturas en la barrera incluyen, pero no se limitan a ultrasonidos (véase, por ejemplo, la publicación de patente de EEUU nº 2002/0038086), presión osmótica (por ejemplo, mediante la administración de manitol hipertónico (Neuwelt, E.A., Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation, vol. 1 y 2, Plenum Press, N.Y. (1989))), permeabilización, por ejemplo, con bradiquina o permeabilizador A 7 (véanse, por ejemplo, las patentes de EEUU nº 5.112.596, 5.268.164, 5.506.206, y 5.686.416), y transfección de neuronas que forman un puente sobre la barrera hematoencefálica con vectores que contienen genes que codifican el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno (véase, por ejemplo, la publicación de patente de EEUU nº 2003/0083299).

Los métodos basados en lípidos para transportar el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno, a través de la barrera hematoencefálica incluyen, pero no se limitan a encapsular el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno, en liposomas que se acoplan a fragmentos de unión del anticuerpo que se unen a receptores sobre el endotelio vascular de la barrera hematoencefálica (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de EEUU nº 2002/0025313), y revestir el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno, en partículas de lipoproteínas de baja densidad (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de EEUU nº 2004/0204354) o apolipoproteína E (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de EEUU nº 2004/0131692).

Los métodos basados en canales y receptores para transportar el anticuerpo, o el fragmento de unión al antígeno, a través de la barrera hematoencefálica incluyen, pero no se limitan a utilizar bloqueantes de glucocorticoides para aumentar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (véanse, por ejemplo, las publicaciones de solicitudes de patente de EEUU nº 2002/0065259, 2003/0162695, y 2005/0124533); activar los canales de potasio (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de EEUU nº 2005/0089473); inhibir los transportadores de fármaco ABC (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de EEUU nº 2003/0073713); revestir los anticuerpos con una transferrina y modular la actividad de uno o más receptores de transferrina (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de EEUU nº 2003/0129186); y cationizar los anticuerpos (véase, por ejemplo, la patente de EEUU nº 5.004.697).

La composición de anticuerpos de la invención puede formularse, dosificarse, y administrarse de una manera coherente con la buena práctica médica. Los factores que hay que considerar en este contexto incluyen el trastorno concreto que se está tratando, el mamífero concreto que se está tratando, la condición clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, el programa de administración y otros factores conocidos por los médicos. No es necesario que el anticuerpo se formule con uno o más agentes que se emplean en la actualidad para prevenir o tratar el trastorno en cuestión, pero opcionalmente puede formularse con estos. La cantidad eficaz de estos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpos de la invención presentes en la formulación, del tipo de trastorno o tratamiento, y de otros factores analizados anteriormente. Estos se emplean en general en las mismas dosificaciones y con las vías de administración descritas

en la presente, o de aproximadamente 1% al 99% de las dosificaciones descritas en la presente, o en cualquier dosificación y mediante cualquier vía que se ha determinado como apropiada de modo empírico/clínico.

Para la prevención o el tratamiento de una enfermedad, la dosificación apropiada de un anticuerpo de la invención (cuando se emplea solo o en combinación con otros agentes, tales como agentes quimioterapéuticos) dependerá del tipo de enfermedad que se va a tratar, del tipo de anticuerpo, de la gravedad y el desarrollo de la enfermedad, si el anticuerpo se administra con objetivos preventivos o terapéuticos, de la terapia previa, de la historia clínica del paciente y de su respuesta al anticuerpo, y del criterio del médico encargado. El anticuerpo se administra de modo adecuado al paciente de una vez o a lo largo de una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y de la gravedad de la enfermedad, de aproximadamente 1 μg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1 mg/kg-10 mg/kg) de anticuerpo puede ser una dosificación inicial candidata para la administracón al paciente mediante, por ejemplo, una o más administraciones distintas, o mediante infusión continua. Una dosificación diaria típica varía de aproximadamente 1 μg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas a lo largo de varios días o más, dependiendo del trastorno, el tratamiento en general se mantendrá hasta que se produzca la supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Un ejemplo de dosificación del anticuerpo estará en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Así, puede administrarse una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquiera de sus combinaciones) al paciente. Estas dosis pueden administrarse de modo intermitente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de modo que el paciente recibe de aproximadamente dos a aproximadamente veinte o, por ejemplo, aproximadamente seis dosis del anticuerpo). Puede administrarse una dosis de carga mayor inicial, seguido de una o más dosis más bajas. Un ejemplo de régimen de dosificación comprende administrar una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguido de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg del anticuerpo. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. El avance de esta terapia puede controlarse con facilidad mediante técnicas y ensayos convencionales.

Artículos manufacturados

En la presente se describe un artículo manufacturado que contiene materiales útiles para el tratamiento, la prevención y/o el diagnóstico de trastornos descritos anteriormente. El artículo manufacturado comprende un recipiente y una etiqueta o un inserto en el envase o asociados con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, etc. Los recipientes pueden estar formados por una diversidad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente porta una composición que, en sí misma o cuando que combina con otra composición, es eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar el trastorno, y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de disolución intravenosa o un vial que tiene un tapón que puede ser atravesado por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo de la invención. La etiqueta o el inserto del envase indica que la composición se emplea para tratar el trastorno elegido. Además, el artículo manufacturado puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en él, en el que la composición comprende un anticuerpo de la invención; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en él, en el que la composición comprende además otro agente citotóxico o de otra forma terapéutico. El artículo manufacturado también puede comprender un inserto del envase que indique que las composiciones pueden emplearse para tratar un trastorno concreto. Como alternativa, o además, el artículo manufacturado puede comprender también un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI), disolución salina tamponada con fosfato, disolución de Ringer, y disolución de dextrosa. También puede incluir otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, y jeringas.

A continuación se presentan ejemplos de los métodos y las composiciones de la invención. Se entiende que pueden practicarse diversas otras realizaciones, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

Ejemplos

Ejemplo 1: Maduración de la afinidad de un fragmento de anticuerpo específico de diubiquitina unida a K63

Los paneles de anticuerpos capaces de discriminar entre poliubiquitina unida a K48 y poliubiquitina unida a K63 han sido descritos en la publicación de patente de EEUU nº US2007-0218069. La afinidad y la especificidad del mejor Fab anti-enlace-K63 identificado en esta publicación (Apu2.16, una Kd de aproximadamente 100 nM y una pequeña cantidad de unión artefactual a la poliubiquitina unida a K48) eran inferiores a la afinidad y a la especificidad del mejor Fab anti-enlace-K48 identificado en esa publicación (Apu2.07, una Kd de aproximadamente 1 nM, no se observa union a poliubiquitina unida a K63). Se buscó un Fab/anticuerpo específico de poliubiquitina unida a K63 mejorado para facilitar aplicaciones en las que sería deseable una mayor especificidad o afinidad del Fab/anticuerpo.

(A) Generación de bancos

El fragmento de anticuerpo anti-diubiquitina unida a K63 Apu2.16 (Fab) se sometió a una mutagénesis para madurar la afinidad del anticuerpo. Los restos 49, 50, 52 y 53 de CRD-L2 y los restos 50, 52, 53, 54 y 56 de CDR-H2 se seleccionaron mediante mutagénesis basándose en el contacto con la diubiquitina unida a K63, tal como se muestra en la estructura cocristalina de Apu2.16 y la diubiquitina unida a K63 (véase la figura 2 y la publicación de patente de

EEUU nº US2007-0218069). Se empleó un molde de fin de Apu2.16 con codones de fin TAA en las posiciones 51 de CDR-L2 y 52a de CDR-H2 para forzar la mutagénesis de ambas regiones CDR. La expresión de esta construcción estaba bajo el control del promotor de fosfatasa alcalina bacteriana (PhoA). Tanto la cadena ligera como la cadena pesada contenían una secuencia señal StII bacteriana amino-terminal para permitir la secreción en *E. coli*. El carboxilo-terminal de la cadena pesada estaba condensado dentro estructural con un codón de fin ámbar seguido del producto génico III del bacteriófago M13 que permite la presentación del Fab monovalente sobre el fago cuando se expresa en una cepa de *E. coli* supresora de ámbar. Se sintetizaron oligonucleótidos degenerados para una aleatorización suave de las posiciones de contacto de modo que 50% de las veces el resto de Apu2.16 de tipo salvaje se mantiene y 50% de las veces uno de los demás 19 aminoácidos se codifica. Para lograr la aleatorización suave se diseñan oligonucleótidos de modo que ciertas posiciones de nucleótidos están ocupadas 70% de la veces con la base indicada y 10% de las veces están ocupadas por una de las otras tres bases (Gallop *et al.*, J. Med. Chem., 37:1233 (1994)). Cuando esta aleatorización suave se incluye en una base concreta, la presencia de la aleatorización suave se indica por la presencia de un número en la posición de esa base. El número “5” indica que la base adenina está presente 70% de las veces en esa posición, mientras que las bases guanina, citosina y timina están cada una presentes 10% de las veces. De modo similar, el número “6” se refiere a la guanina, “7” a la citosina, y “8” a la timina, en las que, en cada caso, cada una de las otras tres bases está presente sólo 10% de las veces.

Se utilizaron los oligonucleótidos mutagénicos 310887 (CCGAAGCTTCTGATT857876GCA877567CTCTACTCTGGAGTC) (SEQ ID NO:1) y 310890 (GGCCTGGAATGGGTTGCA858ATT878CCT858858GGC878ACTTCTTATGCCGATAGC) (SEQ ID NO:2) con 40 µg de ADN de Kunkel del molde de fin de Apu2.16 en una reacción de mutagénesis de Kunkel (Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:488 (1985); y Sidhu *et al.*, Meth. Enzymol., 328:333 (2000)). La reacción de mutagénesis se electroporó en *E. coli* ElectroTen Blue (Stratagene) y se recuperó en 25 ml de medio SOC durante 45 minutos a 37 ºC con agitación. Se retiraron 20 microlitros y se cultivaron diluciones en serie en diez veces sobre placas de agar sólido que contenía carbenicilina y se cultivaron durante la noche a 37 ºC para determinar el tamaño del banco. El resto del cultivo se trasladó a 500 ml de caldo de cultivo 2YT que contenía carbenicilina 50 µg/ml, kanamicina 50 µg/ml, y 10^{10} fagos/ml de fago auxiliar M13K07 (New England Biolabs). El cultivo se cultivó durante 14 horas a 30 ºC con agitación. El banco contenía aproximadamente 3 x 10^{10} CFU. El fago se purificó del sobrenadante del cultivo mediante dos rondas de precipitación con 1/5 volúmenes de polietilenglicol (PEG) al 20%/NaCl 2,5 M

(B) Clasificación del banco

Se empleó el fago amplificado en la clasificación contra la diubiquitina unida a K63 sintetizada enzimáticamente (Boston Biochem) inmovilizada sobre inmunoplacas Maxisorb de 96 pocillos (Nunc). Las placas se revistieron durante la noche a 4 ºC con diubiquitina unida a K63 5 µg/ml en tampón carbonato de sodio 50 mM, pH 9,6. Las placas revestidas se bloquearon con leche al 2,5% en PBS que contenía Tween-20 al 0,05% (PBST) durante una hora a 25 ºC con agitación. El fago se diluyó hasta una DO_{268} de 5,0 en leche al 2,5%/PBST y se incubó en hielo durante una hora. Después del bloqueo, la placa se lavó cinco veces con PBST. Se añadieron 100 microlitros/pocillo del fago y se incubó a 25 ºC durante una hora con agitación. Después de la unión, la placa se lavó diez veces con PBST. El fago se eluyó con 100 µl/pocillo de HCl 100 mM durante 20 minutos a 25 ºC con agitación. El eluato se neutralizó con 1/10 volúmenes de Tris 1 M, pH 11,0, y después se propagó en *E. coli* XL-1 (Stratagene) con la adición del fago auxiliar M13K07.

El fago amplificado se utilizó en posteriores rondas de clasificación. La segunda clasificación se realizó como se describió anteriormente, con la excepción de que se empleó diubiquitina unida a K63 biotinilada 100 nM como diana en la disolución y el fago se utilizó a una OD_{268} de 1,0. La diubiquitina unida a K63 biotinilada junto con el fago unido se capturó sobre inmunoplacas revestidas con neutravidina 5 µg/ml. La tercera ronda de clasificación se realizó de modo similar a la segunda ronda, con la adición de diubiquitina unida a K48 100 nM soluble y monoubiquitina 100 nM (Boston Biochem) como competidores en las etapas de bloqueo del fago y unión del fago. En la cuarta ronda de clasificación, la concentración de la diubiquitina unida a K63 diana disminuyó hasta 10 nM y las concentraciones de diubiquitina unida a K48 y monoubiquitina competidoras aumentaron hasta 1 µM cada una. Se observó un enriquecimiento para la unión a la diubiquitina unida a K63 biotinilada comparado con la neutravidina sola después de la tercera y cuarta ronda.

Se cultivaron 96 clones individuales de la cuarta clasificación en un formato de 96 pocillos en 1 ml de caldo de cultivo 2YT que contiene carbenicilina 50 µg/ml y 10^{10} fagos/ml de fago auxiliar M13K07. Los sobrenadantes de estos cultivos se utilizaron en un ELISA de fagos de alta capacidad de procesamiento para la unión de diubiquitina unida a K63, diubiquitina unida a K48, monoubiquitina, o los pocillos sin revestir de la placa. Cincuenta y un clones mostraron unión específica a la diubiquitina unida a K63 y su ADN se secuenció utilizando procedimientos convencionales. Las secuencias de las CDR-L2 y -H2 para cada clon se muestran en la tabla B. Las CDR-L1 -L3, -H1 y -H3 no se secuenciaron, pero puesto que no fueron diana para la mutagénesis se espera que mantengan la secuencia de CDR-L1 del molde de Apu2.16 (RASQSVSSAVA) (SEQ ID NO:3), las secuencia de CDR-L3 (QQYSSYSSLFT) (SEQ ID NO:4), la secuencia de CDR-H1 (VKTGLI) (SEQ ID NO:5), y la secuencia de CDR-H3 (EYYRWYTAI) (SEQ ID NO:6), que no fueron diana para la mutagénesis.

Tabla B: Secuencias de HVR-L2 y HVR-H2 para los Fab anti-poliubiquitina unida a K63 de origen y con maduración de la afinidad

Clon	Secuencia de HVR-L2								SEQ ID NO	Secuencia de HVR-H2																	SEQ ID NO
	49	50	51	52	53	54	55	56		50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	
Apu2.16	Y	S	A	S	S	L	Y	S	7	Y	I	S	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	59
A8	Y	S	A	R	S	L	Y	S	8	Y	I	T	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	60
A9	Y	S	A	V	S	L	Y	S	9	Y	I	S	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	61
A11	Y	S	A	S	S	L	Y	S	10	D	I	T	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	62
A12	Y	S	A	R	S	L	Y	S	11	Y	I	A	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	63
B1	Y	S	A	R	S	L	Y	S	12	Y	I	T	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	64
B2	Y	S	A	R	S	L	Y	S	13	Y	I	T	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	65
B3	Y	A	A	A	S	L	Y	S	14	Y	I	F	P	Y	H	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	66
B4	Y	S	A	V	S	L	Y	S	15	D	I	A	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	67
B5	Y	S	A	A	S	L	Y	S	16	Y	I	A	P	Y	Y	G	A	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	68
B9	Y	S	A	R	S	L	Y	S	17	Y	I	F	P	Y	F	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	69
C1	Y	A	A	A	S	L	Y	S	18	Y	I	A	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	70
C3	Y	S	A	V	S	L	Y	S	19	D	I	A	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	71
C4	Y	S	A	V	S	L	Y	S	20	Y	I	Y	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	72
C5	Y	S	A	R	S	L	Y	S	21	Y	I	S	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	73
C8	Y	S	A	R	S	L	Y	S	22	Y	I	T	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	74
C12	Y	A	A	A	S	L	Y	S	23	Y	I	T	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	75
D1	Y	A	A	V	S	L	Y	S	24	Y	I	S	P	Y	Y	G	W	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	76
D3	Y	S	A	T	S	L	Y	S	25	D	I	S	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	77
D7	Y	S	A	N	S	L	Y	S	26	Y	I	A	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	78
D8	Y	A	A	A	S	L	Y	S	27	Y	I	V	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	79
D9	Y	S	A	V	S	L	Y	S	28	D	I	F	P	Y	Y	G	S	S	S	Y	A	D	S	V	K	G	80
D10	Y	S	A	S	S	L	Y	S	29	D	I	V	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	81
D11	Y	S	A	V	S	L	Y	S	30	Y	I	F	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	82
E1	Y	S	A	V	S	L	Y	S	31	D	I	S	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	83
E2	F	A	A	A	S	L	Y	S	32	Y	I	A	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	84

E3	Y	S	A	R	S	L	Y	S	33	Y	I	A	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	85
E4	Y	S	A	S	S	L	Y	S	34	W	I	S	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	86
E5	Y	S	A	A	S	L	Y	S	35	Y	I	A	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	87
E8	Y	S	A	A	S	L	Y	S	36	Y	I	T	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	88
E12	Y	A	A	R	S	L	Y	S	37	D	I	T	P	Y	F	G	F	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	89
F1	Y	S	A	V	S	L	Y	S	38	Y	I	S	P	Y	L	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	90
F3	Y	A	A	V	S	L	Y	S	39	Y	I	F	P	Y	Y	G	G	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	91
F4	Y	S	A	L	S	L	Y	S	40	Y	I	Y	P	Y	Y	G	W	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	92
F6	Y	S	A	A	S	L	Y	S	41	D	I	S	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	93
F9	Y	S	A	S	S	L	Y	S	42	D	I	T	P	Y	Y	G	F	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	94
G1	Y	S	A	S	S	L	Y	S	43	Y	I	A	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	95
G2	Y	S	A	S	S	L	Y	S	44	D	I	S	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	96
G3	Y	S	A	A	S	L	Y	S	45	D	I	S	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	97
G4	Y	S	A	T	S	L	Y	S	46	Y	I	T	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	98
G5	Y	S	A	L	S	L	Y	S	47	Y	I	A	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	99
G10	Y	S	A	V	S	L	Y	S	48	D	I	T	P	Y	Y	G	F	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	100
G11	Y	A	A	A	S	L	Y	S	49	D	I	T	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	101
G12	Y	S	A	S	S	L	Y	S	50	D	I	T	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	102
H2	Y	A	A	A	S	L	Y	S	51	D	I	T	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	103
H3	Y	A	A	A	S	L	Y	S	52	Y	I	T	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	104
H4	Y	S	A	A	S	L	Y	S	53	Y	I	S	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	105
H5	Y	A	A	A	S	L	Y	S	54	D	I	S	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	106
H6	Y	S	A	S	S	L	Y	S	55	Y	I	T	P	Y	Y	G	F	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	107
H7	Y	S	A	V	S	L	Y	S	56	Y	I	T	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	108
H9	Y	S	A	V	S	L	Y	S	57	D	I	T	P	Y	Y	G	F	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	109
H10	Y	S	A	L	S	L	Y	S	58	Y	I	A	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	110
Consenso	Y/F	A/S	A	S/R/ V/T/ A/N/ L	S	L	Y	S	111	Y/D/ W	I	S/T/ A/F/ Y/V	P	Y	Y/F/ L/H	G	S/G A/F W	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	112

(C) Producción de Fab

Se seleccionaron 24 de los clones anti-diubiquitina unida a K63 más específicos (según se juzga por una proporción de señal mayor que diez para la unión a la diubiquitina unida a K63 con relación a la diubiquitina unida a K48 en en el ensayo ELISA de puntos de fagos descrito anteriormente) para la producción de Fab soluble. Los plásmidos que codifican estos Fab se transformaron en E. coli y se cultivaron en agar sólido que contenía carbenicilina. Se utilizaron colonias individuales para inocular 25 ml de caldo de cultivo 2YT que contenía carbenicilina 50 μg/ml. Los cultivos se cultivaron durante la noche a 37 ºC y se utilizaron 5 ml para inocular 500 ml de medio C.R.A.P. completo (3,57 g de $(NH_4)_2SO_4$, 0,71 g de citrato de sodio $2H_2O$, 1,07 g de KCl, 5,36 g de extracto de levadura, 5,36 g de Hycase SF (Sheffield), pH ajustado a 7,3 mediante la adición de KOH y con el volumen ajustado a 872 ml con agua ultrapura, sometido a un autoclave, enfriado ahasta 55 ºC, al cual se le añadieron (por l) 110 ml de MOPS 1 M, pH 7,3, 11 ml de glucosa al 50%, y 7 ml de $MgSO_4$ 1 M) con carbenicilina 50 μg/ml. Los cultivos se cultivaron a 30 ºC durante 24 horas con agitación. Las células se recolectaron mediante centrifugación y los sedimentos se conservaron a -20 ºC. Los Fab se purificaron resuspendiendo cada sedimento en 35 ml de tampón de lavado frío (PBS + NaCl 150 mM) que contenía ADNasa I 10 μg/ml, lisozima 0,2 mg/ml, y fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM (PMSF). Los sedimentos se resuspendieron mediante agitación en vórtice rápida durante 45 minutos a 25 ºC. Los residuos celulares se sedimentaron mediante centrifugación y los lisados se cargaron sobre columnas de proteína A Sepharose de 1 ml (GE Health Sciences) preequilibradas con tampón de lavado frío. Las columnas se lavaron con 50 ml de tampón de lavado frío, se eluyeron con 3 ml de ácido acético 0,1 M, y se neutralizaron con 150 μl de Tris 2 M, pH 11,0. Los Fab se concentraron utilizando unidades de filtro de centrífuga Amicon Ultra 15 (límite de exclusión 5 KD, Millipore). Las concentraciones de Fab resultantes se determinaron de modo espectrofotométrico, y los Fab concentrados se conservaron a 4 ºC.

(D) Análisis de afinidad de los Fab aislados

Se determinaron las afinidades de 24 Fab seleccionados (véase el anterior ejemplo 1(C)) mediante resonancia de plasmón de superficie (SPR) utilizando un sistema BIACORE™ A100 (Biacore). Se inmovilizaron aproximadamente 50 unidades de resonancia de la diubiquitina unida a K63 o la diubiquitina unida a K48 en dos de las cuatro células de flujo de un chip CM5 utilizando el protocolo de acoplamiento de aminas suministrado por el fabricante. Se activó una célula de flujo de cada chip CH5 y se bloqueó con etanolamina sin proteína inmovilizante, para ser utilizada como referencia. Se inyectaron diluciones en serie en dos veces (31,25-500 nM) de cada Fab (60 μl totales a un caudal de 30 μl/min) en cada célula de flujo. La señal de referencia se restó de cada señal de la célula de flujo. después de un periodo de disociación (10 minutos), la superficie del chip se regeneró con 15 μl de HCl 10 mM. Se calcularon simultáneamente las constantes cinéticas y las constantes de unión mediante un análisis de regresión no lineal, utilizando un programa informático suministrado por el fabricante, y se muestran en la tabla C. Se muestra la media (Media) de tres mediciones distintas de las constantes cinéticas y las constantes de unión del Fab Apu2.16 de origen, y de una sola medición para los 24 Fab con maduración de la afinidad. Ni el Fab Apu2.16 de origen ni ninguno de los 24 Fab con maduración de la afinidad mostraron unión detectable a la diubiquitina unida a K48.

Tabla C: Constantes de unión para la unión de Fab anti-poliubiquitina unida a K63 con maduración de la afinidad, a la diubiquitina unida a K63 medidas mediante SPR

Clon	**kon (1/Ms)**	**koff (1/s)**	**Kd (nM)**
Media de Apu2.16	$4,9 \times 10^5$	$5,4 \times 10^{-2}$	110
Desviación estándar para las mediciones de Apu2.16	$0,49 \times 10^5$	$2,0 \times 10^{-2}$	30
Apu3.A8	$1,7 \times 10^6$	$1,4 \times 10^{-2}$	8,7
Apu3.A9	$2,3 \times 10^6$	$9,9 \times 10^{-2}$	44
Apu3.A12	$9,9 \times 10^9$	$6,2 \times 10^1$	6,2
Apu3.B3	$4,8 \times 10^6$	$2,9 \times 10^{-2}$	6,1
Apu3.B5	$1,0 \times 10^6$	$4,6 \times 10^{-2}$	46
Apu3.C1	$4,3 \times 10^6$	$7,8 \times 10^{-2}$	18
Apu3.C4	$4,7 \times 10^8$	$3,4 \times 10^1$	73
Apu3.C5	$1,0 \times 10^6$	$2,9 \times 10^{-2}$	28
Apu3.D3	$7,9 \times 10^5$	$6,1 \times 10^{-2}$	78

Apu3.D7	$8,1 \times 10^{5}$	$3,7 \times 10^{-2}$	46
Apu3.D8	$3,9 \times 10^{8}$	$4,4 \times 10^{0}$	11
Apu3.E1	$1,1 \times 10^{6}$	$2,1 \times 10^{-2}$	18
Apu3.E2	$1,0 \times 10^{6}$	$3,0 \times 10^{-2}$	29
Apu3.E4	$7,2 \times 10^{5}$	$8,2 \times 10^{-2}$	110
Apu3.E5	$1,0 \times 10^{6}$	$2,6 \times 10^{-2}$	25
Apu3.F1	$8,3 \times 10^{5}$	$2,3 \times 10^{-2}$	28
Apu3.G1	$6,5 \times 10^{5}$	$5,4 \times 10^{-2}$	84
Apu3.G2	$6,1 \times 10^{5}$	$5,4 \times 10^{-2}$	90
Apu3.G3	$1,0 \times 10^{6}$	$4,1 \times 10^{-2}$	39
Apu3.G4	$7,3 \times 10^{5}$	$2,4 \times 10^{-2}$	33
Apu3.G5	$1,1 \times 10^{6}$	$3,1 \times 10^{-2}$	29
Apu3.H5	$1,0 \times 10^{6}$	$2,9 \times 10^{-2}$	28
Apu3.H6	$3,6 \times 10^{9}$	$7,8 \times 10^{1}$	22
Apu3.H7	$2,0 \times 10^{4}$	$9,2 \times 10^{-4}$	45

(E) Transferencias Western de Fab con maduración de la afinidad

Las constantes de unión obtenidas a partir del análisis SPR en el ejemplo 1(D) indican que tres clones (Apu3.A8, Apu3.A12, y Apu3.B3) muestran una unión nanomolar de un único dígito. Estos tres Fab, junto con el Apu2.16 de origen, se ensayaron para la detección de diubiquitina unida a K63 y diubiquitina unida a K48 en una transferencia Western. Se ensayaron seis concentraciones de diubiquitina unida a K63 (31-1000 ng) y tres concentraciones de diubiquitina unida a K48 (250-1000 ng) en un gel NuPAGE al 4-12% (Invitrogen), se trasladaron a una membrana de poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF), y se transfirieron con el clon de origen y tres Fab con maduración de la afinidad. Los Fab contenían un marcador de 6x-His carboxi-terminal y así se detectaron con un anticuerpo secundario conjugado con HRP anti-pentaHis (Qiagen), seguido del revelado de la quimioluminiscencia. Los cuatro Fab detectaron específicamente la diubiquitina unida a K63 (véase la figura 3). No se observó unión a la diubiquitina unida a K48 en ninguno de los cuatro Fab ensayados.

(F) Conversión a IgG

El Fab Apu2.16 de origen y los tres Fab con maduración de la afinidad Apu3.A8, Apu3.A12, y Apu3.B3 se expresaron en células HEK293 como IgG humanas. Las construcciones de expresión se generaron clonando los dominios variables de los Fab en construcciones de expresión de mamífero pRK que codifican las cadenas pesada y ligera de la IgG humana (Gorman *et al.*, DNA Prot. Eng. Tech., 2: 3-10 (1990)). Las IgG se purificaron mediante cromatografía de afinidad sobre columnas de proteína A Sepharose mediante metodologías convencionales.

Ejemplo 2: Detección de proteínas ubiquitinadas de modo endógeno

Se evaluó la actividad de las IgG anti-poliubiquitina unida a K63 con maduración de la afinidad descritas en el ejemplo 1(F). Para los análisis de la transferencia Western, se ensayó la poliubiquitina o proteínas poliubiquitinadas en geles de policarilamida, y los contenidos de los geles se transfirieron a transferencias de nitrocelulosa siguiendo procedimientos convencionales en la técnica. Las transferencias de nitrocelulosa resultantes se bloquearon durante aproximadamente una hora en Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0,1% (TBST) que contenía polvo de leche desnatada al 5%. El anticuerpo anti-poliubiquitina unida a K63 primario (el anticuerpo Apu2.16 de origen en formato IgG, o Apu3.A8, Apu3.A12 o Apu3.B3 en formato IgG) se añadieron a una concentración final de 5 μg/ml durante un mínimo de 1 hora a temperatura ambiente. Se realizaron incubaciones durante la noche a 4 ºC. Las transferencias se lavaron tres veces en TBST, con 10 minutos por lavado. Los anticuerpos anti-poliubiquitina unida a K63 unidos se detectaron con anti-IgG humana conjugado con peroxidasa (ICN Cappel) diluido 1:10.000 en TBST que contenía polvo de leche desnatada al 5%. Después de una hora a temperatura ambiente, las transferencias se lavaron 3-6 veces en TBST, se incubaron en Supersignal (Pierce) según las instrucciones del fabricante, y se expusieron a una película. Para las transferencias Western de las proteínas ubiquitinadas de modo endógeno, se transfectaron células 293T con o sin un vector que expresa TRAF6 marcado con 3xHA utilizando Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Las células se recolectaron dos días después de la transfección después de un cultivo en MG-132

25 μM (Calbiochem) durante la hora final. Las células se lavaron en disolución salina tamponada con fosfato y después se prepararon extractos de proteína en tampón de lisis enfriado en hielo (Tris-Cl 20 mM, pH 7,5, NaCl 135 mM, $MgCl_2$ 1,5 mM, EGTA 1 mM, Triton X-100 al 1%, glicerol al 10%, ditiotreitol 1 mM, N-etilmaleimida 2 mM) suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas completo (Roche).

Tal como se muestra en las figuras 4 y 5, cada una de las tres IgG anti-enlace-K63 con maduración de la afinidad ensayadas funcionaron mejor en las transferencias Western que el Apu2.16 IgG de origen. La figura 4 muestra los resultados de una transferencia Western contra poliubiquitina unida a K48 o unida a K63 purificada inmovilizada que contiene de dos a siete subunidades de ubiquitina. La IgG Apu2.16 de origen no detecta la poliubiquitina unida a K48 o unida a K63 con cualquier número de subunidades de ubiquitina en ninguna de las concentraciones ensayadas. Las IgG con maduración de la afinidad Apu3.A8, Apu3.A12 o Apu3.B3 detectaron la poliubiquitina unida a K63 que contiene de 2 a 6 subunidades en cada concentración ensayada, y de siete subunidades en todas las concentraciones ensayadas, menos la más baja. No se observó unión no específica a la poliubiquitina unida a K48 en ninguna de las tres IgG con maduración de la afinidad. Para determinar si los anticuerpos con maduración de la afinidad son capaces de detectar las proteínas ubiquitinadas de modo endógeno, las células 293T se transfectaron con TRAF6 y se trataron con MG-132, que se ha descubierto que produce una ubiquitinación unida a K63 de TRAF6 *in vivo* (Wertz *et al.*, Nature (2004), 430:694-699). De modo similar a la transferencia Western con la poliubiquitina purificada inmovilizada en la figura 4, la IgG Apu2.16 de origen no fue capaz de detectar TRAF6 poliubiquitinada unida a K63 ni ninguna otra proteína poliubiquitinada unida a K63 en un ensayo de la transferencia Western (figura 5). Sin embargo, cada uno de los anticuerpos Apu3.A8, Apu3.A12 y Apu3.B3 detectaron específicamente TRAF6 poliubiquitinado unida a K63 y otras proteínas poliubiquitinadas unida a K63 en el mismo ensayo de transferencia Western (figura 5).

Los anteriores experimentos confirman que los anticuerpos con maduración de la afinidad fueron capaces de detectar proteínas poliubiquitinadas inmovilizadas. Se realizaron otros experimentos para determinar si estos anticuerpos son capaces de inmunoprecipitar proteínas poliubiquitinadas. Para los ensayos de inmunoprecipitación, el tampón de lisis descrito previamente también contiene urea 6 M, y las células se lisaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. El material insoluble entonces se retiró mediante centrifugación, y el lisado soluble se diluyó en tampón de lisis normal para disminuir la concentración de urea hasta 0,29 M. Los lisados se preaclararon con proteína A Sepharose (GE) durante 1 hora a 4 ºC y después se incubaron con 5 μg del anticuerpo indicado durante 1 hora a 4 ºC. Los complejos de anticuerpo se capturaron con proteína A Sepharose a 4 ºC durante 1 hora, se lavaron a fondo en tampón de lisis, y se eluyeron mediante un hervido en tampón de muestra Novex Tris-glicina SDS (Invitrogen) suplementado con 2-mercaptoetanol al 2,5%.

Cuando los lisados que contienen TRAF-6 se desnaturalizan en presencia de SDS al 1% para disociarlo de otras proteínas ubiquitinadas y se realizan las inmunoprecipitaciones tras la dilución del SDS hasta un nivel tan bajo como 0,05%, TRAF6 no fue capturado por los anticuerpos específicos de enlace-K63 (los datos no se muestran). Sin embargo, la inmunoprecipitación de TRAF6 tuvo éxito cuando las células que expresan TRAF6 se lisan en presencia de un desnaturalizante alternativo, urea 6M. Tal como se muestra en la figura 6A, los tres anticuerpos con maduración de la afinidad inmunoprecipitaron Traf6 poliubiquitinado unida a K63 mejor que el anticuerpo de origen Apu2.16, lo cual demuestra que los anticuerpos con maduración de la afinidad tienen una mejor unión a las proteínas ubiquitinadas-K63 de modo endógeno en disolución, comparado con el anticuerpo anti-poliubiquitina K63 de origen. En otros experimentos, el tratamiento del material poliubiquitinado unida a K63 con la enzima desubiquitinante promiscua Usp2 durante periodos de tiempo crecientes colapsa las manchas de las bandas con mayor peso molecular observadas en la figura 6A y en el segundo carril de la figura 6B, lo cual confirma que el TRAF6 inmunoprecipitado está ubiquitinado (figura 6B, carriles 3-5). No es probable que la actividad proteolítica no específica potencialmente asociada con Usp2 haya sido la responsable de la desaparición observada de las especies de migración más lenta, porque la inhibición de la actividad desubiquitinante de Usp2 utilizando el inhibidor de cisteína proteasas N-etilmaleimida (NEM) evita el colapso de las manchas (figura 6B, carril 6). Parece que una porción del TRAF6 inmunoprecipitado por el anticuerpo específico de enlace-K63 Apu3.A8, por su migración, es TRAF6 no modificado, pero esto probablemente puede atribuirse a la sobreexpresión de TRAF6 que induce la formación de autooligómeros que atrapan al TRAF6 no modificado.

Estos resultados fueron confirmados por experimentos de espectrometría de masas. Cuando las cadenas de poliubiquitina se digieren con tripsina, pueden observarse péptidos exclusivos que se corresponden con cada uno de los 7 tipos diferentes de enlaces de lisina. Esto está de acuerdo con el consenso general de la existencia de un motivo GlyGly sobre una lisina no rota. Cada uno de los siete posibles enlaces de la cadena de la poliubiquitina produce un péptido exclusivo con una masa exclusiva (cuando se mide a una precisión de masa de 10 ppm) y también un patrón de fragmentación exclusivo tras la disociación inducida por colisión. Por tanto, la utilización de un espectrómetro de masas de alta resolución, junto con el análisis dirigido contra los péptidos distintivos específicos de interés permite controlar y cuantificar los niveles de abundancia del enlace-K48 o -K63 de la cadena de la poliubiquitina. Brevemente, se realizaron reacciones de inmunoprecipitación en células BJAB según se describió anteriormente utilizando un anticuerpo anti-enlace-K48, una mezcla de las tres IgG anti-poliubiquitina unida a K63 con maduración de la afinidad Apu3.A8, Apu3.A12 y Apu3.B3, o un anticuerpo control (Herceptin®). Las proteínas se extrajeron de las esferas químicamente utilizando acetonitrilo:agua + TFA al 0,1%, se redujeron, se alquilaron, y se digirieron con tripsina. Se empleó un espectrómetro de masas híbrido LTQ-Orbitrap acoplado a un

nanoACQUITY™ UPLC (Thermo-Fisher Scientific) a un caudal de 1 µl/minuto con un gradiente de una hora (disolvente A: agua + ácido fórmicao al 0,1%; disolvente B: acetonitilo + ácido fórmico al 0,1%). El instrumento se calibró y se sintonizó utilizando tetraubiquitina sintética digerida trípticamente (Boston Biochem) para validar los estados de carga óptimos para los estudios de análisis dirigidos. Los m/z determinados para la poliubiquitina unida a 48 fueron 487,6, 730,89, y 1460,78, y los m/z determinados para la poliubiquitina unida a K63 fueron 561,80, 748,73, y 1122,6. Después de la digestión tríptica, la separación en fase inversa y la espectrometría de masas en tándem dirigida, los cromatogramas de iones para los péptidos de poliubiquitina unida a K48 y -K63 se extrajeron y se calculó el área de los picos para inferir la concentración.

Los resultados de los análisis de inmunprecipitación se indican en las figura 7A y 7B. Tal como se muestra en la figura 7A, la mezcla de los tres anticuerpos anti-poliubiquitina unida a K63 con maduración de la afinidad inmunoprecipitaron de modo específico las proteínas poliubiquitinadas unida a K63. Los resultados de la figura 7B demuestran que los anticuerpos anti-poliubiquitina unida a K63 no mostraron reacción cruzada con los péptidos de poliubiquitina unida a K48 (mientras que, por comparación, el anticuerpo anti-poliubiquitina unida a K48 muestra un enriquecimiento sustancial en los péptidos de poliubiquitina unida a K48).

En otros experimentos de espectrometría de masas, las proteínas poliubiquitinadas se inmunoprecipitaron a partir de células BJAB humana según se describió anteriormente, y después se resolvieron mediante SDS-PAGE utilizando métodos convencionales. Las proteínas resueltas en gel inmunoprecipitadas se sometieron a una digestión con tripsina dentro del gel y después se analizaron utilizando una variación del método de ubiquitina AQUA (Kirkpatrick *et al.*, Nat. Cell Biol., 8:700-710 (2006)). Brevemente, las digestiones de tripsina se suplementaron con péptidos de patrón interno marcados con un isótopo que representan cada enlace de la cadena de poliubiquitina y la ubiquitina no ramificada, y después los patrones más sus correspondientes analitos nativos se detectaron en barridos de iones precursores de alta resolución utilizando cromatogramas de iones extraídos en un intervalo estrecho (Crosas *et al.*, Cell, 127:1401-1413 (2006)). La abundancia de cada enlace de la cadena de poliubiquitina y la cantidad total de ubiquitina en los inmunoprecipitados de BJAB se cuantificó comparando la señal de cada péptido digerido con relación a su correspondiente patrón interno. De modo específico, las células BJAB se cultivaron en matraces de agitación en la versión de alto contenido en glucosa del medio de Eagle modificado de Dulbecco suplementado con L-asparagina 100 µM, 2-mercaptoetanol 50 µM, y suero de ternera fetal al 10%. Las células ($>10^9$) se lavaron en PBS y se lisaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en tampón de lisis (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 135 mM, $MgCl_2$ 1,5 mM, EGTA 1 mM, Triton X-100 al 1%, glicerol al 10%) que contiene urea 6 M, N-etilmaleimida 2 mM (NEM) y un cóctel de inhibidores de proteasas completo (Roche). El material insoluble se retiró mediante centrifugación y después el lisado se diluyó hasta urea 4 M con tampón de lisis suplementado con inhibidores de proteasas, NEM 2 mM y DTT 1 mM. Después de preaclarar con proteína A Sepharose (GE Healthcare) durante una hora, el lisado se dividió en tres muestras que recibieron 30 µg de Apu3.A8 anti-enlace-K63 (en formato IgG), Apu2.07 anti-enlace-K48 (en formato IgG), o anticuerpo control de isotipo (anti-Her2). Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante dos horas y después se centrifugaron para eliminar el material precipitado. Se añadió más anticuerpo (10 µg) al lisado soluble, así como proteína A Sepharose, y las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante la noche. Las esferas de Sepharose se lavaron a fondo en tampón de lisis, y después en PBS. Las esferas se eluyeron en tampón de muestra de SDS reductor, se alquilaron con yodoacetamida, y después se resolvieron mediante SDS-PAGE en geles de Tris glicina al 4-20% (Invitrogen). Todas las áreas del gel (excepto las regiones de 25 y 55 kDa que representan las cadenas pesada y ligera de los anticuerpo precipitantes) se retiraron, se trituraron, se lavaron en NH_4HCO_3 25 mM en acetonitrilo:agua 50:50 y se deshidrataron. El gel entonces se rehidrató en NH_4HCO_3 25 mM que contiene tripsina (Promega) y se incubó durante la noche a 37 ºC. La reacción se extinguió mediante la adición de TFA al 0,008%. Los péptidos se extrajeron en ácido acético al 5% y después dos veces en acetonitrilo al 100%. Estas muestras se sembraron con patrones de péptidos AQUA (1 pmol) y se inyectaron a través de un automuestreador para su separación mediante una cromatografía en fase inversa en un sistema NanoAcquity UPLC (Waters). Los péptidos cargados sobre una precolumna (Symmetry® C18 de 5 µm, 180 x 20 mm) se separaron utilizando una columna analítica (columna BHE-130 C18 de 1,7 µm, 100 x 100 mm (Waters)) con un caudal de 1 µl por minuto y un gradiente de disolvente B al 2% a disolvente V al 90% (en los que disolvente A es agua + ácido fórmico al 0,1%, y el disolvente B es acetonitrilo al 100% + ácido fórmico al 0,1%) aplicado a lo largo de 70 minutos con un tiempo total de análisis de 90 minutos. Los péptidos se eluyeron directamente utilizando una fuente de ionización de nanopulverización con un voltaje de pulverización de 2 kV y se analizaron utilizando un espectrómetro de masas LTQ XL-Orbitrap (ThermoFisher). Los iones precursores se analizaron en el FTMS con una resolución de 60.000. La cuantificación se realizó comparando las áreas de los picos para la versión pesada y ligera de cada péptido, extrayendo los cromatogramas de iones con una precisión de masa de 10 ppm hasta 4 decimales.

Las reacciones de autoubiquitinación de MuRF1 se realizaron según las instrucciones del fabricante (Boston Biochem). Para las inmunoprecipitaciones, las muestras se diluyeron en 100 veces en tampón de lisis que contenía urea 4 M, se preaclararon con proteína A Sepharose, y después se inmunoprecipitaron durante la noche con anticuerpo (20 µg) y proteína A Sepharose. La ubiquitina total se transfirió con anticuerpo P4D1 (Santa Cruz Biotechnology). Las muestras de MuRF1 analizadas mediante espectrometría de masas se resolvieron en un módulo Agilent 1100 LC con un gradiente de 15 minutos desde disolvente B al 5% hasta disolvente B al 30% y un tiempo total de análisis de 30 minutos. Se crearon los cromatogramas de iones extrayendo una ventana ± 15 ppm del m/z esperado.

El anticuerpo anti-poliubiquitina unida a K48 Apu2.07, el anticuerpo anti-poliubiquitina unida a K63 Apu3.A8, y un anticuerpo control de isotipo reconocen Her2 inmunoprecipìtado con 49,1 pmol, 2,2 pmol y 0,2 pmol de ubiquitina total, respectivamente (figura 7C). Este resultado está de acuerdo con la observación de que las cadenas de poliubiquitina unida a K48 son más abundantes que las cadenas de poliubiquitina unida a K63 en el lisado de entrada utilizado para las inmunoprecipitaciones (figura 7D). El examen directo de los enlaces en poliubiquitinas inmunoprecipitadas por el anticuerpo anti-enlace-K48 reveló 12,7 pmol de péptido distintivo GG-K48 y cantidades residuales de péptidos distintivos para ciertos otros enlaces (0,1 pmol de K63, 1,1 pmol de K11, y 2,0 pmol de K6) (figura 7E). De forma similar, las cadenas de poliubiquitina inmunoprecipitadas por el anticuerpo anti-poliubiquitina unida a K63 Apu3.A8 produjeron principalmente el péptido distintivo GG-K48 (0,3 pmol de K63), y cantidades menores de otros péptidos con otros enlaces (0,81 pmol de K48, 0,08 pmol de K11, y 0,06 pmol de K6) (figura 7F). Dadas las fuertes preferencias de unión observadas por los anticuerpos anti-poliubiquitina mediante resonancia de plasmón de superficie, estos resultados de la espectrometría de masas sugieren que una fracción significativa de sustratos celulares modificados por la ubiquitina muestra enlaces en la cadena de poliubiquitina heterogéneos.

Para confirmar que estos enlaces “no diana” inmunoprecipitados de los lisados de células BJAB proceden de sustratos que portan cadenas de poliubiquitina heterogéneas, en oposición a la unión no específica, se investigó si era necesaria para los enlaces diana la inmunoprecipitación de los enlaces “no diana”. Se generaron *in vitro* cadenas de poliubiquitina unida as mixtos que carecen de enlace-K48 o -K63 utilizando E3 MuRF1 en combinación con la enzima E2 promiscua UbcH5c (Kim *et al.*, J. Biol. Chem., 282:17375-17386 (2007)). El enlace-K4 o K63 se excluyó de las reacciones de autoubiquitinación de MuRF1 utilizando una ubiquitina mutante con K48 o K63 mutada a una arginina (figura 7G). Mediante una transferencia Western con un anticuerpo pan-ubiquitina, las reacciones de autoubiquitinación de MuRF-1 producen manchas de alto peso molecular independientemente de si se emplea ubiquitina de tipo salvaje, K48R, o K63R (figura 7H, carriles 1, 5 y 9). El análisis de ubiquitina AQUA de la reacción con la ubiquitina de tipo salvaje reveló tres enlaces principales: K48, K63, y K11 (figura 7I, carril 1). Tal como se esperaba, las reacción realizadas con ubiquitina K48R carecen de cadenas de poliubiquitina unida a K48 (figura 7I, carril 9). Ambos anticuerpos anti-poliubiquitina unida a K48 y anti-poliubiquitina unida a K63 inmunoprecipitan especies poliubiquitinadas cuando MuRF1 se modifica con la ubiquitina de tipo salvaje (figura 7H, carriles 3,4), pero cada anticuerpo no pudo hacerlo si el enlace diana para el que es específico no está presente (figura 7H, carriles 7 y 12). Un anticuerpo control con isotipo correspondiente (anti-HER2) no inmunoprecipita MuRF1 ubiquitinado en ninguna de las reacciones (figura 7H, carriles 2, 6, 10). El análisis de ubiquitina AQUA de las especies inmunoprecipitadas de la reacción de Ub de tipo salvaje demuestra la presencia de cadenas unidas a K48, K63 y K11 independientemente del anticuerpo utilizado para el enriquecimiento (figura 7J, carril 3 , y figura 7K, carril 4). Según predice la transferencia Western (figura 7H, carriles 7 y 12), las cadenas unida a K11 fueron inmunoprecipitadas por los anticuerpos anti-poliubiquitina unida a K48 y anti-poliubiquitina unida a K63 sólo si su enlace diana también estaba presente (figuras 7J y 7K). Estos resultados demuestran que los anticuerpos anti-poliubiquitina unida a K48 y anti-poliubiquitina unida a K63 conservan su fidelidad en el contexto de la inmunoprecipitación. Además, indican que otros enlaces inmunoprecipitados de las células por los anticuerpos anti-poliubiquitina unida a K48 y anti-poliubiquitina unida a K63 deben proceder de sustratos individuales que portan enlaces diana y enlaces no diana.

Ejemplo 3: Detección de la vía de ubiquitinación utilizando anticuerpos con maduración de la afinidad

Se ha identificado una serie de vías celulares que son reguladas por la poliubiquitinación de proteínas clave. Los anticuerpos anti-poliubiquitina unida a K63 con maduración de la afinidad de la invención se emplean para determinar el grado de poliubiquitinación unida a K63 de proteínas concretas en la célula, ayudando a aclarar las vías de señalización celular en las que la ubiquitinación con poliubiquitina unida a K63 desempeña un papel.

(A) Activación por TNFα del TNFR1

La activación por TNFα del receptor del factor de necrosis tumoral 1 (TNFR1) conduce a la asociación de RIP y TRAF2 (véase la figura 8A). TRAF2 añade cadenas de poliubiquitina unida a K63 a RIP que permiten el reclutamiento de TAK1/TAB2/TAB3 y la posterior activación de la vía de señalización de NFκB (véase Wertz *et al.*, Nature (2004), 430:694-699). La infrarregulación de las señalización a través de esta vía se produce cuando la desubiquitinasa A20 elimina las cadenas de poliubiquitina unida a K63 sobre RIP y las reemplaza por cadenas de poliubiquitina unida a K48, dirigiendo a RIP hacia el proteasoma para su degradación. Los anticuerpos anti-poliubiquitina unida a K63 con maduración de la afinidad de la invención se emplearon para evaluar el grado y el tipo de poliubiquitinación de RIP durante diversas perturbaciones de la vía.

Brevemente, se trataron células HeLa S3 con MG-132 21 μm durante 10 minutos. Las células después se trataron con TNF 100 ng/ml de 0 a 25 minutos. En cada momento, las células se sedimentaron y se lavaron una vez con PBS. El sedimento lavado se lisó en 20 ml de tampón de inmunoprecipitación de TNFR1 (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 al 1%, y EDTA 1 mM) que incluye inhibidores de proteasas, MG-132 25 μM, N-etilmaleimida 10 mM (NEM), y NaF 50 mM durante 10 minutos a 4 ºC con rotación. Los lisados se centrifugaron a 10.000 x g durante 5 minutos. El lisado aclarado se incubó con 200 μl de esferas de proteína A durante una hora a 4 ºC con rotación. Las esferas y los residuos se sedimentaron mediante centrifugación a 2.000 rpm durante 5 minutos. Se tomaron muestras de cada lisado en cada momento para un análisis de la transferencia Western según se describió

anteriormente. Para las muestras de inmunoprecipitación, se añadieron 20 µl de anticuerpo anti-TNFR1 a cada muestra, y las muestras se agitaron en rotación a 4 ºC durante 2,5 horas. Se añadieron 200 µl de esferas de proteína A no bloqueadas a cada muestra, y las muestras de nuevo se agitaron en rotación a 4 ºC durante 2,5 horas. Las esferas se lavaron dos veces con tampón de inmunoprecipitación, dos veces en tampón de inmunoprecipitación que incluye NaCl 1 M, y dos veces en tampón de inmunoprecipitación. Las proteínas unidas de modo específico a las esferas se recuperaron mediante un tratamiento con un tampón de lisis de cadenas de ubiquitina (Tris-Cl 20 mM, pH 7,5, NaCl 135 mM, $MgCl_2$ 1,5 mM, EGTA 1 mM, Triton X-100 al 1%, y glicerol al 10%) que contenía urea 6 M y se realizó una agitación suave durante 15 min a temperatura ambiente. Las esferas se sedimentaron mediante centrifugación. Los sobrenadantes se diluyeron en 25 veces con tampón de lisis de cadenas de ubiquitina que incluía inhibidores de proteasas, NEM 10 mM, y ditiotreitol 0,5 mM, seguido de un preaclaramiento con 50 µl de esferas de proteína A + herceptina 10 µg durante 2 horas. Los anticuerpos anti-poliubiquitina unida a K48 y los anticuerpos anti-poliubiquitina unida a K63 (mezcla 1:1 de Apu3.A8 y Apu3.B3) se preacoplaron a las esferas de proteína A durante 3 horas a 4 ºC. Las muestras de la reacción de inmunoprecipitación se reunieron con uno de los anticuerpos preacoplados y se agitaron en rotación durante 2 horas a 4 ºC, seguido de un lavado en tampón de lisis y la adición del tampón de muestra. Las muestras se redujeron y se alquilaron, y se ensayaron en geles Novex de 15 pocillos de Tris al 4-12%/Gly de 1,5 mm, seguido de una transferencia, una inmunotransferencia, y un análisis de la transferencia Western según los procedimientos descritos anteriormente en el ejemplo 2.

Una forma simplificada de la vía de modificación de RIP conocida se muestra de modo esquemático en la figura 9B. El tratamiento de células HeLa S3 con TNFα estimula la poliubiquitinación unida a K63 de RIP, que está complejado con TNFR1. Una inmunoprecipitación en dos etapas (la primera inmunoprecipita el complejo de TNFR1, y después se inmunoprecipitan las proteínas polubiquitinadas unidas a K48, o las proteínas polubiquitinadas unidas a K63) permite el análisis del estado de ubiquitinación de RIP tras el tratamiento con TNFα. Tal como se muestra en la figura 9A, la proteína RIP se asocia con rapidez a TNFR1 en los primeros cinco minutos del tratamiento con TNFα, y la cantidad de RIP asociado permanece constante independientemente del tiempo que dura el tratamiento con TNFα después (transferencia 4). El RIP que inicialmente está asociado con TNFR1 está poliubiquitinado unido a K63, pero un tratamiento más largo con TNFα conduce a la edición de la cadena, dando como resultado RIP poliubiquitinado unido a K48 (comparar las transferencias 6 y 7). Así, la capacidad para discriminar entre RIP que porta un marcador de poliubiquitina unida a K63 frente a RIP que porta un marcador de poliubiquitina unida a K48 proporciona información importante acerca de la vía celular activada por TNFα, y los anticuerpos con maduración de la afinidad de la invención proporcionan una herramiento cómoda y útil para estudiar esta vía mediada por RIP sin realizar análisis de espectrometría de masas u otros análisis biofísicos.

(B) Edición de la cadena de poliubiquitina de IRAK1

Puesto que la quinasa RIP1 es modificada secuencialmente por cadenas de poliubiquitina unida a K63 y después unido a K48, siendo esta última conferida por la E3 desubiquitinasa A20, y que A20 también es un regulador negativo conocido de la señalización por ciertos TLR (Boone *et al.*, Nat. Immunol., 5:1052-1060 (2004)), se investigaron otros adaptadores de quinasas reclutados a TLR y el receptor de interleuquina 1 (IL-1R) para la regulación de una manera similar. IRAK1 es un fuerte candidato para sufrir la edición de la cadena de poliubiquitina porque el IRAK modificado tras la traducción se recluta con rapidez hacia complejos de receptores activados y después se degrada (Yamin y Miller, J. Biol. Chem., 272:21540-21547 (1997)). Se trataron células 293 que expresan de forma estable IL-1R y IL1R-AcP con MG-132 25 µM justo antes de la adición de IL-1β 10 ng/ml (eBIoscience). Las células se lavaron con PBS y se lisaron con tampón IRAK IP (HEPES 20 mM, pH 7,6, NaCl 150 mM, $MgCl_2$ 1,5 mM, EGTA 2 mM, NaF 10 mM, DTT 2 mM, y Triton X-100 al 0,5%) que contiene urea 6 M. Los lisados solubles se diluyeron aproximadamente en 20 veces en tampón de lisis y se realizaron inmunoprecipitaciones con el anticuerpo anti-poliubiquitina unida a K48 Apu2.07 o con una mezcla 1:1 de anticuerpo anti-poliubiquitina unida a K63 Apu3.A8 y Apu3.B3 como se describió anteriormente en el ejemplo 3(A) para RIP1. El anticuerpo de IRAK1 se obtuvo en Santa Cruz Biotechnology.

Tras el tratamiento con IL-1β, las células que expresan de modo estable el IL-1R mostraron una mancha de IRAK1 modificado en dos minutos (figura 10A). Las formas de migración más lenta de IRAK1 son más abundante a los 10 minutos y pueden ser convertidas en la forma no modificada de IRAK1 por Usp2 de una manera sensible a NEM. Estos rseutlados sugieren que las formas de mayor peso molecular de IRAK1 son debidas a la ubiquitinación. La aparición de IRAK1 ubiquitinado coincide con la activación de la señalización de NF-κB corriente abajo, según prueba la degradación de IκBα (figura 10B). En diferentes momentos después del tratamiento con IL-1β, se prepararon lisados celulares en urea 6 M y se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-poliubiquitina específicos de enlace antes de la transferencia Western para IRAK1 (figura 10C). Se detectó IRAK1 modificado con cadenas de poliubiquitina unida a K63 a los 5 minutos después del tratamiento con IL-1β y se alcanzó el máximo en 30-60 minutos después del tratamiento, reflejando exactamente el momento de la aparición de la mancha de IRAK1 de alto peso molecular (comparar el panel superior de la figura 10B con el panel inferior de la figura 10C). La cantidad de poliubiquitina unida a K48 evidente en IRAK1 alcanzó el máximo a los 90-150 minutos, tras lo cual la intensidad de la señal de IRAK1 total empezó a disminuir. Cuando las células se trataron con IL-1β en presencia del inhibidor de proteasomas MG-132 se inhibió esta degradación del IRAK1 ubiquitinado (figura 10D), lo cual resulta coherente con que las cadenas de poliubiquitina unida a K48 dirigen a IRAK1 a la degradación proteasómica. Así, la edición las de

cadenas de poliubiquitina de IRAK1 en las células tratadas con IL-1β se parece a la RIP1 en células tratadas con TNF y este proceso de edición de las cadenas de poliubiquitina puede representar un mecanismo general para terminar los acontecimientos de seañilización corriente abajo. Tal como se describió anteriormente para RIP, la capacidad para discriminar entre IRAK1 que porta un marcador de poliubiquitina unida a K63 frente a IRAK1 que porta un marcador de poliubiquitina unida a K48 proporciona información importante acerca de la vía celular activada por IL-1β (véase la figura 8B), y los anticuerpos con maduración de la afinidad de la invención proporcionan una herramienta cómoda y útil para estudiar esta vía mediada por IRAK1 sin realizar análisis de espectrometría de masas u otros análisis biofísicos.

Ejemplo 4: Estructura cristalina de Apu3.A8 complejado con K63dUB

Para comprender las consecuencias estructurales de las mejoras en la afinidad y en la especificidad observadas en Apu3.A8, el fragmento Fab se cristalizó complejado con diubiquitina unida a K63 y la estructura se resolvió hasta una resolución de 2,6 Å (figura 2C). Brevemente, el fragmento Fab de Apu3.A8 se expresó en *E. coli*, se purificó utilizando proteína G-Sepharose, y se eluyó con ácido acético al 0,58%. Las fracciones que contenían Fab se purificaron utilizando una columna SP HiTrap (GE Healthcare) equilibrada en MES 20 mM, pH 5,5, y se eluyó con un gradiente de NaCl. La proteína se purificó aún más haciéndola pasar a través de una columna S-2000 (GE Healthcare) en Tris-Hcl 20 mM, pH 7,3, NaCl 150 mM. La diubiquitina unida a K63 se produjo incubando ubiquitina 4,1 mM (K63R y D77), E1 0,1 μM (Boston Biochem), y E2 20 μM (UbcH13/Uev1a para K63 (Boston Biochem) en Tris-HCl 50 mM, $MgCl_2$ 5 mM, DTT 0,5 mM, ATP 2,5 mM durante la noche a 37 ºC (véase, por ejemplo, Pickart y Raasi, Meth. Enzymol., 399:21-36 (2005)). La diubiquitina se purificó utilizando una columna de intercambio catiónico MonoS en un gradiente de NaCl y MES 20 mM, pH 5,5, y después se concentró hasta 0,5 mg/ml. Se prepararon complejos de diubiquitina Fab a partir de un exceso molar en 3 veces de Fab con diubiquitina. El complejo de proteína se purificó en una columna Superdex 75 en Tris-HCl 20 mM, pH 7,3, NaCl 150 mM. Las fracciones complejas se reunieron y se concentraron hasta 17 mg/l para los ensayos de selección de cristalización. Los cristales de K63R diubiquitina Apu3.A9 (90 μm x 90 μm x 150 μm) crecieron después de dos semanas a 18 ºC en gotas en reposo de mezclas 1:1 de proteína (17 mg/ml en Tris-HCl 20 mM, pH 7,3, NaCl 150 mM) y disolución para pocillos (Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, $LiSO_4$ 1,6 M). Los cristales se crioprotegieron utilizando disolución para pocillos con la adición de glicerol al 30%. Los datos cristalográficos se recogieron a SSRL haz de luz 7-1 (tabla D) y se procesaron con HKL (HKL). La estructura se resolvió mediante sustitución molecular utilizando el programa PHASER (CCP4), seguido de un refinamiento con REFMAC5 (CCP4). El complejo de Apu3.A8 se resolvió utilizando el complejo de Apu2.16 refinado como modelo de búsqueda (véase la figura 2A y la publicación de patente de EEUU nº US2007-0218069) (figuras 2C y 2D). Todas las figuras se realizaron con PyMol (www.pymol.org).

Tabla D: Recogida de datos de rayos X y estadísticas de refinamiento

	Ubq-Apu2.16	Ubq-Apu3.A8
Recogida de datos		
Grupos espaciador	C2	C2
Dimensiones de la célula		
a, b, c (Å)	177, 95, 98	107, 88, 90
β (º)	107	108
Resolución (Å)	50-2,7 (2,80-2,70)	50-2,6 (2,69-2,60)
R_{sim}	5,0 (52,6)	5,1 (58,0)
<I/σI>	15,9 (1,9)	11,6 (1,9)
Finalización (%)	99,2 (100)	98,1 (97,9)
Redundancia	3,8 (3,9)	3,8 (3,9)
Refinamiento		
Resolución (Å)	30-2,7	50-2,6
Complejo en asu	2	1
nº de reflexiones	40.137	21.569
$R_{trabajo}/R_{libre}$ (%)	22,1, 27,3	24,0, 30,1

nº de átomos		
Proteína	8914	4469
Disolvente	0	25
Desviaciones r.m.s		
Longitudes de enlace (Å)	0,009	0,009
Ángulos de enlace (º)	1,2	1,1

* Los valores entre paréntesis son para la envuelta de mayor resolución.

La estructura resultante demuestra que los cambios en L2 y H2, que mejoraron mucho la especificidad, tienen un impacto relativamente pequeño sobre la estructura del Fab (figura 2C). Excluyendo las diferencias en la conformación de CDR-L3 y la hebra C-terminal de la cadena ligera, siendo ambas atribuibles a diferencias en el empaquetamiento del cristal, la estructura del Fab A8 es prácticamente idéntica a la estructura del Fab A16 de origen (rmsd 0,08 Å en 412 átomos C-α). Ambas estructuras se compararon con la región Fv del anticuerpo anti-HER2 humanizado 4D5 (figura 2D). La conformación de L1 y los N-terminales de los tres Fab difieren considerablemente. El átomo C-alfa de T5 está desplazado 14 angstrom entre las estructuras de Apu2.16 o Apu3.A8 y 4D5 humanizado, a pesar de que en estas regiones, las tres estructuras tienen secuencias idénticas. La conformación y la secuencia de L3 también difiere considerablemente. Estas diferencias combinadas afectan a la posición de Q90 en Apu3.A8 de modo que ocupa el espacio que normalmente está ocupado por la hebra N-terminal, dando como resultado el desplazamiento de esta hebra con la redisposición concomitante de L1. La comparación de la estructura de la diubiquitina unida a K63 en la anterior estructura cocristalina con la de la estructura cristalina de la diubiquitina unida a K63 sola (código pdb 2JF5) o con las estructuras cristalinas o en disolución de la diubiquitina unida a K48 (Cook *et al.*, J. Biol. Chem., 267:16467-16471 (1992); Varadan *et al.*, J. Mol. Biol., 324:637-647 (2002)) demuestra que los Fab reconocen una conformación específica de la diubiquitina que es exclusiva del enlace-K63.

De manera sorprendente, ni R52 en L2 ni T52 en H2 está en contacto íntimo con la diubiquitina, y ninguno de estos restos contribuye mucho a la superficie de la unión a ubiquitina sobre Apu3.A8. Más bien, el efecto de estas dos mutaciones parece estar conducido en gran medida por la compatibilidad electrostática mejorada entre la superficie de la ubiquitina aceptora K63 y la cadena ligera (figura 2E). En la cadena ligera de Apu3.A8, R52 (que se introdujo en Apu3.A8) y R66 contribuyen a una región positiva que está en proximidad cercana con una región cargada negativamente sobre la superficie de la ubiquitina, creada en parte por los restos D21, D58 y E18 de la ubiquitina aceptora K63.

Ejemplo 5: Localización de las cadenas de poliubiquitina dentro de las células

Los anteriores experimentos demuestran que los anticuerpos con maduración de la afinidad de la invención son capaces de una detección sensible y específica de proteínas poliubiquitinadas unida a K63 en el contexto de una transferencia Western, y son capaces de inmunoprecipitar de modo específico proteínas poliubiquitinadas unidas a K63 de lisados celulares, y pueden utilizarse para ayudar a aclarar las vías celulares que implican la poliubiquitinación unida a K63 de una o más proteínas. Se realizaron más experimentos para determinar la capacidad de los anticuerpos para ser utilizados en una microscopía de inmunofluorescencia indirecta para la visualización de especies poliubiquitinadas dentro de células y allí donde se localicen dichas proteínas detectadas. Se fijaron células HeLa cultivadas en portaobjetos de cámaras de 2 pocillos con paraformaldehído al 4% en PBS a temperatura ambiente durante 20 minutos, se enjuagaron dos veces con PBS, y se permeabilizaron con PBS que contenía Triton X-100 al 0,1% durante 5 minutos. Después de bloquear en disolución salina equilibrada de Earle suplementada con suero de cabra al 10%, Triton X-100 al 0,1%, y saponina al 0,1% durante una hora, las células se marcaron durante la noche a 4 ºC con Apu2.07 anti-enlace-48 1 μg/ml, Apu3.A8 anti-enlace-63 1 μg/ml, o anticuerpos anti-proteasoma PW8155 5 μg/ml (Biomol International) en disolución de bloqueo. Las células se lavaron tres veces con PBS que contiene Triton X-100 al 0,1% y después se incubaron con 4 gotas de potenciador de la señal Image-IT Fx (Invitrogen) durante 15 minutos. Las células se lavaron tres veces con PBS que contenía Triton X-100 al 0,1%, después se tiñeron durante 1 hora con anticuerpos anti-conejo conjugados con rojo Texas y anticuerpos anti-humano conjugados con Cy2 (Jackson ImmunoResearch) diluidos en disolución de bloqueo. Las células se lavaron tres veces con PBS que contenía Triton X-100 al 0,1%, se enjuagaron dos veces con agua, y después se montaron con ProLong Gold™ que contiene DAPI (Invitrogen) y un cubreobjetos de 1,5 mm. Las células se estudiaron utilizando un microscopio óptico Axioplan 2 (Zeiss) y las imágenes se registraron con una cámara $CoolSNAP_{HQ}$ CCD (Photometrics) controlada mediante el programa informático SlideBook™ (Intelligent Imaging Innovations). Además, se adquirieron imágenes de serie Z y se analizaron mediante microscopía de desconvolución, utilizando el programa informático SlideBook™ o AutoQuant™ (Media Cybernetics) (los datos no se muestran). Para confirmar la localización de la señal, las muestras también se estudiaron con un microscopio confocal de barrido de láser LSM510 META (Zeiss). Todas las imágenes presentadas son micrografías fluorescentes de campo amplio de una única captura.

Los resultados se muestran en la figura 11. El anticuerpo anti-poliubiquitina unida a K48 Apu2.07 tiñe el núcleo y el citoplasma de las células HeLa, pero no tiñe los nucleólos (figura 11A). Este patrón de tinción coincide casi completamente con los proteasomas marcados con un anticuerpo policlonal que reconoce las subunidades 20S centrales (figuras 11B y C), lo cual es coherente con la idea de que las cadenas de poliubiquitina unida a K48 en general dirigen las proteína a la degradación proteasómica. Se detectaron cadenas de poliubiquitina unida a K48, pero no proteasomas, en el cuerpo medio durante la mitosis. Por contraste, en las células HeLa teñidas con el anticuerpo anti- 63 Apu3.A8 se tiñen motas citoplásmicas que varían en número y tamaño entre las células individuales (figura 11D). No se detectó colocalización de las cadenas de poliubiquitina unida a K63 con proteasomas en estas motas (figuras 11E y F). En experimentos control, la tinción por los anticuerpos específicos de enlace puede entrar en competición con las cadenas de poliubiquitina sintetizadas sólo si el enlace diana está presente (los datos no se muestran). Estos resultados indican que las cadenas de poliubiquitina unida a K48 y -K63 pueden aparecer en regiones subcelulares diferenciadas, y que los anticuerpos Apu2.07 y Apu3.A8 son capaces de detectar poliubiquitina unida a K48 o unida a 63 en ensayos de inmunofluorescencia indirectos.

Listado de Secuencias

<110> Genentech, Inc.
Kelley, Robert F.
Matsumoto, Marissa L.

<120> MÉTODOS Y COMPOSICIONES QUE SE DIRIGEN A LA POLIUBIQUITINA.

<130> P4161R1 WO

<150> US 61/011,577
<151> 2008-01-18

<150> US 61/127,862
<151> 2008-05-16

<160> 228

<210> 1
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<220>
<221> Inseguro
<222> 16-21
<223> N está poco aleatorizado

<220>
<221> Inseguro
<222> 16-21,25-30
<223> Base desconocida

<400> 1

ccgaagcttc tgattnnnnn ngcannnnnn ctctactctg gagtc 45

<210> 2
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<220>
<221> Inseguro
<222> 19-21
<223> N está poco aleatorizado

<220>
<221> Inseguro
<222> 19-21,25-27,31-36,40-42
<223> Base desconocida

<220>
<221> Inseguro
<222> 25-27
<223> N está poco aleatorizado

<220>

<221> Inseguro
<222> 31-36
<223> N está poco aleatorizado

<220>
<221> Inseguro
<222> 40-42
<223> N está poco aleatorizado

<400> 2

ggcctggaat gggttgcann nattnnncct nnnnnnggcn nnacttctta 50

tgccgatagc 60

<210> 3
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 3

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ala Val Ala
5 10

<210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 4

Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Ser Ser Leu Phe Thr
5 10

<210> 5
<211> 6
<:212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 5

Val Lys Thr Gly Leu Ile
5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 6

Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile
5

<210> 7
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 7

Tyr Ser Ala Ser Ser Leu Tyr Ser
5

<210> 8
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 8

Tyr Ser Ala Arg Ser Leu Tyr Ser
5

<210> 9
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 9

Tyr Ser Ala Val Ser Leu Tyr Ser
5

<210> 10
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 10

Tyr Ser Ala Ser Ser Leu Tyr Ser
5

<210> 11
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 11

Tyr Ser Ala Arg Ser Leu Tyr Ser
5

<210> 12
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 12

Tyr Ser Ala Arg Ser Leu Tyr Ser
5

<210> 13
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 13

Tyr Ser Ala Arg Ser Leu Tyr Ser
5

<210> 14
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 14

Tyr Ala Ala Ala Ser Leu Tyr Ser
5

<210> 15
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 15

Tyr Ser Ala Val Ser Leu Tyr Ser
5

<210> 16
<211> 8
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 16

Tyr Ser Ala Ala Ser Leu Tyr Ser
5

<210> 17
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 17

Tyr Ser Ala Arg Ser Leu Tyr Ser
5

<210> 18
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 18

Tyr Ala Ala Ala Ser Leu Tyr Ser
5

<210> 19
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 19

Tyr Ser Ala Val Ser Leu Tyr Ser
5

<210> 20
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 20

Tyr Ser Ala Val Ser Leu Tyr Ser
5

<210> 21

<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 21

Tyr Ser Ala Arg Ser Leu Tyr Ser
5

<210> 22
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 22

Tyr Ser Ala Arg Ser Leu Tyr Ser
5

<210> 23
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 23

Tyr Ala Ala Ala Ser Leu Tyr Ser
5

<210> 24
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 24

Tyr Ala Ala Val Ser Leu Tyr Ser
5

<210> 25
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 25

Tyr Ser Ala Thr Ser Leu Tyr Ser
5

<210> 26
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 26

Tyr Ser Ala Asn Ser Leu Tyr Ser
5

<210> 27
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 27

Tyr Ala Ala Ala Ser Leu Tyr Ser
5

<210> 28
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 28

Tyr Ser Ala Val Ser Leu Tyr Ser
5

<210> 29
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 29

Tyr Ser Ala Ser Ser Leu Tyr Ser
5

<210> 30
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 30

Tyr Ser Ala Val Ser Leu Tyr Ser
5

<210> 31
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 31

Tyr Ser Ala Val Ser Leu Tyr Ser
5

<210> 32
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 32

Phe Ala Ala Ala Ser Leu Tyr Ser
5

<210> 33
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 33

Tyr Ser Ala Arg Ser Leu Tyr Ser
5

<210> 34
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 34

Tyr Ser Ala Ser Ser Leu Tyr Ser
5

<210> 35
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> la secuencia está sintetizada

<400> 35

Tyr Ser Ala Ala Ser Leu Tyr Ser
5

<210> 36
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 36

Tyr Ser Ala Ala Ser Leu Tyr Ser
5

<210> 37
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 37

Tyr Ala Ala Arg Ser Leu Tyr Ser
5

<210> 38
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 38

Tyr Ser Ala Val Ser Leu Tyr Ser
5

<210> 39
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 39

Tyr Ala Ala Val Ser Leu Tyr Ser
5

<210> 40
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 40

Tyr Ser Ala Leu Ser Leu Tyr Ser
5

<210> 41
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 41

Tyr Ser Ala Ala Ser Leu Tyr Ser
5

<210> 42
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 42

Tyr Ser Ala Ser Ser Leu Tyr Ser
5

<210> 43
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 43

Tyr Ser Ala Ser Ser Leu Tyr Ser
5

<210> 44
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 44

Tyr Ser Ala Ser Ser Leu Tyr Ser
5

<210> 45
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 45

Tyr Ser Ala Ala Ser Leu Tyr Ser
5

<210> 46
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 46

Tyr Ser Ala Thr Ser Leu Tyr Ser
5

<210> 47
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 47

Tyr Ser Ala Leu Ser Leu Tyr Ser
5

<210> 48
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 48

Tyr Ser Ala Val Ser Leu Tyr Ser
5

<210> 49
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 49

Tyr Ala Ala Ala Ser Leu Tyr Ser
5

<210> 50
<211> 8

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 50

Tyr Ser Ala Ser Ser Leu Tyr Ser
5

<210> 51
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 51

Tyr Ala Ala Ala Ser Leu Tyr Ser
5

<210> 52
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 52

Tyr Ala Ala Ala Ser Leu Tyr Ser
5

<210> 53
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 53

Tyr Ser Ala Ala Ser Leu Tyr Ser
5

<210> 54
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 54

Tyr Ala Ala Ala Ser Leu Tyr Ser
5

<210> 55

<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 55

Tyr Ser Ala Ser Ser Leu Tyr Ser
5

<210> 56
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 56

Tyr Ser Ala Val Ser Leu Tyr Ser
5

<210> 57
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 57

Tyr Ser Ala Val Ser Leu Tyr Ser
5

<210> 58
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 58

Tyr Ser Ala Leu Ser Leu Tyr Ser
5

<210> 59
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 59

Tyr Ile Ser Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 60
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 60

Tyr Ile Thr Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 61
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 61

Tyr Ile Ser Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 62
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 62

Asp Ile Thr Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 63
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 63

Tyr Ile Ala Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 64
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 64

Tyr Ile Thr Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 65
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 65

Tyr Ile Thr Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 66
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 66

Tyr Ile Phe Pro Tyr His Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 67
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 67

Asp Ile Ala Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 68
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 68

Tyr Ile Ala Pro Tyr Tyr Gly Ala Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 69
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 69

Tyr Ile Phe Pro Tyr Phe Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 70
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 70

Tyr Ile Ala Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 71
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 71

Asp Ile Ala Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 72
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 72

Tyr Ile Tyr Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 73
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 73

Tyr Ile Ser Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 74
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 74

Tyr Ile Thr Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 75
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 75

Tyr Ile Thr Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 76
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 76

Tyr Ile Ser Pro Tyr Tyr Gly Trp Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 77
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 77

Asp Ile Ser Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 78
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 78

Tyr Ile Ala Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 79
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 79

Tyr Ile Val Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 80
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 80

Asp Ile Phe Pro Tyr Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 81
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 81

Asp Ile Val Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 82
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 82

Tyr Ile Phe Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 83
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 83

Asp Ile Ser Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 84
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 84

Tyr Ile Ala Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 85
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 85

Tyr Ile Ala Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 86
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 86

Trp Ile Ser Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 87
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 87

Tyr Ile Ala Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 88
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 88

Tyr Ile Thr Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 89
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 89

Asp Ile Thr Pro Tyr Phe Gly Phe Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 90
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 90

Tyr Ile Ser Pro Tyr Leu Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 91
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 91

Tyr Ile Phe Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 92
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 92

Tyr Ile Tyr Pro Tyr Tyr Gly Trp Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 93
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 93

Asp Ile Ser Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 94
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 94

Asp Ile Thr Pro Tyr Tyr Gly Phe Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 95
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 95

Tyr Ile Ala Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 96
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 96

Asp Ile Ser Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 97
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 97

Asp Ile Ser Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 98
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 98

Tyr Ile Thr Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 99
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 99

Tyr Ile Ala Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 100
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 100

Asp Ile Thr Pro Tyr Tyr Gly Phe Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 101
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 101

Asp Ile Thr Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 102
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 102

Asp Ile Thr Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 103
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 103

Asp Ile Thr Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 104
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 104

Tyr Ile Thr Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 105
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 105

Tyr Ile Ser Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 106
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 106

Asp Ile Ser Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 107
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 107

Tyr Ile Thr Pro Tyr Tyr Gly Phe Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 108
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 108

Tyr Ile Thr Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 109
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 109

Asp Ile Thr Pro Tyr Tyr Gly Phe Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 110
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 110

Tyr Ile Ala Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 111
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<220>
<221> Variante

<222> 1
<223> Xaa es Tyr o Phe

<220>
<221> Variante
<222> 2
<223> Xaa es Ala o Ser

<220>
<221> Variante
<222> 4
<223> Xaa es Ser, Arg, Val, Thr, Ala, Asn, o Leu

<400> 111

Xaa Xaa Ala Xaa Ser Leu Tyr Ser
5

<210> 112
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<220>
<221> Variante
<222> 1
<223> Xaa es Tyr, Asp, o Trp

<220>
<221> Variante
<222> 3
<223> Xaa es Ser, Thr, Ala, Phe, Tyr o Val

<220>
<221> Variante
<222> 6
<223> Xaa es Tyr, Phe, Leu o His

<220>
<221> Variante
<222> 8
<223> Xaa es Ser, Gly, Ala, Phe, o Trp

<400> 112

Xaa Ile Xaa Pro Tyr Xaa Gly Xaa Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 113
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 113

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

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

<210> 114
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 114

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
5 10

<210> 115
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 115

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met
1 5 10 15

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

Ala Arg

<210> 116
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 116

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
5 10

<210> 117
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 117

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

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
20 25

<210> 118
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 118

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
5 10

<210> 119
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 119

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met
1 5 10 15

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

Ala Arg

<210> 120
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 120

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
5 10

<210> 121
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 121

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

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
20 25

<210> 122
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 122

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
5 10

<210> 123
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 123

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met
1 5 10 15

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

Ala

<210> 124
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 124

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
5 10

<210> 125
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 125

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

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
20 25

<210> 126
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 126

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
5 10

<210> 127
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 127

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met
1 5 10 15

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

<210> 128
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 128

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
5 10

<210> 129
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 129

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

Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser
20 25 30

<210> 130
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 130

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
5 10

<210> 131
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 131

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
1 5 10 15

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

Ala Arg

<210> 132
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 132

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
5 10

<210> 133
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 133

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

Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
20 25

<210> 134
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 134

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
5 10

<210> 135
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 135

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
1 5 10 15

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

Ala Arg

<210> 136
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 136

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
5 10

<210> 137
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 137

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

Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
20 25

<210> 138
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 138

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
5 10

<210> 139
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 139

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
1 5 10 15

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

Ala

<210> 140
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 140

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
5 10

<210> 141
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 141

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

Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
            20                  25
```

<210> 142
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 142

```
Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
                    5                  10
```

<210> 143
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 143

```
Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
  1               5                  10                  15

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

<210> 144
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 144

```
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
                    5                  10
```

<210> 145
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 145

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

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

<210> 146
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 146

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
5 10

<210> 147
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 147

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ala Arg

<210> 148
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 148

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
5 10

<210> 149
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 149

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 150
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 150

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
5 10

<210> 151
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 151

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu

1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ala Arg

<210> 152
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 152

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
5 10

<210> 153
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 153

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 154
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 154

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
5 10

<210> 155
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 155

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ala

<210> 156
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 156

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
5 10

<210> 157
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 157

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 158
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 158

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
5 10

<210> 159
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 159

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 160
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 160

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
5 10

<210> 161
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 161

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
20 25 30

<210> 162
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 162

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
5 10

<210> 163
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 163

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ser Arg

<210> 164
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 164

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
5 10

<210> 165
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 165

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 166
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 166

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
5 10

<210> 167
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 167

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ser Arg

<210> 168
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 168

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
5 10

<210> 169
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 169

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 170
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 170

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
5 10

<210> 171
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 171

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ser

<210> 172
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 172

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
5 10

<210> 173
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 173

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
20 25 30

<210> 174
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 174

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
5 10

<210> 175
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 175

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ala Arg

<210> 176
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 176

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
5 10

<210> 177
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 177

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 178
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 178

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
5 10

<210> 179
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 179

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ala Arg

<210> 180
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 180

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
5 10

<210> 181
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 181

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 182
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 182

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
5 10

<210> 183
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 183

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ala

<210> 184
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 184

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
5 10

<210> 185
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 185

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 186
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 186

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
5 10

<210> 187
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 187

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 188
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 188

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
5 10

<210> 189
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 189

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

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 190
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 190
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 191
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 191

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
1 5 10 15

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
20 25 30

Tyr Cys

<210> 192
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 192

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
5 10

<210> 193
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 193

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

Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys
20

<210> 194
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 194

Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 195
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 195

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
1 5 10 15

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

Tyr Cys

<210> 196
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 196

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
5 10

<210> 197
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 197

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

Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
20

<210> 198
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 198

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 199
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 199

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
1 5 10 15

Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr
20 25 30

Tyr Cys

<210> 200
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 200

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
5 10

<210> 201
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 201

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

Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
20

<210> 202
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 202

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 203
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 203

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
1 5 10 15

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr
20 25 30

Tyr Cys

<210> 204
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 204

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
5 10

<210> 205
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 205

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

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 206
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 206

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 207
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 207

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe
1 5 10 15

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
20 25 30

Tyr Cys

<210> 208
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 208

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
5 10

<210> 209
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 209

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 210
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 210

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
5 10

<210> 211
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 211

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 212
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 212

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
5 10

<210> 213
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 213

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

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 214
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 214

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 215
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 215

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
1 5 10 15

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
20 25 30

Tyr Cys

<210> 216
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 216

Phe Arg Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
5 10

<210> 217
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 217

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 218
<211> 13

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 218

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
5 10

<210> 219
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 219

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 220
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 220

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
5 10

<210> 221
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<220>
<221> Variante
<222> 1
<223> Xaa es Tyr, Asp, o Trp

<220>
<221> Variante
<222> 3
<223> Xaa es Ser, Thr, Ala, Phe, Tyr, o Val

<220>
<221> Variante
<222> 6
<223> Xaa es Tyr, Phe, Leu, o His

<220>
<221> Variante
<222> 8
<223> Xaa es Ser, Gly, Ala, Phe, o Trp

<400> 221

Xaa Ile Xaa Pro Tyr Xaa Gly Xaa Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys

<210> 222
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<220>
<221> Variante
<222> 1
<223> Xaa es Tyr o Phe

<220>
<221> Variante
<222> 2
<223> Xaa es Ala o Ser

<220>
<221> Variante
<222> 4
<223> Xaa es Ser, Arg, Val, Thr, Ala, Asn, o Leu

<400> 222

Xaa Xaa Ala Xaa Ser Leu Tyr Ser
5

<210> 223
<211> 76
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 223

```
Met Gln Ile Phe Val Lys Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu
  1               5                  10                  15

Glu Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile
                20                  25                  30

Gln Asp Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Phe
                35                  40                  45

Ala Gly Lys Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn
                50                  55                  60

Ile Gln Lys Glu Ser Thr Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly
                65                  70                  75

Gly
```

<210> 224
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 224

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

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

Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
                35                  40                  45

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
                50                  55                  60

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
                80                  85                  90

His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
                95                 100                 105

Ile Lys
```

<210> 225
<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 225

```
Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
  1               5                  10                  15

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

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

Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Ser Leu Tyr Ser Gly Val Pro
                50                  55                  60

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
                65                  70                  75

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
                80                  85                  90

Gln Tyr Ser Ser Tyr Ser Ser Leu Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr
                95                 100                 105

Lys Val Glu Ile Lys
               110
```

<210> 226
<211> 123
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 226

```
Glu Ile Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
  1               5                  10                  15

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
                20                  25                  30

Asn Val Lys Thr Gly Leu Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
                35                  40                  45

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Pro Tyr Tyr Gly Ser
                50                  55                  60

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

Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
                80                  85                  90

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Tyr Tyr Arg
                95                 100                 105


Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
               110                 115                 120

Val Ser Ser
```

<210> 227

<211> 123
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 227

```
Glu Ile Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
  1               5                  10                  15

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
                20                  25                  30

Asn Val Lys Thr Gly Leu Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
                35                  40                  45

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Thr Pro Tyr Tyr Gly Ser
                50                  55                  60

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

Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
                80                  85                  90

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Tyr Tyr Arg
                95                 100                 105

Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
               110                 115                 120

Val Ser Ser
```

<210> 228
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> la secuencia está sintetizada

<400> 228

```
  Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
    1               5                  10                  15

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

  Thr Gly Leu Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
                  35                  40                  45

  Glu Trp Val Ala Tyr Ile Thr Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr
```

```
                50                  55                  60

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

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
                80                  85                  90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr
                95                  100                 105

Ala Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
                110                 115                 120
```

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo aislado, o su fragmento de unión al antígeno, que se une de modo específico a la poliubiquitina unida a K63, en el que el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno, no se unen de modo específico a la poliubiquitina unida a K48 y no se unen de modo específico a monoubiquitina, y en el que la K_D del anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno para la poliubiquitina unida a K63 is menor o igual a 10 nM, medida mediante resonancia de plasmón de superficie BIAcore, teniendo el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, un sitio de unión al antígeno definido por un dominio VH y un dominio VL, en el que el dominio VH tiene cuatro regiones estructurales y tres regiones hipervariables, HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, y el dominio VL tiene cuatro regiones estructurales y tres regiones hipervariables, HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3,

teniendo el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno, la secuencia de HVR-H1 de SEQ ID NO:5, la secuencia de HVR-H2 de SEQ ID NO:60, la secuencia de HVR-H3 de SEQ ID NO:6, la secuencia de HVR-L1 de SEQ ID NO:3, la secuencia de HVR-L2 de SEQ ID NO:8, y la secuencia de HVR-L3 de SEQ ID NO:4; o

teniendo el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno, la secuencia de HVR-H1 de SEQ ID NO:5, la secuencia de HVR-H2 de SEQ ID NO:63, la secuencia de HVR-H3 de SEQ ID NO:6, la secuencia de HVR-L1 de SEQ ID NO:3, la secuencia de HVR-L2 de SEQ ID NO:11, y la secuencia de HVR-L3 de SEQ ID NO:4; o

teniendo el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno, la secuencia de HVR-H1 de SEQ ID NO:5, la secuencia de HVR-H2 de SEQ ID NO:66, la secuencia de HVR-H3 de SEQ ID NO:6, la secuencia de HVR-L1 de SEQ ID NO:3, la secuencia de HVR-L2 de SEQ ID NO:14, y la secuencia de HVR-L3 de SEQ ID NO:4.

2. Anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno, según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno, inhiben la degradación de una proteína poliubiquitinada unida a K63.

3. Anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno, según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno, modulan, inhiben o estimulan al menos una vía de señalización mediada por la poliubiquitina.

4. Molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno, según la reivindicación 1.

5. Vector que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 4.

6. Célula hospedante que comprende el vector según la reivindicación 5.

7. Línea celular capaz de producir el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno, según la reivindicación 1.

8. Método para producir el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno, según la reivindicación 1, que comprende cultivar una célula hospedante que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno, bajo condiciones en las que se producen el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno.

9. Composición que comprende una cantidad eficaz del anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno, según la reivindicación 1, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10. Método para identificar la presencia de una poliubiquitina unida a K63 o de una proteína poliubiquitinada unida a K63 en una muestra, que comprende poner en contacto la muestra con al menos un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno, según la reivindicación 1.

11. Método para determinar la presencia de una poliubiquitina unida a K63 o de una proteína poliubiquitinada unida a K63 en una muestra sospechosa de contener una poliubiquitina unida a K63 o una proteína poliubiquitinada unida a K63, que comprende exponer la muestra al menos a un anticuerpo o a un fragmento de unión al antígeno, según la reivindicación 1, y determinar la unión de dicho al menos un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno, a una poliubiquitina unida a K63 o a una proteína poliubiquitinada unida a K63 en la muestra.

12. Método para separar una proteína poliubiquitinada unida a K63 de una proteína poliubiquitinada no unida a K63 en una muestra, que comprende poner en contacto la muestra con al menos un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno, según la reivindicación 1.

13. Método para determinar la función y/o la actividad de una poliubiquitina unida a K63 en una muestra, que comprende poner en contacto la muestra con al menos un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno, según la reivindicación 1, y evaluar el efecto de dicha etapa de contacto sobre la muestra.

1 MET GLN ILE PHE VAL **LYS** THR LEU THR GLY **LYS** THR ILE THR

15 LEU GLU VAL GLU PRO SER ASP THR ILE GLU ASN VAL **LYS** ALA

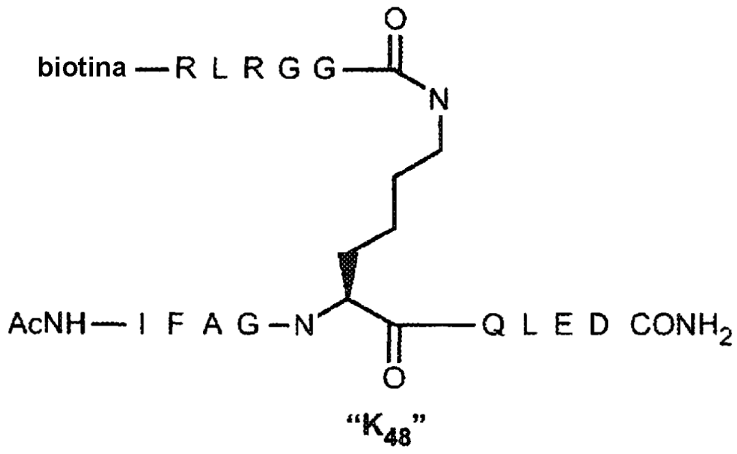
29 **LYS** ILE GLN ASP **LYS** GLU GLY ILE PRO PRO ASP GLN GLN ARG

43 LEU ILE PHE ALA GLY **LYS** GLN LEU GLU ASP GLY ARG THR LEU

57 SER ASP TYR ASN ILE GLN **LYS** GLU SER THR LEU HIS LEU VAL

71 LEU ARG LEU ARG GLY GLY

FIG. 1A



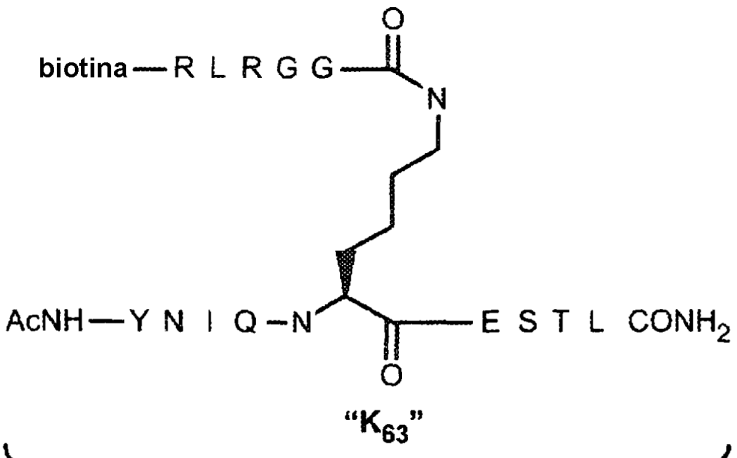


FIG. 1B

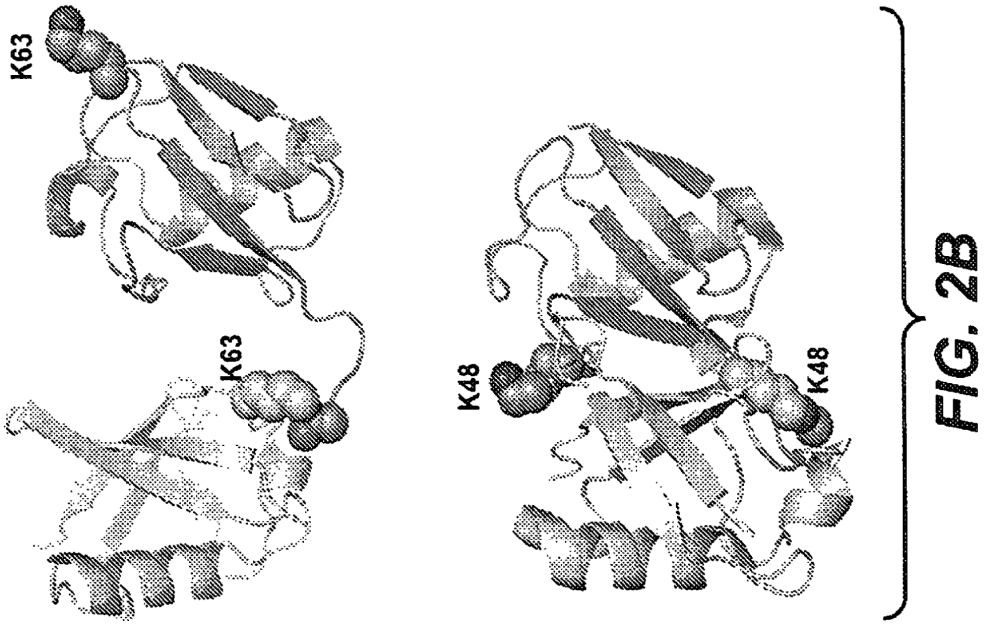

K63
K63
K48
K48

FIG. 2B

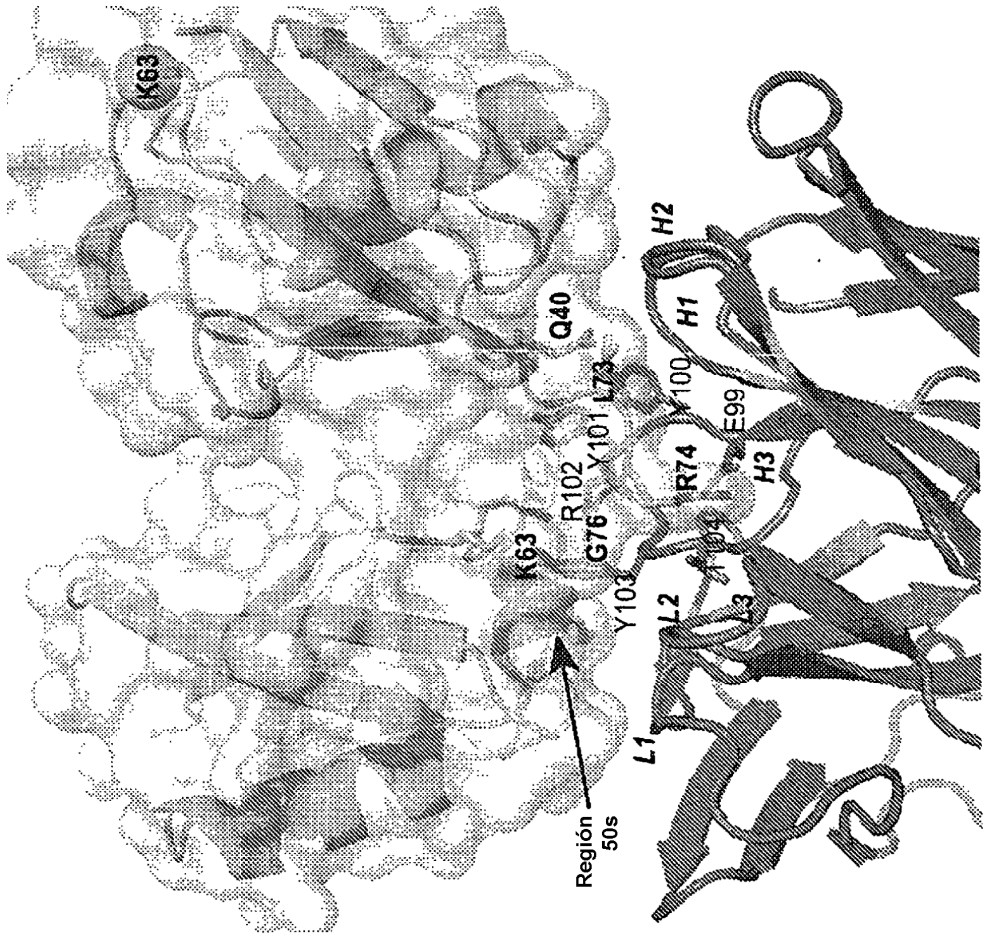

K63
Q40
L3
Y100
H2
H1
E99
H3
R74
R102
Y101
G76
K63
Y103
L2
Y104
L3
L1
Región 50s

FIG. 2A

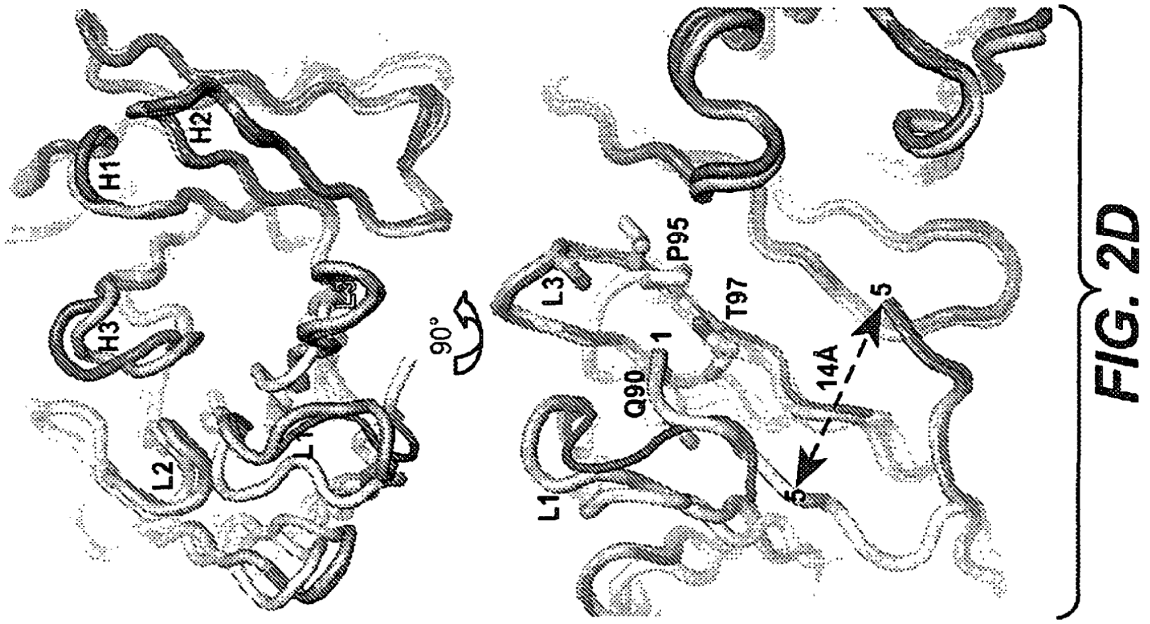


FIG. 2D

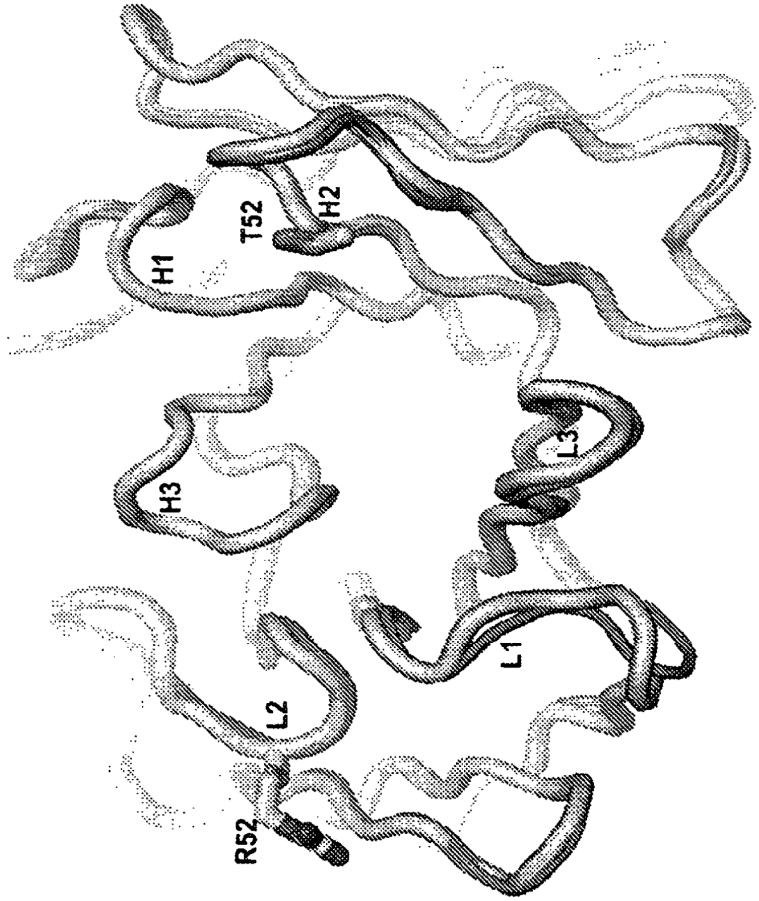


FIG. 2C

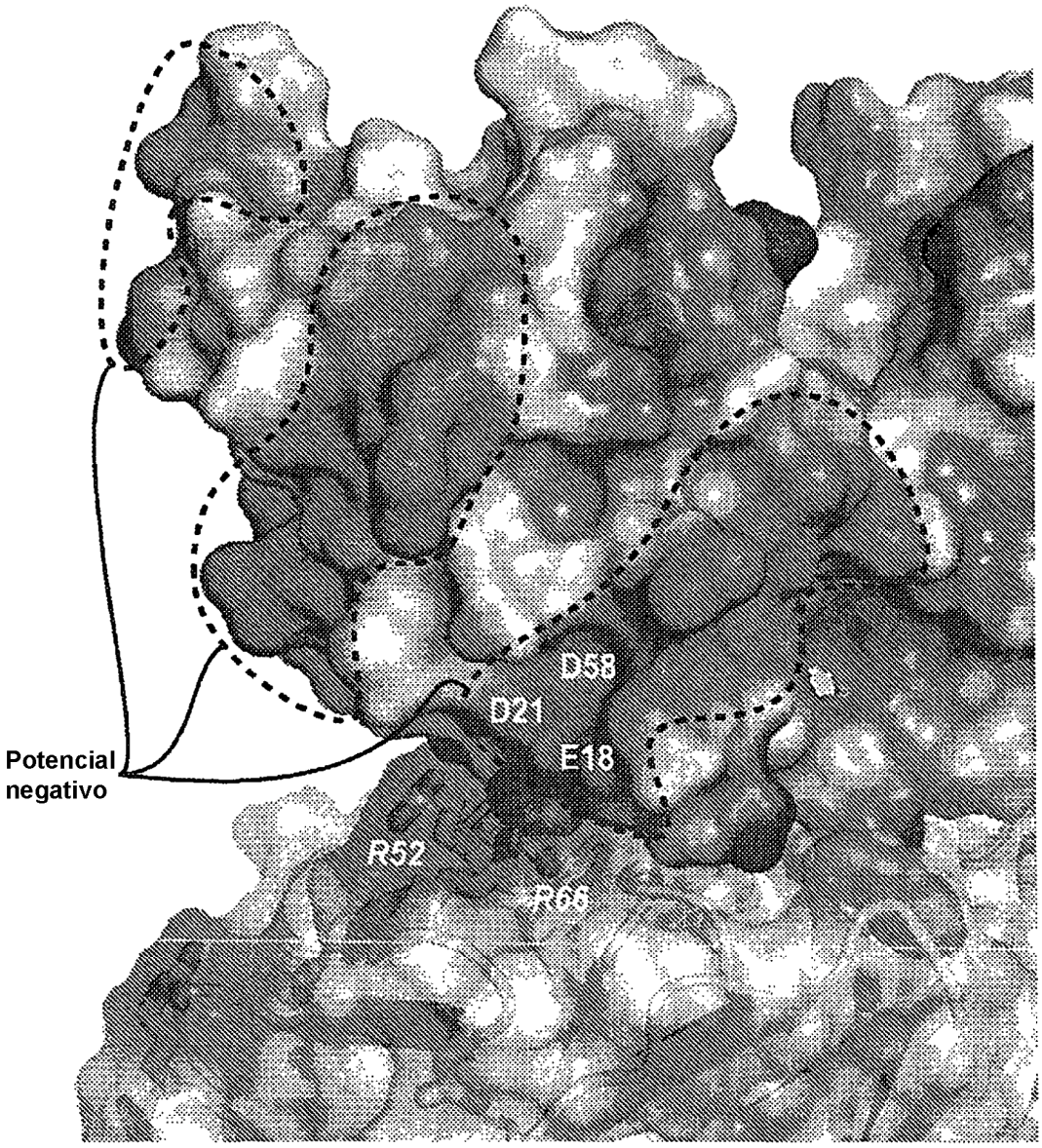


FIG. 2E

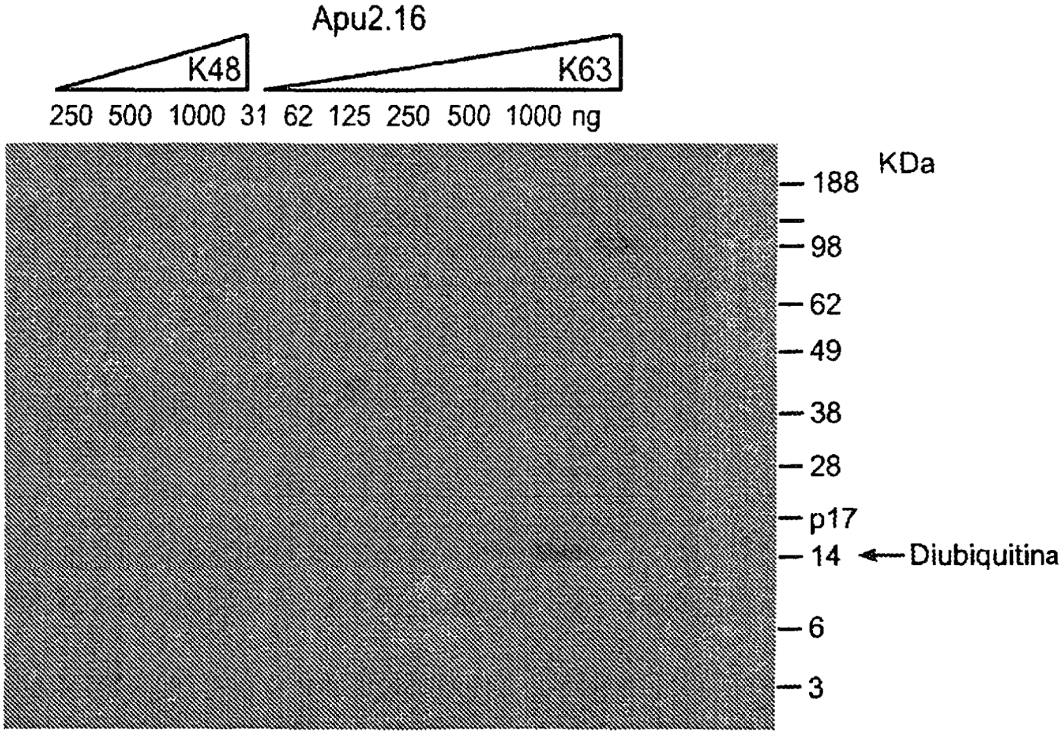

Apu2.16
K48
K63
250 500 1000 31 62 125 250 500 1000 ng
KDa
188
98
62
49
38
28
p17
14
Diubiquitina
6
3

FIG. 3A

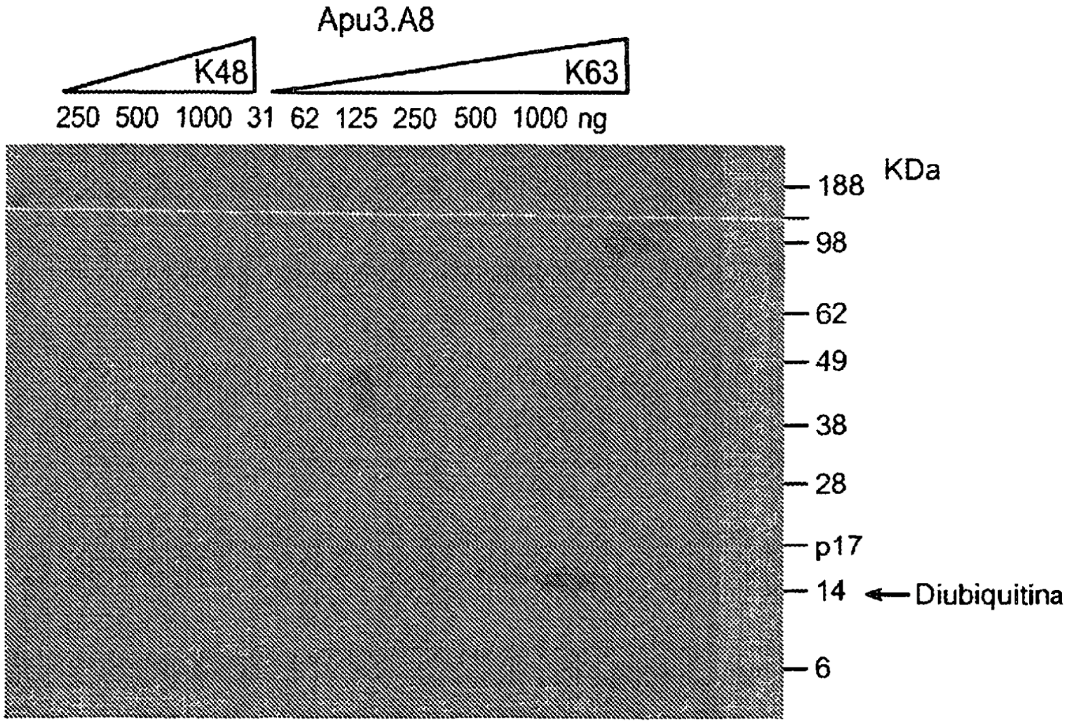

Apu3.A8
K48
K63
250 500 1000 31 62 125 250 500 1000 ng
KDa
188
98
62
49
38
28
p17
14
Diubiquitina
6

FIG. 3B

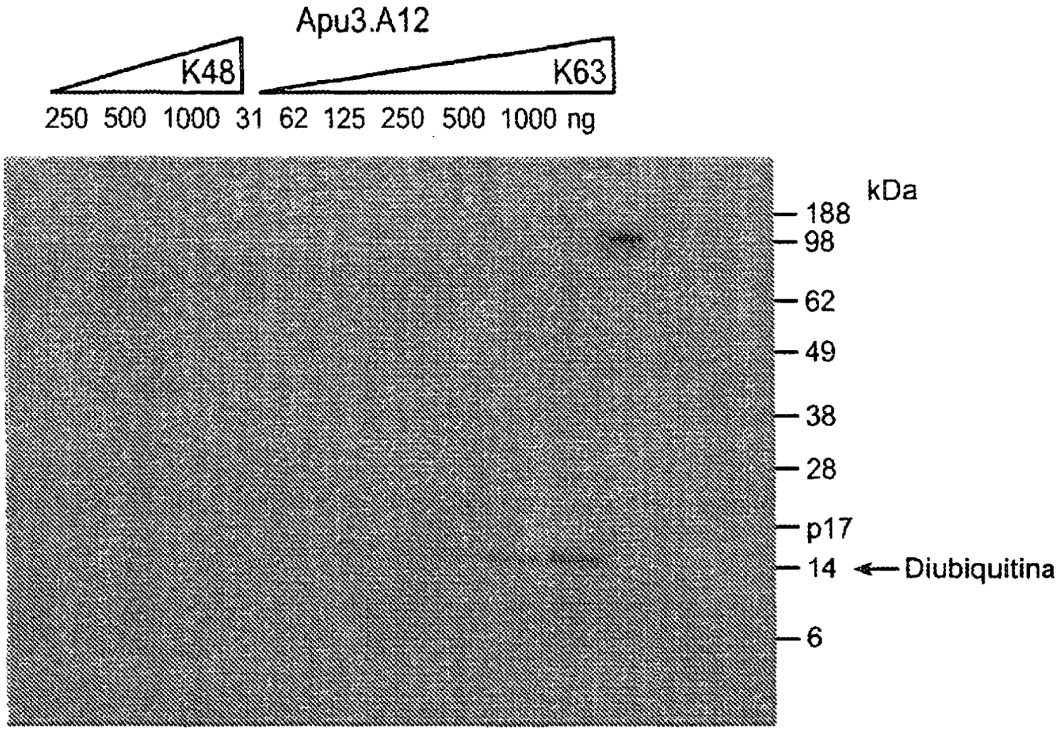

Apu3.A12
K48
K63
250 500 1000 31 62 125 250 500 1000 ng
kDa
188
98
62
49
38
28
p17
14
Diubiquitina
6

FIG. 3C

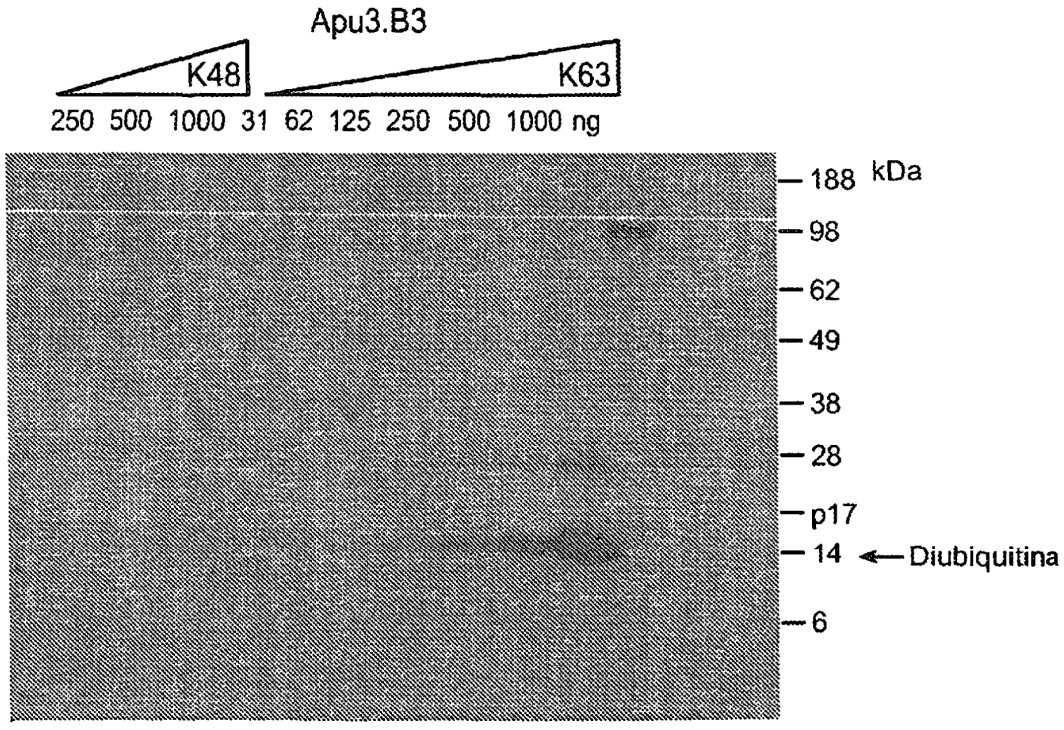

Apu3.B3
K48
K63
250 500 1000 31 62 125 250 500 1000 ng
kDa
188
98
62
49
38
28
p17
14
Diubiquitina
6

FIG. 3D

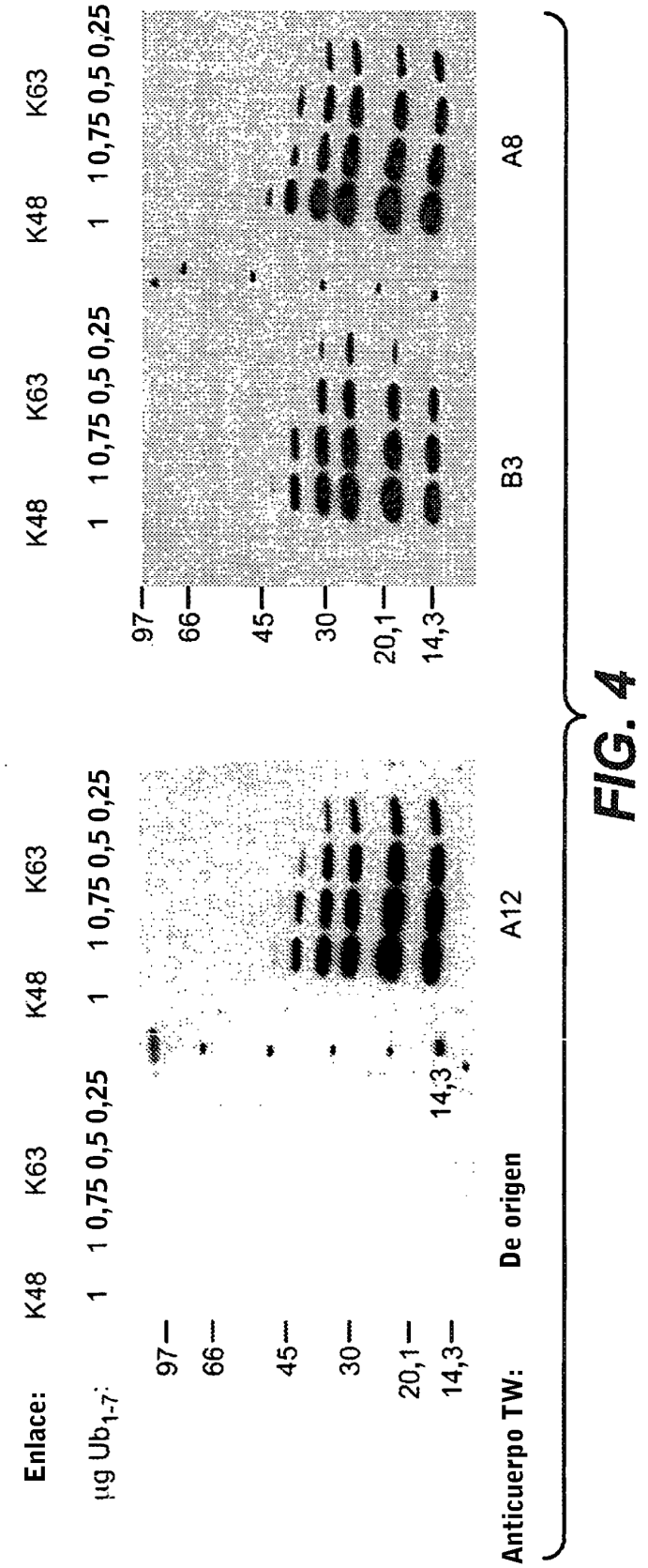

Enlace:
K48
K63
K48
K63
µg Ub1-7:
1
1
0,75
0,5
0,25
1
1
0,75
0,5
0,25
97
66
45
30
20,1
14,3
Anticuerpo TW:
De origen
A12
B3
A8

FIG. 4

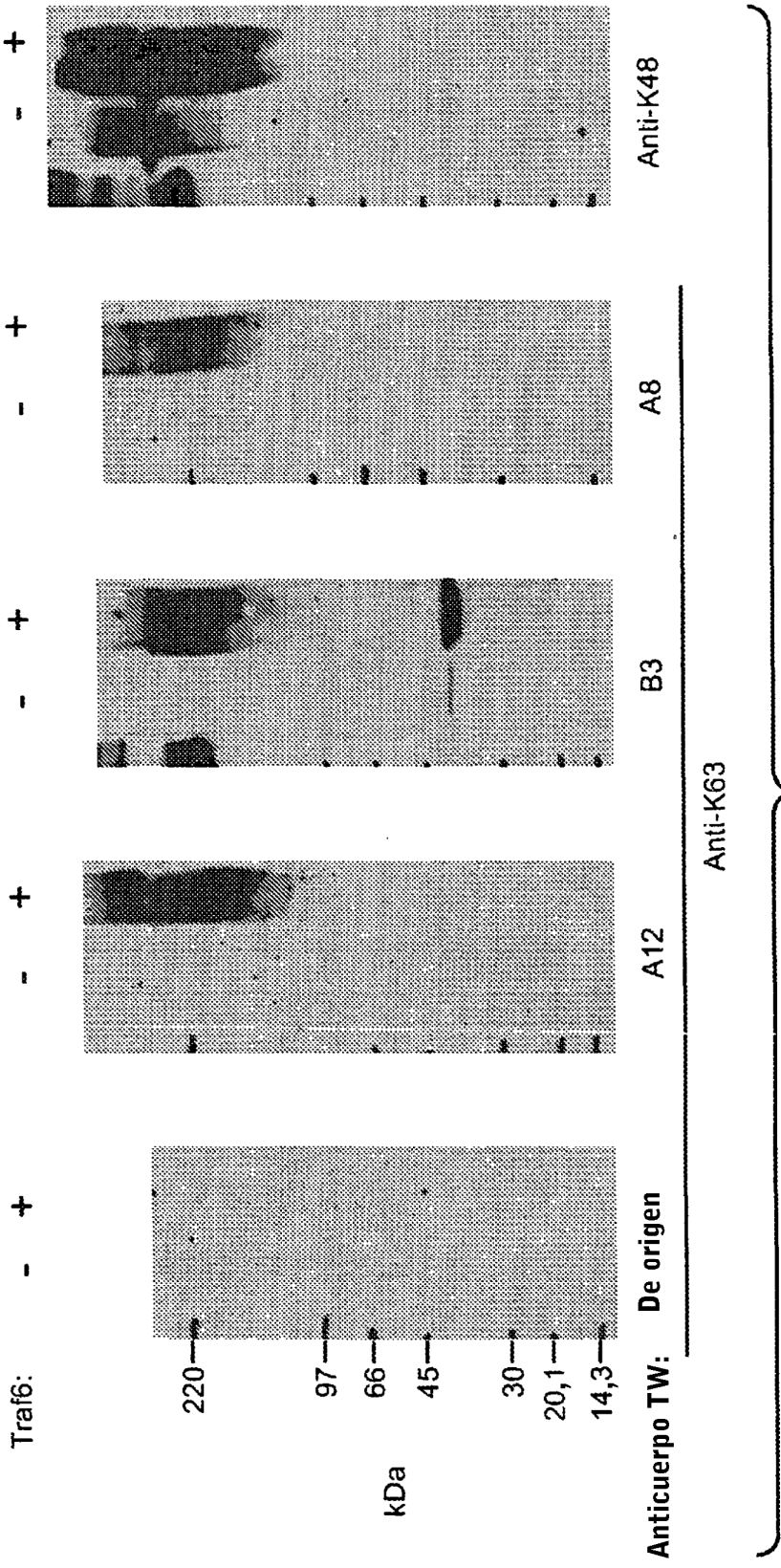

Traf6:
- + - + - + - +
220
97
66
45
30
20,1
14,3
kDa
Anticuerpo TW:
De origen
A12
B3
A8
Anti-K63
Anti-K48

FIG. 5

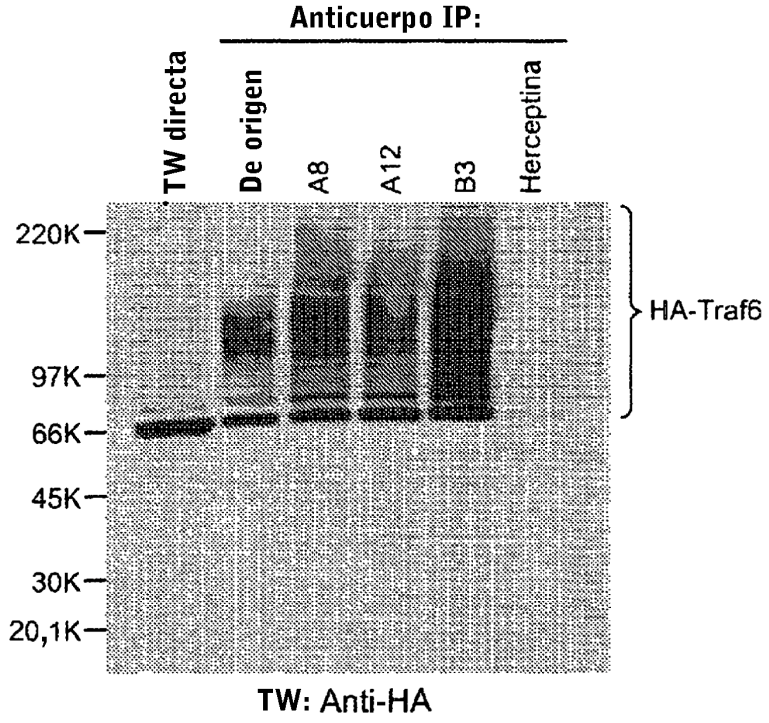

Anticuerpo IP:
TW directa
De origen
A8
A12
B3
Herceptina
220K
97K
66K
45K
30K
20,1K
HA-Traf6
TW: Anti-HA

FIG. 6A

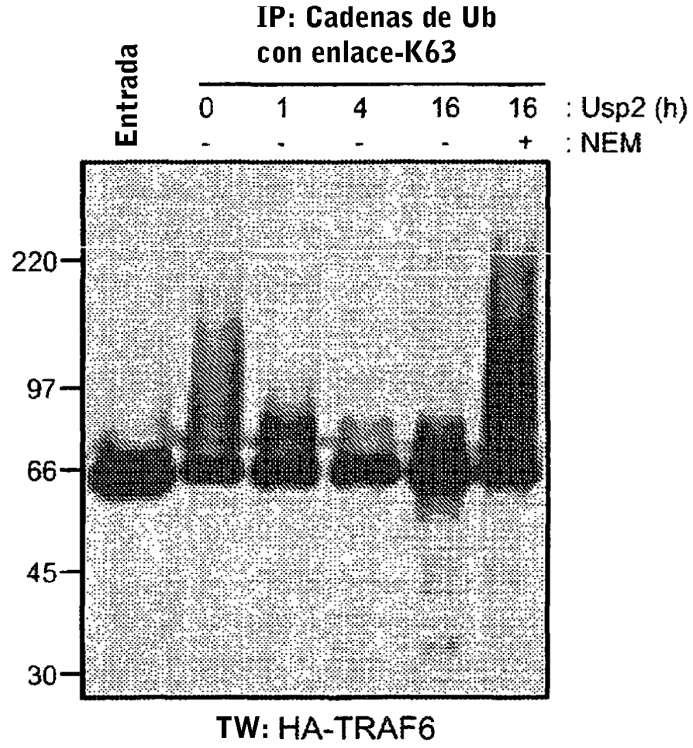

IP: Cadenas de Ub
con enlace-K63
Entrada
0
1
4
16
16
: Usp2 (h)
-
-
-
-
+
: NEM
220
97
66
45
30
TW: HA-TRAF6

FIG. 6B

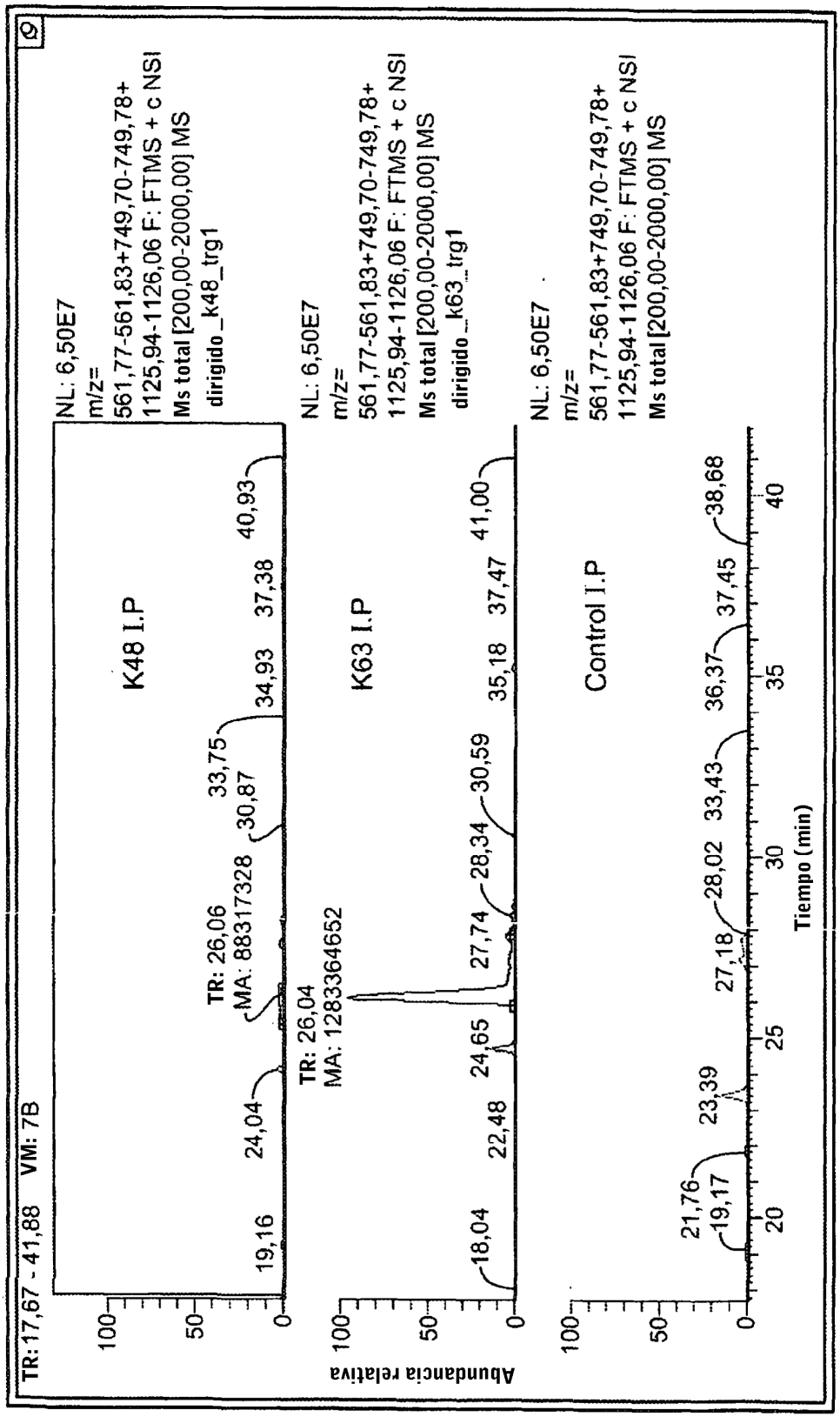

TR: 17,67 - 41,88 VM: 7B
NL: 6,50E7
m/z=
561,77-561,83+749,70-749,78+
1125,94-1126,06 F: FTMS + c NSI
Ms total [200,00-2000,00] MS
dirigido_k48_trg1
K48 I.P
TR: 26,06
MA: 88317328
NL: 6,50E7
m/z=
561,77-561,83+749,70-749,78+
1125,94-1126,06 F: FTMS + c NSI
Ms total [200,00-2000,00] MS
dirigido_k63_trg1
K63 I.P
TR: 26,04
MA: 1283364652
NL: 6,50E7
m/z=
561,77-561,83+749,70-749,78+
1125,94-1126,06 F: FTMS + c NSI
Ms total [200,00-2000,00] MS
Control I.P
Abundancia relativa
Tiempo (min)
19,16
24,04
30,87
33,75
34,93
37,38
40,93
18,04
22,48
24,65
27,74
28,34
30,59
35,18
37,47
41,00
19,17
21,76
23,39
27,18
28,02
33,43
36,37
37,45
38,68

FIG. 7A

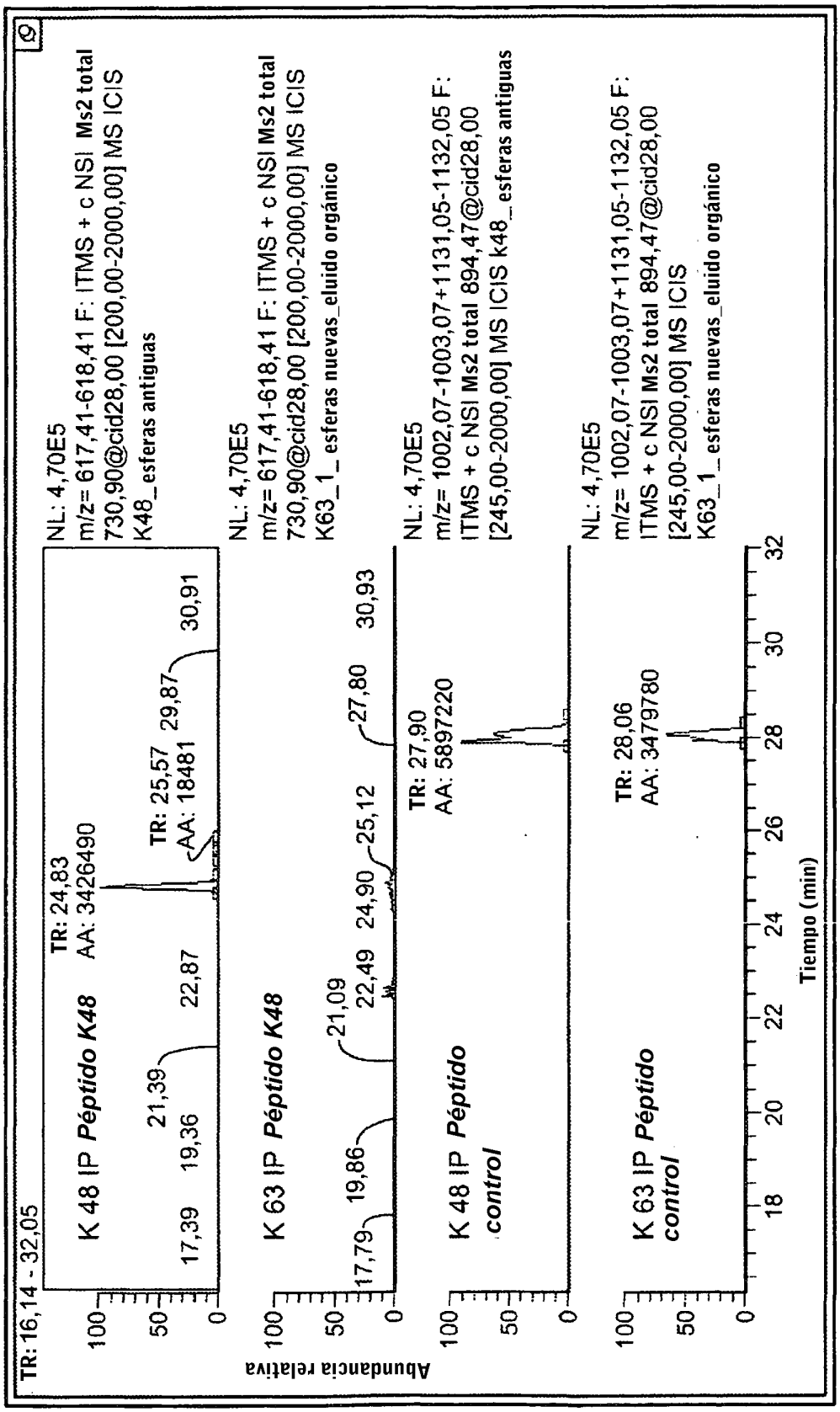

TR: 16,14 - 32,05
K 48 IP Péptido K48
TR: 24,83
AA: 3426490
TR: 25,57
AA: 18481
17,39
19,36
21,39
22,87
29,87
30,91
NL: 4,70E5
m/z= 617,41-618,41 F: ITMS + c NSI Ms2 total 730,90@cid28,00 [200,00-2000,00] MS ICIS K48_esferas antiguas
K 63 IP Péptido K48
17,79
19,86
21,09
22,49
24,90
25,12
27,80
30,93
NL: 4,70E5
m/z= 617,41-618,41 F: ITMS + c NSI Ms2 total 730,90@cid28,00 [200,00-2000,00] MS ICIS K63_1_esferas nuevas_eluido orgánico
K 48 IP Péptido control
TR: 27,90
AA: 5897220
NL: 4,70E5
m/z= 1002,07-1003,07+1131,05-1132,05 F: ITMS + c NSI Ms2 total 894,47@cid28,00 [245,00-2000,00] MS ICIS k48_esferas antiguas
K 63 IP Péptido control
TR: 28,06
AA: 3479780
NL: 4,70E5
m/z= 1002,07-1003,07+1131,05-1132,05 F: ITMS + c NSI Ms2 total 894,47@cid28,00 [245,00-2000,00] MS ICIS K63_1_esferas nuevas_eluido orgánico
Abundancia relativa
Tiempo (min)

FIG. 7B

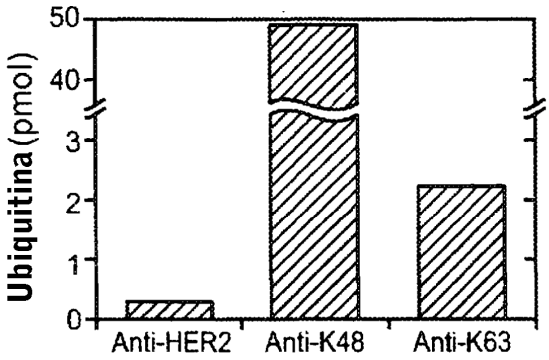


FIG. 7C

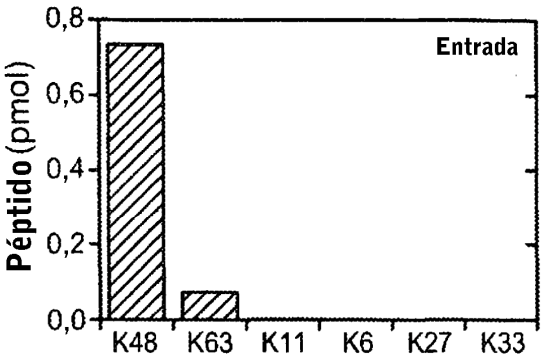


FIG. 7D

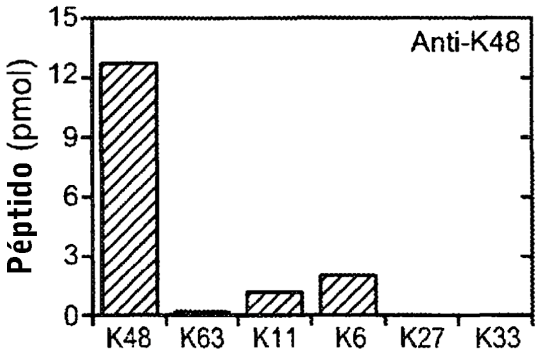


FIG. 7E

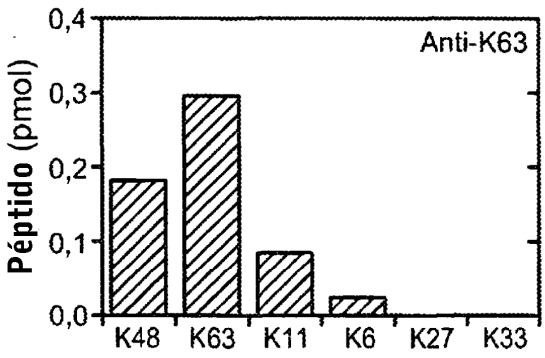


FIG. 7F

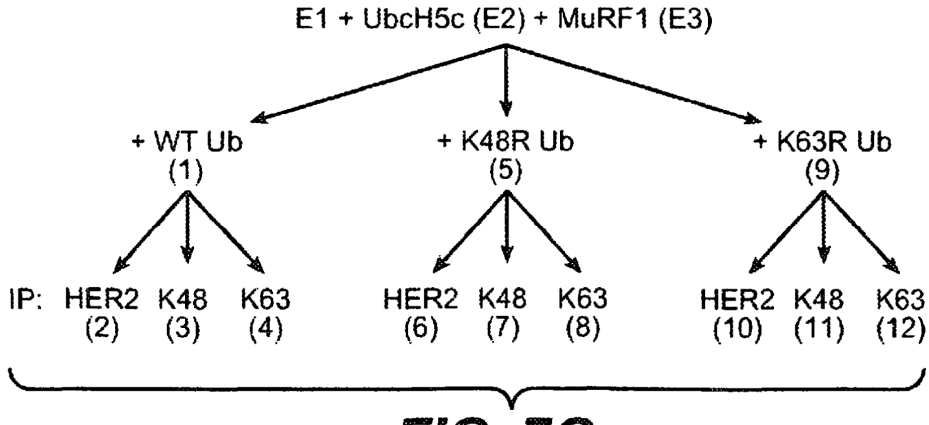


FIG. 7G

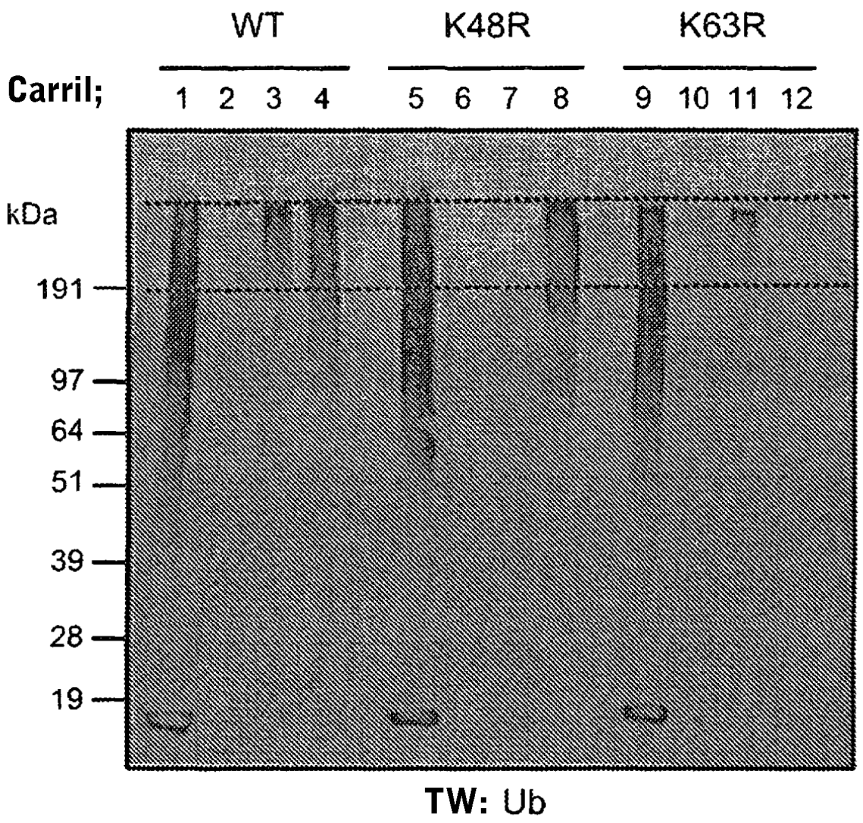

WT
K48R
K63R
Carril;
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
kDa
191
97
64
51
39
28
19
TW: Ub

FIG. 7H

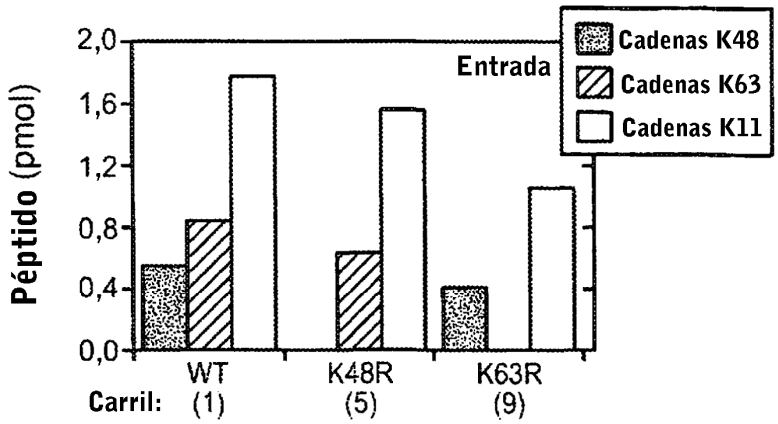


FIG. 7I

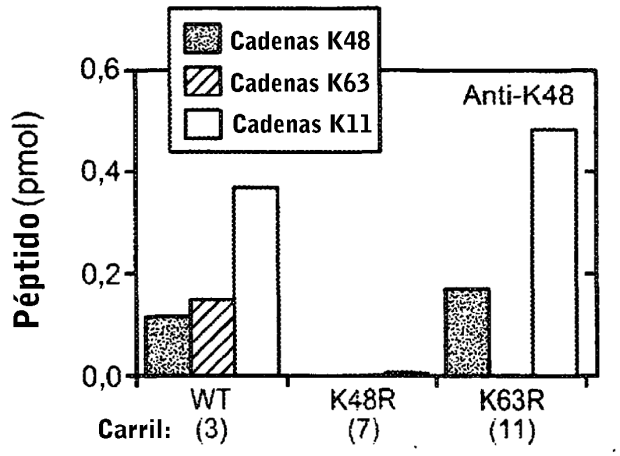


FIG. 7J

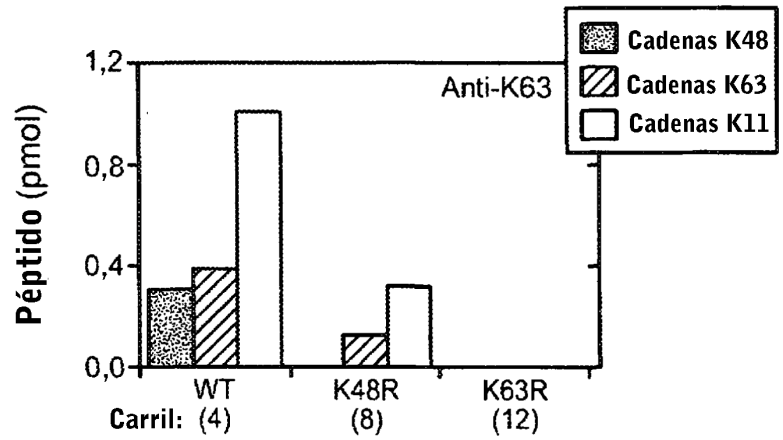


FIG. 7K

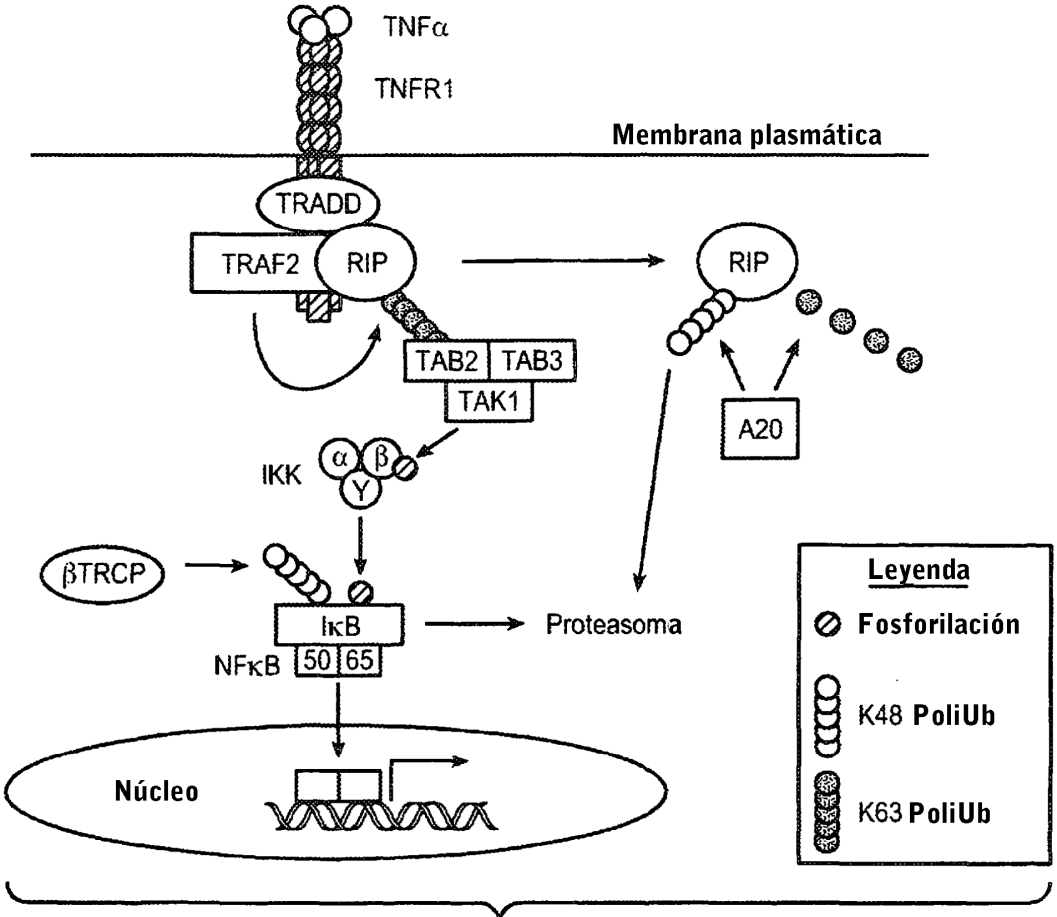

TNFα
TNFR1
Membrana plasmática
TRADD
TRAF2
RIP
TAB2
TAB3
TAK1
IKK
α
β
γ
βTRCP
IκB
NFκB
50
65
Proteasoma
RIP
A20
Núcleo
Leyenda
Fosforilación
K48 PoliUb
K63 PoliUb

FIG. 8A

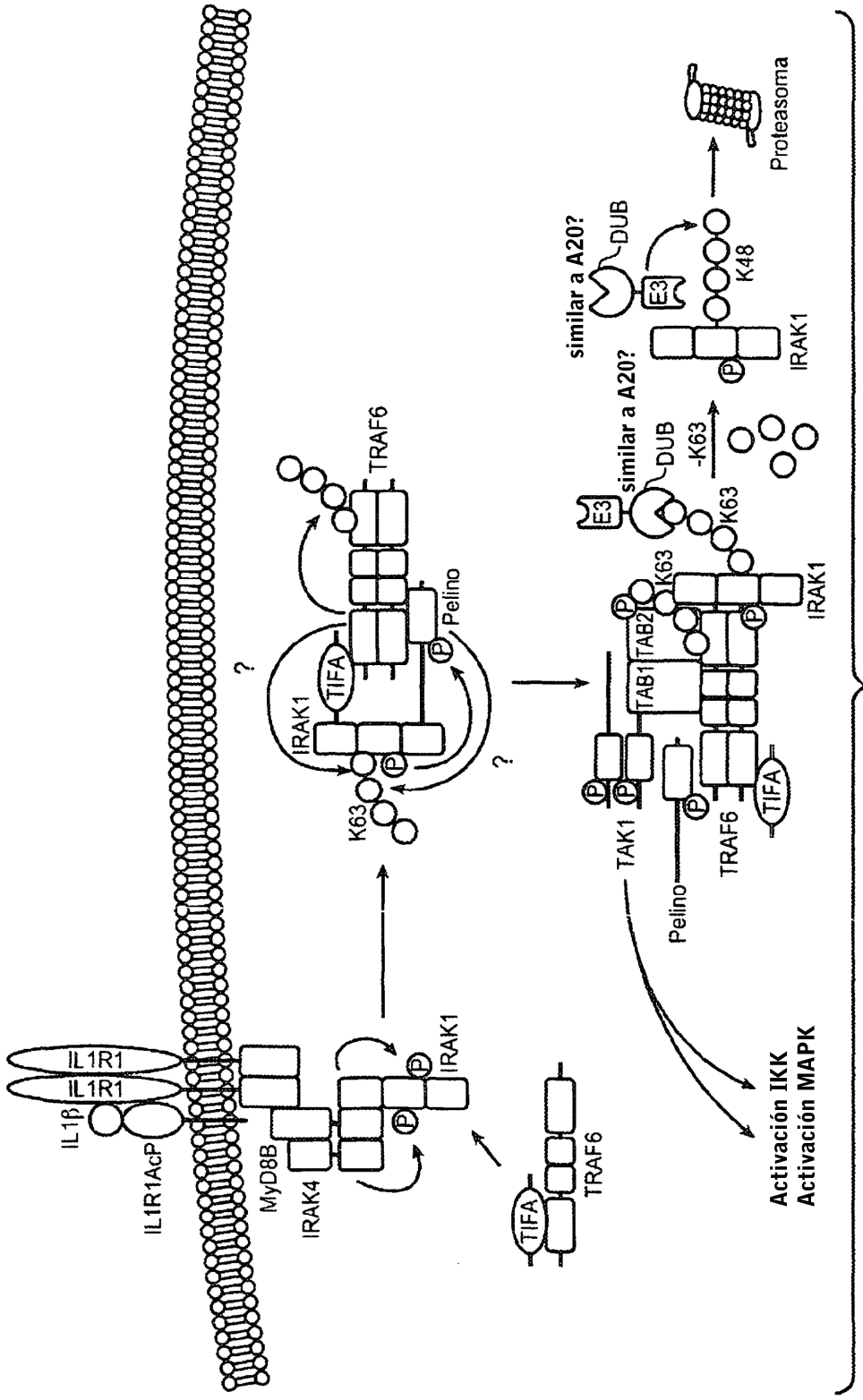

IL1R1
IL1R1
IL1β
IL1R1AcP
MyD8B
IRAK4
IRAK1
TRAF6
TIFA
K63
IRAK1
TIFA
TRAF6
Pelino
?
?
TAK1
TAB1
TAB2
K63
IRAK1
Pelino
TRAF6
TIFA
E3
similar a A20?
DUB
-K63
K63
similar a A20?
DUB
E3
K48
IRAK1
Proteasoma
Activación IKK
Activación MAPK

FIG. 8B

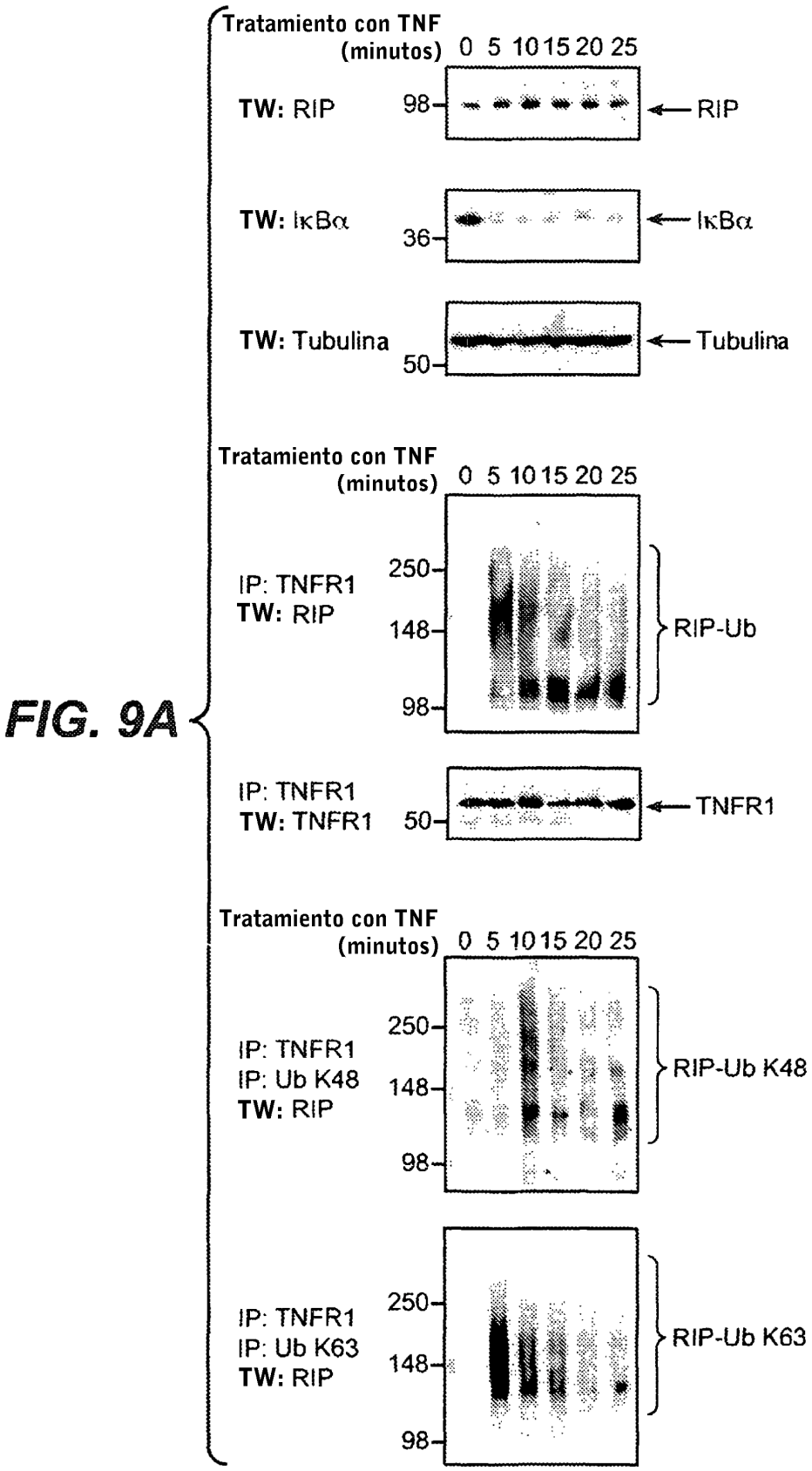

Tratamiento con TNF
(minutos) 0 5 10 15 20 25
TW: RIP
98
RIP
TW: IκBα
36
IκBα
TW: Tubulina
50
Tubulina
Tratamiento con TNF
(minutos) 0 5 10 15 20 25
IP: TNFR1
TW: RIP
250
148
98
RIP-Ub
IP: TNFR1
TW: TNFR1
50
TNFR1
Tratamiento con TNF
(minutos) 0 5 10 15 20 25
IP: TNFR1
IP: Ub K48
TW: RIP
250
148
98
RIP-Ub K48
IP: TNFR1
IP: Ub K63
TW: RIP
250
148
98
RIP-Ub K63

FIG. 9A

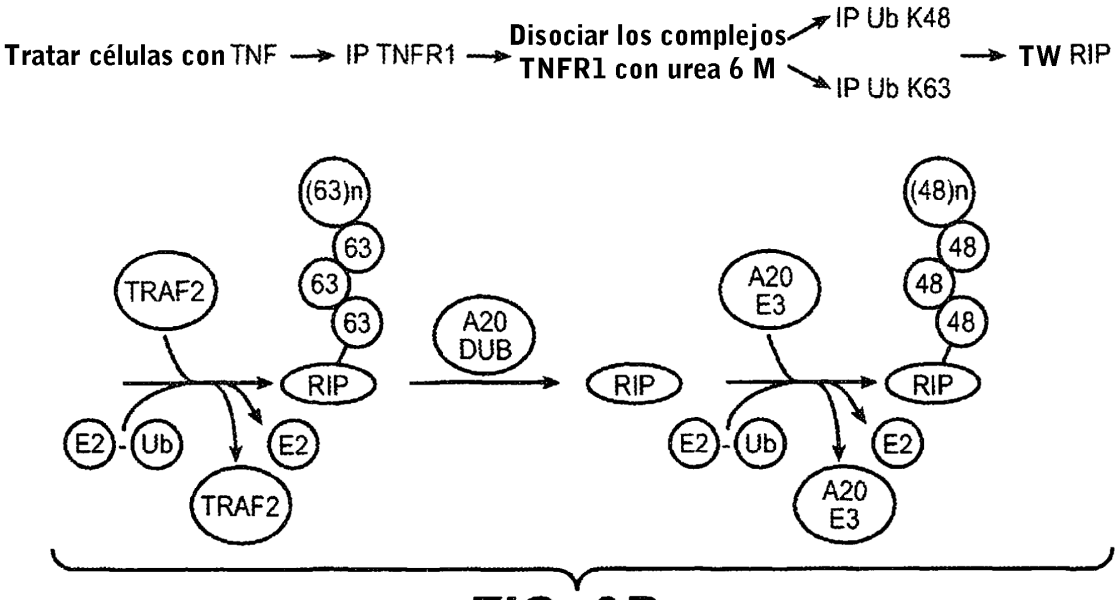

Tratar células con TNF
IP TNFR1
Disociar los complejos TNFR1 con urea 6 M
IP Ub K48
IP Ub K63
TW RIP
(63)n
63
63
63
TRAF2
RIP
E2
Ub
E2
TRAF2
A20 DUB
RIP
(48)n
48
48
48
A20 E3
RIP
E2
Ub
E2
A20 E3

FIG. 9B

FIG. 10A

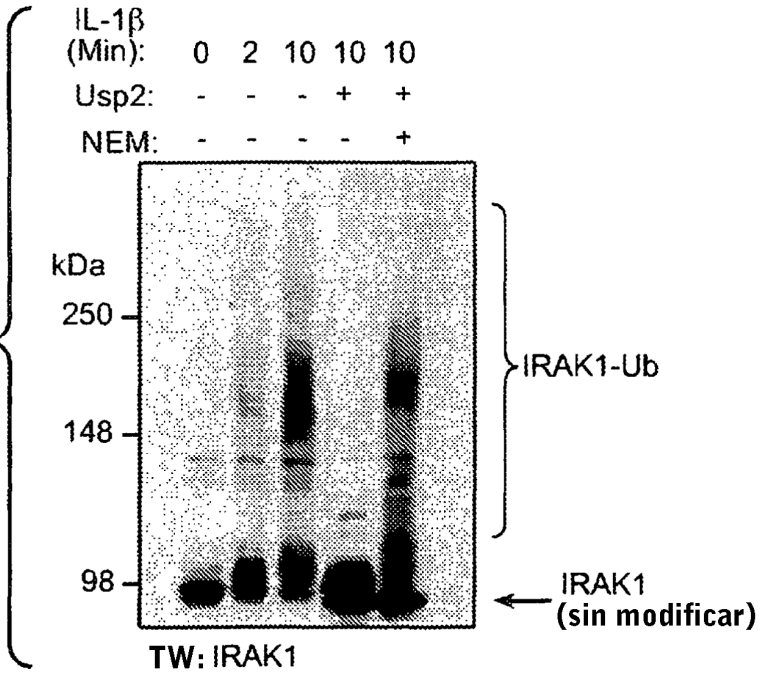


FIG. 10B

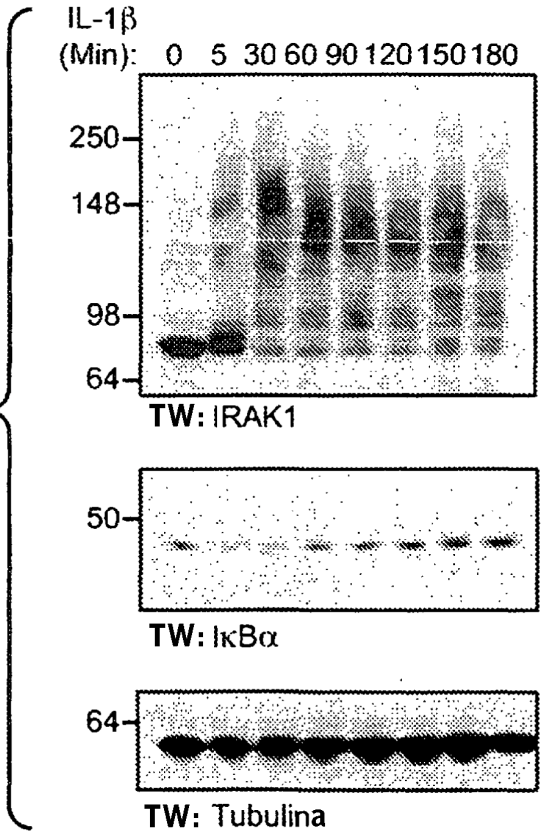


FIG. 10C

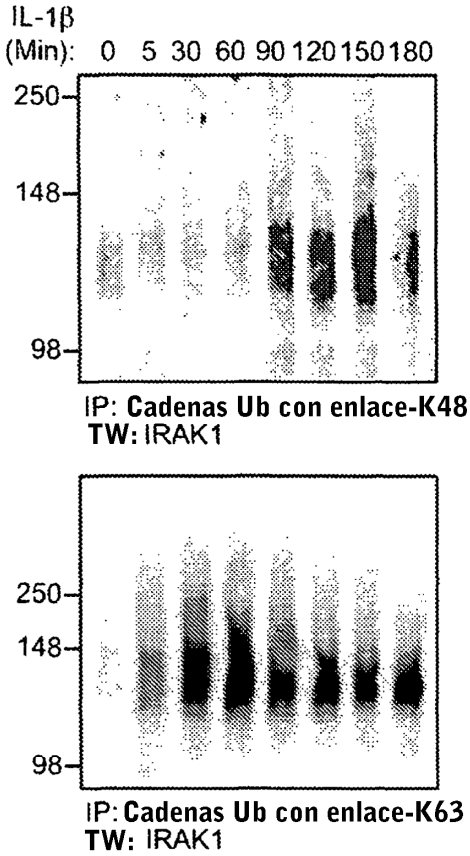
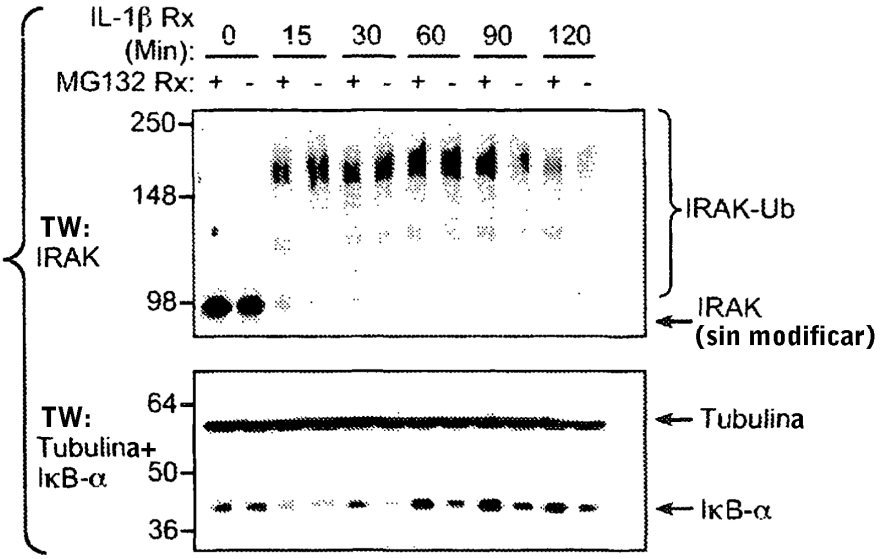


FIG. 10D



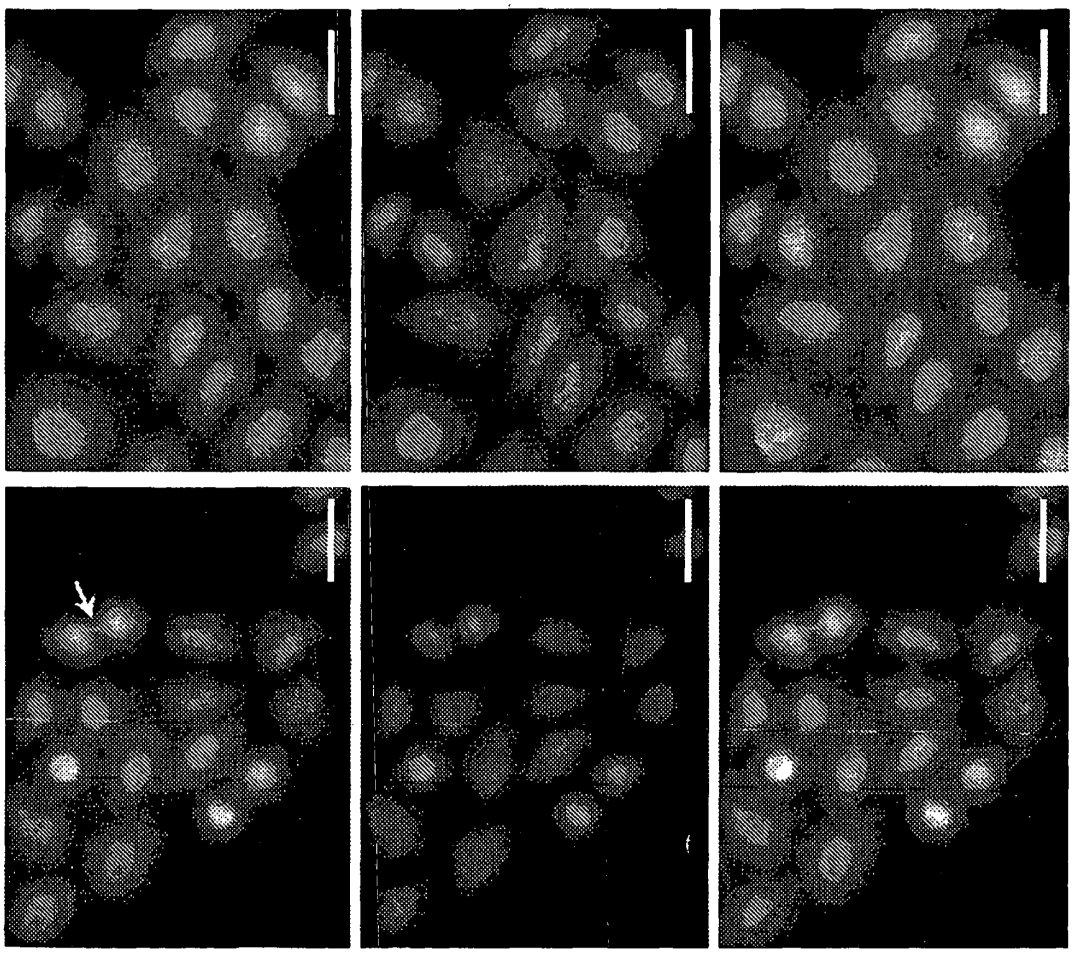


FIG. 11D FIG. 11E FIG. 11F

FIG. 11A FIG. 11B FIG. 11C

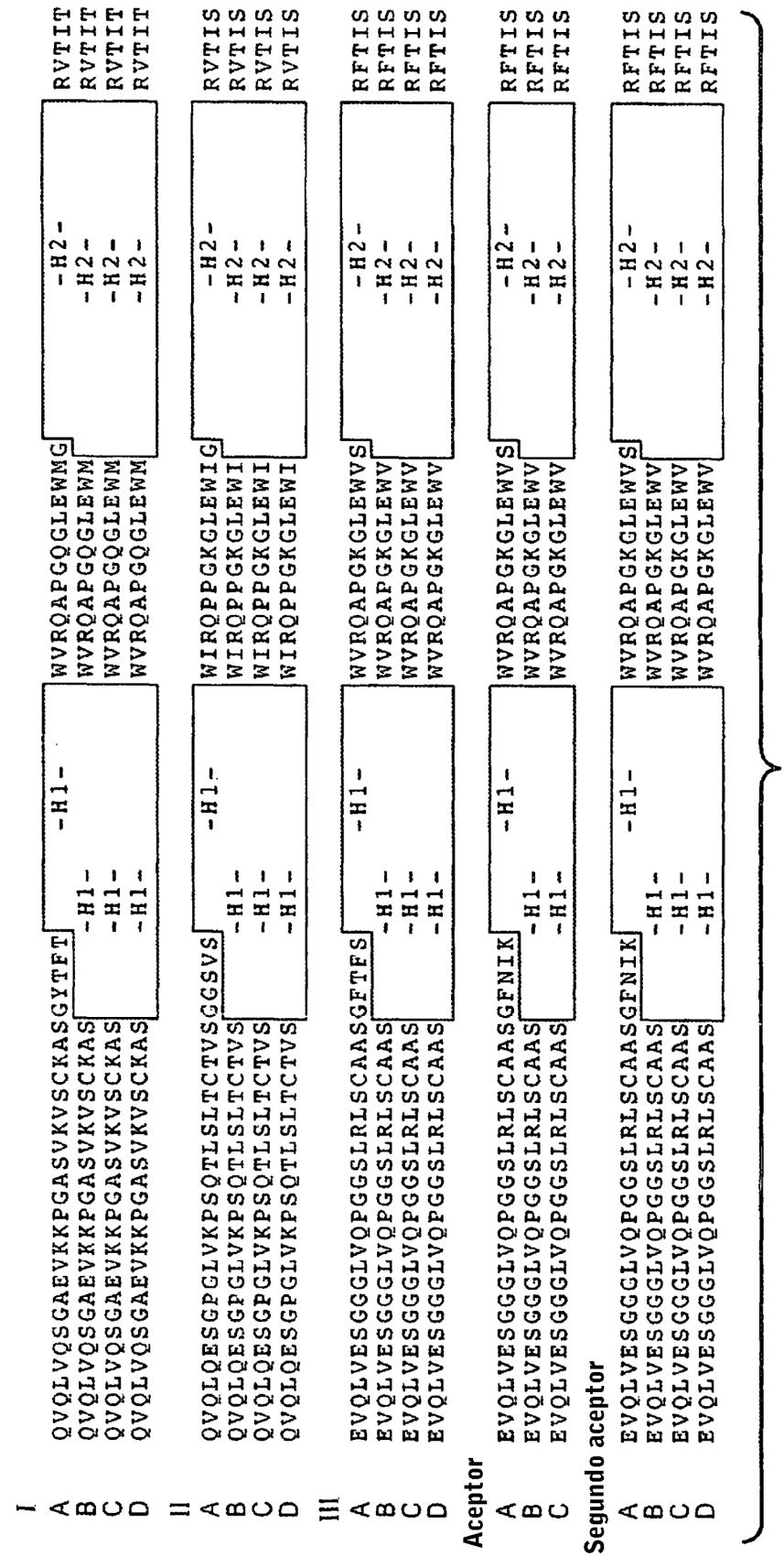

I
A QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT -H1- WVRQAPGQGLEWMG -H2- RVTIT
B QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS -H1- WVRQAPGQGLEWM -H2- RVTIT
C QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS -H1- WVRQAPGQGLEWM -H2- RVTIT
D QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS -H1- WVRQAPGQGLEWM -H2- RVTIT
II
A QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSVS -H1- WIRQPPGKGLEWIG -H2- RVTIS
B QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS -H1- WIRQPPGKGLEWI -H2- RVTIS
C QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS -H1- WIRQPPGKGLEWI -H2- RVTIS
D QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS -H1- WIRQPPGKGLEWI -H2- RVTIS
III
A EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS -H1- WVRQAPGKGLEWVS -H2- RFTIS
B EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1- WVRQAPGKGLEWV -H2- RFTIS
C EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1- WVRQAPGKGLEWV -H2- RFTIS
D EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1- WVRQAPGKGLEWV -H2- RFTIS
Aceptor
A EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK -H1- WVRQAPGKGLEWVS -H2- RFTIS
B EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1- WVRQAPGKGLEWV -H2- RFTIS
C EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1- WVRQAPGKGLEWV -H2- RFTIS
Segundo aceptor
A EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK -H1- WVRQAPGKGLEWVS -H2- RFTIS
B EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1- WVRQAPGKGLEWV -H2- RFTIS
C EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1- WVRQAPGKGLEWV -H2- RFTIS
D EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1- WVRQAPGKGLEWV -H2- RFTIS

FIG. 12A

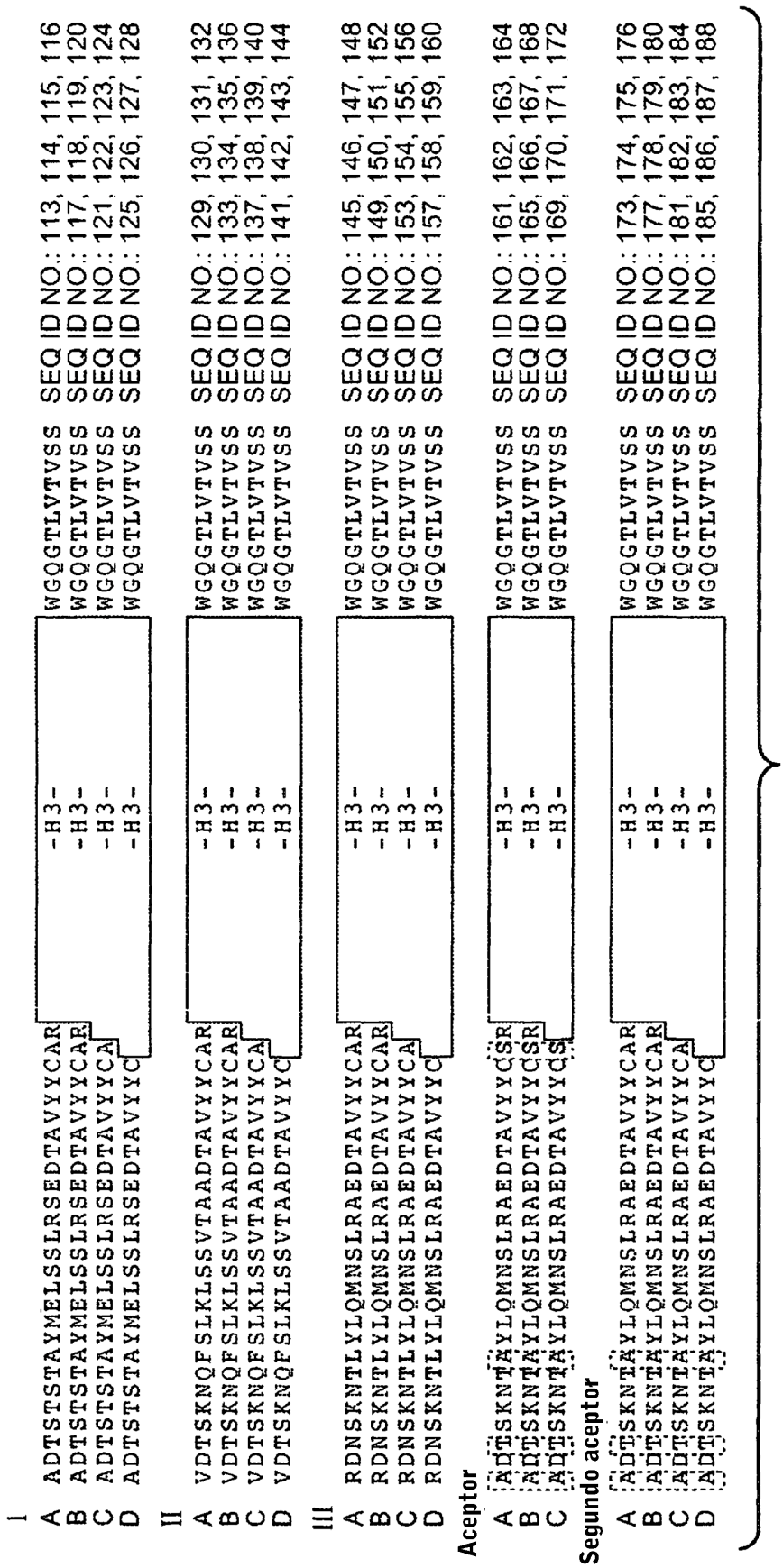

I
A ADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO:: 113, 114, 115, 116
B ADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO:: 117, 118, 119, 120
C ADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO:: 121, 122, 123, 124
D ADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO:: 125, 126, 127, 128
II
A VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO:: 129, 130, 131, 132
B VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO:: 133, 134, 135, 136
C VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO:: 137, 138, 139, 140
D VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO:: 141, 142, 143, 144
III
A RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO:: 145, 146, 147, 148
B RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO:: 149, 150, 151, 152
C RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO:: 153, 154, 155, 156
D RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO:: 157, 158, 159, 160
Aceptor
A ADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO:: 161, 162, 163, 164
B ADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO:: 165, 166, 167, 168
C ADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCS -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO:: 169, 170, 171, 172
Segundo aceptor
A ADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO:: 173, 174, 175, 176
B ADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO:: 177, 178, 179, 180
C ADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCA -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO:: 181, 182, 183, 184
D ADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO:: 185, 186, 187, 188

FIG. 12B

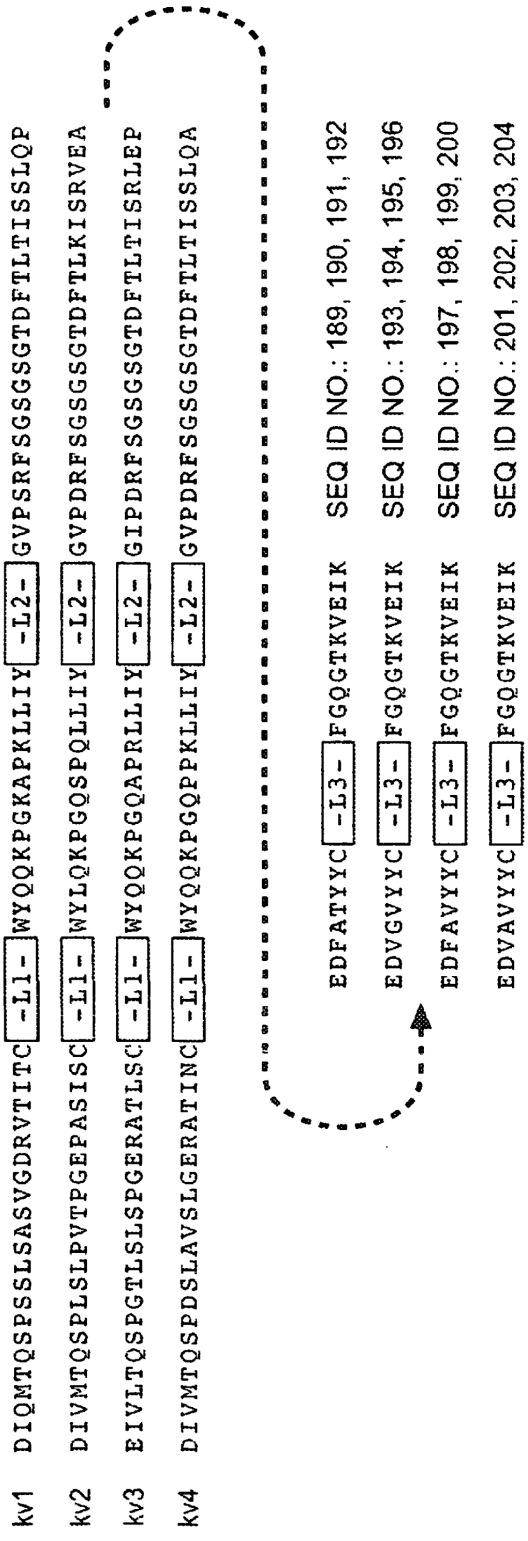

kv1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC -L1- WYQQKPGKAPKLLIY -L2- GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP
kv2 DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC -L1- WYLQKPGQSPQLLIY -L2- GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA
kv3 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC -L1- WYQQKPGQAPRLLIY -L2- GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP
kv4 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC -L1- WYQQKPGQPPKLLIY -L2- GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQA
EDFATYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NO.: 189, 190, 191, 192
EDVGVYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NO.: 193, 194, 195, 196
EDFAVYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NO.: 197, 198, 199, 200
EDVAVYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NO.: 201, 202, 203, 204

FIG. 13

Secuencias de marco de la cadena ligera de huMAb4D5-8

LC-FR1 ^{1}Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys^{23} (SEQ ID NO: 205)

LC-FR2 ^{35}Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr^{49} (SEQ ID NO: 206)

LC-FR3 ^{57}Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys^{88} (SEQ ID NO: 207)

LC-FR4 ^{98}Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys^{107} (SEQ ID NO: 208)

Secuencias de marco de la cadena pesada de huMAb4D5-8

HC-FR1 ^{1}Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser^{25} (SEQ ID NO: 209)

HC-FR2 ^{36}Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val^{48} (SEQ ID NO: 210)

HC-FR3 ^{66}Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn^{83} Ser^{83a} Leu^{83b} Arg^{83c} Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys^{92} (SEQ ID NO: 211)

HC-FR4 ^{103}Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser^{113} (SEQ ID NO: 212)

FIG. 14

Secuencias de marco de la cadena ligera de huMAb4D5-8 modificada en la posición 66 y 99 (subrayado)

LC-FR1 ^{1}Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys^{23} (SEQ ID NO: 213)

LC-FR2 ^{35}Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr^{49} (SEQ ID NO: 214)

LC-FR3 ^{57}Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys^{88} (SEQ ID NO: 215)

LC-FR4 ^{98}Phe Arg Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys^{107} (SEQ ID NO: 216)

Secuencias de marco de la cadena pesada de huMAb4D5-8 modificada en la posición 71, 73 y 78 (subrayado)

HC-FR1 ^{1}Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser^{25} (SEQ ID NO: 217)

HC-FR2 ^{36}Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val^{48} (SEQ ID NO: 218)

HC-FR3 ^{66}Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn83 Ser83a Leu83b Arg83c Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys^{92} (SEQ ID NO: 219)

HC-FR4 ^{103}Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser^{113} (SEQ ID NO: 220)

FIG. 15