

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 442 615**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/46** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)  
**C12P 21/02** (2006.01)  
**G01N 33/50** (2006.01)  
**C07K 16/00** (2006.01)  
**C07K 16/10** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)  
**C07K 16/30** (2006.01)  
**C07K 16/32** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.07.2003 E 10186063 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2013 EP 2314629**

54 Título: **Producción recombinante de mezclas de anticuerpos**

30 Prioridad:

**18.07.2002 US 397066 P**  
**18.07.2002 EP 02077953**  
**27.05.2003 WO PCT/EP03/50201**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**12.02.2014**

73 Titular/es:

**MERUS B.V. (100.0%)**  
**Padualaan 8 (postvak 133)**  
**3584 CH Utrecht , NL**

72 Inventor/es:

**VAN BERKEL, PATRICIUS HENDRIKUS;**  
**BRUS, RONALD HENDRIK PETER;**  
**BOUT, ABRAHAM y**  
**LOGTENBERG, TON**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 442 615 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Producción recombinante de mezclas de anticuerpos

Campo de la invención

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

Fundamento de la invención.

10 La función esencial del sistema inmunitario es la defensa contra la infección. El sistema inmunitario humoral combate moléculas reconocidas como extrañas o *non-self*, tales como los agentes patógenos, utilizando inmunoglobulinas. Estas inmunoglobulinas, también llamadas anticuerpos, son producidas específicamente contra el agente infeccioso, que actúa como antígeno, al tener lugar el primer contacto (Roitt, Essential Immunology, Blackwell Scientific Publications, quinta edición, 1984). Los anticuerpos son moléculas polivalentes que comprenden cadenas pesadas (Heavy: H) y cadenas ligeras (Light:L) unidas con enlaces disulfuro intercadenas. Se conocen varios isotipos de anticuerpos, incluyendo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgD, IgE, e IgM. Una IgG contiene dos cadenas pesadas y dos ligeras. Cada cadena contiene regiones constantes (C) y variables (V), que se pueden romper en dominios designados CH<sub>1</sub>, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>, V<sub>H</sub> y CL, VL (Fig. 1). El anticuerpo se une al antígeno por medio de los dominios de la región variable contenidos en la porción Fab, y después de la unión puede interactuar con moléculas y células del sistema inmunitario a través de los dominios constantes, lo más frecuentemente a través de la porción Fc.

20 Los linfocitos B pueden producir anticuerpos en respuesta a la exposición a sustancias biológicas como las bacterias, los virus y sus productos tóxicos. Los anticuerpos son generalmente específicos del epítipo y se unen fuertemente a sustancias que llevan estos epítopos. La técnica del hibridoma (Kohler y Milstein 1975) emplea la capacidad de las células B para producir anticuerpos monoclonales contra antígenos específicos y subsiguientemente producen estos anticuerpos monoclonales fusionando las células B de ratones expuestos al antígeno de interés con las células plasmáticas murinas inmortalizadas. Como resultado de esta tecnología se cayó en la cuenta de que los anticuerpos monoclonales producidos por hibridomas podían ser usados en investigación, diagnóstico y terapias para el tratamiento de diferentes tipos de enfermedades como el cáncer y los trastornos autoinmunitarios relacionados.

30 Como los anticuerpos que son producidos en hibridomas de ratón inducen fuertes respuestas inmunitarias en los seres humanos, se ha apreciado en la técnica que los anticuerpos requeridos para el tratamiento con éxito de los seres humanos necesitan ser menos inmunogénicos o preferiblemente no inmunogénicos. Para esto, se diseñaron primero anticuerpos murinos reemplazando las regiones constantes murinas con regiones constantes humanas (denominados anticuerpos quiméricos). Subsiguientemente, los dominios entre las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) en los dominios variables, las llamadas regiones marco, fueron reemplazados por sus contrapartidas humanas (denominados anticuerpos humanizados). La etapa final en este proceso de humanización ha sido la producción de anticuerpos totalmente humanos.

40 En la técnica se han descrito también anticuerpos biespecíficos, que tienen especificidad de unión para dos antígenos diferentes. Estos se utilizan generalmente para dirigirse a un resto terapéutico o de diagnóstico, por ejemplo células T, una molécula desencadenante citotóxica o un quelante que se une a un radionucleido, que es reconocido por una región variable del anticuerpo contra una célula que es reconocida por la otra región variable del anticuerpo, por ejemplo, una célula tumoral (véase, para anticuerpos biespecíficos, Segal et al, 2001).

Merchant et al (Nature Biotechnology, vol. 16, N ° 7 (1998), 677 - 681) describen la producción de una IgG biespecífica humana, en donde se usó una cadena ligera única y las cadenas pesadas fueron remodeladas para la heterodimerización usando enlaces disulfuro modificados en combinación con la tecnología de "botón en ojal" (*knob into hole*). Se alcanzó un rendimiento de 95% de heterodímero.

45 Lenz y Weidle (Gene, vol. 87, N ° 2 (1990), 213 - 218) describen un método para producir anticuerpos heterobifuncionales, en donde genes clonados que codifican un anticuerpo de interés son introducidos en una línea de células de hibridoma que segregan otro anticuerpo de interés. De esta forma se obtienen líneas celulares estables que segregan anticuerpos heterobiespecíficos.

50 Un método muy útil conocido en la técnica para obtener anticuerpos monoclonales completamente humanos con propiedades de unión deseables emplea bibliotecas de presentación de fago. Este es un método *in vitro*, basado en ADN recombinante, que imita las características clave de la respuesta inmunitaria humoral (para métodos de presentación de fagos, véase, por ejemplo, CF Barbas III et al, Phage Display, A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 2001). Para la construcción de bibliotecas de presentación de fago, colecciones de región variable de la cadena pesada y ligera del anticuerpo monoclonal humano son expresadas en la superficie de partículas de bacteriófago, normalmente en formato Fv de cadena simple (scFv) o en formato Fab. Las grandes bibliotecas de fagos que expresan fragmentos de anticuerpos contienen típicamente más de 10<sup>9</sup> especificidades de anticuerpo y pueden ser ensambladas a partir de las regiones

V de inmunoglobulina expresadas en los linfocitos B de individuos inmunizados o no inmunizados. Alternativamente, pueden ser construidas bibliotecas de presentación de fagos a partir de regiones variables de inmunoglobulina que han sido parcialmente ensambladas o reorganizadas *in vitro* para introducir diversidad adicional de anticuerpo en la biblioteca (bibliotecas semisintéticas) (De Kruif et al, 1995b). Por ejemplo, las regiones variables ensambladas *in vitro* contienen tramos de ADN aleatorizado o parcialmente aleatorizado producidos sintéticamente en aquellas regiones de las moléculas que son importantes para la especificidad del anticuerpo.

La información genética que codifica los anticuerpos identificados por presentación de fago, se puede utilizar para clonar los anticuerpos en un formato deseado, p. ej. IgG, IgA o IgM, para producir el anticuerpo con métodos de ADN recombinante (Boel et al, 2000).

Un método alternativo para proporcionar anticuerpos totalmente humanos utiliza ratones transgénicos que comprenden material genético que codifica un repertorio de inmunoglobulina humana (Fishwild et al, 1996; Mendez et al, 1997). Tales ratones pueden ser inmunizados con un antígeno diana, y la respuesta inmunitaria resultante producirá anticuerpos totalmente humanos. Las secuencias de estos anticuerpos pueden ser usadas en métodos de producción recombinantes.

La producción de anticuerpos monoclonales se realiza de forma rutinaria mediante el uso de la expresión recombinante de las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las cadenas H y L de los anticuerpos en células hospedadoras (véanse, p. ej., los documentos EP0120694; EP0314161; EP0481790; Patente de EE.UU. 4.816.567; y el documento WO 00/63403).

Hasta ahora, muchas diferentes enfermedades están siendo tratadas con anticuerpos monoclonales bien sea humanizados o bien completamente humanos. Los productos basados en anticuerpos monoclonales que están actualmente aprobados para su uso en seres humanos incluyen Herceptin™ (anti-Her2/Neu), Reopro™ (anti-receptor de glicoproteína IIb/IIIa), Mylotarg™ (anti-CD33), Rituxan™ (Rituximab, anti-CD20), Simulect™ (anti-CD25), Remicade™ (anti-TNF), Synagis™ (anti-RSV), Zenapax™ (receptor de IL2), CAMPATH™ (anti-CD52). A pesar de estos éxitos, hay todavía espacio para nuevos productos de anticuerpos y para una mejora considerable de los productos de anticuerpos existentes. El uso de anticuerpos monoclonales en el tratamiento del cáncer ha demostrado que pueden surgir las denominadas "variantes tumorales de pérdida de antígeno", haciendo menos eficaz el tratamiento con el anticuerpo monoclonal. El tratamiento con el anticuerpo monoclonal Rituximab (anti-CD20), de mucho éxito, ha demostrado por ejemplo que pueden producirse variantes de escape de pérdida de antígeno que conducen a la recidiva del linfoma (Massengale et al, 2002). En la técnica, la potencia de los anticuerpos monoclonales se ha visto incrementada fusionándolos con compuestos tóxicos, tales como radionucleidos, toxinas, citocinas, y similares. Cada uno de estos planteamientos sin embargo, tiene sus limitaciones, incluyendo problemas tecnológicos y de producción y/o una alta toxicidad.

Además, parece que la ganancia en la especificidad de los anticuerpos monoclonales en comparación con los anticuerpos policlonales no definidos tradicionales, es a costa de la pérdida de eficacia. *In vivo*, las respuestas del anticuerpo son de naturaleza policlonal, es decir, se produce una mezcla de anticuerpos porque varias células B responden al antígeno, lo que tiene por resultado que estén presentes diferentes especificidades en la mezcla de anticuerpo policlonal. Los anticuerpos policlonales también pueden utilizarse para aplicaciones terapéuticas, por ejemplo, para la vacunación pasiva o para inmunoterapia activa, y actualmente suelen derivarse de suero agrupado a partir de animales inmunizados o de seres humanos que se recuperaron de la enfermedad. El suero agrupado se purifica en la fracción proteica o gammaglobulina, llamada así porque contiene predominantemente moléculas de IgG. Los anticuerpos policlonales que se utilizan actualmente para el tratamiento incluyen anticuerpos policlonales anti-rhesus, gamma-globulina para la inmunización pasiva, policlonal anti-veneno de serpiente (CroFab), Thymoglobulin™ para el rechazo de aloinjertos, anti-digoxina para neutralizar la digoxina de fármacos para el corazón, y policlonal anti-rabia. En anticuerpos terapéuticos actualmente en el mercado, se puede encontrar un ejemplo de la eficacia más alta de los anticuerpos policlonales en comparación con los anticuerpos monoclonales en el tratamiento del rechazo agudo de trasplantes con anticuerpos anti-T. Los anticuerpos monoclonales en el mercado (basiliximab anti-CD25) son menos eficaces que un anticuerpo policlonal de conejo contra timocitos (Thymoglobulin™) (comunicados de prensa de fecha 12 de marzo, 29 de abril y 26 de agosto de 2002, en [www.sangstat.com](http://www.sangstat.com)). Sin embargo el uso de sueros humanos agrupados lleva potencialmente el riesgo de infecciones con virus tales como el HIV o la hepatitis, con toxinas tales como lipopolisacárido, con agentes infecciosos proteicos, tales como priones, y con agentes infecciosos desconocidos. Además, el suministro disponible es limitado, e insuficiente para los tratamientos humanos generalizados. Los problemas asociados con la aplicación actual de anticuerpos policlonales derivados de sueros de animales en la clínica incluyen una fuerte respuesta inmunitaria del sistema inmunitario humano contra tales anticuerpos extraños. Por consiguiente tales policlonales no son adecuados para el tratamiento repetido, o para el tratamiento de individuos que fueron inyectados previamente con otros preparados de suero de la misma especie animal.

La técnica describe la idea de la generación de animales con un repertorio de inmunoglobulina humana, que posteriormente puede ser utilizada para la inmunización con un antígeno para obtener anticuerpos policlonales contra este antígeno a partir de los animales transgénicos (documento WO 01/19394). Sin embargo todavía habrá que superar muchos obstáculos tecnológicos antes de que un sistema de este tipo sea una realidad práctica en animales más grandes que los ratones, y llevará años de desarrollo antes de que dichos sistemas puedan

proporcionar los anticuerpos policlonales de una manera segura y consistente en cantidades suficientes. Además, los anticuerpos producidos a partir de los sueros agrupados, tanto si son de origen humano como animal, siempre comprenderán una alta cantidad de especificidades no relacionadas y no deseadas, ya que solamente un pequeño porcentaje de los anticuerpos presentes en un suero dado se dirigirá contra el antígeno utilizado para la inmunización. Por ejemplo, se sabe que en animales normales, es decir, no transgénicos, aproximadamente el 1 - 10% de la fracción de inmunoglobulina circulante se dirige contra el antígeno usado para la hiperinmunización, y por tanto, la inmensa mayoría de las inmunoglobulinas de circulación es no específica.

Se ha descrito un planteamiento hacia la expresión de bibliotecas de anticuerpos policlonales (documento WO 95/20401; patentes de Estados Unidos nº 5.789.208 y nº 6.335.163). Se expresa una biblioteca policlonal de fragmentos de anticuerpos Fab utilizando un vector de presentación de fago, y se selecciona en relación con la reactividad hacia un antígeno. Las combinaciones génicas de la región variable de la cadena pesada y ligera seleccionadas se transfieren en masa, como pares enlazados, a un vector de expresión eucariota que proporciona genes de la región constante, para obtener una sub-biblioteca de anticuerpos policlonales intactos. Al tener lugar la transfección de esta sub-biblioteca en células de mieloma, los clones estables producen anticuerpos monoclonales que pueden ser mezclados para obtener una mezcla de anticuerpos policlonales. Mientras que en teoría sería posible obtener anticuerpos policlonales directamente a partir de un solo proceso de producción recombinante utilizando este método mediante el cultivo de una población mixta de células transfectadas, se presentarían problemas potenciales relacionados con la estabilidad de la población de células mixtas, y por lo tanto la consistencia de la mezcla de anticuerpos policlonales producida. El control de una población completa de diferentes células en un proceso a gran escala (es decir, industrial) farmacéuticamente aceptable, es una tarea de grandes proporciones. Parecería que las características tales como las velocidades de crecimiento de las células y las velocidades de producción de los anticuerpos deben permanecer estables para todos los clones individuales de la población no clonal con el fin de mantener la relación de anticuerpos en la mezcla de anticuerpos policlonales más o menos constante. Por tanto, aunque puede haber sido reconocida en la técnica la necesidad de mezclas de anticuerpos, no existen soluciones aceptables para hacer mezclas de anticuerpos económicamente en una manera aceptable farmacéuticamente. Es el objeto de la presente invención proporcionar nuevos medios para producir una mezcla de anticuerpos en hospedadores recombinantes.

Breve descripción de las figuras.

Fig. 1 Representación esquemática de un anticuerpo. Las cadenas pesadas y ligeras están emparejadas por medio de enlaces disulfuro entre cadenas (líneas de puntos). La cadena pesada puede ser cualquiera de los isotipos  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\delta$  o  $\epsilon$ . La cadena ligera es  $\lambda$  o bien  $\kappa$ . Se muestra un anticuerpo del isotipo IgG1.

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

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

Fig. 4 Visión de conjunto de los plásmidos pUBS3000Neo y pCD46 3000 (Neo).

Fig. 5 A. IEF de pUBS3000Neo, pCD46\_3000 (Neo) expresados transitoriamente y una combinación de ambos. B. La parte superior muestra una representación esquemática de las moléculas esperadas cuando se expresan en una célula una sola cadena ligera y una sola cadena pesada, dando lugar a anticuerpos monoclonales UBS-54 o K53. La parte inferior bajo la flecha muestra una representación esquemática de las combinaciones producidas cuando ambas cadenas pesadas y la cadena ligera común son co-expresadas en una célula hospedadora, con las cantidades teóricas cuando ambas cadenas pesadas se expresan a igual nivel y se emparejan entre sí con igual eficiencia. La cadena ligera común se indica con las barras rayadas verticalmente.

Fig. 6. Representación esquemática de una posible realización del método de acuerdo con la invención (véanse p. ej. los Ejemplos 9). (1) Introducción de secuencias de ácidos nucleicos que codifican una cadena ligera y tres distintas cadenas pesadas capaces de emparejarse con la cadena ligera común para dar anticuerpos funcionales en las células hospedadoras; (2) selección de clones estables; (3) los clones se pueden someter a cribado p. ej. en relación con los niveles de expresión, unión; (4) ampliar los clones; (5) producción de mezclas funcionales de anticuerpos. Algunas o todas las etapas 2 a 5 podrían realizarse simultáneamente o por otro orden.

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

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

Fig. 9. IgA biespecífica dimérica con una sola cadena ligera (indicada por la barra rayada horizontalmente). El método de la invención producirá una mezcla de las formas en las que pueden emparejarse las diferentes cadenas pesadas, y sólo se presenta la forma más simple en esta representación esquemática. Se muestra una cadena J para unir a los dos monómeros.

Fig. 10. IgM multiespecífica pentamérica con una sola cadena ligera (indicada por barra rayada horizontalmente). El método de la invención producirá una mezcla de muchas formas diferentes en donde pueden emparejarse diferentes cadenas pesadas, y sólo la forma más simple cuando 5 cadenas pesadas diferentes se expresan con una sola cadena ligera, y las 5 distintas cadenas pesadas están incorporadas en el pentámero y emparejadas a la misma cadena pesada, se expone en esta representación esquemática. También se pueden formar pentámeros con menos especificidades mediante la incorporación de menos de 5 cadenas pesadas diferentes. Especialmente cuando no se expresa la cadena J, también se pueden obtener hexámeros.

Fig. 11. Expresión de una mezcla de isotipos de IgG humana que consisten en una cadena ligera común, pero con diferentes especificidades de unión en una sola célula para evitar la formación de anticuerpos biespecíficos. Las diferentes especificidades de unión están indicadas por los diferentes colores de las secuencias de VH. La cadena ligera común está indicada con las barras rayadas verticalmente. El isotipo IgG1 se indica con la parte de Fc gris, el isotipo IgG3 se indica con la parte de Fc negra.

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

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

Fig. 14. Análisis BIACORE de K53 y 02-237. CD46 humano purificado por afinidad a partir de células LS174T fue acoplado (640 RU) a chips CM5 (Biacore BR-1000-14). Unión de 1000 (A), 500 (B), 250 (C), 125 (D), 63 (E), 31 (F), 16 (G), 8 (H) o 0 (I) nM de 02-237 o K53 purificadas de PER estable. Las líneas celulares derivadas de C6TM a CD46 se monitorizaron utilizando un sistema BIACORE 3000 a 37 °C. Usando este ajuste experimental, se encontró un valor de Kd de  $9,1 \times 10^{-7}$  y  $2,2 \times 10^{-8}$  para K53 y 02-237, respectivamente.

Fig. 15. Unión de K53 y 02-237 a las células LS174T. Diluciones en serie de 02-237 purificada (■), K53 (\*) y el control negativo de GBSIII (◇) conjugado con biotina se incubaron con células LS174T preincubadas con suero humano normal para bloquear la interacción del receptor de Fcγ. La unión (IMF, ordenada) se determinó mediante FACS después de la incubación con ficoeritrina conjugada con estreptavidina.

Fig. 16. Análisis de SDS-PAGE de fracciones de IgG purificadas. Tres µg de IgG purificada se analizaron en un gel NuPAGE 4-20% (Novex) no reducido (A) y reducido (B) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Las proteínas se visualizaron por tinción con azul coloidal (Nº de catálogo Novex LC6025) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La identidad del clon se indica en la parte superior de la SDS-PAGE. Cada gel contiene un control, que es 02-237 purificada o bien K53. NR, no reducido, R, reducido.

Fig. 17. Análisis por IEF de fracciones de IgG purificadas. Diez µg de IgG purificada se analizaron en un gel de Isogel 3-10 (BMA) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Las proteínas se visualizaron por tinción con azul coloidal (Novex, cat. Nº LC6025) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La identidad del clon se indica en la parte superior de la IEF. Cada gel contiene un control, que consiste en una mezcla 1:1:1 de 02-237, K53 y UBS54.

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

Fig. 19. Cromatogramas de masas de péptidos CDR3 de K53, 02-237, UBS54 y los dos péptidos de cadena ligera única L1-K53/UBS54 y L1-237 en la fracción Poli I-280 de IgG. En el lado de la derecha de cada cromatograma de masas se muestra el patrón isotópico del péptido. El ion doblemente cargado en m/z 1058,98 (PM 2.115,96 Da) resulta del péptido H11-K53. El ion doblemente cargado en m/z 1029,96 (PM 2057,92 Da) resulta del péptido H11-02-237. El ion triplemente cargado en m/z 770,03 (PM 2307,09 Da) resulta del péptido H9-UBS54. El ion doblemente cargado en m/z 1291,08 (PM 2580,16 Da) resulta del péptido L1-K53/UBS54. El ion doblemente cargado en m/z 1278,11 (PM 2554,22 Da) resulta del péptido L1-02-237.

Se disolvió IgG purificada en un RapiGest™ 0,1% (Waters) en  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM. Los disulfuros se redujeron utilizando DTT 1 M (1,4-ditio-DL-treitol), seguido de incubación a 65 °C durante 30 minutos. Entonces, para la alquilación de todos los grupos sulfhidrilo, se añadió yodoacetamida 1 M, seguida de incubación a temperatura ambiente durante 45 minutos en la oscuridad. La alquilación se detuvo mediante la adición de DTT 1 M. El tampón se cambió a  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  25 mM, pH 7,5. Finalmente, los anticuerpos fueron digeridos durante la noche a 37 °C

mediante la adición de una solución de tripsina recién preparada en  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  25 mM. La mezcla de péptidos se analizó por LC-MS. El sistema de LC consistió en una columna C18 Vydac de fase inversa, que se eluyó mediante la aplicación de un gradiente de disolvente A (acetonitrilo, agua, ácido acético glacial 5/95/1 v/v/v) y el disolvente B (acetonitrilo, agua, ácido acético glacial 90/10 /1 v/v/v). La LC fue acoplada en línea a un espectrómetro de masas Q-TOF2 (Micromass), equipado con una fuente de electropulverización trabajando a 3 kV. Los espectros de masas se registraron en el modo de ion positivo desde m/z 50 hasta 1500 a un voltaje de cono de 35 V. La resolución del instrumento de más de 10.000 permitió la determinación inequívoca de la carga, y por tanto la de la masa de la mayoría de los iones hasta al menos +7. De esta forma, todos los péptidos se identificaron de acuerdo con su peso molecular. La secuencia de aminoácidos del péptido se confirmó por experimentos MS/MS. Los espectros de MS/MS se registraron en el modo de ion positivo desde m/z 50 a 2000 con energía de colisión entre 20 y 35 eVolts.

Fig. 20. Análisis BIACORE del policlonal 280. CD46 humano purificado por afinidad a partir de células LS174T fue acoplado (640 RU) a chips CM5 (BIACORE BR-1000-14). La unión de poli-280 1000 (A), 500 (B), 250 (C), 125 (D), 63 (E), 31 (F), 16 (G), 8 (H) o 0 (I) nM a CD46 se controló utilizando un sistema BIACORE 3.000 a 37 °C.

Fig. 21. Análisis por IEF de sub- clones a partir de clones de poli 1-241, poli 1-280 y poli 1-402 que producen una mezcla de anticuerpos.

A. Clones poli 1-241 y poli 1-280. La calle 1 contiene un marcador pl (Amersham, nº cat. 17-0471-01). La calle 2 contiene IgG aislada del clon progenitor poli 1-241 (como en la Fig. 18). Las calles 3, 4 y 5 respectivamente contienen IgG aislada de 3 subclones independientes derivados de poli 1-241 por limitación de la dilución. La calle 6 contiene IgG aislada del clon progenitor poli 1-280 (como en la Fig. 18). Las calles 7, 8 y 9 respectivamente contienen IgG aislada a partir de tres sub- clones independientes derivados a partir de poli 1-280 por dilución limitante.

B. Clon poli 1-402. Las calles 1 y 7 contienen un marcador pl. La calle 2 contiene IgG aislada del clon progenitor poli 1-402 (como en la Fig. 18). Las calles 3, 4 y 5 contienen respectivamente IgG aislada de 3 subclones independientes derivados de poli 1-402 por limitación de la dilución. La calle 6 contiene un control (una mezcla 1:1:1 de 02-237, K53 y UBS54).

Fig. 22. Análisis FACS de las mezclas de anticuerpos producidos a partir de sub- clones de poli 1-241 (A), poli 1-280 (B) y poli 1-402 (C). La unión de las mezclas de anticuerpos a las células transfectadas con cADN de CD46, EpCAM, o un control negativo (CD38), se determinó con análisis FACS, y la intensidad de fluorescencia media (MFI) se muestra para los diversos clones progenitores y tres sub- clones independientes de cada uno. También se incluyen los anticuerpos de control GBS-III (control negativo), anti-CD72 (02-004; control negativo) y los anticuerpos individuales UBS54, 02-237 y K53.

Sumario de la invención.

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar al menos un clon de célula hospedadora que produce una mezcla de anticuerpos, en donde dicha mezcla de anticuerpos tiene un efecto deseado de acuerdo con un ensayo funcional, comprendiendo el método las etapas de:

(i) proporcionar una célula hospedadora con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena ligera y secuencias de ácidos nucleicos que codifican dos cadenas pesadas diferentes, en donde dichas cadenas pesadas y ligera son capaces de emparejarse entre sí;

(ii) cultivar al menos un clon de dicha célula hospedadora en condiciones que conducen a la expresión de dichas secuencias de ácidos nucleicos;

(iii) someter a cribado dicho al menos un clon de la célula hospedadora para la producción de una mezcla de anticuerpos que tienen el efecto deseado mediante un ensayo funcional; y

(iv) identificar al menos un clon que produce una mezcla de anticuerpos que tienen el efecto deseado.

Otro aspecto de la invención es la eliminación de la producción de emparejamiento de cadena pesada-ligera potencialmente no funcional usando combinaciones preseleccionadas de cadenas pesadas y ligeras. Se ha reconocido que las bibliotecas de presentación de fagos construidas a partir de una sola cadena ligera y muchas cadenas pesadas diferentes pueden codificar fragmentos de anticuerpos con muy distintas propiedades de unión. Esta característica se puede usar para encontrar diferentes anticuerpos que tienen la misma cadena ligera pero diferentes cadenas pesadas, contra la misma diana o dianas diferentes, en donde una diana puede ser un antígeno completo o un epítipo del mismo. Tales dianas diferentes pueden estar, por ejemplo, en la misma superficie (p. ej. célula o tejido). Tales fragmentos de anticuerpo obtenidos por presentación de fagos pueden ser clonados en vectores para el formato deseado, p. ej. IgG, IgA o IgM, y las secuencias de ácidos nucleicos que codifican estos formatos se pueden utilizar para transfectar células hospedadoras. En un planteamiento, las cadenas H y L pueden ser codificadas por diferentes construcciones que, al tener lugar la transfección en una célula en la que se expresan, dan lugar a moléculas de Ig intactas. Cuando se transfectan en una célula diferentes construcciones de cadena H con una construcción de la cadena L única, las cadenas H y L se ensamblarán para formar todas las combinaciones

posibles. Sin embargo, en contraste con los planteamientos en los que se expresan diferentes cadenas ligeras tal como para la producción de anticuerpos biespecíficos, este método dará lugar sólo a las regiones de unión funcional. Sería particularmente útil cuando el hospedador, p. ej. una única línea celular, es capaz de expresar niveles aceptables de anticuerpos recombinantes, sin necesidad de amplificar o multiplicar primero en dicha célula las secuencias de ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos. La ventaja es que es de esperar que las líneas de células con tan sólo un número limitado de copias de dichos ácidos nucleicos sean genéticamente más estables, porque habrá menos recombinación entre las secuencias que codifican las cadenas pesadas, que en líneas de células en las que está presente una multitud de estas copias. Una línea de células adecuada para el uso en los métodos de acuerdo con la invención es la línea de células humanas PER.C6™. Usando este método puede ser producida una mezcla de anticuerpos con especificidades definidas a partir de un solo clon de células de una manera segura, controlada y consistente.

La invención proporciona un método para producir una mezcla de anticuerpos, que comprende la etapa de:

(i) cultivar un clon de célula hospedadora identificado por un método de acuerdo con la invención bajo condiciones que llevan a la expresión de los ácidos nucleicos que codifican la cadena ligera y las dos diferentes cadenas pesadas.

En un aspecto preferido, la célula hospedadora recombinante comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena ligera común que es capaz de emparejarse con dicho al menos tres diferentes cadenas pesadas, tal que los anticuerpos producidos comprenden una cadena ligera común. Obviamente, los expertos en la técnica reconocerán que "común" se refiere también a equivalentes funcionales de la cadena ligera de los cuales la secuencia de aminoácidos no es idéntica. Existen muchas variantes de dicha cadena ligera en las que están presentes mutaciones (delecciones, sustituciones, adiciones) que no influyen materialmente en la formación de regiones de unión funcionales.

La invención proporciona además una mezcla de anticuerpos que comprenden una cadena ligera común y dos cadenas pesadas diferentes con una región variable diferente, en donde las dos cadenas pesadas diferentes son capaces de emparejarse con dicha cadena ligera común, y en donde dichas cadenas pesadas difieren además suficientemente en sus regiones constantes de modo que la cantidad de anticuerpos biespecíficos disminuye en comparación con el porcentaje teórico de anticuerpos biespecíficos. En una realización, las cadenas ligeras de tales mezclas tienen una secuencia común. La mezcla de anticuerpos se puede producir por el método de acuerdo con la invención. Preferiblemente, la mezcla de anticuerpos es más eficaz que los anticuerpos individuales que la componen, más preferiblemente, la mezcla actúa sinérgicamente en un ensayo funcional.

Los clones independientes obtenidos a partir de la transfección de secuencias de ácidos nucleicos que codifican una cadena ligera y más de una cadena pesada pueden expresar los diferentes anticuerpos en la mezcla a niveles diferentes. Otro aspecto de la invención es seleccionar un clon usando un ensayo funcional para la mezcla de anticuerpos más potente. Por tanto la invención proporciona un método para identificar al menos un clon de la célula hospedadora que produce una mezcla de anticuerpos, en donde dicha mezcla de anticuerpos tiene un efecto deseado de acuerdo con un ensayo funcional, comprendiendo el método las etapas de: (i) proporcionar a una célula hospedadora una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena ligera y secuencias de ácidos nucleicos que codifican dos cadenas pesadas diferentes, en donde dichas cadenas pesadas y ligera son capaces de emparejamiento entre ellas; (ii) cultivar al menos un clon de dicha célula hospedadora bajo condiciones que conducen a la expresión de dichas secuencias de ácidos nucleicos; (iii) cribar dicho al menos un clon de la célula hospedadora para la producción de una mezcla de anticuerpos que tienen el efecto deseado mediante un ensayo funcional; y (iv) identificar al menos un clon que produce una mezcla de anticuerpos que tienen el efecto deseado. Este método de acuerdo con la invención se puede llevar a cabo usando procedimientos de alta producción, si se desea. Los clones identificados por el método pueden usarse para producir mezclas de anticuerpos de acuerdo con la invención.

La invención proporciona además un animal no humano transgénico o una planta transgénica que comprende una secuencia de ácido nucleico recombinante que codifica una cadena ligera común y una secuencia de ácidos nucleicos recombinante o secuencias que codifican al menos dos cadenas pesadas diferentes que son capaces de emparejarse con dicha cadena ligera común, en donde dichas secuencias de ácidos nucleicos recombinantes que codifican dichas cadenas ligera y pesada están bajo el control de un promotor específico del tejido.

La invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden una mezcla de anticuerpos producidos de forma recombinante de acuerdo con la invención, y un vehículo adecuado.

La invención proporciona además mezclas de anticuerpos de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento o el diagnóstico y para la preparación de un medicamento para uso en el tratamiento o el diagnóstico de una enfermedad o trastorno en un sujeto humano o animal.

La invención proporciona además un método de acuerdo con la invención para producir una mezcla de anticuerpos que comprende diferentes isotipos de un único clon de la célula hospedadora.

La invención proporciona además un método de acuerdo con la invención para identificar una mezcla de anticuerpos que tienen un efecto deseado en un ensayo funcional.

#### Descripción detallada de la invención

El término "anticuerpo" como se usa en el presente texto significa un polipéptido que contiene uno o más dominios que se unen a un epítipo en un antígeno, en donde tales dominios se derivan o tienen identidad de secuencias con la región variable de un anticuerpo. La estructura de un anticuerpo se representa esquemáticamente en la Fig.1. Los ejemplos de anticuerpos de acuerdo con la invención incluyen anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpos, anticuerpos biespecíficos, inmunoconjugados, y similares. Un anticuerpo de acuerdo con la invención puede ser isotipo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgM, y similares, o un derivado de éstos. Los fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, y similares. Los anticuerpos según la invención pueden ser de cualquier origen, incluyendo el murino, de más de un origen, es decir, anticuerpos quiméricos, humanizados, o totalmente humanos. Los inmunoconjugados comprenden dominios de unión con el antígeno y una parte no-anticuerpo tal como una toxina, un radiomarcador, una enzima, y similares. Un "dominio de unión con el antígeno" comprende preferiblemente regiones variables de una cadena pesada y una ligera, y es responsable de la unión específica a un antígeno de interés. Los anticuerpos recombinantes se preparan expresando tanto una cadena pesada como una ligera en una célula hospedadora. De un modo similar, mediante la expresión de dos cadenas con sus respectivas cadenas ligeras (o una cadena ligera común), en donde cada cadena pesada/cadena ligera tiene su propia especificidad, se pueden preparar los denominados anticuerpos "biespecíficos". Los "anticuerpos biespecíficos" comprenden dos combinaciones de cadenas pesada/ligera no idénticas (Fig. 2), y ambas regiones de unión con el antígeno de un anticuerpo biespecífico pueden reconocer diferentes antígenos o diferentes epítopos en un antígeno.

Una "cadena ligera común" de acuerdo con la invención se refiere a cadenas ligeras que pueden ser idénticas o que tienen diferencias en la secuencia de aminoácidos. Dichas cadenas ligeras pueden comprender mutaciones que no alteran la especificidad del anticuerpo cuando se combinan con la misma cadena pesada, sin apartarse del alcance de la presente invención. Por ejemplo es posible, dentro del alcance de la definición de cadenas ligeras comunes como se usa en el presente texto, preparar o encontrar cadenas ligeras que no son idénticas pero que todavía son funcionalmente equivalentes, por ejemplo introduciendo y probando cambios de aminoácidos conservadores, cambios de aminoácidos en regiones que no contribuyen, o que lo hacen sólo parcialmente, a la especificidad de unión cuando se emparejan con la cadena pesada, y similares. Es un aspecto de la presente invención usar como cadena ligera común una cadena ligera idéntica para combinar con diferentes cadenas pesadas para formar anticuerpos con dominios de unión con el antígeno funcionales. El uso de una cadena ligera común evita la formación de heterodímeros en los que el emparejamiento de cadenas ligeras y pesadas tiene por resultado dominios de unión con el antígeno que no son funcionales, en otras palabras que no son capaces de unirse al antígeno o antígenos diana. El uso de una cadena ligera común y dos cadenas pesadas ha sido propuesto para un propósito diferente (Merchant et al, 1998; documento WO 98/50431), como es aumentar la formación de anticuerpos biespecíficos funcionales a expensas de la complejidad de la mezcla de anticuerpos. Estas publicaciones enseñan un método para producir de forma preferente un anticuerpo biespecífico definido y deseado, *minimizando* de ese modo la complejidad de la mezcla producida. Así pues, Merchant enseña específicamente prevenir la producción de anticuerpos monoespecíficos, porque estos son subproductos no deseados en el proceso de producción de anticuerpo biespecífico descrito en esas publicaciones. Claramente, no hay ninguna enseñanza en la técnica anterior para preparar una mezcla compleja de anticuerpos a partir de una célula hospedadora recombinante evitando la formación de dominios de unión no funcionales o los beneficios de los mismos, y mucho menos sobre cómo hacerlo. En el método de acuerdo con la presente invención, se expresan dos cadenas pesadas diferentes que son capaces de emparejarse con la cadena ligera común.

"Diferentes cadenas pesadas" de acuerdo con la invención pueden diferir en la región variable y tener la misma región constante. En otras realizaciones, donde es claro por el contexto, pueden tener la misma región variable y diferir en la región constante, p. ej. ser de un isotipo diferente. El uso de una mezcla de anticuerpos que tienen diferentes regiones constantes, tales como la porción Fc, puede ser ventajoso si se han de movilizar diferentes brazos del sistema inmunitario en el tratamiento del cuerpo humano o animal. Hay otras realizaciones, también a ser claras por el contexto, en las que pueden diferir tanto las regiones variables y como las constantes.

Una "mezcla de anticuerpos" de acuerdo con la invención comprende al menos dos anticuerpos no idénticos, pero puede comprender 3 anticuerpos diferentes, y puede parecerse a un anticuerpo policlonal o, al menos, a una mezcla de anticuerpos oligoclonales con respecto a la complejidad y el número de moléculas de unión de antígeno funcionales. Las mezclas producidas de acuerdo con la presente invención comprenderán normalmente anticuerpos biespecíficos. Si se desea, la formación de anticuerpos monoespecíficos en la mezcla puede ser favorecida sobre la formación de anticuerpos biespecíficos. Cuando n cadenas pesadas y una cadena ligera común se expresan de acuerdo con la invención en una célula hospedadora a niveles iguales, el porcentaje teórico de anticuerpos biespecíficos producidos por el método de acuerdo con la invención es  $(1 - 1/N) * 100\%$ . El número total de anticuerpos diferentes en la mezcla producida por el método de acuerdo con la invención es teóricamente  $n + \{(n^2 - n)/2\}$ , de los cuales  $(n^2 - n/2)$  son anticuerpos biespecíficos. La distorsión de la relación de los niveles de expresión de las diferentes cadenas pesadas puede llevar a valores que se desvían de los valores teóricos. La cantidad de anticuerpos biespecíficos puede también reducirse, en comparación con estos valores teóricos, si no todas las



cadenas pesadas se emparejan con la misma eficiencia. Por ejemplo es posible construir las cadenas pesadas, p. ej. mediante la introducción de superficies de interacción específicas y complementarias entre cadenas pesadas seleccionadas, para favorecer el emparejamiento homodimérico sobre el heterodimérico, al contrario de lo que ha sido propuesto por Merchant, *supra*. Las cadenas pesadas se pueden seleccionar también de forma que se minimice la formación de heterodímero en la mezcla. Una forma especial de esta realización implica cadenas pesadas de dos o más isotipos diferentes (p. ej. IgG1, IgG3, IgA). Cuando las cadenas pesadas de diferente isotipo se expresan en la misma célula hospedadora de acuerdo con la presente invención y una cadena ligera que se puede emparejar a estas cadenas pesadas, la cantidad de anticuerpos biespecíficos se reducirá, posiblemente a niveles muy bajos o incluso indetectables. Así pues, cuando los anticuerpos biespecíficos son menos deseable, es posible producir una mezcla de anticuerpos de acuerdo con la invención, en la que una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena ligera común y secuencias de ácidos nucleicos que codifican dos cadenas pesadas diferentes con una región variable diferente capaz de emparejarse con dicha cadena ligera común se expresan en un hospedador recombinante, y en donde dichas cadenas pesadas difieren además en sus regiones constantes de forma suficiente como para reducir o evitar el emparejamiento entre las diferentes cadenas pesadas. Pueden producirse mezclas de anticuerpos de acuerdo con la invención a partir de un clon que fue derivado de una sola célula hospedadora, es decir, de una población de células que contienen las mismas secuencias de ácidos nucleicos recombinantes.

Se entenderá que las diferentes cadenas pesadas de acuerdo con la invención pueden ser codificadas en moléculas de ácidos nucleicos separadas, pero también pueden estar presentes en una molécula de ácido nucleico que comprende diferentes regiones que codifican dichas al menos tres cadenas pesadas. Las moléculas de ácido nucleico codifican normalmente precursores de las cadenas ligeras y/o pesadas, que cuando se expresan son segregadas de las células hospedadoras, procesándose de este modo para dar la forma madura. Estos y otros aspectos de la expresión de anticuerpos en una célula hospedadora son bien conocidos por los profesionales con una experiencia normal en la técnica.

Una "célula hospedadora recombinante" como se usa en el presente texto es una célula que comprende uno o más de los llamados transgenes, es decir, secuencias de ácidos nucleicos recombinantes no presentes naturalmente en dicha célula. Estos transgenes se expresan en dicha célula hospedadora para producir anticuerpos recombinantes codificados por estas secuencias de ácidos nucleicos, cuando estas células se cultivan bajo condiciones que conducen a la expresión de dichas secuencias de ácidos nucleicos. La célula hospedadora de acuerdo con la invención puede estar presente en forma de un cultivo a partir de un clon que es derivado de una sola célula hospedadora en los que se han introducido los transgenes. Para obtener la expresión de secuencias de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos, es bien sabido por los expertos en la técnica que las secuencias capaces de impulsar tal expresión pueden ser enlazadas funcionalmente a las secuencias de ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos. Se entiende que funcionalmente ligado describe que las secuencias de ácidos nucleicos que codifican los fragmentos de anticuerpo o precursores de los mismos están ligadas a las secuencias capaces de impulsar la expresión de forma que estas secuencias pueden impulsar la expresión de los anticuerpos o sus precursores. Están disponibles en la técnica vectores de expresión útiles, p. ej. la serie de vectores pcADN de Invitrogen. Cuando la secuencia que codifica el polipéptido de interés es insertada apropiadamente con referencia a las secuencias que gobiernan la transcripción y la traducción del polipéptido codificado, el casete de expresión resultante es útil para producir el polipéptido de interés, denominado como expresión. La secuencias que impulsan la expresión pueden incluir promotores, potenciadores y similares, y combinaciones de los mismos. Estos deben ser capaces de funcionar en la célula hospedadora, impulsando así la expresión de las secuencias de ácidos nucleicos que están relacionadas funcionalmente con ellos. Los promotores pueden ser constitutivos o regulados, y pueden ser obtenidos de varias fuentes, incluyendo fuentes de virus, procariotas o eucariotas, o diseñados artificialmente. La expresión de ácidos nucleicos de interés puede ser a partir del promotor natural o derivado del mismo o a partir de un promotor completamente heterólogo. Algunos promotores bien conocidos y muy usados para la expresión en células eucariotas comprenden promotores derivados de virus, tales como adenovirus, p. ej. el promotor E1A, promotores derivados de citomegalovirus (CMV), tales como el promotor temprano inmediato (IE) de CMV, promotores derivados de virus de simio 40 (SV40), y similares. Los promotores adecuados también pueden ser derivados a partir de células eucariotas, tales como los promotores de metalotioneína (MT), promotor del factor de alargamiento 1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ), promotor de actina, un promotor de inmunoglobulina, promotores de choque térmico, y similares. Cualquier promotor o potenciador/promotor capaz de impulsar la expresión de la secuencia de interés en la célula hospedadora es adecuado en la invención. En una realización, la secuencia capaz de impulsar la expresión comprende una región de un promotor de CMV, preferiblemente la región que comprende los nucleótidos -735 a +95 del potenciador/promotor del gen temprano inmediato de CMV. El experto en la materia se dará cuenta de que las secuencias de expresión usadas en la invención pueden ser adecuadamente combinadas con elementos que pueden estabilizar o potenciar la expresión, tales como aisladores, regiones de unión a matriz, elementos STAR (documento WO 03/004704), y similares. Esto puede potenciar la estabilidad y/o los niveles de expresión. La producción de proteína en células hospedadoras recombinantes ha sido descrita con profusión, p. ej. en Current Protocols in Protein Science, 1995, Coligan JE, Dunn BM, Ploegh HL, Speicher DW, Wingfield PT, ISBN 0-471-11184-8; Bendig, 1988. El cultivo de una célula se hace para permitirle metabolizar, y/o crecer, y/o dividirse, y/o producir proteínas recombinantes de interés. Esto puede lograrse por métodos bien conocidos por los profesionales expertos en la técnica, e incluye, pero sin limitarse a ello, proporcionar nutrientes para la célula. Los métodos comprenden crecimiento adhiriéndose a superficies, crecimiento en suspensión, o combinaciones de los mismos.

Varias condiciones de cultivo pueden ser optimizadas por métodos bien conocidos en la técnica para optimizar los rendimientos de la producción de proteínas. El cultivo se puede hacer p. ej. en platos, botellas rotatorias o en biorreactores, usando sistemas en tandas, lote alimentado (*fed-batch*), continuos, en fibra hueca, y similares. Con el fin de conseguir una producción a gran escala (continua) de proteínas recombinantes a través de cultivo de células en la técnica se prefiere tener células capaces de crecer en suspensión, y se prefiere tener células capaces de ser cultivadas en ausencia de suero de origen animal o humano o componentes de suero de origen animal o humano. Así pues la purificación es más fácil y se mejora la seguridad debido a la ausencia de proteínas animales o humanas adicionales derivadas del medio de cultivo, mientras que el sistema también es muy fiable ya que los medios sintéticos son los de mejor reproducibilidad.

"Células hospedadoras" de acuerdo con la invención pueden ser cualquier célula hospedadora capaz de expresar moléculas de ADN recombinante, incluyendo bacterias tales como *Eschericia* (por ejemplo *E. coli*), *Enterobacter*, *Salmonella*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, levaduras tales como *S. cerevisiae*, *K. lactis*, *P. pastoris*, *Candida*, o *Yarrowia*, hongos filamentosos tales como *Neurospora*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus nidulans* y *Aspergillus niger*, células de insectos tales como células de *Spodoptera frugiperda* SF-9 o SF-21, células de mamífero tales como células de ovario de hámster chino (CHO), células BHK, células de ratón incluyendo células SP2 / 0 y células de mieloma NS-0, células de primates tales como COS y células Vero, células MDCK, células BRL 3A, hibridomas, células tumorales, células primarias inmortalizadas, células humanas tales como W138, HepG2, HeLa, HEK293, HT1080 o células de retina embrionaria tales como PER.C6™, y similares. Frecuentemente el sistema de expresión de elección implicará un vector de expresión de células de mamíferos y hospedador de modo que los anticuerpos están apropiadamente glicosilados. Se puede utilizar ventajosamente una línea de células humanas, preferiblemente PER.C6™, para obtener anticuerpos con un patrón de glicosilación completamente humano. Las condiciones para el crecimiento o multiplicación de las células (véase, por ejemplo *Tissue Culture*, Academic Press, Kruse y Paterson, editores (1973)), y las condiciones para la expresión del producto recombinante pueden diferir algo, y normalmente se realiza la optimización del proceso para aumentar los rendimientos de producto y/o el crecimiento de las células con respecto a la otra, de acuerdo con métodos generalmente conocidos por los profesionales expertos en la técnica. En general, los principios, protocolos y técnicas prácticas para maximizar la productividad de los cultivos de células de mamíferos se pueden encontrar en *Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach* (M. Butler, ed., IRL Press, 1991). La expresión de anticuerpos en células hospedadoras recombinantes se ha descrito ampliamente en la técnica (véase, por ejemplo EP0120694; EP0314161; EP0481790; EP0523949; patente de EE.UU. nº 4816567; documento WO 00/63403). Las moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas ligera y pesada pueden estar presentes como copias extracromosómicas y/o integradas establemente en el cromosoma de la célula hospedadora. En relación con la estabilidad de la producción, se prefiere esto último.

Los anticuerpos se expresan en las células de acuerdo con la invención, y pueden ser recuperados de las células o, preferiblemente, del medio de cultivo de células, por métodos generalmente conocidos por los profesionales expertos en la técnica. Tales métodos pueden incluir precipitación, centrifugación, filtración, cromatografía de exclusión de tamaños, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio catiónico y/o aniónico, cromatografía de interacción hidrófoba, y similares. Para una mezcla de anticuerpos que comprenden moléculas de IgG, se puede utilizar adecuadamente cromatografía de afinidad de proteína A o de proteína G (véanse por ejemplo, las patentes de Estados Unidos 4.801.687 y 5.151.504).

En una realización, al menos dos anticuerpos a partir de la mezcla producida de acuerdo con la invención comprenden un dímero de cadena ligera-pesada que tiene diferentes especificidades y/o afinidades. La especificidad determina qué antígeno o epítipo del mismo es unido por el anticuerpo. La afinidad es una medida de la fuerza de unión a un antígeno o epítipo en particular. Unión específica se define como la unión con una afinidad ( $K_a$ ) de al menos  $5 \times 10^4$  litros/mol, más preferiblemente  $5 \times 10^5$ , más preferiblemente más de  $5 \times 10^6$ , aún más preferiblemente  $5 \times 10^7$ , o más. Típicamente, los anticuerpos monoclonales pueden tener afinidades que van hasta  $10^8$  litros por mol, o incluso más. La mezcla de anticuerpos producida de acuerdo con la presente invención puede contener al menos dos anticuerpos que se unen a diferentes epítopos en la misma molécula de antígeno y/o puede contener al menos dos anticuerpos que se unen a diferentes moléculas de antígeno presentes en una mezcla que comprende el antígeno. Tal mezcla que comprende un antígeno puede ser una mezcla de antígenos parcial o totalmente purificados, tales como toxinas, componentes de la membrana y proteínas, proteínas de la envoltura viral, o puede ser una célula sana, una célula enferma, una mezcla de células, un tejido o mezcla de tejidos, un tumor, un órgano, un sujeto humano o animal completo, un hongo o levadura, una bacteria o un cultivo bacteriano, un virus o material de virus, combinaciones de estos, y similares. A diferencia de los anticuerpos monoclonales que son capaces de unirse solamente a un antígeno o epítipo único, la mezcla de anticuerpos de acuerdo con la presente invención puede por lo tanto tener muchas de las ventajas de una mezcla de anticuerpos policlonales u oligoclonales.

En una realización preferida, la célula hospedadora de acuerdo con el método de la invención es capaz de expresión de alto nivel de inmunoglobulina humana, es decir, al menos 1 pg/célula/día, preferiblemente al menos 10 pg/célula/día y aún más preferiblemente al menos 20 pg/célula/día o más, sin necesidad de la amplificación de las moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas pesadas y ligeras en dicha célula hospedadora. Preferiblemente, las células hospedadoras de acuerdo con la invención contienen en su genoma entre 1 y 10 copias de cada ácido nucleico recombinante que se ha de expresar. En la técnica, la amplificación del número de copias de

las secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína de interés p. ej. en células CHO se puede utilizar para aumentar los niveles de expresión de la proteína recombinante por las células (véanse, p. ej. Bendig, 1988; Cockett et al, 1990; Patente de EE.UU. 4.399.216 ). Este es actualmente un método muy utilizado. Sin embargo, se requiere un esfuerzo de requerimiento de tiempo importante antes de que se haya establecido un clon con un elevado número de copias deseado y altos niveles de expresión, y además los clones que albergan un número muy elevado de copias (hasta centenares) de la casete de expresión son a menudo inestables (p. ej. Kim et al., 1998). Por consiguiente, es una realización preferida de la presente invención el uso de células hospedadoras que no requieren tales estrategias de amplificación para la expresión de alto nivel de los anticuerpos de interés. Esto permite la rápida generación de clones estables de células hospedadoras que expresan la mezcla de anticuerpos de acuerdo con la invención de una manera consistente. Los autores de la presente invención proporcionan evidencia de que se pueden obtener células hospedadoras de acuerdo con la invención, subclonaras y propagarlas por al menos aproximadamente 30 divisiones celulares (duplicaciones de población), mientras que expresan la mezcla de anticuerpos de acuerdo con la invención de una manera estable, en ausencia de presión de selección. Por lo tanto, en ciertos aspectos de los métodos de la invención incluyen cultivar las células durante al menos 20, preferiblemente 25, más preferiblemente 30 duplicaciones de población, y en otros aspectos las células hospedadoras de acuerdo con la invención han experimentado al menos 20, preferiblemente 25, más preferiblemente 30 duplicaciones de población y son aún capaces de expresar una mezcla de anticuerpos de acuerdo con la invención.

Preferiblemente las células hospedadoras de acuerdo con el método de la invención son derivadas de células de la retina humana que han sido immortalizadas o transformadas con secuencias E1 adenovirales. Una célula hospedadora particularmente preferida de acuerdo con los métodos de la presente invención es PER.C6™ depositada bajo ECACC nº 96022940, o un derivado de la misma. Se pueden generar rápidamente clones derivados de PER.C6, normalmente contienen un número limitado de copias (aproximadamente 1 a 10) del transgén, y son capaces de la expresión de alto nivel de anticuerpos recombinantes (Jones et al, 2003). Por consiguiente, se espera que tales clones mantengan un número de copias estables durante muchas generaciones, lo que es una ventaja en la producción de productos biofarmacéuticos. Las células PER.C6™ han sido extensamente caracterizadas y documentadas, mostrando buen proceso de escalado, crecimiento de la suspensión e independencia del factor de crecimiento. Además, las células PER.C6™ se pueden incorporar en una suspensión de una manera muy reproducible, haciéndolas particularmente adecuadas para la producción a gran escala. En este aspecto, la línea celular PER.C6™ se ha caracterizado para el crecimiento en biorreactor, donde pueden crecer a densidades muy altas. El uso de PER.C6™ para la producción recombinante de anticuerpos ha sido descrito con detalle en la publicación WO 00/63403 y en Jones et al., 2003.

Es otro aspecto de la invención proporcionar una mezcla de anticuerpos que comprende una cadena ligera común y dos cadenas pesadas diferentes con una región variable diferente, en donde las dos cadenas pesadas diferentes son capaces de emparejamiento con dicha cadena ligera común, y en donde dichas cadenas pesadas difieren además en sus regiones constantes de manera suficiente como para que se reduzca la cantidad de anticuerpos biespecíficos en comparación con el porcentaje teórico de anticuerpos biespecíficos.

Es otro aspecto de la presente invención usar una mezcla de anticuerpos que puede obtenerse por un método de acuerdo con la invención. Se espera que tales mezclas de anticuerpos sea más eficaz que los componentes solos que la integran, en analogía con los anticuerpos policlonales que normalmente son más eficaces que los anticuerpos monoclonales para la misma diana. Tales mezclas pueden ser preparadas contra una diversidad de antígenos o epítopos diana.

Es otro aspecto de la presente invención proporcionar una composición farmacéutica que comprende una mezcla de anticuerpos producidos de forma recombinante de acuerdo con la invención, en donde dos secuencias de cadena pesada diferentes están representadas en la mezcla de anticuerpos recombinantes. Los anticuerpos monoclonales se producen de forma rutinaria por métodos recombinantes. La presente invención describe mezclas de anticuerpos útiles para el diagnóstico o el tratamiento en diversos campos. Las composiciones de acuerdo con la invención comprenden mezclas de dos cadenas pesadas diferentes emparejadas a cadenas ligeras en forma de anticuerpos. Preferiblemente, las cadenas ligeras de los anticuerpos en dichas mezclas tienen una cadena ligera común. Las mezclas pueden comprender anticuerpos biespecíficos. Las mezclas pueden producirse a partir de un clon que fue derivado de una única célula hospedadora, es decir, de una población de células que contienen las mismas secuencias de ácidos nucleicos recombinantes. Las mezclas se pueden obtener por métodos de acuerdo con la invención, o pueden producirse por células hospedadoras de acuerdo con la invención. La mezcla óptima para un determinado propósito puede determinarse empíricamente por métodos conocidos por los profesionales expertos en la técnica, o por métodos proporcionados por la presente invención. Tales composiciones de acuerdo con la invención pueden tener varias de las ventajas de una mezcla de anticuerpos policlonales, sin las desventajas normalmente asociadas de una manera inherente con las mezclas de anticuerpos policlonales, a causa de la forma en la que se producen. Se espera además que la mezcla de anticuerpos sea más eficaz que los anticuerpos monoclonales separados. Por consiguiente la dosis, y por tanto la capacidad de producción requerida, puede ser menor para las mezclas de anticuerpos de acuerdo con la invención que para los anticuerpos monoclonales.

Se ha descrito por ejemplo que, aunque ningún anticuerpo monoclonal contra la neurotoxina botulínica (BoNT/A) neutralizaba la toxina de una manera significativa, una combinación de tres de tales anticuerpos monoclonales (anticuerpos oligoclonales) neutralizó 450.000 50% de la dosis letal de BoNT/A, una potencia 90 veces mayor que la

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

Además, la probabilidad de una mezcla de la invención de perder su actividad debido a la pérdida de la diana o el epítipo, se reducen en comparación con un único anticuerpo monoclonal. En realizaciones particulares, 2 o 3 de los anticuerpos presentes en la mezcla de acuerdo con la invención tienen especificidades diferentes. Dichas especificidades diferentes pueden ser dirigidas a diferentes epítopos en el mismo antígeno y/o pueden ser dirigidas a diferentes antígenos presentes en una mezcla que comprende antígeno. Una composición de acuerdo con la invención puede comprender también 2 o 3 anticuerpos que tienen diferentes afinidades para el mismo epítipo. Los anticuerpos con afinidades diferentes para el mismo epítipo pueden ser generados por ejemplo por métodos de maduración de afinidad, conocidos por los expertos en la técnica.

En una realización particularmente preferida, la composición de acuerdo con la invención tiene un efecto que es mayor que el efecto de cada anticuerpo mono-específico individual presente en dicha composición. Dicho efecto se puede medir en un ensayo funcional. Un "ensayo funcional" según la presente invención es un ensayo que puede utilizarse para determinar uno o más parámetros deseados del anticuerpo o la mezcla de anticuerpos sujetos a las condiciones de ensayo. Ensayos funcionales adecuados pueden ser los ensayos de unión, ensayos de apoptosis, ensayos de citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC), citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), ensayos de inhibición del crecimiento o la proliferación de la células (efecto citostático), ensayos de muerte celular (efecto citotóxico), ensayos de señalización celular, ensayos para medir la inhibición de la unión de agentes patógenos a células diana, ensayos para medir la secreción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) u otras moléculas segregadas, ensayos para la bacteriostasis, actividad bactericida, neutralización de virus, ensayos para medir la atracción de los componentes del sistema inmunitario al sitio al que se unen los anticuerpos, incluyendo los métodos de hibridación *in situ*, métodos de marcaje, y similares. Claramente, también se pueden utilizar para este propósito ensayos *in vivo*, tales como modelos animales, incluyendo modelos tumorales de ratón, modelos de enfermedad autoinmunitaria, modelos de roedores o primates infectados por virus o por bacterias, y similares. La eficacia de una mezcla de anticuerpos de acuerdo con la invención puede compararse con los anticuerpos individuales en tales modelos por métodos generalmente conocidos para los expertos en la técnica.

Es otro aspecto de la presente invención proporcionar un método para identificar al menos un clon de célula hospedadora que produce una mezcla de anticuerpos, en donde dicha mezcla de anticuerpos tiene un efecto deseado de acuerdo con un ensayo funcional, comprendiendo el método las etapas de: (i) proporcionar una célula hospedadora que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica al menos una cadena ligera y una secuencia o secuencias de ácidos nucleicos que codifican dos cadenas pesadas diferentes, en donde dichas cadenas pesadas y ligeras son capaces de emparejarse entre sí; (ii) cultivar al menos un clon de dicha célula hospedadora bajo condiciones que conducen a la expresión de dichas secuencias de ácido nucleico, (iii) someter a cribado al menos dicho clon de la célula hospedadora para la producción de una mezcla de anticuerpos que tiene el efecto deseado mediante un ensayo funcional, y (iv) identificar al menos un clon que produce una mezcla de anticuerpos que tienen el efecto deseado. Preferiblemente, dicha célula hospedadora comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena ligera común que es capaz de emparejarse con dichas dos diferentes cadenas pesadas, de forma tal que los anticuerpos producidos comprenden cadenas ligeras comunes, como se describió anteriormente. En realizaciones específicas dicho cultivo en la etapa (ii) y dicho cribado en la etapa (iii) del método se realiza con al menos dos clones. El método puede incluir opcionalmente un ensayo para medir los niveles de expresión de los anticuerpos que se producen, el cual ensayo puede ser durante o después de la etapa (ii) de acuerdo con el método, o más tarde en el procedimiento. Tales ensayos son bien conocidos por los expertos en la técnica, e incluyen ensayos de concentración de proteínas, ensayos específicos de inmunoglobulinas tales como ELISA, RIA, DELFIA, y similares. Los ensayos funcionales útiles para el método de acuerdo con la invención pueden ser ensayos para la apoptosis, ADCC, CDC, muerte celular, inhibición de la proliferación, neutralización de virus, opsonización de bacterias, señalización mediada por receptor, señalización celular, actividad bactericida, y similares. Ensayos de cribado útiles para anticuerpos anticáncer han sido descritos por ejemplo en la patente de EE.UU. 6.180.357. Tales ensayos pueden también ser usados para identificar un clon de acuerdo con el método de la presente invención. Es por ejemplo posible utilizar ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) para el ensayo de unión del anticuerpo a su diana. Usando tales ensayos, es posible cribar en relación con mezclas de anticuerpos que se unen lo más ávidamente el antígeno diana (o mezcla de antígenos diana contra los que se va a probar la mezcla de anticuerpos). Otra posibilidad que puede explorarse es cribar directamente en relación con la citotoxicidad o los efectos citostáticos. Es posible que tras tal cribado diferente, se elegirán otros o los mismos clones que producen mezclas de anticuerpos que con el ELISA mencionado anteriormente. El cribado en relación con la muerte celular o el cese del crecimiento de células cancerosas se puede utilizar adecuadamente de acuerdo con la invención. La muerte celular puede medirse mediante diversos puntos finales, incluyendo la ausencia de metabolismo o la desnaturalización de las enzimas. En una posible realización de la presente invención, el ensayo se lleva a cabo enfocando sobre la actividad citotóxica hacia células cancerosas como punto final. Para este ensayo puede utilizarse adecuadamente un kit de ensayo *in vivo*/muerto, por ejemplo el kit para ensayo LIVE/DEAD® de viabilidad/citotoxicidad (L-3224) por Molecular Probes. También se pueden utilizar otros métodos de evaluación de la viabilidad celular, tales como la exclusión de azul de tripano, liberación de <sup>51</sup>Cr, calceína-AM, Azul Alamar™, actividad de LDH, y métodos similares. Los ensayos pueden incluir también el cribado de la mezcla de anticuerpos

en relación con la especificidad para el tejido antígeno que comprende el deseado. Los anticuerpos de acuerdo con la invención pueden tener una distribución de tejido limitada. Es posible incluir probar las mezclas de anticuerpos contra una diversidad de células, tipos de células, o tejidos, para el cribado en relación con mezclas de anticuerpos que se unen preferiblemente a las células, tipos de células o tejidos de interés.

5 Al margen de un ensayo funcional como se describió anteriormente, la presente invención también enseña formas de determinar la identidad de los anticuerpos expresados por un clon, usando métodos tales como enfoque isoeléctrico (IEF), espectrometría de masas (MS), y similares. Es por tanto un aspecto de la invención proporcionar el uso de MS y/o IEF en la selección de un clon que expresa una mezcla de anticuerpos de acuerdo con la invención.

10 Cuando los anticuerpos monoclonales son producidos por células hospedadoras recombinantes, normalmente se lleva a cabo una etapa de cribado para evaluar los niveles de expresión de los clones individuales que se generaron. La adición de más cadenas pesadas para producir mezclas añade un nivel de complejidad a la producción de anticuerpos. Cuando las células hospedadoras son transfectadas con moléculas de ácidos nucleicos que codifican las cadenas ligeras y pesadas que formarán la mezcla de anticuerpos deseada, pueden surgir clones  
15 independientes que contienen la misma información genética, pero que sin embargo difieren en los niveles de expresión, produciendo así diferentes relaciones de los anticuerpos codificados, dando lugar a diferentes mezclas de anticuerpos a partir del mismo repertorio genético. El método de acuerdo con la invención es útil para la identificación de un clon que produce una mezcla óptima para un cierto propósito.

El cultivo y/o cribado de acuerdo con las etapas (ii) y (iii), respectivamente, puede llevarse a cabo adecuadamente usando procedimientos de alto rendimiento, opcionalmente en forma automatizada. Los clones pueden ser  
20 cultivados por ejemplo en placas de 96 pocillos u otras placas pocillos múltiples, p. ej. en formato matricial, y pueden ser cribados para la producción de una mezcla deseada. Se puede emplear adecuadamente la robótica para este fin. Los métodos para poner en práctica el cultivo de alto rendimiento y los ensayos están disponibles generalmente y son conocidos por los expertos en la técnica. Está claro que, también para este método de acuerdo con la  
25 invención, es beneficioso usar células hospedadoras capaces de expresión de alto nivel de proteínas, sin necesidad de amplificación del ácido nucleico que codifica dichas proteínas en dicha célula. En una realización, dicha célula hospedadora se deriva de una célula de retinoblasto embrionario humano, que ha sido inmortalizada o transformada por secuencias E1 adenovirales. En una realización preferida, dicha célula se deriva de PER.C6™. Esta línea celular ha demostrado ya ser susceptible de manipulaciones de alto rendimiento, incluyendo el cultivo (documento WO 99/64582).  
30

En realizaciones específicas de la presente invención, dicha mezcla de anticuerpos de acuerdo con el método de identificación de al menos una célula hospedadora de acuerdo con la invención comprende al menos 2 o 3 anticuerpos que tienen diferentes especificidades y/o afinidades.

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

El clon que ha sido identificado por el método de acuerdo con la invención, puede ser usado para producir una  
40 mezcla de anticuerpos deseada. Por tanto, es otro aspecto de la presente invención proporcionar un método para producir una mezcla de anticuerpos, comprendiendo el método la etapa de cultivar un clon de célula hospedadora identificado por el método de identificación de al menos un clon de célula hospedadora que produce una mezcla de anticuerpos de acuerdo con la invención, siendo dicho cultivo bajo condiciones que conducen a la expresión de las  
45 moléculas de ácido nucleico que codifican la cadena ligera y las dos cadenas pesadas diferentes. Los anticuerpos producidos se pueden recuperar de las células hospedadoras y/o del cultivo de células hospedadoras, p. ej. del medio de cultivo. La mezcla de anticuerpos puede ser recuperada de acuerdo con diversas técnicas conocidas por los expertos en este campo. Una mezcla de anticuerpos que puede obtenerse por el método de acuerdo con la invención descrito anteriormente se puede utilizar para una diversidad de propósitos, tales como en el tratamiento o el diagnóstico de enfermedades, y puede sustituir a anticuerpos monoclonales o policlonales, o ser usada además  
50 de ellos.

Los métodos de acuerdo con la presente invención pueden utilizar adecuadamente moléculas de ácido nucleico para la codificación de los anticuerpos, las cuales moléculas de ácido nucleico han sido obtenidas por cualquier método adecuado, incluyendo *in vivo*, p. ej. métodos de inmunización, o *in vitro*, p. ej. métodos de presentación de anticuerpos (A. Plückthun . et al, In vitro selection and evolution of proteins, en Adv. Prot. Chem., F. M. Richards et al, Eds, Academic Press, San Diego, 2001, vol 55: 367 - 403), tales como presentación de fagos, presentación de  
55 ribosomas o presentación de mRNA (C. Schaffitzel et al, In vitro selection and evolution of protein-ligand interactions by ribosome display, en Protein-Protein Interactions: A Molecular Cloning Manual, E. Golemis, Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva Cork, 2001, p. 535 - 567), y presentación en levadura (p. ej. documento WO 99/36569). Los métodos para identificar anticuerpos contra una diana determinada, la cual diana puede ser un  
60 antígeno conocido o un antígeno desconocido presente en una mezcla de antígenos, mediante presentación de

fagos, son conocidos por los expertos en la técnica. En general, una biblioteca de fagos que expresan un dominio de unión con el antígeno o derivado del mismo en su superficie, dicho dominio de unión con el antígeno codificado por el material genético presente en dichos fagos, se incubó con el antígeno o mezcla de antígenos de interés, después de lo cual se obtiene la unión de una subpoblación de los fagos que muestran sitios de unión con el antígeno deseado mientras que los fagos no de unión son desechados. Tales etapas de selección pueden repetirse una, dos, o más veces para obtener una población de fagos que son más o menos específicos para el antígeno de interés. Los métodos de presentación de fagos para obtener anticuerpos, partes o derivados de los mismos han sido ampliamente descritos p. ej. en (CF Barbas III et al, Phage Display. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 2001). La biblioteca usada para tal cribado puede ser generada usando la información genética de una o más cadenas ligeras, combinada con la información genética que codifica una diversidad de cadenas pesadas. La biblioteca descrita por De Kruif et al. (1995b) comprende 7 cadenas ligeras. Por tanto, en un panel de fagos que se unen a una diana, que puede p. ej. ser obtenido por los métodos descritos en De Kruif et al (supra); patente de EE.UU. 6.265.150, se representarán no más de 7 cadenas ligeras diferentes, y si el panel es suficientemente grande, se pueden encontrar varios fagos con la misma cadena ligera acoplada a cadenas pesadas no relacionadas. Tales fagos se pueden usar para obtener las moléculas de ácido nucleico útiles en los métodos de acuerdo con la presente invención.

Es otro aspecto de la presente invención proporcionar un método de cribado para una mezcla de anticuerpos que es capaz de unirse a una diana, comprendiendo el método las etapas de:

- i) poner una biblioteca de presentación de anticuerpos que comprende anticuerpos en contacto con material que comprende una diana;
- ii) al menos una etapa de seleccionar anticuerpos que se unen a dicha diana;
- iii) identificar al menos dos anticuerpos que se unen a dicha diana, en donde dichos al menos dos anticuerpos comprenden una cadena ligera común;
- iv) introducir una secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena ligera común y una secuencia de ácidos nucleicos o secuencias de ácidos nucleicos que codifican dos cadenas pesadas de dichos al menos dos anticuerpos en una célula hospedadora;
- v) cultivar un clon de dicha célula hospedadora bajo condiciones que conducen a la expresión de dichas secuencias de ácidos nucleicos;
- vi) cribar dicho clon de dicha célula hospedadora en relación con la producción de una mezcla de anticuerpos que tienen un efecto deseado mediante un ensayo funcional; y
- (vii) identificar al menos un clon que produce una mezcla de anticuerpos que tienen el efecto deseado.

La biblioteca de presentación del anticuerpo puede ser una biblioteca de presentación de fago, una biblioteca de presentación de ribosoma, una biblioteca de presentación de mRNA, o una biblioteca de presentación de levadura. Los pasos i) y ii) pueden opcionalmente repetirse una o más veces.

Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos obtenidos por el método de presentación de fagos, presentación de ribosomas o presentación de levadura se pueden convertir para codificar cualquier formato de anticuerpo deseado, tal como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgD, IgE, antes de introducirlas en una célula hospedadora, usando métodos estándar de clonación molecular y medios conocidos por los expertos en la técnica (p. ej. descrito en Boel et al, 2000).

Los expertos en la técnica entenderán que las bibliotecas en las que está representada solamente una cadena ligera son especialmente útiles a la luz de la presente invención, ya que todos los anticuerpos que pueden obtenerse a partir de dicha biblioteca tendrán una cadena ligera común que es funcional en la unión del antígeno diana con cada una de las cadenas pesadas. En otras palabras, de acuerdo con los métodos de la invención se evita la formación de dímeros de cadena ligera-cadena pesada no funcionales. Se han descrito en la técnica bibliotecas de presentación de anticuerpos de fago que tienen repertorios extensivos de cadena H y secuencias de cadena L únicas o muy pocas (Nissim et al, 1994; Vaughan et al, 1996). En general, la especificidad de un anticuerpo parece estar determinada en gran medida por su cadena pesada. Incluso es posible para el cribado y la identificación de cadenas ligeras que no contribuyen significativamente a la unión del anticuerpo, las cuales cadenas ligeras podrían también ser utilizadas adecuadamente de acuerdo con la invención. También pueden seguirse las enseñanzas de la presente invención, pero usar una cadena pesada y variar las cadenas ligeras. Sin embargo, parece preferible el uso de una cadena ligera común y diferentes cadenas pesadas, y las observaciones que siguen apoyan la idea de que la especificidad de un anticuerpo parece estar dominada por su secuencia de la cadena pesada. En el proceso de edición del receptor, un mecanismo de las células B para monitorizar si su receptor de inmunoglobulina codifica un autoanticuerpo potencialmente nocivo, las células B que expresan un autoanticuerpo reemplazan la cadena pesada expresada con otra cadena pesada aunque mantiene la cadena ligera expresada. Así pues, se genera una nueva especificidad para el anticuerpo que no codifica un autoanticuerpo. Esto indica que una sola cadena ligera puede dimerizarse con éxito con múltiples cadenas pesadas para formar diferentes especificidades de anticuerpo

(Nemazee, 2000; Casellas et al, 2001). Se han publicado serie de líneas de células transfectadas utilizando un único gen de cadena pesada con diferentes genes de cadena ligera, manteniendo los anticuerpos producidos en gran medida su especificidad, al margen de la cadena ligera (Radic et al, 1991). Se han obtenido diferentes anticuerpos a partir de una biblioteca que ha sido construida usando una sola cadena ligera (Nissim et al, 1994). Los autores de la presente invención han obtenido varios anticuerpos a partir de la biblioteca descrita por De Kruijff et al (1995), que fue construida usando 7 cadenas ligeras, que tienen la misma cadena ligera, pero diferentes especificidades (p. ej. véase el ejemplo 1: anticuerpos que se unen a EpCAM y a CD46, descritos en el documento WO 01/48485 y WO 02/18948, respectivamente). Además de cribar una biblioteca de fagos contra una diana, será también posible empezar con un anticuerpo que ya ha probado sus méritos, y usar la cadena ligera de este anticuerpo en la preparación de una biblioteca de cadenas pesadas combinadas con sólo esta cadena ligera concreta, de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica, tales como la presentación de fagos. Usando esta estrategia, se puede utilizar un anticuerpo monoclonal para obtener una mezcla de anticuerpos de acuerdo con la invención, que se parece funcionalmente a un anticuerpo policlonal u oligoclonal para la misma diana. Alternativamente puede usarse un método que recuerda el método descrito por Jespers et al (1994) para obtener un anticuerpo humano basado en un anticuerpo funcional de roedor. La cadena pesada de un anticuerpo conocido de origen no humano se clona en primer lugar y se empareja como una cadena de plantilla con repertorio de cadenas ligeras humanas para su uso en la presentación de fago, después de lo cual los fagos se seleccionan en cuanto a su unión al antígeno o a la mezcla de antígenos. La cadena ligera seleccionada se empareja a su vez con un repertorio de cadenas pesadas humanas presentadas en un fago, y los fagos se seleccionan de nuevo para encontrar varias cadenas pesadas que cuando se emparejan con la cadena ligera son capaces de unirse al antígeno o mezcla de antígenos de interés. Esto permite crear una mezcla de anticuerpos humanos contra una diana para la cual hasta ahora sólo se describe un anticuerpo monoclonal no humano. Es posible que una mezcla de acuerdo con la presente invención tenga ya efectos funcionales beneficiosos cuando los anticuerpos individuales no tienen afinidades elevadas para la diana, mientras que a menudo se requieren afinidades elevadas para los anticuerpos monoclonales para que sean eficaces. Esto tendría la ventaja de que puede requerirse la maduración de la afinidad para métodos y mezclas de acuerdo con la presente invención en menos casos que cuando se prevé un planteamiento con anticuerpos monoclonales.

Las secuencias de codificación de la cadena pesada y ligera se pueden introducir simultáneamente o consecutivamente en la célula hospedadora. También es un aspecto de la invención preparar una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico recombinante que codifica una cadena ligera de un anticuerpo. Tal célula puede obtenerse por ejemplo por transfección de dicho ácido nucleico, y, opcionalmente, puede ser identificado un clon que tiene una alta expresión de la cadena ligera. Entonces puede usarse un clon establecido para añadir información genética que codifica 2 cadenas pesadas de la invención introduciendo las moléculas de ácido nucleico que codifican estas en células del clon que ya contienen la cadena ligera. Las moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas pesadas pueden ser introducidas en dicha célula hospedadora de forma concomitante. Evidentemente es también posible introducirlas consecutivamente, p. ej. utilizando diferentes marcadores de selección, lo que puede ser ventajoso si no se pueden introducir simultáneamente todas las cadenas pesadas porque las células no ocupan suficientes copias de moléculas de ácido nucleico recombinantes. Los métodos para introducir moléculas de ácido nucleico recombinantes en células hospedadoras son bien conocidos por los expertos en la técnica, e incluyen transfección, electroporación, precipitación con fosfato cálcico, infección por virus, y similares. El experto en la técnica tiene varias posibilidades para introducir más vectores con secuencias de ácido nucleico de interés en la misma célula hospedadora, véase p. ej. Sambrook, Fritsch y Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición, 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel FM, y otros, eds, 1987; la serie *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.). Pueden ser marcadores de selección dominante adecuados para introducir ácidos nucleicos en células hospedadoras eucariotas de acuerdo con la invención el G418 o neomicina (geneticina), higromicina o ácido micofenólico, puromicina, y similares, para los que se dispone en vectores de expresión de genes que codifican la resistencia. Otras posibilidades incluyen p. ej. el uso de vectores que contienen genes DHFR o glutamato sintetasa para selección en presencia de metotrexato en una célula DHFR- o la ausencia de glutamina en una glutamina auxotrofa, respectivamente. El uso de vectores de expresión con diferentes marcadores de selección permite subsiguientes transfecciones con secuencias de cadena pesada de interés en la célula hospedadora, que ya contiene establemente otras cadenas pesadas introducidas con anterioridad por el uso de otros marcadores de selección. También es posible usar marcadores de selección que pueden ser usados más de una vez, p. ej. cuando contienen mutaciones, intrones, o promotores debilitados que las hacen dependientes de la concentración (por ejemplo, los documentos EP0724639, WO01/32901 y patente de EE.UU. nº 5.733.779). Alternativamente, un marcador de selección puede ser reutilizado borrándolo de la célula hospedadora después de su uso, p. ej. mediante recombinación específica del sitio. Un marcador seleccionable localizado entre secuencias reconocidas por una recombinasa específica del sitio, p. ej. sitios lox o sitios FRT, se utiliza para la generación del primer transfectante estable (véase, por ejemplo, recombinación específica del sitio Cre-lox Wilson y de Kola, 2001). Posteriormente, el marcador seleccionable se escinde del ADN de la célula hospedadora por la recombinasa específica de sitio concordante, p. ej. Cre o Flp. Una transfección subsiguiente puede usar adecuadamente el mismo marcador de selección. Se pueden preparar diferentes clones de células hospedadoras que comprenden cada uno de ellos la información genética que codifica una cadena ligera diferente. Si los anticuerpos se identifican mediante un método de presentación de anticuerpos, es entonces posible preparar varias células hospedadoras, que comprende cada una de ellas una cadena ligera presente en la biblioteca de presentación de anticuerpos. Después de identificar los anticuerpos que se unen a una diana usando presentación

de anticuerpo, se pueden introducir las moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas pesadas en la célula hospedadora que contiene la cadena ligera común que es capaz de emparejarse con las cadenas pesadas. En otro aspecto de acuerdo con la invención más, se proporciona un método para hacer obtener célula hospedadora recombinante para la producción de una mezcla de anticuerpos, comprendiendo el método la etapa de introducir

5 secuencias de ácidos nucleicos que codifican 2 cadenas pesadas diferentes en una célula hospedadora recombinante que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cadena ligera común capaz de emparejarse con las dos cadenas pesadas, dando como resultado solamente regiones de unión funcionales.

En el caso en que parece que una célula hospedadora recombinante de acuerdo con la invención no expresa cadena ligera suficiente para dimerizarse con las dos cadenas pesadas expresadas, pueden transfectarse en la

10 célula copias extra de las moléculas de ácido nucleico que codifican la cadena ligera.

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

15

Otro aspecto más de la presente invención es proporcionar un animal no humano transgénico o una planta transgénica que comprende una secuencia de ácido nucleico recombinante que codifica una cadena ligera común y una secuencia de ácido nucleico recombinante o secuencias que codifican al menos dos cadenas pesadas diferentes que son capaces de emparejarse con dicha cadena ligera común, en donde dichas secuencias de ácido

20 nucleico recombinante que codifican dichas cadenas ligera y pesada están bajo el control de un promotor específico del tejido. Los promotores en las plantas pueden ser también no específicos del tejido, y también se pueden utilizar los elementos generales de expresión génica, tales como el promotor 35S de CaMV y el sitio de adición de poliA de la nopalina sintasa. Dicha cadena ligera es una cadena ligera común acuerdo con la invención. En realizaciones específicas, el animal o planta transgénicos de acuerdo con la invención comprende 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más secuencias de cadena pesada. Además del cultivo de células como sistema de producción para proteínas recombinantes, la técnica describe también el uso de animales transgénicos, plantas transgénicas, y, por ejemplo

25 pollos transgénicos para producir proteínas en los huevos, y lo mismo para producir proteínas recombinantes de interés (Pollock et al, 1999; Larrick y Thomas, 2001; documento WO 91/08216). Estos comprenden normalmente el gen o genes recombinantes que codifican una o más proteínas de interés en asociación operativa con un promotor específico del tejido. Se ha demostrado por ejemplo que se pueden producir anticuerpos recombinantes en altos niveles en la leche de animales transgénicos, que contiene los ácidos nucleicos que codifican una cadena pesada y una ligera detrás de un promotor específico de la glándula mamaria (p. ej. Pollock et al, 1999; documento WO 95/17085). En este sentido son particularmente útiles las vacas, ovejas, cabras, cerdos, conejos, ratones, y similares, que pueden ser ordeñadas para obtener anticuerpos. Son promotores útiles los promotores de caseína, tales como el promotor de  $\beta$ -caseína, el promotor de  $\alpha$ S1-caseína, el promotor de la proteína ácida del suero (WAP), el promotor de  $\beta$ -lactoglobulina, el promotor de  $\alpha$ -lactoalbúmina, y similares. La producción de proteínas biofarmacéuticas en la leche de mamíferos transgénicos ha sido descrita ampliamente (p. ej. Pollock et al, 1999). Además de los promotores específicos de la glándula mamaria, también se pueden utilizar otros promotores específicos del tejido, que dirigen la expresión a la sangre, orina, saliva, y similares. La generación de animales transgénicos que comprenden moléculas de ácido nucleico recombinante ha sido ampliamente documentada, y puede incluir micro-inyección de oocitos (véase p. ej. Wilmut y Clark, 1991), transferencia nuclear después de la transfección (p. ej. Schnieke et al, 1997), infección por virus recombinantes (por ejemplo, patente de EE.UU. nº 6.291.740), y similares. La transferencia nuclear y métodos de clonación para células de mamífero son conocidos por los expertos en la técnica, y se describen por ejemplo en Campbell et al, 1996; Wilmut et al, 1997; Dinnyes et al, 2002; documento WO 95/17500; documento WO 98/39416). Actualmente es posible clonar la mayoría de estos animales para generar líneas de animales que son genéticamente idénticos, lo que hace posible que un experto en la técnica pueda crear tal línea una vez ha sido identificado un animal individual que produce la mezcla de anticuerpos deseada. Alternativamente, se pueden utilizar métodos clásicos de mejoramiento para generar descendencia transgénica. Se describen estrategias para la generación de animales transgénicos para la producción de proteínas recombinantes en la leche, en Brink et al, 2000.

30

35

40

45

50

También se han descrito plantas transgénicas o células vegetales que producen anticuerpos (Hiatt et al, 1989; Peeters et al, 2001), y entre las plantas útiles con este propósito se incluyen el maíz, el tabaco, la soja, la alfalfa, el arroz, y similares. Los promotores constitutivos que por ejemplo pueden ser utilizados en las células vegetales son los promotores 35S y 19S de CaMV, promotores de *Agrobacterium* *nos* y *ocs*. Otros promotores útiles son los promotores inducibles por la luz tales como *rbcS*. Promotores específicos del tejido pueden ser por ejemplo

55 específicos de la semilla, tales como los promotores de zeína, napina, beta-faseolina, ubiquitina, o específicos de tubérculo, específicos de la hoja (p. ej. útil en el tabaco), específicos de la raíz, y similares. También es posible transformar el organelo plástido por recombinación homóloga, para expresar proteínas en plantas. Los métodos y medios para la expresión de proteínas en plantas recombinantes o partes de las mismas, o cultivo de células de plantas recombinantes, son conocidos por los expertos en la técnica y han sido descritos, p. ej., en Giddings et al, 2000; documento WO 01/64929; documento WO 97/42313; patentes de EE.UU. nº 5888789, 6080560; véase, para directrices prácticas: *Methods in Molecular Biology* vol. 49 "Plant Gene Transfer And Expresión Protocols", Jones H, 1995). Se han descrito también otros sistemas transgénicos para la producción de proteínas recombinantes,

60



incluyendo el uso de pájaros transgénicos para producir proteínas recombinantes en los huevos (p. ej. documento WO 97/47739), y el uso de peces transgénicos (p. ej. documento WO 98/15627), y pueden ser utilizados en combinación con las enseñanzas de la presente invención para obtener mezclas de anticuerpos. También es posible utilizar un sistema de transcripción/traducción *in vitro* o sistema de traducción *in vitro* para la expresión de mezclas de anticuerpos de acuerdo con la presente invención. Estará claro para los expertos en la técnica que las enseñanzas de la actual invención permitirán producir mezclas de anticuerpos en sistemas en los que puede ser introducido y expresado el ácido nucleico recombinante que codifica la cadena ligera y las cadenas pesadas. Preferiblemente, tales sistemas son capaces de producir anticuerpos codificados por dichas secuencias de ácido nucleico, sin usar la amplificación de dichas secuencias de ácidos nucleicos en dichos sistemas. En otro aspecto de la invención, se utiliza una célula de un animal no humano transgénico o una planta transgénica de acuerdo con la invención. Tales células se pueden utilizar para generar los animales o las plantas de acuerdo con la invención, usando técnicas conocidas por los expertos en la técnica, tales como transferencia nuclear u otros métodos conocidos de clonar organismos enteros a partir de células individuales. Las células de acuerdo con la invención también se pueden obtener mediante la introducción de las secuencias de la cadena ligera y por lo menos dos cadenas pesadas en células aisladas de animales no humanos o plantas, las cuales las células son capaces de convertirse en parte de un animal o una planta transgénicos. Particularmente útil para tales propósitos son las células madre embrionarias. Estas pueden contribuir a la línea germinal, y por consiguiente la información genética introducida en tales células se pueden pasar a generaciones futuras. Además, pueden utilizarse como huéspedes cultivos de células vegetales de algodón, maíz, tomate, soja, patata, petunia y tabaco, cuando se transforman con las moléculas de ácido nucleico que codifican la cadena ligera y las cadenas pesadas, p. ej. usando la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* transformadora de la planta o por bombardeo de partículas, o por infección con virus de plantas recombinantes.

Es otro aspecto de la presente invención proporcionar una composición farmacéutica que comprende una mezcla de anticuerpos producidos de forma recombinante y un vehículo adecuado, en donde dos cadenas pesadas diferentes y una cadena ligera común están representadas en dicha mezcla de anticuerpos producidos de forma recombinante, y por lo cual los dos cadenas pesadas diferentes son capaces de emparejarse con dicha cadena ligera común. Los vehículos farmacéuticamente aceptables como se usan en el presente documento se ejemplifican, pero sin limitarse a ellos, con adyuvantes, vehículos sólidos, agua, tampones, u otros vehículos usados en la técnica para mantener los componentes terapéuticos, o combinaciones de los mismos. Dicha mezcla puede comprender anticuerpos biespecíficos. Dicha mezcla puede ser producida a partir de un clon que fue derivado de una sola célula hospedadora, es decir, de una población de células que contienen las mismas moléculas de ácido nucleico recombinante. La expresión "producido de forma recombinante" tal como se utiliza en el presente texto, se refiere a la producción por las células hospedadoras que producen anticuerpos codificados por ácidos nucleicos recombinantes introducidos en tales células hospedadoras o de los antepasados de los mismos. Por tanto, no incluye el método clásico de producir anticuerpos policlonales, por el que un sujeto es inmunizado con un antígeno o una mezcla que comprende antígeno, después de lo cual los anticuerpos producidos por este sujeto son recuperados a partir del sujeto, p. ej. de la sangre.

Es otro aspecto de la presente invención proporcionar una mezcla de anticuerpos de acuerdo con la invención u obtenible por un método de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento o diagnóstico de una enfermedad o trastorno en un sujeto humano o animal. En otro aspecto, la invención proporciona el uso de una mezcla de anticuerpos en los que están presentes dos cadenas pesadas diferentes y una cadena ligera común, para la preparación de un medicamento para ser usado en el tratamiento o el diagnóstico de una enfermedad o trastorno en un sujeto humano o animal. Las mezclas pueden comprender anticuerpos biespecíficos, y pueden ser producidos de forma recombinante a partir de un clon que fue derivado de una sola célula hospedadora, es decir, de una población de células que contienen las mismas moléculas de ácido nucleico recombinante. Las dianas se pueden usar para cribar una biblioteca de presentación de anticuerpo, como se describió anteriormente, para obtener 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más anticuerpos que comprenden una cadena ligera común que se une a la diana, y producir una mezcla de éstos de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención. Prácticamente cualquier área de la medicina en la que se pueden utilizar anticuerpos monoclonales es válida para el uso de las mezclas de acuerdo con la invención. Esto puede incluir por ejemplo el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias y del cáncer, incluyendo tumores sólidos del cerebro, cáncer de cabeza y cuello, mama, próstata, colon, pulmón, y similares, así como tumores hematológicos tales como tumores de células B. Los trastornos neoplásicos que se pueden tratar con las mezclas de acuerdo con la presente invención incluyen leucemias, linfomas, sarcomas, carcinomas, tumores de células neuronales, carcinomas de células escamosas, tumores de células germinales, metástasis, tumores indiferenciados, seminomas, melanomas, mielomas, neuroblastomas, tumores de células mixtas, neoplasias causadas por agentes infecciosos y otras enfermedades malignas. Las dianas para las mezclas de anticuerpos pueden incluir, pero no se limitan a ellas, el receptor de HER-2/neu, otros receptores de factores de crecimiento tales como el receptor de VEGFR1 y VEGFR2, marcadores de células B tales como CD19, CD20, CD22, CD37, CD72, etc., marcadores de células T tales como CD3, CD25, etc., otros marcadores de la superficie celular de leucocitos, tales como CD33 o HLA-DR, etc., citocinas tales como TNF, interleucinas, receptores para estas citocinas, tales como miembros de la familia de receptores de TNF, y similares. Se espera que el uso de tales mezclas de anticuerpos en el tratamiento de tejidos cancerosos u otras células que comprenden multi-antígenos complejos tales como microorganismos o virus dará lugar a menos aparición de variantes de escape de pérdida de epítipo que el uso de anticuerpos monoclonales individuales. Varios tratamientos usan actualmente mezclas policlonales de anticuerpos, que se derivan de personas

o animales inmunizados. Estos tratamientos pueden ser reemplazados por el uso de las mezclas de acuerdo con la presente invención. El uso de estas mezclas puede también incluir el uso en rechazos de injerto contra hospedador, conocidos en la técnica de los trasplantes, p. ej. mediante el uso de anticuerpos anti-timocitos. Se espera que las mezclas de anticuerpos sean superiores a los anticuerpos monoclonales en el tratamiento de antígenos complejos o mezclas que comprenden antígeno tales como bacterias o virus. Por tanto, el uso de acuerdo con la invención también puede incluir el uso contra cepas de bacterias y hongos, p. ej. en el tratamiento de enfermedades infecciosas debidas a bacterias patógenas tales como *S. aureus* multirresistente y similares, hongos tales como las especies de *Candida albicans* y *Aspergillus*, levaduras y similares. Las mezclas según la invención también se pueden usar para la profilaxis post-exposición contra virus, tales como los miembros del género *Lyssavirus* p. ej. virus de la rabia, o para uso terapéutico o profiláctico contra virus tales como el virus varicela-zóster, adenovirus, virus sincitial respiratorio, virus de la inmunodeficiencia humana, metaneumovirus humano, virus de la influenza, virus del Nilo Occidental, el virus que causa el síndrome respiratorio agudo severo (SARS), y similares. También pueden ser usadas mezclas de acuerdo con las invenciones para proteger contra agentes, tanto bacterias como virus, y contra las sustancias tóxicas que son amenazas potenciales de la guerra biológica. Por tanto, el uso de acuerdo con la invención puede incluir también el uso contra cepas de bacterias tales como *Bacillus anthracis*, toxina de *Clostridium botulinum*, toxina épsilon de *Clostridium perfringens*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, *Coxiella burnetii*, *Brucella* especies, enterotoxina B de *Staphylococcus*, o contra virus tales como el de la viruela mayor, alfavirus que causa síndromes de meningoencefalitis (EEEV, VEEV y WEEV), virus conocidos por causar fiebres hemorrágicas tales como los virus Ebola, Marburg y Junin, o contra virus tales como el virus Nipah, Hantavirus, virus de la encefalitis transmitida por la garrapata y el virus de la fiebre amarilla, o contra toxinas p. ej. la toxina ricina de *Ricinus communis* y similares. El uso de las mezclas de acuerdo con la invención también puede incluir el uso contra parásitos unicelulares o multicelulares. Mezclas recombinantes de anticuerpos de acuerdo con la invención pueden convertirse en una alternativa segura a los anticuerpos policlonales obtenidos a partir de agrupaciones de sueros humanos para la inmunización pasiva, o a partir de sueros de animales hiperinmunizados. Las mezclas pueden ser más eficaces que los anticuerpos monoclonales recombinantes en diversas aplicaciones terapéuticas, incluyendo el cáncer, alergia, enfermedades virales, inflamación crónica, y similares.

Se ha descrito que la homodimerización de anticuerpos monoclonales reactivos a tumores aumenta notablemente su capacidad para inducir la detención del crecimiento o la apoptosis de las células tumorales (Ghetie et al, 1997). Posiblemente, cuando los anticuerpos contra los receptores u otros antígenos de superficie sobre las células diana, tales como células tumorales o microorganismos infecciosos, se producen de acuerdo con la presente invención, los anticuerpos biespecíficos presentes en mezclas de acuerdo con la invención pueden también entrecruzar diferentes receptores u otros antígenos sobre la superficie de las células diana, y por tanto tales mezclas pueden ser muy adecuadas para matar tales células. Alternativamente, cuando los anticuerpos biespecíficos son menos deseables, la presente invención proporciona también métodos para producir de forma recombinante mezclas de anticuerpos que comprenden anticuerpos principalmente monoespecíficos. Se ha descrito que la eficacia del tratamiento con Rituximab™ (anticuerpo monoclonal anti-CD20) aumentó cuando se añadieron anticuerpos anti-CD59 (Herjunpaa et al., 2000). Por tanto, es de esperar que la inclusión de anticuerpos contra CD59 en una mezcla de acuerdo con la invención que comprende anticuerpos anti-tumorales en forma de anticuerpos que reconocen el receptor de células B aumente la sensibilidad de las células tumorales al ataque del complemento. También se ha demostrado que un cóctel de triple combinación de inmunotoxinas saporina anti-CD19, anti-CD22, y anti-CD38 es mucho más eficaz que los componentes individuales en el tratamiento del linfoma de células B humanas en un modelo de ratón inmunodeficiente (Flavell et al, 1997). Muchas otras combinaciones pueden también ser factibles y pueden ser diseñadas por los expertos en la técnica. En general, el uso de mezclas de anticuerpos que son capaces de reconocer múltiples epítomos de células B es probable que haga disminuir la aparición de variantes de escape.

Otro posible objetivo es un receptor de tirosina quinasa transmembrana, codificado por el proto-oncogén Her-2/neu (ErbB2) (véanse por ejemplo las patentes de Estados Unidos nº 5.772.997 y nº 5.783.186 para los anticuerpos anti-HER2). Her-2 está sobreexpresado en el 30% de los cánceres de mama altamente malignos, y se han desarrollado anticuerpos con éxito contra esta diana, comercializados bajo el nombre de Herceptin™ (trastuzumab). Se ha demostrado que el direccionamiento de múltiples epítomos de HER-2 con una mezcla de anticuerpos monoclonales tiene como resultado la mejora de la actividad anticrecimiento de una línea celular de cáncer de mama humano *in vitro* e *in vivo* (Spiridon et al, 2002). Her-2 puede por lo tanto ser una buena diana para las mezclas de anticuerpos de acuerdo con la presente invención. Los anticuerpos útiles para este propósito se pueden obtener por métodos descritos en la presente invención, incluyendo los métodos de presentación de anticuerpos.

Los anticuerpos humanos son capaces de desencadenar la función efectora por la vía de la unión a receptores de inmunoglobulina en las células efectoras inmunitarias. La IgG humana, y en particular la IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub>, fijan el complemento para inducir CDC y interactúan con los receptores de Fcγ para inducir la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpo (ADCC), la fagocitosis, la endocitosis, la inducción del estallido respiratorio y la liberación de mediadores inflamatorios y citocinas. La IgA humana interactúa con FcαR, también para dar como resultado la activación eficiente de la ADCC y la fagocitosis de las células diana. Por tanto, debido a la distribución diferencial de FcγR y FcαR en células de sangre periférica (Huls et al., 1999), usando una mezcla de anticuerpos dirigidos contra la diana y que consiste tanto en IgG como en IgA maximizaría potencialmente el reclutamiento y la activación de diferentes células efectoras inmunitarias. Tal mezcla de ambos IgG e IgA podría obtenerse produciendo anticuerpo monoclonal IgG e IgA en un proceso de producción separado utilizando dos líneas de

células de producción distinta, pero podría obtenerse también a partir de una sola línea celular que produce tanto el anticuerpo monoclonal IgG como IgA. Esto tendría la ventaja de que solamente tiene que ser desarrollado un único proceso de producción. Así, cuando se mencionan cadenas pesadas diferentes, también están comprendidas en la invención cadenas pesadas que difieren en sus regiones constantes. El principio de usar una cadena ligera común también se puede utilizar para la producción de una mezcla de isotipos de una célula hospedadora. Por consiguiente es otro aspecto de la presente invención usar un método para producir una mezcla de anticuerpos que comprende diferentes isotipos a partir de una célula hospedadora, comprendiendo el método la etapa de cultivar una célula hospedadora que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera y secuencias de ácido nucleico que codifican dos cadenas pesadas de diferente isotipo que son capaces de emparejarse con dicha cadena ligera, bajo condiciones que conducen a la expresión de dichas secuencias de ácido nucleico. De acuerdo con este aspecto de la invención, cadenas pesadas diferentes pueden tener regiones variables idénticas, y diferir sólo en sus regiones constantes (es decir, ser de diferente isotipo y tener la misma especificidad). En una realización particular, dichos isotipos comprenden al menos una IgG y una IgA y/o IgM, preferiblemente IgG1 o IgG3 e IgA. También se pueden utilizar otras combinaciones de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En estas realizaciones, no se producen anticuerpos biespecíficos debido a que las regiones variables son iguales.

En otras realizaciones de acuerdo con este aspecto de la invención, pueden diferir no sólo las regiones constantes de las cadenas pesadas, sino también las regiones variables, dando lugar así a diferentes especificidades, emparejadas con la misma cadena ligera. Cuando no se desean anticuerpos biespecíficos para un propósito dado, p. ej. porque las mezclas de anticuerpos son menos eficaces a causa de la presencia de los anticuerpos biespecíficos, es posible usar dos cadenas pesadas combinadas con la cadena ligera común de acuerdo con la invención en donde dichas cadenas pesadas difieren suficientemente en sus regiones constantes para reducir o prevenir el emparejamiento entre las diferentes cadenas pesadas, p. ej. mediante el uso de cadenas pesadas de diferentes isotipos, p. ej. una IgG1 y una IgG3 una (véase la Fig. 11 para una representación esquemática). Se espera que las cadenas pesadas de diferente isotipo se emparejarán mucho menos eficientemente, si lo hacen, en comparación con las mismas cadenas pesadas. Alternativamente, también es posible construir las cadenas pesadas diferentes en su región constante de forma que la homodimerización es favorecida sobre la heterodimerización, p. ej. mediante la introducción de interacciones auto-complementarias (véase, por ejemplo el documento WO 98/50431 para posibilidades tales como estrategias de "protuberancia en cavidad" (véase el documento WO 96/27011)). Por tanto, es otro aspecto de la presente invención proporcionar un método para producir una mezcla de anticuerpos en un hospedador recombinante, incluyendo el método la etapa de expresar en una célula hospedadora recombinante una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera común y secuencias de ácido nucleico que codifican dos cadenas pesadas diferentes que difieren en la región variable y que son capaces de emparejar con dicha cadena ligera común, y en donde dichas cadenas pesadas difieren más en sus regiones constantes lo suficiente para reducir o prevenir el emparejamiento entre las diferentes cadenas pesadas. En una realización, dichas cadenas pesadas son de isotipo diferente. Las mezclas de anticuerpos que se pueden obtener por este método también se incorporan en la presente invención. Tales mezclas comprenderán principalmente anticuerpos monoespecíficos.

Las enseñanzas de la presente invención se pueden usar también para obtener nuevos anticuerpos multiespecíficos o mezclas de los mismos. La dimerización de las moléculas de IgA se puede potenciar coexpresando la cadena J (Yoo et al, 1999). Dichos anticuerpos IgA diméricos tienen dos especificidades (véase la Fig. 9 para una representación esquemática de una posible forma producida y presente en la mezcla). Hasta cinco especificidades pueden estar comprendidas en un pentámero de IgM en presencia de la cadena J, y hasta seis en un hexámero de IgM en ausencia de la cadena J (Yoo et al, 1999). Por consiguiente, en realizaciones específicas, 3, 4, 5, o 6 cadenas pesadas de IgM se coexpresan con la cadena ligera común de acuerdo con este aspecto de la invención. Véase la Fig. 10 para una representación esquemática de una de las posibles formas que pueden producirse y estar presentes en la mezcla de acuerdo con este aspecto de la invención, cuando cinco diferentes cadenas pesadas se expresan con una cadena ligera común. Pueden producirse dímeros de IgA, pentámeros o hexámeros de IgM que tienen al menos dos especificidades diferentes a partir de un clon de una sola célula hospedadora de acuerdo con la invención. Tales moléculas que albergan regiones de unión con el antígeno con especificidades diferentes, se pueden unir a epítomos diferentes en el mismo antígeno, antígenos diferentes en una célula, o antígenos diferentes en diferentes células, entrecruzando así los antígenos o células.

Ejemplos.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar la invención, y no deben considerarse de ninguna forma limitantes del alcance de la invención. La práctica de esta invención empleará, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de inmunología, biología molecular, microbiología, biología celular y ADN recombinante, que están dentro de la experiencia de la técnica. Véanse, por ejemplo Sambrook, Fritsch y Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, 1989; Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel FM, et al., ed., 1987; la serie Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); PCR2: A Practical Approach, MacPherson MJ, Hams BD, Taylor GR, ed., 1995; Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow y Lane, ed., 1988.

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

El clon UBS-54 y el clon K53 fueron aislados previamente por selecciones de la línea de células colorrectales SW40 (Hüls et al., 1999) y en una mezcla heterogénea de células mononucleares de un paciente con mieloma múltiple (WO 02/18948), respectivamente, con una biblioteca semi-sintética (de Kruif et al., 1995b). Otros estudios revelaron que el clon UBS-54 y K53 se unieron a la molécula de adhesión homotípica EP-CAM (de Huls et al., 1999) y la proteína cofactor de membrana CD46 (WO 02/18948), respectivamente. La secuenciación del ADN de los clones reveló que eran únicos en las CDRs de cadena pesada, pero que contenían una secuencia de cadena ligera idéntica (Fig. 3). El  $V_H$  y  $V_L$  de los clones UBS-54 y K53 se insertaron en un vector de expresión que contiene la secuencia líder HAVT20 y todas las secuencias de codificación los dominios constantes de una IgG1 humana con una cadena ligera Kappa mediante un método esencialmente como se ha descrito (Boel et al, 2000), lo que tuvo como resultado los plásmidos pUBS3000Neo y pCD46\_3000 (Neo) (Fig. 4). Estos plásmidos fueron expresados transitoriamente bien sea solos o bien en combinación en células PER.C6™. De forma breve, cada matraz de 80 cm<sup>2</sup> fue transfectado por incubación durante 4 horas con 140 µl de lipofectamina + 10 µg de ADN (bien sea pUBS3000Neo, pCD46\_3000 (Neo) o bien 10 µg de ambos) en medio DMEM libre de suero a 37 °C. Al cabo de 4 horas, este fue reemplazado con DMEM + 10% de FBS, y las células se desarrollaron durante la noche a 37 °C. Las células fueron después lavadas con PBS y el medio se reemplazó con medio Excell 525 (JRH Bioscience). Las células se dejaron crecer a 37 °C durante 6 días, después de lo cual se recolectó el sobrenadante del cultivo celular. El análisis ELISA específico de IgG humana (descrito en el documento WO 00/63403) indicó que la IgG estaba presente en aproximadamente 10 µg/ml para todos los matraces que contenían plásmidos de expresión. No había presente IgG1 en un matraz testigo o de control que no fue transfectado con el plásmido de expresión. A continuación la IgG humana de cada sobrenadante se purificó usando cromatografía de afinidad de Proteína A (Hightrap Protein A HP, n° de cat. 1-040203) de acuerdo con procedimientos estándar, siguiendo las recomendaciones del fabricante (Amersham Biosciences). Después de la elución, las muestras se concentraron en un concentrador Microcon YM30 (Amicon) y el tampón se cambió a fosfato sódico 10 mM, pH 6,7. Doce µg de IgG purificada se analizaron a continuación en geles de enfoque isoelectrico (geles de IEF Pre-cast Serva, intervalo de pH 3 - 10, n° de cat. 42866). Las muestras se cargaron en el lado de pH bajo y después del enfoque se tiñeron con azul coloidal (Fig. 5). La calle 1 muestra K53 expresado transitoriamente, la calle 2 muestra UBS-54 expresado transitoriamente y la calle 3 expone la muestra de IgG de las células en las que ambos anticuerpos fueron co-transfectados.

Claramente, K53 y UBS-54 tienen cada uno un perfil único de pl y la muestra de la cotransfección mostró otras isoformas únicas, teniendo la isoforma principal un pl de entre los de K53 y de UBS-54. Esto también se prevé sobre la base del pl teórico cuando se calcula con la herramienta ProtParam proporcionada en la página de inicio Expasy (<http://www.expasy.ch>; Appel et al., 1994). K53 y UBS-54 tienen un pl teórico de 8,24 y 7,65, respectivamente, mientras que una isoforma que representa un heterodímero de una cadena pesada de UBS-54 y una cadena pesada de K53 tiene un pl teórico de 8,01. El ensamblaje de tal heterodímero sólo puede ocurrir cuando una sola célula traduce tanto la cadena pesada de K53 como la cadena pesada de UBS-54 y ensambla estas en una molécula de IgG de longitud completa junto con la cadena ligera común.

Por consiguiente, este experimento muestra que es posible expresar dos moléculas de IgG humana únicas en una sola célula y que también se forma de manera eficiente un heterodímero que consiste en estas dos especificidades de unión únicas.

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

Se ejemplifica en el presente texto un método para producir una mezcla de anticuerpos de acuerdo con la invención, utilizando la expresión en una célula hospedadora recombinante de una sola cadena ligera y tres cadenas pesadas diferentes capaces de emparejarse con la cadena ligera individual para formar anticuerpos funcionales, y se muestra esquemáticamente en la Fig. 6. Los fagos que codifican anticuerpos capaces de unir proteínas presentes en células B humanas, es decir, CD22, CD72 y complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II (denominados en adelante HLA-DR) fueron previamente aislados de una biblioteca de fagos semisintética (de Kruif et al., 1995; van der Vuurst de Vries y Logtenberg, 1999). La secuenciación del ADN de las secuencias de  $V_H$  y  $V_L$  de los fagos clon B28 (anti-CD22), clon I-2 (anti-HLA-DR) y clon II-2 (anti-CD72) reveló que todos ellos contienen una única secuencia  $V_H$ , pero una secuencia de cadena ligera común ( $V_L3$ ) con una región CDR idéntica (Fig. 7).

Las secuencias  $V_H$  y  $V_L$  de los clones B28, I-1 y II-2 se clonan detrás de las secuencias líder HAVT20 de un plásmido de expresión que comprende una cadena pesada. Un ejemplo de tal plásmido es el pCRU-K01 (contiene secuencias de cadena pesada kappa, que pueden ser fácilmente intercambiadas por secuencias de cadena pesada lambda si se desea, por un profesional experto en la técnica), depositado en la ECACC bajo el número 03041601. La clonación da lugar a plásmidos que codifican una IgG<sub>1</sub> humana de longitud total con especificidades de unión para CD22, CD72 y HLA-DR. Estos plásmidos se denominan en adelante como pCRU-CD22, pCRU-CD72 y pCRU-HLA-DR, respectivamente.

Se generan líneas celulares derivadas de PER.C6™ estables, de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo el documento WO 00/63403), expresando las líneas celulares anticuerpos

codificados por información genética sobre pCRU- CD22, o bien pCRU- CD72 o bien pCRU- HLA- DR y una línea celular que expresa anticuerpos codificados por los tres plásmidos. Por tanto, se siembran células PER.C6™ en DMEM más 10% de FBS en placas de cultivo de tejidos (de 10 cm de diámetro) o frascos T80, con aproximadamente  $2,5 \times 10^5$  células por placa y se mantienen durante la noche bajo sus condiciones de cultivo normales (concentración del 10% de CO<sub>2</sub> y 37 °C). Al día siguiente se llevan a cabo transfecciones en platos separados a 37 °C usando Lipofectamina (Invitrogen Life Technologies) de acuerdo con protocolos estándar proporcionados por el fabricante, con 1 - 2 µg de pCRU- CD22, o bien 1 - 2 µg de pCRU- CD72, 1 - 2 µg de pCRU- HLA-DR o bien 1 µg de una mezcla de pCRU- CD22, pCRU- CD72 y pCRU- HLA- DR. Como control para la eficiencia de la transfección, unos cuantos platos son transfectados con un vector de control LacZ, mientras que unos cuantos platos no serán transfectados y servirán como controles negativos.

Al cabo de 4 a 5 horas, las células se lavan dos veces con DMEM y se vuelven a alimentar con medio fresco sin selección. El día siguiente, el medio se reemplaza con medio fresco que contiene 500 µg/ml de G418. Las células se refrescan cada 2 o 3 días con medio que contiene las mismas concentraciones de G418. Aproximadamente 20 a 22 días después de la siembra, son visibles numerosas colonias y de cada transfección se seleccionan al menos 300 y se desarrollan en placas vía 96 pocillos y/o 24 pocillos vía 6 pocillos a matraces T25. En esta fase, las células se congelan (por lo menos 1, pero normalmente 4 ampollas por colonia subcultivada) y se determinan en el sobrenadante los niveles de producción de anticuerpo IgG humana recombinante usando un ELISA específico para IgG<sub>1</sub> humana (descrito en el documento WO 00/63403). También, en esta fase se retira G418 del medio de cultivo y nunca se vuelve a aplicar de nuevo. Para un número representativo de colonias se cultivarán mayores volúmenes para purificar la fracción IgG<sub>1</sub> humana recombinante del sobrenadante acondicionado usando cromatografía de afinidad de Proteína A de acuerdo con procedimientos estándar. La IgG<sub>1</sub> humana purificada a partir de los diversos clones se analiza en SDS-PAGE, enfoque iso-eléctrico (IEF) y unión a las dianas CD22, CD72 y HLA-DR usando transfectantes celulares que expresan estos antígenos humanos en su superficie celular (los transfectantes que expresan CD72 y de HLA-DR han sido descritos por van der Vuurst-de Vries y Logtenberg, 1999; un transfectante de CD22 ha sido preparado de acuerdo con procedimientos estándar similares en PER.C6™). Las colonias obtenidas a partir de la co-transfección con pCRU- CD22, pCRU- CD72 y pCRU- HLA- DR se cribaron mediante PCR en ADN genómico en relación con la presencia o ausencia de cada una de las tres construcciones. La identidad de los productos de la PCR se confirmó adicionalmente mediante secuenciación de ADN.

A continuación se demuestra que una línea celular clonal explica la producción de cada uno de las tres especificidades de unión, es decir probando que una sola célula es capaz de producir una mezcla de más de dos IgGs humanas funcionales. Por tanto, un número limitado de colonias que cribaron positivamente en relación con la producción de cada una de las tres especificidades de unión (tanto por PCR a nivel de ADN como en los ensayos de unión especificados frente a CD22, CD72 y HLA- DR), es sometido a clasificación de una sola célula utilizando un clasificador de células activado por fluorescencia (FACS) (Becton y Dickinson FACS VANTAGE SE). Alternativamente, las colonias se siembran a razón de 0,3 células/pocillo para garantizar un resultado clonal. Poblaciones de células clonales, en adelante designadas como subclones, se refrescan una vez por semana con un medio fresco. Los subclones son cultivados y transferidos a partir de 96 pocillos a través de placas de 24 y 6 pocillos a matraces T25. En esta fase los subclones se congelan (por lo menos 1, pero normalmente 4 ampollas por subclón) y los niveles de producción de anticuerpo de IgG<sub>1</sub> humana recombinante se determinan en el sobrenadante utilizando un ELISA específico para IgG<sub>1</sub> humana. Para un número representativo de sub-clones, se cultivan volúmenes más grandes para purificar la fracción de IgG<sub>1</sub> humana recombinante a partir del sobrenadante acondicionado usando cromatografía de afinidad de Proteína A de acuerdo con procedimientos estándar. La IgG<sub>1</sub> humana purificada a partir de los varios subclones se analiza subsiguientemente como se describió anteriormente para la IgG<sub>1</sub> humana obtenida a partir de los clones progenitores, es decir mediante SDS-PAGE, enfoque isoeléctrico (IEF) y unión a las dianas CD22, CD72 y HLA- DR. Los subclones serán también cribados por PCR en ADN genómico en relación con la presencia o ausencia de cada una de las tres construcciones pCRU- CD22, pCRU- CD72 y pCRU- HLA- DR. La identidad de los productos de la PCR se confirma adicionalmente mediante secuenciación de ADN.

Otros métodos tales como la transferencia Southern y/o FISH pueden también ser utilizados para determinar si cada una de las tres construcciones está presente en la línea celular clonal.

Los subclones que han demostrado ser transgénicos para cada una de las tres construcciones se ponen en cultivo durante un período prolongado para determinar si la presencia de los transgenes es estable y si la expresión de la mezcla de anticuerpos sigue siendo la misma, no sólo en términos de niveles de expresión, sino también para la relación entre las diversas isoformas de anticuerpo que se segregan desde la célula. Por consiguiente, el cultivo de subclones se mantiene durante al menos 25 veces de duplicación de la población, bien sea como cultivo adherente o como cultivo en suspensión. A cada 4 - 6 duplicaciones de la población, se lleva a cabo una prueba de producción específica utilizando el ELISA específico para IgG humana, y se cultivan volúmenes más grandes para obtener el sedimento celular y el sobrenadante. El sedimento celular se utiliza para evaluar la presencia de las tres construcciones en el ADN genómico, bien sea a través de PCR, o transferencia Southern y/o FISH. El sobrenadante se usa para purificar la fracción de IgG<sub>1</sub> humana recombinante como se ha descrito anteriormente. La IgG<sub>1</sub> humana purificada obtenida en las varias duplicaciones de la población se analiza como se describió, esto es por SDS-PAGE, enfoque iso-eléctrico (IEF) y unión a las dianas CD22, CD72 y HLA- DR utilizando transfectantes celulares que expresan estos antígenos.

Ejemplo 3 Cribado de clones que expresan múltiples IgGs humanas en relación con la mezcla más potente de IgGs humanas funcionales.

La funcionalidad de la mezcla de anticuerpos se analiza en ensayos basados en células para determinar si la mezcla de IgG<sub>1</sub> humana inhibe la proliferación y/o induce la apoptosis de líneas de células B, tales como por ejemplo Ramos. También se pueden utilizar otras líneas de células. Además se analizan las mezclas de anticuerpos en relación con su potencial para inducir la toxicidad celular dependiente de anticuerpos y la citotoxicidad dependiente de, por ejemplo, las células de Ramos.

En cada uno de los experimentos que siguen se analiza la funcionalidad de la mezcla de anticuerpos que reconoce las dianas CD22, CD72 y HLA-DR y puede compararse con cada uno de los anticuerpos IgG<sub>1</sub> individuales y con una combinación equimolar de las tres especificidades de IgG<sub>1</sub> individuales.

Para evaluar la capacidad de las mezclas de anticuerpos para inhibir la proliferación de las células de Ramos, estas células se incuban en placas de 96 pocillos (0,1 a 1,0 x 10<sup>5</sup> /ml) con varias concentraciones (5 a 20 mg/ml) de las mezclas de anticuerpos contra CD22, CD72 y HLA-DR durante 24 horas. La proliferación de las células se mide por la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina durante otras 16 horas de cultivo. La inhibición del crecimiento se determinó representando gráficamente el porcentaje de incorporación de <sup>3</sup>H-timidina en comparación con las células no tratadas (que se toma como valor de referencia 100%).

Para analizar la inducción de la apoptosis de las células de Ramos, estas células se estimulan en placas de 48 pocillos (0,2 a 1,0 x 10<sup>6</sup> /ml) con varias concentraciones (5 a 20 mg/ml) de las mezclas de anticuerpos contra las dianas CD22, CD72 y HLA - DR durante 24 o 48 horas. Después del período de incubación se analiza la exposición de fosfatidil serina en células apoptóticas (Koopman G et al, 1994). Por tanto las células se cosechan, se lavan dos veces con PBS y se incuban a temperatura ambiente durante 10 min con 100 µl de anexina V marcada con FITC (Caltag) diluido 1:25 en tampón para unión de anexina V (Caltag). Con anterioridad al análisis de las muestras mediante citometría de flujo (FACSCalibur, Becton Dickinson, San José, CA) se añade yoduro de propidio (PI) (Sigma) a una concentración final de 5 µg/ml para distinguir las células necróticas (anexina V-/PI+) de las células apoptóticas (anexina V+/PI-, células apoptóticas tempranas; anexina V+/PI+, células apoptóticas tardías).

En un ensayo alternativo, la apoptosis se induce mediante el entrecruzamiento de las mezclas de anticuerpos contra CD22, CD72 y HLA- DR en la superficie celular de las células de Ramos con 25 µg/ml de F(ab)<sub>2</sub> de anticuerpos policlonales anti-humanos (Fc-específicas) de cabra (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA) durante el período de incubación.

En otro ensayo alternativo, la apoptosis se induce mediante la incubación de las células de Ramos con varias concentraciones (5 a 20 µg/ml) de las mezclas de anticuerpos contra CD22, CD72 y HLA- DR al tiempo que se coinubaban con los agentes quimiosensibilizantes doxorubicina (Calbiochem) o dexametasona (UMCU, Utrecht, Países Bajos).

La citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo de las mezclas de anticuerpos se analizó usando células mononucleares de sangre periférica como células efectoras en un ensayo de liberación de <sup>51</sup>Cr estándar (Hüls et al, 1999). Con este fin, 1 a 3 x 10<sup>6</sup> células de Ramos se marcan con 100 µi (Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido) durante 1 hora a 37 °C. Después de tres lavados con medio, las células de Ramos diana se ponen en placas de 96 pocillos con fondo en U a razón de 5 x 10<sup>3</sup> células/pocillo. Se añaden entonces células mononucleares de sangre periférica que se obtienen de donantes sanos por gradientes de densidad de Ficoll-Hypaque a cada pocillo en proporciones de efector:diana que se encuentran en el intervalo de 80:1 a 10:1 por triplicado. Las células se incuban a 37 °C en presencia de varias concentraciones de las mezclas de anticuerpos (5 a 20 µg/ml) en un volumen final de 200 µl. Al cabo de 4 horas de incubación se recolecta parte del sobrenadante y se mide la liberación de <sup>51</sup>Cr. El porcentaje de lisis específica se calcula usando la fórmula siguiente: % de lisis específica = ([cpm experimental - cpm espontánea] / [cpm máxima - cpm espontánea] x 100%). La liberación máxima de <sup>51</sup>Cr se determina añadiendo triton X-100 a una concentración final de 1% a las células diana y la liberación espontánea se determina después de la incubación de las células diana con medio solo.

La citotoxicidad dependiente del complemento se determina en un ensayo similar. En vez de las células efectoras, ahora se añaden 50 µl de suero humano a las células diana. Subsiguientemente se realiza el ensayo de la misma manera.

Alternativamente se determina el ADCC y CDC de las mezclas de anticuerpos usando un ensayo de liberación de Europio (Patel y Boyd, 1995) o utilizando un ensayo de liberación de LDH (Shields et al, 2001).

Ejemplo 4 Uso de la presentación de fagos para aislar fagos múltiples con una secuencia de V<sub>L</sub> idéntica frente a una diana predefinida (Her-2), y producción en una célula hospedadora recombinante de una mezcla de anticuerpos capaces de unirse a esta diana.

Se pueden aislar fagos que presentan fragmentos scFv capaces de unirse a epítopos múltiples presentes en la misma proteína, por ejemplo el receptor del factor de crecimiento epidérmico Her-2, de una biblioteca semisintética de fagos (de Kruif et al., 1995a, b). Es posible identificar varios de tales fagos y seleccionar los que comprenden la

misma secuencia de cadena ligera, para uso posterior de acuerdo con la invención. La biblioteca semisintética se forma mezclando 7 sub-bibliotecas que contienen cada una de ellas una cadena ligera diferente (de Kruif et al, 1995a, b). Por consiguiente es particularmente práctico usar para el cribado tal sub-biblioteca, que contiene solamente una cadena ligera y muchas cadenas pesadas, de forma que se obtienen múltiples anticuerpos con una secuencia V<sub>L</sub> idéntica, y usarla además para la expresión de las mezclas de anticuerpos de acuerdo con la invención.

Para la selección de fagos contra Her-2 se generan varias proteínas de fusión que comprenden diferentes partes del dominio extracelular de Her-2 que se fusionan con los dominios CH2 y CH3 de la IgG<sub>1</sub> humana. Con este propósito se ha construido un vector de expresión pcADN3.1Zeo (Invitrogen) que contiene en su región de clonación múltiple un sitio de restricción XhoI en la región bisagra en el marco antes de los dominios CH2 y CH3 de la IgG<sub>1</sub> humana. Usando un clon de cADN de Her-2 como plantilla se generan fragmentos de PCR utilizando técnicas de biología molecular estándar conocidas por los expertos en la técnica. Estos fragmentos consisten en un único sitio de restricción 5', un codón de inicio seguido por una secuencia líder eucariota que está ligada en el marco bien sea al dominio extracelular total (EC) de Her-2 o bien a una parte del dominio EC de Her-2 que es seguido en el marco por un sitio de restricción XhoI. Estos fragmentos de PCR se clonan posteriormente en marco con la región CH2-CH3 IgG<sub>1</sub> en el vector de expresión pcADN3.1Zeo. Además de la proteína de fusión que contiene el dominio total EC de Her-2, se generan varias proteínas de fusión más pequeñas que contienen fragmentos no solapantes del dominio EC de Her-2. Estas construcciones que codifican las proteínas de fusión Her-2-Ig se usan para la transfección transitoria de células 293T utilizando el reactivo lipofectamina (Gibco). Cinco días después de la transfección se recolectan los sobrenadantes de las células 293T y las proteínas de fusión HER-2-Ig se purifican usando cromatografía de afinidad de proteína A de acuerdo con procedimientos estándar.

Las proteínas de fusión HER-2-Ig que contienen fragmentos no solapantes del dominio Her-2 EC se recubren durante 2 horas a 37 °C sobre la superficie de tubos de plástico Maxisorp™ (Nunc) a una concentración saturante (0,5 a 5 µg/ml). Los tubos se bloquean durante 1 h en 2% de polvo de leche libre de grasa disuelto en PBS (MPBS). Simultáneamente, 500 µl (aproximadamente 10<sup>13</sup> ufc) de una biblioteca de presentación de fago semi-sintética (una sub-biblioteca de acuerdo con la terminología utilizada anteriormente) en la que se representa solamente una cadena ligera V<sub>kappa</sub>1 preparada como se describe en De Kruif et al. (1995a, b) y las referencias contenidas en dicha cita, se añaden a dos volúmenes de MPBS al 4%. Además, se añade suero humano hasta una concentración final de 15% y se deja que siga el bloqueo durante 30 a 60 min. Los tubos recubiertos con Her-2-Ig se vacían y se añade la biblioteca de fagos bloqueados. El tubo se sella y se hace girar lentamente durante 1 h, seguido por 2 h de incubación sin hacer rotación. Los tubos se vacían y se lavan 10 veces en PBS que contiene 0,1% de Tween-20, seguido por lavado 5 veces en PBS. Se añade 1 ml de glicina-HCl, 0,05 M, pH 2,2, y el tubo se hace rotar lentamente durante 10 min. Los fagos eluidos se añaden a 500 µl de Tris-HCl 1 M, pH 7,4. A esta mezcla se añaden 3,5 ml de cultivo bacteriano azul XL-1 de crecimiento exponencial. Los tubos se incuban durante 30 min a 37 °C sin agitación. Posteriormente, las bacterias se cultivan en placas sobre placas de agar 2TY que contienen ampicilina, tetraciclina y glucosa. Después de incubación las placas a 37 °C durante la noche, las colonias se rasparon de las placas y se utilizaron para preparar una biblioteca de fagos enriquecida, esencialmente como se describe por De Kruif et al. (1995a). De forma resumida, las bacterias raspadas se utilizan para inocular medio 2TY que contiene ampicilina, tetraciclina y glucosa y se cultivan a 37 °C a una densidad óptica OD 600 nm de ~ 0,3. Se añaden fagos colaboradores y se deja que infecten a las bacterias después de lo cual el medio se cambia a 2TY que contiene ampicilina, tetraciclina y kanamicina. La incubación se continuó durante la noche a 30 °C. El día siguiente, las bacterias se eliminan del medio 2TY mediante centrifugación, después de lo cual los fagos se precipitan usando polietilenglicol 6000/NaCl. Finalmente, los fagos se disuelven en un pequeño volumen de PBS-BSA al 1%, esterilizado por filtración, y se utiliza para una siguiente ronda de selección. El procedimiento de selección/re-infección se lleva a cabo dos veces. Después de la segunda ronda de selección, las colonias de E. coli individuales se usan para preparar anticuerpos de fagos monoclonales. Esencialmente, las colonias individuales se cultivan hasta fase logarítmica y se infectan con fagos colaboradores después de lo cual se permite que tenga lugar la producción de anticuerpos de fagos durante la noche. Los sobrenadantes que contienen anticuerpos de fago se prueban en ELISA en relación con la actividad de unión con respecto a placas de 96 pocillos recubiertos con Her-2-total EC-Ig.

Los anticuerpos de fagos seleccionados que se obtienen en el cribado que se ha descrito anteriormente, se validan mediante ELISA en relación con su especificidad. Para este propósito, las proteínas de fusión Her-2-Ig que contienen fragmentos no solapantes del dominio Her-2 EC son aplicados como recubrimiento a las placas de ELISA Maxisorp. Después del recubrimiento, las placas se bloquean en MPBS al 2%. Los anticuerpos de fago seleccionados se incuban en un volumen igual de MPBS al 4%. Las placas se vacían, se lavan una vez en PBS, después de lo cual se añaden los fagos bloqueados. Se deja que la incubación prosiga durante 1 h, las placas se lavan en PBS 0,1% de Tween-20 y los fagos unidos son detectados usando un anticuerpo anti-M13 conjugado con peroxidasa. El procedimiento se lleva a cabo de forma simultánea usando un anticuerpo de fago de control dirigido contra la tiroglobulina (De Kruif et al. 1995a, b), que sirve como un control negativo.

En otro ensayo se analizaron los anticuerpos de fago seleccionados en relación con su capacidad para unirse a las células de cáncer de mama BT474 humanas que expresan Her-2. Para el análisis de citometría de flujo, los anticuerpos de fago se bloquean primero en un volumen igual de MPBS al 4% durante 15 min a 4 °C antes de la

tinción de las células BT474. La unión de los anticuerpos de fago a las células se visualiza usando un anticuerpo anti-M13 biotinilado (Santa Cruz Biotechnology) seguido por estreptavidina-ficoeritrina (Caltag).

Alternativamente, los anticuerpos de fago que reconocen múltiples epítomos en Her-2 se seleccionan utilizando un método basado en la competencia de la unión de fago a Her-2 con la unión de los bien caracterizados anticuerpos anti-HER-2 murinos HER50, HER66 y HER70 (Spiridon et al, 2002). Con este propósito se incuban  $2 \times 10^8$  células BT474 a 4 °C con aproximadamente  $10^{13}$  ufc (0,5 ml) de una biblioteca de presentación de fago semi-sintética en donde se representa solamente una cadena ligera Vkappal preparada como se ha descrito anteriormente y se bloquean con 2 volúmenes de medio que contiene 10% de FBS. La mezcla se hace girar lentamente a 4 °C durante 2 horas en un tubo sellado. Posteriormente, los fagos no unidos se eliminan mediante dos lavados con 50 ml de medio frío que contienen 10% de FBS. A continuación, los fagos que reconocen epítomos múltiples en Her-2 se eluyen resuspendiendo las células BT474 en 1 ml de medio frío que contiene concentraciones saturantes (5 a 20 µg/ml) de anticuerpos anti-HER-2 murinos HER50, HER66 y HER70. Las células se dejan en hielo durante 10 min, se centrifugan y el sobrenadante que contiene los anticuerpos de fago anti-HER-2 se utiliza para reinfectar células XL1-Blue como se ha descrito anteriormente.

Del panel de anticuerpos de fago específicos de Her-2 generados por los cribados descritos anteriormente, se seleccionan tres anticuerpos de fago que reconocen tres epítomos no solapantes diferentes en la proteína Her-2. Las secuencias  $V_H$  y la única secuencia de la cadena ligera Vkappal de estos clones, designados provisionalmente VK1HER2-1, VK1HER2-2 y VK1HER2-3, se clonan detrás de las secuencias líder HAVT20 del plásmido de expresión pCRU-K01 (depósito ECACC 03041601), o un plásmido de expresión similar, para obtener plásmidos que codifican una IgG<sub>1</sub> -kappa humana de longitud total con especificidades de unión para Her-2. Estos plásmidos se designan provisionalmente como pCRU-VK1HER2-1, pCRU-VK1HER2-2 y pCRU-VK1HER2-3, respectivamente.

Se generan líneas de células derivadas de PER.C6™ estables de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica, expresando las líneas de células anticuerpos codificados por información genética sobre pCRU-VK1HER2-1, pCRU-VK1HER2-2 o bien pCRU-VK1HER2-3, y una línea celular que expresa anticuerpos codificados por los tres plásmidos. Por tanto, se sembraron células PER.C6™ en DMEM más 10% de SFB en placas de cultivo de tejidos (10 cm de diámetro) o frascos T80, con aproximadamente  $2,5 \times 10^6$  células por placa y se mantuvieron durante la noche bajo sus condiciones de cultivo normales (10% de CO<sub>2</sub> de concentración y 37 °C). El día siguiente, se llevan a cabo transfecciones en platos separados a 37 °C usando Lipofectamina (Invitrogen Life Technologies) de acuerdo con protocolos estándar proporcionados por el fabricante, bien sea con 1 a 2 µg de pCRU-VK1HER2-1, 1-2 g pCRU-VK1HER2-2, 1-2 g pCRU-VK1HER2-3 o bien 1 µg de una mezcla de pCRU-VK1HER2-1, pCRU-VK1HER2-2 y pCRU-VK1HER2-3. Como control para la eficiencia de la transfección, unos cuantos platos son transfectados con un vector de control LacZ, mientras que unos cuantos platos no son transfectados y sirven como controles negativos.

Al cabo de 5 horas, las células se lavan dos veces con DMEM y se vuelven a alimentar con medio fresco sin selección. El día siguiente, el medio se reemplaza con medio fresco que contiene 500 µg/ml de G418. Las células se refrescan cada 2 o 3 días con medio que contiene las mismas concentraciones de G418. Aproximadamente de 20 a 22 días después de la siembra, son visibles un gran número de colonias y de cada transfección se seleccionan al menos 300 y se desarrollan a través de 96 pocillos y/o de 24 pocillos a través de placas de 6 pocillos a frascos T25. En esta fase, las células se congelan (al menos 1, pero normalmente 4 frascos por colonia sub-cultivada) y los niveles de producción de anticuerpo IgG humana recombinante se determinan en el sobrenadante usando un ELISA específico para IgG<sub>1</sub> humana. También, en esta etapa se elimina G418 del medio de cultivo y nunca vuelve a aplicarse de nuevo. Para un número representativo de colonias se cultivan volúmenes más grandes para purificar la fracción IgG<sub>1</sub> humana recombinante del sobrenadante acondicionado usando cromatografía de afinidad de Proteína A de acuerdo con procedimientos estándar. La IgG<sub>1</sub> humana purificada procedente de los diversos clones se analiza en SDS-PAGE, enfoque isoeléctrico (IEF), se ensayó la unión a proteínas de fusión de HER-2-Ig por ELISA, y se analizó en relación con la unión a Her-2 en la superficie de las células BT474 por citometría de flujo.

Los clones obtenidos de la co-transfección de pCRU-VK1HER2-1, pCRU-VK1HER2-2 y pCRU-VK1HER2-3 son cribados mediante PCR sobre el ADN genómico en relación con la presencia o ausencia de cada uno de las tres construcciones. La identidad de los productos de la PCR se confirma adicionalmente mediante secuenciación del ADN.

A continuación, se demuestra que una línea celular clonal explica la producción de cada uno de las tres especificidades de unión. Por tanto, un número limitado de colonias, que cribaron como positivas para la producción de cada uno de los tres especificidades de unión (tanto por PCR a nivel del ADN, como en los ensayos de unión especificados frente a Her-2), se someten a clasificación de una sola célula utilizando un clasificador de células activado por fluorescencia (FACS) (Becton y Dickinson FACS VANTAGE SE). Alternativamente, las colonias se siembran a razón de 0,3 células/pocillo para garantizar vástagos clonales. Las poblaciones celulares clonales, en adelante designadas como sub- clones, se refrescan una vez por semana con un nuevo medio. Los sub- clones son cultivados y transferidos de placas de 96 pocillos a través de 24 y 6 pocillos a matraces T25. En esta fase, los sub- clones se congelan (por lo menos 1, pero normalmente 4 ampollas por subclón) y los niveles de producción de anticuerpo IgG<sub>1</sub> humana recombinante se determinan en el sobrenadante utilizando un ELISA específico para la IgG<sub>1</sub> humana. Para un número representativo de sub- clones, se cultivan volúmenes más grandes para purificar la



- fracción de IgG<sub>1</sub> humana recombinante del sobrenadante acondicionado usando cromatografía de afinidad de Proteína A de acuerdo con procedimientos estándar. La IgG<sub>1</sub> humana purificada de los varios sub- clones se analiza subsiguientemente como se describió anteriormente para la IgG<sub>1</sub> humana obtenida a partir de los clones progenitores, es decir por SDS-PAGE, enfoque isoeléctrico (IEF) y unión a Her-2. Los sub- clones serán también
- 5 cribados por PCR sobre el ADN genómico en relación con la presencia o ausencia de cada uno de las tres construcciones pCRU-VK1HER2-1, pCRU-VK1HER2-2 y pCRU-VK1HER2-3. La identidad de los productos de la PCR se confirma adicionalmente mediante secuenciación de ADN. Otros métodos tales como transferencia Southern y/o FISH se pueden también utilizar para determinar si cada una de las tres construcciones están presentes en la línea celular clonal.
- 10 Los subclones que han demostrado ser transgénicos para cada una de las tres construcciones se ponen en cultivo durante un período extenso para determinar si la presencia de los transgenes es estable y si la expresión de la mezcla de anticuerpos sigue siendo la misma, no sólo en términos de niveles de expresión, sino también para la relación entre los diversos anticuerpos que son segregados de la célula. Por tanto, el cultivo del sub-clon se mantiene durante al menos 25 veces la duplicación de la población bien sea como cultivo adherente o como cultivo
- 15 en suspensión. En cada 4 a 6 duplicaciones de la población, se lleva a cabo una prueba de producción específica utilizando ELISA específica para IgG humana y se cultivan volúmenes más grandes para obtener el sedimento de células y el sobrenadante. El sedimento de células se utiliza para evaluar la presencia de las tres construcciones en el ADN genómico, bien sea a través de PCR, transferencia Southern y/o FISH. El sobrenadante se usa para purificar la fracción de IgG<sub>1</sub> humana recombinante como se ha descrito anteriormente. La IgG<sub>1</sub> humana purificada obtenida en las diversas duplicaciones de la población se analiza como se ha descrito, es decir por SDS-PAGE, enfoque isoeléctrico (IEF) y unión a Her-2 por ELISA y por citometría de flujo utilizando células BT474.
- 20 La funcionalidad de la mezcla de anticuerpos de los anticuerpos anti-HER-2 se analiza en ensayos basados en células para determinar si la mezcla de IgG<sub>1</sub> humana inhibe la proliferación y/o induce la apoptosis de las células BT474. Además las mezclas de anticuerpos se analizan en relación con su potencial para inducir la toxicidad celular dependiente de anticuerpos y la citotoxicidad dependiente de las células BT474.
- 25 En cada uno de los experimentos descritos más adelante la funcionalidad de la mezcla de anticuerpos que reconoce Her-2 puede ser analizada y comparada con cada uno de los anticuerpos IgG1 individuales y con una combinación equimolar de las tres moléculas de IgG1 monoespecífica individuales.
- Para evaluar la capacidad de las mezclas de anticuerpos para inhibir la proliferación de células BT474, se deja que estas células se adhieran durante la noche en placas de 96 pocillos ( $1,5 \times 10^5$ /pocillo) y posteriormente se incuban con varias concentraciones (5 a 20 µg/ml) de las mezclas de anticuerpos contra Her-2 durante 72 horas. La proliferación de las células se mide mediante la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina durante las últimas 6 horas de cultivo. La inhibición del crecimiento se determina representando gráficamente el porcentaje de incorporación de <sup>3</sup>H-timidina en comparación con las células no tratadas (tomado como valor de referencia 100%).
- 30 Para analizar la inducción de la apoptosis de las células BT474, se deja que estas células se adhieran durante la noche en placas de 48 pocillos ( $2,5 \times 10^5$ /pocillo en 1 µl) y posteriormente se incuban con varias concentraciones (5 a 20 pg/ml) de las mezclas de anticuerpos contra Her-2 durante 4 horas. A continuación las células se recogen por tripsinización, se lavan dos veces con PBS y se incuban a temperatura ambiente durante 10 min con 100 µl de anexina V marcada con FITC (Caltag) diluida 1:25 en tampón de unión de anexina V (Caltag). Antes del análisis de las muestras por citometría de flujo (FACSCalibur, Becton Dickinson, San José, CA) se añade yoduro de propidio (PI) (Sigma) a una concentración final de 5 µg/ml para distinguir las células necróticas (anexina V-/PI+) de las células apoptóticas (anexina V+/ PI-, células apoptóticas tempranas; anexina V+/ PI+, células apoptóticas tardías).
- 35 La citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo de las mezclas de anticuerpos se analiza usando células mononucleares de sangre periférica como células efectoras y células BT474 como células diana en un ensayo de liberación de <sup>51</sup>Cr estándar como se ha descrito más arriba (Huls et al, 1999). La citotoxicidad dependiente del complemento se determina en un ensayo similar. En vez de las células efectoras, ahora se añaden 50 µl de suero humano a las células diana. Posteriormente, el ensayo se realiza como se describió anteriormente. Alternativamente, ADCC y CDC de las mezclas de anticuerpos se determina usando un ensayo de liberación de europio (Patel y Boyd, 1995) o usando un ensayo de liberación de LDH (Shields et al., 2001).
- 45 La funcionalidad de las mezclas de anticuerpos contra Her-2 se ensaya también usando modelos animales in vivo, tal como por ejemplo se describe en Spiridon et al, 2002.

#### Ejemplo 5 Expresión de diferentes IgG humanas funcionales en la leche de animales transgénicos.

- Las secuencias de V<sub>H</sub> y V<sub>H</sub> de fagos contra las proteínas presentes en células B humanas, es decir, CD22 (clon B28), CD72 (clon II-2) y HLA-DR (clon I-2) (Fig. 7) son clonadas en el plásmido de expresión pBC1 (según se proporciona en el sistema de expresión de pBC1 en leche de ratón, Invitrogen Life Technologies) para obtener la
- 55 expresión específica de la glándula mamaria y la lactancia de estas moléculas de IgG humana en animales transgénicos, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Estos vectores de expresión específicos de la glándula mamaria, que codifican las secuencias de anticuerpos para anti-CD22, anti-CD72 y anti-HLA-DR se

introducen en la línea germinal murina de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las crías obtenidas son cribadas en relación con la presencia de cada uno de las tres construcciones mediante PCR sobre ADN aislado de la cola. Las crías, ya sea macho o hembra, confirmadas por ser transgénicas para cada uno de los tres anticuerpos, se destetan y se maduran. Los ratones transgénicos hembra se fertilizan a la edad de 6 a 8 semanas y se obtienen muestras de leche en momentos después de la gestación. Los ratones transgénicos macho se aparearon con hembras no transgénicas y la descendencia transgénica hembra (como se determinó con PCR, tal como se ha descrito anteriormente) se aparean y se ordeñan como se describió anteriormente para los fundadores transgénicos hembra. En caso necesario, los fundadores transgénicos hembras o machos se aparean durante otra generación para poder obtener suficientes cantidades de leche transgénica para cada línea fundadora. La leche transgénica se analiza en relación con la presencia de IgG humana con un ELISA específico de la IgG humana, que no reacciona de forma cruzada con IgG de ratón u otros componentes de la leche de ratón. La IgG humana se purifica a partir de leche de ratón transgénico usando cromatografía de afinidad de Proteína A de acuerdo con procedimientos estándar. La IgG humana purificada se analiza en SDS-PAGE, enfoque isoelectrico y unión en las dianas CD22, CD72 y HLA-DR. La funcionalidad de la mezcla de anticuerpos se analiza como se describió antes.

Ejemplo 6 Producción de una mezcla IgA/IgG contra una diana predefinida en un clon derivado de PER.C6™.

Las secuencias V<sub>H</sub> - V<sub>L</sub> del fago UBS-54 dirigido contra la molécula de adhesión homotípica EP-CAM (de Huls et al., 1999) no sólo se clonó en un vector que codifica los dominios constantes de una IgG1 humana con la cadena ligera kappa (vector de expresión pUBS3000Neo), sino también en un vector de expresión que codifica los dominios constantes de una IgA1 humana con cadena ligera kappa (vector de expresión pUBS54-IgA, Fig. 8). Por ello, los anticuerpos derivados de pUBS3000Neo y pUBS54-IgA no se unen al mismo epítipo en EPCAM. Las únicas diferencias de anticuerpos derivados de pUBS3000Neo y pUBS54-IgA están en las secuencias que codifican los dominios constantes de la cadena pesada, lo que tiene por resultado un isotipo IgG<sub>1</sub> o bien IgA<sub>1</sub>. Las secuencias de la cadena ligera kappa de estos dos vectores son idénticas.

Se generan líneas de células estables derivadas de PER.C6™ que expresan anticuerpos codificados por información genética sobre pUBS3000Neo y pUBS54-IgA, mediante procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica. Por eso, se siembran células PER.C6™ en DMEM más 10% de SFB en placas de cultivo de tejidos (10 cm de diámetro) o frascos T80, con aproximadamente 2,5 x 10<sup>6</sup> células por placa y se mantienen durante la noche bajo sus condiciones normales de cultivo (concentración 10% de CO<sub>2</sub> y 37 °C). El día siguiente, se llevan a cabo transfecciones en placas separadas a 37 °C usando Lipofectamina (Invitrogen Life Technologies) de acuerdo con protocolos estándar proporcionados por el fabricante, bien sea con 1 a 2 µg de pUBS3000Neo o pUBS54-IgA. Como control para la eficiencia de la transfección, unas cuantas placas son transfectadas con un vector de control LacZ, mientras que unas cuantas placas no son transfectadas y sirven como controles negativos.

Después de 4 a 5 horas, las células se lavan dos veces con DMEM y se vuelven a alimentar con medio fresco sin selección. El día siguiente, el medio se reemplazó con medio fresco que contiene 500 µg/ml de G418. Las células se refrescan cada 2 o 3 días con medio que contiene las mismas concentraciones de G418. Aproximadamente de 20 a 22 días después de la siembra, es visible un gran número de colonias y de cada transfección se escogen al menos 300 y se las cultiva mediante placas de 96 pocillos y/o de 24-pocillos vía placas de 6 pocillos a frascos T25. En esta fase se congelan las células (por lo menos 1, pero usualmente 4 ampollas por colonia subcultivada) y los niveles de producción de IgG humana recombinante y anticuerpo IgA humano se determinan en el sobrenadante usando un ELISA específico para IgG1 humana, así como un ELISA específico para IgA humana. También, en esta etapa se elimina G418 del medio de cultivo y nunca vuelve a aplicarse de nuevo. Para un número representativo de colonias se cultivan volúmenes mayores para purificar la IgG<sub>1</sub> humana recombinante y la fracción IgA humana del sobrenadante acondicionado usando, por ejemplo, una combinación de cromatografía de afinidad de proteína L o LA, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de interacción hidrófoba y filtración en gel. Las inmunoglobulinas humanas purificadas de los diversos clones se analizan en SDS-PAGE, enfoque isoelectrico (IEF) y unión a la EPCAM diana utilizando líneas de células que tienen una alta expresión de esta molécula. Los clones también serán cribados por PCR en el ADN genómico en relación con la presencia o ausencia de pUBS3000Neo y pUBS54-IgA. La identidad de los productos de la PCR se confirma adicionalmente mediante secuenciación de ADN.

Un número limitado de clones, que se criban como positivos para la producción tanto de IgG<sub>1</sub> de EPCAM como de IgA de EPCAM, son sometidos a clasificación de una sola célula utilizando un clasificador de células activado por fluorescencia (FACS) (Becton Dickinson FACS VANTAGE SE). Alternativamente, las colonias se sembraron a razón de 0,3 células/pocillo para garantizar descendencia clonal. Las poblaciones celulares clonales, designados en lo sucesivo como sub-clones, se refrescan una vez por semana con medio fresco. Los sub-clones son cultivados y transferidos de placas de 96 pocillos vía placas de 24 y 6 pocillos a matraces T25. En esta fase, los sub-clones se congelan (al menos 1, pero normalmente 4 ampollas por subclón) y los niveles de producción de anticuerpo IgG<sub>1</sub> humana recombinante e IgA se determinan en el sobrenadante usando un ELISA específico para IgG<sub>1</sub> humana y un ELISA específico para IgA humana. Para un número representativo de sub-clones, se cultivan volúmenes más grandes para purificar la fracción de IgG<sub>1</sub> humana recombinante y IgA humana del sobrenadante acondicionado usando, por ejemplo una combinación de cromatografía de afinidad de proteína L o LA, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de interacción hidrófoba, y filtración en gel. Las inmunoglobulinas humanas purificadas de los diversos clones se analizan en SDS-PAGE, enfoque isoelectrico (IEF) y unión a la EPCAM diana utilizando líneas de células que tienen una alta expresión de esta molécula. Los sub-clones también serán cribados

por PCR sobre el ADN genómico en relación con la presencia o ausencia de pUBS3000Neo y pUBS54-IgA. La identidad de los productos de la PCR se confirma adicionalmente mediante secuenciación de ADN. Otros métodos tales como transferencia Southern y/o FISH también se pueden usar para determinar si ambas construcciones están presentes en la línea celular clonal.

#### 5 Ejemplo 7 Producción de una mezcla IgG<sub>1</sub>/IgG<sub>3</sub> humana contra dianas múltiples en una línea de células PER.C6™ clonal.

Se obtuvieron clones de fago UBS-54 y K53 (Fig. 3) como se describe en el Ejemplo 1. V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> del clon UBS-54 fue insertado en un vector de expresión que contiene la secuencia líder HAVT20 y todas las secuencias de codificación para los dominios constantes de una IgG<sub>1</sub> humana con una cadena ligera Kappa por un método esencialmente como se describe (Boel et al, 2000). El plásmido resultante fue designado como pUBS3000Neo (Fig. 4). Será evidente que los vectores de expresión que contienen dominios constantes de la cadena pesada de cualquier isotipo deseado se pueden construir por métodos de biología molecular rutinarios, usando las secuencias de estas regiones que son todas disponibles en la técnica. Las secuencias V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> del clon de fago K53 se clonan en un vector de expresión que contiene la secuencia líder HAVT20 y todas las secuencias de codificación para los dominios constantes de una cadena pesada de IgG<sub>3</sub> humana con una cadena ligera Kappa por un método esencialmente como se ha descrito (Boel et al, 2000). Este vector de expresión se designa como pK53IgG3.

Estos plásmidos se expresaron transitoriamente bien sea solos o en combinación en células PER.C6™. En resumen, cada frasco de 80 cm<sup>2</sup> se transfecta por incubación durante 4 horas con 140 µl de lipofectamina + 10 µg de ADN (bien sea pUBS3000Neo, pK53IgG3 o bien 10 pg de ambos) en medio DMEM libre de suero a 37 °C. Al cabo de 4 horas, este se sustituye con DMEM + 10% de FBS, y las células se cultivan durante la noche a 37 °C. Las células se lavan después con PBS y el medio se reemplaza con medio Excell 525 (JRH Bioscience). Las células se dejaron crecer a 37 °C durante 6 días, después de lo cual se recolecta el sobrenadante del cultivo celular. Se hace el análisis ELISA específico de IgG humana, es decir, midiendo todos los sub-tipos de IgG, para determinar la concentración de IgG en las células PER.C6™ transfectadas y no transfectadas. La IgG humana de cada sobrenadante se purifica a continuación usando cromatografía de afinidad de Proteína A (Hightrap Protein A HP, n° de cat. 1-040.203) de acuerdo con procedimientos estándar, siguiendo las recomendaciones del fabricante (Amersham Biosciences). Después de la elución, las muestras se concentran en un concentrador Microcon YM30 (Amicon) y se cambia el tampón a fosfato sódico 10 mM, pH 6,7. Las muestras se analizan en relación con la unión a las dianas EPCAM y CD46 utilizando líneas de células que tienen una alta expresión de estas moléculas tales como células las LS174T. Doce µg de IgG purificada, bien sea IgG1 de UBS-54 expresado transitoriamente, IgG3 de K53 o IgG de las células en las que ambos anticuerpos fueron co-transfectadas, se analizan posteriormente en geles de enfoque isoelectrico (geles Serva Pre-cast IEF, intervalo de pH 3 - 10, n° cat. 42866). Las muestras se cargan en el lado de bajo pH y tras enfocar se tiñeron con azul coloidal. Los valores de pI de las isoformas principales para cada muestra se determinan para ilustrar si ha habido expresión de IgG1 de UBS-54, IgG3 de K53 o heterodímeros biespecíficos, dependiendo de cómo se transfectaron las células. La identificación de heterodímeros indicaría que las células individuales han traducido tanto la cadena pesada de IgG3 de K53 como la cadena pesada de IgG1 de UBS-54 y ensamblados estos en una molécula de IgG de longitud completa junto con la cadena ligera común. La ausencia de heterodímeros biespecíficos indica que es posible traducir tanto la cadena pesada de IgG3 de K53 como la cadena pesada de IgG1 de UBS-54 en las células individuales, pero que éstas no se ensamblan para formar una molécula de IgG de longitud completa junto con la cadena ligera común, es decir, hay unión preferencial de cadenas pesadas de IgG1 e IgG3. Sin embargo esto podría también explicarse por la falta de co-expresión de IgG1 de UBS-54 y IgG3 de K53. Por consiguiente, las líneas de células clonales estables que expresan tanto pUBS3000Neo como pK53IgG3 se generan por procedimientos tales bien conocidos por los expertos en la técnica. Se sembraron células PER.C6™ en DMEM más 10% de SFB en placas de cultivo de tejidos (10 cm de diámetro) o frascos T80, con aproximadamente 2,5 x 10<sup>6</sup> células por placa y se mantuvieron durante la noche bajo sus condiciones de cultivo normales (10% de CO<sub>2</sub> de concentración y 37°C). El día siguiente, se llevan a cabo transfecciones en placas separadas a 37 °C usando Lipofectamina (Invitrogen Life Technologies) de acuerdo con protocolos estándar proporcionados por el fabricante, bien sea con 1 - 2 µg de pUBS3000Neo, pK53IgG3 o ambos. Como control para la eficiencia de la transfección, unas cuantas placas son transfectadas con un vector de control LacZ, mientras que unas cuantas placas no serán transfectadas y sirven como controles negativos.

Después de 4-5 horas, las células se lavan dos veces con DMEM y se vuelven a alimentar con medio fresco sin selección. El día siguiente, el medio se reemplaza con medio fresco que contiene 500 µg/ml de G418. Las células se refrescan cada 2 o 3 días con medio que contiene las mismas concentraciones de G418. Aproximadamente 20 - 22 días después de la siembra, es visible un gran número de colonias y de cada transfección se seleccionaron al menos 300 y se desarrollaron a través de placas de 96 pocillos y/o de 24-pocillos a través de placas de 6 pocillos a frascos T25. En esta fase se congelan las células (por lo menos 1, pero normalmente 4 ampollas por colonia subcultivada) y los niveles de producción de anticuerpo de IgG humana recombinante se determinan en el sobrenadante usando un ELISA específico para todos los subtipos de IgG humana. También, en esta etapa se elimina G418 del medio de cultivo y no vuelve a aplicarse de nuevo. Para un número representativo de colonias se cultivan volúmenes más grandes para purificar la IgG humana recombinante a partir del sobrenadante acondicionado usando cromatografía de afinidad de proteína A (Hightrap Protein A HP, n° de cat 1-040203) de acuerdo con procedimientos estándar, siguiendo las recomendaciones del fabricante (Amersham Biosciences). Inmunoglobulinas humanas purificadas de los diversos clones se analizan en SDS-PAGE, enfoque isoelectrico (IEF) y unión a las dianas

EPCAM y CD46 utilizando líneas de células que tienen una alta expresión de estas moléculas tales como las células LS174T. Los clones también se criban mediante PCR sobre el ADN genómico en relación con la presencia o ausencia de pUBS3000Neo y pK53IgG3. La identidad de los productos de la PCR se confirmó adicionalmente mediante secuenciación de ADN.

- 5 Un número limitado de clones, que se criban como positivos para la producción tanto de IgG1 de EPCAM como de IgG3 de K53, se someten a clasificación de una sola célula utilizando un clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS) (Becton Dickinson FACS VANTAGE SE). Alternativamente, las colonias se siembran a razón de 0,3 células/pocillo para garantizar descendencia clonal. Poblaciones celulares clonales, en adelante designadas como sub-clones, se refrescan una vez por semana con un medio nuevo. Los sub-clones son cultivados y transferidos desde 96 pozos a través de placas de 24 y 6 pocillos a matraces T25. En esta etapa, los sub-clones se congelan (por lo menos 1, pero normalmente 4 ampollas por subclón) y los niveles de producción de anticuerpo IgG humana recombinante se determinan en el sobrenadante usando un ELISA específico de IgG humana. Para un número representativo de sub-clones, se cultivan volúmenes más grandes para purificar la fracción de IgG humana recombinante a partir del sobrenadante acondicionado usando cromatografía de afinidad de proteína A (Hightrap Protein A HP, n° de cat. 1-040203) de acuerdo con procedimientos estándar, siguiendo las recomendaciones del fabricante (Amersham Biosciences). Las inmunoglobulinas humanas purificadas de los diversos clones se analizan en SDS-PAGE, enfoque isoeléctrico (IEF) y unión a las dianas EPCAM y CD46 utilizando líneas de células que tienen una alta expresión de estas moléculas, tales como por ejemplo las células LS174T, o transfectantes que expresan estas moléculas. Los sub-clones son también examinados por PCR sobre el ADN genómico en relación con la presencia o ausencia de pUBS3000Neo y pK53IgG3. La identidad de los productos de la PCR se confirmó adicionalmente mediante secuenciación de ADN.

También se pueden utilizar otros métodos tales como transferencia Southern y/o FISH para determinar si ambas construcciones están presentes en la línea celular clonal.

- 25 Una vez que los sub-clones clonales están disponibles y confirmados como positivos para la expresión tanto de IgG1 de UBS-54 como de IgG3 de K53, la presencia de K53 y UBS-54 funcional demuestra que es posible generar una mezcla de IgGs funcionales con diferentes isotipos con la cadena ligera común en una sola célula. El análisis de la expresión de anticuerpos biespecíficos de unión tanto de EpCAM como de CD46 revelará en qué medida se emparejarán las diferentes cadenas pesadas que tienen un subtipo diferente, lo que influirá sobre la cantidad de anticuerpos biespecíficos producidos. Se espera que en este caso no se encontrarán anticuerpos biespecíficos o se hará en muy bajos niveles de los mismos.

Ejemplo 8. Selección de fago que lleva fragmentos Fv de cadena simple que reconoce específicamente la glucoproteína del virus de la rabia (RVGP) usando proteína de fusión RVGP-Ig, y expresión de las mezclas de anticuerpos contra el virus de la rabia.

- 35 Este ejemplo describe la producción de mezclas de anticuerpos contra el virus de la rabia, como otra diana potencial. Como antígeno se elige la glucoproteína del virus de la rabia de (RVGP), pero pueden ser elegidos o incluidos otros antígenos de la rabia también para este propósito. Ya se han descrito en la técnica varios anticuerpos monoclonales que reconocen RVGP, y así mismo se han reconocido anticuerpos policlonales útiles en el tratamiento de infecciones de la rabia (p. ej. EP0402029; EP0445625).

- 40 Se seleccionan fragmentos de anticuerpos usando bibliotecas de anticuerpos de presentación de fago y tecnología MAbstract™, esencialmente como se describe en la patente de EE.UU. n° 6.265.150 y en el documento WO 98/15833. Todos los procedimientos se realizan a temperatura ambiente a menos que se indique lo contrario. La secuencia de RVGP está disponible para los expertos en la técnica, para fines de clonación (p. ej. Yelverton et al., 1983). Una proteína de fusión RVGP-Ig que consiste en RVGP entera fusionada genéticamente con los dominios CH2 y CH3 de la IgG1 humana se produce utilizando vectores pcADN3.1 Zeo-CH2-CH3 expresado en PER.C6™ y recubierto durante 2 horas a 37 °C sobre la superficie de tubos de plástico Maxisorp™ (Nunc) a una concentración de 1,25 µg/ml. Los tubos se bloquean durante 1 h en 2% de polvo de leche libre de grasa disuelto en PBS (MPBS). Simultáneamente, se añaden 500 µl (aproximadamente 10<sup>13</sup> ufc) de una biblioteca de presentación de fagos que expresan fragmentos Fv de cadena simple (scFv's) preparada esencialmente como se describe en De Kruif et al. (1995a, b) y las referencias en dicho trabajo, a dos volúmenes de MPBS al 4%. En este experimento, las selecciones se realizaron con fracciones de la biblioteca original construidas usando sólo una especie de gen de cadena ligera variable individual (p. ej. una biblioteca "VK1"). Además, se añade suero humano hasta una concentración final de 15% y se deja que tenga lugar el bloqueo durante 30 a 60 min. Los tubos recubiertos con RVGP-Ig se vacían y se añade la biblioteca de fagos bloqueados. El tubo se sella y se hace girar lentamente durante 1 h, seguido por 2 h de incubación sin rotación. Los tubos se vacían y se lavan 10 veces en PBS que contiene 0,1% de Tween-20, seguido por el lavado 5 veces en PBS. Se añade 1 µl de glicina-HCl, 0,05 M, pH 2,2, y el tubo se hace girar lentamente durante 10 min. Los fagos eluidos se añaden a 500 µl de Tris-HCl 1 M, pH 7,4. A esta mezcla se añaden 3,5 µl de cultivo bacteriano azul XL-1 en crecimiento exponencial. Los tubos se incuban durante 30 min a 37 °C sin agitar. Entonces, las bacterias se ponen en placas sobre placas de agar 2TY que contiene ampicilina, tetraciclina y glucosa. Después de incubar las placas durante la noche a 37 °C, las colonias se raspan de las placas y se utilizan para preparar una biblioteca de fagos enriquecida, esencialmente como se describe en De Kruif et al. (1995a, b). Brevemente, las bacterias raspadas se utilizan para inocular medio 2TY que contiene ampicilina,

tetraciclina y glucosa y se hacen crecer a una temperatura de 37 °C hasta una  $DO_{600\text{ nm}}$  de ~ 0,3. Se añaden fagos colaboradores y se deja que infecten a las bacterias después de lo cual se cambia el medio a 2TY que contiene ampicilina, tetraciclina y kanamicina. La incubación se prolongó durante la noche a 30 °C. El día siguiente, las bacterias se eliminan del medio 2TY mediante centrifugación después de lo cual los fagos se precipitan usando polietilenglicol 6000/NaCl. Finalmente, los fagos se disuelven en un pequeño volumen de PBS-1% de BSA, se esterilizan por filtración, y se usan para una siguiente ronda de selección. El procedimiento de selección/ reinfeksi3n se realiza dos veces. Después de la segunda ronda de selección, se utilizan colonias de *E. coli* individuales para preparar anticuerpos de fago monoclonales. Esencialmente, las colonias individuales se cultivan hasta fase log y se infectan con fagos colaboradores después de lo cual se deja que tenga lugar la producción de anticuerpos de fago durante la noche. Los sobrenadantes que contienen anticuerpos de fago se ensayan en ELISA en relación con la actividad de unión a placas de 96 pocillos recubiertas con RVGP-Ig humana.

Anticuerpos de fagos seleccionados que se obtienen en el cribado que se ha descrito anteriormente, se validan en un ensayo ELISA en relación con su especificidad. Para este propósito, la RVGP-Ig humana se aplica como recubrimiento a las placas de ELISA Maxisorp. Después del recubrimiento, las placas se bloquean en MPBS al 2%. Los anticuerpos de fagos seleccionados se incuban en un volumen igual de MPBS al 4%. Las placas se vacían, se lavan una vez en PBS, después de lo cual se añaden los fagos bloqueados. Se deja que prosiga la incubación durante 1 h, las placas se lavan con Tween-20 en PBS al 0,1%, y los fagos unidos se detectan utilizando un anticuerpo anti-M13 conjugado con peroxidasa. Como control, el procedimiento se realiza de forma simultánea usando un anticuerpo de fago testigo dirigido contra la tiroglobulina (De Kruif et al. 1995a, b), que sirve como control negativo.

Los anticuerpos de fago que se unen a RVGP-Ig humana se ensayan subsiguientemente en relación con la unión a IgG de suero humano para excluir la posibilidad de que reconociese la parte Fc de la proteína de fusión.

En otro ensayo los anticuerpos de fagos se analizan en relación con su capacidad para unirse a células PER.C6™ que expresan RVGP. Para este propósito las células PER.C6™ son transfectadas con un plásmido que lleva una secuencia de cADN que codifica RVGP o con el vector vacío, y los transfectantes estables se seleccionan usando técnicas estándar conocidas por los expertos en la técnica (p. ej. Coligan, JE et al. (2001) Current Protocols in protein science, volumen I. John Wiley & Sons, Inc., Nueva York). Para el análisis de citometría de flujo, los anticuerpos de fagos se bloquean primero en un volumen igual de MPBS al 4% durante 15 min a 4 °C antes de la tinción de las células PER.C6™ transfectadas con RVGP y de control. Los fagos bloqueados se añaden a una mezcla de células PER.C6™ transfectadas testigo no marcadas y células PER.C6™ transfectadas con RVGP que han sido etiquetadas verde usando un colorante lipófilo (PKH67, Sigma). La unión de los anticuerpos de fagos con las células se visualizan usando un anticuerpo anti-M13 biotinilado (Santa Cruz Biotechnology) seguido por estreptavidina-ficoeritrina (Caltag). El scFv anti RVGP tiñe selectivamente el transfectante RVGP de PER.C6™ aunque no se unen al transfectante testigo.

Una forma alternativa de cribado de fagos que llevan fragmentos Fv de una sola cadena que reconocen específicamente la RVGP humana, es mediante el uso de células PER.C6™ transfectadas con RVGP. Las células PER.C6™ que expresan RVGP unida a la membrana se producen como se describió más arriba. Se realizaron experimentos de selección de fagos como se ha descrito más arriba, usando estas células como diana. Una fracción de la biblioteca de fagos compuesta por partículas de fago-scFv usando sólo una especie de scFv individual (500 µl, aproximadamente  $10^{13}$  ufc) se bloquea con 2 µl de RPMI/10% de FCS/1% de NHS durante 15 minutos a temperatura ambiente. Células PER.C6™ no transfectadas ( $\sim 10^6$  células) se añadieron a las células PER.C6-RVGP ( $\sim 1,0 \times 10^6$  células). Esta mezcla se añade a la biblioteca de fagos restringida de cadena ligera bloqueada y se incubaba durante 2,5 h rotando lentamente a 4 °C. Subsiguientemente, las células se lavan dos veces y se resuspenden en 500 µl RPMI/10% de FCS y se incuban con un anticuerpo murino anti-RVGP (Becton Dickinson) seguido por un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con ficoeritrina (PE) (Caltag) durante 15 minutos en hielo. Las células se lavan una vez y se transfieren a un tubo de 4 ml. Se lleva a cabo la clasificación de células en un clasificador de células FACSVantage activado por fluorescencia (Becton Dickinson) y se clasifican las células RVGP (positivas para PE). Las células clasificadas se sedimentan mediante centrifugación, se reserva el sobrenadante y los fagos unidos se eluyen de las células mediante la resuspensión de las células en 500 µl de glicina 50 mM pH 2,2 seguido por incubación durante 5 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se neutraliza con 250µl de Tris-HCl1M, pH 7,4 y se añade al sobrenadante reservado. Colectivamente estos fagos se usan para preparar una biblioteca de fagos enriquecida como se describió anteriormente. El procedimiento de selección/re-infección se realiza dos veces. Después de la segunda ronda de selección, se prepararon anticuerpos de fagos monoclonales y se ensayaron para la unión con células RVGP-PER.C6™ y células PER.C6™ no transfectadas como se describe más arriba. Los fagos que son positivos en las células transfectadas con RVGP se ensayan posteriormente en relación con la unión con la proteína de fusión RVGP-IgG en ELISA como se describe más arriba.

Los fragmentos scFv seleccionados se clonan en un formato de IgG1 humana, de acuerdo con métodos conocidos en la técnica (p. ej. Boel et al, 2000). Para este propósito, el fragmento VL compartido por el scFv seleccionado es amplificado por PCR usando oligos que añaden los sitios de restricción apropiados. Un procedimiento similar se usa para los genes VH. Por tanto los genes modificados se clonan en pCRU-K01 de expresión (depósito ECACC 03041601), lo que tiene como resultado vectores de expresión que codifican una cadena pesada de hulgG1 completa y un gen de cadena ligera humana completa que tiene la misma especificidad que el clon de fago original.

Por este método, tres cadenas pesadas diferentes se clonan en vectores de expresión separados, mientras que sólo uno de los vectores ha de comprender la secuencia de la cadena ligera común. Estos vectores de expresión se designan provisionalmente pCRU-RVGP-1, pCU-RVGP-2, y pCRU-RVGP-3. Alternativamente, estos tres vectores pueden carecer del ADN que codifica la región  $V_L$ , que después puede ser codificada en un cuarto vector de expresión separado que no codifica una cadena pesada. También es posible tener secuencias  $V_L$  presentes en los tres o dos de los tres vectores que comprenden las diferentes secuencias  $V_H$ .

Se generan líneas de células derivadas de PER.C6™ estables, de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica (véase p. ej. el documento WO 00/63403), las líneas de células que expresan anticuerpos codificados por información genética sobre pCRU-RVGP-1, pCRU-RVGP-2 o bien pCRU-RVGP-3 y una línea de células que expresan anticuerpos codificados por los tres plásmidos. Por tanto, se sembraron células PER.C6™ en DMEM más 10% de SFB en placas de cultivo de tejidos (10 cm de diámetro) o frascos T80, con aproximadamente  $2,5 \times 10^6$  células por placa y se mantuvieron durante la noche bajo sus condiciones de cultivo normales (10% de  $CO_2$  de concentración y 37 °C). El día siguiente se llevan a cabo transfecciones en placas separadas a 37 °C usando Lipofectamina (Invitrogen Life Technologies) de acuerdo con protocolos estándar proporcionados por el fabricante, bien sea con 1 - 2 µg de pCRU-RVGP-1, 1 - 2 µg de pCRU-RVGP-2, 1 - 2 µg de pCRU-RVGP-3 o bien 1 µg de una mezcla de pCRU-RVGP-1, pCRU-RVGP-2 y pCRU-RVGP-3. Como control para la eficiencia de la transfección, unas cuantas placas son transfectadas con un vector de control LacZ, mientras que unas cuantas placas no son transfectadas y sirven como controles negativos.

Al cabo de 4 a 5 horas, las células se lavan dos veces con DMEM y se vuelven a alimentar con medio fresco sin selección. El día siguiente, el medio se reemplaza con medio fresco que contiene 500 µg/ml de G418. Las células se refrescan cada 2 o 3 días con medio que contiene las mismas concentraciones de G418. Aproximadamente 20 - 22 días después de la siembra, son visibles numerosas colonias y, de cada transfección, se escogen al menos 300 y se las cultiva vía placas de 96 pocillos y/o de 24-pocillos vía placas de 6 pocillos a matraces T25. En esta fase, las células se congelan (por lo menos 1, pero normalmente 4 ampollas por colonia subcultivada) y los niveles de producción de anticuerpo IgG humana recombinante se determinan en el sobrenadante usando un ELISA específico para IgG<sub>1</sub> humana (descrito en el documento WO 00/63403). También, en esta etapa se elimina G418 del medio de cultivo y no se vuelve a aplicar de nuevo. Para un número representativo de colonias se pueden cultivar volúmenes más grandes para purificar la fracción IgG<sub>1</sub> humana recombinante del sobrenadante acondicionado usando cromatografía de afinidad de Proteína A de acuerdo con procedimientos estándar. La IgG<sub>1</sub> humana purificada de los diversos clones se analiza en SDS-PAGE, enfoque isoeléctrico (IEF) y unión a la RVGP diana usando un transfectante PER.C6-RVGP descrito anteriormente.

Las colonias obtenidas de la co-transfección con pCRU-RVGP -1, pCRU-RVGP-2 y pCRU-RVGP-3 se criban mediante PCR sobre el ADN genómico en relación con la presencia o ausencia de cada uno de las tres construcciones. La identidad de los productos de la PCR se confirmó adicionalmente mediante secuenciación de ADN.

Un número limitado de colonias, que se cribaron como positivas para la producción de cada una de los tres especificidades de unión (tanto por PCR a nivel de ADN, así como en los ensayos de unión especificados contra RVGP), se someten a clasificación de célula única utilizando un clasificador de células activado por fluorescencia (FACS) (Becton y Dickinson FACS VANTAGE SE). Alternativamente, las colonias se siembran a razón de 0,3 células/pocillo para garantizar descendencia clonal. Las poblaciones celulares clonales, designadas en lo sucesivo como sub- clones, se refrescan una vez por semana con medio nuevo. Los sub- clones son cultivados y transferidos de 96 pocillos a través de placas de 24 y 6 pocillos a matraces T25. En esta fase, los sub- clones se congelan (por lo menos 1, pero normalmente 4 ampollas por subclón) y los niveles de producción de anticuerpo de IgG<sub>1</sub> humana recombinante se determinan en el sobrenadante utilizando un ELISA específico para IgG<sub>1</sub> humana. Para un número representativo de sub- clones, se cultivan volúmenes más grandes para purificar la fracción de IgG<sub>1</sub> humana recombinante del sobrenadante acondicionado usando cromatografía de afinidad de Proteína A de acuerdo con procedimientos estándar. La IgG<sub>1</sub> humana purificada de los varios sub- clones se analiza posteriormente como se describe anteriormente para la IgG<sub>1</sub> humana obtenida a partir de los clones progenitores, es decir por SDS-PAGE, enfoque isoeléctrico (IEF) y unión a RVGP diana. Los sub- clones son también examinados por PCR sobre el ADN genómico en relación con la presencia o ausencia de cada una de las tres construcciones pCRU-RVGP-1, pCRU-RVGP-2 y pCRU-RVGP-3. La identidad de los productos de la PCR se confirma adicionalmente mediante secuenciación de ADN. También se pueden utilizar otros métodos tales como transferencia Southern y/o FISH para determinar si cada una de las tres construcciones están presentes en la línea celular clonal.

Los sub- clones que han demostrado ser transgénicos para cada una de las tres construcciones se ponen en cultivo durante un amplio período para determinar si la presencia de los transgenes es estable y si la expresión de la mezcla de anticuerpos sigue siendo la misma, no sólo en términos de niveles de expresión, sino también para la relación entre las diversas isoformas de anticuerpos que se segregan desde la célula. Por consiguiente, el cultivo de sub- clon se mantiene durante al menos 25 veces de duplicación de la población bien sea como cultivo adherente o bien como cultivo en suspensión. En cada 4 - 6 duplicaciones de la población, se lleva a cabo una prueba de producción concreta utilizando el ELISA específico para IgG humana y se cultivan volúmenes más grandes para obtener el sedimento celular y el sobrenadante. El sedimento de células se utiliza para evaluar la presencia de las tres construcciones en el ADN genómico, bien sea a través de PCR, transferencia Southern y/o FISH. El

sobrenadante se usa para purificar la fracción de IgG<sub>1</sub> humana recombinante como se ha descrito anteriormente. La IgG<sub>1</sub> humana purificada obtenida en las diversas duplicaciones de la población se analiza como se ha descrito, es decir por SDS-PAGE, enfoque isoeléctrico (IEF) y unión a RVGP diana.

La eficacia de las mezclas de anticuerpos contra la rabia se prueba en ensayos de cultivo celular in vitro en los que se mide la disminución de la propagación del virus de la rabia, así como in vivo en modelos animales infectados por la rabia. Tales modelos son conocidos por los expertos en la técnica, y se describen por ejemplo en EP0402029.

Ejemplo 9. Producción de una mezcla de anticuerpos con una cadena ligera común y tres regiones variables de cadena pesada diferentes en una única célula.

En el presente texto se ejemplifica y se muestra esquemáticamente en la Fig. 6 un método para producir una mezcla de anticuerpos de acuerdo con la invención, utilizando la expresión en una célula hospedadora recombinante de una sola cadena ligera y tres cadenas pesadas diferentes capaces de emparejarse con la cadena ligera única para formar anticuerpos funcionales.

IgGs humanas UBS54 y K53 contra la molécula de adhesión homotípica EP-CAM (Huls et al., 1999) y la proteína cofactor de la membrana CD46 (WO 02/18948), respectivamente, se describen en el Ejemplo 1. Otro clon que se identificó que se une a la proteína cofactor CD46 fue el clon 02-237 (secuencia de VH proporcionada en la Fig. 12). La secuenciación del ADN de este clon reveló que contenía la misma cadena ligera que UBS54 y K53, pero una única secuencia variable de cadena pesada (véase la alineación en la Fig. 3). Como resultado, la CDR3 de la cadena pesada de 02-237 difiere en 4 posiciones desde la de K53 (véase la alineación en la Fig. 13). Las secuencias variables de las cadenas pesada y ligera de fago 02-237 fueron clonadas en el plásmido de expresión pCRU-K01, (pCRU-K01 está depositado en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) bajo el número 03041601), que contiene los dominios constantes de cadena pesada y ligera de un anticuerpo IgG1. El plásmido resultante se designó pgG102-237. Debido a la estrategia de clonación seguida, el término N resultante de la cadena ligera de 02-237 como codificada por pgG102-237 difería ligeramente del término N de UBS54 y K53 como se presenta por pUBS3000Neo, pCD46\_3000 (Neo), respectivamente (Fig. 3). El plásmido pgG102-237 fue producido de forma transitoria en 293 células (T) humanas o establemente en células PER.C6. Parecía que la 02-237 IgG purificada tenía una afinidad mucho mayor para CD46 purificado (Fig. 14) que IgG K53, es decir, la afinidad había aumentado de  $9,1 \times 10^{-7}$  M a  $2,2 \times 10^{-8}$  M para K53 y 02-237, respectivamente. También, 02-237 se unió mucho mejor con CD46 en células LS174T de carcinoma de colon humano que K53 (Fig. 15).

Líneas de células derivadas de PER.C6<sup>TM</sup> estables que expresan una combinación de los plásmidos pUBS3000Neo, pCD46\_3000 (Neo) y pgG102-237 que codifica IgG humana 02-237, se generaron de acuerdo con los métodos conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, el documento WO 00/63403). Por tanto, las células PER.C6<sup>TM</sup> se sembraron en DMEM más 10% de FBS en placas de cultivo de tejidos (10 cm de diámetro) con aproximadamente  $2,5 \times 10^6$  células por placa y se mantuvieron durante la noche bajo sus condiciones de cultivo normales (concentración de CO<sub>2</sub> 10% y 37 °C). El día siguiente, se realizaron las transfecciones en placas separadas a 37 °C usando Lipofectamina (Invitrogen Life Technologies) de acuerdo con protocolos estándar proporcionados por el fabricante, con 2 µg de una mezcla equimolar de pUBS3000Neo, pCD46\_3000 (Neo) y pgG102-237. Como control negativo para la selección, unas cuantas placas no fueron transfectadas. Después de 4 a 5 horas, las células se lavaron dos veces con DMEM y se volvieron a alimentar con medio fresco sin selección. El día siguiente, el medio se reemplazó con medio fresco que contiene 500 µg/ml de G418. Las células se refrescaron cada 2 o 3 días con medio que contiene las mismas concentraciones de G418. Aproximadamente 20 - 22 días después de la siembra, fueron visibles numerosas colonias y cerca de 300 se seleccionaron y se cultivaron vía placas de 96 pocillos y/o de 24-pocillos vía placas de 6 pocillos a matraces T25. Durante el sub-cultivo, se determinaron los niveles de producción de anticuerpo IgG humana recombinante en el sobrenadante usando un ELISA específico para IgG1 humana (descrito en el documento WO 00/63403). Aproximadamente el 25% de todas las colonias parecían ser positivas en este ensayo altamente específico. Los niveles de producción medidos en esta fase eran comparables a los niveles cuando se expresa una sola IgG en células PER.C6<sup>TM</sup> (la expresión de una única IgG se describe en Jones et al., 2003). Es importante hacer hincapié en que estos niveles altos de expresión se obtuvieron sin ningún método para la amplificación del transgén y que ocurren en un número bajo de copias del transgén.

Las 30 colonias que producen mejor se congelaron en viales y los 19 clones de producción más alta fueron seleccionados para purificación de la IgG (Tabla 1). Fueron sub-cultivados en matraces T80 y la IgG humana de cada clon se purificó subsiguientemente usando cromatografía de afinidad de Proteína A. Por tanto, 15 - 25 ml de medio condicionado se cargaron en una columna de 5 ml de Proteína A Sepharose FF (Amersham Biosciences). La columna se lavó con solución salina tamponada con fosfato 4 mM, pH 7,4 (PBS) antes de la elución con citrato 0,1 M pH 3,0. La fracción eluida se desala a continuación en una columna de desalación Sephadex G25 Fine HiPrep (Amersham Biotech) a PBS. La concentración de la fracción de IgG purificada se determinó por medida de la absorbancia a 280 nm usando un coeficiente de 1,4 para una solución al 0,1% (p/v) (Tabla 1).

Las muestras de IgG purificadas se analizaron en SDS-PAGE no reducida y reducida y IEF. La SDS-PAGE no reducida (Fig. 16A) indicó que todas las muestras de IgG migraron de forma comparable a la del control K53 o 02-237, como una molécula de IgG ensamblada intacta de aproximadamente 150 kDa. En SDS-PAGE reducida (Fig.

16B), las muestras de IgG migraron como cadenas pesada y ligera de aproximadamente 50 y 25 kDa, respectivamente, comparables a las cadenas pesada y ligera del control K53 o 02-237.

En IEF, las fracciones de IgG purificadas se comparan en primer lugar con una mezcla de iguales cantidades de K53, UBS54 y 02-237 (Fig. 17). Claramente, algunas de las muestras contenían isoformas con un perfil pl único, en comparación con la mezcla que contiene K53, UBS54 y 02-237 purificadas. Algunas de las isoformas principales únicas tienen un pl entre el pl de K53 y 02-237 por un lado y el de UBS54 por otro. Esto también se prevé sobre la base del pl teórico cuando se calcula con la herramienta ProtParam proporcionada en la página de inicio Expasy (<http://www.expasy.ch>; Appel y otros, 1994). K53, 02-237 y UBS54 tener un pl teórico de 8,24, 8,36 y 7,65, respectivamente, mientras que una isoforma que representa un heterodímero de una cadena pesada de UBS54 y una cadena pesada de K53 tiene un pl teórico de 8,01. El ensamblaje de un heterodímero sólo puede ocurrir cuando una sola célula traduce tanto la cadena pesada de K53 como la cadena pesada de UBS54 y las ensambla en una molécula de IgG de longitud completa junto con la cadena ligera común. Por lo tanto estos resultados sugieren que ciertos clones al menos expresan dos anticuerpos funcionales. Para confirmar la identidad única de algunas de las isoformas, las muestras de los clones más interesantes se analizaron en paralelo con K53, UBS54 y 02-237, ya sea solo o en una mezcla (Fig. 18). Esto además indicó que algunos clones expresaban al menos dos anticuerpos (241, 282, 361). Además, proporcionó evidencia de que algunos clones expresan los tres anticuerpos funcionales (280 y 402).

Para confirmar que los clones expresaban mezclas de IgG que comprenden las tres cadenas pesadas, se utilizó el mapeo de péptidos (Garnick, 1992; Gelpi, 1995) para analizar la fracción de IgG policlonal. Los autores de la presente invención emplearon previamente el mapeo de péptidos para recuperar el 99% de la secuencia de la proteína de K53. Basándose en la secuencia de proteína proporcionada en la Fig. 12 se calculó la masa de los péptidos trípticos teóricos de K53, UBS54 y 02-237 (Tabla II y III). Unos pocos péptidos únicos para cada IgG pudieron ser identificados, es decir, p. ej. los péptidos CDR3 para K53, 02-237 y UBS54 con un Pm de 2116,05, 2057,99 y 2307,15 Da, respectivamente. A continuación, se preparó una digestión triptica de poli 1-280 y esto se analizó utilizando LC-MS (Fig. 19). Se detectaron los péptidos con Pm de 2.116, 2.057 y 2.308 Da, que representan a los péptidos CDR3 únicos de K53, 02-237 y UBS54, respectivamente. La secuencia de aminoácidos precisa de estos péptidos (como se expone en la Tabla III) se confirmó mediante análisis de MS-MS (Tablas IV, V y VI). Los autores de la presente invención confirmaron también la presencia de los dos péptidos de cadena ligera N-terminal únicos con Pm 2580 y 2554 Da, respectivamente. Los datos del mapeo de péptidos mostró inequívocamente que una mezcla de anticuerpos que comprenden una cadena ligera común y tres cadenas pesadas diferentes fue expresada por el clon de PER.C6™ pol11-280. También fueron cribados los clones 055, 241 y 402 por mapeo de péptidos. Los clones 241 y 402 fueron confirmados positivos para las tres secuencias de cadena pesada, mientras que el clon 055 sólo mostró la expresión de las cadenas pesadas de K53 y 02-237, y no de UBS54. Esto confirma el cribado por IEF (Fig. 18) donde no se observó ninguna banda relacionada con UBS54 en la muestra 055.

El poli1-280 se analizó por BIACORE en relación con la unión con CD46 (Fig. 20). La afinidad de poli1-280 para CD46 fue  $2,1 \times 10^{-8}$  M, lo que indica que la mezcla de IgG contiene moléculas de unión con CD46 que tienen la misma afinidad que IgG 02-237 sola. Tomado en conjunto, este experimento indica que es posible expresar una mezcla de moléculas de IgG funcionales que comprenden tres cadenas pesadas únicas en una sola célula y que próximos a los homodímeros se forman también heterodímeros que consisten en dos especificidades de unión. Además, la frecuencia de clones que expresan tres cadenas pesadas diferentes sugiere que también será posible obtener clones que expresan al menos 4, 5 o más cadenas pesadas, usando el mismo procedimiento. En caso de que fuese difícil de obtener clones que expresan mayor número de cadenas pesadas, se puede utilizar un clon que expresa al menos 3 cadenas pesadas de acuerdo con la invención para introducir más cadenas pesadas en una ronda de transfección separada, por ejemplo usando un marcador de selección diferente.

A continuación, se demostró que una sola célula es capaz de producir una mezcla de más de dos IgGs humanas funcionales. Por tanto, los clones 241, 280 y 402, que fueron cribados como positivos para la producción de cada una de los tres IgGs, tanto por IEF como por MS, fueron sometidos a dilución limitante, es decir, se sembraron a razón de 0,3 células/pocillo en placa de 96 pocillos para garantizar descendencia clonal.

Las poblaciones de células clonales, denominadas en adelante como subclones, fueron refrescadas una vez a la semana con medio fresco. Los sub-clones se desarrollaron y se transfirieron desde placas de 96 pocillos vía 24 y 6 pocillos a frascos T25, T80 y T175. En la fase de T80, los sub-clones fueron congelados. Los niveles de producción de anticuerpo IgG<sub>1</sub> humana recombinante se determinaron en el sobrenadante utilizando un ELISA específico para la IgG<sub>1</sub> humana. Para cada clon progenitor, se eligieron 3 sub-clones y se cultivaron en unos pocos matraces T175 para obtener un medio acondicionado suficiente para la purificación utilizando cromatografía de afinidad de Proteína A como se describió anteriormente. La IgG<sub>1</sub> humana purificada procedente de los sub-clones se analizó posteriormente como se describió anteriormente para la IgG<sub>1</sub> humana obtenida a partir del clon progenitor, mediante enfoque isoeléctrico (IEF). El resultado se muestra en la Fig. 21. Los subclones del clon poli 1-241 tienen cada uno de ellos el mismo patrón, pero difieren del clon progenitor en que parecen perderse ciertas bandas. Los subclones del clon poli 1-280 parecen todos diferir unos de otros y del clon progenitor. Los patrones obtenidos por IEF para subclones del clon progenitor poli 1-402 son idénticos para los tres subclones y el clon progenitor. A partir de estos datos se puede concluir que el clon 402 está produciendo establemente una mezcla de anticuerpos. Esto demuestra que es factible producir una mezcla de anticuerpos de acuerdo con la invención a partir de un clon de célula única.



Los clones han experimentado aproximadamente 25 duplicaciones de la población (divisiones celulares) desde el procedimiento de transfección hasta el primer análisis (mostrado en la Fig. 18) bajo presión de selección, y desde ese punto en adelante se han experimentado más de 30 duplicaciones de la población durante el procedimiento de sub-clonación en ausencia de presión de selección, antes de que fuese recolectado el material analizado en Fig. 21.

5 Por consiguiente la producción de una mezcla de anticuerpos a partir de un clon de una sola célula puede ser estable durante al menos 30 generaciones.

10 La IgG1 purificada a partir de los clones progenitores 241, 280 y 402, y subclones, también se analizaron en relación con la reactividad de unión hacia los antígenos CD46- y EpCAM. Con este fin, el cADN de EpCAM, CD46 y antígeno CD38 de control se clonaron en vectores de expresión pcADN (Invitrogen). Estos vectores se transfectaron en células CHO (dhfr-) utilizando Eugene (Roche) de acuerdo con el protocolo suministrado por el fabricante. Las células se cultivaron en medio de Iscove que contiene 10% de FBS y suplemento HT (Gibco). Después de cultivar durante 2 días, se recogieron las células mediante tripsinización y se suspendieron en PBS-BSA al 1% (PBSB) para su uso en el análisis de FACS.

15 La IgG1 purificada de los clones que producen las mezclas de anticuerpos y las muestras de control de IgG1 de anticuerpos anti-GBSIII, un anticuerpo anti- CD72 (02-004), así como anticuerpos procedentes de clon UBS54 anti-EpCAM y clones anti-CD46 K53 y 02-237, se diluyeron en PBSB a una concentración de 20 µg de IgG1 /ml. Se añadieron 20 µl de cada uno a 200.000 células transfectadas y se incubaron en hielo durante 1 hora. Posteriormente, las células se lavaron una vez en PBSB enfriado con hielo. La IgG unida se detectó después, usando la incubación con IgG anti-humana de cabra -biotina seguido por estreptavidina-PE. Después de una etapa de lavado final, las células se suspendieron en PBSB que contiene 1 µg/ml de yoduro de propidio. Las muestras se analizaron en un FACS (FACSVantage, Becton Dickinson). Las células vivas fueron encerradas y se calcularon las intensidades fluorescentes medias (IMF) a partir de las representaciones gráficas de FACS. Los resultados se representan en la Fig. 22. Como era de esperar, la UBS54 se unió selectivamente a las células transfectadas con EpCAM y 02-237 y K53 se unieron selectivamente a los transfectantes de CD46, mientras que los anticuerpos no relacionados no se unieron a estos transfectantes.

20 Los resultados demuestran que las actividades de unión tanto hacia EpCAM como hacia CD46 estaban presentes en los preparados de IgG1 purificada de la mayoría de los clones que expresan una mezcla de anticuerpos de acuerdo con la invención, lo que demuestra que ha sido producida una mezcla de anticuerpos funcionales por sub-clones que han sido sometidos a más de 30 divisiones celulares, y que tiene como resultado una sola célula. En el subclón 280-015 los patrones de unión hacia CD46 y EpCAM eran similares al clon progenitor poli 1-280, al contrario que con los otros clones. Debe afirmarse que el aspecto cuantitativo de este ensayo no está completamente claro. El cribado de rutina, p. ej. mediante un ensayo funcional, se puede usar para encontrar un clon con el perfil de expresión deseado. También se pueden incluir aspectos cuantitativos en tales cribados. Tales cribados permiten la identificación de clones deseados que expresan la mezcla de anticuerpos con una funcionalidad dada de una manera cuantitativamente estable.

Tabla I. Resumen de los clones utilizados para la purificación de IgG.

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

361	10,4	71	1,73
379	9,5	78	1,75
402	39,9	135	3,14
022	16,2	83	1,69
040	7,8	67	1,43
048	6,5	43	0,94
055	11	55	1,04

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

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

<sup>1)</sup> AA, aminoácido

<sup>2)</sup> un residuo de cisteína alquilado

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

K53				02-237				UBS54			
A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
H1	1	12	1267,68	H1	1	12	1267,68	H1	1	12	1267,68
H2	13	19	685,41	H2	13	19	685,41	<b>H2</b>	<b>13</b>	<b>19</b>	<b>729,41</b>
H3	20	23	492,24	H3	20	23	492,24	H3	20	23	492,24
H4	24	38	1693,81	H4	24	38	1693,81	<b>H4</b>	<b>24</b>	<b>38</b>	<b>1587,77</b>
H5	39	63	2783,28	H5	39	63	2783,28	<b>H5</b>	<b>39</b>	<b>63</b>	<b>2646,33</b>
H6	64	67	472,28	H6	64	67	472,28	<b>H6</b>	<b>64</b>	<b>67</b>	<b>506,26</b>
H7	68	84	1906,87	H7	68	84	1906,87	<b>H7</b>	<b>68</b>	<b>87</b>	<b>2174,04</b>
H8	85	87	374,23	H8	85	87	374,23	-	-	-	-
H9	88	98	1319,55	H9	88	98	1319,55	<b>H8</b>	<b>88</b>	<b>98</b>	<b>1333,56</b>
<b>H10</b>	<b>99</b>	<b>102</b>	<b>493,21</b>	<b>H10</b>	<b>99</b>	<b>102</b>	<b>475,25</b>	<b>H9</b>	<b>99</b>	<b>119</b>	<b>2307,15</b>
<b>H11</b>	<b>103</b>	<b>122</b>	<b>2116,05</b>	<b>H11</b>	<b>103</b>	<b>122</b>	<b>2057,99</b>	-	-	-	-

Clave:

A: péptido

B: primer aminoácido

C: último aminoácido

D: Pm monoisotópico (Da)

Notas:

1) para H1, el resto de aminoácido 1 es un ácido piroglutámico

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

5 3) los péptidos únicos que pueden usarse para confirmar la presencia de las correspondientes IgGs se indican en negrita y cursiva

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

Ion	m / z		Ion	m / z
Y"1	147,12		B1	n. d.
Y"2	248,18		B2	157,10
Y"3	<u>335,21</u> (1)		B3	304,18
Y"4	406,25		B4	419,22
Y"5	507,30		B5	<u>582,31</u>
Y"6	<u>594,33</u>		B6	768,38
Y"7	693,40		B7	825,39
Y"8	<u>794,46</u>		B8	953,43
Y"9	<u>893,54</u>		B9	n. d.
Y"10	1006,63		B10	n. d.
Y"11	1107,67		B11	1224,65
Y"12	<u>1164,68</u>		B12	1323,68
Y"13	1292,81		B13	1424,79
Y"14	<u>1349,77</u>		B14	1523,86
Y"15	<u>1535,85</u>		B15	n. d.
Y"16	1698,95		B16	n. d.
Y"17	1813,95		B17	1782,96
Y"18	1960,97		B18	n. d.
Y"19	n. d. (2)		B19	n. d.

<sup>1</sup> Los valores m/z subrayados son los picos principales del espectro de MS-MS.

<sup>2</sup> n. d. es no detectado.

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

Ion	m / z		Ion	m / z
Y"1	147,12		B1	n. d.
Y"2	248,18		B2	189,09
Y"3	<u>335,20</u>		B3	n. d.
Y"4	406,24		B4	451,22
Y"5	493,30		B5	n. d.
Y"6	<u>580,32</u>		B6	n. d.
Y"7	679,40		B7	n. d.
Y"8	<u>780,44</u>		B8	n. d.
Y"9	<u>879,53</u>		B9	n. d.
Y"10	992,60		B10	n. d.
Y"11	1093,65		B11	n. d.
Y"12	<u>1150,67</u>		B12	n. d.
Y"13	1278,80		B13	n. d.
Y"14	<u>1335,80</u>		B14	n. d.
Y"15	1521,83		B15	n. d.
Y"16	1608,90		B16	n. d.
Y"17	1724,00		B17	n. d.
Y"18	n. d.		B18	n. d.
Y"19	n. d.		B19	n. d.
<sup>1</sup> Los valores de m/z subrayados son los picos principales en el espectro de MS-MS.				
<sup>2</sup> n. d. es no detectado.				

5 Tabla VI. Datos MS/MS de péptido CDR3 (H9) de UBS54, obtenidos por *disociación inducida por colisión* de m / z doblemente cargado 770,09.

Ion	m / z		Ion	m / z
Y"1	n. d.		B1	n. d.
Y"2	248,17		B2	213,17
Y"3	<u>335,20</u>		B3	360,16
Y"4	406,25		B4	473,27
Y"5	<u>507,30</u>		B5	610,32
Y"6	<u>594,33</u>		B6	773,41
Y"7	<u>693,42</u>		B7	<u>959,48</u>
Y"8	<u>794,45</u>		B8	<u>1016,50</u>

Y"9	<u>893,53</u>		B9	<u>1144,57</u>
Y"10	<u>1006,64</u>		B10	<u>1201,59</u>
Y"11	1107,67		B11	<u>1302,68</u>
Y"12	1164,68		B12	<u>1415,72</u>
Y"13	n. d.		B13	1514,78
Y"14	n. d.		B14	n. d.
Y"15	n. d.		B15	n. d.
Y"16	n. d.		B16	n. d.
Y"17	n. d.		B17	n. d.
Y"18	n. d.		B18	n. d.
Y"19	n. d.		B19	n. d.
Y"20	n. d.		B20	n. d.
<sup>1</sup> Los valores de m/z subrayados son los picos principales en el espectro de MS-MS.				
<sup>2</sup> n. d. es no detectado.				

## Referencias

- Appel RD, Bairoch A, Hochstrasser DF. 1994. A new generation of information retrieval tools for biologists: the example of the ExPASy WWW server. *Trends Biochem. Sci.* 19: 258-260.
- Bendig MM. 1988. The production of foreign proteins in mammalian cells. *Genet Eng* 7: 91-127.
- 5 Boel E, Verlaan S, Poppelier MJ, Westerdal NA, Van Strijp JA, Logtenberg T. 2000. Functional human monoclonal antibodies of all isotypes constructed from phage display library-derived single-chain Fv antibody fragments. *J Immunol Methods* 239:153-166.
- Brink MF, Bishop MD, Pieper FR. 2000. Developing efficient strategies for the generation of transgenic cattle which produce biopharmaceuticals in milk. *Theriogenology* 53: 139-148.
- 10 Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I. 1996. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 380: 64-66.
- Casellas R, Shih TA, Kleinewietfeld M, Rakoniak J, Nemazee D, Rajewski K, Nussenzweig MC. 2001. Contribution of receptor editing to the antibody repertoire. *Science* 291: 1541-1544.
- 15 Cockett MI, Bebbington CR, Yarranton GT. 1990. High level expression of tissue inhibitor of metalloproteinases in Chinese hamster ovary cells using glutamate synthetase gene amplification. *Bio/technology* 8: 662-667.
- De Kruif J, Terstappen L, Boel E y Logtenberg T (1995a) Rapid selection of cell subpopulation-specific human monoclonal antibodies from a synthetic phage antibody library. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:3938
- De Kruif J, Boel E y Logtenberg T (1995b) Selection and application of human single chain Fv antibody fragments from a semi-synthetic phage antibody display library with designed CDR3 regions. *J Mol Biol* 248:97
- 20 Dinnyes A, De Sousa P, King T, Wilmut I. 2002. Somatic cell nuclear transfer: recent progress and challenges. *Cloning Stem Cells* 4: 81-90.
- Flavell DJ, Noss A, Pulford KA, Ling N, Flavell SU. 1997. Systemic therapy with 3BIT, a triple combination cocktail of anti-CD19, -CD22, and -CD38-saporin immunotoxins, is curative of human B-cell lymphoma in severe combined immunodeficient mice. *Cancer Res* 57: 4824-4829.
- 25 Fishwild DM, O'Donnell SL, Bengoechea T, Hudson DV, Harding F, Bernhard SL, Jones D, Kay RM, Higgins KM, Schramm SR, Lonberg N. 1996. High-avidity human IgG kappa monoclonal antibodies from a novel strain of minilocus transgenic mice. *Nat Biotechnol.* 14: 845-51.
- Garnick RL. 1992. Peptide mapping for detecting variants in protein products. *Develop. Biol. Standard* 76: 117-130.
- 30 Gelpi E. 1995. Biomedical and biochemical applications of liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatography A* 703: 59-80.
- Ghetie M-A, Podar EM, Ilgen A, Gordon BE, Uhr JW, Vitetta, ES. 1997. Homodimerization of tumor-reactive monoclonal antibodies markedly increases their ability to induce growth arrest or apoptosis of tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 7509-7514.
- 35 Giddings G, Allison G, Brooks D, Carter A. 2000. Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nat. Biotechnol.* 18: 1151-1155.
- Gorman C, Bullock C. 2000. Site-specific gene targeting for gene expression in eukaryotes. *Curr Opin Biotechnol* 11: 455-460.
- Hiatt A, Cafferkey R, Bowdish K (1989) Production of antibodies in transgenic plants. *Nature.* 342: 76-78.
- 40 Huls, G. A., Heijnen, I. A., Cuomo, M. E., Koningsberger, J. C., Wiegman, L., Boel, E., van der Vuurst de Vries, A. R., Loyson, S. A., Helfrich, W., van Berge Henegouwen, G. P., van Meijer, M., de Kruif, J. & Logtenberg, T. 1999. A recombinant, fully human monoclonal antibody with antitumor activity constructed from phage-displayed antibody fragments. *Nat Biotechnol* 17: 276-281.
- Jespers LS, Roberts A, Mahler SM, Winter G, Hoogenboom HR. 1994. Guiding the selection of human antibodies from phage display repertoires to a single epitope of an antigen. *Biotechnology (N Y)* 12: 899-903.
- 45 Jones, D., Kroos, N., Anema, R., Van Montfort, B., Vooy, A., Van Der Kraats, S., Van Der Helm, E., Smits, S., Schouten, J., Brouwer, K., Lagerwerf, F., Van Berkel, P., Opstelten, D-J., Logtenberg, T., Bout, A. (2003). High-level expression of recombinant IgG in the human cell line PER.C6™. *Biotechnol Prog.* 19, 163-168.

- Kim SJ, Kim Ns, Ryu CJ, Hong HJ, Lee GM. 1998. Characterization of chimeric antibody producing CHO cells in the course of dihydrofolate reductase-mediated gene amplification and their stability in the absence of selective pressure. *Biotechnol Bioeng* 58: 73-84.
- 5 Kohler G y Millstein C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497.
- Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. 1994. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84: 1415-1420.
- Larrick JW, Thomas DW. 2001. Producing proteins in transgenic plants and animals. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12: 411-418.
- 10 Massengale WT, McBurney E, Gurtler J. 2002. CD20-negative relapse of cutaneous B-cell lymphoma after anti-CD20 monoclonal antibody therapy. *J. Am. Acad. Dermatol.* 46: 441-443.
- Mendez MJ, Green LL, Corvalan JR, Jia XC, Maynard-Currie CE, Yang XD, Gallo ML, Louie DM, Lee DV, Erickson KL, Luna J, Roy CM, Abderrahim H, Kirschenbaum F, Noguchi M, Smith DH, Fukushima A, Hales JF, Klapholz S, Finer MH, Davis CG, Zsebo KM, Jakobovits A. 1997. Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice. *Nat Genet.* 15: 146-56.
- 15 Merchant AM, Zhu Z, Yuan JQ, Goddard A, Adams CW, Presta LG, Carter P. 1998. An efficient route to human bispecific IgG. *Nat. Biotech.* 16: 677-681.
- Nemazee D. 2000. Receptor editing in B cells. *Adv. Immunol.* 74: 89-126.
- 20 Nissim A, Hoogenboom HR, Tomlinson IM, Flynn G, Midgley C, Lane D, Winter G. 1994. Antibody fragments from a "single pot" phage display library as immunological reagents. *EMBO J.* 13: 692-698.
- Nowakowski A, Wang C, Powers DB, Amersdorfer P, Smith TJ, Montgomery VA, Sheridan R, Blake R, Smith LA, Marks JD. 2002. Potent neutralization of botulinum neurotoxin by recombinant oligoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 11346-11350.
- 25 Patel AK, Boyd PN. 1995. An improved assay for antibody dependent cellular cytotoxicity based on time resolved fluorometry. *Journal of Immunological Methods* 184: 29-38.
- Peeters K, De Wilde C, De Jaeger G, Angenon G, Depicker A. 2001. Production of antibodies and antibody fragments in plants. *Vaccine* 19: 2756-2761.
- Pollock DP, Kutzko JP, Birck-Wilson E, Williams JL, Echelard Y, Meade HM. 1999. Transgenic milk as a method for the production of recombinant antibodies. *J Immunol Methods.* 231: 147-157.
- 30 Radic MC, Mascelli MA, Shan H, Weigert M. 1991. Ig H and L chain contributions to autoimmune specificities. *J. Immunol.* 146: 176-182.
- Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA, Mycock K, Scott AR, Ritchie M, Wilmut I, Colman A, Campbell KH. 1997. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science.* 278: 2130-2133.
- Segal DM, Weiner GJ, Weiner LM. 2001. Introduction: bispecific antibodies. *J Immunol Methods.* 248:1-6.
- 35 Shields, RL, Namenuk AK, Hong K, Gloria Meng Y, Rae J, Biggs J, Xie D, Lai J, Stadlen A, Li B, Fox JA and Presta LG. 2001. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for FcγRI, FcγRII, FcγRIII and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the FcγR. *J Biol Chem* 276: 6591-6604.
- Spiridon CI, Ghetie MA, Uhr J, Marches R, Li JL, Shen GL, Vitetta ES. 2002. Targeting multiple her-2 epitopes with monoclonal antibodies results in improved antigrowth activity of a human breast cancer cell line in vitro and in vivo. *Clin. Cancer Res.* 8: 1720-1730.
- 40 Van der Vuurst de Vries A, Logtenberg T. 1999. Dissecting the human peripheral B-cell compartment with phage display-derived antibodies. *Immunology* 98: 55-62.
- Vaughan TJ, Williams AJ, Pritchard K, Osbourn JK, Pope AR, Earnshaw JC, McCafferty J, Hodits RA, Wilton J, Johnson KS. 1996. Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. *Nat. Biotech.* 14: 309-314.
- 45 Wilmut I, Clark AJ. 1991. Basic techniques for transgenesis. *J Reprod Fertil Suppl* 43: 265-275.
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385: 810-813.

Wilson TJ, Kola I. 2001. The LoxP/CRE system and genome modification. *Methods Mol Biol.* 158:83-94.

Yelverton E, Norton S, Obijeski JF, Goeddel DV. 1983. Rabies virus glycoprotein analogs: biosynthesis in *Escherichia coli*. *Science* 219: 614-620.

5 Yoo EM, Coloma MJ, Trinh KR, Nguyen TQ, Vuong LU, Morrison SL, Chintalacharuvu KR. 1999. Structural requirements for polymeric immunoglobulin assembly and association with J chain. *J Biol Chem.* 274: 33771-33777.



## Listado de Secuencias

<110> CRUCCELL HOLLAND B.V.

5 <120> Producción recombinante de mezclas de anticuerpos

<130> 0079 WO 00 ORD

<160> 18

10 <170> Versión PatentIn 3.2

 $\langle 210 \rangle$  1

<211> 333

15 <212> ADN

<213> Artificial

$\langle 220 \rangle$

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

20

 $\langle 220 \rangle$ 

<221> CDS  
<222> (1)..(333)

25      <400> 1

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

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

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

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

gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggc aca gat ttt aca ctg aaa atc 240  
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80

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

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

30  $\langle 210 \rangle$  2

 $\langle 211 \rangle$  111

<212> PRT

<213> Artificial

35       $\langle 220 \rangle$

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

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

<210> 3

5 <211> 333

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> Secuencia VL de 02-237 (anti-CD46)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(333)

15

<400> 3

gac atc gtg atg act cag tct cca ctc tcc ctg ccc gtc acc cct gga 48  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15

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

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

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

gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggc aca gat ttt aca ctg aaa atc 240  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

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

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

<210> 4  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Secuencia VL de 02-237 (anti-CD46)

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

<210> 5  
 <211> 345

<212> ADN  
<213> Artificial

<220>

5 <223> Secuencia VH de UBS54 (anti-EpCAM)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(345)

10

<400> 5

cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg tcc	48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser	
1 5 10 15	
tcg gtg agg gtc tcc tgc aag gct tct gga ggc acc ttc agc agc tat	96
Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr	
20 25 30	
gct atc agc tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg	144
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	
35 40 45	
gga ggg atc atc cct atc ttt ggt aca gca aac tac gca cag aag ttc	192
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe	
50 55 60	
cag ggc aga gtc acg att acc gcg gac gaa tcc acg agc aca gcc tac	240
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	
atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gct gtg tat tac tgt	288
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
gca aga gac ccg ttt ctt cac tat tgg ggc caa ggt acc ctg gtc acc	336
Ala Arg Asp Pro Phe Leu His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr	
100 105 110	
gtc tcg aca	345
Val Ser Thr	
115	

15 <210> 6

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

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

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Thr  
115

<210> 7  
<211> 354  
5 <212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
10 <223> Secuencia VH de K53 (anti-CD46)

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(354)

15 <400> 7

# ES 2 442 615 T3

```

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

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

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

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

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

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

gca agg ggc atg atg agg ggt gtg ttt gac tac tgg ggc caa ggt acc      336
Ala Arg Gly Met Met Arg Gly Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
           100           105           110

ctg gtc acc gtc tcg aca      354
Leu Val Thr Val Ser Thr
           115

```

<210> 8  
 <211> 118  
 5 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Secuencia VH de K53 (anti-CD46)

10 <400> 8

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Thr  
115

<210> 9  
<211> 354  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> Secuencia VH de 02-237 (anti-CD46)

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(354)

<400> 9

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 10  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Secuencia VH de 02-237 (anti-CD46)

<400> 10

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 11



<211> 369  
<212> ADN  
<213> Artificial

5 <220>  
<223> Secuencia VH de clon B28 (fago anti-CD22)

<220>  
<221> CDS  
10 <222> (1)..(369)

<400> 11

```

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

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

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

tgg gtc tct ggt att aat tgg aat ggt ggt agc aca ggt tat gca gac      192
Trp Val Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp
          50          55          60

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

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

tac tgt gca aga ggc ttt ctt cgt ttt gct tcc tcc tgg ttt gac tat      336
Tyr Cys Ala Arg Gly Phe Leu Arg Phe Ala Ser Ser Trp Phe Asp Tyr
          100          105          110

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

```

15  
20 <210> 12  
<211> 123  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Secuencia VH de clon B28 (fago anti-CD22)

25 <400> 12

```

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

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

```

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

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

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

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

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

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

<210> 13

<211> 369

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> Secuencia VH de clon II-2 (fago anti-CD72)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(369)

15 <400> 13

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 14  
<211> 123  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
10 <223> Secuencia VH de clon II-2 (fago anti-CD72)

<400> 14

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

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

Ser Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu  
35 40 45  
Trp Met Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Gly Thr Ser Tyr Ala Gln  
50 55 60

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

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

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

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

15 <210> 15  
<211> 360  
<212> ADN  
20 <213> Artificial

<220>

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

<220>

<221> CDS

5 <222> (1)..(360)

<400> 15

```

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

```

```

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

```

```

gat tat gcc atg cac tgg gtc cgg caa gct cca ggg aag ggc ctg gag      144
Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
          35          40          45
tgg gtc tca ggt att agt tgg aat agt ggt agc ata ggc tat gcg gac      192
Trp Val Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp
        50          55          60

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

ggc acc ctg gtc acc gtc tcg aga      360
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Arg
10          115          120

```

<210> 16

<211> 120

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

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

20 <400> 16

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

50                      55                      60

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Arg  
                    115                      120

5 <210> 17  
<211> 336  
<212> ADN  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> Secuencia VL común de clones B28 (fago anti-CD22), II-2 (fago anti-CD72) y I-2 (fago anti-clase II)

15 <220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(336)

15 <400> 17

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

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

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

ggt aaa aac aac cgg ccc tca ggg atc cca gac cga ttc tct ggc tcc                      192  
Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser  
                    50                      55                      60

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

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

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

20 <210> 18  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> Artificial

25 <220>

# ES 2 442 615 T3

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

<400> 18

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

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

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

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

5 Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu  
65 70 75 80  
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His  
85 90 95

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

## REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar al menos un clon de célula hospedadora que produce una mezcla de anticuerpos, en donde dicha mezcla de anticuerpos tiene un efecto deseado de acuerdo con un ensayo funcional, comprendiendo el método las etapas de:
  - 5 (i) proporcionar una célula hospedadora con una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera y secuencias de ácidos nucleicos que codifican dos cadenas pesadas diferentes, en donde dichas cadenas pesadas y ligera son capaces de emparejarse entre sí;
  - (ii) cultivar al menos un clon de dicha célula hospedadora en condiciones que conducen a la expresión de dichas secuencias de ácidos nucleicos;
  - 10 (iii) someter a cribado dicho al menos un clon de la célula hospedadora para la producción de una mezcla de anticuerpos que tienen el efecto deseado mediante un ensayo funcional; y
  - (iv) identificar al menos un clon que produce una mezcla de anticuerpos que tiene el efecto deseado.
2. El método según la reivindicación 1ª, en donde dicho cultivo en la etapa (ii) y dicho cribado en la etapa (iii) se realizan con al menos dos clones.
- 15 3. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª y 2ª, en donde dicha célula hospedadora es capaz de expresión a alto nivel de proteínas sin necesidad de amplificación del ácido nucleico que codifica dichas proteínas en dicha célula.
4. Un método para preparar una mezcla de anticuerpos, que comprende la etapa de:
  - 20 (i) cultivar un clon de célula hospedadora identificado por un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 3ª bajo condiciones que conducen a la expresión de los ácidos nucleicos que codifican la cadena ligera y las dos cadenas pesadas diferentes.
5. Un método según la reivindicación 4ª, que comprende además la etapa de: (ii) recuperar la mezcla de anticuerpos de la célula hospedadora o del cultivo de la célula hospedadora.
- 25 6. Un método para preparar una célula hospedadora recombinante para la producción de una mezcla de anticuerpos, comprendiendo el método la etapa de introducir secuencias de ácido nucleico que codifican dos cadenas pesadas diferentes en una célula hospedadora recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera común capaz de emparejarse con las dos cadenas pesadas, dando como resultado solamente regiones de unión funcionales.
7. Un animal no humano transgénico o una planta transgénica que comprenden una secuencia de ácido nucleico recombinante que codifica una cadena ligera común y una secuencia o secuencias de ácido nucleico recombinante que codifica al menos dos cadenas pesadas diferentes que son capaces de emparejarse con dicha cadena ligera común, en donde dichas secuencias de ácido nucleico recombinante que codifican dichas cadenas ligera y pesadas están bajo el control de un promotor específico del tejido.
- 30 8. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 3ª, en donde la secuencia o secuencias de ácido nucleico que codifican al menos una de dichas cadenas ligera común y/o pesadas han sido obtenidas por un método que comprende al menos una etapa de selección para la presentación de anticuerpo.
- 35 9. Un método para el cribado en relación con una mezcla de anticuerpos que es capaz de unirse a una diana, comprendiendo el método las etapas de:
  - 40 i) poner una biblioteca de presentación de anticuerpos que comprende anticuerpos en contacto con material que comprende una diana;
  - ii) al menos una etapa de seleccionar anticuerpos que se unen a dicha diana;
  - iii) identificar al menos dos anticuerpos que se unen a dicha diana, en donde dichos al menos dos anticuerpos comprenden una cadena ligera común;
  - 45 iv) introducir una secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena ligera común y una secuencia de ácido nucleico o secuencias de ácidos nucleicos que codifican dos cadenas pesadas de dichos al menos dos anticuerpos en una célula hospedadora;
  - v) cultivar un clon de dicha célula hospedadora bajo condiciones que conducen a la expresión de dichas secuencias de ácidos nucleicos;
  - 50 vi) cribar dicho clon de dicha célula hospedadora en relación con la producción de una mezcla de anticuerpos que tienen un efecto deseado mediante un ensayo funcional; y

(vii) identificar al menos un clon que produce una mezcla de anticuerpos que tienen el efecto deseado.

10. Un método para preparar una mezcla de anticuerpos en un hospedador recombinante, incluyendo el método la etapa de expresar en una célula hospedadora recombinante una secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera común y secuencia o secuencias de ácidos nucleicos que codifican dos cadenas pesadas diferentes que difieren en la región variable y que son capaces de emparejarse con dicha cadena ligera común, y en donde dichas cadenas pesadas difieren además en sus regiones constantes lo suficiente para reducir o prevenir el emparejamiento entre las diferentes cadenas pesadas.

11. Un método según la reivindicación 10<sup>a</sup>, en donde dichas cadenas pesadas son de isotipo diferente.

12. Un método según la reivindicación 1<sup>a</sup>, en donde dicho ensayo funcional se elige entre el grupo de ensayos de unión, ensayos de apoptosis, ensayos de citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC), ensayos de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), ensayos de inhibición del crecimiento o proliferación celular (efecto citostático), ensayos de muerte de células (efecto citotóxico), ensayos de señalización de células, ensayos para la medida de la inhibición de la unión de un agente patógeno a la célula diana, ensayos para la medida de la secreción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) u otras moléculas segregadas, ensayos para la bacteriostasis, actividad bactericida, neutralización de virus, ensayos para medir la atracción de componentes del sistema inmunitario al sitio en donde se unen los anticuerpos, incluyendo métodos de hibridación *in situ*, métodos de marcaje, ensayos *in vivo* tales como modelos animales, incluyendo modelos tumorales en ratones, modelos de enfermedad autoinmunitaria, modelos en roedores en primates infectados por virus o infectados por bacterias.

13. Una mezcla de anticuerpos que comprenden una cadena ligera común y dos cadenas pesadas diferentes con una región variable diferente, en donde las dos cadenas pesadas diferentes son capaces de emparejarse con dicha cadena ligera común, y en donde dichas cadenas pesadas difieren además en sus regiones constantes lo suficiente como para que la cantidad de anticuerpos biespecíficos disminuya en comparación con el porcentaje teórico de anticuerpos biespecíficos.

14. Una mezcla de anticuerpos según la reivindicación 13<sup>a</sup>, en donde dos anticuerpos de la mezcla se unen a epítomos diferentes en el mismo antígeno o se unen a diferentes moléculas de antígeno presentes en una mezcla que comprende antígenos.

15. Una mezcla de anticuerpos según una cualquiera de las reivindicaciones 13<sup>a</sup> o 14<sup>a</sup> u obtenible por un método según una cualquiera de las reivindicaciones 4<sup>a</sup>, 5<sup>a</sup>, 10<sup>a</sup> o 11<sup>a</sup>, para su uso en el tratamiento o el diagnóstico de una enfermedad o trastorno en un sujeto humano o animal.

16. Una composición farmacéutica que comprende la mezcla de anticuerpos según una cualquiera de las reivindicaciones 13<sup>a</sup> o 14<sup>a</sup>.

17. El uso de una mezcla de antibióticos, en donde están presentes dos cadenas pesadas diferentes y una cadena ligera común, en la preparación de un medicamento para el tratamiento o el diagnóstico de una enfermedad o trastorno en un sujeto humano o animal.

18. El uso de la reivindicación 17<sup>a</sup>, en donde la mezcla es obtenible por un método según una cualquiera de las reivindicaciones 4<sup>a</sup>, 5<sup>a</sup>, 10<sup>a</sup> o 11<sup>a</sup>.

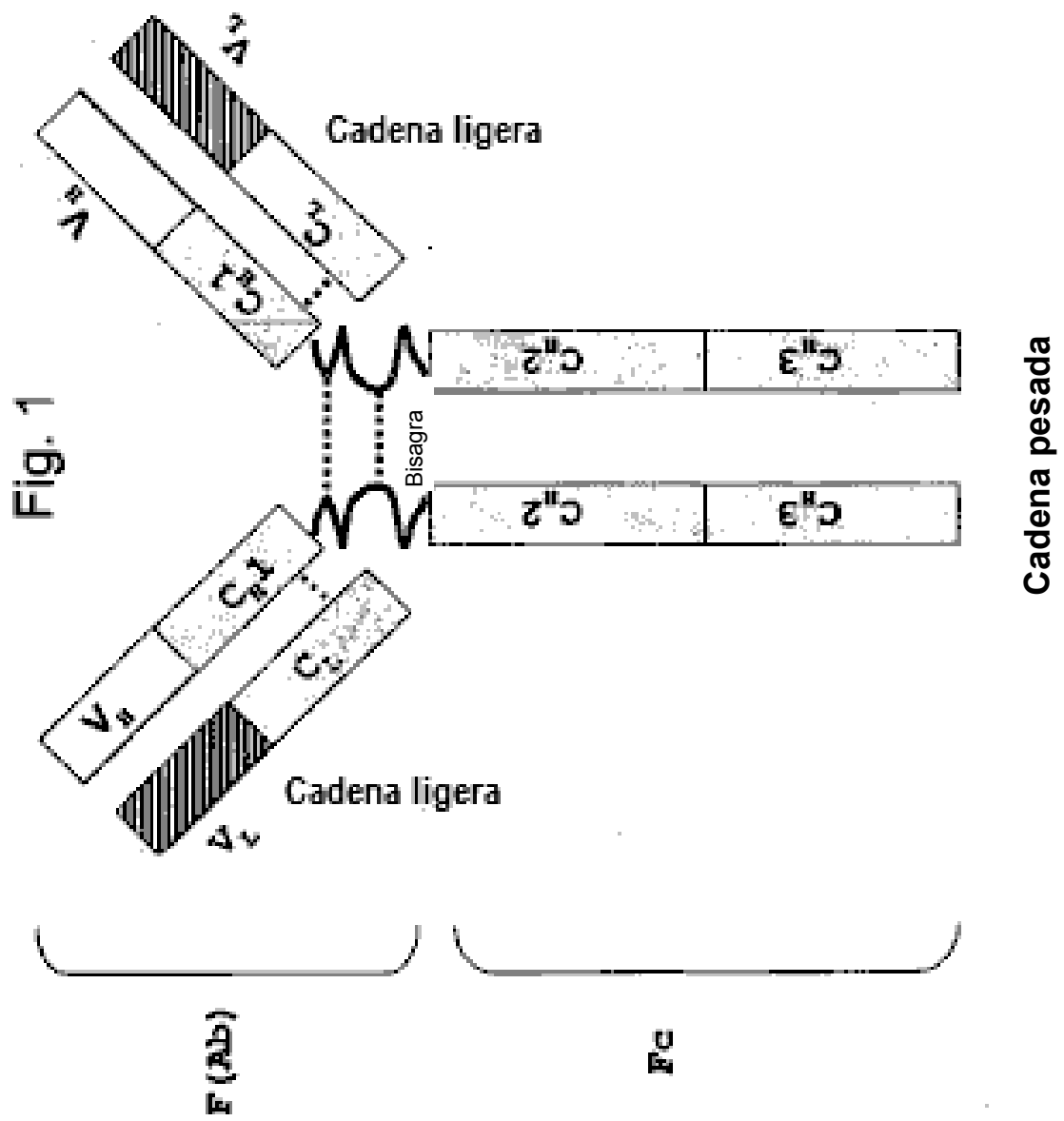
19. El uso según las reivindicaciones 17<sup>a</sup> o 18<sup>a</sup>, en donde la enfermedad o el trastorno se eligen entre el grupo de enfermedades autoinmunitarias, rechazo de injerto contra huésped, y cáncer, incluyendo tumores sólidos del cerebro, cabeza y cuello, mama, próstata, colon, pulmón, tumores hematológicos, tumores de células B, trastornos neoplásicos incluyendo leucemias, linfomas, sarcomas, carcinomas, tumores de células neuronales, carcinomas de células escamosas, tumores de células germinales, metástasis, tumores no diferenciados, seminomas, melanomas, mielomas, neuroblastomas, tumores de células mixtas, y neoplasias causadas por agentes infecciosos.

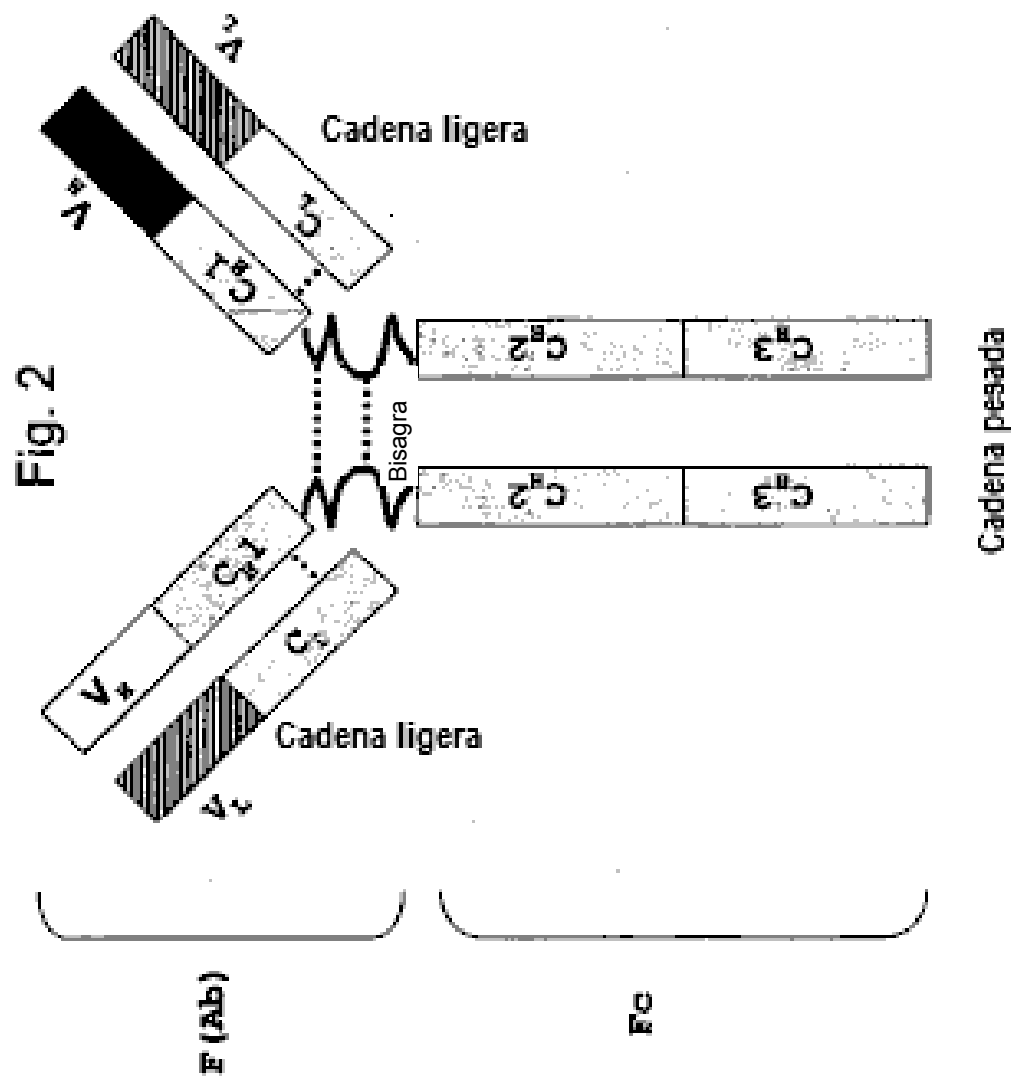
20. El uso según las reivindicaciones 17<sup>a</sup> o 18<sup>a</sup>, en donde la enfermedad o el trastorno son causados por una bacteria, virus u hongo, incluyendo *S. aureus* multirresistente, *Candida albicans* y *Aspergillus* sp., levaduras, Lyssavirus p. ej. virus de la rabia, virus varicela-zóster, adenovirus, virus sincitial respiratorio, virus de la inmunodeficiencia humana, metaneumovirus humano, virus de la influenza, virus del Nilo Occidental, el virus que causa el síndrome respiratorio agudo severo (SARS), *Bacillus anthracis*, toxina de *Clostridium botulinum*, toxina épsilon de *Clostridium perfringens*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, *Coxiella burnetii*, *Brucella* especies, enterotoxina B de *Staphylococcus*, viruela mayor, alfavirus que causan síndromes de meningoencefalitis (EEEV, VEEV y WEEV), virus conocidos por causar fiebres hemorrágicas tales como los virus Ebola, Marburg y Junin, o contra virus tales como el virus Nipah, Hantavirus, virus de la encefalitis transmitida por la garrapata y el virus de la fiebre amarilla, o contra toxinas p. ej. la toxina ricina de *Ricinus communis*.

21. El uso según la reivindicación 17<sup>a</sup> o 18<sup>a</sup>, en donde la enfermedad o el trastorno son causados por un parásito unicelular o multicelular.



22. Una composición farmacéutica que comprende una mezcla de anticuerpos producidos de forma recombinante y un vehículo adecuado, en donde dos cadenas pesadas diferentes y una cadena ligera común están representadas en dicha mezcla de anticuerpos producidos de forma recombinante, y con lo que las dos cadenas pesadas diferentes son capaces de emparejarse con dicha cadena ligera común.





**Fig. 3**

```

UBS54-VL      GAAATTGAGCTCACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCC
K53-VL        GAAATTGAGCTCACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCC
02-237-VL     GACATCGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCC
** ** *      *****
UBS54-VL      TCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTAATGGATACAACATATTGGAT
K53-VL        TCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTAATGGATACAACATATTGGAT
02-237-VL     TCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTAATGGATACAACATATTGGAT
*****
UBS54-VL      TGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTGGGTTCTAATCGG
K53-VL        TGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTGGGTTCTAATCGG
02-237-VL     TGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTGGGTTCTAATCGG
*****
UBS54-VL      GCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCACTGAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAA
K53-VL        GCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCACTGAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAA
02-237-VL     GCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCACTGAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAA
*****
UBS54-VL      ATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTCTACAACT
K53-VL        ATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTCTACAACT
02-237-VL     ATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTCTACAACT
*****
UBS54-VL      TTCACCTTTCGGCCCTGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
K53-VL        TTCACCTTTCGGCCCTGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
02-237-VL     TTCACCTTTCGGCCCTGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
*****

```

Fig. 3, continuación

K53-VH	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTC
02-237-VH	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTC
UBS54-VH	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCGGTGAGGGTC
	*****
K53-VH	TCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTACCAGCTATGGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCC
02-237-VH	TCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTACCAGCTATGGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCC
UBS54-VH	TCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCC
	*****
K53-VH	CCTGGACAAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTTACAATGGTAACACAACTAT
02-237-VH	CCTGGACAAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTTACAATGGTAACACAACTAT
UBS54-VH	CCTGGACAAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTAC
	*****
K53-VH	GCACAGAAAGCTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGCCTAC
02-237-VH	GCACAGAAAGCTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGCCTAC
UBS54-VH	GCACAGAAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGGGAGCGAATCCACGAGCACAGCCTAC
	*****
K53-VH	ATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGGTGTATTACTGTGCAAGGGGCATG
02-237-VH	ATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGGTGTATTACTGTGCAAGGGGCTTT
UBS54-VH	ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGAGACC--
	*****
K53-VH	ATGAGGGGTGTGTTTGACTACTGGGGCCCAAGGTACCCTGGTCACCGTCTCGACA
02-237-VH	CCGCGTACGTCGTTTGACTCCTCGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTCTCCTCA
UBS54-VH	-----CGTTTCTTCACTATTGGGGCCCAAGGTACCCTGGTCACCGTCTCGACA
	*****

Fig. 4

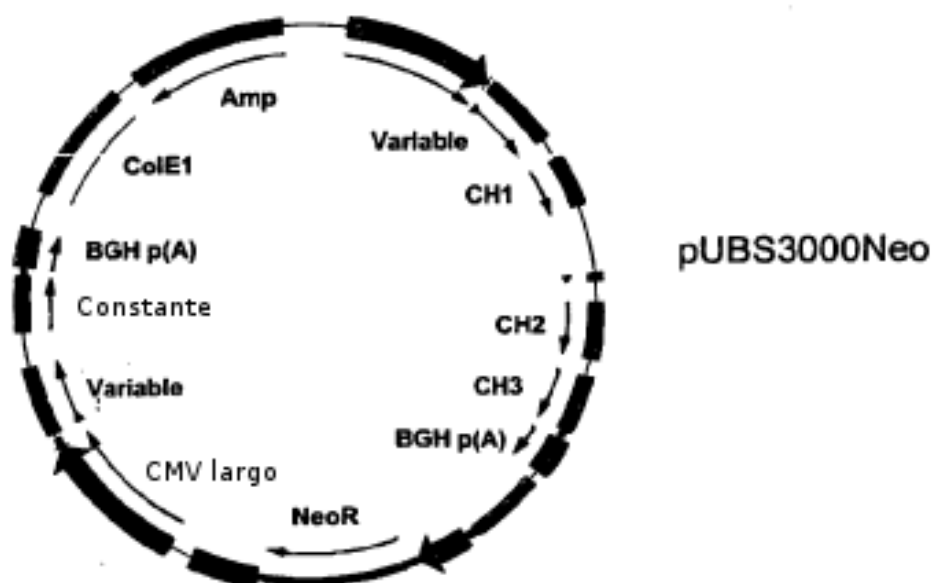
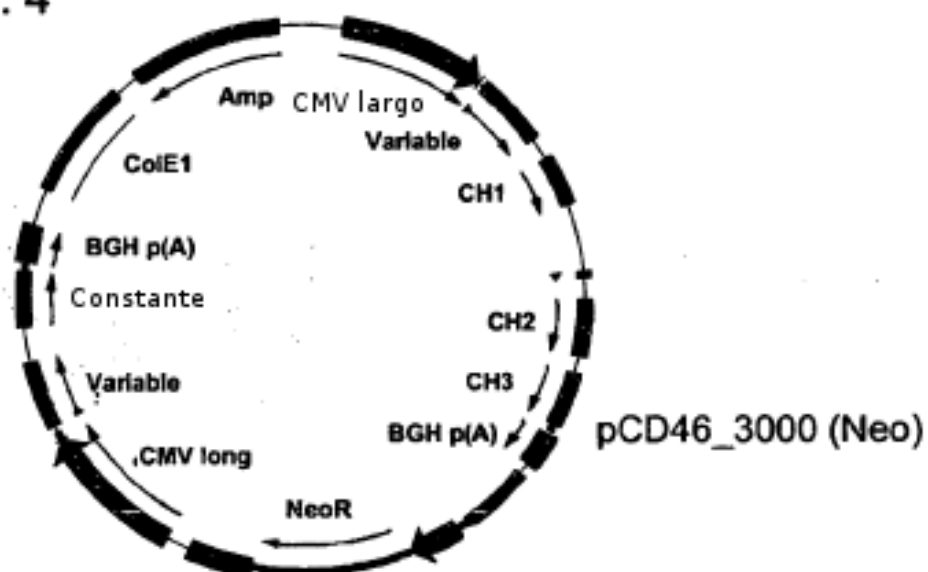


Fig. 5

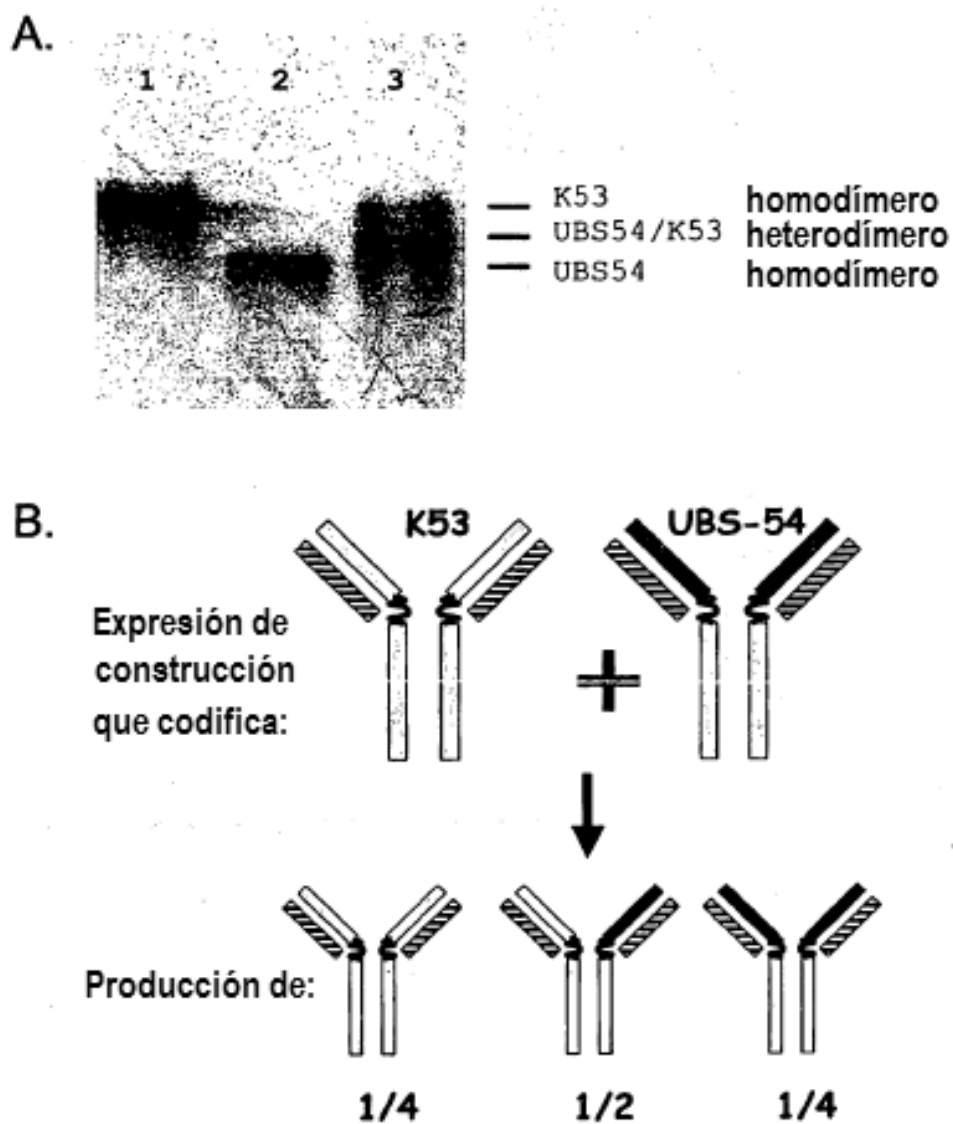
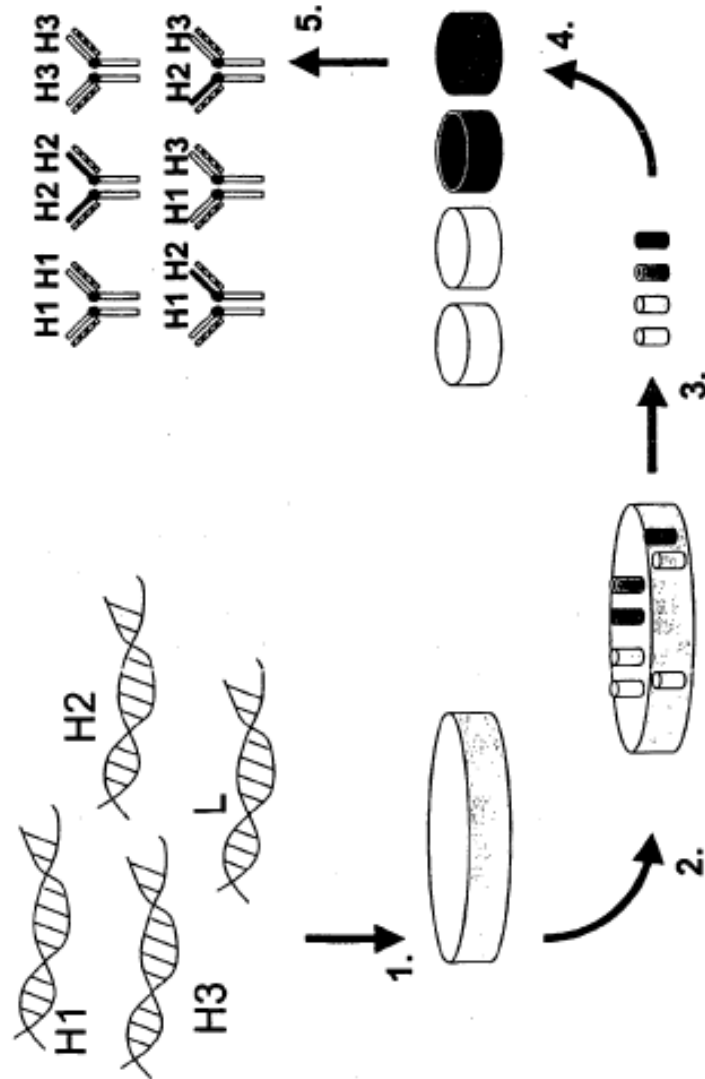


Fig. 6





**Fig. 7****Fragmento V<sub>H</sub> anti-CD22 (Fago B28)**

M A E V Q L V E S G G G V V R P G G S L R L S C .  
 1 ATGGCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGTGTGGTACGGCTGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTG  
 . A A S G F T F D D Y G M S W V R Q A P G K G L E .  
 72 TGCAGCCTCTGGATTACCTTTGATGATTATGGCATGAGCTGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGCTGG  
 . W V S G I N W N G G S T G Y A D S V K G R F T  
 143 AGTGGTCTCTGGTATTAAATTGGAATGGTGTAGCACAGGTTATGCAGACTCTGTGAAGGCCGATTACAC  
 I S R D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D T A V .  
 214 ATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTGCAATGAACAGTCTGAGAGCCGAGACACGGCCGT  
 . Y Y C A R G F L R F A S S W F D Y W G Q G T L V .  
 285 GTATTACTGTGCAAGAGGCTTTCTTCGTTTGTCTCCTCCTGGTTTGACTATTGGGGCCAAGGTACCCCTGG  
 . T V S R  
 356 TCACCGTCTCGAGA

**Fragmento V<sub>H</sub> anti-CD72 (Fago II-2)**

M A Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C .  
 1 ATGGCCGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTG  
 . K A S G Y T F T S Y Y M H W V R Q A P G Q G L E .  
 72 CAAGGCATCTGGATACACCTTCACCAGCTACTATATGCAGTGGTGGCAGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTG  
 . W M G I I N P S G G T S Y A Q K F Q G R V T  
 143 AGTGGATGGGAATAATCAACCCTAGTGGTGGCACAAGCTACGCACAGAAGTTCAGGGCAGAGTCACC  
 M T R D T S T S T V Y M E L S S L R S E D T A V .  
 214 ATGACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGT  
 . Y Y C A R D Y Y V T Y D S W F D S W G Q G T L V .  
 285 GTATTACTGTGCAAGAGACTACTATGTTACGTATGATTCTCCTGGTTTGACTCCTGGGGCCAAGGTACCCCTGG  
 . T V S R  
 356 TCACCGTCTCGAGA

Fig. 7, continuación

## fragmento VH anti-clase II (fago I-2)

```

M A E V Q L V E S G G L V Q F G R S L R L S C .
1  ATGCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTGTGACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTG
. A A S G F T F D D Y A M H W V R Q A P G K G L E .
72 TGCAGCCTCTGGATTCACTTTGATGATTATGCCATGCACCTGGTCCGGCAGCTCCAGGGAGGSCCTGG
. W V S G I S W N S G S I G Y A D S V K G R F T
143 AGTGGTCTCAGSTATTAGTTGGATAGTGGTAGCATAGGCTATCGGCACTCTCTGAGGGCCGATTCAACC
I S R D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D T A V .
214 ATCTCCAGAGACACGCCACAGAACTCCCTGTATCTGCAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCGT
. Y Y C A R D L Y L A H F D Y W G Q G T L V T V S .
285 GTATTACTGTGCAGGGACCTTATCTTGGCAATTTGACTACTGGGGCCAGGTACCTGGTCACCGTCT
. R
356 CGAGA

```

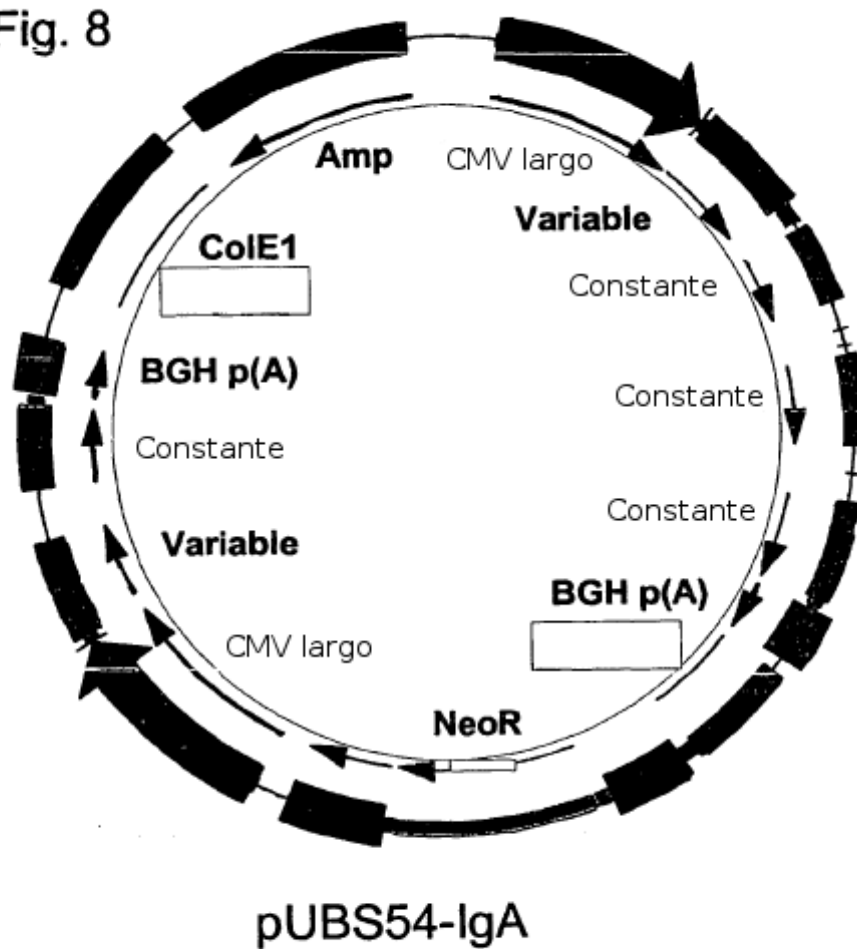
## Secuencia VL compartida de fagos I-2, II-2 y B28

```

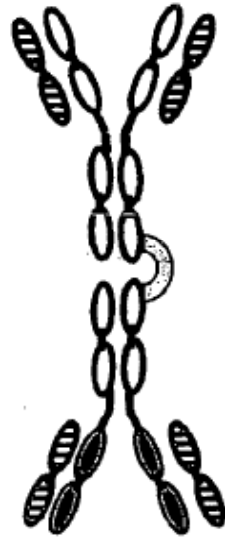
S S E L T Q D P A V S V A L G Q T V R I T C Q G .
1  TCGTCTGAGCTGACTCAGGACCCCTGTGTGTCTGTGGCTTGGGACAGACAGTCAGGATCAGATGCCAAGG
. D S L R S Y Y A S W Y Q Q K P G Q A P V L V I Y .
72 AGACAGCCTCAGAGCTATTATGCNAGCTGTGTAACAGCAGAGCCAGGACAGGCCCTGTACTTGTCTCT
. G K N N R P S G I P D R F S G S S S G N T A S
143 ATGGTAARACACACCGCCCTCAGGGATCCAGACCGATTCTCTGGCTCCAGCTCAGGAACACAGCTTCC
L T I T G A Q A E D E A D Y Y C N S R D S S G N .
214 TTGACCATCACTGGGCTCAGGGGAGATGAGGCTGACTATTACTGTAACTCCCGGACAGCAGTGGTAA
. H V V F G G G T K L T V L G A A A
285 CCATGTGGTATTCGGCGAGGACCAAGCTGACCGCTCTGTAGGTGGCGCGCA

```

Fig. 8



**Fig. 9**



**Fig. 10**

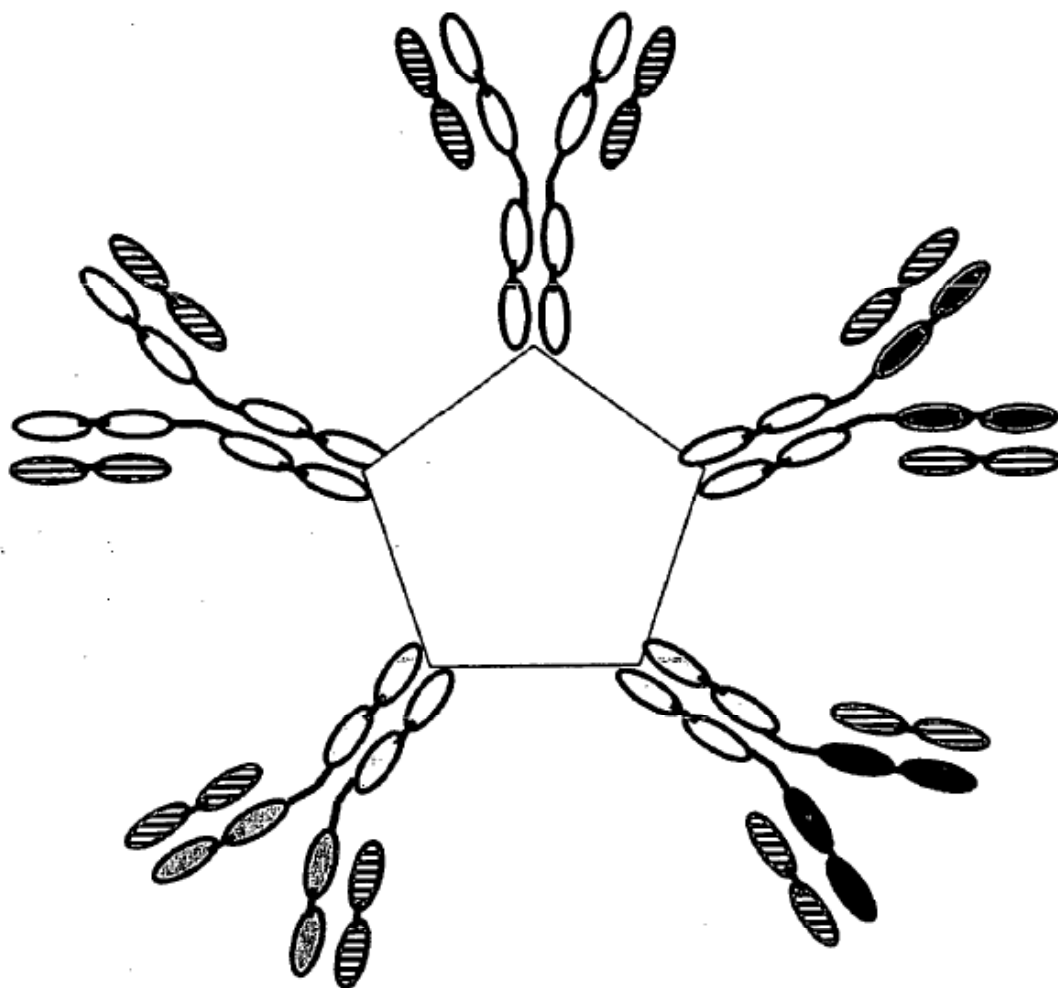
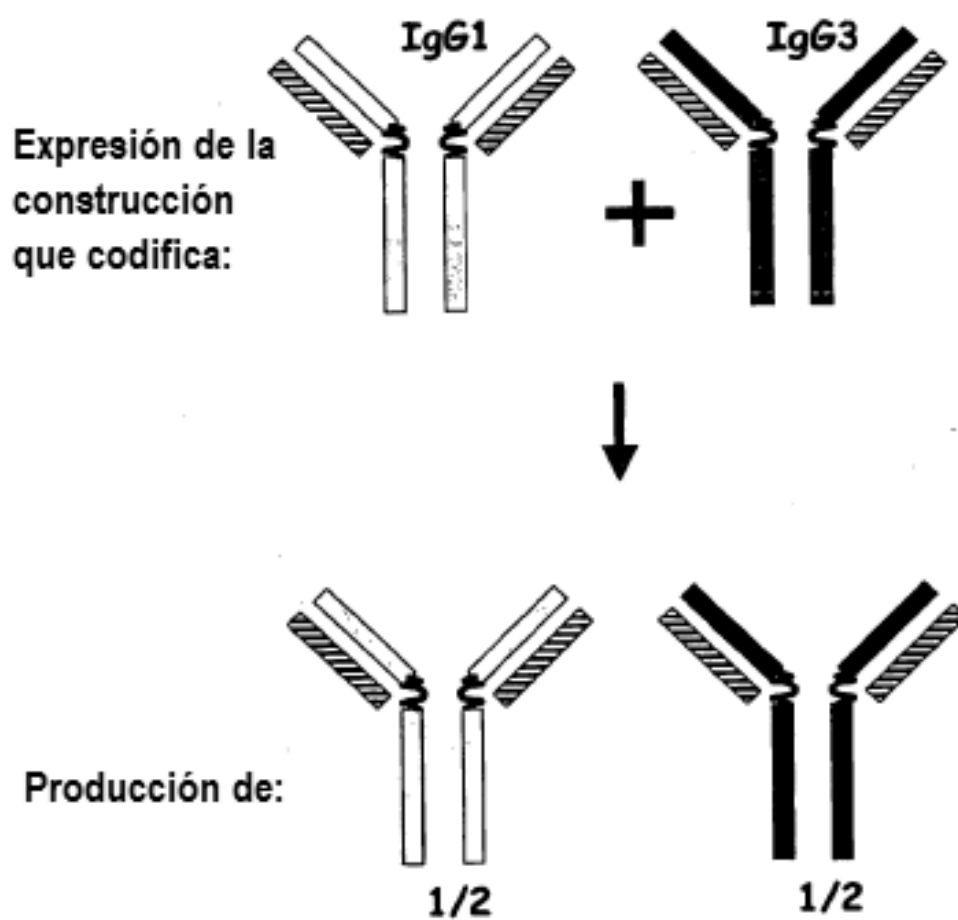


Fig. 11



**Fig. 12**Secuencia V<sub>H</sub> de K53 IgG

1	Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V
	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAGAGAGCCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTC
61	S C K A S G Y T F T S Y G I S W V R Q A
	TCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTACCAGCTATGGTATCAGCTGGGTGGACAGGCC
121	P G Q G L E W M G W I S A Y N G N T N Y
	CCTGGACAGGGCTTGACTGCTGATGGGATGGATCAGCGCTTACAATGGTAAACACAACTAT
181	A Q K L Q G R V T M T T D T S T S T A Y
	GCACAGAGCTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCCACAGACACATCCACGAGCACAGCCCTAC
241	M E L R S L R S D D T A V Y Y C A R G M
	ATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGRCGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGGGGCATG
301	M R G V F D Y W G Q G T L V T V S T
	ATGAGGGGTGTGTTTGACTACTGGGGCCAAGGTACCCCTGGTCACCGTCTCGACA

**Fig. 12, continuación**

Secuencia VH de 02-237 IgG

1	Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V
	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAGAGAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTC
61	S C K A S G Y T F T S Y G I S W V R Q A
	TCCTGCAGGCTTCTGGTTACACCTTTACCAGCTATGGTATCAGCTGGGTGGACAGGCC
121	P G Q G L E W M G W I S A Y N G N T N Y
	CCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGGGCTTACAATGGTAACACAACCTAT
181	A Q K L Q G R V T M T T D T S T S T A Y
	GCACAGAGCTCCAGGGCAGAGTCACCATGACACAGACACATCCACGAGCACAGCCTAC
241	M E L R S L R S D D T A V Y Y C A R G F
	ATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGGGGCTTT
301	P R T S F D S W G Q G T L V T V S S
	CCGCGTACGTGTTGACTCCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTCTCCTCA



**Fig. 12, continuación****secuencia VH de UBS54 IgG**

1	Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V R V CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAGAGAGCCTGGGTCTCGGTGAGGGTC
61	S C K A S G G T F S S Y A I S W V R Q A TCCTGCAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTCCGACAGGCC
121	P G Q G L E W M G G I I P I F G T A N Y CCTGGACAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAACTAC
181	A Q K F Q G R V T I T A D E S T S T A Y GCACAGAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGGGACGATCCACGAGCAGCAGCCTAC
241	M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R D P ATGGAGCTGAGCAGCCCTGAGATCTGAGGACACGGGCTGTGTATTACTGTGCAAGAGACCCG
301	F L H Y W G Q G T L V T V S T TTTCTTCACTATTGGGGCCAAGGTACCTGGTCACCGTCTCGACA

**Fig. 12, continuación**

Secuencia VL de IgG de K53 yUBS54

1	E I E L T Q S P L S L P V T P G E P A
	GNATTGAGCTCACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCAAGCCCTGGAGAGCGCGGC
58	S I S C R S S Q S L L H S N G Y M Y L D
	TGCATCTCTGCAGGGTCTAGTCAGAGCGCTCTGCATAGTATGGATACAACTATTGGAT
118	W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y L G S N R
	TGSTRCTGCAGAGCGCAGGCGAGTCTCCACAGCTCTGATCTATTGGGGTCTAATCGG
178	A S G V P D R F S G S G S G T D F T L K
	GCCTCCGGGTCCCTGACAGGTTTCAGTGGCGAGTGCATCAGGCACAGATTTTACACAGAA
238	I S R V E A E D V G V Y Y C M Q A L Q T
	ATCAGCAGATGGAGGCTGAGGATGTGTGGGTTTATTTACTGCAATGCAAGCTCTCAAACT
298	F T F G P G T K V E I K
	TTCACTTTTCGGGCCCTGGAGCCAGGGTGGAGATCAAA

**Fig. 12, continuación**

secuencia VL de 02-237 IgG

```

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

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

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

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

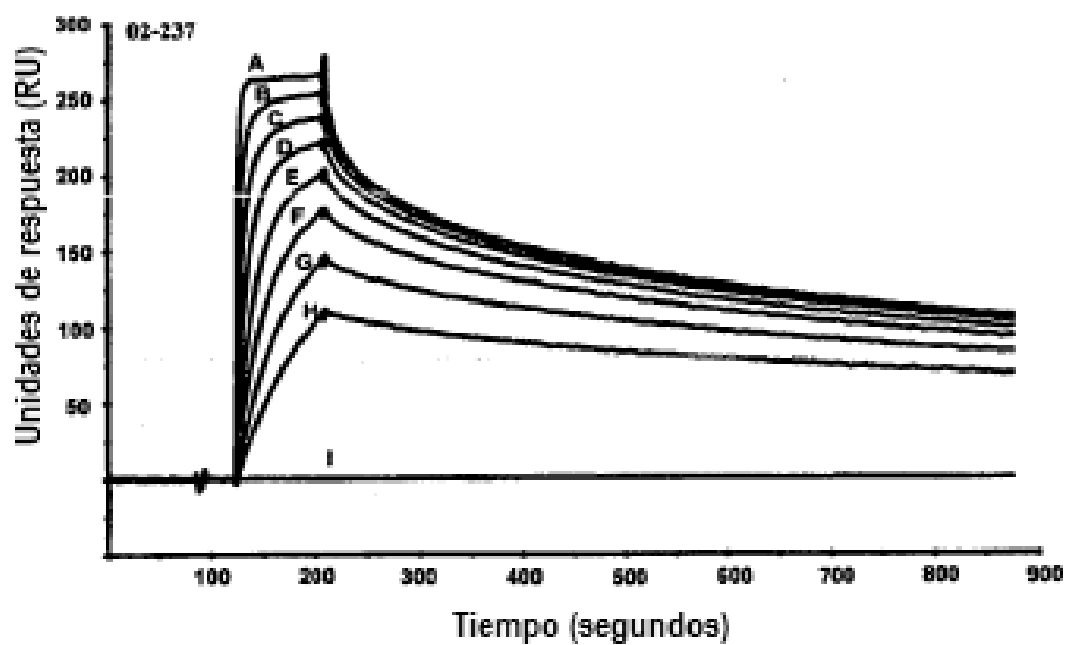
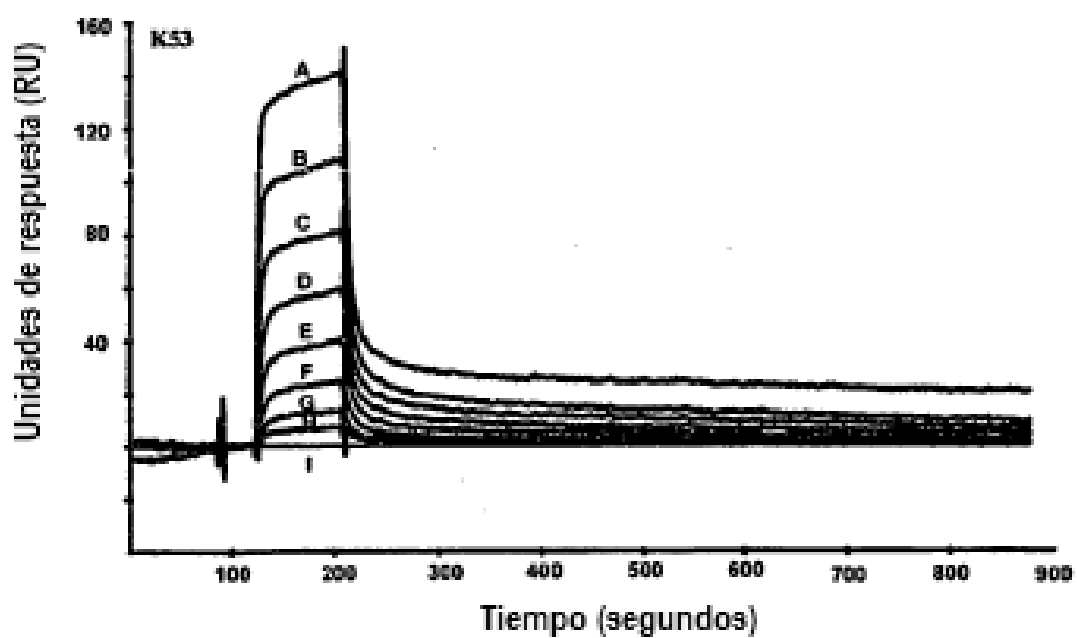
238    I S R V E A E D V G V Y Y C M Q A L Q T
      ATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTCTACAAACT

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

```

K53 VH	1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYG	CDR1	ISWVRQAPGQGLEWMG
UBS54 VH	1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSCKASGGTFSSYA		ISWVRQAPGQGLEWMG
02-237	1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYG		ISWVRQAPGQGLEWMG
		*****--**--*****--**--*****		
K53 VH	50	WISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTAYMELR	CDR2	SLRSDDTAVYYCAR
UBS54	50	GIPIFGNANYAQKFQGRVTITADESTAYMELSSL		RSED TAVYYCAR
02-237	50	WISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTAYMELR		SLRSDDTAVYYCAR
		-*-----**--*****--**--*****--**--*****		
K53 VH	99	GMMRGVFDYWGQGLVTVST	CDR3	
UBS54 VH	99	DPFLH---YWGQGLVTVST		
02-237	99	GFPRTSFDSWGQGLVTVSS		
		-----**--*****--		

**Fig. 14**



**Fig. 15**

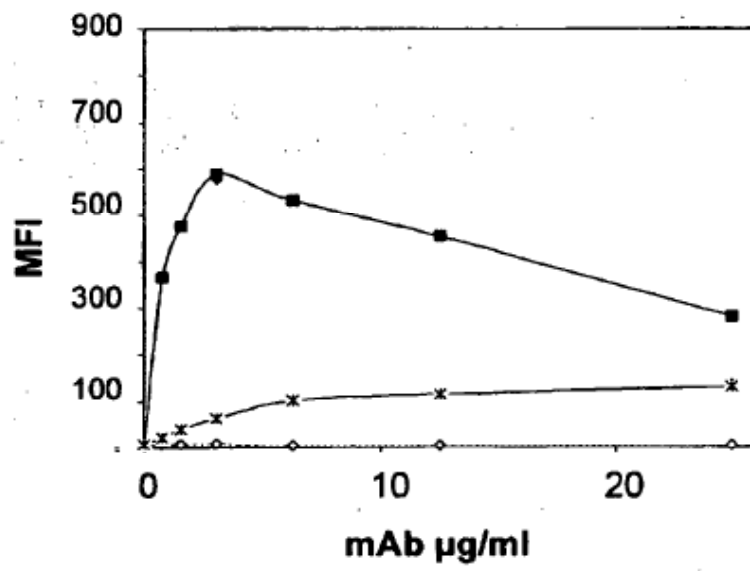


Fig. 16A

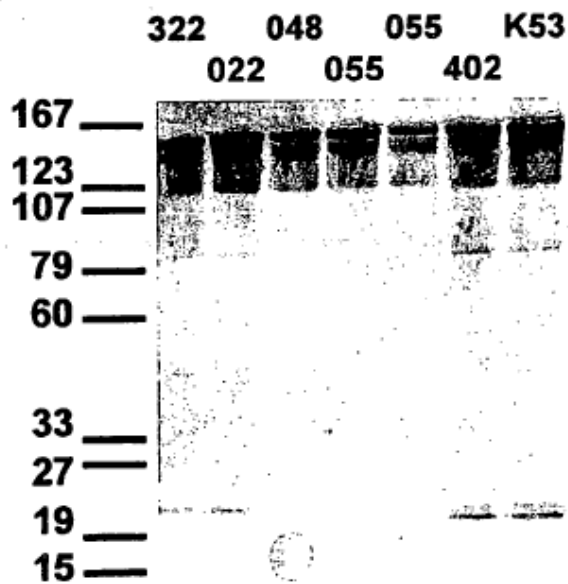
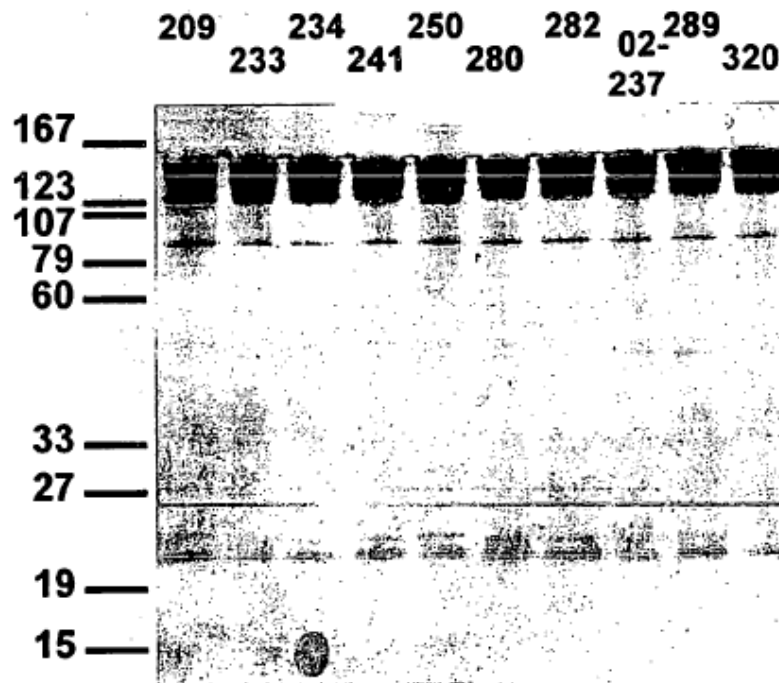


Fig. 16A, continuación

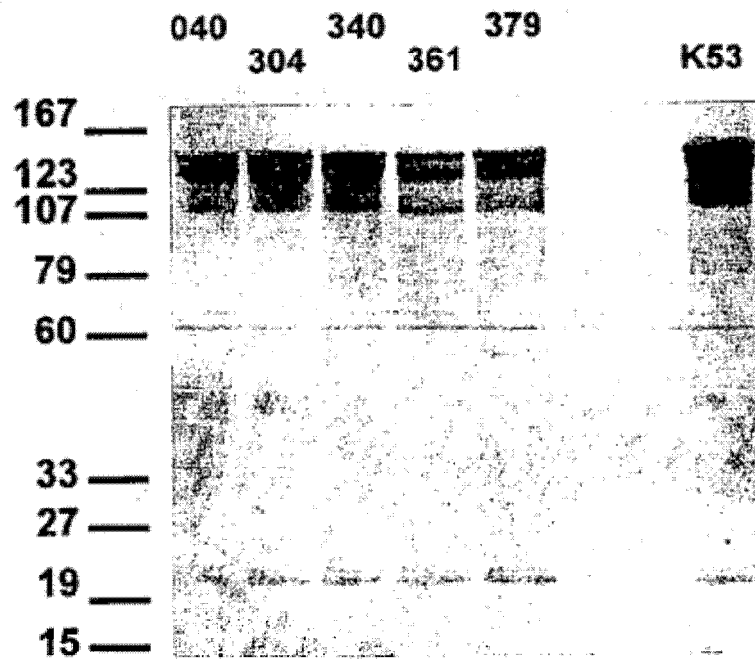




Fig. 16B

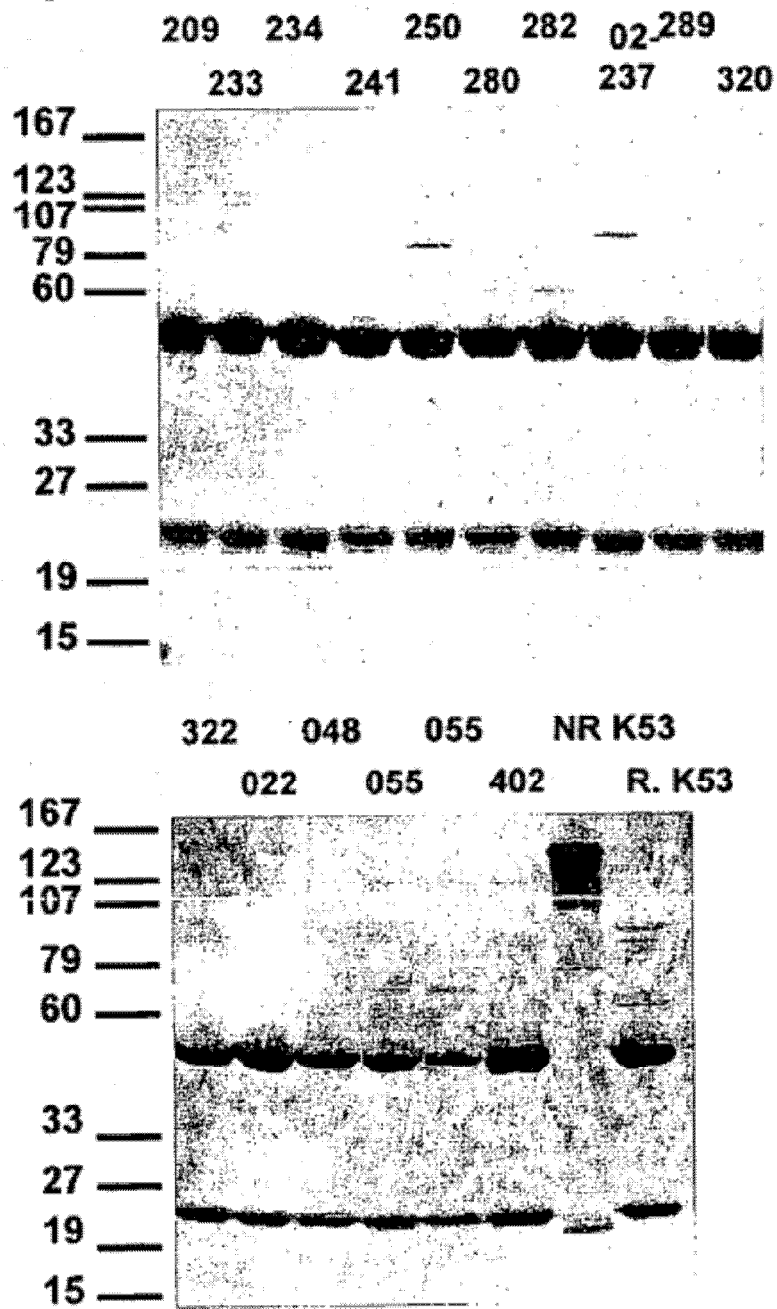
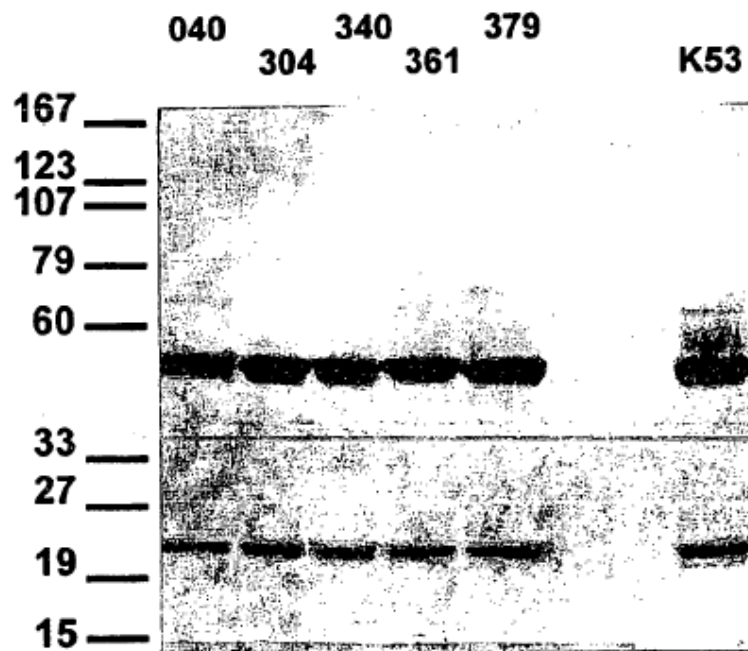


Fig. 16B, continuación



**Fig. 17**

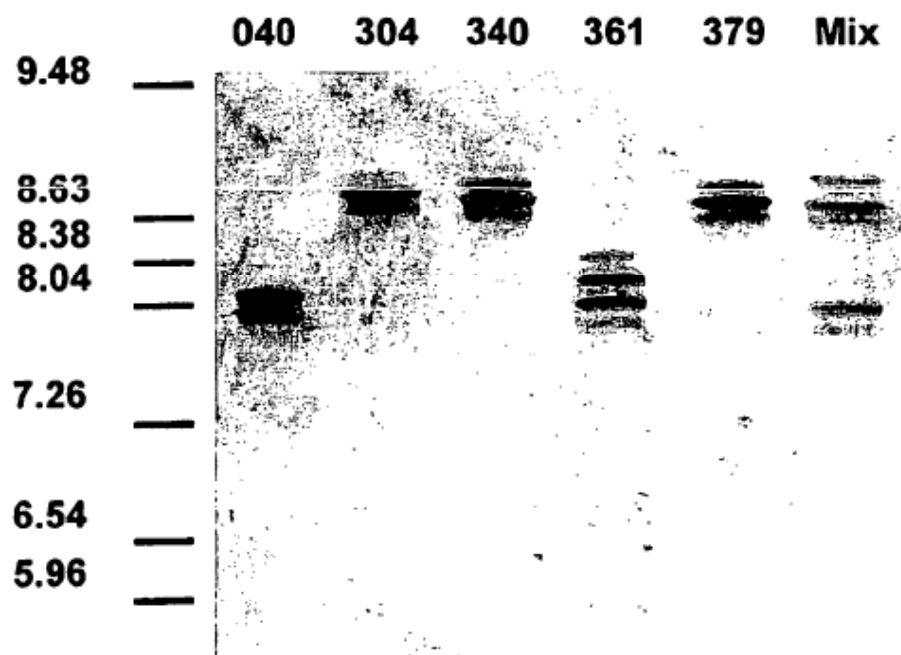
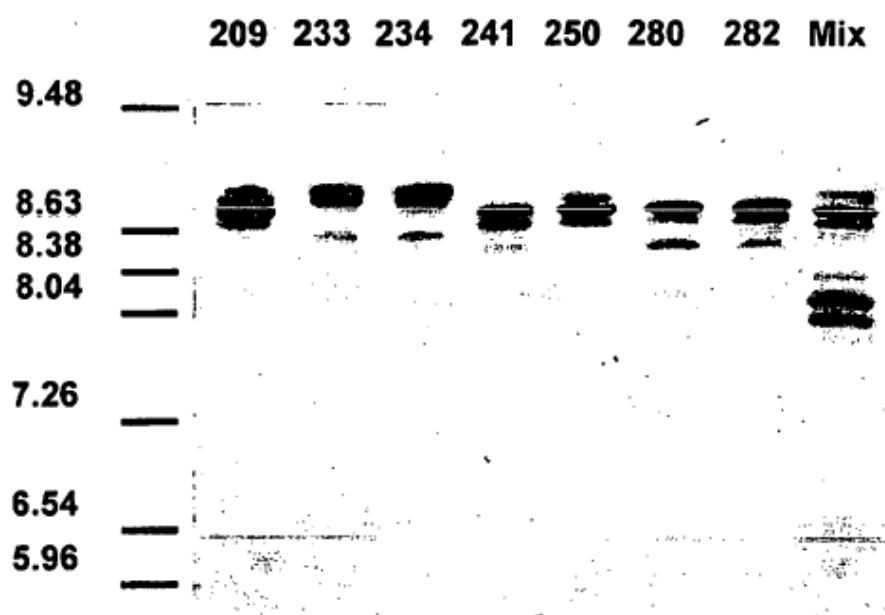


Fig. 17, continuación

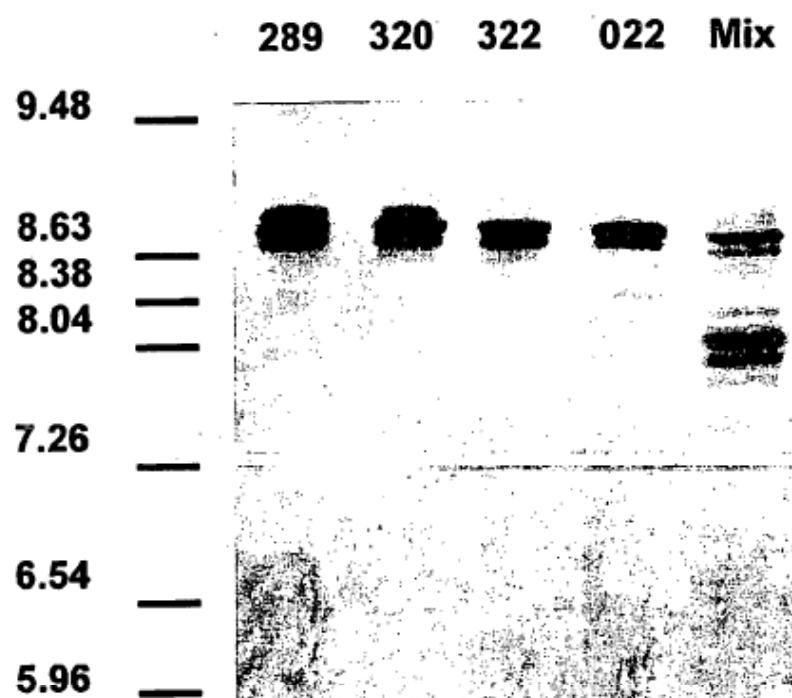
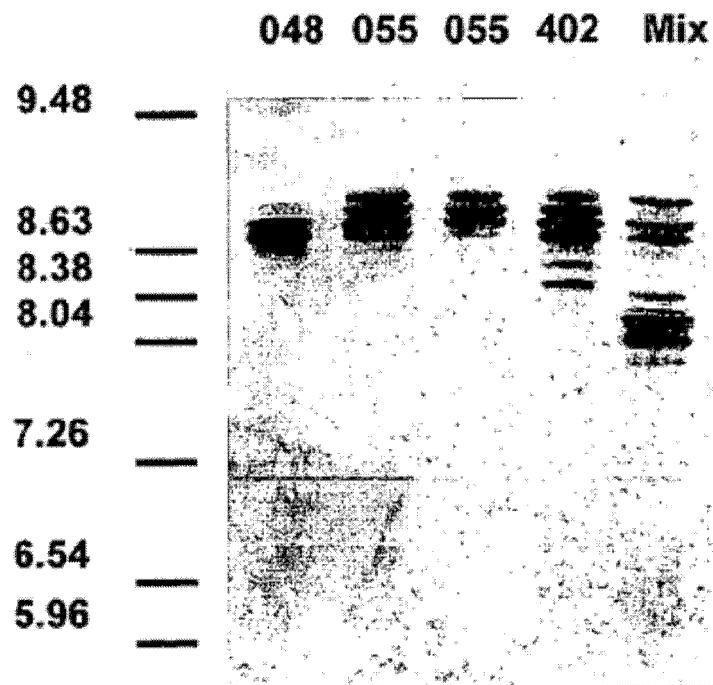
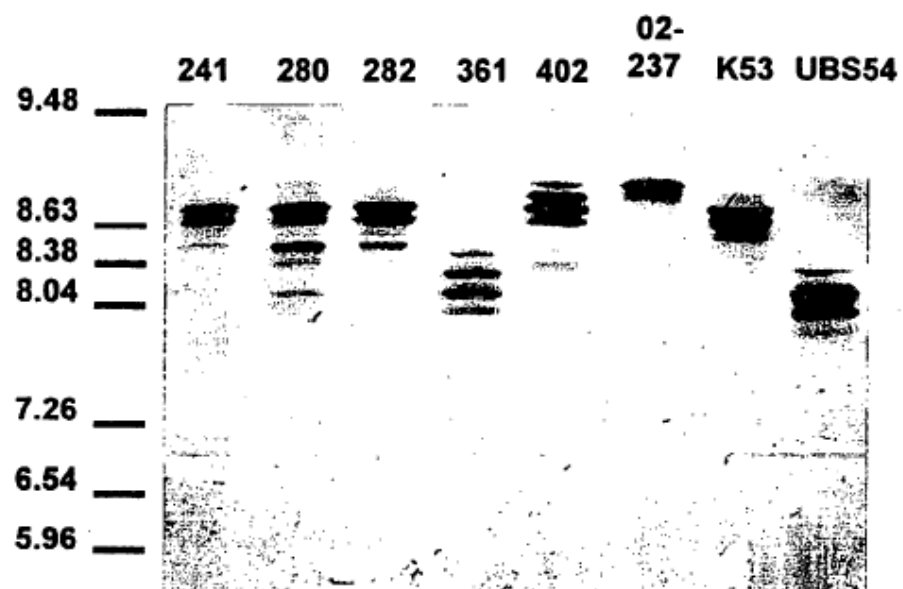


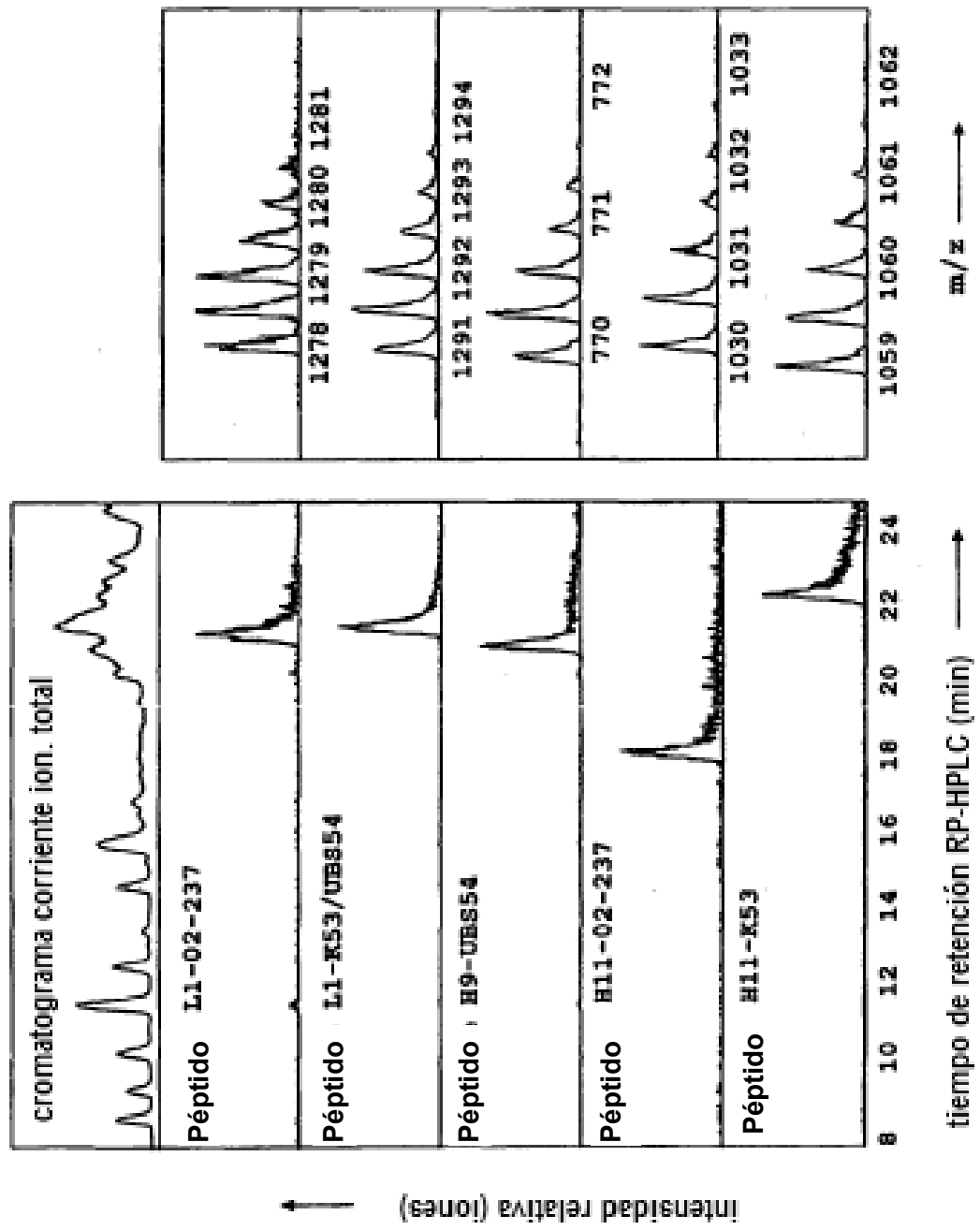
Fig. 17, continuación



**Fig. 18**



**Fig. 19** Mapeo de péptidos de pol1-280 policlonal



**Fig. 20**

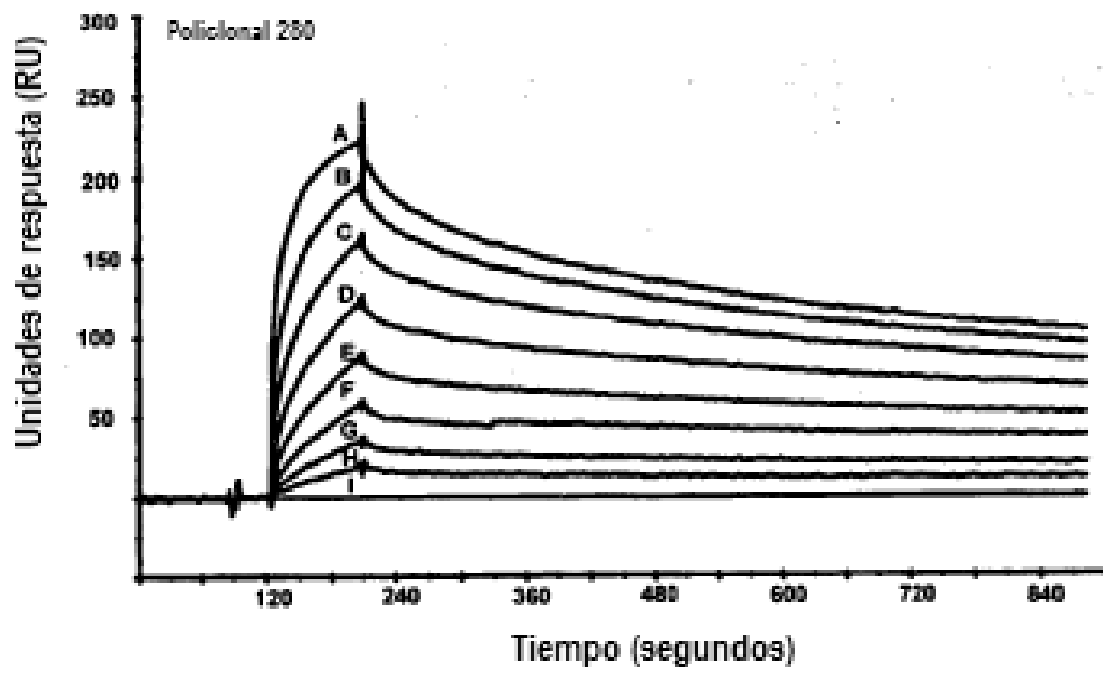




Fig. 21

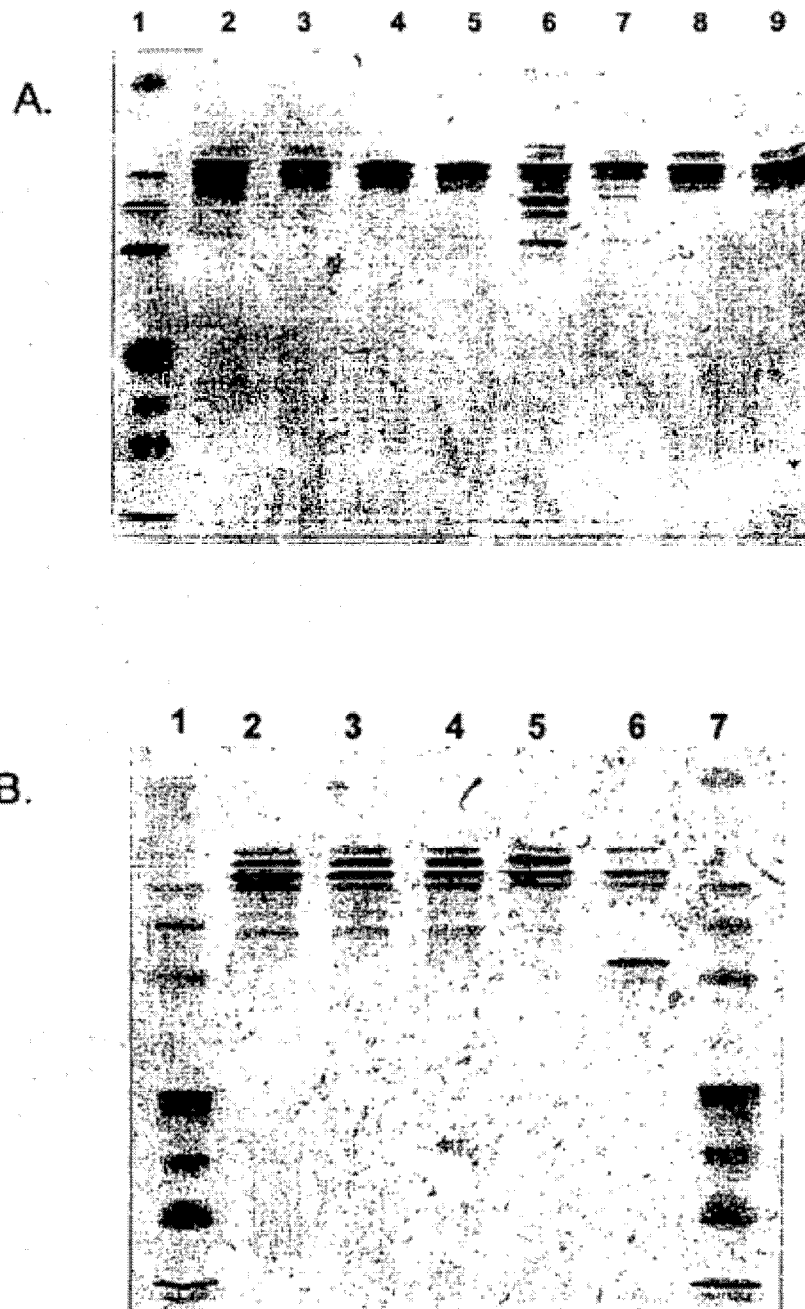


Fig. 22

