

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 549 638**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.02.2012** **E 12706242 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2015** **EP 2681239**

54 Título: **Proteínas de unión a antígeno**

30 Prioridad:

28.02.2011 EP 11156320

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

30.10.2015

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacher Strasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

BOSSENMAIER, BIRGIT;
KETTENBERGER, HUBERT;
KLEIN, CHRISTIAN;
KUENKELE, KLAUS-PETER;
REGULA, JOERG THOMAS;
SCHAEFER, WOLFGANG;
SCHWAIGER, MANFRED y
SUSTMANN, CLAUDIO

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 549 638 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

Proteínas de unión a antígeno

- 5 La presente invención se refiere a proteínas de unión a antígeno que comprenden dos partes Fc, a métodos para la producción de las mismas, a composiciones farmacéuticas que contienen dichas proteínas de unión a antígenos y a usos de las mismas.

Antecedentes de la invención

- 10 En las últimas dos décadas se han desarrollado y evaluado diversos derivados de anticuerpo manipulado, mono- o multi-específicos, mono- o multi-valentes (ver, por ejemplo, Holliger P. *et al.*, Nature Biotech. 23:1126-1136, 2005; Fischer N. y Léger O., Pathobiology 74:3-14, 2007).

- 15 El documento nº WO 2006/093794 A1 da a conocer moléculas de tipo IgG monoespecíficas con un entrecruzamiento de los dominios de cadena pesada y cadena ligera.

- El documento nº WO 2010/145792 A1 se refiere a proteínas de unión a antígeno biespecíficas que incluyen un anticuerpo de longitud completa acoplado con fragmentos Fab con un entrecruzamiento de dominios en el anticuerpo de longitud completa y/o los fragmentos Fab adicionales.
- 20

El documento nº US 2010/322934 A1 se refiere a anticuerpos biespecíficos tetravalentes con un entrecruzamiento de dominios de los dominios constantes de cadena pesada y cadena ligera CH1 y CL.

- 25 El documento nº US 2004/0033561 se refiere al ADN y a la producción de monocuerpos monovalentes mediante la coexpresión de una cadena pesada y una cadena pesada modificada. Sin embargo, durante la expresión se forma como producto secundario una cantidad considerable de homodímero no deseado, que resulta difícil de separar de los monocuerpos heterodiméricos deseados, ya que el homodímero y el heterodímero presentan el mismo peso molecular o pesos moleculares similares. El documento nº WO 2007/048037 se refiere a IgG monovalentes que corresponden a los monocuerpos heterodiméricos del documento nº US 2004/0033561, pero que pueden presentar una fracción de etiqueta unida a la cadena pesada para una purificación más sencilla del heterodímero a partir del producto secundario homodimérico más difícil de separar.
- 30

Descripción resumida de la invención

- 35 La invención comprende una proteína de unión a antígeno, que comprende:
- a) dos cadenas pesadas modificadas de un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno, en el que VH de cada cadena pesada se ha sustituido por VL de dicho anticuerpo, estando asociadas dichas cadenas pesadas modificadas entre sí mediante sus dominios CH de la parte Fc,
- 40 b) dos cadenas pesadas modificadas de dicho anticuerpo, en el que CH1 de cada cadena pesada ha sido sustituido por CL de dicho anticuerpo, estando asociadas dichas cadenas pesadas modificadas entre sí mediante sus dominios CH1 de la parte Fc, y en el que los dominios VL de las cadenas pesadas de a) están asociadas a los dominios VH de las cadenas pesadas de b), y los dominios CH1 de las cadenas pesadas de a) están asociadas a los dominios CL de las cadenas pesadas de b).
- 45

En una realización, la proteína de unión a antígeno según la invención se caracteriza porque los dominios CH3 de la parte Fc de las cadenas pesadas modificadas de a) y los dominios CH3 de la parte Fc de las cadenas pesadas modificadas de b) son del mismo isotipo.

- 50 En una realización, la proteína de unión a antígeno según la invención se caracteriza porque los dominios CH2 y CH3 de la parte Fc de las cadenas pesadas modificadas de a) y los dominios CH2 y CH3 de la parte Fc de las cadenas pesadas modificadas de b) son del mismo isotipo.

- En una realización, la proteína de unión a antígeno según la invención se caracteriza porque los dominios CH2 y CH3 de la parte Fc de las cadenas pesadas modificadas de a) y los dominios CH2 y CH3 de la parte Fc de las cadenas pesadas modificadas de b) son del isotipo IgG.
- 55

En una realización, la proteína de unión a antígeno según la invención se caracteriza porque los dominios CH2 y CH3 de la parte Fc de las cadenas pesadas modificadas de a) y los dominios CH2 y CH3 de la parte Fc de las cadenas pesadas modificadas de b) son del isotipo IgG1.

60

En una realización, la proteína de unión a antígeno según la invención se caracteriza porque comprende:

- a) dos cadenas pesadas modificadas que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 1, y

- b) dos cadenas pesadas modificadas que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 2,
- a) dos cadenas pesadas modificadas que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 3, y
- b) dos cadenas pesadas modificadas que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 4, o
- a) dos cadenas pesadas modificadas que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 5, y
- b) dos cadenas pesadas modificadas que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 6.

En una realización, la proteína de unión a antígeno según la invención se caracteriza porque las dos cadenas pesadas modificadas de a), o las dos cadenas pesadas modificadas de b), son adicionalmente modificadas con las sustituciones de aminoácidos S364G, L368F, D399K y K409D (en las que las posiciones de los aminoácidos están numeradas según el índice EU de Kabat).

En una realización, la proteína de unión a antígeno según la invención se caracteriza porque:

- a) dos cadenas pesadas modificadas que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 1, y b) dos cadenas pesadas modificadas que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 2, en las que las dos cadenas pesadas modificadas de a), o las dos cadenas pesadas modificadas de b), se modifican adicionalmente con las sustituciones de aminoácidos S364G, L368F, D399K y K409D (en las que las posiciones de aminoácidos se numeran según el índice EU de Kabat),
- a) dos cadenas pesadas modificadas que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 3, y b) dos cadenas pesadas modificadas que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 4, en las que las dos cadenas pesadas modificadas de a), o las dos cadenas pesadas modificadas de b), se modifican adicionalmente con las sustituciones de aminoácidos S364G, L368F, D399K y K409D (en las que las posiciones de aminoácidos se numeran según el índice EU de Kabat), o
- a) dos cadenas pesadas modificadas que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 5, y b) dos cadenas pesadas modificadas que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 6, en las que las dos cadenas pesadas modificadas de a), o las dos cadenas pesadas modificadas de b), se modifican adicionalmente con las sustituciones de aminoácidos S364G, L368F, D399K y K409D (en las que las posiciones de aminoácidos se numeran según el índice EU de Kabat).

En una realización, la proteína de unión a antígeno según la invención se caracteriza porque los dominios CH3 de la parte Fc de las cadenas pesadas modificadas de a) y los dominios CH3 de la parte Fc de las cadenas pesadas modificadas de b) son de isotipos diferentes.

En una realización, la proteína de unión a antígeno según la invención se caracteriza porque los dominios CH3 de la parte Fc de las cadenas pesadas modificadas de a) son del isotipo IgG1, y los dominios CH3 de la parte Fc de las cadenas pesadas modificadas de b) son del isotipo IgA.

En una realización, la proteína de unión a antígeno según la invención se caracteriza porque comprende:

- a) dos cadenas pesadas modificadas que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 7, y b) dos cadenas pesadas modificadas que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 4.

En una realización, la proteína de unión a antígeno según la invención se caracteriza porque comprende:

- a) dos cadenas pesadas modificadas que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 3, y b) dos cadenas pesadas modificadas que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 8.

En una realización, la proteína de unión a antígeno según la invención se caracteriza porque los dominios CH2 y CH3 de la parte Fc de las cadenas pesadas modificadas de a) son del isotipo IgG1, y los dominios CH2 y CH3 de la parte Fc de las cadenas pesadas modificadas de b) son del isotipo IgA.

En una realización, la proteína de unión a antígeno según la invención se caracteriza porque el dominio CH2 de las partes Fc de a) y b) son del isotipo IgG1 y la proteína de unión a antígeno se encuentra afucosilada, con una cantidad de fucosa de 80% o menos (preferentemente de entre 65% y 5%) de la cantidad total de oligosacáridos (azúcares) en Asn297 es del isotipo IgG1 humano.

La invención comprende además un método para la preparación de una proteína de unión a antígeno según la invención que comprende las etapas de:

- a) transformar una célula huésped con vectores que comprenden moléculas de ácidos nucleicos codificantes de una proteína de unión a antígeno según la invención
- b) cultivar la célula huésped bajo condiciones que permiten la síntesis de dicha molécula de proteína de unión a antígeno, y

c) recuperar dicha molécula de proteína de unión a antígeno a partir de dicho cultivo.

La invención comprende además un ácido nucleico codificante de la proteína de unión a antígeno según la invención.

La invención comprende además vectores que comprenden un ácido nucleico codificante de la proteína de unión a antígeno según la invención.

La invención comprende además una célula huésped que comprende dichos vectores.

La invención comprende además una composición, preferentemente una composición farmacéutica o diagnóstica de una proteína de unión a antígeno según la invención.

La invención comprende además una composición farmacéutica que comprende una proteína de unión a antígeno según la invención.

Ahora se ha encontrado que las proteínas de unión a antígeno según la invención presentan características valiosas, tales como actividades biológicas o farmacológicas (tales como, por ejemplo, una ADCC incrementada en comparación con los anticuerpos parentales). Pueden utilizarse, por ejemplo, para el tratamiento de enfermedades tales como el cáncer. Las proteínas de unión a antígeno según la invención presentan además propiedades farmacocinéticas altamente valiosas (tales como, por ejemplo, AUC_{0-inf}, C_{max} o C₀).

Descripción de las figuras

Figura 1A y B: A) Estructura esquemática de la proteína de unión a antígeno según la invención (abreviada como dímero de MoAb) con entrecruzamiento CH1-CL. B) Esquema del producto secundario mayor-monómero de anticuerpo monovalente (MoAb) con entrecruzamiento CH1-CL (abreviadamente MoAb).

Figura 1C: C) Asociación de dos cadenas pesadas modificadas a y b: la heterodimerización de dos cadenas diferentes (a con b) conduce directamente al anticuerpo monovalente B (ruta 2). La homodimerización de dos cadenas idénticas (a con a y b con b) conduce a los intermediarios putativos aa y bb (mediante la ruta 1) que pueden asociarse para formar el "dímero de MoAb" A. La modificación de los contactos CH3-CH3 puede afectar a la distribución de los productos A (dímero de MoAb) y B (MoAb). Las modificaciones que favorecen la heterodimerización (por ejemplo botones en ojales) incrementará la cantidad relativa del compuesto B mediante la ruta 2, mientras que las modificaciones que mantienen interacciones atractoras entre cadenas idénticas pero conducen a la repulsión de cadenas diferentes (por ejemplo dominios CH3 de a y b de diferente isotipo) favorecerán la ruta 1 e incrementarán de esta manera la cantidad de A. Blanco: dominios de cadena ligera. Sombreado: dominios de cadena pesada.

Figura 2: caracterización bioquímica del dímero de MoAb c-Met (dímero de MoAb 5D5 ("CH3-wt")) (CH3-wt se refiere al dominio CH3 de tipo salvaje no modificado). (A) Se separó el anticuerpo purificado con proteína en una columna Superdex 200 26/60. (B) Las fracciones pico (1,2,3) se agruparon y se sometieron a SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras y reductoras. Los geles de poliacrilamida se tiñeron con pigmento azul de Coomassie. Los picos individuales corresponden a MoAb (3), dímero de MoAb (2) y a un agregado de peso molecular más alto (1).

Figura 3: caracterización bioquímica del dímero de MoAb IGF-1R (dímero de MoAb IGF-1R AK18 ("CH3-wt")) (CH3-wt se refiere al dominio CH3 de tipo salvaje no modificado). (A) Se separó el anticuerpo purificado con proteína en una columna Superdex 200 26/60. (B) Las fracciones pico (1,2) se agruparon y se sometieron a SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras y reductoras. Los geles de poliacrilamida se tiñeron con pigmento azul de Coomassie. Los picos individuales corresponden a MoAb (2) y al dímero de MoAb (1). C) La masa molecular de las fracciones pico 1 y 2 se investigó mediante SEC-MALLS.

Figura 4: caracterización bioquímica de dímero de MoAb c-Met (dímero de MoAb 5D5 ("CH3-wt")) (CH3-wt se refiere al dominio CH3 de tipo salvaje no modificado). (A) Se separó el anticuerpo purificado con proteína en una columna Superdex 200 26/60. (B) Las fracciones pico (1,2) se agruparon y se sometieron a SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras y reductoras. Los geles de poliacrilamida se tiñeron con pigmento azul de Coomassie. Los picos individuales corresponden a MoAb (3), dímero de MoAb (2) y a un agregado de peso molecular más alto (1).

Figura 5: dibujo esquemático del ensayo de resonancia del plasmón superficial aplicado al análisis de la afinidad de unión de IGF-1R. Se inmovilizó un anticuerpo anti-IgG humana (JIR 109-005-098) sobre la superficie de un chip biosensor CM5 y posteriormente capturó los anticuerpos de

MoAb o del dímero de MoAb. La inyección adicional del ectodominio de IGF-1R recombinante confirmó la funcionalidad de los sitios de unión a antígeno en las moléculas de MoAb y el dímero de MoAb.

Figura 6: unión celular del dímero de MoAb (dímero de MoAb IGF-1R AK18 ("CH3-wt") (B) y anticuerpo parental mAb IGF-1R (A) contra células A549 con análisis de citometría de flujo. Se incubaron células A549 con una serie de dilución de los anticuerpos indicados. Los anticuerpos unidos se visualizaron con un anticuerpo secundario de unión a Fc acoplado con fluoróforo.

Figura 7: ensayo de ADCC con mAb IGF1R no glucomanipulado (no ge) y glucomanipulado (ge) y dímero de MoAb IGF-1R no glucomanipulado (dímero de MoAb IGF1R AK18 ("CH3-wt")). Se incubaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) derivadas de donante, con células de cáncer de próstata (DU145) en presencia de mAb IGF1R no ge (1), mAb IGF1R ge (2) y dímero de MoAb IGF1R AK18 ("CH3-wt") (3).

Figura 8: se evaluó la internalización de IGF-1R en células HT29 tras la incubación con anticuerpo IgG1 de IGF-1R (mAb de IGF-1R) y dímero de MoAb IGF-1R (dímero de MoAb IGF1R AK18 ("CH3-wt")). El gráfico ilustra los niveles totales de IGF-1R tras la exposición de anticuerpos determinados en una configuración de ensayo basada en ELISA.

Figura 9: se evaluó la autofosforilación de IGF-1R tras la incubación de células 3T3-IGF-1R con anticuerpo IgG1 de IGF-1R y dímero de MoAb de IGF-1R (dímero de MoAb IGF1R AK18 ("CH3-wt")) en presencia de IGF-1 10 nM. El gráfico ilustra los niveles de fosfo-IGF-1R con la exposición a anticuerpos, determinados en una configuración de ensayo basada en ELISA.

Figura 10: análisis de proporciones de dímero de MoAb obtenido (=proteína de unión a antígeno según la invención) a monómero de MoAb (=producto secundario monovalente) determinadas mediante HPLC. Se expresaron transitoriamente diferentes anticuerpos con dominios CH3 de tipo salvaje (CH3-wt) y dominios CH3 modificados y se determinaron las proporciones de dímero frente a monómero.

Figura 11: espectro de IEP-EM del dímero de MoAb IGF-1R (fracción 1 de la CET) bajo condiciones no reductoras y tras la desglucosilación.

Figura 12: espectro de IEP-EM del dímero de MoAb IGF-1R (fracción 1 de la CET) tras desglucosilación y reducción.

Descripción detallada de la invención

La invención comprende una proteína de unión a antígeno, que comprende:

- a) dos cadenas pesadas modificadas de un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno, en las que VH de cada cadena pesada se sustituye por el VL de dicho anticuerpo, estando asociadas dichas cadenas pesadas modificadas entre sí mediante sus dominios CH de la parte Fc, b) dos cadenas pesadas modificadas de dicho anticuerpo en las que CH1 de cada cadena pesada se ha sustituido por CL de dicho anticuerpo, estando asociadas dichas cadenas pesadas modificadas entre sí mediante sus dominios CH3 de la parte Fc, y en las que los dominios VL de las cadenas pesadas de a) están asociadas a los dominios VH de las cadenas pesadas de b), y los dominios CH1 de las cadenas pesadas de a) están asociadas a los dominios CL de las cadenas pesadas de b).

En una realización, la proteína de unión a antígeno según la invención se caracteriza porque los dominios CH3 de la parte Fc de las cadenas pesadas modificadas de a) y los dominios CH3 de la parte Fc de las cadenas pesadas modificadas de b) son del mismo isotipo.

En una realización, la proteína de unión a antígeno según la invención se caracteriza porque los dominios CH2 y CH3 de la parte Fc de las cadenas pesadas modificadas de a) y los dominios CH2 y CH3 de la parte Fc de las cadenas pesadas modificadas de b) son del mismo isotipo.

En una realización, la proteína de unión a antígeno según la invención se caracteriza porque los dominios CH2 y CH3 de la parte Fc de las cadenas pesadas modificadas de a) y los dominios CH2 y CH3 de la parte Fc de las cadenas pesadas modificadas de b) son del isotipo IgG.

En una realización, la proteína de unión a antígeno según la invención se caracteriza porque los dominios CH2 y CH3 de la parte Fc de las cadenas pesadas modificadas de a) y los dominios CH2 y CH3 de la parte Fc de las cadenas pesadas modificadas de b) son del isotipo IgG1.

En una realización, la proteína de unión a antígeno según la invención se caracteriza porque comprende:

- a) dos cadenas pesadas modificadas que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 1, y
- b) dos cadenas pesadas modificadas que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 2,

- a) dos cadenas pesadas modificadas que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 3, y

b) dos cadenas pesadas modificadas que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 4, o

a) dos cadenas pesadas modificadas que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 5, y

b) dos cadenas pesadas modificadas que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 6.

Para mejorar los rendimientos de la proteína de unión a antígeno según la invención (es decir, para mejorar la proporción de dímero de MoAb a monómero de MoAb (ver el Ejemplo 9)), los dominios CH3 de IgG1 de a) pueden modificarse adicionalmente mediante mutaciones de manera que los dominios CH3 de IgG1 de a) y los dominios CH3 de IgG1 natural (wt) de b) sean diferentes. La modificación/mutación debe llevarse a cabo de manera que se mantengan las interacciones atractoras entre cadenas idénticas pero conduzcan a la repulsión de las cadenas diferentes (ver también la fig. 1C).

En una realización, la proteína de unión a antígeno según la invención se caracteriza porque las dos cadenas pesadas modificadas de a), o las dos cadenas pesadas modificadas de b), son adicionalmente modificadas con las sustituciones de aminoácidos S364G, L368F, D399K y K409D (en las que las posiciones de los aminoácidos están numeradas según el índice EU de Kabat).

El sistema de numeración de índice EU de Kabat se describe en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a edición, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

En una realización, la proteína de unión a antígeno según la invención se caracteriza porque:

a) dos cadenas pesadas modificadas que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 1, y

b) dos cadenas pesadas modificadas que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 2,

en las que las dos cadenas pesadas modificadas de a),

o las dos cadenas pesadas modificadas de b),

son adicionalmente modificadas por las sustituciones de aminoácidos S364G, L368F, D399K y K409D en las que las posiciones de aminoácidos están numeradas según el índice EU de Kabat),

a) dos cadenas pesadas modificadas que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 3, y

b) dos cadenas pesadas modificadas que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 4,

en las que las dos cadenas pesadas modificadas de a), o las dos cadenas pesadas modificadas de b), son adicionalmente modificadas con las sustituciones de aminoácidos S364G, L368F, D399K y K409D (en las que las posiciones de aminoácidos están numeradas según el índice EU de Kabat), o

a) dos cadenas pesadas modificadas que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 5, y

b) dos cadenas pesadas modificadas que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 6,

en las que las dos cadenas pesadas modificadas de a),

o las dos cadenas pesadas modificadas de b),

son adicionalmente modificadas por las sustituciones de aminoácidos S364G, L368F, D399K y K409D (en las que las posiciones de aminoácidos están numeradas según el índice EU de Kabat).

Otra posibilidad para mejorar los rendimientos de la proteína de unión a antígeno según la invención (es decir, para mejorar la proporción de dímero de MoAb a monómero de MoAb (ver el Ejemplo 9)), es obtener los dominios CH3 de a) y b) de isotipos diferentes. De esta manera, las interacciones atractoras entre cadenas idénticas se mantienen mientras que las cadenas diferentes se repelen (ver también la fig. 1C).

Por lo tanto, en una realización, la proteína de unión a antígeno según la invención se caracteriza porque los dominios CH3 de la parte Fc de las cadenas pesadas modificadas de a) y los dominios CH3 de la parte Fc de las cadenas pesadas modificadas de b) son de isotipos diferentes.

En una realización, la proteína de unión a antígeno según la invención se caracteriza porque los dominios CH3 de la parte Fc de las cadenas pesadas modificadas de a) son del isotipo IgG, y los dominios CH3 de la parte Fc de las cadenas pesadas modificadas de b) son del isotipo IgA.

En una realización, la proteína de unión a antígeno según la invención se caracteriza porque comprende:

a) dos cadenas pesadas modificadas que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 7, y

b) dos cadenas pesadas modificadas que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 4.

En una realización, la proteína de unión a antígeno según la invención se caracteriza porque comprende:

a) dos cadenas pesadas modificadas que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 3, y

b) dos cadenas pesadas modificadas que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 8.

En una realización, la proteína de unión a antígeno según la invención se caracteriza porque los dominios CH2 u C3 de la parte Fc de las cadenas pesadas modificadas de a) son del isotipo IgG1,

y los dominios CH2 y CH3 de la parte Fc de las cadenas pesadas modificadas de b) son del isotipo IgA1.

En una realización, la proteína de unión a antígeno según la invención se caracteriza porque el dominio CH2 de las partes Fc de a) y b) son del isotipo IgG1 y la proteína de unión a antígeno se encuentra afucosilada, con una cantidad de fucosa de 80% o menos de la cantidad total de oligosacáridos (azúcares) en Asn297 es del isotipo IgG1 humano.

El término "anticuerpo" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un anticuerpo de longitud completa que consiste de dos cadenas pesadas de anticuerpo y dos cadenas ligeras de anticuerpo (ver la fig. 1). Una cadena pesada de un anticuerpo de longitud completa es un polipéptido que consiste en la dirección N-terminal a C-terminal de un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo, un dominio constante 1 de cadena pesada (CH1) de anticuerpo, una región bisagra (HR) de anticuerpo, un dominio constante 2 de cadena pesada (CH2) de anticuerpo, y un dominio constante 3 de cadena pesada (CH3) de anticuerpo, abreviadamente: VH-CH1-HR-CH2-CH3, y opcionalmente un dominio constante 4 de cadena pesada (CH4) de anticuerpo en el caso de un anticuerpo de la subclase IgE. Preferentemente, la cadena pesada del anticuerpo de longitud completa es un polipéptido que consiste, en la dirección N-terminal a C-terminal, de V_H, CH1, HR, CH2 y CH3. La cadena ligera del anticuerpo de longitud completa es un polipéptido que consiste, en dirección N-terminal a C-terminal, de un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo, y un dominio constante de cadena ligera (CL) de anticuerpo, abreviadamente: VL-CL. El dominio constante de cadena ligera (CL) de anticuerpo puede ser κ (kappa) o λ (lambda). Las cadenas de anticuerpo se encuentran unidas entre sí mediante enlaces disulfuro entre polipéptidos, entre el dominio C_L y el dominio CH1 (es decir, entre la cadena ligera y la pesada y entre las regiones de bisagra de las cadenas pesadas del anticuerpo de longitud completa. Son ejemplos de anticuerpos de longitud completa típicos anticuerpos naturales tales como IgG (por ejemplo IgG1 e IgG2), IgM, IgA, IgD e IgE. Los anticuerpos según la invención pueden ser de una única especie, por ejemplo humanos, o pueden ser anticuerpos quimerizados o humanizados. Los anticuerpos de longitud completa según la invención comprenden dos sitios de unión a antígeno, cada uno formado por una pareja de V_H y V_L, uniéndose ambos específicamente al mismo (primer) antígeno.

A partir de dichos anticuerpos de longitud completa, se deriva la proteína de unión a antígeno de la invención mediante:

- a) la modificación de dos cadenas pesadas de un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno, mediante la sustitución del dominio VH de cada cadena pesada por el dominio VL de dicho anticuerpo, b) la modificación de dos cadenas pesadas de dicho anticuerpo mediante la sustitución del dominio CH1 de cada cadena pesada por el dominio CL de dicho anticuerpo.

La "parte Fc" de un anticuerpo o proteína de unión a antígeno no participa directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, aunque es responsable de: a) la asociación de las cadenas de anticuerpo (modificadas) entre sí (por ejemplo mediante sus dominios CH3) y b) diversas funciones efectoras. Una "parte Fc de un anticuerpo" es una expresión bien conocida por el experto en la materia y definida basándose en el corte con papaína de los anticuerpos. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la región constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos o inmunoglobulinas se dividen en las clases: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y algunas de ellas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, IgA1 e IgA2. Según las regiones constantes de cadena pesada, las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ , and μ , respectivamente.

Existen cinco tipos de cadenas pesadas de anticuerpo de mamífero indicadas con las letras griegas: α , δ , ϵ , γ y μ (Janeway C.A. Jr. *et al.*, Immunobiology, 5a ed., Garland Publishing, 2001). El tipo de cadena pesada presente define la clase de anticuerpo; estas cadenas se encuentran en los anticuerpos IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente (Rhoades R.A. y Pflanzner R.G., Human Physiology, 4a ed., Thomson Learning, 2002). Las diferentes cadenas pesadas difieren en el tamaño y la composición; α y γ contienen aproximadamente 450 aminoácidos, mientras que μ y ϵ presentan aproximadamente 550 aminoácidos.

Cada cadena pesada presenta dos regiones: la región constante y la región variable. La región constante es idéntica en todos los anticuerpos del mismo isotipo pero difiere en anticuerpos de isotipo diferente. Las cadenas pesadas γ , α y δ presentan una región constante compuesta de tres dominios constantes CH1, CH2 y CH3 (en una línea), y una región bisagra para mayor flexibilidad (Woof J. y Burton D., Nat. Rev. Immunol. 4:89-99, 2004); las cadenas pesadas μ y ϵ presentan una región constante compuesta de cuatro dominios constantes: CH1, CH2, CH3 y CH4 (Janeway C.A. Jr. *et al.*, Immunobiology, 5a ed., Garland Publishing, 2001). La región variable de la cadena pesada difiere en anticuerpos producidos por diferentes células B, pero es la misma para todos los anticuerpos producidos por una única célula B o clon de células B. La región variable de cada cadena pesada presenta una longitud aproximada de 110 aminoácidos y está compuesta de un único dominio de anticuerpo.

Los "dominios CH de la parte Fc" son el dominio constante 2 de cadena pesada (CH2) de anticuerpo y el dominio constante 3 de cadena pesada (CH3) de anticuerpo, y opcionalmente el dominio constante 4 de cadena pesada (CH4) de anticuerpo en el caso de un anticuerpo de clase IgE.

- 5 La expresión "estando asociadas entre sí dichas cadenas pesadas modificadas mediante sus dominios CH de la parte Fc" se refiere al emparejamiento de dominios entre cadenas de los dominios constantes de cadena pesada (CH) de anticuerpo de las dos cadenas pesadas modificadas entre sí, por ejemplo los dos dominios CH3 de ambas cadenas entre sí mediante, por ejemplo, interacción iónica entre cadenas, interacción de van-der Waals o enlaces de hidrógeno (ver la fig. 1A). En una realización, dichas cadenas pesadas modificadas se asocian entre sí mediante por lo menos sus dominios CH3 de la parte Fc (y opcionalmente mediante sus dominios CH2, u opcionalmente mediante sus dominios CH2 y dominios CH4 (en caso de hallarse presentes)).

- 15 La expresión "en el que los dominios VL de las cadenas pesadas de a) están asociados a los dominios VH de las cadenas pesadas de b), y los dominios CH1 de las cadenas pesadas de a) están asociados a los dominios CL de las cadenas pesadas de b)" se refiere al emparejamiento de dominios de dichos dominios de anticuerpo (en todos los casos uno de a) y uno de b)), tal como se encuentran en, por ejemplo, los anticuerpos naturales (VL/VH y CH1/CL), por ejemplo mediante interacción iónica entre cadenas, interacción de van-der Waals, enlaces de hidrógeno o interacción de disulfuros (ver la fig. 1A).

- 20 La "proteína de unión a antígeno" según la invención comprende dos sitios de unión a antígeno y es bivalente. Las expresiones "sitio de unión" o "sitio de unión a antígeno" tal como se utilizan en la presente memoria se refiere a una o más regiones de una proteína de unión a antígeno según la invención a las que se une un ligando (por ejemplo el antígeno o un fragmento del mismo) y que se deriva de una molécula de anticuerpo o de un fragmento del mismo (por ejemplo un fragmento Fab). El sitio de unión a antígeno según la invención comprende dominios variables de cadena pesada (V_H) de anticuerpo y dominios variables de cadena ligera (V_L) de anticuerpo.

- 25 Los sitios de unión a antígeno (es decir, las parejas V_H/V_L) que se unen específicamente al antígeno deseado pueden derivarse de: a) anticuerpos conocidos del antígeno, o b) nuevos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo obtenidos mediante métodos de inmunización *de novo* utilizando, entre otros, la proteína antigénica o ácido nucleico o fragmentos de los mismos, o mediante expresión fágica.

- 35 Un sitio de unión a antígeno de una proteína de unión a antígeno de la invención contiene seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) que contribuye en grados variables a la afinidad del sitio de unión para el antígeno. Existen tres CDR de dominio variable de cadena pesada (CDRH1, CDRH2 y CDRH3) y tres CDR de dominio variable de cadena ligera (CDRL1, CDRL2 y CDRL3). La extensión de las regiones CDR y de marco (FRs) se determina mediante comparación con una base de datos compilada a partir de secuencias de aminoácidos en las que dichas regiones se han definido según la variabilidad entre secuencias.

- 40 La especificidad del anticuerpo se refiere al reconocimiento selectivo del anticuerpo para un epítipo particular de un antígeno. Los anticuerpos naturales, por ejemplo, son monoespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que presentan dos especificidades de unión a antígeno diferentes. Las proteínas de unión a antígeno según la invención son por lo menos monoespecíficas y se unen específicamente a un epítipo del antígeno respectivo.

- 45 El término "valente" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a la presencia de un número específico de sitios de unión en una molécula de anticuerpo. Un anticuerpo natural presenta, por ejemplo, dos sitios de unión y es bivalente. La proteína de unión a antígeno según la invención es como mínimo bivalente.

- 50 Las expresiones "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo de una única composición de aminoácidos.

- 55 La expresión "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo que comprende una región variable, es decir la región de unión, procedente de una fuente o especie, y por lo menos una parte de una región constante derivada de una fuente o especie diferente, habitualmente preparado mediante técnicas de ADN recombinante. Los anticuerpos quiméricos que comprenden una región variable murina y una región constante humana resultan preferentes. Otras formas preferentes de "anticuerpos quiméricos" comprendidas en la presente invención son aquellas en las que la región constante ha sido modificada o cambiada respecto a la del anticuerpo original para generar las propiedades según la invención, especialmente con respecto a la unión de C1q y/o a la unión de receptor Fc (FcR). Dichos anticuerpos quiméricos también se denominan "anticuerpos de clase intercambiada". Los anticuerpos quiméricos son el producto de genes de inmunoglobulina expresados que comprenden segmentos de ADN codificantes de regiones variables de inmunoglobulina y segmentos de ADN codificantes de regiones constantes de inmunoglobulina. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos implican técnicas convencionales de ADN recombinante y de

transfección génica bien conocidas de la técnica (ver, por ejemplo, Morrison, S.L. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855, 1985, y las patentes US nº 5.202.238 y nº 5.204.244).

La expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a anticuerpos en los que el marco o las "regiones determinantes de complementariedad" (CDR) han sido modificadas para que comprendan la CDR de una inmunoglobulina de especificidad diferente de la de la inmunoglobulina parental. En una realización preferente, se injerta una CDR murina en la región marco de un anticuerpo humano para preparar un "anticuerpo humanizado". Ver, por ejemplo, Riechmann, L. *et al.*, Nature 332:323-327, 1988, y Neuberger, M.S. *et al.*, Nature 314:268-270, 1985. Las CDR particularmente preferentes corresponden a aquéllas que representan secuencias que reconocen los anteriormente indicados antígenos de los anticuerpos quiméricos. Otras formas de "anticuerpos humanizados" comprendidas dentro de la presente invención son aquéllas en las que la región constante ha sido adicionalmente modificada o cambiada respecto a la del anticuerpo original para generar las propiedades según la invención, especialmente con respecto a la unión de C1q y/o a la del receptor de Fc (FcR).

La expresión "anticuerpo humano", tal como se utiliza en la presente memoria, pretende incluir anticuerpos que presentan regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos son bien conocidos del estado de la técnica (van Dijk, M.A. y van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5:368-374, 2001). También pueden producirse anticuerpos humanos en animales transgénicos (por ejemplo ratones) que sean capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo o una selección de anticuerpos humanos en ausencia de producción endógena de inmunoglobulinas. La transferencia de la serie génica de inmunoglobulinas de la línea germinal humana en dichos ratones mutantes para la línea germinal resultará en la producción de anticuerpos humanos tras el reto de antígeno (ver, por ejemplo, Jakobovits A. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551-2555, 1993; Jakobovits A. *et al.*, Nature 362:255-258, 1993; Brüggemann M. *et al.*, Year Immunol. 7:33-40, 1993). También pueden producirse anticuerpos humanos en bibliotecas de expresión fágica (Hoogenboom H.R. y Winter G., J. Mol. Biol. 227:381-388, 1992; Marks J.D. *et al.*, J. Mol. Biol. 222:581-597, 1991). Las técnicas de Cole *et al.* y de Boerner *et al.* también se encuentran disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, página 77, 1985; y Boerner P. *et al.*, J. Immunol. 147:86-95, 1991). Tal como se ha indicado para los anticuerpos quiméricos y humanizados según la invención, la expresión "anticuerpo humano" tal como se utiliza en la presente memoria también comprende anticuerpos modificados en la región constante para generar las propiedades según la invención, especialmente con respecto a la unión de C1q y/o a la unión de FcR, por ejemplo mediante "intercambio de clase", es decir, el cambio o la mutación de partes de Fc (por ejemplo de IgG1 a IgG4 y/o la mutación IgG1/IgG4).

La expresión "anticuerpo recombinante humano", tal como se utiliza en la presente memoria, pretende incluir todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos aislados de una célula huésped, tal como una célula NS0 ó CHO, o de un animal (por ejemplo un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana o para anticuerpos expresados utilizando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped. Dichos anticuerpos recombinantes humanos presentan regiones variables y constantes en una forma reorganizada. Los anticuerpos recombinantes humanos según la invención han sido sometidos a hipermutación somática *in vivo*. De esta manera, las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivadas y relacionadas con secuencias V_H y V_L de la línea germinal humana, pueden no existir naturalmente en el repertorio *in vivo* de anticuerpos de la línea germinal humana.

La expresión "dominio variable" (dominio variable de una cadena ligera (VL), región variable de una cadena pesada (VH)) tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cada cadena de la pareja de cadenas ligera y pesada que participa directamente en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios de las cadenas variables ligeras y pesadas humanas presentan la misma estructura general y cada dominio comprende cuatro regiones marco (FR) cuyas secuencias se encuentran ampliamente conservadas y conectadas por tres "regiones hipervariables" (o regiones determinantes de complementariedad, CDR). Las regiones marco adoptan una conformación de hoja β y las CDR pueden formar bucles que conectan la estructura de hojas β. Las CDR en cada cadena son mantenidas en su estructura tridimensional por las regiones de marco y forman conjuntamente con las CDR de la otra cadena el sitio de unión de antígeno. Las regiones CDR3 de las cadenas pesada y ligera de anticuerpo desempeñan un papel particularmente importante en la especificidad/afinidad de unión de los anticuerpos según la invención y, por lo tanto, proporcionan un objetivo adicional de la invención.

Las expresiones "región hipervariable" o "parte de unión a antígeno de un anticuerpo", tal como se utilizan en la presente memoria se refieren a los residuos aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable comprende residuos aminoácidos de las "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR". Las regiones "de marco" o "FR" son aquellas regiones de dominio variable diferentes de los residuos de la región hipervariable tal como se definen en la presente memoria. Por lo tanto, las cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo comprenden, de extremo N-terminal a extremo C-terminal, los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Las CDR en cada cadena se encuentran separadas por dichos aminoácidos

de marco. En particular, la CDR3 de la cadena pesada es la región que contribuye más a la unión de antígeno. Las regiones CDR y FR se determinan según la definición estándar de Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a edición, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “de unión” o “de unión específica” se refiere a la unión del anticuerpo a un epítipo del antígeno en un ensayo *in vitro*, preferentemente en un ensayo de resonancia de plasmón (BIAcore, GE-Healthcare, Uppsala, Suecia) con antígeno de tipo salvaje purificado. La afinidad de unión está definida por los términos k_a (constante de velocidad para la asociación del anticuerpo del complejo de anticuerpo/antígeno), k_D (constante de disociación) y K_D (k_D/k_a). Las expresiones “unión” o “unión específica” se refieren a una afinidad de unión (K_D) de 10^{-8} moles/l o inferior (por ejemplo de entre 10^{-8} M y 10^{-13} moles/l), preferentemente de entre 10^{-8} M y 10^{-13} moles/l. De esta manera, una proteína de unión a antígeno según la invención se une específicamente a cada antígeno para el que es específica con una afinidad de unión (K_D) de 10^{-8} moles/l o inferior (por ejemplo de entre 10^{-8} M y 10^{-13} moles/l), preferentemente de entre 10^{-9} M y 10^{-13} moles/l.

15 La unión de la proteína de unión a antígeno a FcγRIII puede investigarse mediante un ensayo BIAcore (GE-Healthcare Uppsala, Suecia). La afinidad de la unión está definida por los términos k_a (constante de velocidad para la asociación del anticuerpo del complejo de anticuerpo/antígeno), k_D (constante de disociación) y K_D (k_D/k_a).

20 El término “epítipo” incluye cualquier determinante polipéptido capaz de unirse específicamente a una proteína de unión a antígeno. En determinadas realizaciones, el determinante epítipo incluye grupos superficiales químicamente activos de moléculas, tales como aminoácidos, cadenas laterales sacáridas, fosforilo o sulfonilo y, en determinadas realizaciones, puede presentar características estructurales tridimensionales específicas, o presentar características de carga específicas. Un epítipo es una región de un antígeno que se une a una proteína de unión a antígeno.

25 En determinadas realizaciones, se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno en el caso de que reconozca preferentemente su antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas.

La expresión “región constante” tal como se utiliza en las presentes solicitudes se refiere a la suma de los dominios de un anticuerpo que no son la región variable. La región constante no se encuentra directamente implicada en la unión de un antígeno, aunque muestra diversas funciones efectoras. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la región constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos se dividen en las clases (también denominadas isotipos) siguientes: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de ellas pueden dividirse adicionalmente en subclases (también denominadas isotipos), tales como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, IgA1 e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las regiones constantes de cadena ligera (CL) que pueden encontrarse en la totalidad de las cinco clases de anticuerpo se denominan κ (kappa) y λ (lambda).

La expresión “región constante derivada de origen humano” tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a una región constante de cadena pesada de un anticuerpo humano de la subclase IgG1, IgG2, IgG3 ó IgG4 y/o una región constante de cadena ligera kappa o lambda. Dichas regiones constantes son bien conocidas del estado de la técnica y se describen en, por ejemplo, Kabat E.A. (ver, por ejemplo, Johnson, G. y Wu, T.T., Nucleic Acids Res. 28:214-218, 2000; Kabat E.A. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72:2785-2788, 1975).

La expresión “citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)” se refiere a un proceso iniciado por la unión del factor del complemento C1q a la parte Fc de la mayoría de subclases de anticuerpo IgG. La unión de C1q a un anticuerpo está provocada por interacciones proteína-proteína definidas en el denominado sitio de unión. Dichos sitios de unión de la parte Fc son conocidos del estado de la técnica (ver anteriormente). Dichos sitios de unión de la parte Fc se caracterizan, por ejemplo, por los aminoácidos L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y P329 (numeración según el índice EU de Kabat). Los anticuerpos de las subclases IgG1, IgG2 e IgG3 habitualmente muestran activación del complemento, incluyendo la unión de C1q y C3, mientras que IgG4 no activa el sistema del complemento y no se une a C1q y/o a C3.

Aunque los anticuerpos de la subclase IgG4 muestran un nivel reducido de unión al receptor de Fc (FcγRIIIa), los anticuerpos de otras subclases de IgG muestran una unión fuerte. Sin embargo, Pro238, Asp265, Asp270, Asn297 (pérdida del carbohidrato de Fc), Pro329, Leu234, Leu235, Gly236, Gly237, Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 e His435 son residuos que, en caso de alterarse, también proporcionan un nivel reducido de unión de Fc (Shields R.L. *et al.*, J. Biol. Chem. 276:6591-6604, 2001; Lund J. *et al.*, FASEB J. 9:115-119, 1995; Morgan A. *et al.*, Immunology 86:319-324, 1995; patente EP nº 0 307 434).

60 En una realización, un anticuerpo según la invención presenta un nivel reducido de unión a FcR en comparación con un anticuerpo IgG1 y el anticuerpo parental de longitud completa presenta un nivel reducido de unión a FcR de la subclase IgG4 o de la subclase IgG1 o IgG2 con una mutación en S228, L234, L235 y/o D265, y/o contiene la mutación PVA236. En una realización, las mutaciones en el anticuerpo parental de longitud completa son S228P,

L234A, L235A, L235E y/o PVA236. En otra realización, las mutaciones en el anticuerpo parental de longitud completa son, en IgG4, S228P y L235E, y en IgG1, L234A y L235A.

La región constante de un anticuerpo participa directamente en la ADCC (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos) y la CDC (citotoxicidad dependiente del complemento). La activación del complemento (CDC) se inicia a partir de la unión del factor del complemento C1q a la región constante de la mayoría de subclases de anticuerpo IgG. La unión de C1q a un anticuerpo está provocada por interacciones proteína-proteína definidas en el denominado sitio de unión. Dichos sitios de unión de región constante son conocidos del estado de la técnica y se describen en, por ejemplo, Lukas T.J. *et al.*, J. Immunol. 127:2555-2560, 1981; Bunkhouse R. y Cobra J.J., Mol. Immunol. 16:907-917, 1979; Burton D.R. *et al.*, Nature 288:338-344, 1980; Thomason J.E. *et al.*, Mol. Immunol. 37:995-1004, 2000; Idicies E.E. *et al.*, J. Immunol. 164:4178-4184, 2000; Hearer M. *et al.*, J. Virol. 75:12161-12168, 2001; Morgan A. *et al.*, Immunology 86:319-324, 1995, y la patente EP nº 0 307 434. Dichos sitios de unión de región constante se caracterizan, por ejemplo, por los aminoácidos L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y P329 (numeración según el índice EU de Kabat, descrita en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991).

La expresión "citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)" se refiere a la lisis de células diana humanas por un anticuerpo según la invención en presencia de células efectoras. La ADCC se mide preferentemente mediante el tratamiento de una preparación de células expresantes de antígeno con un anticuerpo según la invención en presencia de células efectoras, tales como las PBMC recién aisladas o células efectoras purificadas a partir de capas leucocitarias, por ejemplo monocitos o células asesinas naturales (NK) o una línea celular de NK de crecimiento continuo.

Inesperadamente se ha encontrado que una proteína de unión a antígeno según la invención muestra propiedades de ADCC mejorada en comparación con su anticuerpo parental de longitud completa, especialmente en la región de las concentraciones de anticuerpo más altas. Estos efectos de ADCC mejorada se consiguen sin modificación adicional de la parte Fc, tal como la glucomanipulación.

De esta manera, en una realización las proteínas de unión a antígeno según la invención presentan una ADCC mejorada (medida tal como se indica en el Ejemplo 4) en comparación con su anticuerpo parental de longitud completa.

En mamíferos sólo existen dos tipos de cadena ligera, denominados lambda (λ) y kappa (κ). Una cadena ligera presenta dos dominios sucesivos: un dominio constante CL y un dominio variable VL. La longitud aproximada de una cadena ligera es de entre 211 y 217 aminoácidos. Preferentemente, la cadena ligera es una cadena ligera kappa (κ) y el dominio constante CL preferentemente se deriva de una cadena ligera kappa (κ) (el dominio constante C κ).

Las funciones efectoras mediadas por células de los anticuerpos monoclonales pueden potenciarse adicionalmente, por ejemplo, mediante la manipulación de su componente oligosacárido, tal como se describe en Umana P. *et al.*, Nature Biotechnol. 17:176-180, 1999, y la patente US nº 6.602.684. Los anticuerpos de tipo IgG1, los anticuerpos terapéuticos utilizados más habitualmente, son glucoproteínas que presentan un sitio N-ligado de glucosilación conservado en Asn297 en cada dominio CH2. Los dos oligosacáridos complejos biantenarios unidos a Asn297 se encuentran enterrados entre los dominios CH2, formando contactos extensivos con el esqueleto polipeptídico, y su presencia resulta esencial para que el anticuerpo medie en funciones efectoras, tales como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (Lifely M. R. *et al.*, Glycobiology 5:813-822, 1995; Jefferis R. *et al.*, Immunol. Rev. 163:59-76, 1998; Wright A. y Morrison S.L., Trends Biotechnol. 15 (1997) 26-32). Umana, P. *et al.* Nature Biotechnol. 17:176-180, 1999, y el documento nº WO 99/54342 mostraron que la sobreexpresión en células de ovario de hámster chino (CHO) de la β (1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III ("GnTIII"), una glucosiltransferasa que cataliza la formación de oligosacáridos bisectados, incrementaba significativamente la actividad de ADCC *in vitro* de los anticuerpos. Las alteraciones en la composición del carbohidrato de Asn297 o su eliminación también afecta a la unión a Fc γ R y a C1q (Umana P. *et al.*, Nature Biotechnol. 17:176-180, 1999; Davies J. *et al.*, Biotechnol. Bioeng. 74:288-294, 2001; Mimura Y. *et al.*, J. Biol. Chem. 276:45539-45547, 2001; Radaev S. *et al.*, J. Biol. Chem. 276:16478-16483, 2001; Shields R.L. *et al.*, J. Biol. Chem. 276:6591-6604, 2001; Shields R.L. *et al.*, J. Biol. Chem. 277:26733-26740, 2002; Simmons L.C. *et al.*, J. Immunol. Methods 263:133-147, 2002).

En un aspecto de la invención, la proteína de unión a antígeno según la invención se caracteriza porque los dominios CH2 de las partes Fc de a) y b) son del isotipo IgG1 y la proteína de unión a antígeno se encuentra afucosilada, con una cantidad de fucosa de 80% o menos de la cantidad total de oligosacáridos (azúcares) en Asn297.

En una realización, la proteína de unión a antígeno se encuentra afucosilada, con una cantidad de fucosa de entre 65% y 5% de la cantidad total de oligosacáridos (azúcares) en Asn297.

La expresión "proteína de unión a antígeno afucosilado" se refiere a proteínas de unión a antígeno de isotipo IgG1 o IgG3 (preferentemente de isotipo IgG1) que presentan un patrón alterado de glucosilación en la región Fc en Asn297, presentando un nivel reducido de residuos de fucosa. La glucosilación de la IgG1 o IgG3 humana se produce en Asn297 en forma de glucosilación del complejo biantenarico fucosilado terminado en hasta 2 residuos Gal. Estas estructuras se denominan residuos glicano G0, G1 (α 1,6 o α 1,3) o G2, dependiendo de la cantidad de residuos Gal terminales (Raju T.S., *BioProcess Int.* 1 (2003) 44-53). La glucosilación de tipo CHO de las partes Fc de anticuerpo se describe en, por ejemplo, Routier F.H., *Glyconjugate J.* 14:201-207, 1997. Los anticuerpos que se expresan recombinantemente en células huésped CHO no glucomodificadas habitualmente se encuentran fucosiladas en Asn297 en una proporción de por lo menos 85%. Debe entenderse que la expresión "proteína de unión a antígeno" tal como se utiliza en la presente memoria incluye una proteína de unión a antígeno que no presenta fucosa en su patrón de glucosilación. Es comúnmente conocido que la posición típica de residuo glucosilado en un anticuerpo es la asparagina en la posición 297 según el sistema de numeración de EU ("Asn297").

De esta manera, una proteína de unión a antígeno afucosilada según la invención se refiere a una proteína de unión a antígeno de isotipo IgG1 o IgG3 (preferentemente de isotipo IgG1) en el que la cantidad de fucosa es de 80% o inferior (por ejemplo de entre 80% y 1%) de la cantidad total de oligosacáridos (azúcares) en Asn297 (lo que implica que por lo menos 20% o más de los oligosacáridos de la región Fc en Asn297 se encuentran afucosilados). En una realización, la cantidad de fucosa es de 65% o inferior (por ejemplo de entre 65% y 1%); en una realización es de entre 65% y 5%; en una realización es de entre 40% y 20% de los oligosacáridos de la región Fc en Asn297. Según la invención, la expresión "cantidad de fucosa" se refiere a la cantidad de dichos oligosacáridos (fucosas) dentro de la cadena oligosacárida (sacárida) en Asn297, relacionada con la suma de todos los oligosacáridos (azúcares) unidos a Asn297 (por ejemplo estructuras complejas, híbridas y ricas en manosa) medida mediante espectrometría de masas MALDI-TOF y calculada como valor promedio (para un procedimiento detallado para determinar la proporción de fucosa, ver, por ejemplo, el documento n° WO 2008/077546). Además, en una realización, los oligosacáridos de la región Fc preferentemente son bisectados.

La proteína de unión a antígeno afucosilada según la invención puede expresarse en una célula huésped glucomodificada que ha sido manipulada para expresar por lo menos un ácido nucleico codificante de un polipéptido que presenta actividad de GnTIII en una cantidad suficiente para fucosilar parcialmente los oligosacáridos en la región Fc. En una realización, el polipéptido que presenta actividad de GnTIII es un polipéptido de fusión. Alternativamente, puede reducirse o eliminarse la actividad de α 1,6-fucosiltransferasa de la célula huésped según la patente US n° 6.946.292 para generar células huésped glucomodificadas. La cantidad de fucosilación de la proteína de unión a antígeno puede encontrarse predeterminada, por ejemplo por las condiciones de la fermentación (por ejemplo el tiempo de fermentación) o por la combinación de por lo menos dos proteínas de unión a antígeno con diferente cantidad de fucosilación. Dichos métodos para generar proteínas de unión a antígeno afucosiladas se describen en los documentos n° WO 2005/044859, n° 2004/065540 y n° 2007/031875, y en Umana P. *et al.*, *Nature Biotechnol.* 17:176-180, 1999, y en los documentos n° WO 99/154342, n° WO 2005/018572, n° WO 2006/116260, n° WO 2006/114700, n° WO 2005/011735, n° WO 2005/027966, n° WO 97/028267, n° US 2006/0134709, n° US 2005/0054048, n° US 2005/0152894, n° WO 2003/035835 y n° WO 2000/061739. Estas proteínas de unión a antígeno glucomanipuladas según la invención presentan una ADCC incrementada (en comparación con las proteínas de unión a antígeno parentales). Otros métodos de glucomanipulación que proporcionan proteínas de unión a antígeno afucosiladas según la invención se describen en, por ejemplo, Niwa R. *et al.*, *J. Immunol. Methods* 306:151-160, 2005; Shinkawa T. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 278:3466-3473, 2003; documentos n° WO 03/055993 o n° US 2005/0249722.

De esta manera, un aspecto de la invención es una proteína de unión a antígeno afucosilada según la invención que es del isotipo IgG1 o IgG3 (preferentemente de isotipo IgG1) con una cantidad de fucosa de 60% o inferior (por ejemplo de entre 60% y 1%) de la cantidad total de oligosacáridos (sacáridos) en Asn297.

De esta manera, un aspecto de la invención es una proteína de unión a antígeno afucosilada según la invención que es del isotipo IgG1 o IgG3 (preferentemente de isotipo IgG1) con una cantidad de fucosa de 60% o inferior (por ejemplo de entre 60% y 1%) de la cantidad total de oligosacáridos (sacáridos) en Asn297 para el tratamiento del cáncer.

Otro aspecto de la invención es la utilización de una proteína de unión a antígeno afucosilada según la invención que es del isotipo IgG1 o IgG3 (preferentemente de isotipo IgG1) con una cantidad de fucosa del 60% o inferior respecto de la cantidad total de oligosacáridos (azúcares) en Asn297, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento del cáncer.

En una realización, la cantidad de fucosa es de entre 60% y 20% de la cantidad total de oligosacáridos (azúcares) en Asn297. En una realización, la cantidad de fucosa es de entre 60% y 40% de la cantidad total de oligosacáridos (azúcares) en Asn297. En una realización, la cantidad de fucosa es de 0% la cantidad total de oligosacáridos (azúcares) en Asn297.

El "sistema de numeración de EU" o "índice EU" generalmente se utiliza en referencia a un residuo en una región contante de cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo el índice EU informado en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a edición, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991).

La expresión "las cadenas sacáridas muestran características de glicanos N-ligados unidos a Asn297 de un anticuerpo expresado recombinantemente en una célula CHO" se refiere a que la cadena sacárida en Asn297 del anticuerpo parental de longitud completa según la invención presenta la misma estructura y secuencia de residuos sacáridos, excepto por el residuo fucosa, que los del mismo anticuerpo expresado en células CHO no modificadas, por ejemplo que las células de las que se informa en el documento nº WO 2006/103100.

El término "NGNA" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere al residuo sacárido del ácido N-glucolilneuramínico.

La glucosilación de IgG1 o IgG3 humana se produce en Asn297 en forma de glucosilación nuclear de oligosacárido complejo biantenarico fucosilado terminado en, como máximo, dos residuos Gal. Las regiones constantes de cadena pesada humana de la subclase IgG1 o IgG3 se informan en detalle en Kabat E.A. *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª edición, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991, y en Brueggemann M. *et al.*, J. Exp. Med. 166:1351-1361, 1987; Love T.W. *et al.*, Methods Enzymol. 178 (1989) 515-527. Estas estructuras se denominan G0, G1 (α -1,6- o α -1,3-) o residuos glicanos G2, dependiendo de la cantidad de residuos Gal terminales (Raju T.S., Bioprocess Int. 1 (2003) 44-53). La glucosilación de tipo CHO de partes Fc de anticuerpo se describe en, por ejemplo, Routier, F.H., Glyconjugate J. 14:201-207, 1997. Los anticuerpos que se expresan recombinantemente en células CHO huésped no glucomodificadas habitualmente se encuentran fucosiladas en Asn297 en una proporción de por lo menos 85%. Los oligosacáridos modificados del anticuerpo parental de longitud completa pueden ser híbridos o complejos. Preferentemente, los oligosacáridos bifurcados, reducidos/no fucosilados son híbridos. En otra realización, los oligosacáridos bifurcados reducidos/no fucosilados son complejos.

Según la invención, la expresión "cantidad de fucosa" se refiere a la cantidad de dicho azúcar en la cadena sacárida en Asn297, referida a la suma de todas las glucoestructuras unidas a Asn297 (por ejemplo estructuras complejas, híbridas y de alto contenido en manosa) según medición realizada mediante espectrometría de masas MALDI-TOF y calculado como valor medio. La cantidad relativa de fucosa es el porcentaje de estructuras que contienen fucosa en relación a la totalidad de las glucoestructuras identificadas en una muestra tratada con N-glucosidasa F (por ejemplo estructuras complejas, híbridas y estructuras de bajo y alto contenido en manosa, respectivamente) según el MALDI-TOF.

El anticuerpo según la invención se produce por medios recombinantes. De esta manera, un aspecto de la presente invención es un ácido nucleico codificante del anticuerpo según la invención, y un aspecto adicional es una célula que comprende dicho ácido nucleico codificante de un anticuerpo según la invención. Los métodos para la producción recombinante son ampliamente conocidos del estado de la técnica y comprende la expresión de proteínas en células procarióticas y eucarióticas con el aislamiento posterior del anticuerpo y habitualmente la purificación hasta una pureza farmacéuticamente aceptable. Para la expresión de los anticuerpos tal como se ha indicado anteriormente en una célula huésped, se insertan ácidos nucleicos codificantes de las cadenas ligeras y pesadas modificadas respectivas en los vectores de expresión mediante métodos estándares. La expresión se lleva a cabo en células huésped procarióticas o eucarióticas apropiadas, tales como células CHO, células NS0, células SP2/0, células HEK293, células COS, células PER.C6, levaduras o células de *E. coli*, y el anticuerpo se recupera de las células (del sobrenadante o de la parte celular tras la lisis). Los métodos generales para la producción recombinante de anticuerpos son bien conocidos del estado de la técnica y se describen, por ejemplo, en los artículos de revisión de Makrides, S.C., Protein Expr. Purif. 17:183-202, 1999; Geisse, S. *et al.*, Protein Expr. Purif. 8:271-282, 1996; Kaufman, R.J., Mol. Biotechnol. 16:151-161, 2000; Werner, R.G., Drug Res. 48 (1998) 870-880.

Las proteínas de unión a antígeno según la invención convenientemente se separan del medio de cultivo mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas tales como, por ejemplo, proteína A-sefarosa, cromatografía en hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad. El ADN y ARN codificante de los anticuerpos monoclonales se aísla y se secuencia mediante procedimientos convencionales. Las células de hibridoma pueden servir como fuente de dicho ADN y ARN. Tras el aislamiento, el ADN puede insertarse en vectores de expresión, que seguidamente se transfectan en células huésped, tales como células HEK 293, células CHO o células de mieloma que de otra manera no producirían proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales recombinantes en las células huésped.

Las variantes (o mutantes) de la secuencia de aminoácidos de la proteína de unión a antígeno se preparan mediante la introducción de cambios nucleótidos apropiados en el ADN del anticuerpo, o mediante síntesis de nucleótidos.

Sin embargo, estas modificaciones únicamente pueden llevarse a cabo bajo condiciones muy limitadas, por ejemplo tal como se ha indicado anteriormente. Por ejemplo, las modificaciones que no alteran las características anteriormente indicadas del anticuerpo, tal como el isotipo y la unión de antígeno del IgG pero que podrían mejorar el rendimiento de la producción recombinante, la estabilidad de la proteína o facilitar la purificación.

La expresión "célula huésped" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a cualquier tipo de sistema celular que puede manipularse para generar los anticuerpos según la presente invención. En una realización, se utilizan células HEK293 y CHO como células huésped. Tal como se utilizan en la presente memoria, las expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se utilizan intercambiabilmente y todas dichas expresiones incluyen la progenie. De esta manera, las expresiones "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula sujeto primario y los cultivos derivados de la misma con independencia del número de transferencias. También debe interpretarse que toda la progenie puede no ser exactamente idéntica en su contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o naturales. Se encuentra incluida la progenie variante que presenta la misma función o actividad biológica según el cribado realizado en la célula originalmente transformada.

La expresión en células NS0 se describe en, por ejemplo, Barnes L.M. *et al.*, Cytotechnology 32:109-123, 2000; Barnes L.M. *et al.*, Biotech. Bioeng. 73:261-270, 2001. La expresión transitoria se describe en, por ejemplo, Durocher Y. *et al.*, Nucl. Acids Res. 30:E9, 2002. La clonación de dominios variables se describe en Orlandi, R. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:3833-3837, 1989; Carter, P. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285-4289, 1992, y en Norderhaug, L. *et al.*, J. Immunol. Methods 204:77-87, 1997. Un sistema de expresión transitoria preferente (HEK293) se describe en Schlaeger, E.-J. y Christensen, K., Cytotechnology 30:71-83, 1999, y en Schlaeger, E.-J., J. Immunol. Methods 194:191-199, 1996.

Entre las secuencias de control que resultan adecuadas para los procariotas se incluyen, por ejemplo, un promotor, opcionalmente una secuencia de operador, y un sitio de unión ribosómica. Es conocido que las células eucarióticas utilizan promotores, intensificadores y señales de poliadenilación.

Un ácido nucleico se encuentra "operablemente ligado" en el caso de que se encuentre situado en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el ADN de una presecuencia o líder secretorio se encuentra operablemente ligado a ADN de un polipéptido en el caso de que se exprese en forma de una preproteína que participe en la secreción del polipéptido; un promotor o intensificador se encuentra operablemente ligado a una secuencia codificante en el caso de que afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión ribosómica se encuentra operablemente ligado a una secuencia codificante en el caso de que se encuentre situado de manera que facilite la traducción. Generalmente, la expresión "operablemente ligado" se refiere a que las secuencias de ADN que se unen son contiguas y, en el caso de un líder secretorio, a que son contiguas y se encuentran en el mismo marco de lectura. Sin embargo, los intensificadores no son necesariamente contiguos. La unión se lleva a cabo mediante ligación en sitios de restricción apropiados. En el caso de que dichos sitios no existan, se utilizan adaptadores oligonucleótidos sintéticos o conector según la práctica convencional.

La purificación de las proteínas de unión a antígeno se lleva a cabo con el fin de eliminar los componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo otros ácidos nucleicos o proteínas celulares (por ejemplo productos secundarios de la fig. 1B), mediante técnicas estándares, incluyendo el tratamiento alcalino/de SDS, la formación de bandas en CsCl, la cromatografía de columna, la electroforesis en gel de agarosa, y otras técnicas bien conocidas de la técnica (ver Ausubel, F. *et al.*, editor, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York, 1987). Una serie de diferentes métodos se encuentran bien establecidos y son ampliamente utilizados para la purificación de proteínas, tales como la cromatografía de afinidad con proteínas microbianas (por ejemplo la cromatografía de afinidad de proteína A o de proteína G), la cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo de intercambio catiónico (resinas carboximetilo), de intercambio aniónico (resinas aminoetilo) y de intercambio de modo mixto), la adsorción tiofílica (por ejemplo con beta-mercaptoetanol y con otros ligandos de SH), la cromatografía de interacción hidrofóbica o de adsorción aromática (por ejemplo con fenil-sefarosa, resinas aza-arenofílicas o ácido m-aminofenilborónico), la cromatografía de afinidad de quelato metálico (por ejemplo con material de afinidad por el Ni(II) y por el Cu(II)), la cromatografía de exclusión por tamaño, y métodos electroforéticos (tales como la electroforesis en gel y la electroforesis capilar) (Vijayalakshmi, M.A., Appl. Biochem. Biotech. 75:93-102, 1998). Se describe un ejemplo de una purificación en el Ejemplo 1 y en las figuras correspondientes.

Un aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende una proteína de unión a antígeno según la invención. Otro aspecto de la invención es la utilización de una proteína de unión a antígeno según la invención para la preparación de una composición farmacéutica. Un aspecto adicional de la invención es un método para la preparación de una composición farmacéutica que comprende una proteína de unión a antígeno según la invención. En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición, por ejemplo una composición farmacéutica, que contiene una proteína de unión a antígeno según la presente invención, formulada conjuntamente con un portador farmacéutico.

Una realización de la invención es la proteína de unión a antígeno según la invención para el tratamiento del cáncer.

Otro aspecto de la invención es dicha composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer.

- 5 Una realización de la invención es la proteína de unión a antígeno según la invención para la utilización en el tratamiento del cáncer.

Otro aspecto de la invención es la utilización de una proteína de unión a antígeno según la invención para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento del cáncer.

- 10 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "portador farmacéutico" incluye cualquiera y la totalidad de los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retraso de la absorción y similares que son fisiológicamente compatibles. Preferentemente, el portador resulta adecuado para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo mediante inyección o infusión).

- 15 Una composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse mediante una diversidad de métodos conocidos de la técnica. Tal como apreciará el experto en la materia, la vía y/o modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Para administrar un compuesto de la invención mediante determinadas vías de administración, puede resultar necesario recubrir el compuesto con un material, o coadministrar el compuesto con un material, para impedir su inactivación. Por ejemplo, el compuesto puede administrarse en un sujeto en un portador apropiado, por ejemplo liposomas o un diluyente. Entre los diluyentes farmacéuticamente aceptables se incluyen solución salina y soluciones tamponadoras acuosas. Entre los portadores farmacéuticos se incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. La utilización de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocida de la técnica.

- 20 Las expresiones "administración parenteral" y "administrado parenteralmente" tal como se utilizan en la presente memoria se refieren a modos de administración diferentes de la administración entérica y tópica, habitualmente mediante inyección, e incluyen, sin limitarse a las mismas, las inyecciones e infusiones intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal.

- 35 El término "cáncer" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a enfermedades proliferativas, tales como linfomas, leucemias linfocíticas, cáncer de pulmón, cáncer de células pulmonares no pequeñas (CPNP), cáncer pulmonar de células bronquioloalveolares, cáncer óseo, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer uterino, cáncer ovárico, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer uterino, carcinoma de los tubos de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cérvix, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de la glándula adrenal, sarcoma del tejido blando, cáncer de uretra, cáncer de pene, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de tiñón o uretra, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, mesotelioma, cáncer hepatocelular, cáncer biliar, neoplasma del sistema nervioso central (SNC), tumores del eje espinal, glioma del tallo cerebral, glioblastoma multiforme, astrocitomas, schwannomas, ependinomas, meduloblastomas, meningiomas, carcinomas de células escamosas, adenoma pituitario y sarcoma de Ewings, incluyendo las versiones refractarias de cualquiera de los cánceres anteriormente indicados, o de una combinación de uno o más de los cánceres anteriormente indicados.

- 50 Dichas composiciones también pueden contener adyuvantes, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos puede garantizarse tanto mediante procedimientos de esterilización, *supra*, como mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabén, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También puede resultar deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico y similares en las composiciones. Además, puede conseguirse la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

- 60 Con independencia de la vía de administración seleccionada, los compuestos de la presente invención, que pueden utilizarse en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables mediante métodos convencionales conocidos por el experto en la materia.

Los niveles reales de las dosis de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden modificarse de manera que se obtenga una cantidad del ingrediente activo que resulte eficaz para

conseguir la respuesta terapéutica deseada en un paciente, composición y modo de administración particulares, sin resultar tóxicos para el paciente. El nivel de dosis seleccionado dependerá de una diversidad de factores farmacocinéticos, incluyendo la actividad de las composiciones particulares de la presente invención utilizadas, la vía de administración, el momento de la administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se utiliza, la duración del tratamiento, otros fármacos, los compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares utilizadas, la edad, sexo, peso, condición, estado de salud general e historia médica del paciente bajo tratamiento, y factores similares bien conocidos de la técnica médica.

La composición debe ser estéril y líquida en grado suficiente para que la composición resulte administrable mediante jeringa. Además de agua, el portador preferentemente es una solución salina tamponada isotónica.

Puede mantenerse la fluidez correcta, por ejemplo mediante la utilización de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento de un tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión, y mediante la utilización de surfactantes. En muchos casos, resulta preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares, polialcoholes, tales como manitol o sorbitol, y cloruro sódico en la composición.

Tal como se utilizan en la presente memoria, las expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se utilizan intercambiamente y todas dichas expresiones incluyen la progenie. De esta manera, las expresiones "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula sujeto primario y los cultivos derivados de la misma con independencia del número de transferencias. También debe interpretarse que toda la progenie puede no ser exactamente idéntica en su contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o naturales. Se encuentra incluida la progenie variante que presenta la misma función o actividad biológica según el cribado realizado en la célula originalmente transformada. En donde se pretendan utilizar denominaciones diferentes, éstas resultarán evidentes a partir del contexto.

El término "transformación" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un procedimiento de transferencia de un vector/ácido nucleico al interior de una célula huésped. En el caso de que se utilicen células sin grandes barreras de pared celular a modo de células huésped, la transfección se lleva a cabo mediante, por ejemplo, el método de precipitación con fosfato de calcio, tal como se describe en Graham y van der Eb, *Virology* 52:546, 1978. Sin embargo, también pueden utilizarse otros métodos para introducir ADN en células, tales como la inyección nuclear o la fusión de protoplastos. En el caso de que se utilicen células procarióticas o células que contengan construcciones sustanciales de pared celular, un método de transfección es, por ejemplo, el tratamiento de calcio utilizando cloruro de calcio tal como se describe en Cohen F.N. *et al.*, *PNAS* 69:7110, 1972.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "expresión" se refiere al procedimiento por el que se transcribe un ácido nucleico en ARNm y/o al procedimiento por el que el ARNm transcrito (también denominado "transcrito") se traduce posteriormente en péptidos, polipéptidos o proteínas. Los transcritos y los polipéptidos codificados se denominan colectivamente "producto génico". En el caso de que se derive el polinucleótido de ADN genómico, la expresión en una célula eucariótica puede incluir el procesamiento del ARNm.

Un "vector" es una molécula de ácidos nucleicos, en particular autorreplicativa, que transfiere una molécula de ácidos nucleicos insertada al interior de células huésped y/o entre las mismas. El término incluye vectores que funcionan principalmente insertando ADN o ARN en una célula (por ejemplo la integración cromosómica), la replicación de vectores que funcionan principalmente replicando ADN o ARN, y los vectores de expresión que funcionan transcribiendo y/o traduciendo ADN o ARN. También se encuentran incluidos los vectores que proporcionan más de una de las funciones anteriormente descritas.

Un "vector de expresión" es un polinucleótido que, al introducirlo en una célula huésped apropiada, puede transcribirse y traducirse en un polipéptido. Un "sistema de expresión" habitualmente se refiere a una célula huésped adecuada que comprende un vector de expresión que puede funcionar rindiendo un producto de expresión deseado.

Los ejemplos, listado de secuencias y figuras siguientes se proporcionan con el fin de ayudar a comprender la presente invención, el alcance real de la cual se proporciona en las reivindicaciones adjuntas.

Descripción de las secuencias de aminoácidos

SEC ID nº 1	dímero MoAb c-Met 5D5 ("CH3-wt") - cadena pesada modificada a) VL-CH1-CH2-CH3
SEC ID nº 2	dímero MoAb c-Met 5D5 ("CH3-wt") - cadena pesada modificada b) VH-CL-CH2-CH3
SEC ID nº 3	dímero MoAb IGF1R AK18 ("CH3-wt") - cadena pesada modificada a) VL-CH1-CH2-CH3
SEC ID nº 4	dímero MoAb IGF1R AK18 ("CH3-wt") - cadena pesada modificada b) VH-CL-CH2-CH3
SEC ID nº 5	dímero MoAb Her3 205 ("CH3-wt") - cadena pesada modificada a) VL-CH1-CH2-CH3
SEC ID nº 6	dímero MoAb Her3 ("CH3-wt") - cadena pesada modificada b) VH-CL-CH2-CH3
SEC ID nº 7	dímero MoAb IGF1R AK18 - cadena pesada modificada a) VL-CH1-CH2-CH3 con IgA-CH3

SEC ID nº 8 dímero MoAb IGF1R AK18 - cadena pesada modificada b) VH-CL-CH2-CH3 con Dominio CH3 de IgA

Procedimiento experimental

- 5 A. Materiales y métodos:
Técnicas de ADN recombinante
- 10 Se utilizaron métodos estándares para manipular el ADN, tales como los descritos en Sambrook J. *et al.*, Molecular cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Se utilizaron los reactivos biológicos moleculares siguiendo las instrucciones del fabricante.
- 15 **Análisis de secuencias de ADN y de proteínas y gestión de los datos de secuencias**
Se proporciona información general sobre secuencias de nucleótidos de cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulinas humanas en: Kabat, E.A. *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, publicación del NIH nº 91-3242, 1991. Los aminoácidos de las cadenas de anticuerpos se han numerado según la numeración EU (Edelman G.M. *et al.*, PNAS 63:78-85, 1969; Kabat E.A. *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, publicación del NIH nº 91-3242, 1991). Se utilizó el paquete informático versión 10.2 del GCG (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin) y Vector NTI Advance suite versión 8.0 de Infomax para la creación, mapeado, análisis, anotación e ilustración de las secuencias.
- 20 **Secuenciación de ADN**
Se determinaron las secuencias del ADN mediante secuenciación de doble cadena realizada en SequiServe (Vaterstetten, Alemania) y en Geneart AG (Regensburg, Alemania).
- 25 **Síntesis génica**
Los segmentos génicos deseados fueron preparados por Geneart AG (Regensburg, Alemania) a partir de oligonucleótidos sintéticos y productos de PCR mediante síntesis génica automática. Los segmentos génicos flanqueados por sitios únicos de corte por endonucleasa de restricción se clonaron en plásmidos pGA18 (ampR). El plásmido de ADN se purificó a partir de bacterias transformadas y la concentración se determinó mediante espectroscopía de UV. La secuencia del ADN de los fragmentos génicos subclonados se confirmó mediante secuenciación de ADN. Las secuencias de ADN de las dos cadenas de anticuerpo (VH-CL-CH2-CH3 y VL-CH1-CH2-CH3) se prepararon como fragmentos completos mediante síntesis génica con sitios de restricción flanqueantes 5'HpaI y 3'NaeI. Los segmentos génicos para las mutaciones puntuales en el dominio CH3 que preferentemente conducen al producto dímero de MoAb así como a la sustitución de segmentos génicos codificantes de la parte IgG1 con un dominio CH3 de IgA (por ejemplo la SEC ID nº 7) se prepararon mediante síntesis génica. Estos segmentos estaban flanqueados por sitios de restricción únicos que permitían la sustitución de las secuencias de IgG1 de tipo salvaje correspondientes. Todos los constructos se diseñaron con una secuencia 5'-terminal de ADN codificante de un péptido líder que presenta como diana proteínas para la secreción en células eucarióticas.
- 30 **Construcción de los plásmidos de expresión**
Se utilizó un vector de expresión de Roche para la construcción de todas las cadenas de anticuerpo. El vector estaba compuesto de los elementos siguientes:
 - un origen de replicación, oriP, procedente del virus Epstein-Barr (EBV),
 - un origen de replicación procedente del vector pUC18 que permite la replicación de este plásmido en *E. coli*
 - un gen beta-lactamasa que proporciona resistencia a la ampicilina en *E. coli*,
 - el intensificador y promotor tempranos inmediatos procedentes del citomegalovirus humano (HCMV),
 - la secuencia de señal de poliadenilación ("poli A") de la inmunoglobulina 1 humana, y
 - sitios de restricción HpaI, BclI y NaeI únicos.
- 35 **Los genes de inmunoglobulina en el orden VH-CL-CH2-CH3 y VL-CH1-CH2-CH3, así como los constructos modificados en la región 3' codificante del extremo C-terminal de la cadena de anticuerpo (CH3) se prepararon mediante síntesis génica y se clonaron en plásmidos pGA18 (ampR) tal como se ha descrito. Los plásmidos pG18 (ampR) que portaba los segmentos de ADN sintetizados y el vector de expresión de Roche se digirieron con los enzimas de restricción HpaI y NaeI o BclI y NaeI (Roche Molecular Biochemicals) y se sometieron a electroforesis en gel de agarosa. A continuación, se ligaron segmentos de ADN purificados al fragmento HpaI/NaeI o BclI/NaeI del vector de expresión de Roche aislado, resultando en los vectores de expresión finales. Los vectores de expresión finales se transformaron en células de *E. coli*, se aisló el plásmido ADN de expresión (Miniprep) y se sometió a**
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60

análisis de enzimas de restricción y de secuenciación del ADN. Los clones correctos se cultivaron en 150 ml de medio LB-Amp, se aisló nuevamente el plásmido de ADN (Maxiprep) y se confirmó la integridad de la secuencia mediante secuenciación del ADN.

5 Expresión transitoria de variantes de inmunoglobulina en células HEK293

Se expresaron variantes recombinantes de inmunoglobulina mediante transfección transitoria de células 293-F renales embrionarias humanas utilizando el sistema de expresión FreeStyle™ 293 Expression System siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen, USA). Brevemente, se cultivaron células FreeStyle™ 293-F en suspensión en medio de expresión FreeStyle™ 293 a 37°C/8% de CO₂. Se sembraron células en medio fresco a una densidad de 1-2x10⁶ células viables/ml el día de la transfección. Se prepararon complejos de ADN-293fectin™ en medio Opti-MEM® I (Invitrogen, USA) utilizando 325 µl de 293fectin™ (Invitrogen, Alemania) y 250 µg de cada plásmido de ADN en una proporción molar 1:1 para un volumen final de transfección de 250 µl. Se recolectaron sobrenadantes de cultivo celular que contenían anticuerpos 7 días después de la transfección, mediante centrifugación a 14.000xg durante 30 minutos, y se filtraron a través de un filtro estéril (0,22 µm). Los sobrenadantes se almacenaron a -20°C hasta la purificación.

Alternativamente, se generaron anticuerpos mediante transfección transitoria de células HEK293-EBNA. Se expresaron anticuerpos mediante cotransfección transitoria de los plásmidos de expresión respectivos en células HEK293-EBNA en crecimiento adherente (línea celular renal embrionaria humana 293 que expresaba el antígeno nuclear del virus de Epstein-Barr; American Type Culture Collection número de depósito ATCC n° CRL-10852, Lote n° 959 218) cultivadas en DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco, Gibco) suplementado con FCS (suero de feto bovino, Gibco) al 10% con niveles ultrabajos de IgG, L-glutamina 2 mM (Gibco) y geneticina 250 mg/ml (Gibco). Para la transfección, se utilizó reactivo de transfección FuGENE™ 6 (Roche Molecular Biochemicals) en una proporción de reactivo FuGENE™ (µl) a ADN (µg) de 4:1 (comprendida entre 3:1 y 6:1). Las proteínas se expresaron a partir de los plásmidos respectivos utilizando una proporción equimolar de plásmidos. Las células se alimentaron el día 3 con L-glutamina 4 mM, glucosa [Sigma] y NAA [Gibco]. Se recolectaron sobrenadantes de cultivo celular que contenían variantes de inmunoglobulina, entre los días 5 y 11 tras la transfección mediante centrifugación y se almacenaron a -80°C. Se proporciona información general sobre la expresión recombinante de inmunoglobulinas humanas en, por ejemplo, células HEK293, proporcionadas en: Meissner P. *et al.*, Biotechnol. Bioeng. 75:197-203, 2001.

Purificación de anticuerpos

Se purificaron anticuerpos a partir de sobrenadantes de cultivo celular mediante cromatografía de afinidad utilizando proteína A-Sepharose™ (GE Healthcare, Suecia) y cromatografía de exclusión por tamaño Superdex200. Brevemente, se pasaron sobrenadantes de cultivo celular filtrados a esterilidad por una columna HiTrap HP de proteína A (5 ml) equilibrada con tampón PBS (Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1 mM, NaCl 137 mM y KCl 2,7 mM, pH 7,4). Las proteínas no unidas se lavaron con tampón de equilibración. Los anticuerpos y variantes de anticuerpo se eluyeron con tampón citrato 0,1 M, pH 2,8, y las fracciones que contenían proteínas se neutralizaron con 0,1 ml de Tris 1 M, pH 8,5. A continuación, las fracciones de proteínas eluidas se agruparon, se concentraron con un dispositivo de filtración centrífuga de Amicon Ultra (valor de corte de PM: 30 K, Millipore) hasta un volumen de 3 ml y se cargaron en una columna de filtración en gel 16/60 o 26/60 Superdex200 HiLoad de 120 ml (GE Healthcare, Suecia) equilibrada con histidina 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0. Se agruparon las fracciones que contenían anticuerpos purificados con menos de 5% de agregados de alto peso molecular y se almacenaron como alícuotas de 1,0 mg/ml a -80°C.

Análisis de las proteínas purificadas

La concentración de proteínas de las muestras de proteínas purificadas se determinó mediante la medición de la densidad óptica (DO) a 280 nm, utilizando el coeficiente de extinción molar calculado basándose en la secuencia de aminoácidos. Se analizó mediante SDS-PAGE la pureza y el peso molecular de los anticuerpos en presencia y en ausencia de un agente reductor (1,4-ditiotreitol 5 mM) y tinción con azul brillante de Coomassie. Se utilizó el sistema de gel premoldeado NuPAGE® (Invitrogen, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante (geles de Tris-glicina al 4-12%). Se analizó el contenido de agregados de muestras de anticuerpos mediante CET de alto rendimiento utilizando una columna analítica de exclusión por tamaños Superdex 200 (GE Healthcare, Suecia) en tampón de migración de KH₂PO₄ 200 mM, KCl 250 mM, pH 7,0 a 25°C. Se inyectaron 25 µg de proteínas en la columna a un caudal de 0,5 ml/minuto y se eluyeron isocráticamente durante 50 minutos. Para el análisis de estabilidad, se incubaron a 4°C y a 40°C durante 7 días concentraciones de 1 mg/ml de proteínas purificadas y después se evaluaron mediante CET de alto rendimiento (análisis de CET AR (proteína purificada)). La integridad del esqueleto de aminoácidos de cadenas variantes de inmunoglobulina reducida se verificó mediante espectrometría de masas Q-TOF de nanoelectropulverización tras la eliminación de los N-glicanos mediante tratamiento enzimático con péptido-N-glucosidasa F (Roche Molecular Biochemicals).

Espectrometría de masas

Se determinó la masa desglucosilada total de los anticuerpos y se confirmó mediante espectrometría de masas de ionización por electropulverización (EM-IEP). Brevemente, se desglucosilaron 100 µg de anticuerpos purificados con N-glucosidasa F (PNGasaF, ProZyme) 50 mM en $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 100 mM, pH 7, a 37°C durante 12 a 24 horas a una concentración de proteínas de hasta 2 mg/ml y posteriormente se desalaron mediante HPLC en una columna Sephadex G25 (GE Healthcare). La masa de las cadenas de anticuerpo respectivas se determinó mediante EM-IEP tras la desglucosilación y reducción. Brevemente, se incubaron 50 µg de anticuerpo en 115 µl con 60 µl de TCEP 1 M y 50 µl de hidrocloreuro de guanidina 8 M posteriormente desalado. Se determinó la masa total y la masa de las cadenas de anticuerpo reducidas mediante EM-IEP en un sistema de EM Q-Star Elite dotado de una fuente NanoMate. El intervalo de masas registrado depende del peso molecular de las muestras. En general, para anticuerpos reducidos el intervalo de masas se fijó entre 600 y 2.000 m/z y para los anticuerpos no reducidos, entre 1.000 y 3.600 m/z.

CET-DLLMA

Se utilizó la CET-DLLMA (cromatografía de exclusión por tamaño con dispersión de luz láser multiángulo) para determinar el peso molecular aproximado de proteínas en solución. Según la teoría de dispersión lumínica, la DLLMA permite la estimación del peso molecular de las macromoléculas con independencia de su forma molecular u otras premisas. La CET-DLLMA se basa en la separación de las proteínas según su tamaño (radio hidrodinámico) mediante cromatografía CET, seguida por detectores sensibles a la concentración y a la luz dispersada. La CET-DLLMA típicamente proporciona estimaciones del peso molecular con una precisión que permite una clara discriminación entre monómeros, dímeros, trímeros, etc., con la condición de que la separación de CET sea suficiente.

En el presente trabajo se utilizó la instrumentación siguiente: HPLC Dionex Ultimate 3000; columna: Superose6 10/300 (GE Healthcare); eluyente: 1 x PBS; caudal: 0,25 ml/min; detectores: OptiLab REX (Wyatt Inc., Dernbach), MiniDawn Treos (Wyatt Inc., Dernbach). Los pesos moleculares se calcularon con el software Astra, versión 5.3.2.13. Se cargaron cantidades de proteínas de entre 50 y 150 µg en la columna y se utilizó BSA (Sigma Aldrich) como proteína de referencia.

Curso temporal de la dispersión lumínica dinámica (DLD)

Se filtraron las muestras (30 µl) a una concentración de aprox. 1 mg/ml en His/HisCl 20 mM, NaCl 140 mM, pH 6,0, mediante una placa de filtración de 384 pocillos (0,45 µm) en una placa óptica de 384 pocillos (Corning) y se recubrieron con 20 µl de aceite de parafina (Sigma). Los datos de dispersión lumínica dinámica se recogieron repetidamente durante un periodo de 5 días con un lector de placas de DLD DynaPro (Wyatt) a una temperatura constante de 40°C. Los datos se procesaron con Dynamics V6.10 (Wyatt).

Resonancia del plasmón superficial

Se analizaron las propiedades de unión de proteínas de unión a antígeno y anticuerpos anti-IGF-1R mediante tecnología de resonancia de plasmón superficial (RPS) utilizando un instrumento Biacore (Biacore, GE-Healthcare, Uppsala). Dicho sistema está bien establecido para el estudio de las interacciones entre moléculas. Permite un seguimiento en tiempo real continuo de unión de ligando/analito y, de esta manera, la determinación de constantes de tasa de asociación (k_a), constantes de tasa de disociación (k_d) y constantes de equilibrio (K_D) en diversos contextos de ensayo. La tecnología de RPS se basa en la medición del índice refractivo en proximidad a la superficie de un chip biosensor recubierto de oro. Los cambios en el índice refractivo indica cambios de masa sobre la superficie causados por la interacción de ligando inmovilizado con el analito inyectado en solución. Como las moléculas unidas a ligando inmovilizado sobre la superficie incrementan la masa, en el caso de disociación se reducirá la masa. Se capturó anticuerpo anti-IgG humana sobre la superficie de un chip biosensor CM5 utilizando la reacción de acoplamiento de las aminas. Se activaron las células de flujo con una mezcla 1:1 de N-hidroxisuccinimida 0,1 M y 3-(N,N-dimetilamino)propil-N-etilcarbodiimida 0,1 M a un caudal de 5 µl/min. Se inyectó anticuerpo anti-IgG humana en acetato sódico, pH 5,0 a una concentración de 10 mg/ml. Se trató una célula de flujo de control de referencia de la misma manera, aunque con tampones de vehículo únicamente en lugar del anticuerpo de captura. Las superficies se bloquearon con una inyección de etanolamina 1 M/HCl, pH 8,5. Los anticuerpos de IGF-1R se diluyeron en HBS-P y se inyectaron. Todas las interacciones se llevaron a cabo a 25°C (temperatura estándar). Se inyectó la solución de regeneración de cloruro de magnesio 3 M durante 60 s a un caudal de 5 µl/min para eliminar cualquier proteína unida no covalentemente tras cada ciclo de unión. Se detectaron las señales a una tasa de una señal por segundo. Se inyectaron las muestras a concentraciones crecientes. La fig. 17 ilustra el formato de ensayo aplicado. Para forzar la unión se seleccionó una densidad de carga reducida con densidad de anticuerpo de captura y anticuerpo de IGF-1R para forzar la unión.

Para las mediciones de afinidad, se inmovilizó FcγIIIa humano en un chip sensor CM-5 mediante la captura del receptor etiquetado con His en un anticuerpo anti-His (Penta-His, Qiagen) que se acopló a la superficie mediante acoplamiento estándar de aminas y reacciones de bloqueo en un instrumento de RPS (Biacore T100). Tras la captura de FcγRIIIa se inyectaron anticuerpos de IGF1R 50 nM a 25°C a un caudal de 5 µl/min. El chip posteriormente se regeneró con un pulso de 60 s de solución de glicina-HCl 10 mM, pH 2,0.

Ensayo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)

Determinación de las funciones efectoras mediadas por anticuerpos de los anticuerpos anti-IGF-1R. Con el fin de determinar la capacidad de los anticuerpos generados de inducir mecanismos inmunológicos efectores, se llevaron a cabo estudios de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Para estudiar los efectos de los anticuerpos en la ADCC, se marcaron células DU145 expresantes de IGF-1R (1×10^6 células/ml) con 1 µl por ml de solución de BATDA (Perkin Elmer) durante 25 minutos a 37°C en un incubador celular. Después, las células se lavaron cuatro veces con 10 ml de RPMI-FM(PenStrep y se agitaron durante 10 minutos a 200xg. Antes de la última etapa de centrifugación, se determinó el número de células y éstas posteriormente se diluyeron a 1×10^5 células/ml en medio RPMI-FM/PenStrep a partir del pellet. Las células se sembraron a razón de 5.000 en cada pocillo de una placa de fondo redondo, en un volumen de 50 µl. Se añadieron anticuerpos HuMab a una concentración final comprendida entre 25 y 0,1 µg/ml en un volumen de 50 µl de medio de cultivo celular a 50 µl de suspensión celular y se incubaron durante 15 minutos. A continuación, se añadieron 50 µl de células efectoras, PBMC recién aisladas en una proporción E:T de 25:1. Las placas se centrifugaron durante 1 minuto a 200xg, seguido de una etapa de incubación de 2 horas a 37°C. Tras la incubación, las células se peletizaron durante 10 minutos a 200xg y se recolectaron 20 µl de sobrenadante y se transfirieron a una placa Optiplate 96-F. Se añadieron 200 µl de solución de europio (Perkin Elmer, a temperatura ambiente) y las placas se incubaron durante 15 minutos en una mesa agitadora. Se cuantificó la fluorescencia en un fluorímetro con resolución temporal (Victor 3, Perkin Elmer) utilizando el protocolo de Eu-TDA de Perkin Elmer. La magnitud de la lisis celular por ADCC se expresa como % de la liberación máxima de intensificador de fluorescencia de TDA por parte de las células diana lisadas por detergente corregida para la liberación espontánea de TDA por las células diana respectivas.

Ensayo de internalización de IGF-1R

La unión de anticuerpos y la proteína de unión a antígeno según la invención a IGF-1R resulta en la internalización y degradación del receptor. Puede llevarse a cabo un seguimiento de dicho procedimiento mediante incubación de las células CRC HT29 expresantes de IGF-1R con anticuerpos con diana en IGF-1R, seguido de la cuantificación de los niveles de proteína IGF-1R restante en lisados celulares mediante ELISA.

Con este fin se incubaron células HT29 a razón de $1,5 \times 10^4$ células/pocillo en una MTP de 96 pocillos en RPMI con FCS al 10% durante la noche a 37°C y 5% de CO₂ con el fin de permitir la unión de las células. A la mañana siguiente se aspiró el medio y se añadieron 100 µl de anticuerpo anti-IGF-1R diluido en RPMI + FCS al 10% a concentraciones de entre 10 nM y 2 pM en etapas de dilución 1:3. Las células se incubaron con anticuerpo durante 18 horas a 37°C. A continuación, el medio nuevamente se eliminó y se añadieron 120 µl de tampón de lisis MES (MES 25 mM, pH 6,5 + completo).

Para el ELISA, se cargaron placas de poliestireno de 96 pocillos recubiertas con estreptavidina (Nunc) con 100 µl de MAK <IGF_hu-1Rα>hu-1a-IgG-Bi (c.10) diluidos 1:200 en BSA al 3%/PBST (concentración final: 2,4 µg/ml) y se incubaron bajo agitación constante durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se extrajo el contenido de los pocillos y se lavó cada uno tres veces con 200 µl de PBST. Se añadieron a cada pocillo 100 µl de la solución de lisado celular y se incubaron nuevamente durante 1 hora a temperatura ambiente en un agitador de placas y se lavaron tres veces con 200 µl de PBST. Tras la eliminación del sobrenadante, se añadieron 100 µl/pocillo de PAK<human IGF-1Rα>Ra-C20-IgG (Santa Cruz nº sc-713) diluidos 1:750 en BSA/PBST al 3% seguido por los mismos intervalos de incubación y lavado tal como se ha indicado anteriormente. Con el fin de detectar el anticuerpo específico unido a IGF-1R, se añadieron 100 µl/pocillo de un anticuerpo policlonal de caballo anticonejo acoplado con peroxidasa de rábano picante (Cell Signaling nº 7074) diluido 1:4.000 en BSA/PBST al 3%. Tras una hora adicional, nuevamente se eliminó el anticuerpo no unido mediante lavado intensivo 6 veces tal como se ha indicado anteriormente. Para la cuantificación del anticuerpo unido, se añadieron 100 µl/pocillo de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (Roche, BM-Blue ID-nº 11484281) y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción colorigénica finalmente se detuvo mediante la adición de 25 µl/pocillo de H₂SO₄ 1 M y se midió la absorción de la luz a una longitud de onda de 450 nm. Se utilizaron las células no tratadas con anticuerpo a modo de control de 0% de regulación negativa y tampón de lisis como control de fondo.

Ensayo de autofosforilación de IGF-1R (estimulación de IGF-1)

La unión dirigida de anticuerpos de IGF-1R a IGF-1R resulta en la inhibición de la autofosforilación inducida por IGF-1. Los presentes solicitantes investigaron la inhibición de la autofosforilación del dímero de MoAb IGF-1R de tipo

salvaje en comparación con la del anticuerpo IgG1 de IGF-1R. Con este fin, se trataron células 3T3-IGF-1R, una línea celular de fibroblastos murinos sobreexpresante de IGF-1R humano, durante 10 minutos con IGF-1 humano recombinante 10 mM en presencia de diferentes concentraciones de anticuerpo de IGF-1R o proteína de unión a antígeno IGF-1R. Tras la lisis de las células, se determinaron los niveles de proteína IGF-1R fosforilada mediante un ELISA específico de fosfo-IGF-1R, combinando un anticuerpo de captura específico para IGF-1R humano y un anticuerpo de detección específico para fosfo-tirosina.

Determinación de las propiedades farmacocinéticas Cinética de dosis individuales en ratones

Métodos

Animales:

Ratones NMRI, hembra, alimentados, de peso corporal entre 23 y 32 g en el punto temporal de administración de compuesto.

Protocolo de estudio:

Para una única dosis i.v. de 10 mg/kg, los ratones se asignaron a 3 grupos con 2-3 animales cada uno. Se extrajeron muestras de sangre del grupo 1, 0,5, 168 y 672 horas después de la administración; del grupo 2, 24 y 336 horas después de la administración y del grupo 3, 48 y 504 horas después de la administración.

Se obtuvieron muestras de sangre de aproximadamente 100 µl mediante punción retrobulbar. Se obtuvieron muestras de suero de por lo menos 40 µl de sangre tras 1 hora a temperatura ambiente mediante centrifugación (9.300xg) a temperatura ambiente durante 2,5 min. Se congelaron muestras de suero directamente tras la centrifugación y se almacenaron congeladas a -20°C hasta el análisis.

Análisis:

Las concentraciones de los anticuerpos humanos en suero de ratones se determinaron mediante un ensayo de inmunosorción ligada a enzima (ELISA) utilizando suero de ratón al 1%. Se unió anticuerpo monoclonal biotinilado contra Fcγ humano (mAb$hFc\gamma_{PAN}>IgG-Bi$) a placas de microtitulación recubiertas con estreptavidina en la primera etapa. En la etapa siguiente se añadieron muestras de suero (en diversas diluciones) y estándares de referencia y se unieron al mAb$hFc\gamma_{PAN}>IgG-Bi$ inmovilizado. A continuación se añadió anticuerpo monoclonal digoxigenilado contra Fcγ (mAb$hFc\gamma_{PAN}>IgG-Dig$) humano. Se detectaron los anticuerpos humanos mediante el conjugado de anticuerpo anti-Dig-peroxidasa de rábano picante. Se utilizó solución de ABTS como sustrato para la peroxidasa de rábano picante. La especificidad del anticuerpo de captura y de detección utilizado, que no reacciona cruzadamente con la IgG de ratón, permite la determinación cuantitativa de los anticuerpos humanos en muestras de suero de ratón.

Cálculos:

Se calcularon los parámetros farmacocinéticos mediante análisis no compartimentalizado utilizando el programa de evaluación farmacocinética WinNonlin™, versión 5.2.1.

Tabla 1: parámetros farmacocinéticos calculados:

Abreviaturas de parámetros farmacocinéticos	Parámetros farmacocinéticos	unidades
C0	Concentración inicial estimada únicamente para modelos de bolo IV	mg/ml
C0_NORM	concentración inicial estimada únicamente para modelos de bolo IV, de dosis normalizada	mg/ml/mg/kg
T0	Tiempo de concentración inicial estimada únicamente para modelos de bolo IV	h
TMAX	Tiempo de concentración observada máxima	h
CMAX	Concentración observada máxima, producida en TMAX	mg/ml
CMAX_NORM	Cmax, normalizado para la dosis	mg/ml/mg/kg
AUC_0_INF	ABC extrapolado	h* mg/ml
AUC_0_LST	ABC observado	h* mg/ml
TLAST	Tiempo de última concentración observada > 0	h
AUC_0_INF_NORM	ABC extrapolada, dosis normalizada	h* mg/ml/mg/kg

AUC_0_LST_NORM	ABC observada, dosis normalizada	h*mg/ml/mg/kg
PCT_AUC_EXTRA	porcentaje ABC extrapolado	%
CL_TOTAL	eliminación total	ml/min/kg
CL_TOTAL_CTG	categorías de eliminación total	L, M, H
VSS	volumen de distribución en estado estacionario	L/kg
VSS_CTG	categorías de volumen de distribución en estado estacionario	L, M, H
VZ	volumen de distribución terminal	L/kg
CL/F	eliminación total tras vías no IV o tras vía IV de profármaco	ml/min/kg
VZ/F	volumen de distribución terminal tras vías no IV o tras vía IV de profármaco	L/kg
MRT_INF	tiempo medio de residencia (extrapolado)	h
MRT_LST	tiempo medio de residencia (observado)	h
HALFLIFE_Z	vida media terminal	h
F	Biodisponibilidad tras vías no IV o tras vía IV de profármaco	%

Se utilizaron los parámetros farmacocinéticos siguientes para evaluar los anticuerpos humanos:

- la concentración inicial estimada para modelos de bolo IV (C_0).
- La concentración observada máxima (C_{max}), producida en (T_{max}).
- El tiempo de concentración observada máxima (T_{max}).
- Se calculó el área bajo la curva de concentración/tiempo ABC(0-inf) mediante la regla trapezoidal lineal (con interpolación lineal) entre el tiempo 0 y el infinito.
- La vida media terminal aparente ($T_{1/2}$) se derivó de la ecuación: $T_{1/2} = \ln 2 / \lambda_z$.
- Se calculó la eliminación total del cuerpo (E) como Dosis/ABC(0-inf).
- El volumen de distribución en estado estacionario (Vss), calculado como $MRT(0-inf) \times E$ ($MRT(0-inf)$, definido como $AUMC(0-inf)/ABC(0-inf)$).

B. Ejemplos:

Ejemplo 1:

generación de proteínas de unión a antígeno dímero de MoAb

Los presentes solicitantes diseñaron proteínas de unión a antígeno según la invención contra c-Met (SEC ID nº 1 y SEC ID nº 2), IGF-1R (SEC ID nº 3 y SEC ID nº 4) y HER3 (SEC ID nº 5 y SEC ID nº 6) basados en el principio de diseño tal como se muestra en la fig. 1A. Los constructos respectivos se expresaron transitoriamente en células HEK293 tal como se ha indicado anteriormente y posteriormente se purificaron mediante cromatografía de afinidad para proteína A seguido de exclusión por tamaño. Las figs. 2 a 4 ilustran los cromatogramas de la cromatografía de exclusión por tamaño de las tres producciones diferentes de proteínas de unión a antígeno, así como la SDS-PAGE correspondiente bajo condiciones no reductoras y reductoras. Además del pico 3 en la fig. 2, el pico 2 en la fig. 3, el pico 3 en la fig. 4, se observaron proteínas que eluyeron en puntos temporales anteriores de la columna, pico 2 en la fig. 2, pico 1 en la fig. 3, pico 4 en la fig. 7. Basándose en su tiempo de retención, se calculó que mostraban el doble de peso molecular del anticuerpo monovalente (fig. 1B, MoAb), correspondiente a la proteína de unión a antígeno según la figura 1A (dímero de MoAb).

Se confirmó el tamaño de los dos picos 1 y 2 de los anticuerpos de IGF-1R mediante CET-DLLMA (fig. 3C) y mostraron en efecto que la proteína correspondiente al pico 1 mostró aproximadamente el doble de peso molecular del anticuerpo monovalente (pico 2). A continuación, se confirmó mediante espectrometría de masas la existencia de un dímero de MoAb y la identidad de las proteínas aisladas. Basándose en estos resultados los presentes solicitantes derivaron un modelo de la estructura del dímero de MoAb que se ilustra en la fig. 1A.

Los presentes solicitantes llevaron a cabo experimentos tales como espectrometría de masas, reducción y digestión con proteasas para confirmar la estructura putativa que se muestra en la fig. 1A.

La estabilidad del dímero de MoAb de IGF1R AK18 ("CH3-wt") se estudió mediante dispersión lumínica dinámica tal como se ha indicado anteriormente. Brevemente, se evaluó la tendencia a la agregación del dímero de MoAb de IGF1R AK18 ("CH3-wt") mediante un experimento de curso temporal de DLD a 40°C.

Ejemplo 2:

Afinidad de unión de IGF-1R

Se comparó la unión del dominio extracelular de IGF-1R del dímero de MoAb IGF1R AK18 ("CH3-wt") con la unión al anticuerpo IgG1 <IGF-1R> parental mediante resonancia de plasmón superficial (RPS). La fig. 5 ilustra el esquema del ensayo de RPS para determinar la afinidad. El análisis (doble determinación) demostró que la afinidad de unión para IGF-1R se conserva en el dímero de MoAb IGF1R AK18 ("CH3-wt").

5

	k(on)	k(off)	KD
mAb (IGF-1R)	1,74E+06	6,63E-03	3,80E-09
Dímero de MoAb (IGF-1R) (1º deter.)	1,5E+06	3,0E-03	2,01E-09
Dímero de MoAb (IGF-1R) (2º deter.)	1,5E+06	3,0E-03	2,05E-09

Ejemplo 3

Unión celular a líneas celulares expresantes de IGF-1R

10

Se demostró en células A549 la unión celular del dímero de MoAb de IGF-1R. Se desprendieron las células A549 en la etapa de crecimiento logarítmico con acutasa (Sigma) y se utilizaron 2×10^5 células para cada incubación individual de anticuerpos. Se añadió anticuerpo de IGF1R y dímero de MoAb en una serie de dilución de tres veces (100-0,0003 µg/ml). Los anticuerpos unidos se visualizaron con un anticuerpo secundario acoplado con Alexa488 (5 µg/ml) de unión a la región constante de la inmunoglobulina humana. Las células muertas se tiñeron con 7-AAD (BD) y se excluyeron del análisis. Se midió la intensidad de fluorescencia de las células individuales en un citómetro de flujo FACS Canto (BD Biosciences). Los datos demuestran que el dímero de MoAb mostraba una unión semimáxima muy similar a las células, comparable al anticuerpo IgG1 anti-IGF-1R parental. Lo anterior implica que el dímero de MoAb puede unirse con dos brazos a IGF-1R sobre las células y muestra un efecto de avidéz. Sin embargo, la imf (intensidad media de fluorescencia) total es más alta para el dímero de MoAb que el mAb de IGF-1R. Lo anterior probablemente se debe al número más alto de partes Fc por molécula de IGF-1R sobre la superficie celular. Se muestran los resultados en la figura 6 y posteriormente.

15

20

	unión semimáxima
IGF-1R (150kDa):	0,76 nM
dímero de MoAb IGF-1R (200 kDa):	1,13 nM

Ejemplo 4:

inducción de ADCC

30

Pueden utilizarse células mononucleares de sangre periférica (PBMC) derivadas de donante para medir el reclutamiento de células efectoras por anticuerpos no glucomanipulados y glucomanipulados a las células de cáncer. La lisis de las células de cáncer se correlaciona con la citotoxicidad mediada por células NK y es proporcional a la capacidad del anticuerpo de reclutar las células NK. En el presente contexto particular, se incubaron células de cáncer de próstata DU145 en una proporción 1:25 (DU145:PBMC) con PBMC en ausencia o en presencia de los anticuerpos respectivos. Tras 2 horas se determinó la lisis celular utilizando el sistema de BATDA/europio tal como se ha indicado anteriormente. La magnitud de la lisis celular por ADCC se expresa como % de la liberación máxima de intensificador de fluorescencia de TDA por parte de las células diana lisadas por detergente corregida para la liberación espontánea de TDA por las células diana respectivas. Los datos muestran que el dímero de MoAb de IGF-1R bivalente no glucomanipulado es superior en la inducción de la ADCC que el anticuerpo de IGF-1R no glucomanipulado. Inesperadamente el dímero de MoAb de IGF-1R no glucomanipulado es incluso superior en la inducción de ADCC a concentraciones altas que el anticuerpo de IGF-1R glucomanipulado, que muestra una caída en el ensayo de ADCC hacia las concentraciones altas. La superior inducción de ADCC por el dímero de MoAb en ausencia de glucomanipulación puede explicarse por la afinidad más alta del constructo para FcγRIIIa sobre las células NK debido a la bivalencia para FcγRIIIa (efecto de avidéz).

35

40

45

Los resultados para mAb IGF1R no glucomanipulado (1), mAb IGF1R afucosilado glucomanipulado (2) y dímero de MoAb IGF1R AK18 no glucomanip. (3) se presentan en la figura 7, mostrando que el dímero de MoAb IGF1R AK18 ("CH3-wt") presenta una ADCC mejorada en comparación con el mAb de IGF1R no glucomanipulado y a concentraciones más altas, incluso en comparación con el mAb de IGF1R afucosilado glucomanipulado (2).

Ejemplo 5:

ensayo de internalización de IGF-1R

55

La unión dirigida de IGF-1R sobre las células tumorales a anticuerpos de IGF-1R bivalentes resulta en la internalización y degradación lisosómica de IGF-1R. Los presentes solicitantes investigaron las propiedades de internalización del dímero de MoAb IGF-1R en comparación con las del anticuerpo de IGF-1R parental. Con este fin

se trataron células de cáncer de colon HT29 durante 18 horas con diferentes concentraciones de dímero de MoAb y anticuerpo de IGF-1R parental. Tras la lisis de las células, se determinaron los niveles remanentes de proteína IGF-1R mediante ELISA específica para IGF-1R.

- 5 Los datos en la fig. 8 muestran que la internalización de IGF-1R por el dímero de MoAb es prácticamente idéntica con el anticuerpo parental bivalente de IGF-1R. La internalización máxima fue de 82,99% (IgG1) frente a 83,7% (dímero de MoAb); la concentración requerida para la inhibición semimáxima fue de 0,027 nM (IgG1) frente a 0,027 nM (dímero de MoAb).

10 Ejemplo 6:

autofosforilación de IGF-1R (estimulación de IGF-1)

- 15 La unión dirigida de anticuerpos de IGF-1R a IGF-1R resulta en la inhibición de la autofosforilación inducida por IGF-1. Los presentes solicitantes investigaron la inhibición de la autofosforilación del dímero de MoAb IGF-1R en comparación con la del anticuerpo IgG1 de IGF-1R parental. Con este fin, se trataron células 3T3-IGF-1R, una línea celular de fibroblastos murinos sobreexpresante de IGF-1R humano, durante 10 minutos con IGF-1 humano recombinante 10 nM en presencia de diferentes concentraciones de anticuerpo o proteína de unión a antígeno IGF-1R. Tras la lisis de las células, se determinaron los niveles de proteína IGF-1R fosforilada mediante un ELISA específico de fosfo-IGF-1R, combinando un anticuerpo de captura específico para IGF-1R humano y un anticuerpo de detección específico para fosfo-tirosina.

- 20 Los datos en la fig. 9 muestran que el dímero de MoAb IGF-1R puede inhibir una autofosforilación inducida por IGF-1R similar o incluso ligeramente mejor que la de la molécula parental de IgG1 de IGF-1R. La concentración requerida para la inhibición semimáxima fue de 1,44 nM (IgG1 de IGF-1R parental) frente a 3,52 nM (dímero de MoAb); la inhibición máxima observada fue de 80,3% (IgG1 de IGF-1R parental) frente a 89,1% (dímero de MoAb).

25 Ejemplo 7:

- 30 determinación de las propiedades farmacocinéticas

- Se determinaron las propiedades farmacocinéticas de las proteínas de unión a antígeno según la invención en ratones NMRI, hembra, alimentados, de peso corporal entre 23 y 32 g en el punto temporal de administración de compuesto en un estudio FC de dosis individuales, tal como se ha indicado anteriormente (en la sección de métodos).

- 35 Se proporcionan las propiedades FC en la tabla a continuación e indican que la proteína de unión a antígeno dímero de MoAb IGF1R AK18 ("CH3-wt") presenta propiedades FC altamente valiosas en comparación con el anticuerpo IgG1 <IGF-1R> parental (tales como, por ejemplo, ABC0-inf, Cmax o C0).

40

Tabla 2: propiedades FC

		anticuerpo IgG1 <IGF-1R>	dímero de MoAb <IGF1R>
C0	mg/ml	81,9	201,56
Cmax	mg/ml	80,7	195,9
Tmax	h	0,5	0,5
AUC0inf	h* mg/ml	9349	12096
term t1/2	h	106,2	83,5
Cl	ml/min/kg	0,018	0,013
Vss	L/kg	0,16	0,1

Ejemplo 8:

- 45 experimento de EM-IEP de dímero de MoAb IGF-1R

- El dímero de MoAb IGF-1R (MoAb de IGF1R AK18 ("CH3-wt")) (SEC ID nº 3 y SEC ID nº 4) se expresó transitoriamente y se purificó mediante afinidad de proteína A y cromatografía de exclusión por tamaño. Tras la CET preparativa (ver la figura 3A), el anticuerpo eluyó en dos picos separados, que se recogieron. La CET analítica del primer pico (fracción 1) muestra un peso molecular aparente de aproximadamente 200 kDa, mientras que el segundo pico (fracción 2) corresponde a un peso molecular de 100 kDa. Los diferentes pesos moleculares podrían asignarse a un monómero definido como producto secundario (fracción 2) y al dímero deseado (fracción 1), respectivamente. La CET-DLLMA confirmó los resultados iniciales de la CET y muestra para la fracción 2 (monómero) un PM de 99,5 kDa y para la fracción 1 (dímero) un PM de 193,8 kDa.

55

El análisis de SDS-PAGE (ver la figura 3B) de las dos fracciones bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras muestra una banda principal con un peso molecular aparente de 50 a 60 kDa. Bajo condiciones no reductoras, la fracción 2 muestra una banda principal en torno a un PM de 100 kDa y la fracción 1 muestra una banda muy ancha comprendida entre aproximadamente 100 y 200 kDa.

Fracción 1=165 ml; fracción 2=190 ml.

Estos datos iniciales muestran la formación de dímero.

Los espectros de EM-IEP (muestras incubadas con 60 ml de TCEP 1 M y 50 ml de hidrocloreuro de guanidina 8 M) de dímero de MoAb desglucosilado de la fracción 1 y monómero de MoAb fracción 2 muestran diferencias. La fracción 2 muestra una serie con un solo pico correspondiente a un monómero con una masa de 98.151 Da, mientras que la fracción 1 muestra 2 cubiertas diferentes que contienen dos series de pico principales correspondientes a una masa de 98.155 Da (monómero) y una segunda serie con una masa de 196.319 Da (dímero).

Tabla 3: resumen de datos de EM de mediciones de EM-IEP no reductora de las fracciones 1 y 2.

Fracción	Peso molecular, monómero (teor. 98.162 Da)	Peso molecular, dímero (teor. 196324 Da)
Fracción 1	98155 Da	196319 Da
Fracción 2	98151 Da	No detectado

La presencia de un monómero en la fracción 1 puede explicarse por las condiciones de la incubación (incubado con 60 µl de TCEP 1 M y 50 µl de hidrocloreuro de guanidina 8 M) y un potencial puente S-S abierto entre CH1-Ck. En este caso, la transferencia de un solvente acuoso a un solvente orgánico ácido durante la preparación de las muestras para la EM puede provocar la disociación del dímero en 2 monómeros.

Lo anterior concuerda con los resultados del análisis de CE-SDS (BioAnalyzer). La fracción 1 contiene 71% de dímero y 16% de monómero bajo condiciones no reductoras. La utilización de SDS separa las cadenas unidas no covalentemente. La fracción 2 contiene únicamente una señal de monómero (98%) bajo condiciones no reductoras.

Las mediciones de EM bajo condiciones reductoras de la fracción 1 y la fracción 2 muestran la secuencia y expresión correctas de los constructos. Los datos de EM de la fracción 1 muestra dos cadenas pesadas diferentes con un peso molecular de 47.960 Da y 50.208 Da en cantidades aproximadamente iguales. Estas dos cadenas pesadas también se encontraron en la fracción 2 con intensidades similares.

Tabla 4: resumen de datos de EM de mediciones de EM-IEP no reductora bajo condiciones reductoras de las fracciones 1 y 2.

Fracción	Peso molecular, cadena pesada 1 (teor. 50226 Da)	Peso molecular, cadena pesada 2 (teor. 47961 Da)
Fracción 1	98155 Da	196319 Da
Fracción 2	98151 Da	No detectado
Fracción 1	50208 Da (piro Glu en el extremo N-terminal)	47960 Da
Fracción 2	50211 Da (piro Glu en el extremo N-terminal)	47959 Da

Ejemplo 9:

análisis de las proporciones de dímero de moAb a monómero monovalente en proteínas de unión a antígeno dímero de MoAb IGF1R AK18 con CH3 wt y CH3 modificado

Las modificaciones de los dominios CH3 de las cadenas de anticuerpo pueden cambiar las proporciones de dímero de MoAb y monómero de MoAb. Se expresaron transitoriamente en células HEK293F modificaciones de cadena pesada diferentes ejemplares conjuntamente o en combinación con la cadena pesada no modificada. A título comparativo, se transfectoron transitoriamente en paralelo anticuerpos que comprendían cadenas pesadas no modificadas. Se recolectó sobrenadante que contenía los anticuerpos siete días después de la transfección. Se precipitó el anticuerpo utilizando proteína A-sefarosa y se eluyó de las perlas aplicando un protocolo estándar de choque de pH. Los eluidos obtenidos se sometieron a un análisis de HPLC utilizando una columna G3000SW (TSKGel). Se cuantificaron las proporciones de los anticuerpos mediante el cálculo del área bajo los picos respectivos. El término "CH3-wt" se refiere a un dominio CH3 de IgG1 con la secuencia natural (tipo salvaje=wt).

Tabla 5: proporciones de dímero de MoAb obtenido (=proteína de unión a antígeno bivalente según la invención) a monómero de MoAb (=producto secundario monovalente) determinadas mediante HPLC. Pueden separarse fácilmente tanto un producto dimérico deseado como el producto secundario monomérico. Se derivaron valores a partir de los cromatogramas mostrados en la figura 10.

Muestra	Combinación de cadenas pesadas modificadas a) VL-CH1-CH2-CH3 / b) VH-CL-CH2-CH3	% dímero de MoAb	% de MoAb (monómero)
A	CH3-wt (SEC ID nº 3) / CH3-wt (SEC ID nº 4)	30	70
B	CH3-wt (SEC ID nº 3) / 1 (SEC ID nº 4 con mutaciones S364F y L368G)	25	75
C	m (SEC ID nº 3 con las mutaciones S364G, L368F, D399K y K409D)/ CH3-wt (SEC ID nº 4)	98,5	1,5
D	m (SEC ID nº 3 con las mutaciones S364G, L368F, D399K y K409D)/ 1 (SEC ID nº 4 con las mutaciones S364F y L368G)	17	83
E	CH3-wt (SEC ID nº 3) / h (SEC ID nº 4 con las mutaciones S364W y L368G)	20	80
F	i (SEC ID nº 3 con las mutaciones S364G, L368W, D399K y K409D)/ CH3-wt (SEC ID nº 4)	-	-
G	i (SEC ID nº 3 con las mutaciones S364G, L368W, D399K y K409D) / h (SEC ID nº 4 con las mutaciones S364W y L368G)	-	-
H	CH3- IgA ((SEC ID nº 7)/ CH3-wt (SEC ID nº 4)	100	0
h=mutante con las mutaciones S364W y L368G en el dominio CH3 de IgG1. i=mutante con las mutaciones S364G, L368W, D399K y K409D en el dominio CH3 de IgG1. l=mutante con las mutaciones S364F y L368G en el dominio CH3 de IgG1. m=mutante con las mutaciones S364G, L368F, D399K y K409D en el dominio CH3 de IgG1. CH3-wt =dominio CH3 wt de IgG1. CH3- IgA = quimera con un dominio CH2 de IgG1 y un dominio CH3 de IgA.			

5

Ejemplo 10:

Producción de anticuerpos glucomanipulados

- 10 Para la producción de la proteína de unión a antígeno MoAb glucomanipulada, se transfectaron células HEK-EBNA, utilizando el método de fosfato de calcio, con cuatro plásmidos. Dos plásmidos codificantes de las cadenas de anticuerpo, uno para un polipéptido de fusión de GnTIII (un vector de expresión de GnT-III) y uno para la expresión de manosidasa II (un vector de expresión de manosidasa II del Golgi) en una proporción de 4:4:1:1, respectivamente. Se cultivaron las células como cultivos de monocapas adherentes en matraces T utilizando un
- 15 medio de cultivo DMEM suplementado con FCS al 10 %, y se transfectaron al encontrarse a un nivel de confluencia de entre 50% y 80%. Para la transfección de un matraz T150, se sembraron, por ejemplo, 15 millones de células 24 horas antes de la transfección en 25 ml de medio de cultivo DMEM suplementado con FCS (al 10% v/v concentración final) y las células se introdujeron en un incubador a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂ durante la noche. Para cada matraz T150 que debía transfectarse, se preparó una solución de ADN, CaCl₂ y agua mediante
- 20 la mezcla de 94 µg de ADN total de vector plásmido divididos igualmente entre los vectores de expresión de cadena ligera y de cadena pesada, agua hasta un volumen final de 469 µl y 469 µl de una solución 1 M de CaCl₂. A esta solución se añadieron 938 µl de una solución de HEPES 50 mM, NaCl 280 mM, Na₂HPO₄ 1,5 mM a pH 7,05, se mezcló inmediatamente durante 10 segundos y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 20 segundos. La suspensión se diluyó con 10 ml de DMEM suplementado con FCS al 2%, y se añadió al matraz T150 en lugar del
- 25 medio existente. A continuación se añadieron 13 ml de medio de transfección. Las células se incubaron a 37°C, con 5% de CO₂, durante aproximadamente 17 a 20 horas, después se sustituyó el medio por 25 ml de DMEM, FCS al 10%. El medio de cultivo condicionado se recolectó 7 días después del cambio de medio, mediante centrifugación durante 15 minutos a 210 x g, y se añadió la solución y la azida sódica a una concentración final de 0,01% p/v, y se mantuvo a 4°C.

30

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

35 <120> Proteínas de unión a antígeno

<130> 27361

<150> EP 11156320.1

40 <151> 2011-02-28

<160> 8

<170> PatentIn versión 3.5

5

<210> 1

<211> 445

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> dímero de MoAb c-Met 5D5 ("CH3-wt") - cadena pesada modificada a) VL-CH1-CH2-CH3

<400> 1

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

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

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

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Ala Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
115 120 125

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala

15

145		150		155		160
Leu Thr Ser Gly	Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly					
	165		170		175	
Leu Tyr Ser	Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly					
	180		185		190	
Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys						
	195		200		205	
Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys						
	210		215		220	
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu						
	225		230		235	240
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu						
	245		250		255	
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys						
	260		265		270	
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys						
	275		280		285	
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu						
	290		295		300	
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys						
	305		310		315	320
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys						
	325		330		335	
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser						
	340		345		350	
Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys						
	355		360		365	
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln						
	370		375		380	
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly						
	385		390		395	400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 2

<211> 453

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220> <223> dímero de MoAb c-Met 5D5 ("CH3-wt") - cadena pesada modificada b) VH-CL-CH2-CH3

10 <400> 2

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

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

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

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn Phe
50 55 60

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
115 120 125

Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val
130 135 140

Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp
145 150 155 160

Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr
165 170 175

Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
180 185 190

Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val
195 200 205

Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly
210 215 220

Glu Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 3

<211> 440

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220> <223> dímero de MoAb IGF1R AK18 ("CH3-wt") - cadena pesada modificada a) VL-CH1-CH2-CH3

10 <400> 3

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Lys Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Lys Trp Pro Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ser Lys Ser Ser Ala Ser
100 105 110

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
115 120 125

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
130 135 140

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
145 150 155 160

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
180 185 190

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
195 200 205

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
210 215 220

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
225 230 235 240

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
245 250 255

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
260 265 270

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
275 280 285

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
290 295 300

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
305 310 315 320

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
325 330 335

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
340 345 350

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
355 360 365

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
370 375 380

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
385 390 395 400

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
405 410 415

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
420 425 430

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 4

<211> 452

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220> <223> dímero de MoAb IGF1R AK18 ("CH3-wt") - cadena pesada modificada b) VH-CL-CH2-CH3

<400> 4

10

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Glu Leu Gly Arg Arg Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr
100 105 110

Leu Val Ser Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile
115 120 125

Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val
130 135 140

Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys
145 150 155 160

Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
165 170 175

Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu
180 185 190

Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr
195 200 205

His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val

ES 2 549 638 T3

420

425

430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 5

<211> 445

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220> <223> dímero de MoAb Her3 205 ("CH3-wt") - cadena pesada modificada a) VL-CH1-CH2-CH3

10 <400> 5

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Asn Ser
20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Ser
85 90 95

Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
115 120 125

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly

165										170					175						
Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly						
			180					185					190								
Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys						
		195					200					205									
Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys						
	210					215					220										
Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu						
225					230					235					240						
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu						
				245					250					255							
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys						
			260					265					270								
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys						
		275					280					285									
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu						
	290					295					300										
Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys						
305				310						315					320						
Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys						
				325					330					335							
Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser						
			340					345					350								
Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys						
		355					360					365									
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln						
	370					375					380										
Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly						
385					390					395					400						
Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln						
				405					410					415							

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 6

<211> 454

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220> <223> dímero de MoAb Her3 205 ("CH3-wt") - cadena pesada modificada b) VH-CL-CH2-CH3

10 <400> 6

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 Arg Ser Ser
20 25 30

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

Gly Trp Ile Tyr Ala Gly Thr Gly Ser Pro Ser Tyr Asn 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 His Arg Asp Tyr Tyr Ser Asn Ser Leu Thr Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val
115 120 125

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
130 135 140

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
145 150 155 160

Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val
165 170 175

Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	180	185	190	
Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	195	200	205	
Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	210	215	220	
Gly	Glu	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	225	230	235	240
Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	245	250	255	
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	260	265	270	
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	275	280	285	
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	290	295	300	
Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	305	310	315	320
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	325	330	335	
Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	340	345	350	
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	355	360	365	
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	370	375	380	
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	385	390	395	400
Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	405	410	415	
Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	420	425	430	

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
435 440 445

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 7
<211> 446
<212> PRT
<213> Artificial

<220> <223>dímero de MoAb IGF1R AK18 - cadena pesada modificada a) VL-CH1-CH2-CH3 con dominio CH3 de IgA

<400> 7

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Lys Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Lys Trp Pro Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ser Lys Ser Ser Ala Ser
100 105 110

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
115 120 125

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
130 135 140

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
145 150 155 160

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
180 185 190

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
195 200 205

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
210 215 220

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
225 230 235 240

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
245 250 255

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
260 265 270

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
275 280 285

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
290 295 300

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
305 310 315 320

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Asn Thr
325 330 335

Phe Arg Pro Glu Val His Leu Leu Pro Pro Pro Ser Glu Glu Leu Ala
340 345 350

Leu Asn Glu Leu Val Thr Leu Thr Cys Leu Ala Arg Gly Phe Ser Pro
355 360 365

Lys Asp Val Leu Val Arg Trp Leu Gln Gly Ser Gln Glu Leu Pro Arg
370 375 380

Glu Lys Tyr Leu Thr Trp Ala Ser Arg Gln Glu Pro Ser Gln Gly Thr
385 390 395 400

Thr Thr Phe Ala Val Thr Ser Ile Leu Arg Val Ala Ala Glu Asp Trp
405 410 415

Lys Lys Gly Asp Thr Phe Ser Cys Met Val Gly His Glu Ala Leu Pro
420 425 430

Leu Ala Phe Thr Gln Lys Thr Ile Asp Arg Leu Ala Gly Lys
435 440 445

<210> 8
<211> 458
<212> PRT
<213> Artificial

<220> <223>dímero de MoAb IGF1R AK18 - cadena pesada modificada b) VH-CL-CH2-CH3 con dominio CH3 de IgA

<400> 8

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Glu Leu Gly Arg Arg Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr
100 105 110

Leu Val Ser Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile
115 120 125

Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val
130 135 140

Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys
145 150 155 160

Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
165 170 175

Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu
180 185 190

Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr
195 200 205

His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Asn Thr Phe Arg Pro Glu
340 345 350

Val His Leu Leu Pro Pro Pro Ser Glu Glu Leu Ala Leu Asn Glu Leu
355 360 365

Val Thr Leu Thr Cys Leu Ala Arg Gly Phe Ser Pro Lys Asp Val Leu
370 375 380

Val Arg Trp Leu Gln Gly Ser Gln Glu Leu Pro Arg Glu Lys Tyr Leu
385 390 395 400

Thr Trp Ala Ser Arg Gln Glu Pro Ser Gln Gly Thr Thr Thr Phe Ala
405 410 415

Val Thr Ser Ile Leu Arg Val Ala Ala Glu Asp Trp Lys Lys Gly Asp
420 425 430

Thr Phe Ser Cys Met Val Gly His Glu Ala Leu Pro Leu Ala Phe Thr

		435					440			445
Gln	Lys	Thr	Ile	Asp	Arg	Leu	Ala	Gly	Lys	
	450					455				

REIVINDICACIONES

1. Proteína de unión a antígeno, que comprende:
 - a) dos cadenas pesadas modificadas de un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno, en el que VH de cada cadena pesada se ha sustituido por VL de dicho anticuerpo, estando asociadas dichas cadenas pesadas modificadas entre sí mediante sus dominios CH3 de la parte Fc,
 - b) dos cadenas pesadas modificadas de dicho anticuerpo, en el que CH1 de cada cadena pesada ha sido sustituido por CL de dicho anticuerpo, estando asociadas dichas cadenas pesadas modificadas entre sí mediante sus dominios CH3 de la parte Fc, y en el que los dominios VL de las cadenas pesadas de a) están asociadas a los dominios VH de las cadenas pesadas de b), y los dominios CH1 de las cadenas pesadas de a) están asociadas a los dominios CL de las cadenas pesadas de b).
2. Proteína de unión a antígeno según la reivindicación 1, caracterizada por que los dominios CH3 de la parte Fc de las cadenas pesadas modificadas de a) y los dominios CH3 de la parte Fc de las cadenas pesadas modificadas de b) son del mismo isotipo.
3. Proteína de unión a antígeno según la reivindicación 2, caracterizada por que los dominios CH2 y CH3 de la parte Fc de las cadenas pesadas modificadas de a) y los dominios CH2 y CH3 de la parte Fc de las cadenas pesadas modificadas de b) son del mismo isotipo.
4. Proteína de unión a antígeno según la reivindicación 3, caracterizada por que los dominios CH2 y CH3 de la parte Fc de las cadenas pesadas modificadas de a) y los dominios CH2 y CH3 de la parte Fc de las cadenas pesadas modificadas de b) son del isotipo IgG.
5. Proteína de unión a antígeno según la reivindicación 4, caracterizada por que los dominios CH2 y CH3 de la parte Fc de las cadenas pesadas modificadas de a) y los dominios CH2 y CH3 de la parte Fc de las cadenas pesadas modificadas de b) son del isotipo IgG1.
6. Proteína de unión a antígeno según la reivindicación 1, caracterizada por que comprende:
 - a) dos cadenas pesadas modificadas que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 1, y
 - b) dos cadenas pesadas modificadas que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 2,
 - a) dos cadenas pesadas modificadas que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 3, y
 - b) dos cadenas pesadas modificadas que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 4, o
 - a) dos cadenas pesadas modificadas que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 5, y
 - b) dos cadenas pesadas modificadas que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 6.
7. Proteína de unión a antígeno según la reivindicación 5, caracterizada por que las dos cadenas pesadas modificadas de a), o las dos cadenas pesadas modificadas de b), son adicionalmente modificadas con las sustituciones de aminoácidos S364G, L368F, D399K y K409D (en las que las posiciones de los aminoácidos están numeradas según el índice EU de Kabat).
8. Proteína de unión a antígeno según la reivindicación 1, caracterizada por que comprende:
 - a) dos cadenas pesadas modificadas que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 1, y b) dos cadenas pesadas modificadas que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 2, en las que las dos cadenas pesadas modificadas de a), o las dos cadenas pesadas modificadas de b), se modifican adicionalmente con las sustituciones de aminoácidos S364G, L368F, D399K y K409D (en las que las posiciones de aminoácidos se numeran según el índice EU de Kabat),
 - a) dos cadenas pesadas modificadas que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 3, y
 - b) dos cadenas pesadas modificadas que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº4, en las que las dos cadenas pesadas modificadas de a), o las dos cadenas pesadas modificadas de b), son modificadas adicionalmente con las sustituciones de aminoácidos S364G, L368F, D399K y K409D (en las que las posiciones de aminoácidos están numeradas según el índice EU de Kabat),
 - o
 - a) dos cadenas pesadas modificadas que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 5, y
 - b) dos cadenas pesadas modificadas que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº6, en las que las dos cadenas pesadas modificadas de a), o las dos cadenas pesadas modificadas de b), son modificadas adicionalmente con las sustituciones de aminoácidos S364G, L368F, D399K y K409D (en las que las posiciones de aminoácidos están numeradas según el índice EU de Kabat).

9. Proteína de unión a antígeno según la reivindicación 1, caracterizada por que los dominios CH3 de la parte Fc de las cadenas pesadas modificadas de a) y los dominios CH3 de la parte Fc de las cadenas pesadas modificadas de b) son de isotipo diferente.
- 5 10. Proteína de unión a antígeno según la reivindicación 9, caracterizada por que los dominios CH3 de la parte Fc de las cadenas pesadas modificadas de a) son del isotipo IgG1, y los dominios CH3 de la parte Fc de las cadenas pesadas modificadas de b) son del isotipo IgA.
- 10 11. Proteína de unión a antígeno según la reivindicación 10, caracterizada por que comprende:
a) dos cadenas pesadas modificadas que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 7, y
b) dos cadenas pesadas modificadas que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 4.
- 15 12. Proteína de unión a antígeno según la reivindicación 10, caracterizada por que los dominios CH2 y CH3 de la parte Fc de las cadenas pesadas modificadas de a) son del isotipo IgG1, y los dominios CH2 y CH3 de la parte Fc de las cadenas pesadas modificadas de b) son del isotipo IgA.
- 20 13. Proteína de unión a antígeno monovalente según las reivindicaciones 1 a 11, caracterizada por que el dominio CH2 de las partes Fc de a) y b) son del isotipo IgG1 y la proteína de unión a antígeno se encuentra afucosilada, con una cantidad de fucosa de 80% o menos de la cantidad total de oligosacáridos (azúcares) en Asn297 es del isotipo IgG1 humano.
- 25 14. Composición farmacéutica que comprende una proteína de unión a antígeno según las reivindicaciones 1 a 13.
- 30 15. Proteína de unión a antígeno según las reivindicaciones 1 a 13, destinada a la utilización en el tratamiento del cáncer.
- 35 16. Utilización de proteína de unión a antígeno según las reivindicaciones 1 a 13 para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento del cáncer.
- 40 17. Método para la preparación de una proteína de unión a antígeno según las reivindicaciones 1 a 13, que comprende las etapas siguientes:
a) transformar una célula huésped con vectores que comprenden moléculas de ácidos nucleicos codificantes de una proteína de unión a antígeno según las reivindicaciones 1 a 13,
b) cultivar la célula huésped bajo condiciones que permiten la síntesis de dicha molécula de proteína de unión a antígeno, y
c) recuperar dicha molécula de proteína de unión a antígeno a partir de dicho cultivo.
18. Ácido nucleico codificante de una proteína de unión a antígeno según las reivindicaciones 1 a 13.
19. Vector que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 18.
20. Célula huésped que comprende el vector según la reivindicación 19.

Fig. 1A

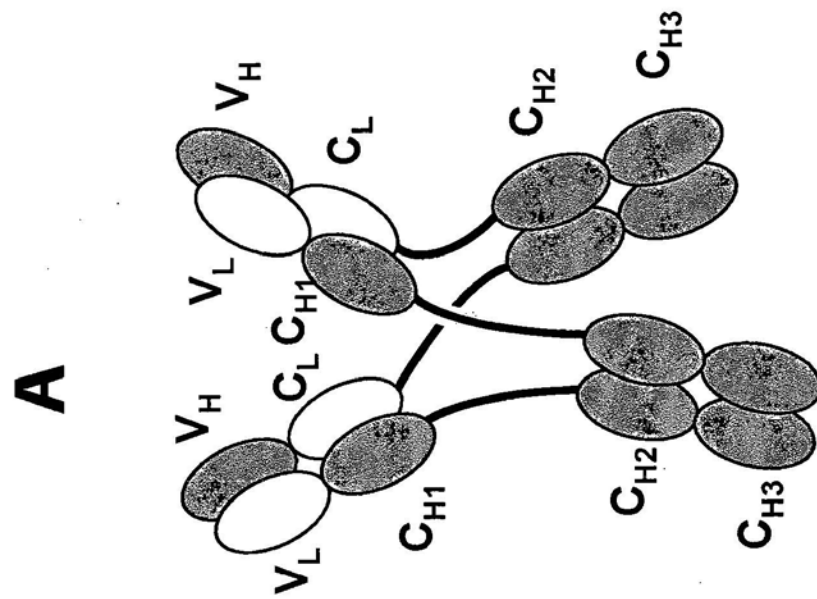


Fig. 1B

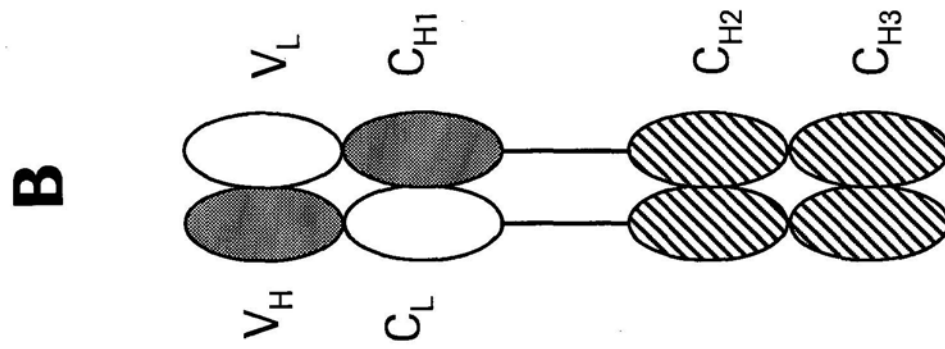


Fig. 1C

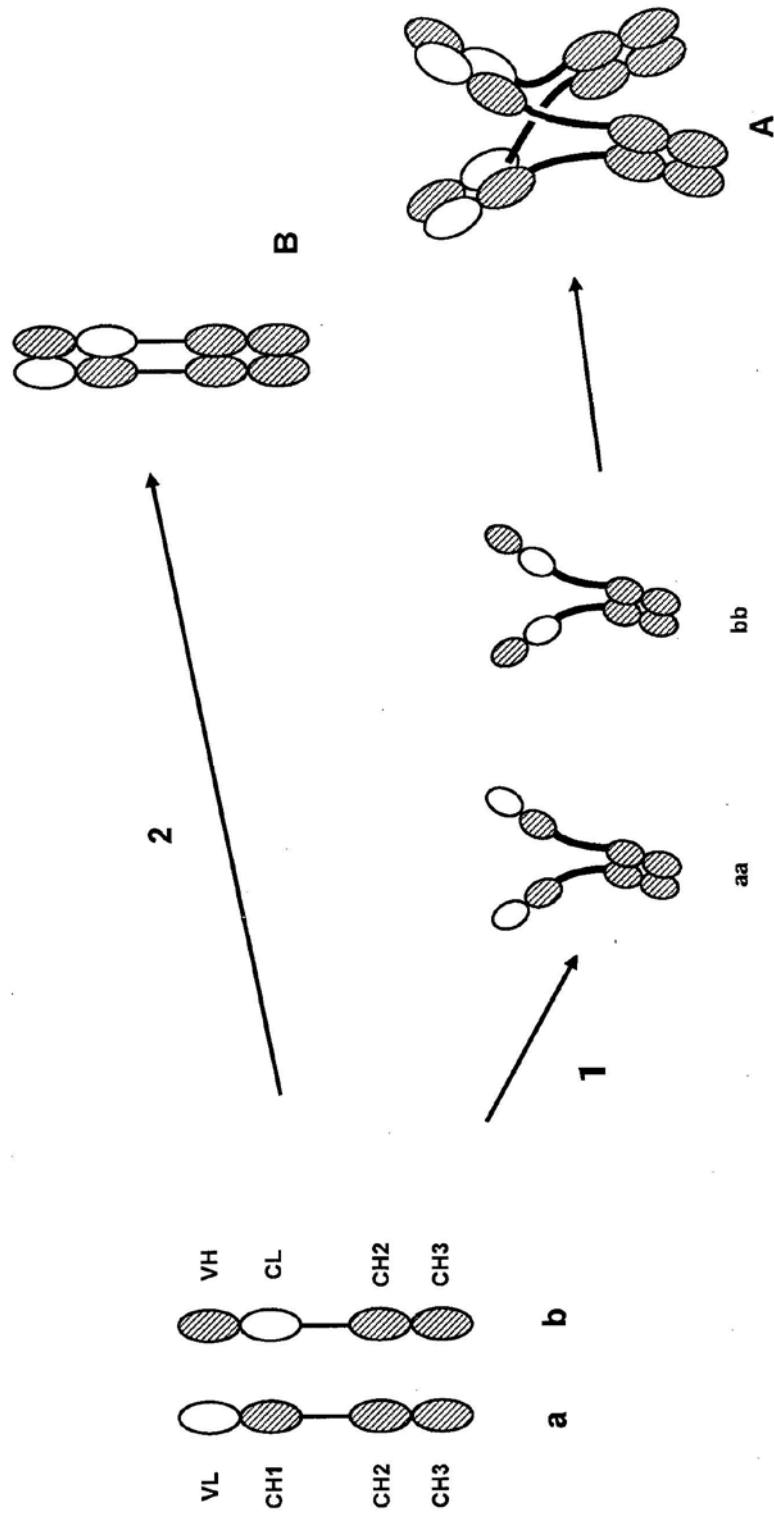


Fig. 2

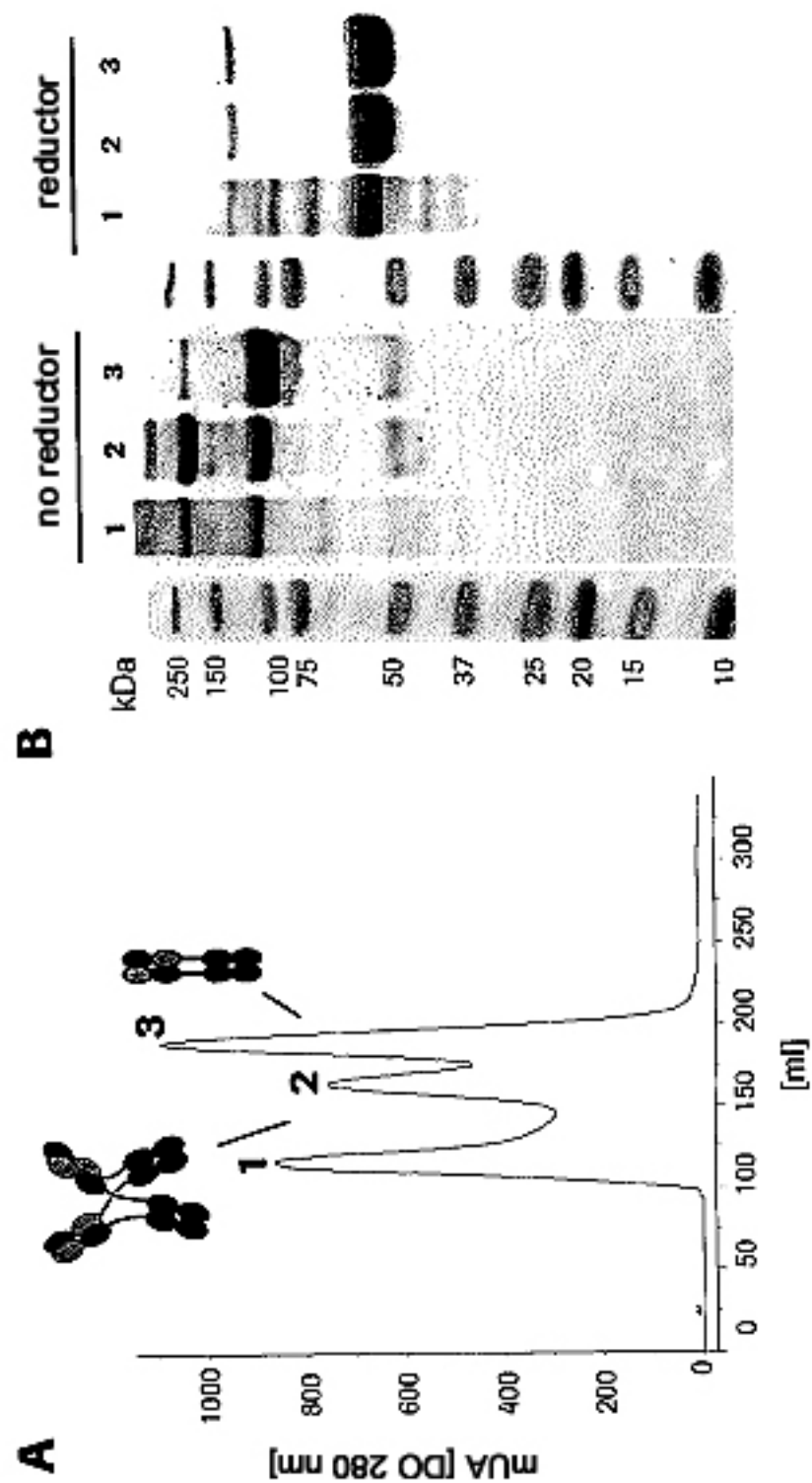


Fig. 3A y B

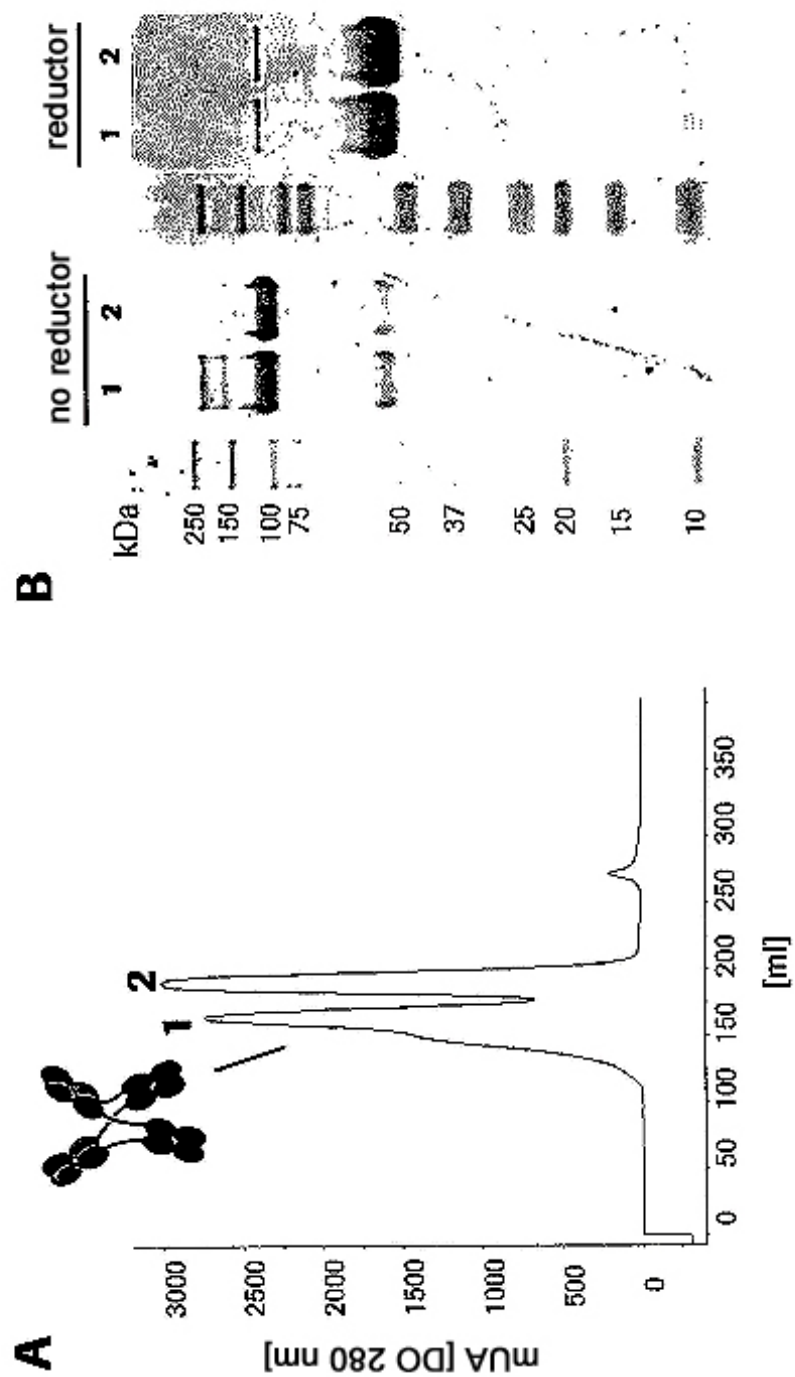


Fig. 3C

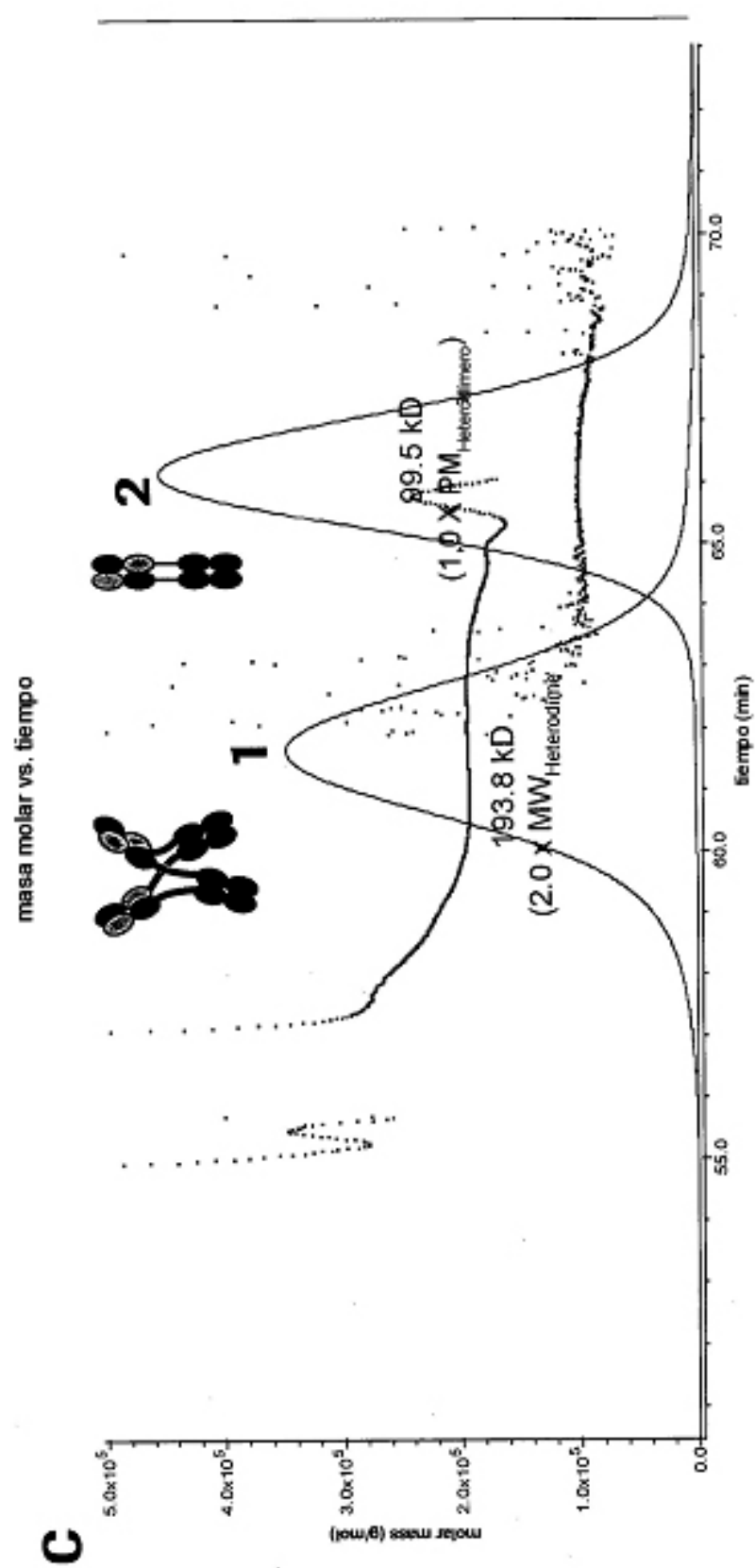


Fig. 4

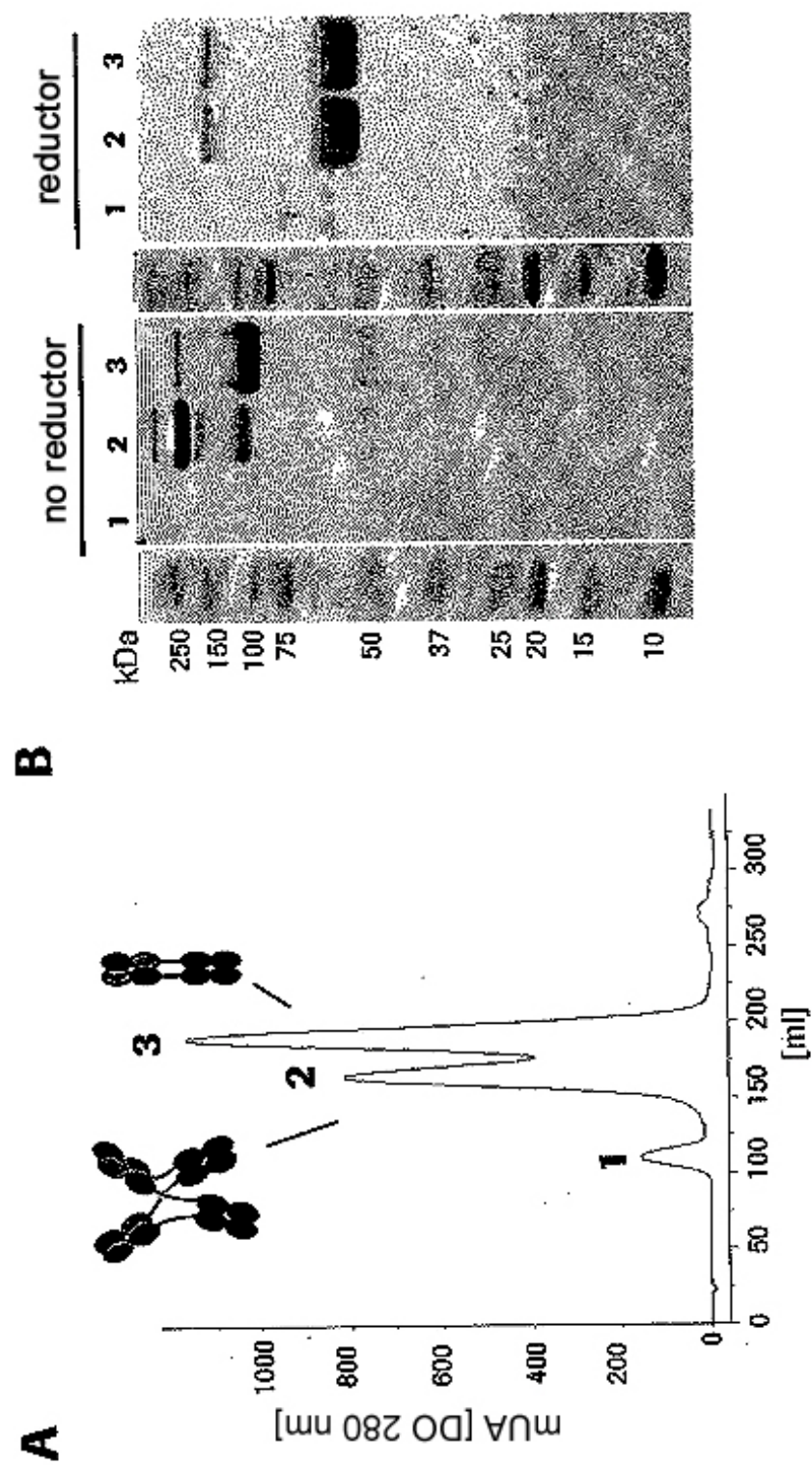


Fig. 5

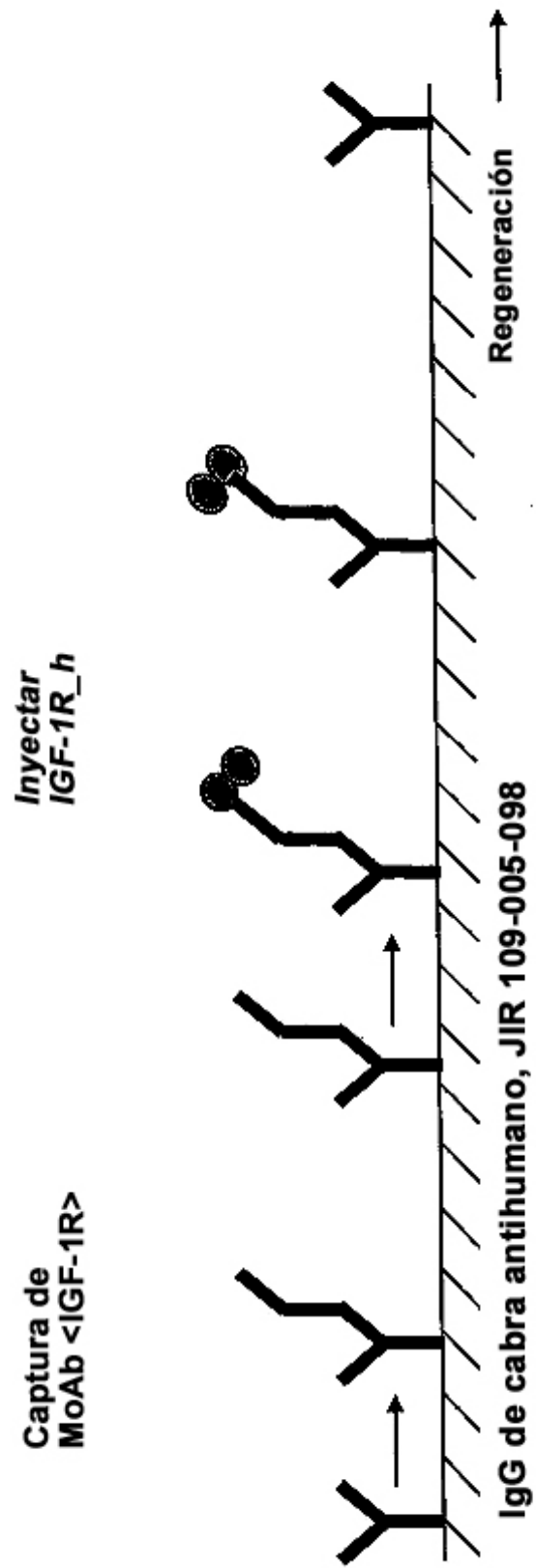


Fig. 6

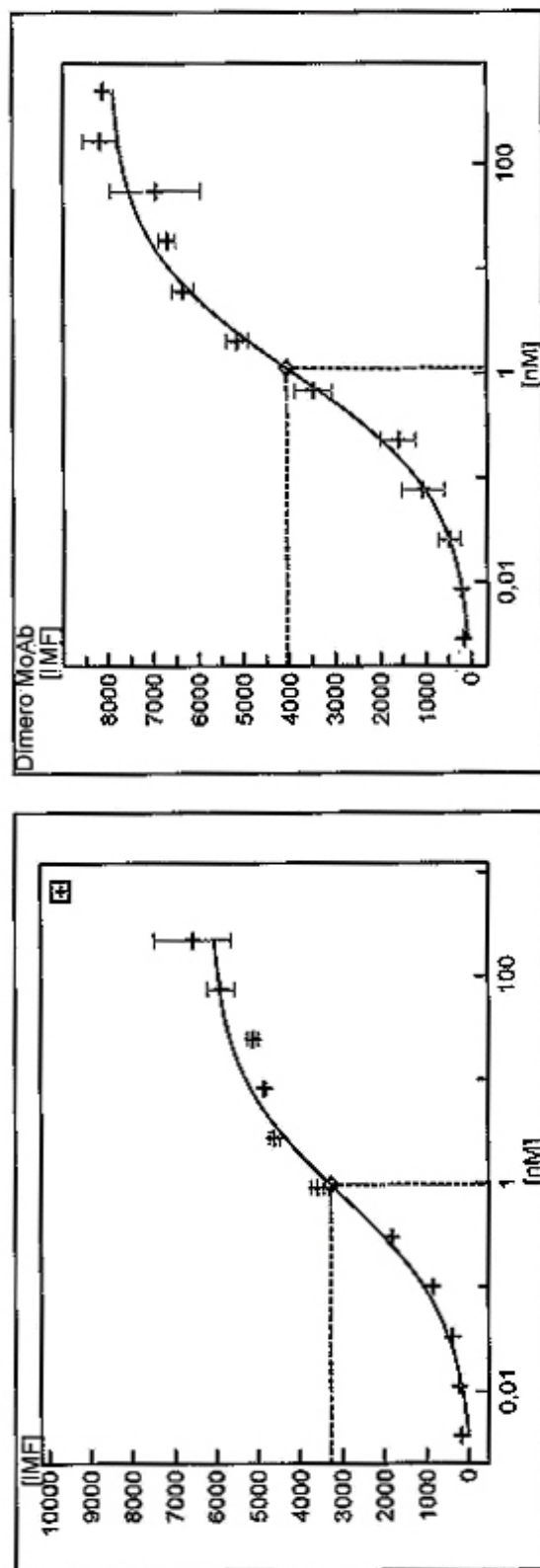


Fig. 7

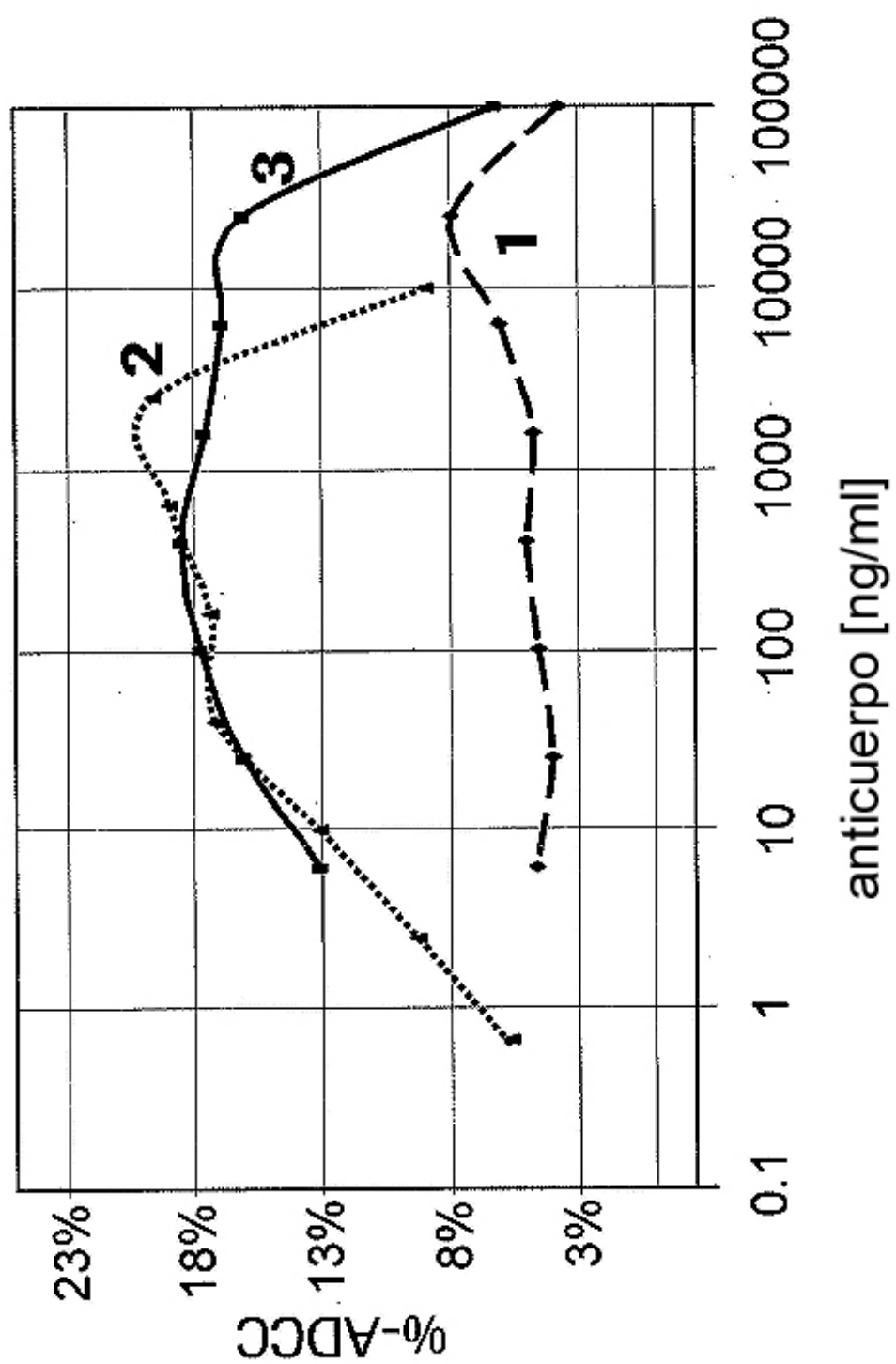


Fig. 8

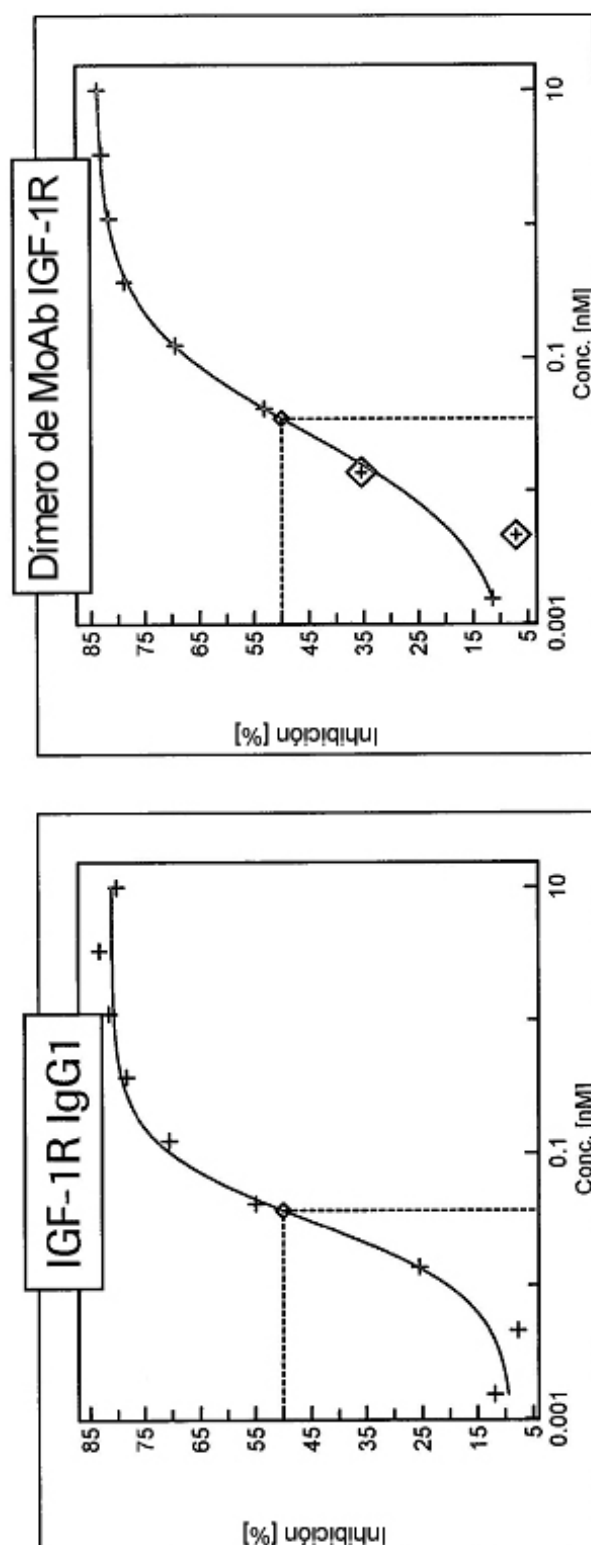


Fig. 9

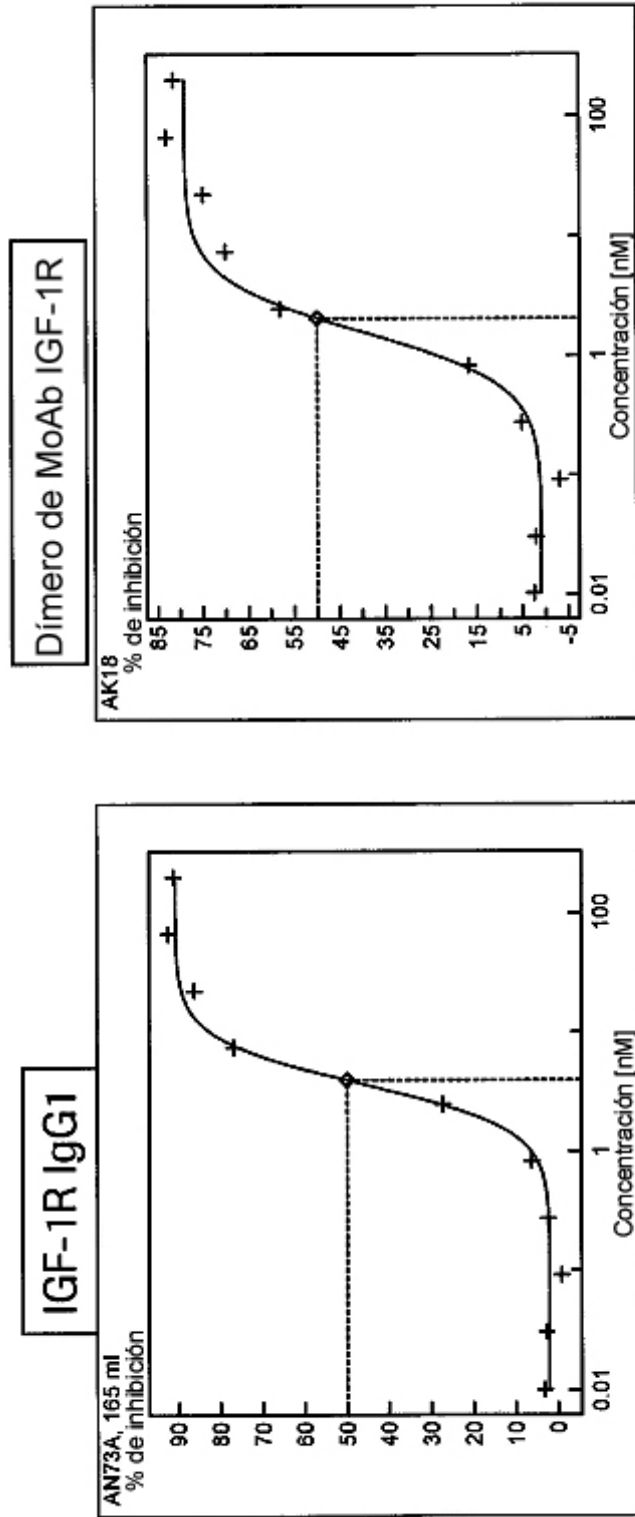


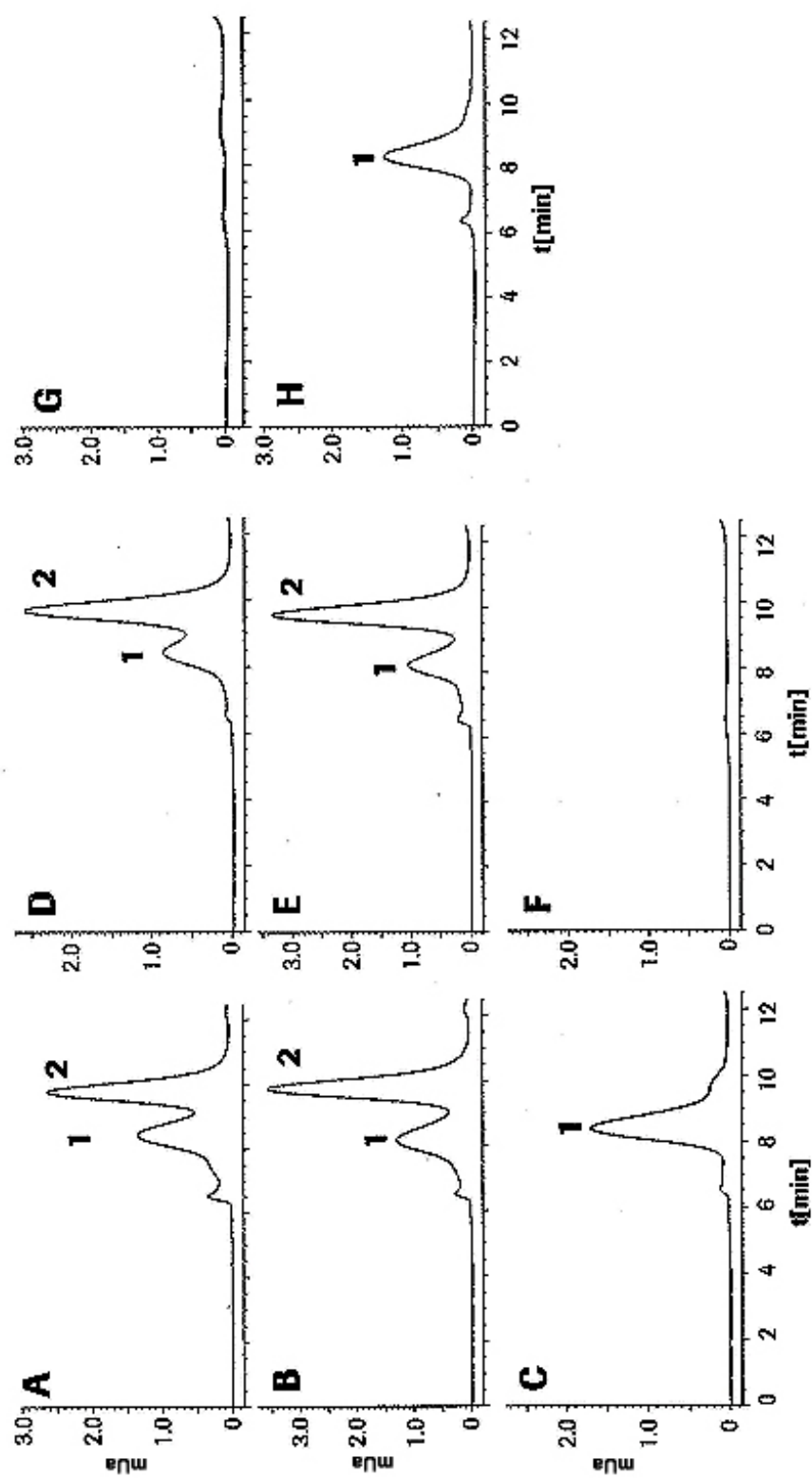
Fig. 10

Fig. 11

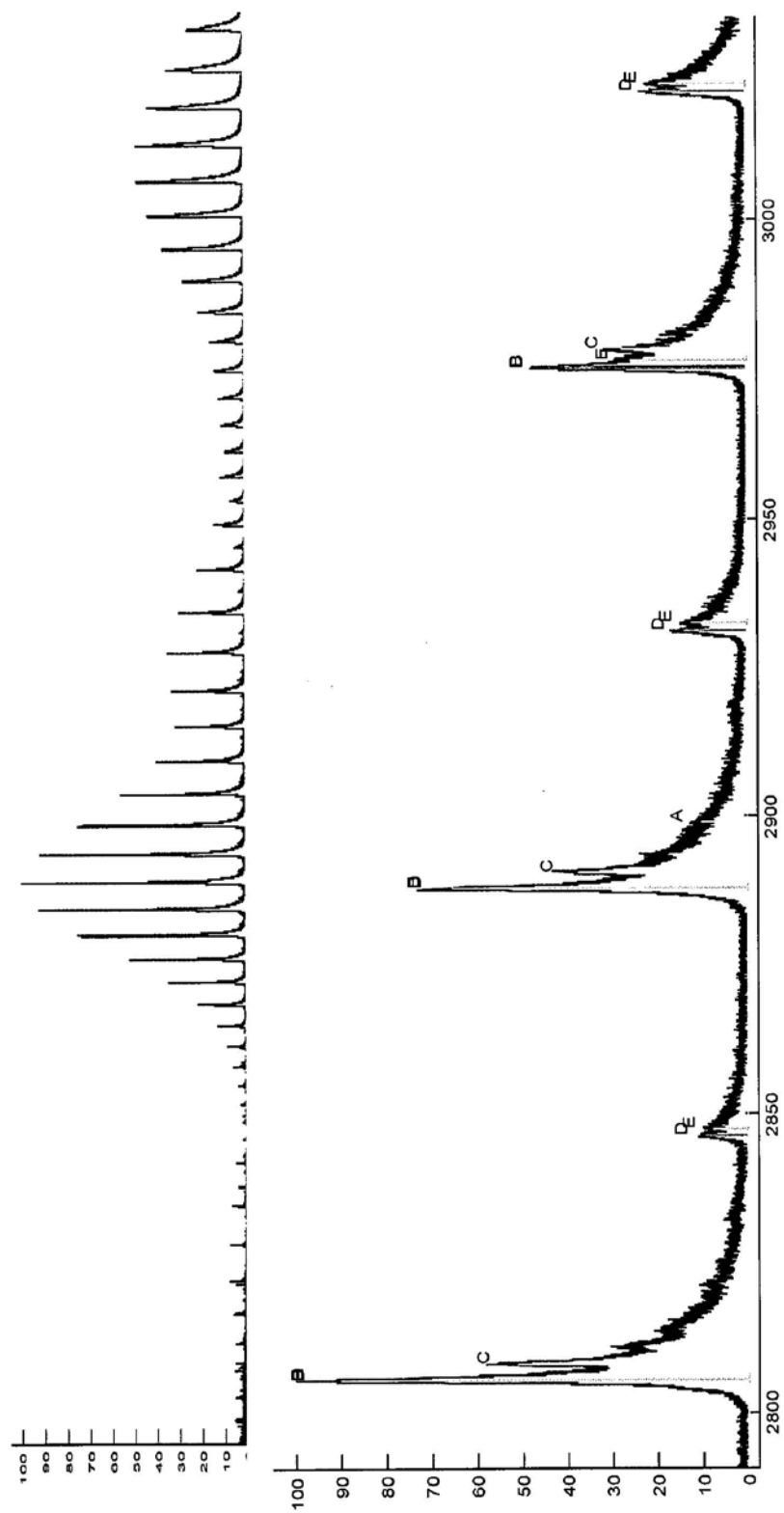


Fig. 12

