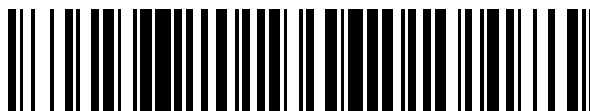


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 551 439**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.2004 E 04743158 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.09.2015 EP 1644412**

54 Título: **Fragmentos Fab de anticuerpos modificados**

30 Prioridad:

01.07.2003 GB 0315457

20.08.2003 GB 0319588

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.11.2015

73 Titular/es:

UCB BIOPHARMA SPRL (100.0%)

Allée de la Recherche 60

1070 Brussels, BE

72 Inventor/es:

HUMPHREYS, DAVID PAUL y

HEYWOOD, SAM PHILIP

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 551 439 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

Fragmentos Fab de anticuerpos modificados

La presente invención se refiere a fragmentos de anticuerpos mejorados y más específicamente proporciona fragmentos de anticuerpos mejorados a los cuales están ancladas una o más moléculas efectoras y a los métodos para su producción.

La alta especificidad y afinidad de las regiones variables de los anticuerpos los hacen agentes de diagnóstico y terapéuticos ideales, concretamente para modular las interacciones proteína:proteína. Se proporcionan fragmentos de anticuerpos por ser agentes terapéuticos versátiles, como se observa por el reciente éxito de productos tales como ReoPro®. Una expresión bacteriana de un fragmento Fab recombinante fue descrita por Tout N L et al., 1997, Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, vol. 4, núm. 2, 147-155. Se describieron fragmentos de anticuerpos terapéuticos con vidas medias in vivo prolongadas en Chapman A P et al., 1999, Nature Biotechnology, vol. 17, núm. 8, 780-783. La función de direccionamiento codificada en Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ y otros fragmentos de anticuerpos se puede utilizar directamente o se pueden conjugar con una o más moléculas efectoras tales como fármacos citotóxicos, toxinas o moléculas poliméricas para incrementar su eficacia. Por ejemplo, puesto que estos fragmentos carecen de una región Fc tienen una vida media circulante corta en animales pero esto se puede mejorar mediante conjugación con ciertos tipos de polímeros tales como polietileno glicol (PEG). Se ha demostrado que el incremento del tamaño del PEG conjugado aumenta la vida media circulante de minutos a muchas horas y se ha demostrado la modificación de un Fab' con PEG que oscila de 5 kDa a 100 kDa (Chapman et al., 1999, Nature Biotechnology, 17, 780-783; Leong et al., 2001, Cytokine, 16, 106-119; Chapman, 2002, Advanced Drug Delivery Reviews, 54, 531-545). Los fragmentos de anticuerpos PEGilados tales como CDP870 están siendo sometidos a pruebas clínicas en la actualidad en las que el efecto del PEG conjugado consiste en llevar la vida media circulante a niveles aceptables para la terapia.

Se pueden anclar moléculas efectoras a fragmentos de anticuerpos por medio de numerosos métodos diferentes, incluyendo a través de azúcares de aldehídos o más comúnmente a través de cualquier cadena lateral de aminoácido o grupo funcional de aminoácido terminal disponibles localizados en el fragmento de anticuerpo, por ejemplo cualquier grupo amino, imino, tiol, hidroxilo o carboxilo libre. El sitio de anclaje de las moléculas efectoras puede ser aleatorio o específico del sitio.

El anclaje aleatorio se logra a menudo a través de aminoácidos tales como lisina y esto da como resultado moléculas efectoras que están ancladas a numerosos sitios a lo largo de todo el fragmento de anticuerpo dependiendo de la posición de las lisinas. Si bien esto ha sido satisfactorio, en algunos casos no se pueden controlar la localización exacta y el número de moléculas efectoras ancladas y esto puede conducir a una pérdida de actividad por ejemplo si se anclan demasiadas pocas y/o a pérdida de afinidad si, por ejemplo, interfieren en el sitio de unión (Chapman 2002 Advanced Drug Delivery Reviews, 54, 531-545). Como resultado, normalmente el método de elección es el anclaje controlado de moléculas efectoras, específico del sitio.

El anclaje de moléculas efectoras específico del sitio se logra muy comúnmente por medio del anclaje de residuos de cisteína puesto que tales residuos son relativamente poco comunes en los fragmentos de anticuerpos. Las bisagras de los anticuerpos son regiones populares para el anclaje específico del sitio ya que éstas contienen residuos de cisteína y están alejadas de otras regiones del anticuerpo probablemente implicadas en la unión al antígeno. Las bisagras adecuadas existen naturalmente en el fragmento o se pueden crear utilizando técnicas de ADN recombinante (Véanse por ejemplo el documento US 5.677.425; el documento WO98/25971; Leong et al., 2001 Cytokine, 16, 106-119; Chapman et al., 1999 Nature Biotechnology, 17, 780-783). Alternativamente, o además, se pueden modificar cisteínas específicas del sitio en el fragmento de anticuerpo por ejemplo para crear una o varias cisteínas expuestas en la superficie (documento US 5.219.996).

Cuando las moléculas efectoras se van a anclar específicamente a un sitio a través de una cisteína, a menudo el tiol diana del fragmento de anticuerpo se protege terminalmente por medio de un pequeño producto peptídico relacionado con la fermentación tal como glutatión o se protege terminalmente de forma deliberada por medio de un aditivo químico utilizado durante la extracción y la purificación del fragmento de anticuerpo tal como ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB). Es necesario retirar estos agentes de protección terminal para activar el tiol diana (bisagra o superficie). Los fragmentos de anticuerpo tienen un enlace disulfuro intercatenario nativo entre las regiones constantes de la cadena pesada y ligera (C_H1 y C_L) que generalmente se ha considerado crítico en el mantenimiento de la estabilidad y en las propiedades de unión del anticuerpo. Como resultado la activación de la bisagra o el tiol de la superficie diana debe ser llevada a cabo con cierto cuidado de manera que el disulfuro inter C_L:C_H1 permanezca intacto. Por consiguiente se utilizan convencionalmente condiciones reductoras "suaves" para retirar el agente de protección terminal de tiol antes de la reacción con la molécula efectora. Esto se logra normalmente utilizando agentes reductores basados en tiol tales como β-mercaptoetanol (β-ME), β-mercaptoetilamina (β-MA) y ditiotreitól (DTT). No obstante, se sabe que cada uno de estos agentes reductores es capaz de reaccionar con y permanecer anclado a la cisteína que se pretende que reduzca (Begg y Speicher, 1999 Journal of Biomolecular techniques, 10,17-20) reduciendo de ese modo la eficacia del anclaje a la molécula efectora. Por lo tanto, después de la reducción y la reacción con las moléculas efectoras, una gran proporción de los fragmentos de anticuerpo no tienen moléculas efectoras ancladas y éstas tienen que ser purificadas de los

fragmentos de anticuerpos que tienen anclado el número correcto de moléculas efectoras. Esta escasa eficacia de modificación es claramente una desventaja durante la producción a gran escala de fragmentos de anticuerpos terapéuticos modificados en la que es importante alcanzar la máxima eficacia de producción.

5 La presente invención proporciona una nueva clase de fragmentos Fab de anticuerpos a los que se pueden anclar moléculas efectoras. Una ventaja concreta de estos fragmentos radica en los residuos de cisteína presentes en estos fragmentos que se pueden utilizar para el anclaje de moléculas efectoras específico del sitio evitando la necesidad de diseñar regiones bisagra modificadas y/o sustituciones de aminoácidos de la superficie. Cuando las moléculas efectoras se anclan a los fragmentos Fab de anticuerpos de la presente invención no hay enlaces covalentes intercatenarios entre la cadena pesada y ligera. A pesar de la ausencia de cualquier enlace covalente
10 entre la cadena pesada y ligera y el anclaje de moléculas efectoras, los fragmentos de la presente invención funcionan de manera comparable con los fragmentos de tipo salvaje en numerosos ensayos *in vitro* e *in vivo*. Sorprendentemente estos fragmentos novedosos tienen la misma afinidad para los antígenos y similar estabilidad *in vivo* e *in vitro* que los fragmentos de tipo salvaje. Una ventaja adicional de estos fragmentos radica en la facilidad de anclaje de las moléculas efectoras a los fragmentos, y en particular, en la eficacia del anclaje. Los fragmentos
15 proporcionan de este modo una alternativa de bajo coste a los fragmentos disponibles en la actualidad en la que los enlaces covalentes intercatenarios nativos se conservan después del anclaje de la molécula efectora.

De este modo, de acuerdo con la presente invención se proporciona un fragmento Fab de anticuerpo caracterizado porque dicha región constante de la cadena pesada termina en la cisteína intercatenaria de C_{H1}.

20 El fragmento Fab de anticuerpo de la presente invención puede ser cualquier par de cadena pesada y cadena ligera que tenga una región variable (V_H/M_L) y una región constante (C_H/C_L). Preferiblemente el par de cadena pesada y ligera es V_H/C_{H1} y V_L/C_L ligado covalentemente por medio de cisteínas intercatenarias en las regiones constantes de la cadena pesada y ligera. El término 'cisteína intercatenaria' según se utiliza en la presente memoria hace referencia a una cisteína en la región constante de la cadena pesada o ligera que podría unirse por medio de disulfuro a una cisteína en la correspondiente región constante de la cadena pesada o ligera codificada en un gen de anticuerpo de la línea germinal de origen natural. En particular, las cisteínas intercatenarias de la presente invención
25 son una cisteína en la región constante de la cadena ligera (C_L) y una cisteína en la primera región constante de la cadena pesada (C_{H1}) que están unidas por disulfuro entre sí en los anticuerpos de origen natural. Se pueden encontrar típicamente ejemplos de tales cisteínas en la posición 214 de la cadena ligera y en la 233 de la cadena pesada de la IgG1 humana, en la 127 de la cadena pesada de las IgM, IgE, IgG2, IgG3, IgG4 humanas y en la 128 de la cadena pesada de las IgD e IgA2B humanas, como definen Kabat et al., 1987, en Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, USA. En la IgG murina, se pueden encontrar cisteínas intercatenarias en la posición 214 de la cadena ligera y en la 235 de la cadena pesada. Se apreciará que las posiciones exactas de estas cisteínas pueden variar con respecto a las de los anticuerpos de origen natural si se ha realizado cualquier modificación, tal como delecciones, inserciones y/o sustituciones en el
30 fragmento Fab del anticuerpo.

En el fragmento Fab de anticuerpo de la presente invención la región constante de la cadena pesada termina en la cisteína intercatenaria de C_{H1}. Por lo tanto, el último aminoácido en el dominio C_{H1} del fragmento Fab de anticuerpo de la presente invención es una cisteína. El fragmento Fab de anticuerpo de la presente invención en el que el dominio C_{H1} está truncado se puede preparar mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por
40 ejemplo, el fragmento Fab de anticuerpo de la presente invención se puede obtener a partir de cualquier anticuerpo completo, especialmente un anticuerpo monoclonal completo, utilizando cualquier técnica de escisión enzimática y/o digestión, por ejemplo mediante tratamiento con pepsina o papaína y proteasas c-terminales. Preferiblemente el fragmento Fab de anticuerpo de la presente invención se prepara mediante el uso de técnicas de ADN recombinante que implican la manipulación y re-expresión de ADN que codifica regiones variables y constantes de anticuerpos. Se pueden utilizar técnicas convencionales de la biología molecular para modificar, añadir o suprimir aminoácidos o dominios adicionales si se desea. Cualquier alteración de las regiones variables o constantes todavía está incluida en los términos región 'variable' y 'constante' según se utilizan en la presente memoria. Preferiblemente se utiliza la PCR para introducir un codón de parada inmediatamente después del codón que codifica la cisteína intercatenaria de C_{H1}, de manera que la traducción del dominio C_{H1} se detiene en la cisteína intercatenaria. Los métodos para diseñar cebadores de PCR adecuados son bien conocidos en la técnica y las secuencias de los dominios C_{H1} de los anticuerpos son fácilmente asequibles (Kabat *et al.*, *supra*). Alternativamente se pueden introducir codones de parada utilizando técnicas de mutagénesis dirigida al sitio tales como las descritas en White (Ed.), PCR Protocols: Current Methods and Applications (1993). El material de partida del fragmento de anticuerpo de la presente invención puede derivar de cualquier isotipo de anticuerpo incluyendo por ejemplo IgG, IgM, IgA, IgD e IgE y las subclases de los mismos incluyendo por ejemplo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Preferiblemente el fragmento Fab de anticuerpo de la presente invención deriva de IgG1. El material de partida del fragmento de anticuerpo se puede obtener de cualquier especie incluyendo por ejemplo ratón, rata, conejo, cerdo, hámster, camello, llama, cabra o ser humano. Las porciones del fragmento de anticuerpo se pueden obtener de más de una especie, por ejemplo los fragmentos de anticuerpo pueden ser quiméricos. En un ejemplo las regiones constantes son de una especie y las regiones variables de otra. El material de partida del fragmento de anticuerpo también se puede modificar. En un ejemplo la región variable del fragmento de anticuerpo ha sido creada utilizando técnicas de modificación de ADN recombinante. Tales versiones modificadas incluyen aquellas creadas por ejemplo a partir de regiones variables de anticuerpos naturales por medio de inserciones, delecciones o cambios en o para las secuencias de aminoácidos de
55
60

los anticuerpos naturales. Los ejemplos concretos de este tipo incluyen aquellos dominios de la región variable modificada que contienen al menos una CDR y opcionalmente uno o más aminoácidos marco de un anticuerpo y el resto del dominio de la región variable de un segundo anticuerpo. Los métodos para crear y fabricar estos fragmentos de anticuerpos son bien conocidos en la técnica (véanse por ejemplo, Boss et al., documento US 4.816.397; Cabilly et al., documento US 6.331.415; Shrader et al., documento WO 92/02551; Orlandi et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 3833; Riechmann et al., 1988, Nature, 322, 323; Queen et al., documento US 5.585.089; Adair, documento WO91/09967; Mountain y Adair, 1992, Biotechnol. Genet. Eng. Rev, 10, 1-142; Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181).

El fragmento de anticuerpo de la presente invención será capaz en general de unirse selectivamente a un antígeno. El antígeno puede ser cualquier antígeno asociado a una célula, por ejemplo un antígeno de la superficie celular sobre células tales como células bacterianas, células de levadura, células T, células endoteliales o células tumorales, o puede ser un antígeno soluble. Los antígenos también pueden ser cualquier antígeno médicamente relevante tal como aquellos antígenos regulados al alza durante una enfermedad o infección, por ejemplo receptores y/o sus correspondientes ligandos. Los ejemplos concretos de los antígenos de la superficie celular incluyen moléculas de adherencia, por ejemplo integrinas tales como integrinas $\beta 1$ p. ej. VLA-4, E-selectina, P selectina o L-selectina, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, C11a, CD11b, CD18, CD19, CD20, CD23, CD25, CD33, CD38, CD40, CD45, CDW52, CD69, antígeno carcinoembrionario (CEA), globulina de grasa de leche humana (HMFG1 y 2), antígenos de MHC Clase I y MHC Clase II, y VEGF, y cuando sea apropiado, los receptores de los mismos. Los antígenos solubles incluyen interleuquinas tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, IL-16 o IL-17, antígenos virales, por ejemplo antígenos de virus respiratorio sincitial o citomegalovirus, inmunoglobulinas, tales como IgE, interferones tales como interferón α , interferón β o interferón γ , factor de necrosis tumoral α , factor de necrosis tumoral β , factores estimuladores de colonias tales como G-CSF o GM-CSF, y factores de crecimiento derivados de plaquetas tales como PDGF- α , y PDGF- β y cuando sea apropiado los receptores de los mismos.

La presente invención proporciona un fragmento Fab de anticuerpo caracterizado porque la región constante de la cadena pesada termina en la cisteína intercatenaria de C_H1 . En una realización las regiones constantes de la cadena pesada y la cadena ligera derivan de IgG1 humana. En una realización la presente invención proporciona un fragmento Fab de anticuerpo en el que la región constante de la cadena pesada comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos proporcionada en el SEQ ID NO: 1. La presente invención también proporciona un fragmento Fab de anticuerpo en el que la región constante de la cadena pesada comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos proporcionada en el SEQ ID NO: 1 y la región constante de la cadena ligera comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos proporcionada en el SEQ ID NO: 2. Todas las secuencias y sus SEQ ID número se proporcionan en la Figura 5.

En otra realización las regiones constantes de la cadena pesada y ligera derivan de IgG1 murina. En este aspecto la presente invención proporciona un fragmento Fab de anticuerpo en el que la región constante de la cadena pesada comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos proporcionada en el SEQ ID NO: 3. La presente invención también proporciona un fragmento Fab de anticuerpo en el que la región constante de la cadena pesada comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos proporcionada en el SEQ ID NO: 3 y la región constante de la cadena ligera comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos proporcionada en el SEQ ID NO: 4.

La presente invención también proporciona un fragmento Fab de anticuerpo en donde la región constante de la cadena pesada comprende o consiste en una secuencia que tiene una identidad o similitud de al menos 90% con la secuencia proporcionada en el SEQ ID NO: 1.

"Identidad", según se utiliza en la presente memoria, indica que en cualquier posición concreta en las secuencias alineadas, el residuo de aminoácido es idéntico entre las secuencias. "Similitud", según se utiliza en la presente memoria, indica que, en cualquier posición concreta en las secuencias alienadas, el residuo de aminoácido es de un tipo similar entre las secuencias. Por ejemplo, la leucina puede ser sustituida por isoleucina o valina. Otros aminoácidos que se pueden sustituir a menudo por otro incluyen, pero no se limitan a:

- fenilalanina, tirosina y triptófano (aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas);
- lisina, arginina e histidina (aminoácidos que tienen cadenas laterales alcalinas);
- aspartato y glutamato (aminoácidos que tienen cadenas laterales ácidas);
- asparragina y glutamina (aminoácidos que tienen cadenas laterales de amida); y
- cisteína y metionina (aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre).

Los grados de identidad y similitud se pueden calcular fácilmente (Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing. Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Parte 1, Griffin, A.M., y Griffin, H.G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991).

Preferiblemente, el fragmento Fab de anticuerpo de este aspecto de la presente invención comprende una cadena pesada, en donde la región constante de la cadena pesada comprende una secuencia que tiene una identidad o similitud de al menos 90%, 95% o 98% con la secuencia proporcionada en el SEQ ID NO: 1.

5 La presente invención también proporciona un fragmento Fab de anticuerpo en donde la región constante de la cadena pesada comprende o consiste en una secuencia que tiene una identidad o similitud de al menos 90% con la secuencia proporcionada en el SEQ ID NO: 1 y la región constante de la cadena ligera que comprende o consiste en una secuencia que tiene una identidad o similitud de al menos 90% con la secuencia proporcionada en el SEQ ID NO: 2. Preferiblemente, el fragmento Fab de anticuerpo de este aspecto de la presente invención comprende una
10 cadena pesada, en donde la región constante de la cadena pesada comprende una secuencia que tiene una identidad o similitud de al menos 90%, 95% o 98% con la secuencia proporcionada en el SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera en donde la región constante de la cadena ligera comprende una secuencia que tiene una identidad o similitud de al menos 90%, 95% o 98% con la secuencia proporcionada en el SEQ ID NO: 2.

15 La presente invención también proporciona un fragmento Fab de anticuerpo en donde la región constante de la cadena pesada comprende o consiste en una secuencia que tiene una identidad o similitud de al menos 90% con la secuencia proporcionada en el SEQ ID NO: 3. En una realización, la presente invención proporciona un fragmento Fab de anticuerpo en donde la región constante de la cadena pesada comprende o consiste en una secuencia que tiene una identidad o similitud de al menos 90% con la secuencia proporcionada en el SEQ ID NO: 3 y la región constante de la cadena ligera comprende o consiste en una secuencia que tiene una identidad o similitud de al menos 90% con la secuencia proporcionada en el SEQ ID NO: 4. Preferiblemente, el fragmento Fab de anticuerpo
20 de este aspecto de la presente invención comprende una cadena pesada, en donde la región constante de la cadena pesada comprende una secuencia que tiene una identidad o similitud de al menos 90%, 95% o 98% con la secuencia proporcionada en el SEQ ID NO: 3 y una cadena ligera en donde la región constante de la cadena ligera comprende una secuencia que tiene una identidad o similitud de al menos 90%, 95% o 98% con la secuencia proporcionada en el SEQ ID NO: 4.

25 Las secuencias de ácido nucleico que codifican las secuencias de aminoácidos proporcionadas en los SEQ ID NO: 1-4 se pueden diseñar utilizando métodos conocidos en la técnica. En una realización la invención proporciona secuencias de ADN aisladas que codifican las regiones constantes de la cadena pesada y/o ligera proporcionadas en los SEQ ID NO: 1-4. En una realización las secuencias de ácido nucleico que codifican las secuencias de aminoácidos proporcionadas en los SEQ ID NO: 1, 2, 3 y 4 son aquellas dadas en los SEQ ID NO: 5, 6, 7 y 8
30 respectivamente.

La presente invención también se refiere a un vector de clonación o de expresión que comprende una o más secuencias de ADN de la presente invención. Por consiguiente, se proporciona un vector de clonación o expresión que comprende una o más secuencias de ADN que codifican un fragmento Fab de anticuerpo de la presente invención. En particular los vectores de clonación o expresión de la presente invención comprenden una o más
35 secuencias de ADN que codifican las regiones constantes de anticuerpos de la presente invención, proporcionadas en los SEQ ID NO: 5-8. En una realización el vector comprende la secuencia proporcionada en el SEQ ID NO: 5 y el SEQ ID NO: 6. En otra realización el vector comprende la secuencia proporcionada en el SEQ ID NO: 7 y el SEQ ID NO: 8.

40 Los métodos generales por medio de los cuales se pueden construir los vectores, los métodos de transfección y los métodos de cultivo son bien conocidos por los expertos en la técnica. A este respecto, se hace referencia a "Current Protocols in Molecular Biology", 1999, F. M. Ausubel (ed), Wiley Interscience, Nueva York y a Maniatis Manual producido por Cold Spring Harbor Publishing

45 Asimismo se proporciona en la presente invención una célula anfitriona que expresa un fragmento Fab de anticuerpo en el que el dominio C_H1 termina en la cisteína intercatenaria. Se puede utilizar cualquier sistema de célula anfitriona/vector adecuado para la expresión de las secuencias de ADN que codifican el Fab de anticuerpo de la presente invención. Asimismo se proporciona por lo tanto una célula anfitriona que comprende uno o más vectores de clonación o expresión que comprenden una o más secuencias de ADN que codifican un fragmento de anticuerpo de la presente invención. En particular las células anfitrionas que comprenden vectores de clonación o expresión de la presente invención que comprenden una o más secuencias de ADN que codifican las regiones constantes de los anticuerpos de la presente invención, se proporcionan en los SEQ ID NO: 5-8. Se pueden utilizar sistemas bacterianos, por ejemplo *E. coli*, y otros sistemas microbianos o eucarióticos, por ejemplo también se pueden utilizar sistemas de expresión de células anfitrionas de mamífero. Las cepas de *E. coli* adecuadas para su uso en la presente invención pueden ser cepas de origen natural o cepas mutadas capaces de producir proteínas recombinantes. Los ejemplos de las cepas de *E. coli* anfitrionas específicas incluyen MC4100, TG1, TG2, DHB4, DH5α, DH1, BL21, XL1Blue y W3110 (ATCC 27,325). Las células anfitrionas de mamífero adecuadas incluyen las células CHO, de mieloma o de hibridoma. También se proporciona un método de producción del fragmento Fab de anticuerpo de la presente invención que comprende cultivar la célula anfitriona que expresa el fragmento Fab de anticuerpo de la presente invención y aislar dicho fragmento. Una vez producido en la célula anfitriona el fragmento Fab de anticuerpo puede ser extraído y purificado utilizando cualquier método adecuado conocido en la técnica. Se
50 puede utilizar la extracción con calor como se describe en el documento US 5.665.866 debido a la presencia del enlace disulfuro intercatenario. Los métodos de purificación adecuados incluyen, pero no se limitan a, cromatografía
55
60

de exclusión por tamaño, de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad con proteína A, G o L e intercambio iónico.

Si se desea, el fragmento Fab de anticuerpo de la presente invención puede tener una o más moléculas efectoras ancladas a él. El término molécula efectora según se utiliza en la presente memoria incluye, por ejemplo, agentes antineoplásicos, fármacos, toxinas (tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano o vegetal y fragmentos de las mismas p. ej. ricina y fragmentos de la misma), proteínas biológicamente activas, por ejemplo enzimas, otros anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, polímeros sintéticos o de origen natural, ácidos nucleicos y fragmentos de los mismos p. ej. ADN, ARN y fragmentos de los mismos, radionúclidos, concretamente yodo radiactivo, radioisótopos, metales quelados, nanopartículas y grupos informadores tales como compuestos fluorescentes o compuestos que pueden ser detectados por medio de RMN o espectroscopía ESR.

Los agentes antineoplásicos concretos incluyen agentes citotóxicos o citostáticos, por ejemplo agentes alquilantes, tales como mostazas nitrogenadas (p. ej. clorambucilo, melfalán, mecloretamina, ciclosfosfamida, o mostaza de uracilo) y derivados de los mismos, trietilenfosforamida, trietileno fosforamida, busulfán, o cisplatino; antimetabolitos, tales como metotrexato, fluorouracilo, floxuridina, citarabina, mercaptopurina, tioguanina, ácido fluoroacético, o ácido fluorocítrico, antibióticos, tales como bleomicinas (p. ej. sulfato de bleomicina), doxorubicina, daunorrubicina, mitomicinas (p. ej. mitomicina C), actinomicinas (p. ej. dactinomicina), plicamina, caliqueamicina y derivados de los mismos, o esperamicina y derivados de la misma; inhibidores mitóticos, tales como etoposido, vincristina o vinblastina y derivados de los mismos; alcaloides tales como elipticina; polioles tales como taxicina I o taxicina II; hormonas, tales como andrógenos (p. ej. dromostanolona o testolactona), progestinas (p. ej. acetato de megestrol o acetato de medroxiprogesterona), estrógenos (p. ej. difosfato de dimetilestilbestrol, fosfato de poliestradiol o fosfato de estramustina) o antiestrógenos (p. ej. tamoxifeno); antraquinonas, tales como mitoxantrona, ureas, tales como hidroxíurea; hidrazinas, tales como procarbazona; o imidazoles, tales como dacarbazina.

Los metales quelados incluyen quelatos de metales di- o trivalentes que tienen un número de coordinación de 2 a 8 inclusive. Los ejemplos concretos de tales metales incluyen tecnecio (Tc), rhenio (Re), cobalto (Co), cobre (Cu), oro (Au), plata (Ag), plomo (Pb), bismuto (Bi), indio (In), galio (Ga), ytrio (Y), terbio (Tb), gadolinio (Gd), y escandio (Sc). En general el metal es preferiblemente un radionúclido. Los radionúclidos concretos incluyen ^{99m}Tc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{58}Co , ^{60}Co , ^{67}Cu , ^{195}Au , ^{199}Au , ^{110}Ag , ^{203}Pb , ^{206}Bi , ^{207}Bi , ^{111}In , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{88}Y , ^{90}Y , ^{160}Tb , ^{153}Gd y ^{47}Sc .

El metal quelado puede ser por ejemplo uno de los tipos anteriores de metales quelados con cualquier agente quelante polidentado adecuado, por ejemplo poliaminas acíclicas o cíclicas, poliéteres, (p. ej. éteres corona y derivados de los mismos); poliamidas; porfirinas; y derivados carbocíclicos.

En general, el tipo de agente quelante dependerá del metal en uso. Un grupo particularmente útil de agentes quelantes en los productos conjugados de acuerdo con la invención, sin embargo, son las poliaminas acíclicas y cíclicas, especialmente ácidos poliaminocarboxílicos, por ejemplo ácido dietilentriaminopentaacético y los derivados del mismo, y las aminas macrocíclicas, p. ej. derivados cíclicos tri-azoicos y tetra-azoicos (por ejemplo como se describe en la Memoria de Patente Internacional Núm. WO 92/22583); y las poliamidas, especialmente desferrioxamina y los derivados de la misma.

Otras moléculas efectoras incluyen proteínas, péptidos y enzimas. Las enzimas de interés incluyen, aunque sin limitación, enzimas proteolíticas, hidrolasas, liasas, isomerasas, transferasas. Las proteínas, polipéptidos y péptidos de interés incluyen, aunque sin limitación, inmunoglobulinas, toxinas tales como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas, o toxina de la difteria, una proteína tal como la insulina, factor de necrosis tumoral, interferón α , interferón β , factor de crecimiento de nervio, factor de crecimiento derivado de plaqueta o activador de plasminógeno de tejido, un agente trombótico o un agente anti-angiogénico, p.ej., angioestatina o endostatina, o un modificador de la respuesta biológica tal como una linfoquina, interleuquina 1 (IL-1), interleuquina 2 (IL-2), interleuquina 6 (IL-6), factor estimulante de colonia de granulocitos macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonia de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento nervioso (NGF) u otro factor de crecimiento e inmunoglobulinas.

Otras moléculas efectoras pueden incluir sustancias detectables útiles por ejemplo en diagnosis. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, núclidos radioactivos, metales emisores de positrones (para uso en tomografía de emisión de positrones), e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. Véase en general la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.741.900 para los iones metálicos que se pueden conjugar con anticuerpos para su uso como agentes de diagnóstico. Las enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, o acetilcolinesterasa; los grupos protéticos adecuados incluyen estreptavidina, avidina y biotina; los materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo y ficococitrina; los materiales luminiscentes adecuados incluyen luminol; los materiales bioluminiscentes adecuados incluyen luciferasa, luciferina y acorina; y los núclidos radiactivos adecuados incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In y ^{99}Tc .

Los polímeros naturales o sintéticos para su uso como moléculas efectoras incluyen, por ejemplo polímeros de polialquileño, polialquilenilo, o polioxialquileño de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituidos o polisacáridos ramificados o no ramificados, p. ej. un homo- o hetero- polisacárido tal como lactosa, amilosa, dextrano

o glicógeno.

Los sustituyentes opcionales particulares que pueden estar presentes en los polímeros sintéticos mencionados antes incluyen uno o más grupos hidroxilo, metilo o metoxi. Los ejemplos concretos de polímeros sintéticos incluyen poli(etilenglicol), poli(propilenglicol), poli(alcohol vinílico) de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituidos o derivados de los mismos, especialmente poli(etilenglicol) opcionalmente sustituido tal como metoxipoli(etilenglicol) o los derivados del mismo.

Se pretende que "derivados" según se utiliza en la presente memoria incluya derivados reactivos, por ejemplo grupos reactivos selectivos de tiol tales como un ácido o éster α -halocarboxílico, p. ej. yodoacetamida, una imida, p. ej. maleimida, una vinilsulfona o disulfuro maleimidado y similares. El grupo reactivo puede estar unido directamente o a través de un segmento conector al polímero. Cabe destacar que el residuo de dicho grupo en algunos casos formará parte del producto, como grupo de unión entre el fragmento de anticuerpo y el polímero.

El tamaño del polímero se puede variar según se desee, pero generalmente estará en un intervalo de peso molecular de 500 Da a 50.000 Da, preferiblemente de 5.000 a 40.000 Da y más preferiblemente de 10.000 a 40.000 Da y 20.000 a 40.000 Da. En particular, el tamaño del polímero se puede seleccionar en base al uso pretendido para el producto, por ejemplo, la capacidad para localizarse en determinados tejidos tales como tumores o prolongar la vida media en circulación (para una revisión, véase Chapman, 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 531-545). De este modo, por ejemplo, cuando se pretende que el producto deje la circulación y penetre en el tejido, por ejemplo para su uso en el tratamiento de un tumor, puede resultar ventajoso utilizar un polímero de peso molecular pequeño, por ejemplo con un peso molecular de alrededor de 5.000 Da. Para las aplicaciones en las que el producto permanece en la circulación, puede ser ventajoso utilizar un polímero de peso molecular superior, por ejemplo con un peso molecular en el intervalo de 20.000 Da a 40.000 Da.

Los polímeros particularmente preferidos incluyen un polímero de polialquileno, tal como un poli(etilenglicol) o, especialmente, un metoxipoli(etilenglicol) o un derivado del mismo, y especialmente con un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 10.000 Da a aproximadamente 40.000 Da.

Los polímeros de la presente invención se pueden obtener comercialmente (por ejemplo de Nippon Oil and Fats; Nektar Therapeutics) o se pueden preparar a partir de materiales de partida disponibles en el mercado utilizando procedimientos químicos convencionales.

Las moléculas efectoras se pueden anclar utilizando procedimientos químicos o de ADN recombinante convencionales en los que el fragmento de anticuerpo está conectado o bien directamente o bien a través de un agente de acoplamiento a la molécula efectora. Las técnicas para conjugar dichas moléculas efectoras a anticuerpo son bien conocidas en la técnica (véase, Hellstrom et al., *Controlled Drug Delivery*, 2ª Ed., Robinson et al., eds., 1987, pág. 623-53; Thorpe et al., 1982, *Immunol. Rev.*, 62:119-58 y Dubowchik et al., 1999, *Pharmacology and Therapeutics*, 83, 67-123). Los procedimientos químicos concretos incluyen por ejemplo aquellos descritos en las Memorias de Patente Internacional Números WO 93/06231, WO92/22583, WO90/09195, WO89/01476, WO9915549 y WO03031581. Alternativamente, cuando la molécula efectora es una proteína o un polipéptido la conexión se puede lograr utilizando procedimientos de ADN recombinante, por ejemplo como se describe en la Memoria de Patente Europea Núm. 392745.

Las moléculas efectoras se pueden anclar al fragmento de anticuerpo de la presente invención por medio de cualquier cadena lateral de aminoácido o grupo funcional de aminoácido terminal disponible localizado en el fragmento de anticuerpo, por ejemplo cualquier grupo amino, imino, tiol, hidroxilo o carboxilo libre. Tales aminoácidos pueden existir naturalmente en el fragmento de anticuerpo o se pueden modificar en el fragmento utilizando métodos de ADN recombinante. Véase por ejemplo el documento US 5.219.996. Preferiblemente las moléculas efectoras se conectan covalentemente a través de un grupo tiol de un residuo de cisteína localizado en el fragmento de anticuerpo, ya sea natural o modificado. El enlace covalente generalmente será un enlace de disulfuro o, en particular, un enlace azufre-carbono. Cuando se usa un grupo tiol como punto de unión se pueden usar moléculas efectoras activadas apropiadamente, por ejemplo derivados selectivos para tiol tales como maleimidado y los derivados de cisteína.

Se apreciará que cuando hay dos o más moléculas efectoras ancladas al fragmento de anticuerpo, éstas pueden ser idénticas o diferentes y se pueden anclar al fragmento de anticuerpo en sitios diferentes. También se apreciará que dos o más moléculas efectoras se pueden anclar al fragmento de anticuerpo en un único sitio mediante el uso, por ejemplo, de una estructura conectora ramificada para unir dos o más moléculas efectoras y proporcionar un único sitio de anclaje.

En un aspecto preferido de la presente invención al menos una de las moléculas efectoras ancladas al fragmento de anticuerpo es una molécula polimérica, preferiblemente PEG o un derivado del mismo. Por lo que se refiere al anclaje de radicales de poli(etilenglicol) (PEG) en general, se hace referencia a "Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, Nueva York; "Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications", 1997, J. Milton Harris y S. Zalipsky (eds), American Chemical Society, Washington DC y "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences",

1998, M. Aslam y A. Dent, Grove Publishers, Nueva York.

Preferiblemente todas las moléculas efectoras ancladas al fragmento Fab de la presente invención son PEG y cada molécula está unida covalentemente a través de un grupo maleimida a uno o más grupos tiol en el fragmento de anticuerpo. El PEG puede ser cualquier molécula lineal o ramificada en un intervalo de peso molecular medio de 500 Da a 50.000 Da, preferiblemente de 5.000 a 40.000 Da y más preferiblemente de 10.000 a 40.000 Da y 20.000 a 40.000 Da. Para anclar moléculas de PEG ramificadas, preferiblemente se une covalentemente un residuo de lisina al grupo maleimida. A cada uno de los grupos amina del residuo de lisina se le ancla preferiblemente un polímero de metoxipoli(etilenglicol). En un ejemplo el peso molecular de cada polímero anclado a la lisina es de aproximadamente 20.000 Da y el peso molecular total de la molécula de polímero completa es por lo tanto de aproximadamente 40.000 Da. Preferiblemente, las moléculas de PEG ancladas al fragmento Fab de la presente invención son lineales.

Se pueden anclar una o más moléculas efectoras al fragmento Fab de anticuerpo de la presente invención. En un aspecto preferido se anclan al menos dos moléculas efectoras al fragmento Fab, una a una cisteína de la región constante de la cadena ligera y una a una cisteína de la región constante de la cadena pesada. Preferiblemente los residuos de cisteína a los cuales se anclan las moléculas efectoras se unirían de otro modo entre sí por medio de un enlace disulfuro si las moléculas efectoras no estuvieran ancladas. Las cisteínas adecuadas para el anclaje incluyen cisteínas de origen natural presentes en la región constante de la cadena ligera y/o pesada tales como las cisteínas intercatenarias. En un aspecto preferido de la invención se ancla una molécula efectora a la cisteína intercatenaria de C_L y la cisteína intercatenaria de C_{H1} en el fragmento Fab de anticuerpo. En una realización la cisteína intercatenaria de C_L a la cual se ancla la molécula efectora está en la posición 214 de la cadena ligera y la cisteína intercatenaria de C_{H1} a la cual se ancla la molécula efectora está en la posición 233 de la cadena pesada. En otra realización en la que las regiones constantes derivan de IgG1 murina, la cisteína intercatenaria de C_L a la cual se ancla una molécula efectora está en la posición 214 de la cadena ligera y la cisteína intercatenaria de C_{H1} a la cual se ancla una molécula efectora está en la posición 235 de la cadena pesada. Otras cisteínas adecuadas incluyen aquellas que han sido modificadas en las regiones constantes utilizando técnicas de ADN recombinante. Por ejemplo se pueden modificar dos cisteínas en el fragmento de anticuerpo, una en cada una de las regiones constantes de las cadenas pesada y ligera, preferiblemente en posiciones en las que pueden formar una conexión disulfuro entre sí.

Los fragmentos concretos de acuerdo con este aspecto de la invención incluyen aquellos en los que:

(i) los residuos de cisteína de las regiones constantes de la cadena pesada y ligera que están ancladas a las moléculas efectoras estaría conectados de otro modo entre sí a través de un enlace disulfuro si las moléculas efectoras no estuvieran ancladas o

(ii) la cisteína de la cadena ligera a la cual está anclada una molécula efectora es la cisteína intercatenaria de C_L y la cisteína de la cadena pesada a la cual está anclada una molécula efectora es la cisteína intercatenaria de C_{H1}

Durante el anclaje de las moléculas efectoras a las cisteínas del fragmento Fab de anticuerpo de la presente invención se elimina cualquier conexión covalente entre las cisteínas, como se describe en la presente memoria, utilizando un agente reductor. En tales fragmentos la cadena pesada ya no está unida covalentemente a la cadena ligera y la conexión disulfuro encontrada en los anticuerpos de origen natural entre la cisteína intercatenaria de C_L y la cisteína intercatenaria de C_{H1} está ausente.

También se proporciona en la presente invención por lo tanto un método para anclar las moléculas efectoras a los fragmentos Fab de anticuerpo de la presente invención, comprendiendo dicho método:

a) Tratar un fragmento Fab de anticuerpo de la presente invención con un agente reductor capaz de generar un grupo tiol libre en una cisteína de la región constante de la cadena pesada y ligera

b) Hacer reaccionar el fragmento tratado con una molécula efectora

En un aspecto preferido el método comprende:

a) Reducir el enlace disulfuro intercatenario entre la cisteína intercatenaria de C_{H1} y la cisteína intercatenaria de C_L en el fragmento Fab de anticuerpo de la presente invención

b) Hacer reaccionar el fragmento tratado con una molécula efectora

Los métodos proporcionados por la presente invención permiten anclar una o más moléculas efectoras a cisteína del fragmento de anticuerpo, en particular a cisteínas de la región constante. Se pueden anclar dos o más moléculas efectoras al fragmento de anticuerpo utilizando los métodos descritos en la presente memoria ya sea simultáneamente ya sea sucesivamente repitiendo el método.

Se pueden anclar moléculas efectoras adicionales en cualquier parte del fragmento de anticuerpo, en particular las regiones constantes. Los métodos de la presente invención por lo tanto también se extienden a una o más etapas

antes y/o después de los métodos de reducción descritos antes en los que se anclan otras moléculas efectoras al fragmento de anticuerpo utilizando cualquier método adecuado como se ha descrito previamente, por ejemplo a través de otras cadenas laterales de aminoácidos disponibles tales como grupos amino e imino.

5 El agente reductor para su uso en los métodos de la presente invención es cualquier agente reductor capaz de reducir cisteínas en el fragmento Fab de anticuerpo de la presente invención para producir tioles libres. Preferiblemente el agente reductor reduce el enlace disulfuro intercatenario entre cisteínas de las regiones constantes de la cadena pesada y ligera, por ejemplo, entre la cisteína intercatenaria de C_L y la cisteína intercatenaria de C_{H1}, con el fin de permitir el anclaje de las moléculas efectoras a dichas cisteínas. Como los fragmentos Fab de anticuerpo de la presente invención sorprendentemente no tienen necesidad de enlace disulfuro intercatenario, se pueden utilizar agentes reductores más fuertes que los utilizados comúnmente con los fragmentos de anticuerpo de tipo salvaje que conservan el enlace disulfuro. Como resultado se produce un número mayor de moléculas Fab con grupos tiol libres y se modifica correctamente una mayor proporción de los fragmentos de anticuerpo, esto es, se ancla el número correcto de moléculas efectoras. Además, la cisteína intercatenaria terminal de C_{H1} en los fragmentos Fab de anticuerpo de la presente invención es mucho más accesible para el anclaje de la molécula efectora y la reducción que en los fragmentos Fab convencionales en los que puede haber efectos estéricos o electrostáticos locales debido a la presencia de la bisagra superior u otros aminoácidos C-terminales con respecto a la cisteína intercatenaria de C_{H1}. Los fragmentos de anticuerpo de la presente invención se pueden modificar por lo tanto más eficazmente y con un coste más eficaz que los fragmentos de anticuerpos convencionales. Resultará evidente para un experto en la técnica que los agentes reductores adecuados se pueden identificar determinando el número de tioles libres producidos después de tratar el fragmento de anticuerpo con el agente reductor. Los métodos para determinar el número de tioles libres son bien conocidos en la técnica, véase por ejemplo Lyons *et al.*, 1990, *Protein Engineering*, 3, 703. Los agentes reductores que se utilizan en la presente invención son ampliamente conocidos en la técnica, por ejemplo los descritos por Singh *et al.*, 1995, *Methods in Enzymology*, 251, 167-73. Los ejemplos concretos incluyen agentes reductores basados en tiol tales como glutatión reducido (GSH), β-mercaptoetanol (β-ME), (β-mercaptoetilamina (β-MA) y ditiotreitil (DTT). Otros métodos para reducir los fragmentos de anticuerpos de la presente invención incluyen el uso de métodos electrolíticos, tales como el método descrito por Leach *et al.*, 1965, *Div. Protein. Chem*, 4, 23-27y el uso de métodos de fotorreducción, tales como el método descrito por Ellison *et al.*, 2000, *Biotechniques*, 28 (2), 324-326. Preferiblemente sin embargo, el agente reductor para su uso en la presente invención es un agente reductor no basado en tiol capaz de liberar uno o más tioles en un fragmento de anticuerpo. Preferiblemente el agente reductor no basado en tiol es capaz de liberar los tioles intercatenarios en un fragmento de anticuerpo. Los agentes reductores preferidos para su uso en la presente invención son agentes reductores de trialquilfosfina (Ruegg UT y Rudinger, J., 1977, *Methods in Enzymology*, 47, 111-126; Bums J *et al.*, 1991, *J. Org. Chem*, 56, 2648-2650; Getz *et al.*, 1999, *Analytical Biochemistry*, 273, 73-80; Han y Han, 1994, *Analytical Biochemistry*, 220, 5-10; Seitz *et al.*, 1999, *Euro. J. Nuclear Medicine*, 26, 1265-1273), cuyos ejemplos concretos incluyen tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), tris butilfosfina (TBP), tris-(2-cianoetil)fosfina, tris-(3-hidroxiopropil)fosfina (THP) y tris-(2-hidroxietil)fosfina. Muy preferiblemente el agente reductor que se va a utilizar en la presente invención es TCEP o THP. Resultará evidente para un experto en la técnica que la concentración de agente reductor que se utiliza en la presente invención se puede determinar empíricamente, por ejemplo, variando la concentración de agente reductor y midiendo el número de tioles libres producidos. Típicamente el agente reductor que se utiliza en la presente invención se utiliza en exceso con respecto al fragmento de anticuerpo, por ejemplo en un exceso molar entre 2 y 1000 veces. Preferiblemente el agente reductor se encuentra en un exceso de 2, 3, 4, 5, 10, 100 o 1000 veces. En una realización el reductor se utiliza a una concentración entre 2 y 5 mM.

45 Los fragmentos Fab de anticuerpos modificados de acuerdo con la invención se pueden preparar haciendo reaccionar un fragmento Fab de anticuerpo como se describe en la presente memoria que contiene al menos un residuo de cisteína reactivo con una molécula efectora, preferiblemente una molécula efectora activada selectiva de tiol. Las reacciones en las etapas (a) y (b) del método descrito más arriba se pueden llevar a cabo generalmente en un disolvente, por ejemplo una solución tampón acuosa tal como acetato o fosfato, a un pH aproximadamente neutro, por ejemplo a un pH de aproximadamente 4,5 a un pH de aproximadamente 8,5, típicamente un pH de 4,5 a 8, adecuadamente un pH de 6 a 7. La reacción se puede llevar a cabo generalmente a cualquier temperatura adecuada, por ejemplo entre aproximadamente 5°C y aproximadamente 70°C, por ejemplo a la temperatura ambiente. El disolvente puede contener opcionalmente un agente quelante tal como EDTA, EGTA, CDTA o DTPA. Preferiblemente el disolvente contiene EDTA a una concentración entre 1 y 5 mM, preferiblemente 2 mM. Alternativamente o además el disolvente puede ser un tampón quelante tal como ácido cítrico, ácido oxálico, ácido fólico, bicina, tricina, tris o ADA. La molécula efectora se empleará generalmente a una concentración en exceso con respecto a la concentración del fragmento de anticuerpo. Típicamente la molécula efectora se encuentra en un exceso molar de entre 2 y 100 veces, preferiblemente un exceso de 5, 10 o 50 veces.

60 Cuando es necesario, el producto deseado que contiene el número deseado de moléculas efectoras se puede separar de cualquiera de los materiales de partida o de otro producto generado durante el proceso de producción mediante métodos convencionales, por ejemplo mediante técnicas de cromatografía tales como cromatografía de intercambio iónico, de exclusión por tamaño, cromatografía de afinidad con proteína A, G o L o de interacción hidrófoba.

También se proporciona en la presente invención una mezcla que contiene dos o más fragmentos Fab de

anticuerpo, caracterizados porque la mezcla está enriquecida en fragmentos Fab en los cuales el dominio constante de la cadena pesada termina en la cisteína intercatenaria de C_H1, las cadenas pesadas de los fragmentos no están unidas covalentemente a las cadenas ligeras y los fragmentos tienen una molécula efectora anclada a una cisteína en la región constante de la cadena ligera y la cadena pesada. Dicha mezcla puede ser producida utilizando los métodos proporcionados por la presente invención. Por 'enriquecida' los autores de la presente invención entienden que el fragmento Fab de anticuerpo con un número deseado de moléculas efectoras ancladas representa 50% o más de la mezcla. Preferiblemente el fragmento Fab de anticuerpo con el número deseado de moléculas efectoras ancladas representa entre 50 y 99% de la mezcla. Preferiblemente las mezclas están enriquecidas en más de 50%, preferiblemente más de 60%, más preferiblemente más de 70%. La proporción de tales mezclas que contienen el fragmento Fab de anticuerpo con el número deseado de moléculas efectoras se puede determinar utilizando métodos de HPLC de exclusión por tamaño descritos en la presente memoria.

Los fragmentos de anticuerpos de acuerdo con la invención pueden ser útiles en la detección o el tratamiento de numerosas enfermedades o trastornos. Tales enfermedades o trastornos pueden incluir aquellos descritos en el encabezamiento general enfermedad infecciosa, p. ej. infección bacteriana; infección fúngica; enfermedad inflamatoria/autoinmunidad p. ej. artritis reumatoide, osteoartritis, enfermedad inflamatoria del intestino; cáncer; enfermedad alérgica/atópica p. ej. asma, eczema; enfermedad congénita; p. ej. fibrosis quística, anemia de células falciformes; enfermedad dermatológica p. ej. psoriasis; enfermedad neurológica, p. ej. esclerosis múltiples; trasplantes p. ej. rechazo de trasplante de órganos, enfermedad injerto contra anfitrión; y enfermedad metabólica/idiopática p. ej. diabetes.

Los fragmentos de anticuerpos de acuerdo con la invención se pueden formular para su uso en la terapia y/o el diagnóstico y de acuerdo con un aspecto adicional de la invención, los autores de la presente invención proporcionan una composición farmacéutica que comprende un fragmento Fab de anticuerpo en el que la región constante de la cadena pesada termina en la cisteína intercatenaria de C_H1 junto con uno o más excipientes, diluyentes o portadores farmacéuticamente aceptables. Asimismo se proporciona una composición farmacéutica que comprende un fragmento Fab de anticuerpo en el que la región constante de la cadena pesada termina en la cisteína intercatenaria de C_H1, la cadena pesada no está unida covalentemente a la cadena ligera y el fragmento tiene una molécula efectora anclada a una cisteína en la región constante de la cadena ligera y la cadena pesada, junto con uno o más excipientes, diluyentes o portadores farmacéuticamente aceptables.

Ejemplos

La presente invención se describirá a continuación por medio de ejemplos solamente, en los que se hace referencia a:

Figura 1: SDS-PAGE no reductora de Fab g163 PEGilado en el que la región constante de la cadena pesada termina en la cisteína intercatenaria de C_H1. La calle B muestra el Fab g163 con PEG anclado después de la reducción con TCEP. La calle D muestra el Fab g163 con PEG anclado después de la reducción con THP.

Figura 2: Comparación de los reductores THP y TCEP sobre la eficacia de PEGilación de Fab(B).

Figura 3: SDS-PAGE de Fab murino PEGilado, m13.

Figura 4: Farmacocinética del m13 Fab-DiPEG(2x20kDa) marcado con ¹²⁵I en ratones.

Ejemplo 1 Creación de un fragmento Fab 'truncado' novedoso,

La molécula Fab de anticuerpo del Ejemplo 2 fue g163 que se une a receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFr) de babuino. La molécula Fab de anticuerpo de los Ejemplos 3-6 fue un Fab humano (referido en adelante como FAB(B)) que se une a citoquina soluble. La molécula Fab de anticuerpo de los Ejemplos 7-8 fue un Fab murino, m13, que se une a una citoquina soluble. Para producir g163 y Fab(B) se diseñaron cebadores de PCR basándose en la región C_H1 de IgG1 humana y se utilizó la mutagénesis por PCR para insertar un codón de parada inmediatamente después de la cisteína intercatenaria de C_H1. Para producir m13 se diseñaron cebadores de PCR basándose en la región CH1 de IgG1 murina y se utilizó la mutagénesis por PCR para insertar un codón de parada inmediatamente después de la cisteína intercatenaria de C_H1. Las secuencias de las regiones constantes de la cadena pesada y ligera se muestran más abajo y en la Figura 5:

Regiones constantes de Fab y1 humana de tipo salvaje:

Kappa (Seq ID NO: 2)

KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKDYSLSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

CH1 (Seq ID NO: 9)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCAA*

Regiones constantes de Fab γ 1 "truncada" humana utilizadas en g163 y Fab(B):

Kappa (Seq ID NO:2)

KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
 VTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

5 **CH1 (SEQ ID NO:1)**

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC*

Regiones constantes de Fab γ 1 "truncada" murina utilizadas en m13:

Kappa (SEQ ID NO: 4)

DAAPTVISIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQ
 DSKDSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRGEC*

10 **CH1(SEQ ID NO: 3)**

KTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVL
 QSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDC*

Los residuos de cisteína subrayados indican las cisteínas intercatenarias a las cuales se pueden anclar moléculas efectoras.

15 Los fragmentos Fab se produjeron en la cepa W3110 de *E. coli* y se purificaron utilizando métodos convencionales (Humphreys et al., 2002, Protein Expression and Purification, 26, 309-320).

Ejemplo 2: PEGilación de g163

20 Todas las reducciones y PEGilaciones se realizaron en Fosfato 0,1 M pH 6,0; EDTA 2 mM. La concentración de Fab fue de 5 mg/ml y el reductor estuvo a una concentración final de 40 mM. En todos los casos la reducción se llevó a cabo a la temperatura ambiente (~24°C) durante 30 minutos, las proteínas se sometieron a eliminación de las sales sobre una columna PD-10 (Pharmacia) y a continuación se mezclaron con un exceso molar de 5 veces de PEG de 20 kDa -maleimida sobre Fab. El PEG de 20 kDa fue de Nippon Oils and Fats (NOF). El Fab PEGilado se separó del Fab no Pegilado mediante HPLC de exclusión por tamaño sobre columnas Zorbax GF-450 y GF-250 analíticas en serie. Estas se desarrollaron con un gradiente isocrático durante 30 min de fosfato 0,2 M pH 7,0 + etanol al 10% a 1 ml/min y el Fab se detectó utilizando la absorbancia a 214 nm y 280 nm.

25 El Fab g163 se redujo utilizando dos agentes reductores no basados en tiol, tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), tris butil fosfina (TBP) y dos moléculas de PEG de 20 kDa ancladas a las cisteínas intercatenarias. Se esperaba que la PEGilación se produjera en ambas cisteínas si se reducía el disulfuro intercatenario. La PEGilación de ambos sitios se confirmó por medio de SDS-PAGE no reductora (Figura 1). La calle B corresponde al Fab truncado g163 con dos moléculas de PEG ancladas después de la reducción con TCEP. Las dos bandas de elevado peso molecular muy próximas alrededor de 100 kDa se componen de cadena pesada y ligera con una molécula de PEG anclada. La banda inferior a alrededor de 45 kDa corresponde a una pequeña cantidad de Fab no modificado sin PEG anclado. La banda inferior a alrededor de 25 kDa corresponde a cadenas pesadas y ligeras libres. La calle D es el mismo fragmento reducido utilizando TBP que es menos compatible con tampones acuosos y proteínas. El porcentaje del Fab truncado g163 que va a ser diPEGilado utilizando TCEP y TBP como reductores fue de 76% y 21% respectivamente, como se determina por medio de HPLC. Por lo tanto TCEP es un agente reductor útil para producir los fragmentos de anticuerpos modificados de la presente invención.

Ejemplo 3: Comparación de la eficacia de la PEGilación de Fab(B) utilizando los agentes reductores TCEP y THP

40 En este ejemplo se llevaron a cabo reducciones y PEGilaciones en MOPS 50 mM, EDT 2 mM pH 6,8. La reducción de Fab(B) (20mg/ml) se llevó a cabo utilizando los agentes reductores TCEP o THP a 10 mM, durante 1 hr a la temperatura ambiente. El reductor se eliminó sobre columnas de eliminación de sales PD10 (Pharmacia) con un corte restrictivo para evitar el transporte del reductor. La PEGilación se llevó a cabo utilizando un exceso molar de 3 veces de PEG de 20 kDa-maleimida sobre Fab, durante la noche a la temperatura ambiente. La Figura 2 muestra

que el THP también es un agente reductor útil para el anclaje de PEG a los fragmentos de anticuerpo de la presente invención.

Ejemplo 4: Di-Pegilación de un Fab murino, m13.

5 Las cisteínas intercatenarias de un Fab truncado murino, m13 fueron PEGiladas utilizando un PEG lineal de 20 kDa. Las reducciones y PEGilaciones se realizaron en Tris.HCl 50 mM EDTA 5 mM pH 7,14 con Fab a 20,06 mg/ml, TCEP 10 mM (final) y un exceso molar de 4 veces de PEG lineal de 20 kDa, temperatura ambiente. La PEGilación de ambos sitios se confirmó mediante SDS-PAGE (Figura 3). Calle 1 m13 diPegilado (no reducido); Calle 2 m13 diPegilado reducido; Calle 3 m13 no reducido (no PEG); Calle 4 m13 reducido (no PEG).

Ejemplo 5: Farmacocinética de m13 Fab-PEG (2x20 kDa) en ratones.

10 Se determinó la vida media en circulación de m13Fab PEGilado en ambos polipéptidos (como en el Ejemplo 4) en animales. Se inyectaron subcutáneamente o intravenosamente moléculas de Fab Pegilado marcadas con ¹²⁵I en ratones y se determinó la permanencia en suero.

15 Los ratones recibieron inyecciones subcutáneas en la parte posterior del cuello o intravenosas en la vena de la cola con anestesia ligera. El volumen de la inyección fue de 100 µl por ratón, lo que equivalía a 13 µg de proteína y 1,2 µCi de dosis de isótopo (actividad específica 0,1 µCi/µg). Se tomaron muestras de sangre de 4 ratones por medio de punción cardíaca en cada momento puntual. La sangre heparinizada se recogió en tubos pesados previamente. El peso de la sangre se determinó antes del recuento de la radiactividad en el contador gamma.

Momentos puntuales estudiados:

iv; 0,5, 2, 4, 6, 24, 48, 72 y 144 h después de la inyección.

20 sc; 3, 6, 24, 30, 48, 72 y 144 h después de la inyección.

Tabla 1.

	IV	SC
AUC (0-∞) (%dosis*h)	3147	2072
T½ β(h)	37	41
Cmax(%dosis)		26

25 Los resultados de la Tabla 1 y la Figura 4 demuestran que aunque las cadenas pesadas y ligeras del Fab PEGilado no están asociadas covalentemente, la vida media en la circulación es mayor que la de un Fab no PEGilado (t½β ≈ 30 minutos) y que la de la LC o la HC libres que es probable que sea aún más corta.

REIVINDICACIONES

1. Un fragmento Fab de anticuerpo caracterizado por que la región constante de la cadena pesada termina en la cisteína intercatenaria de C_{H1}.
- 5 2. El fragmento Fab de anticuerpo de la reivindicación 1 en el que la cisteína intercatenaria de C_{H1} está conectada covalentemente a la cisteína intercatenaria de C_L.
3. El fragmento Fab de anticuerpo de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en el que la cisteína intercatenaria de C_{H1} está en la posición 233 de la cadena pesada.
4. El fragmento Fab de anticuerpo de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en el que la cisteína intercatenaria de C_{H1} está en la posición 127 de la cadena pesada.
- 10 5. El fragmento Fab de anticuerpo de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en el que la cisteína intercatenaria de C_{H1} está en la posición 128 de la cadena pesada.
6. El fragmento Fab de anticuerpo de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en el que la cisteína intercatenaria de C_{H1} está en la posición 235 de la cadena pesada.
- 15 7. El fragmento Fab de anticuerpo de las reivindicaciones 1-5 en el que la cisteína intercatenaria de la región constante de la cadena ligera está en la posición 214 de la cadena ligera.
8. El fragmento Fab de anticuerpo de las reivindicaciones 1-3 en el que la región constante de la cadena pesada consiste en una secuencia que tiene una identidad o similitud de al menos 90% con la secuencia proporcionada en el SEQ ID NO: 1.
- 20 9. El fragmento Fab de anticuerpo de la reivindicación 8 en el que la región constante de la cadena ligera consiste en una secuencia que tiene una identidad o similitud de al menos 90% con la secuencia proporcionada en el SEQ ID NO: 2.
10. El fragmento Fab de anticuerpo de las reivindicaciones 1, 2 y 6 en el que la región constante de la cadena pesada consiste en una secuencia que tiene una identidad o similitud de al menos 90% con la secuencia proporcionada en el SEQ ID NO: 3.
- 25 11. El fragmento Fab de anticuerpo de la reivindicación 10 en el que la región constante de la cadena ligera consiste en una secuencia que tiene una identidad o similitud de al menos 90% con la secuencia proporcionada en el SEQ ID NO: 4.
12. El fragmento Fab de anticuerpo de las reivindicaciones 1 a 11 al cual se anclan una o más moléculas efectoras.
13. El fragmento Fab de anticuerpo de la reivindicación 12 al cual se anclan dos o más moléculas efectoras.
- 30 14. El fragmento de anticuerpo de la reivindicación 13, en donde una molécula efectora se ancla a una cisteína de la región constante de la cadena ligera y a una cisteína de la región constante de la cadena pesada.
15. El fragmento de anticuerpo de la reivindicación 14, en donde los residuos de cisteína de las regiones constantes de la cadena pesada y ligera que están ancladas a las moléculas efectoras estarían conectadas de otro modo entre sí por medio de un enlace disulfuro si las moléculas efectoras no estuvieran ancladas.
- 35 16. El fragmento de anticuerpo de la reivindicación 15 donde la cisteína de la cadena ligera a la cual está anclada una molécula efectora es la cisteína intercatenaria de C_L y la cisteína de la cadena pesada a la cual está anclada una molécula efectora es la cisteína intercatenaria de C_{H1}.
17. El fragmento Fab de anticuerpo de las reivindicaciones 12-16 en donde la molécula efectora es PEG
- 40 18. Un método de producción de un fragmento Fab de anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 12-17 que comprende:
 - a. Tratar un fragmento Fab de anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1, 2, 3,4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 con un agente reductor capaz de generar un grupo tiol libre en una cisteína de la región constante de la cadena pesada y ligera
 - b. Hacer reaccionar el fragmento tratado con una molécula efectora
- 45 19. El método de acuerdo con la reivindicación 18 en el que el agente reductor es un reductor no basado en tiol.
20. El método de acuerdo con la reivindicación 19 en el que el reductor es una trialquilfosfina.
21. El método de acuerdo con la reivindicación 20 donde el reductor no basado en tiol es tris(2-carboxietil)fosfina

(TCEP).

22. El método de acuerdo con la reivindicación 20 donde el reductor no basado en tiol es tris(3-hidroxipropil)fosfina (THP).
- 5 23. El método de acuerdo con la reivindicación 18 en el que cualquiera o ambas etapas (a) y (b) se llevan a cabo en presencia de un agente quelante.
24. El método de acuerdo con la reivindicación 23 en el que el agente quelante es EDTA.
25. El método de acuerdo con la reivindicación 24 en el que ambas etapas (a) y (b) se llevan a cabo en presencia de EDTA.
- 10 26. Una mezcla que contiene dos o más fragmentos Fab de anticuerpo, caracterizada porque la mezcla está enriquecida en fragmentos Fab en los que el dominio C_H1 termina en la cisteína intercatenaria, las cadenas pesadas de los fragmentos no están unidas covalentemente a las cadenas ligeras y los fragmentos tienen una molécula efectora anclada a una cisteína en la región constante de la cadena ligera y la cadena pesada.
- 15 27. La mezcla de la reivindicación 26 en la que más de 50% de la mezcla comprende un fragmento Fab en el que el dominio C_H1 termina en la cisteína intercatenaria, las cadenas pesadas de los fragmentos no están unidas covalentemente a las cadenas ligeras y los fragmentos tienen una molécula efectora anclada a una cisteína en la región constante de la cadena ligera y la cadena pesada.
28. Una secuencia de ADN aislada que codifica las regiones constantes de la cadena pesada y/o ligera de un fragmento Fab de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3-11.
- 20 29. Un vector de clonación o de expresión que comprende una o más secuencias de ADN de acuerdo con la reivindicación 28.
30. El vector de acuerdo con la reivindicación 29, en donde el vector comprende la secuencia proporcionada en el SEQ ID NO: 5.
31. El vector de acuerdo con la reivindicación 30, que comprende adicionalmente la secuencia proporcionada en el SEQ ID NO: 6.
- 25 32. El vector de acuerdo con la reivindicación 29, en donde el vector comprende la secuencia proporcionada en el SEQ ID NO: 7.
33. El vector de acuerdo con la reivindicación 32, que comprende adicionalmente la secuencia proporcionada en el SEQ ID NO: 8.
- 30 34. Una célula anfitriona que expresa el fragmento Fab de anticuerpo de la reivindicación 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11
35. Una célula anfitriona de acuerdo con la reivindicación 34, que comprende uno o más vectores de clonación o expresión de acuerdo con las reivindicaciones 29-33.
36. Un procedimiento para producir el fragmento Fab de anticuerpo de la reivindicación 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 que comprende cultivar la célula anfitriona de la reivindicación 34 y aislar dicho fragmento.
- 35 37. Una composición farmacéutica que comprende un fragmento Fab de anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1-17 y 26-27, junto con uno o más excipientes, diluyentes o portadores farmacéuticamente aceptables.

Figura 1

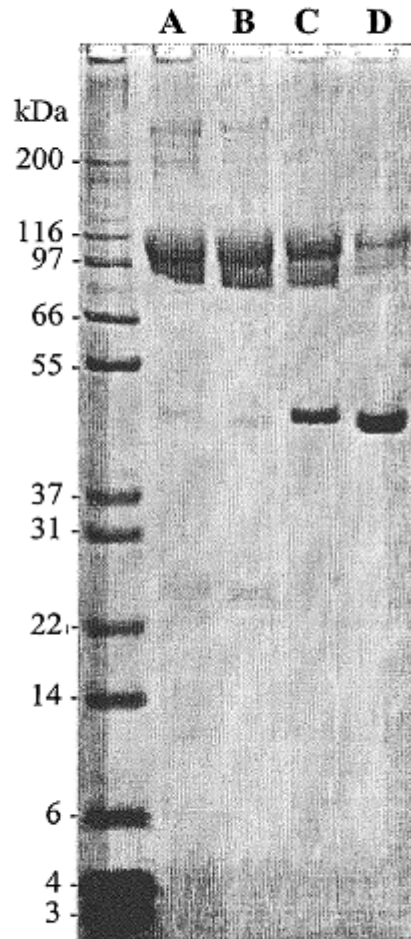


Figura 2

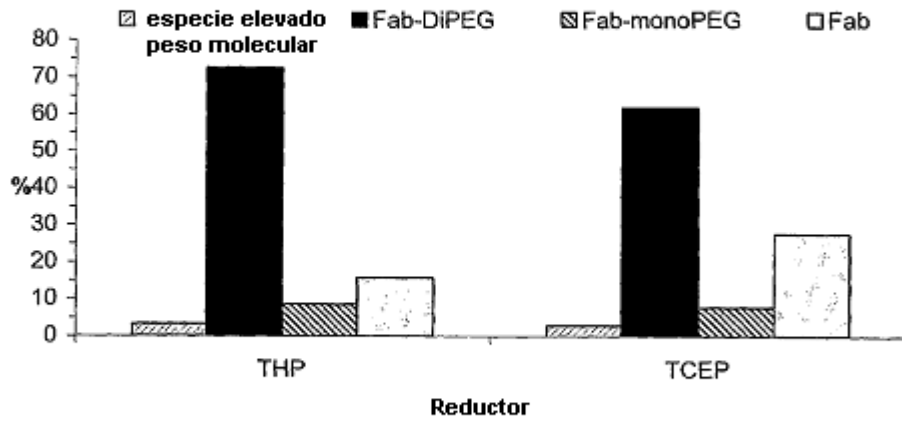


Figura 3

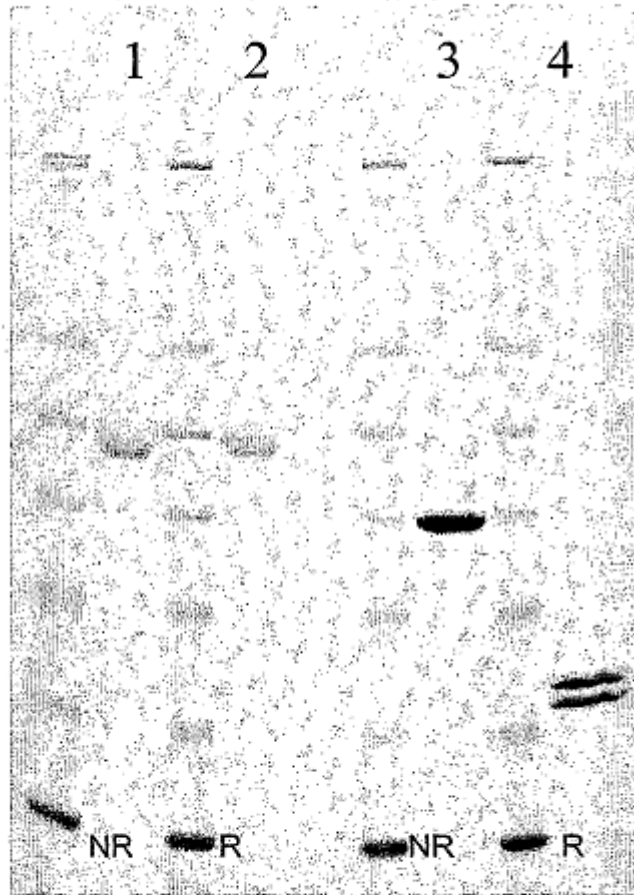


Figura 4

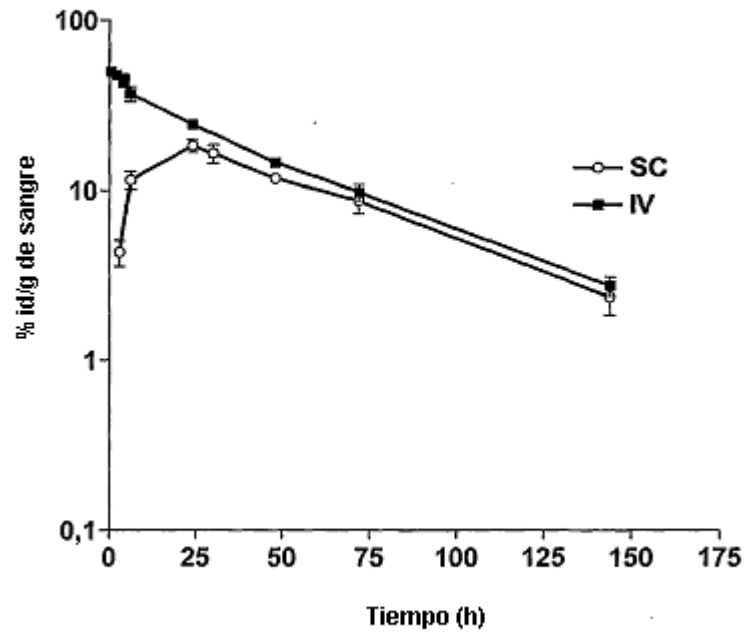


Figura 5

Seq ID No:1

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHFFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

Seq ID No:2

KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Seq ID No: 3

KITPPSVYPLAPGSAQAQNSMVTLGCLVKGYTPEPVTVTWNSGSLSSGVHFFPAVLQSDLYTSL
SSVTVPSSTWVPEITVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDC

Seq ID No:4

DAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQSKDSTY
SMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCATHKTSSTPIVKSFNRRGEC

Seq ID No:5

GCTTCTACAAAGGGCCCATCGGTCCTCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGG
CACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGG
AACTCAGGCGCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACT
CTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCT
GCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTCGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTG
TTAA

Seq ID No:6

AAACGTACGGTAGCGGCCCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATC
TGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGT
GGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACA
GCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGA
AACACAAAGTCTACGCTGCGAAGTACCCATCAGGGCTGAGCTCACCAGTAACAAAAAG
TTTTAATAGAGGGGAGTGTTAA

Seq ID No.7

AAAACGACACCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCTGGATCTGCTGCCCAAATACTCCAT
GGTGACCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAAC
TCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTGCAATCTGACCTCTACAC
TCTGAGCAGTCAAGTACTGTCCCTCCAGCACCTGGCCAGCGAGACCGTCACTGCAAC
GTTGCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCAGGGATTGTTAA

Seq ID No:8

GATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGC
CTCAGTCGTGTCTTCTGAACAACTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGAAGATTG
ATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACA
GCACCTACAGCATGAGCAGCACCTCACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAG
CTATACCTGTGAGGCCACTACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAAGCTTTAATAGAG
GGGAGTGTTAA

Seq ID No:9

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHFFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCAA