

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 568 436**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/09** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**C07K 16/00** (2006.01)  
**C12N 1/15** (2006.01)  
**C12N 1/19** (2006.01)  
**C12N 1/21** (2006.01)  
**C12N 5/10** (2006.01)  
**C12P 21/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2007 E 07740474 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.02.2016 EP 2006381**

54 Título: **Procedimiento para controlar la farmacocinética en sangre de anticuerpos**

30 Prioridad:

**31.03.2006 JP 2006097796**

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

**29.04.2016**

73 Titular/es:

**CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA (100.0%)**  
**5-1, Ukima 5-chome, Kita-ku**  
**Tokyo, 115-8543, JP**

72 Inventor/es:

**IGAWA, TOMOYUKI;**  
**TSUNODA, HIROYUKI y**  
**TACHIBANA, TATSUHIKO**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 568 436 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

Procedimiento para controlar la farmacocinética en sangre de anticuerpos

**Campo técnico**

5 La presente divulgación se refiere a procedimientos para modificar anticuerpos para controlar la farmacocinética de los anticuerpos en la sangre, y a composiciones farmacéuticas que comprenden como ingrediente activo un anticuerpo con una farmacocinética en sangre que está controlada. En particular, la presente invención se refiere a procedimientos para producir anticuerpos modificados que tienen una semivida prolongada o reducida en comparación con antes de la modificación del anticuerpo.

**Antecedentes**

10 Puesto que los anticuerpos son altamente estables en sangre y tienen pocos efectos adversos, han llamado mucho la atención como productos farmacéuticos. Existen una serie de compuestos farmacéuticos con anticuerpos de tipo IgG disponibles en el mercado y muchos de estos están actualmente en desarrollo (documentos distintos de patente 1 y 2). Se han desarrollado tecnologías para potenciar la función efectora y similares, para producir productos farmacéuticos con anticuerpos de segunda generación. Por ejemplo, son conocidas las tecnologías para potenciar la  
 15 citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) a través de sustituciones de aminoácidos en el dominio Fc de un anticuerpo IgG (documento distinto de patente 3). Además de dichas sustituciones de aminoácidos que dan como resultado la potenciación de la función efectora, existen informes sobre otras sustituciones de aminoácidos en el dominio Fc, que prolongan la semivida del anticuerpo en sangre (documentos distintos de patente 4 y 5). Prolongar la semivida del anticuerpo en  
 20 sangre permite la administración de productos farmacéuticos con anticuerpos a dosis reducidas o a intervalos más amplios y, así, da como resultado la proporción de productos farmacéuticos con anticuerpos altamente ventajosos y económicos. Específicamente, se puede prolongar la semivida en sangre modificando el dominio Fc a través de sustituciones de aminoácidos que incrementan la afinidad por el receptor Fc neonatal conocido como el receptor de rescate de IgG. De forma alternativa, se puede prolongar la semivida en sangre reordenando los dominios CH1,  
 25 CH2, y CH3 de región constante (documento distinto de patente 6). Sin embargo, las secuencias de aminoácidos de regiones constantes de un anticuerpo IgG se conservan en seres humanos, y por lo tanto es mejor mantener el número de sustituciones de aminoácidos artificiales en las regiones constantes al mínimo desde el punto de vista de la inmunogenicidad.

30 Las técnicas notificadas para sustituir aminoácidos en regiones variables de anticuerpos IgG incluyen no sólo la humanización (documento distinto de patente 7) sino también la maduración de la afinidad para potenciar la actividad de unión usando sustituciones de aminoácidos en regiones determinantes de la complementariedad (CDR) (documento distinto de patente 8) y la mejora de la estabilidad fisicoquímica a través de sustituciones de aminoácidos en regiones estructurales (FR) (documento distinto de patente 9). Por tanto, a diferencia de las regiones constantes, la sustitución de aminoácidos en regiones variables es una técnica general para mejorar la función y las  
 35 propiedades de un anticuerpo. Puesto que las secuencias de aminoácidos de la CDR de un anticuerpo humanizado se derivan de un animal no humano, el riesgo de inmunogenicidad no se considerará como un problema. De forma alternativa, si la secuencia de FR es la misma que la de un anticuerpo humano divulgado públicamente en la base de datos Kabat (<http://ftp.ebi.ac.uk/pub/bases/datos/Kabat/>) o la base de datos IMGT (<http://imgt.cines.fr/>), el riesgo de inmunogenicidad se considera bajo. Sin embargo, sólo las sustituciones de aminoácidos descritas anteriormente en la región Fc constante están disponibles hasta el momento como procedimientos para mejorar la semivida de anticuerpos IgG en sangre. No hay informes sobre un procedimiento para mejorar la semivida del anticuerpo IgG en sangre usando sustitución de aminoácidos en una región variable en la que el riesgo de inmunogenicidad sea más bajo. El motivo es que se consideró que la semivida de la IgG en sangre depende fuertemente de su unión al receptor Fc neonatal, el receptor de rescate, y la eliminación de IgG dependiente de antígeno (documento distinto de patente 10), y las regiones variables no tienen una influencia significativa sobre esta semivida en sangre. Mientras tanto, el punto isoeléctrico (pI) de IgG disminuye cuando la IgG se anioniza a través de succinación (documento distinto de patente 11), o el pI de la IgG se incrementa cuando el anticuerpo se cationiza a través de la modificación usando una poliamina (documento distinto de patente 12). Sin embargo, en ambos casos, la semivida en sangre se acorta en lugar de prolongarse. Por tanto, no se ha logrado una mejora de la semivida en  
 50 sangre cambiando el pI a través de la modificación.

Mientras tanto, la semivida de los minicuerpos (anticuerpos de bajo peso molecular) tales como Fab y scFv es más corta que la de la IgG, que es un anticuerpo completo. Por lo tanto, se puede prolongar la semivida de los minicuerpos en sangre por la modificación usando un polímero tal como polietilenglicol para reducir su excreción renal (documento distinto de patente 13). Además de la modificación con un polímero, también se ha informado de un desplazamiento en el punto isoeléctrico (pI) para modificar la farmacocinética de los minicuerpos en sangre. Por ejemplo, el documento distinto de patente 14 describió que la modificación de Fab anti-Tac con un ácido orgánico disminuye su pI, dando como resultado una mejora del ABC (área bajo la curva). Por el contrario, los documentos distintos de patente 15 y 16 describieron que la modificación de dsFv anti-Tac con un ácido orgánico disminuyó su pI, dando como resultado una reducción del ABC. El documento distinto de patente 17 demostró que la semivida (t<sub>1/2</sub>) y el ABC de la toxina anti-Tac-scFv se redujeron cuando disminuyó su pI modificando sus regiones variables a  
 60

- través de sustituciones de aminoácidos. El documento distinto de patente 18 describe que casi no existieron cambios en el ABC de un scFv cuando se disminuyó su pl añadiendo aminoácidos al extremo C terminal. Por tanto, se puede incrementar o disminuir el ABC de un minicuerpo cuando se disminuye su pl por modificación o sustitución de aminoácidos. En consecuencia, no se puede controlar de forma exacta la semivida de los minicuerpos en sangre como se pretendía desplazando el pl.
- 5 [Documento distinto de patente 1] Monoclonal antibody successes in the clinic, Janice M Reichert, Clark J Rosensweig, Laura B Faden & Matthew C Dewitz, *Nature Biotechnology* 2005;23: 1073-1078
- [Documento distinto de patente 2] Pavlou AK, Belsey MJ., The therapeutic antibodies market to 2008., *Eur J Pharm Biopharm.* 2005 Apr;59(3):389-96.
- 10 [Documento distinto de patente 3] Kim SJ, Park Y, Hong HJ., Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies., *Mol Cells.* 2005 Aug 31;20(1):17-29. Review.
- [Documento distinto de patente 4] Hinton PR, Xiong JM, Johlfs MG, Tang MT, Keller S, Tsurushita N., An engineered human IgG1 antibody with longer serum half-life., *J Immunol.* 2006 Jan 1;176(1):346-56.
- 15 [Documento distinto de patente 5] Ghetie V, Popov S, Borvak J, Radu C, Matesoi D, Medesan C, Ober RJ, Ward ES., Increasing the serum persistence of an IgG fragment by random mutagenesis., *Nat Biotechnol.* 1997 Jul;15(7):637-40.
- [Documento distinto de patente 6] Zuckier LS, Chang CJ, Scharff MD, Morrison SL., Chimeric human-mouse IgG antibodies with shuffled constant region exons demonstrate that multiple domains contribute to in vivo half-life., *Cancer Res.* 1998 Sep 1;58(17):3905-8.
- 20 [Documento distinto de patente 7] Tsurushita N, Hinton PR, Kumar S., Design of humanized antibodies: from anti-Tac to Zenapax., *Methods.* 2005 May;36(1):69-83.
- [Documento distinto de patente 8] Rajpal A, Beyaz N, Haber L, Cappuccilli G, Yee H, Bhatt RR, Takeuchi T, Lemer RA, Crea R., A general method for greatly improving the affinity of antibodies by using combinatorial libraries., *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005 Jun 14;102(24):8466-71.
- 25 [Documento distinto de patente 9] Ewert S, Honegger A, Pluckthun A., Stability improvement of antibodies for extracellular and intracellular applications: CDR grafting to stable frameworks and structure-based framework engineering., *Methods.* 2004 Oct;34(2): 184-99. Review.
- [Documento distinto de patente 10] Lobo ED, Hansen RJ, Balthasar JP., Antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics., *J Pharm Sci.* 2004 Nov;93(11):2645-68. Review.
- 30 [Documento distinto de patente 11] Yamasaki Y, Sumimoto K, Nishikawa M, Yamashita F, Yamaoka K, Hashida M, Takakura Y., pharmacokinetic analysis of in vivo disposition of succinylated proteins targeted to liver nonparenchymal cells via scavenger receptors: importance of molecular size and negative charge density for in vivo recognition by receptors., *Pharmacol Exp Ther.* 2002 May;301(2):467-77.
- 35 [Documento distinto de patente 12] Poduslo JF, Curran GL., olyamine modification increases the permeability of proteins at the blood-nerve and blood-brain barriers., *Neurochem.* 1996 Apr;66(4): 1599-609.
- [Documento distinto de patente 13] Yang K, Basu A, Wang M, Chintala R, Hsieh MC, Liu S, Hua J, Zhang Z, Zhou J, Li M, Phyu H, Petti G, Mendez M, Janjua H, Peng P, Longley C, Borowski V, Mehlig M, Filpula D., Tailoring structure-function and pharmacokinetic properties of single-chain Fv proteins by site-specific PEGylation., *Protein Eng.* 2003 Oct;16(10):761-70.
- 40 [Documento distinto de patente 14] Kobayashi H, Le N, Kim IS, Kim MK, Pie JE, Drumm D, Paik DS, Waldmann TA, Paik CH, Carrasquillo JA., The pharmacokinetic characteristics of glycolated humanized anti-Tac Fabs are determined by their isoelectric points., *Cancer Res.* 1999 Jan 15;59(2):422-30.
- [Documento distinto de patente 15] Kim I, Kobayashi H, Yoo TM, Kim MK, Le N, Han ES, Wang QC, Pastan I, Carrasquillo JA, Paik CH., Lowering of pl by acylation improves the renal uptake of 99mTc-labeled anti-Tac dsFv: effect of different acylating reagents., *Nucl Med Biol.* 2002 Nov;29(8):795-801
- 45 [Documento distinto de patente 16] Kim IS, Yoo TM, Kobayashi H, Kim MK, Le N, Wang QC, Pastan I, Carrasquillo JA, Paik CH., Chemical modification to reduce renal uptake of disulfide-bonded variable region fragment of anti-Tac monoclonal antibody labeled with 99mTc., *Bioconj Chem.* 1999 May-Jun;10(3):447-53.
- 50 [Documento distinto de patente 17] Onda M, Nagata S, Tsutsumi Y, Vincent JJ, Wang Q, Kreitman RJ, Lee B, Pastan I., Lowering the isoelectric point of the Fv portion of recombinant immunotoxins leads to decreased nonspecific animal toxicity without affecting antitumor activity., *Cancer Res.* 2001 Jul 1;61(13):5070-7.

- [Documento distinto de patente 18] Pavlinkova G, Beresford G, Booth BJ, Batra SK, Colcher D., Charge-modified single chain antibody constructs of monoclonal antibody CC49: generation, characterization, pharmacokinetics, and biodistribution analysis., Nucl Med Biol. 1999 Jan;26(1):27-34.
- 5 [Documento distinto de patente 19] Deen WM, Lazzara MJ, Myers BD., Structural determinants of glomerular permeability., Am J Physiol Renal Physiol. 2001 Oct;281(4):F579-96.
- [Documento distinto de patente 20] Schaeffer RC Jr, Gratrix ML, Mucha DR, Carbajal JM., The rat glomerular filtration barrier does not show negative charge selectivity., Microcirculation. 2002 Oct;9(5):329-42.
- [Documento distinto de patente 21] Goode NP, Shires M, Davison AM., The glomerular basement membrane charge-selectivity barrier: an oversimplified concept?, Nephrol Dial Transplant. 1996 Sep;11(9):1714-6.
- 10 [Documento distinto de patente 22] Comper WD, Glasgow EF., Charge selectivity in kidney ultrafiltration., Kidney Int. 1995 May;47(5): 1242-51.
- [Documento distinto de patente 23] Ghetie V, Ward ES. FcRn: the MHC class I-related receptor that is more than an IgG transporter. Immunol Today. 1997 Dec;18(12):592-8.
- 15 [Documento distinto de patente 24] He XY, Xu Z, Melrose J, Mallowney A, Vasquez M, Queen C, Vexler V, Klingbeil C, Co MS, Berg EL. Humanization and pharmacokinetics of a monoclonal antibody with specificity for both E- and P-selectin. J Immunol. 1998 Jan 15;160(2):1029-35.
- [Documento distinto de patente 25] Gobburu JV, Tenhoor C, Rogge MC, Frazier DE Jr, Thomas D, Benjamin C, Hess DM, Jusko WJ. Pharmacokinetics/dynamics of 5c8, a monoclonal antibody to CD 154 (CD40 ligand) suppression of an immune response in monkeys. J Pharmacol Exp Ther. 1998 Aug;286(2):925-30.
- 20 [Documento distinto de patente 26] Kashmiri SV, Shu L, Padlan EA, Milenic DE, Schlom J, Hand PH., Generation, characterization, and in vivo studies of humanized anticarcinoma antibody CC49., Hybridoma. 1995 Oct; 14(5) :461-73.
- [Documento distinto de patente 27] Graves SS, Goshom SC, Stone DM, Axworthy DB, Reno JM, Bottino B, Searle S, Henry A, Pedersen J, Rees AR, Libby RT., Molecular modeling and preclinical evaluation of the humanized NR-LU-13 antibody., Clin Cancer Res. 1999 Apr;5(4):899-908.
- 25 [Documento distinto de patente 28] Couto JR, Blank EW, Peterson JA, Ceriani RL., Anti-BA46 monoclonal antibody Mc3: humanization using a novel positional consensus and in vivo and in vitro characterization., Cancer Res. 1995 Apr 15;55(8): 1717-22.
- [Documento distinto de patente 29] Adams CW, Allison DE, Flagella K, Presta L, Clarke J, Dybdal N, McKeever K, Sliwkowski MX. Humanization of a recombinant monoclonal antibody to produce a therapeutic HER dimerization inhibitor, pertuzumab., Cancer Immunol Immunother. 2005 Sep 3;: 1-11
- 30 [Documento distinto de patente 30] Binz HK, Amstutz P, Pluckthun A., Engineering novel binding proteins from nonimmunoglobulin domains., Nat Biotechnol. 2005 Oct;23(10): 1257-68.

## Resumen

35 La presente invención se refiere a los modos de realización como se definen en las reivindicaciones. En particular, la presente invención se refiere a un procedimiento para producir un anticuerpo IgG modificado, con una semivida en sangre que se prolonga o se reduce en comparación con antes de la modificación del anticuerpo, en el que el procedimiento comprende (a) seleccionar residuos de aminoácidos que puede estar expuestos en la superficie del anticuerpo dentro de aminoácidos en las regiones variables de cadena H o cadena L del anticuerpo; (b) modificar un

40 ácido nucleico que codifica el anticuerpo para cambiar la carga de al menos un residuo de aminoácido seleccionado en la etapa (a), en el que se logra el cambio de carga por sustitución de aminoácidos; (c) cultivar una célula huésped para expresar el ácido nucleico; y (d) recoger el anticuerpo del cultivo de célula huésped.

La presente invención también se refiere a un procedimiento para prolongar o reducir la semivida de un anticuerpo IgG, en el que el procedimiento comprende (a) seleccionar residuos de aminoácidos que pueden estar expuestos en la superficie del anticuerpo dentro de los aminoácidos en las regiones variables de cadena H o cadena L del anticuerpo; y (b) modificar al menos un residuo de aminoácido seleccionado en la etapa (a) por sustitución para

45 cambiar su carga.

Un objetivo de la presente divulgación es proporcionar procedimientos para controlar la semivida en sangre de los polipéptidos que comprenden un dominio de unión a FcRn, tales como anticuerpos IgG, modificando los polipéptidos a través de sustitución de residuos de aminoácidos expuestos en su superficie; composiciones farmacéuticas que comprenden polipéptidos que comprenden un dominio de unión a FcRn, con una semivida en sangre que se controla

50 por sustituciones de aminoácidos; y procedimientos para producir las composiciones farmacéuticas.

Los inventores de la presente invención realizaron estudios especiales sobre procedimientos para controlar la semivida en sangre de polipéptidos que comprenden un dominio de unión a FcRn a través de sustituciones de aminoácidos. Como resultado, los inventores de la presente invención desarrollaron procedimientos para controlar la semivida de anticuerpos IgG controlando la carga de superficie a través de la modificación de residuos expuestos en la superficie en las regiones variables de los anticuerpos IgG, polipéptidos que comprenden un dominio de unión a FcRn. Específicamente, los inventores de la presente invención descubrieron sitios de modificación en regiones variables para controlar la carga de superficie y la semivida de anticuerpos IgG en sangre sin influir en la estructura y función de los anticuerpos. Además, los inventores de la presente invención confirmaron que los anticuerpos con una semivida en sangre que se controla por la presente invención realmente mantienen su actividad.

Independientemente del tipo de antígeno objetivo, los procedimientos de la presente divulgación son ampliamente aplicables a polipéptidos que comprenden un dominio de unión a FcRn, tal como las IgG, que se reciclan por medio de la vía de rescate de FcRn, y con una vía metabólica principal que no es la excreción renal.

La presente divulgación se refiere a procedimientos para controlar la semivida en sangre de los polipéptidos que comprenden un dominio de unión a FcRn, tales como anticuerpos IgG, modificando los polipéptidos a través de sustitución de residuos de aminoácidos expuestos en su superficie; composiciones farmacéuticas que comprenden polipéptidos que comprenden un dominio de unión a FcRn, con una semivida en sangre que se controla por sustituciones de aminoácidos; y procedimientos para producir las composiciones farmacéuticas.

Más específicamente, la presente divulgación se refiere a lo siguiente:

[1] un procedimiento para producir un polipéptido que comprende un dominio de unión a FcRn, con una farmacocinética en sangre que está controlada, en el que el procedimiento comprende:

(a) modificar un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende un dominio de unión a FcRn para cambiar la carga de al menos un residuo de aminoácido que se puede estar expuesto en la superficie del polipéptido,

(b) cultivar una célula huésped para expresar el ácido nucleico, y

(c) recoger el polipéptido que comprende un dominio de unión a FcRn del cultivo de célula huésped;

[2] el procedimiento de [1], en el que el residuo de aminoácido que puede estar expuesto en la superficie del polipéptido que comprende un dominio de unión a FcRn está situado en un dominio distinto del dominio de unión a FcRn dentro del polipéptido;

[3] el procedimiento de [2], en el que el dominio de unión a FcRn comprende un Fc o dominio similar a Fc;

[4] el procedimiento de [1], en el que el polipéptido que comprende un dominio de unión a FcRn es un anticuerpo IgG;

[5] el procedimiento de [4], en el que el residuo de aminoácido con una carga que se cambia en la etapa (a) es un residuo de aminoácido en una región variable de cadena pesada o cadena ligera del anticuerpo IgG;

[6] el procedimiento de [1], en el que el control de la farmacocinética en sangre es el control de uno cualquiera de los siguientes parámetros: semivida en sangre, tiempo de permanencia medio en sangre, o aclaramiento en sangre;

[7] el procedimiento de [1], en el que el cambio de carga del residuo de aminoácido en la etapa (a) se logra por una sustitución de aminoácidos;

[8] un polipéptido que comprende un dominio de unión a FcRn, que se produce por el procedimiento de [1];

[9] un procedimiento para controlar la farmacocinética en sangre de un polipéptido que comprende un dominio de unión a FcRn, que comprende cambiar la carga de al menos un residuo de aminoácido que puede estar expuesto en la superficie del polipéptido;

[10] el procedimiento de [9], en el que el residuo de aminoácido que puede estar expuesto en la superficie del polipéptido que comprende un dominio de unión a FcRn está situado en un dominio distinto del dominio de unión a FcRn dentro del polipéptido;

[11] el procedimiento de [10], en el que el dominio de unión a FcRn comprende un Fc o dominio similar a Fc;

[12] el procedimiento de [9], en el que el polipéptido que comprende un dominio de unión a FcRn es un anticuerpo IgG;

[13] el procedimiento de [12], en el que el residuo de aminoácido con una carga que se cambia es un residuo de aminoácido en una región variable de cadena pesada o cadena ligera del anticuerpo IgG;

[14] el procedimiento de [9], en el que el control de la farmacocinética en sangre es el control de uno cualquiera de los siguientes parámetros: semivida en sangre, tiempo de permanencia medio en sangre, o aclaramiento en sangre;

[15] el procedimiento de [9], en el que el cambio de carga del residuo de aminoácido se logra por una sustitución de aminoácidos;

[16] un polipéptido que comprende un dominio de unión a FcRn, con una farmacocinética en sangre que está controlada por el procedimiento de [9];

5 [17] un anticuerpo humanizado que comprende regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un animal no humano, regiones estructurales derivadas de un ser humano (FR), y regiones constantes humanas, en el que al menos un residuo de aminoácido que puede estar expuesto en la superficie en las CDR o FR tiene una carga diferente de la del residuo de aminoácido correspondiente en las CDR o FR del tipo natural, y en el que su farmacocinética en sangre se controla en comparación a un anticuerpo quimérico con unas regiones variables que se derivan de un anticuerpo del animal no humano y con unas regiones constantes que son las mismas;

10 [18] el anticuerpo humanizado de [17], en el que las regiones constantes humanas comprenden un dominio Fc humano natural;

[19] una composición que comprende el anticuerpo humanizado de [17] o [18] y un vehículo farmacéuticamente aceptable;

15 [20] un ácido nucleico que codifica un polipéptido que constituye el anticuerpo humanizado de [17] o [18];

[21] una célula huésped que comprende el ácido nucleico de [20];

[22] un procedimiento para producir el anticuerpo humanizado de [17] o [18], que comprende cultivar la célula huésped de [21] y recoger un polipéptido del cultivo celular;

20 [23] un anticuerpo IgG, en el que se cambia la carga de al menos un residuo de aminoácido seleccionado de los residuos de aminoácidos en las posiciones 10, 12, 23, 39, 43 y 105 de acuerdo con el sistema de numeración Kabat en una región variable de cadena pesada, y con una farmacocinética en sangre que está controlada en comparación con antes de la modificación del residuo de aminoácido;

[24] el anticuerpo IgG de [23], en el que el residuo de aminoácido modificado se selecciona de los residuos de aminoácidos del grupo (a) o (b) a continuación:

25 (a) ácido glutámico (E) y ácido aspártico (D), y

(b) lisina (K), arginina (R) e histidina (H);

[25] una composición que comprende el anticuerpo IgG de [23] o [24] y un vehículo farmacéuticamente aceptable;

[26] un ácido nucleico que codifica un polipéptido que constituye el anticuerpo IgG de [23] o [24];

[27] una célula huésped que comprende el ácido nucleico de [26]; y

30 [28] un procedimiento para producir el anticuerpo de [23] o [24], que comprende cultivar la célula huésped de [27] y recoger un polipéptido del cultivo celular.

### Breve descripción de los dibujos

35 La fig. 1 es un gráfico que muestra la evaluación de la actividad de coagulación para un anticuerpo biespecífico humanizado (A69 humanizado (hA69a), B26 humanizado (hB26-F123e4) y BBA humanizado (hAL-F123j4)). El resultado de la evaluación demuestra que las actividades de coagulación son equivalentes a o mayores que las de los anticuerpos biespecíficos quiméricos.

40 La fig. 2 es un diagrama que muestra el modelado de anticuerpo para las combinaciones de región variable de cadena H-A69 humanizado (hA69a) y BBA humanizado (hAL-F123j4), y región variable de cadena H-hB26 humanizado (hB26-F123e4) y BBA humanizado (hAL-F123j4). Las cadenas laterales de aminoácidos que pueden cambiar la carga de superficie se muestran resaltadas. La numeración se realizó de acuerdo con el sistema de numeración de base de datos de Kabat (Kabat EA *et al.*, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest. NIH).

La fig. 3 es una fotografía que muestra un resultado de análisis de enfoque isoelectrico de ATF, hA69-PF, BiAb, hB26-PF, hA69-N97R, hA69-p18, hB26-F123e4 y hB26-p15.

45 La fig. 4 muestra una curva de calibrado de un marcador de pI y el pI de cada muestra determinado a partir de la curva, que se obtuvieron a partir del análisis de enfoque isoelectrico de ATF, hA69-PF, BiAb, hB26-PF, hA69-N97R, hA69-p18, hB26-F123e4 y hB26-p15. Los diagramas demuestran que la carga de superficie varía dependiendo de las secuencias de aminoácidos de regiones variables y las diferencias en la carga de superficie que resultan de las modificaciones de aminoácidos desplazan el pI.

La fig. 5 muestra los resultados del análisis de anticuerpos A69 humanizados (hA69a y hA69-N97R; hA69-N97R, hA69-p18 y hA69-PF) con regiones variables no modificadas o modificadas para determinar su actividad de unión al factor IXa de antígeno. Los resultados demuestran que los anticuerpos modificados con puntos isoeléctrico desplazados tienen una actividad de unión comparable a la de los anticuerpos no modificados.

5 La fig. 6 es un gráfico que muestra el resultado del análisis de anticuerpos B26 humanizados (hB26-F123e4 y hB26-p15) con regiones variables no modificadas o modificadas, respectivamente, para determinar su actividad de unión al factor X de antígeno. Los resultados demuestran que el anticuerpo modificado con punto isoeléctrico desplazado tiene una actividad de unión comparable a la de los anticuerpos no modificados.

10 La fig. 7 es un gráfico que muestra las evoluciones temporales de las concentraciones plasmáticas de ATF, hA69-PF, BiAb y hB26-PF.

La fig. 8 muestra la correlación entre el pl y parámetros farmacocinéticos, aclaramiento (CL) y semivida (T1/2), para ATF, hA69-PF, BiAb, hB26-PF, hA69-N97R, hA69-p18, hB26-F123e4 y hB26-p15.

### Descripción detallada

15 La presente divulgación proporciona procedimientos para el control de la farmacocinética de polipéptidos que comprenden un dominio de unión a FcRn en sangre. En un modo de realización preferente, los procedimientos de la presente invención comprenden cambiar la carga de al menos un residuo de aminoácido que puede estar expuesto en la superficie de dichos polipéptidos. Específicamente, se puede controlar la farmacocinética de estos polipéptidos en sangre desplazando su punto isoeléctrico (pl) cambiando la carga de sus residuos de aminoácidos.

20 Como se describe anteriormente, la farmacocinética en sangre de minicuerpos tales como scFv y Fab no se puede controlar necesariamente desplazando el pl. Se sabe que la excreción renal es la vía metabólica principal de dichos minicuerpos. Sin embargo, algunos de los documentos distintos de patente 19 a 22 describen que la eficacia de la filtración renal en la excreción renal es menor si la carga de proteína es más negativa, mientras que otros informan de que la carga de proteína no tiene influencia sobre la eficacia de la filtración renal. Además, algunos de los documentos distintos de patente 14 a 18 informan de que la semivida de un minicuerpo en sangre se puede prolongar disminuyendo su pl, mientras que otros informan de que se puede acortar disminuyendo su pl. Las proteínas filtradas a través del riñón se reabsorben por el túbulo proximal. Esta reabsorción se puede llegar a suprimir más cuando la carga de una proteína es más negativa. Esto sugiere que la semivida de un minicuerpo no se puede controlar de forma exacta como se pretende desplazando el pl.

30 Por otra parte, la vía metabólica principal de los anticuerpos IgG no es la excreción renal debido a que su peso molecular es relativamente alto. Se sabe que los anticuerpos IgG con Fc se reciclan por medio de la vía de rescate de FcRn expresada en las células endoteliales de vasos sanguíneos y similares, y por tanto tienen una semivida larga. Se asume que la IgG se metaboliza principalmente en las células endoteliales (documento distinto de patente 23). En consecuencia, se ha especulado con que las moléculas de IgG libres se metabolizan mientras que las moléculas de IgG incorporadas de forma no específica en células endoteliales se reciclan por medio de su unión a FcRn. Las IgG con una disminución en la actividad de unión a FcRn tienen una semivida más corta en sangre, mientras que su semivida en sangre se puede prolongar incrementando su actividad de unión a FcRn (documento distinto de patente 23). En consecuencia, se han llevado a cabo procedimientos previos para controlar la farmacocinética de las IgG en sangre alterando la actividad de unión a FcRn a través de la modificación de Fc. Por el contrario, el ejemplo 8 en el presente documento demuestran que cuando las IgG comparten el mismo dominio Fc, la semivida de la IgG se correlaciona con el pl mostrando un coeficiente de correlación alto independientemente del tipo de antígeno objetivo, y que la semivida en sangre de dos tipos de anticuerpos frente a diferentes antígenos se puede controlar en realidad modificando los pl de sus regiones variables sin modificar el Fc. Se supone que la tasa de captación de anticuerpo inespecífico por las células endoteliales depende de la interacción fisicoquímica de Coulomb entre una IgG y una superficie celular cargada negativamente. Por lo tanto, se cree que una disminución (un incremento) en el pl de IgG reduce (potencia) la interacción de Coulomb, y esto está seguido de una reducción (un incremento) en una captación inespecífica por células endoteliales, lo que da lugar a una disminución (un incremento) en el metabolismo en estas células, y como resultado, se puede controlar la farmacocinética en sangre. Puesto que la interacción de Coulomb entre la superficie celular cargada negativamente de las células endoteliales es una interacción fisicoquímica, se supone que la interacción no depende del antígeno objetivo. Por tanto, los procedimientos de la presente divulgación para controlar la farmacocinética en sangre son ampliamente aplicables a polipéptidos tales como IgG arbitrarias que comprenden un dominio de unión a FcRn que se reciclan por medio de la vía de rescate de FcRn y con una vía metabólica principal que no es la excreción renal, independientemente del tipo de antígeno.

55 Por tanto, los polipéptidos divulgados en el presente documento que comprenden un dominio de unión a FcRn no se limitan a anticuerpos IgG, sino que pueden ser cualquier proteína que se pueda unir (que tenga actividad o afinidad de unión) a un receptor Fc (FcRn). Por tanto, los polipéptidos divulgados en el presente documento que comprenden un dominio de unión a FcRn no están particularmente limitados; sin embargo, son preferentemente proteínas que comprenden dominio Fc de anticuerpo o dominio de tipo Fc. Los polipéptidos divulgados en el presente documento que comprenden un dominio de unión a FcRn incluyen, por ejemplo, anticuerpos IgG. Además, los polipéptidos

divulgados en el presente documento que comprenden un dominio de unión a FcRn incluyen formas modificadas de anticuerpos (proteínas) siempre que se puedan unir a FcRn. Los ejemplos más preferentes de polipéptidos de la presente invención que comprenden un dominio de unión a FcRn son los anticuerpos IgG.

5 Cuando se usa un anticuerpo IgG como polipéptido que comprende un dominio de unión a FcRn en la presente invención, puede ser de cualquier subtipo de IgG o un anticuerpo IgG biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos específicos para dos epítomos diferentes, e incluyen anticuerpos que reconocen diferentes antígenos y los que reconocen epítomos diferentes en un único antígeno. Por otra parte, cuando el anticuerpo es un minicuerpo tal como scFv o Fab, con una vía metabólica principal que es la excreción renal, su farmacocinética en sangre no se puede controlar desplazando el pl, como se describe anteriormente. La presente divulgación es aplicable a cualquier tipo de anticuerpo, siempre que sea una proteína de unión a Fc con una vía metabólica principal que no es la excreción renal, por ejemplo, scFv-Fc, dAb-Fc y proteínas de fusión Fc. Dado que la excreción renal no es la vía metabólica principal de estas moléculas, se puede controlar su farmacocinética en sangre desplazando el pl usando los procedimientos de la presente invención. Las moléculas de anticuerpo para las que la presente divulgación es aplicable pueden ser moléculas similares a anticuerpos. Moléculas similares a anticuerpos se refiere a moléculas que ejercen sus funciones uniéndose a moléculas objetivo (documento distinto de patente 30), e incluyen, por ejemplo, DARPs, anticuerpos y avímeros.

En el presente documento, la expresión “se controla la farmacocinética en sangre” indica que la farmacocinética en sangre se desplaza en una dirección deseada cuando se compara entre antes y después de la modificación de un polipéptido que comprende un dominio de unión a FcRn. Específicamente, cuando el propósito es el de prolongar la semivida en sangre, el control de la farmacocinética en sangre quiere decir la prolongación de la semivida en sangre. De forma alternativa, cuando el propósito es reducir la semivida en sangre, el control de la farmacocinética en sangre se refiere a la reducción de la semivida en sangre.

En la presente divulgación, tanto si la farmacocinética en sangre de un polipéptido que comprende un dominio de unión a FcRn se desplaza en una dirección deseada, como si la farmacocinética en sangre se puede controlar de forma exacta como se pretende, se puede evaluar llevando a cabo pruebas cinéticas apropiadas, por ejemplo, pruebas usando ratones, ratas, conejos, perros, monos o similares. Más específicamente, como se usa en el presente documento, “control de la farmacocinética en sangre” incluye el control de cualquier parámetro tal como la semivida en sangre, tiempo de permanencia medio en sangre, o aclaramiento en sangre (Pharmacokinetics: Enshu niyori Rikai (Understanding through Exercises), Nanzando). Por ejemplo, el control de la farmacocinética en sangre se puede evaluar por análisis no compartimental apropiado usando un programa informático de análisis cinético *in vivo*, WinNonlin (Pharsight), de acuerdo con el manual de instrucciones adjunto.

En el presente documento, la expresión “aminoácidos que pueden estar expuestos en la superficie”, en general, quiere decir aminoácidos que constituyen un polipéptido que comprende un dominio de unión a FcRn y que están presentes en la superficie del polipéptido. Las cadenas laterales de un aminoácido que está presente en la superficie del polipéptido pueden estar en contacto con moléculas de disolvente (típicamente, moléculas de agua). Sin embargo, no toda la cadena lateral tiene que estar en contacto con las moléculas de disolvente. Cuando incluso una porción de las cadenas laterales está en contacto con moléculas de disolvente, se considera que el aminoácido está presente en la superficie del polipéptido. Los expertos en la técnica pueden preparar modelos de homología para polipéptidos y anticuerpos a través del modelado de homología usando un programa informático comercialmente disponible, y así sucesivamente, y también pueden seleccionar residuos apropiados como aminoácidos de superficie usando los modelos.

En la presente invención, los “aminoácidos que pueden estar expuestos en la superficie” no están limitados en particular; sin embargo, están preferentemente fuera de un dominio de unión a FcRn de un polipéptido que comprende un dominio de este tipo. Un dominio de unión a FcRn incluye, por ejemplo, dominios Fc y de tipo Fc.

45 Cuando un polipéptido de la presente invención que comprende un dominio de unión a FcRn es una IgG, los residuos de aminoácidos con cargas que se van a cambiar de acuerdo con la presente invención están presentes preferentemente dentro de las regiones variables de la cadena pesada o ligera del anticuerpo IgG. Específicamente, las regiones variables incluyen regiones determinantes de la complementariedad (CDR) y regiones estructurales (FR).

50 Los expertos en la técnica pueden seleccionar aminoácidos de superficie apropiados en regiones variables de anticuerpo usando modelos de homología preparados por modelado de homología o similares. Dichos aminoácidos de superficie incluyen, por ejemplo, aminoácidos en H1, H3, H5, H8, H10, H12, H13, H15, H16, H19, H23, H25, H26, H39, H42, H43, H44, H46, H68, H71, H72, H73, H75, H76, H81, H82b, H83, H85, H86, H105, H108, H110 y H112 en una región FR de la cadena H, pero no se limitan a estos en la presente divulgación.

55 Asimismo, los expertos en la técnica también pueden seleccionar aminoácidos de superficie en una región CDR de la cadena H usando modelos de homología. Por ejemplo, el aminoácido en H97 está expuesto en la superficie en casi todos los anticuerpos. Los aminoácidos de superficie en una región FR de la cadena L incluyen, por ejemplo, los aminoácidos en L1, L3, L7, L8, L9, L11, L12, L16, L17, L18, L20, L22, L38, L39, L41, L42, L43, L45, L46, L49, L57, L60, L63, L65, L66, L68, L69, L70, L74, L76, L77, L79, L80, L81, L85, L100, L103, L105, L106, L107 y L108, pero no

se limitan a estos en la presente divulgación. Asimismo, los expertos en la técnica también pueden seleccionar aminoácidos de superficie en una región CDR de la cadena L usando modelos de homología.

En los procedimientos de la presente divulgación, "modificación" de un residuo de aminoácido específicamente se refiere a la sustitución del residuo de aminoácido original con un residuo de aminoácido diferente, delección del residuo de aminoácido original, adición de otro residuo de aminoácido, y así sucesivamente. La modificación quiere decir preferentemente la sustitución del residuo de aminoácido original con un residuo de aminoácido diferente. Específicamente, como se usa en el presente documento, "modificación de la carga de un residuo de aminoácido" incluye preferentemente sustituciones de aminoácidos.

Cuando un polipéptido de la presente invención que comprende un dominio de unión a FcRn es un anticuerpo IgG, "cambiar la carga de un residuo de aminoácido" descrito anteriormente incluye, por ejemplo, cambiar la carga de al menos un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en residuos de aminoácidos en las posiciones 10, 12, 23, 39, 43 y 105 de acuerdo con el sistema de numeración Kabat en una cadena pesada del anticuerpo IgG. De los residuos de aminoácidos en las posiciones indicadas anteriormente, no es necesario modificar los residuos de aminoácidos distintos de los residuos de aminoácidos con cargas que se han modificado siempre que la farmacocinética en sangre se haya controlado como se pretende. Los aminoácidos se pueden modificar para que tengan una carga del mismo tipo que la de los residuos de aminoácidos modificados o para que no tengan carga alguna.

Se sabe que los aminoácidos incluyen aminoácidos cargados. Los aminoácidos conocidos, en general, con una carga positiva (aminoácidos cargados positivamente) incluyen la lisina (K), arginina (R) e histidina (H). Los aminoácidos conocidos con una carga negativa (aminoácidos cargados negativamente) incluyen ácido aspártico (D) y ácido glutámico (E). Los ácidos aminoácidos distintos de éstos son conocidos como aminoácidos no cargados.

Preferentemente, los "residuos de aminoácidos modificados" descritos anteriormente se seleccionan de forma apropiada de residuos de aminoácidos de cualquier grupo (a) o (b) indicado a continuación; sin embargo, los aminoácidos modificados no están particularmente limitados a estos.

(a) ácido glutámico (E) y ácido aspártico (D)

(b) lisina (K), arginina (R) e histidina (H)

Cuando un residuo de aminoácido original (no modificado) ya tiene una carga, la modificación del aminoácido en un aminoácido no cargado también es un modo de realización preferente de la presente divulgación. Específicamente, la modificación de la presente invención incluye:

(1) sustitución de un aminoácido cargado con un aminoácido no cargado;

(2) sustitución de un aminoácido cargado con un aminoácido que lleva una carga opuesta al aminoácido original; y

(3) sustitución de un aminoácido no cargado con un aminoácido cargado.

En los procedimientos divulgados en el presente documento, preferentemente, los residuos de aminoácidos en los polipéptidos que comprenden un dominio de unión a FcRn se modifican para desplazar el punto isoeléctrico (pI). Cuando el número de residuos de aminoácidos que se van a introducir a través de la modificación es de dos o más, algunos de ellos pueden ser residuos aminoácidos no cargados.

El número de residuos de aminoácidos que se van a modificar en los procedimientos de la presente invención no está particularmente limitado. Sin embargo, cuando se modifica una región variable del anticuerpo, por ejemplo, sólo se modifican preferentemente un número mínimo de los residuos de aminoácidos requeridos para lograr la farmacocinética en sangre controlada como se pretende, de modo que no se reduzca la actividad de unión a antígeno y no se incremente la inmunogenicidad.

La secuencia de aminoácidos después de la modificación es preferentemente una secuencia humana de modo que no se incremente la inmunogenicidad; sin embargo, la presente divulgación no se limita a esto. Además, se pueden introducir mutaciones en sitios distintos de aquellos en los que se han realizado modificaciones para desplazar el punto isoeléctrico, de modo que las FR respectivas (FR1, FR2, FR3 y FR4) después de la modificación son secuencias humanas. Se ha informado de un procedimiento de este tipo para sustituir cada FR con una secuencia humana en un documento distinto de patente (Ono K *et al.*, Mol Immunol. 1999 Abr; 36(6): 387-395). De forma alternativa, para desplazar el punto isoeléctrico, se puede modificar cada FR en otra FR humana con un punto isoeléctrico diferente (por ejemplo, FR3 se puede sustituir con otra FR humana con un punto isoeléctrico menor). Se ha informado de un procedimiento de humanización de este tipo en un documento distinto de patente (Dall'Acqua WF, Methods. 2005 Mayo; 36(1): 43-60).

Aun cuando la farmacocinética en sangre no se puede controlar como se pretende modificando sólo un pequeño número de cargas de superficie, se puede obtener un polipéptido deseado que comprende un dominio de unión a

FcRn, con una farmacocinética en sangre que está controlada, repitiendo las modificaciones de carga de superficie y la evaluación de la farmacocinética en sangre.

En monos Rhesus, el documento distinto de patente 24 informa de una comparación de la farmacocinética en sangre EP5C7.g4 quimérico, un anticuerpo quimérico (IgG4), y HuEP5C7.g4, un anticuerpo humanizado (IgG4), de los que ambos se derivan de un anticuerpo anti-E, P-selectina, en la que se descubrió que la farmacocinética era comparable entre sí. El documento distinto de patente 25 describe una comparación de la farmacocinética en sangre en macacos de Java entre ch5d8, un anticuerpo quimérico, y Hu5c8, un anticuerpo humanizado, de los que ambos se derivan de un anticuerpo anti-CD154, en la que se descubrió que la farmacocinética era comparable entre sí. El documento distinto de patente 26 demuestra que la farmacocinética en sangre en ratones de cCC49, un anticuerpo quimérico, era comparable a la de HuCC49, un anticuerpo humanizado. Además, los documentos distintos de patente 27 y 28 informa de que la farmacocinética y la distribución en sangre de los anticuerpos de ratón eran comparables a las de los anticuerpos humanizados cuando se evaluaron usando ratones. Puesto que tanto los Fc de ratón como los Fc humanos son reactivos con el FcRn de ratón, los hallazgos anteriores sugieren que la farmacocinética y la distribución en sangre de los anticuerpos quiméricos son comparables a las de los anticuerpos humanizados descritos anteriormente. Como se muestra por estos ejemplos, la farmacocinética de los anticuerpos quiméricos en sangre es comparable a la de los anticuerpos humanizados. Específicamente, cuando se humaniza un anticuerpo por un procedimiento conocido tal como el descrito en el documento distinto de patente 7, su farmacocinética en sangre es comparable a la de un anticuerpo quimérico. Por tanto, los anticuerpos humanizados con una farmacocinética en sangre que está controlada no se pueden producir por procedimientos conocidos.

Se pueden producir anticuerpos humanizados con una farmacocinética en sangre que está controlada (específicamente, se prolonga la semivida en sangre o se reduce la farmacocinética en sangre) en comparación con anticuerpos quiméricos desplazando sus pl a través de la modificación de aminoácidos de superficie en el momento de la humanización de anticuerpos quiméricos, usando los procedimientos descubiertos por la presente invención. La modificación de los aminoácidos de superficie para controlar la farmacocinética en sangre se puede realizar en el momento de la humanización o después de la humanización.

El documento distinto de patente 29 describe que la farmacocinética en sangre de tres tipos de anticuerpos humanizados, trastuzumab, bevacizumab y pertuzumab, obtenidos a través de la humanización usando la misma secuencia de FR de un anticuerpo humano, era casi la misma. Específicamente, la farmacocinética en sangre es casi la misma cuando se realiza la humanización usando la misma secuencia de FR. La concentración en sangre se puede controlar sólo cuando se desplazan los pl de los anticuerpos modificando los aminoácidos de superficie usando los procedimientos descubiertos por la presente invención, además del procedimiento de humanización descrito anteriormente.

Además, se pueden producir anticuerpos humanos, con una farmacocinética en sangre que está controlada (específicamente, se prolonga la semivida en sangre o se reduce la farmacocinética en sangre) en comparación con los anticuerpos humanos originales desplazando los pl de anticuerpos humanos preparados a partir de colecciones de anticuerpos humanos o de ratones que producen anticuerpos humanos y similares, a través de la modificación de aminoácidos de superficie.

Los "anticuerpos" de la presente divulgación incluyen los anticuerpos obtenidos introduciendo adicionalmente sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones y similares de aminoácidos en las secuencias de aminoácidos de anticuerpos que ya se han modificado para cambiar las cargas de sus residuos de aminoácidos como se describe anteriormente. Los anticuerpos de la presente divulgación también incluyen los anticuerpos obtenidos cambiando adicionalmente la carga de los residuos de aminoácidos en anticuerpos con secuencias de aminoácidos que ya se han modificado por sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos, quimerización, humanización o similares.

Se pueden lograr modificaciones de aminoácidos tales como sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos, y quimerización y humanización, por procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Asimismo, las secuencias de aminoácidos de las regiones constantes y variables de anticuerpos que se usan para producir los anticuerpos divulgados en el presente documento como anticuerpos recombinantes también se pueden modificar por sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos, o quimerización, humanización o similares.

Los anticuerpos divulgados en el presente documento pueden ser anticuerpos derivados de cualquier animal tal como un ratón, ser humano, rata, conejo, cabra o camello. Además, los anticuerpos pueden ser anticuerpos modificados, por ejemplo, anticuerpos quiméricos y en particular, anticuerpos humanizados que comprenden sustituciones de aminoácidos en su secuencia. Los anticuerpos también incluyen productos de modificación de anticuerpos unidos a diversas moléculas.

"Anticuerpos quiméricos" son anticuerpos preparados combinando secuencias derivadas de diferentes animales. Los anticuerpos quiméricos incluyen, por ejemplo, anticuerpos que comprenden regiones variables (V) de la cadena pesada y ligera de un anticuerpo de ratón y regiones constantes (C) de la cadena pesada y ligera de un anticuerpo humano. Se pueden preparar anticuerpos quiméricos por procedimientos conocidos, por ejemplo, por el siguiente

procedimiento: un ADN que codifica una región V de anticuerpo se enlaza con un ADN que codifica una región C de anticuerpo humano; el producto de enlace resultante se inserta en un vector de expresión; y la construcción se puede introducir en un huésped para producir un anticuerpo quimérico.

5 Los "anticuerpos humanizados" también se denominan anticuerpos humanos remodelados, y se pueden obtener sustituyendo las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo humano por las CDR de un anticuerpo derivado de un mamífero no humano, por ejemplo, un ratón. Son conocidos los procedimientos para identificar las CDR (Kabat *et al.*, Sequence of Proteins of Immunological Interest (1987), National Institute of Health, Bethesda, Md.; Chothia *et al.*, Nature (1989) 342: 877). También son conocidas las técnicas de recombinación genética generales para el procedimiento anterior (véase la publicación de solicitud de patente europea n.º EP 125023, y el documento WO 96/02576). Por ejemplo, las CDR de un anticuerpo de ratón se determinan por procedimientos conocidos, y se prepara un ADN de modo que codifique un anticuerpo en el que las CDR están unidas a las regiones estructurales (FR) de un anticuerpo humano. A continuación, se puede producir un anticuerpo humanizado por un sistema usando un vector de expresión convencional. Dichos ADN se pueden sintetizar por PCR usando como cebadores varios oligonucleótidos diseñados para comprender porciones que solapan los extremos de ambas regiones CDR y FR (véase el procedimiento descrito en el documento WO 98/13388). Se seleccionan FR de anticuerpos humanos unidos por CDR de modo que las CDR pueden formar un sitio de unión a antígeno adecuado. Si es necesario, se pueden modificar los aminoácidos en las FR de una región variable del anticuerpo de modo que las CDR de un anticuerpo humano remodelado pueden formar un sitio de unión a antígeno adecuado (Sato, K. *et al.*, Cancer Res. (1993) 53: 851-856). Los residuos de aminoácidos modificables en las FR incluyen porciones que unen directamente a un antígeno por medio de enlaces no covalentes (Amit *et al.*, Science (1986) 233: 747-53), porciones que tienen un impacto o efecto sobre la estructura de la CDR (Chotia *et al.*, J. Mol. Biol. (1987) 196: 901-17), y porciones implicadas en la interacción entre VH y VL (documento EP 239400).

25 Cuando los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos quiméricos o anticuerpos humanizados, las regiones C de estos anticuerpos se derivan preferentemente de anticuerpos humanos. Por ejemplo, C $\gamma$ 1, C $\gamma$ 2, C $\gamma$ 3, y C $\gamma$ 4 se pueden usar para las cadenas H, y C $\kappa$  y C $\lambda$  se pueden usar para las cadenas L. Mientras tanto, las regiones C de anticuerpos humanos se pueden modificar según se requiera para mejorar el anticuerpo o la estabilidad de producción. Un anticuerpo quimérico de la presente invención comprende preferentemente una región variable de un anticuerpo derivado de un mamífero no humano y una región constante derivada de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado de la presente invención comprende preferentemente CDR de un anticuerpo derivado de un mamífero no humano y regiones FR y C derivadas de un anticuerpo humano. Las regiones constantes de los anticuerpos humanos comprenden secuencias de aminoácidos específicas para cada isotipo de anticuerpo, por ejemplo, IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), IgM, IgA, IgD e IgE. Las regiones constantes usadas para preparar los anticuerpos humanizados divulgados en el presente documento pueden ser las regiones constantes de anticuerpos de cualquier isotipo. Preferentemente, se usa una región constante de una IgG humana, pero las regiones constantes no están limitadas a esto. Las FR derivadas de un anticuerpo humano, que se usan para preparar anticuerpos humanizados, no están particularmente limitadas, y por tanto se pueden derivar de un anticuerpo de cualquier isotipo.

40 Las regiones variables y constantes de los anticuerpos quiméricos o humanizados divulgados en el presente documento se pueden modificar por deleciones, sustituciones, inserciones, y/o adiciones, siempre que los anticuerpos presenten la misma especificidad de unión que la de los anticuerpos originales.

Se espera que los anticuerpos quiméricos y humanizados que usan secuencias derivadas de seres humanos sean útiles cuando se administran a seres humanos con fines terapéuticos o similares, ya que se ha reducido su inmunogenicidad en el cuerpo humano.

45 Se pueden usar secuencias conocidas como genes que codifican la cadena H o cadena L de anticuerpos antes de la introducción de mutaciones por procedimientos de la presente invención (en el presente documento, se pueden denominar simplemente "anticuerpos de la presente invención"), o se pueden obtener los genes por procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se pueden obtener a partir de una colección de anticuerpos, o clonando genes que codifican los anticuerpos a partir de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales.

50 En lo que respecta a las colecciones de anticuerpos, muchas colecciones de anticuerpos ya son bien conocidas, y puesto que los procedimientos para producir colecciones de anticuerpos son conocidos, los expertos en la técnica pueden obtener de forma apropiada colecciones de anticuerpos. Por ejemplo, con respecto a las colecciones de fagos de anticuerpos, se puede hacer referencia a la literatura tal como Clackson *et al.*, Nature 1991, 352: 624-8; Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 1991, 222: 581-97; Waterhouses *et al.*, Nucleic Acids Res. 1993, 21: 2265-6; Griffiths *et al.*, EMBO J. 1994, 13: 3245-60; Vaughan *et al.*, Nature Biotechnology 1996, 14: 309-14; y la publicación de patente japonesa Kohyo n.º H10-504970 (publicación de fase nacional japonesa no examinada correspondiente a una publicación internacional no japonesa). Además, se pueden usar procedimientos conocidos tales como procedimientos que usan células eucariotas como colecciones (WO95/15393) y procedimientos de presentación en ribosomas. Además, también son conocidas las técnicas para obtener anticuerpos humanos, por selección usando colecciones de anticuerpos humanos. Por ejemplo, se pueden expresar regiones variables de anticuerpos humanos en la superficie de fagos como anticuerpos monocatenarios (scFv) usando procedimientos de presentación en fagos, y se pueden seleccionar fagos que se unen a antígenos. El análisis genético de los fagos seleccionados puede

determinar las secuencias de ADN que codifican las regiones variables de anticuerpos humanos que se unen a los antígenos. Una vez que se revelan las secuencias de ADN de los scFv que se unen a los antígenos, se pueden producir vectores de expresión adecuados en base a estas secuencias para obtener anticuerpos humanos. Estos procedimientos ya son bien conocidos, y se puede hacer referencia a los documentos WO92/01047, WO92/20791, WO93/06213, WO93/11236, WO93/19172, WO95/01438 y WO95/15388.

En cuanto a los procedimientos para obtener genes que codifican anticuerpos a partir de hibridomas, se pueden usar técnicas conocidas, que implican el uso de antígenos deseados o células que expresan los antígenos deseados como antígenos sensibilizantes, usando estos para realizar las inmunizaciones de acuerdo con los procedimientos de inmunización convencionales, fusionando las células inmunitarias así obtenidas con células originales conocidas por procedimientos de fusión celular habituales, cribando las células productoras de anticuerpos monoclonales (hibridomas) por procedimientos de cribado habituales, sintetizando los ADNc de regiones variables de anticuerpo (regiones V) a partir de los ARNm de los hibridomas obtenidos usando una transcriptasa inversa, y uniéndolos a los ADN que codifican las regiones constantes de anticuerpo deseado (regiones C).

Más específicamente, sin limitarse particularmente a los siguientes ejemplos, los antígenos sensibilizantes para obtener los genes de anticuerpo mencionados anteriormente que codifican las cadenas H y cadenas L incluyen tanto antígenos completos con inmunogenicidad como antígenos incompletos que comprenden haptenos y similares que no muestran inmunogenicidad. Por ejemplo, se pueden usar proteínas de longitud completa y péptidos parciales de proteínas de interés. Además, se sabe que las sustancias compuestas de polisacáridos, ácidos nucleicos, lípidos y similares se pueden convertir en antígenos. Por tanto, no existen limitaciones particulares sobre los antígenos de los anticuerpos de la presente invención. Se pueden preparar antígenos por procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, y se pueden preparar, por ejemplo, por los procedimientos que usan baculovirus (por ejemplo, véase el documento WO98/46777). Se pueden producir hibridomas, por ejemplo, por el procedimiento de Milstein *et al.* (G. Kohler y C. Milstein, *Methods Enzymol.* 1981, 73: 3-46). Cuando la inmunogenicidad de un antígeno es baja, se puede unir a una macromolécula que tenga inmunogenicidad, tal como albúmina, y a continuación usarse para la inmunización. Además, al unir los antígenos a otras moléculas en caso necesario, se pueden convertir en antígenos solubles. Cuando se usan moléculas transmembranarias tales como receptores como antígenos, se pueden usar porciones de las regiones extracelulares de los receptores como fragmentos, o se pueden usar células que expresan moléculas transmembranarias en su superficie celular como inmunógenos.

Se pueden obtener células productoras de anticuerpos inmunizando animales usando los antígenos sensibilizantes adecuados descritos anteriormente. De forma alternativa, se pueden preparar células productoras de anticuerpos por inmunización *in vitro* de linfocitos que pueden producir anticuerpos. Se pueden usar varios mamíferos como animales para la inmunización, en la que, en general, se usan roedores, lagomorfos y primates. Los ejemplos de dichos animales incluyen ratones, ratas y hámsteres para roedores, conejos para lagomorfos, y monos incluyendo macacos de Java, macacos de la India, hamadryas y chimpancés para primates. Además, también son conocidos animales transgénicos que llevan repertorios de genes de anticuerpos humanos, y se pueden obtener anticuerpos humanos usando estos animales (véase el documento WO96/34096; Mendez *et al.*, *Nat. Genet.* 1997, 15: 146-56). En lugar de usar dichos animales transgénicos, por ejemplo, se pueden obtener los anticuerpos humanos deseados que tienen actividad de unión a antígenos deseados sensibilizando linfocitos humanos *in vitro* con los antígenos deseados o células que expresan los antígenos deseados, y a continuación fusionando los linfocitos sensibilizados con células de mieloma humano tales como U266 (véase la solicitud de patente japonesa Kokoku n.º H1-59878 (solicitud de patente japonesa examinada y aprobada publicada para oposición)). Además, se pueden obtener anticuerpos humanos deseados inmunizando animales transgénicos que llevan un repertorio completo de genes de anticuerpos humanos, con los antígenos deseados (véanse los documentos WO93/12227, WO92/03918, WO94/02602, WO96/34096 y WO96/33735).

La inmunización animal se puede llevar a cabo diluyendo y suspendiendo apropiadamente un antígeno sensibilizante en solución salina tamponada con fosfato (PBS), solución salina fisiológica o similares, y formando una emulsión mezclando un coadyuvante en caso necesario, seguido de una inyección intraperitoneal o subcutánea en los animales. Después de eso, el antígeno sensibilizante mezclado con adyuvante incompleto de Freund se administra preferentemente varias veces cada de cuatro a 21 días. Se puede confirmar la producción de anticuerpos midiendo la valoración del anticuerpo objetivo en el suero del animal usando procedimientos convencionales.

Se pueden fusionar células productoras de anticuerpos de linfocitos o animales inmunizados con un antígeno deseado con células de mieloma usando agentes de fusión convencionales (por ejemplo, polietilenglicol) para generar hibridomas (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, 1986, 59-103). Cuando se requiera, se pueden cultivar y hacer crecer células de hibridoma, y se puede medir la especificidad de unión de los anticuerpos producidos a partir de estos hibridomas usando procedimientos de análisis conocidos tales como inmunoprecipitación, radioinmunoensayo (RIA) y un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Después de esto, se pueden subclonar hibridomas que producen anticuerpos en los que se ha determinado la especificidad, afinidad o actividad de interés por procedimientos tales como dilución limitante.

A continuación, se pueden clonar los genes que codifican los anticuerpos seleccionados a partir de hibridomas o células productoras de anticuerpos (linfocitos sensibilizados y similares) usando sondas que se pueden unir específicamente a los anticuerpos (por ejemplo, oligonucleótidos complementarios para las secuencias que codifican

las regiones constantes de los anticuerpos). También es posible la clonación a partir de ARNm usando RT-PCR. Las inmunoglobulinas se clasifican en cinco clases diferentes, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Estas clases se dividen además en varias subclases (isotipos) (por ejemplo, IgG-1, IgG-2, IgG-3 e IgG-4; e IgA-1 e IgA-2). Las cadenas H y cadenas L usadas en la presente divulgación para producir anticuerpos no están particularmente limitadas y pueden derivar de anticuerpos que pertenecen a cualquiera de estas clases o subclases; sin embargo, las IgG son particularmente preferentes.

En el presente documento, es posible modificar genes que codifican la cadena H y genes que codifican la cadena L usando técnicas de ingeniería genética. Los anticuerpos modificados genéticamente tales como anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados que se han modificado artificialmente para disminuir la inmunogenicidad heteróloga frente a seres humanos, y similares, se pueden producir de forma apropiada en caso necesario para anticuerpos tales como anticuerpos de ratón, anticuerpos de rata, anticuerpos de conejo, anticuerpos de hámster, anticuerpos de ovejas y anticuerpos de camello. Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos compuestos de regiones variables de la cadena H y cadena L de un anticuerpo de mamífero no humano tal como anticuerpo de ratón, y regiones constantes de la cadena H y cadena L de un anticuerpo humano. Se pueden obtener uniendo los ADN que codifican regiones variables de un anticuerpo de ratón a los ADN que codifican las regiones constantes de un anticuerpo humano, incorporándolos en un vector de expresión, e introduciendo el vector en un huésped para la producción de los anticuerpos. También se puede obtener un anticuerpo humanizado, que también se denomina un anticuerpo humano remodelado, como sigue: Se sintetiza una secuencia de ADN diseñada para unir las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo de un mamífero no humano, tal como un ratón, por PCR a partir de varios oligonucleótidos producidos de modo que tienen porciones solapantes en los extremos de la secuencia. Se puede unir el ADN obtenido a un ADN que codifica una región constante de anticuerpo humano. Se puede incorporar el ADN unido en un vector de expresión, y se puede introducir el vector en un huésped para producir el anticuerpo (véanse los documentos EP239400 y WO96/02576). Se seleccionan FR de anticuerpos humanos que están unidas por medio de las CDR de modo que las CDR formen un sitio de unión a antígeno favorable. En caso necesario, se pueden sustituir aminoácidos en las regiones estructurales de las regiones variables de anticuerpo de modo que las CDR de un anticuerpo humano remodelado formen un sitio de unión a antígeno apropiado (K. Sato *et al.*, Cancer Res. 1993, 53:851-856).

Además de la humanización descrita anteriormente, se pueden modificar los anticuerpos para mejorar sus propiedades biológicas, por ejemplo, actividad de unión a un antígeno. Las modificaciones en la presente divulgación se pueden llevar a cabo usando procedimientos tales como mutagénesis dirigida a sitio (véase, por ejemplo, Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488), mutagénesis de PCR, y mutagénesis de casetes. En general, los anticuerpos mutantes con propiedades biológicas que se han mejorado muestran una homología y/o similitud de secuencia de aminoácidos de un 70 % o mayor, más preferentemente de un 80 % o mayor, y aún más preferentemente de un 90 % o mayor (por ejemplo, 95 % o mayor, 97 %, 98 %, 99 % y así sucesivamente), en comparación con las secuencias de aminoácidos de las regiones variables del anticuerpo original. En el presente documento, homología y/o similitud de secuencia se define como la proporción de residuos de aminoácidos que son homólogos (mismo residuo) o similares (residuos de aminoácidos clasificados en el mismo grupo en base a las propiedades generales de las cadenas laterales de aminoácidos) a los residuos del anticuerpo original, después de que se haya maximizado el valor de homología de secuencia por alineación de secuencias e introducción de huecos, en caso necesario. En general, los residuos de aminoácidos naturales se clasifican en grupos en base a las características de sus cadenas laterales: (1) hidrófobos: alanina, isoleucina, valina, metionina y leucina; (2) hidrófilos neutros: asparagina, glutamina, cisteína, treonina y serina; (3) ácidos: ácido aspártico y ácido glutámico; (4) básicos: arginina, histidina y lisina; (5) residuos que afectan a la orientación de la cadena: glicina y prolina; y (6) aromáticos: tirosina, triptófano y fenilalanina.

Generalmente, de un total de seis regiones determinantes de la complementariedad (CDR; regiones hipervariables) presentes en las regiones variables de la cadena H y cadena L interaccionan para formar el/los sitio(s) de unión a antígeno de un anticuerpo. Se sabe que incluso una de estas regiones variables tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque la afinidad será menor que cuando se incluyen todos los sitios de unión. Por lo tanto, los genes de anticuerpo de la presente divulgación que codifican las cadenas H y cadenas L sólo tienen que codificar las porciones de fragmentos que tienen cada uno de los sitios de unión a antígeno de las cadenas H y cadenas L, y los polipéptidos codificados por estos genes sólo tienen que mantener la actividad de unión a los antígenos deseados.

Las regiones variables de la cadena pesada se componen habitualmente de tres regiones CDR y cuatro regiones FR como se describe anteriormente. En un modo de realización preferente divulgado en el presente documento, se pueden seleccionar de forma apropiada residuos de aminoácidos sometidos a "modificación" de entre los residuos de aminoácidos situados en las regiones CDR o regiones FR. En general, la modificación de los residuos de aminoácidos en las regiones CDR puede reducir la actividad de unión a antígenos. Por lo tanto, en la presente invención, los residuos de aminoácidos sometidos a "modificación" no están limitados particularmente, pero es preferente que se seleccionen de forma apropiada de entre los residuos de aminoácidos situados en las regiones FR. Se pueden seleccionar incluso residuos de aminoácidos en las CDR, siempre que se haya confirmado que las modificaciones de estos residuos no reduzcan la actividad de unión.

Además, las secuencias que se pueden usar como FR de regiones variables de los anticuerpos de organismos tales como seres humanos o ratones, se pueden obtener de forma apropiada por los expertos en la técnica usando bases de datos públicas.

5 La presente divulgación también se refiere a polipéptidos que comprenden un dominio de unión a FcRn con una farmacocinética en sangre que está controlada por un procedimiento de la presente invención.

10 En un modo de realización preferente, la presente divulgación proporciona anticuerpos humanizados con una farmacocinética en sangre que está controlada por un procedimiento de la presente invención. Por ejemplo, los anticuerpos humanos son anticuerpos humanizados que comprenden regiones determinantes de la complementariedad (CDR) derivadas de un animal no humano, regiones estructurales (FR) derivadas de un ser humano, y regiones constantes humanas, con al menos un residuo de aminoácido en las CDR o FR, que pueden estar expuestas en la superficie del anticuerpo, tienen una carga diferente de la del residuo de aminoácido correspondiente en las CDR o FR naturales, y con regiones variables que se derivan de un anticuerpo del animal no humano y con una farmacocinética en sangre que está controlada en comparación con los anticuerpos quiméricos correspondientes que tienen las mismas regiones constantes.

15 La "región constante humana" descrita anteriormente se refiere preferentemente a una región que comprende un dominio Fc humano natural; sin embargo, puede ser un Fc modificado.

20 La presente divulgación también se refiere a procedimientos para producir polipéptidos que comprenden un dominio de unión a FcRn, con una farmacocinética en sangre que está controlada usando los procedimientos divulgados en el presente documento. Específicamente, la presente divulgación proporciona procedimientos para producir polipéptidos que comprenden un dominio de unión a FcRn, con una farmacocinética en sangre que está controlada. La presente divulgación también incluye polipéptidos que comprenden un dominio de unión a FcRn, que se producen por los procedimientos divulgados en el presente documento.

25 En un modo de realización preferente, los procedimientos de producción divulgados en el presente documento son procedimientos para producir polipéptidos que comprenden un dominio de unión a FcRn, con una farmacocinética en sangre que está controlada, y que comprenden:

(a) modificar los ácidos nucleicos que codifican los polipéptido que comprenden un dominio de unión a FcRn para cambiar la carga de al menos un residuo de aminoácido que se puede estar expuesto en la superficie de los polipéptidos;

(b) cultivar las células huésped para expresar los ácidos nucleicos; y

30 (c) recoger los polipéptidos que comprenden un dominio de unión a FcRn de los cultivos de células huésped.

35 La expresión "modificar los ácidos nucleicos" en los procedimientos mencionados anteriormente se refiere modificar los ácidos nucleicos de modo que correspondan a los residuos de aminoácidos introducidos por las "modificaciones" divulgadas en el presente documento. Más específicamente, se refiere a modificar los ácidos nucleicos que codifican los residuos de aminoácidos originales (premodificados) a los ácidos nucleicos que codifican los residuos de aminoácidos que se van a introducir por la modificación. Generalmente, quiere decir realizar una manipulación génica o un tratamiento de mutación que podría dar como resultado al menos una inserción, delección o sustitución nucleotídica en un ácido nucleico original de modo que se formen codones que codifican los residuos de aminoácidos de interés. Más específicamente, los codones que codifican los residuos de aminoácidos originales se sustituyen con codones que codifican los residuos de aminoácidos que se van a introducir por la modificación.

40 Dichas modificaciones de ácidos nucleicos se pueden realizar de forma adecuada por los expertos en la técnica usando técnicas conocidas tales como mutagénesis dirigida a sitio y mutagénesis de PCR.

45 Además, los ácidos nucleicos divulgados en el presente documento normalmente se llevan por (se insertan en) vectores adecuados y a continuación se introducen en células huésped. Estos vectores no están limitados particularmente siempre que los ácidos nucleicos insertados se mantengan de forma estable. Por ejemplo, cuando se usa *E. Coli* como huésped, el vector de clonación es preferentemente el vector pBluescript (Stratagene) y similares, pero se pueden usar varios vectores comercialmente disponibles. Los vectores de expresión son particularmente útiles como vectores para producir los polipéptidos divulgados en el presente documento. Los vectores de expresión no están limitados particularmente, siempre que puedan expresar polipéptidos en tubos de ensayo, *E. Coli*, células cultivadas u organismos individuales. Por ejemplo, los vectores preferentes incluyen el

50 vector pBEST (Promega) para la expresión en tubos de ensayo, el vector pET (Invitrogen) para *E. Coli*, el vector pME18S-FL3 (n.º de acceso GenBank AB009864) para células cultivadas y el vector pME18S (Mol. Cell Biol. 8: 466-472 (1998)) para organismos individuales. La inserción de un ADN divulgado en el presente documento en vectores se puede realizar por procedimientos estándar tales como reacciones con ligasas usando sitios de enzimas de restricción (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel *et al.* (1987) Publish. John Wiley & Sons. Sección

55 11.4-11.11).

Las células huésped mencionadas anteriormente no están limitadas particularmente, y se pueden usar varias células huésped, dependiendo del propósito. Las células usadas para expresar los polipéptidos incluyen células bacterianas

(por ejemplo, *Streptococcus*, *Staphilococcus*, *E. Coli*, *Streptomyces* y *Bacillus subtilis*), células fúngicas (por ejemplo, levaduras y *Aspergillus*), células de insectos (por ejemplo, *Drosophila* S2 y *Spodoptera* SF9), células animales (por ejemplo, CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, HEK293 y células de melanoma de Bowes), y células vegetales. Se pueden introducir vectores en células huésped usando procedimientos conocidos tales como el procedimiento de precipitación de fosfato de calcio, procedimiento de electroporación (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel *et al.* (1987) Publish. John Wiley & Sons. Sección 9.1-9.9), procedimiento de lipofección y procedimiento de microinyección.

Para secretar polipéptidos expresados en células huésped en la luz del retículo endoplásmico, espacio periplásmico o entorno extracelular, se pueden incorporar señales de secreción adecuadas en los polipéptidos de interés. Estas señales pueden ser intrínsecas o exógenas a los polipéptidos de interés.

Cuando se secretan los polipéptidos divulgados en el presente documento en el medio de cultivo, los polipéptidos producidos por los procedimientos mencionados anteriormente se puede recoger recogiendo el medio. Cuando los polipéptidos divulgados en el presente documento se producen dentro de células, en primer lugar, se lisan las células, y a continuación se recogen estos polipéptidos.

Los polipéptidos divulgados en el presente documento se pueden recoger y purificar a partir de cultivos celulares recombinantes usando procedimientos conocidos, incluyendo precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción ácida, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía con fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía con hidroxiapatita y cromatografía con lectina.

La presente divulgación se refiere a composiciones (agentes farmacéuticos) que comprenden polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos IgG) que comprenden un dominio de unión a FcRn, con una farmacocinética en sangre que está controlada por los procedimientos divulgados en el presente documento, y vehículos farmacéuticamente aceptables.

En la presente divulgación, las composiciones farmacéuticas normalmente se refieren a los agentes farmacéuticos para tratar o evitar, o probar y diagnosticar enfermedades.

Las composiciones farmacéuticas divulgadas en el presente documento se pueden formular por procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, dichas composiciones farmacéuticas se pueden usar por vía parenteral, como inyecciones que son soluciones o suspensiones estériles que incluyen las composiciones junto con agua u otro líquido farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, dichas composiciones se pueden formular como dosis unitarias que cumplen los requisitos para la preparación de productos farmacéuticos combinando de forma apropiada las composiciones con medios o vehículos farmacéuticamente aceptables, específicamente con agua estéril, solución salina fisiológica, un aceite vegetal, emulsionante, suspensión, tensioactivo, estabilizante, agente saborizante, excipiente, vehículo, conservante, aglutinante o similares. En dichas preparaciones, la cantidad de ingrediente activo se ajusta de modo que se pueda obtener una dosis apropiada que entre dentro de un intervalo predeterminado.

Se pueden formular composiciones estériles para inyección usando vehículos tales como agua destilada para inyectables, de acuerdo con protocolos estándar para formulación.

Las soluciones acuosas para inyección incluyen, por ejemplo, solución salina fisiológica y soluciones isotónicas que contienen dextrosa u otros coadyuvantes (por ejemplo, D-sorbitol, D-manosa, D-manitol y cloruro de sodio). Se pueden usar en combinación solubilizantes apropiados, por ejemplo, alcoholes (etanol y similares), polialcoholes (propilenglicol, polietilenglicol y similares), tensioactivos no iónicos (polisorbato 80™, HCO-50 y similares).

Los aceites incluyen aceites de sésamo y soja. Benzoato de bencilo y/o alcohol bencílico se pueden usar en combinación como solubilizantes. También se pueden combinar tampones (por ejemplo, tampón fosfato y tampón acetato de sodio), agentes calmantes (por ejemplo, clorhidrato de procaína), estabilizantes (por ejemplo, alcohol bencílico y fenol), y/o antioxidantes. En general, las inyecciones preparadas se cargan en ampollas apropiadas.

Las composiciones farmacéuticas divulgadas en el presente documento, se administran por vía parenteral. Por ejemplo, las composiciones pueden ser inyecciones, composiciones transnasales, composiciones transpulmonares o composiciones transdérmicas. Por ejemplo, dichas composiciones se pueden administrar por vía sistémica o local por inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, inyección subcutánea o similares.

Los procedimientos de administración se pueden seleccionar de forma apropiada considerando la edad y los síntomas del paciente. La dosis de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o un polinucleótido que codifica un anticuerpo puede ser, por ejemplo, de 0,0001 a 1000 mg/kg para cada administración. De forma alternativa, la dosis puede ser, por ejemplo, de 0,001 a 100.000 mg por paciente. Sin embargo, las dosis divulgadas en el presente documento no están limitadas a los intervalos descritos anteriormente. Las dosis y los procedimientos de administración varían dependiendo del peso, edad y síntomas de un paciente, y similares. Los expertos en la técnica pueden seleccionar las dosis y procedimientos de administración apropiados considerando los factores descritos anteriormente.

La presente divulgación también proporciona ácidos nucleicos que codifican polipéptidos que comprenden polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos humanizados) que comprenden un dominio de unión a FcRn, con una farmacocinética en sangre que está controlada por los procedimientos divulgados en el presente documento. Además, los vectores que llevan estos ácidos nucleicos se engloban por la presente divulgación.

5 La presente divulgación también proporciona células huésped que llevan los ácidos nucleicos descritos anteriormente. Las células huésped no están limitadas particularmente e incluyen, por ejemplo, *E. Coli* y células de diversos animales. Las células huésped se pueden usar, por ejemplo, como sistema de producción para producir y expresar los anticuerpos o los polipéptidos divulgados en el presente documento. Los sistemas de producción *in vitro* e *in vivo* están disponibles para sistemas de producción de polipéptidos. Los sistemas de producción que usan  
10 células eucariotas o células procariotas son ejemplos sistemas de producción *in vitro*.

Las células eucariotas que se pueden usar como célula huésped incluyen, por ejemplo, células animales, células vegetales y células fúngicas. Las células animales incluyen células de mamífero tales como CHO (J. Exp. Med. (1995) 108: 945), COS, HEK293, 3T3, mieloma, BHK (riñón de cría de hámster), HeLa y Vero; células de anfibios tales como ovocitos de *Xenopus laevis* (Valle, *et al.* (1981) Nature 291: 338-340); y células de insecto tales como Sf9, Sf21 y Tn5. En la expresión de los anticuerpos de la presente invención, se pueden usar de forma adecuada CHO-DG44, CHO-DX11B, células COS7, células HEK293 y células BHK. Entre las células animales, las células CHO son particularmente preferentes para la expresión a gran escala. Se pueden introducir vectores en una célula huésped por, por ejemplo, procedimientos con fosfato de calcio, procedimientos con DEAE-dextrano, procedimientos que usan liposomas catiónicos-DOTAP (Boehringer-Mannheim), procedimientos de electroporación o procedimientos de lipofección.  
15  
20

Las células vegetales incluyen, por ejemplo, células derivadas de *Nicotiana tabacum* y lenteja de agua (*Lemna minor*) conocido como sistema de producción de proteínas. Los callos se pueden cultivar a partir de estas células para producir los anticuerpos de la presente invención. Los sistemas de producción de proteínas conocidos son los que usan células fúngicas incluyendo células de levadura, por ejemplo, células del género *Saccharomyces* (tal como *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces pombe*); y células de hongos filamentosos, por ejemplo, género *Aspergillus* (tal como *Aspergillus niger*). Estas células se pueden usar como huésped para producir los anticuerpos de la presente invención.  
25

Se pueden usar células bacterianas en sistemas de producción procariotas. Los ejemplos de células bacterianas incluyen *Bacillus subtilis* así como *E. Coli* descritos anteriormente. Se pueden usar dichas células para producir los anticuerpos de la presente invención.  
30

Cuando se produce un anticuerpo usando una célula huésped divulgada en el presente documento, el polinucleótido que codifica un anticuerpo de la presente invención se puede expresar cultivando la célula huésped transformada con un vector de expresión que contiene el polinucleótido. Se puede realizar el cultivo usando procedimientos conocidos. Por ejemplo, cuando se usan células animales como huésped, se pueden usar DMEM, MEM, RPMI 1640 o IMDM como medio de cultivo, y se pueden usar con o sin complementos de suero tales como FBS o suero fetal bovino (FCS). El pH preferente es de aproximadamente 6 a 8 durante el cultivo. El cultivo se realiza típicamente a una temperatura de aproximadamente 30 a 40 °C durante aproximadamente de 15 a 200 horas. El medio se intercambia, se oxigena se agita, según sea necesario.  
35

Por otra parte, se pueden usar sistemas de producción que usan animales o plantas como sistemas para producir polipéptidos *in vivo*. Por ejemplo, se introduce un polinucleótido de interés en un animal o planta y se produce el polipéptido en el cuerpo del animal o vegetal y después se recoge. Los “huéspedes” divulgados en el presente documento incluyen dichos animales y plantas.  
40

Los animales que se van a usar para sistemas de producción incluyen mamíferos e insectos. Se pueden usar mamíferos tales como cabras, cerdos, ovejas ratones y reses (Vicki Glaser SPECTRUM Biotechnology Applications (1993)). De forma alternativa, los mamíferos pueden ser animales transgénicos.  
45

Por ejemplo, se puede preparar un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la presente invención como gen de fusión con un gen que codifica un polipéptido producido específicamente en la leche, tal como el gen  $\beta$ -caseína de cabra. Se inyectan fragmentos de polinucleótidos que contienen el gen de fusión en embriones de cabra, que a continuación se trasplantan en cabras hembra. Se puede obtener el anticuerpo deseado a partir de leche producida por las cabras transgénicas nacidas de las cabras que recibieron los embriones, o de sus crías. Se pueden administrar hormonas apropiadas a las cabras transgénicas para incrementar el volumen de leche que contiene el anticuerpo producido por las cabras (Ebert *et al.*, Bio/Technology 12: 699-702 (1994)).  
50

También se pueden usar insectos tales como gusanos de seda para producir los anticuerpos de la presente invención. Se pueden usar baculovirus que llevan un polinucleótido que codifica un anticuerpo de interés para infectar gusanos de seda, y se puede obtener el anticuerpo de interés de los fluidos corporales de los gusanos de seda (Susumu *et al.*, Nature 315: 592-594 (1985)).  
55

Las plantas usadas para producir los anticuerpos de la presente invención incluyen, por ejemplo, tabaco. Cuando se usa tabaco, se inserta un polinucleótido que codifica un anticuerpo de interés en un vector de expresión vegetal, por

ejemplo, pMON 530, y a continuación se introduce el vector en una bacteria tal como *Agrobacterium tumefaciens*. A continuación, se usan las bacterias para infectar el tabaco tal como *Nicotiana tabacum*, y se puede obtener el anticuerpo deseado de las hojas (Ma *et al.*, Eur. J. Immunol. 24: 131-138 (1994)). De forma alternativa, se infecta una lenteja de agua (*Lemna minor*) con bacterias similares y a continuación, se clona. Se puede obtener el anticuerpo deseado de las células de lenteja de agua clonada (Cox KM *et al.* Nat. Biotechnol. 2006 Dic; 24(12): 1591-1597).

Se puede aislar el anticuerpo resultante del interior o del exterior (tal como el medio y la leche) de células huésped, y se purifica como un anticuerpo homogéneo y sustancialmente puro. Los procedimientos para aislar y purificar los anticuerpos no se limitan a ningún procedimiento específico y se puede usar cualquier procedimiento estándar para aislar y purificar polipéptidos. Los anticuerpos se pueden aislar y purificar, seleccionando o combinando de forma apropiada, por ejemplo, columnas de cromatografía, filtración, ultrafiltración, desalado, precipitación con disolvente, extracción con disolvente, destilación, inmunoprecipitación, electroforesis en gel de poli(acrilamida)-SDS, enfoque isoeléctrico, diálisis, recristalización y otros.

Las cromatografías incluyen, por ejemplo, cromatografías de afinidad, cromatografías de intercambio iónico, cromatografías hidrófobas, filtraciones en gel, cromatografías en fase inversa, y cromatografías de adsorción (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996). Estas cromatografías se pueden llevar a cabo usando cromatografías fase líquida tales como HPLC y FPLC. Los ejemplos de columnas de cromatografía de afinidad incluyen columnas de proteína A y columnas de proteína G. Los ejemplos de las columnas de proteínas A incluyen Hyper D, POROS y Sepharose F. F. (Farmacia).

Se puede modificar libremente un anticuerpo y se pueden eliminar porciones peptídicas de él tratando el anticuerpo con una enzima modificadora de proteínas apropiada antes o después de la purificación del anticuerpo, según sea necesario. Dichas enzimas modificadoras de proteínas incluyen, por ejemplo, tripsinas, quimotripsinas, lisil endopeptidasas, proteína cinasas y glucosidasas.

Los procedimientos descritos anteriormente para producir polipéptidos como se divulga en el presente documento que comprenden un dominio de unión a FcRn, con una farmacocinética en sangre que está controlada, que comprenden cultivar células huésped de la presente invención y recoger los polipéptidos de los cultivos celulares, también son modos de realización preferentes de la presente invención.

### Ejemplos

A continuación en el presente documento, se describe específicamente la presente invención con referencia a los ejemplos.

#### [Ejemplo 1] Humanización de anticuerpo biespecífico

Se humanizó un anticuerpo biespecífico que consistía en la combinación de VH-anticuerpo A69 anti-Factor IXa, VH-anticuerpo B26 anti-Factor X, y cadena L híbrida (BBA), que se descubrió que era el más eficaz para acortar el tiempo de coagulación sanguínea en la solicitud de patente japonesa n.º 2005-112514, como se describe a continuación.

#### 1-1. Búsqueda por homología de anticuerpos humanizados

Usando una base de datos construida obteniendo datos de secuencias de aminoácidos de anticuerpos humanos a partir de la base de datos Kabat divulgada públicamente (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/kabat/>) y la base de datos IMGT (<http://imgt.cines.fr/>), se llevó a cabo la búsqueda por homología por separado para región variable de la cadena H-A69 de ratón (secuencia de aminoácidos; SEQ ID NO: 15), región variable de la cadena H-B26 de ratón (secuencia de aminoácidos; SEQ ID NO: 16), y región variable de la cadena L-BBA de ratón (secuencia de aminoácidos; SEQ ID NO: 17). Los resultados confirmaron que tienen homologías altas para las secuencias de anticuerpos humanos mostradas a continuación, y por tanto, se decidió que se iban a usar como regiones estructurales (a continuación en el presente documento abreviadas como FR) de los anticuerpos humanizados.

(1) región variable de la cadena H-A69: KABATID-000064 (base de datos Kabat)

(Kipps *et al.*, J. Clin. Invest. 1991; 87:2087-2096)

(2) región variable de la cadena H-B26: N.º de acceso EMBL AB063872 (base de datos IMGT) (datos no publicados)

(3) región variable de la cadena L-BBA: KABATID-024300 (base de datos Kabat)

(Welschof *et al.*, J. Immunol. Method 1995; 179:203-214)

Se prepararon anticuerpos humanizados en los que se injertaron regiones determinantes de la complementariedad (a continuación en el presente documento abreviadas como CDR) de cada anticuerpo de ratón en las FR de los anticuerpos humanos (1)-(3).

Además, se usó la búsqueda por homología en Internet divulgada públicamente por NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) para buscar secuencias señal secretoras de anticuerpos humanos que sean altamente homólogas a los anticuerpos humanos de (4)-(6). Se usaron las siguientes secuencias señal secretoras obtenidas por la búsqueda.

5 (4) región variable de la cadena H-A69: N.º de acceso de GenBank AF062257

(5) región variable de la cadena H-B26: N.º de acceso de GenBank AAC18248

(6) región variable de la cadena L-BBA: N.º de acceso de GenBank AAA59100

### 1-2. Construcción del vector de expresión génica de anticuerpo humanizado

10 Se prepararon doce oligoADN sintéticos de aproximadamente 50 bases a partir de una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de una secuencia señal secretora a una región variable del anticuerpo, de modo que aproximadamente 20 bases de su extremo 3' se hibridan entre sí. Se diseñaron oligoADN sintéticos de modo que los nucleótidos 5'-terminales codifican una secuencia humana, los nucleótidos 3'-terminales codifican una secuencia de ratón, o todos los nucleótidos codifican secuencias humanas. Además, se prepararon un cebador que se hibrida al extremo 5' de un gen de la región variable del anticuerpo y que tiene la secuencia de escisión XhoI, y un  
15 cebador que se hibrida al extremo 3' de un gen de la región variable del anticuerpo, que tiene la secuencia de escisión SfiI y que codifica también la secuencia del extremo 5' de un intrón.

20 Se mezcló 1 µl de cada uno de los oligoADN sintéticos preparados a 2,5 µM, y se añadieron 1x tampón Takara Ex Taq, dNTPs 0,4 mM y 0,5 unidades de Takara Ex Taq (todos de Takara) para preparar 48 µl de una solución de reacción. Después de calentar esto a 94°C durante 5 minutos, se realizaron 2 ciclos de reacción a 94°C durante 2 minutos, 55°C durante 2 minutos, y 72°C durante 2 minutos para montar y alargar cada uno de los oligoADN sintéticos. A continuación, se añadió 1 µl (10 µM cada uno) de cebadores que se hibridan al extremo 5' y al extremo 3' del gen del anticuerpo, y se amplificaron los genes de la región variable del anticuerpo por 35 ciclos de reacción a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos, y 72°C durante 1 min y después con reacción a 72°C durante 5 minutos. Después de la PCR, la cantidad total de la solución de reacción se sometió a electroforesis en gel  
25 de agarosa al 1 %. Se purificaron los fragmentos amplificados que tenían el tamaño de interés (aproximadamente 400 pb) usando el kit de extracción de gel QIAquick (QIAGEN) de acuerdo con el procedimiento descrito en el manual de instrucciones, y se eluyeron con 30 µl de agua estéril. Se clonaron estos fragmentos usando sistema de vectores pGEM-T Easy Vector System (Promega) de acuerdo con el procedimiento descrito en el manual de instrucciones. Se determinó la secuencia de nucleótidos de cada uno de los fragmentos de ADN usando el kit de secuenciación BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) y el secuenciador de ADN ABI PRISM 3730xL DNA Sequencer o el secuenciador de ADN ABI PRISM 3700 DNA Sequencer (Applied Biosystems) de acuerdo con el procedimiento descrito en el manual de instrucciones.

35 El plásmido insertado con el fragmento de la región variable de la cadena H y plásmido insertado con el fragmento de la región variable de la cadena L, de los que cada uno se confirmó que tenía una secuencia génica de la región variable del anticuerpo humanizado correcta, se digirieron con XhoI y SfiI y EcoRI, respectivamente. A continuación, se sometió la solución de reacción a electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Se purificaron los fragmentos de ADN que tenían el tamaño de interés (aproximadamente 400 pb) usando el kit de extracción de gel QIAquick (QIAGEN) de acuerdo con el procedimiento descrito en el manual de instrucciones, y se eluyeron con 30 µl de agua estéril. A continuación, se prepararon los vectores de expresión para células animales como sigue. Para expresar preferencialmente la IgG4 con cadenas H que son de combinación heteróloga, se usó una IgG4 sustituida con aminoácido con porción CH3 en referencia a la técnica de "botones en ojalos" (*knobs-into-holes*) de IgG1 (Merchant AM *et al.*, Nature Biotechnology, Vol.16, p.677-681 (1998)). Además, para promover la formación del dímero de la cadena H, también se introdujo una sustitución de aminoácidos (-ppcpScp- → -ppcpPcp-) a la bisagra. Se preparó el vector de expresión de cadena H de A69 humanizado insertando un fragmento génico de la región variable de  
40 cadena H del anticuerpo A69 humanizado en un vector de expresión preparado insertando el gen de la región constante con sustitución de Y349C y T366W a pCAGGS que comprende un promotor de β-actina de pollo (Niwa *et al.*, Gene vol. 108, p. 193-199 (1991)). Además, se preparó un vector de expresión de cadena H de B26 humanizado insertando un fragmento génico de región variable de cadena H del anticuerpo B26 humanizado en un vector de expresión preparado insertando el gen de la región constante con sustitución de E356C, T366S, L368A y Y407V a  
50 pCAGGS. Se digirió el plásmido (pCAG-gkADN) preparado insertando una región constante de cadena L de anticuerpo natural en pCAGGS con EcoRI para preparar un vector de expresión insertado con un fragmento génico de la región variable de cadena L del anticuerpo BBA humanizado. Se realizó una reacción de enlace usando el kit Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics), y se transformó la cepa DH5α de *E. Coli* (TOYOBO).

### 1-3. Expresión del anticuerpo biespecífico humanizado

55 Se expresó el anticuerpo biespecífico humanizado de acuerdo con el siguiente procedimiento. Se suspendió la cepa HEK293H derivada de células de carcinoma renal fetal humano (Invitrogen) en medio DMEM (Invitrogen) que contenía suero bovino fetal al 10 % (Invitrogen), y se sembraron 10 ml de esto a una densidad celular de 5-6 x 10<sup>5</sup> células/ml en cada placa usada por células adhesivas (10 cm de diámetro, CORNING) y se cultivó durante un día en

una incubadora con CO<sub>2</sub> (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). A continuación, se retiró el medio por succión, y se añadieron 6,9 ml de medio CHO-S-SFM-II (Invitrogen) que contenía suero bovino fetal al 1 % (Invitrogen). Se mezcló la solución de mezcla de ADN plasmídico preparada en el ejemplo 1-2 (total de 13,8 µg) con 20,7 µl de 1 µg/ml de polietilimina (Polisciences Inc.) y 690 µl de medio CHO-S-SFMII, se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 10 minutos, a continuación se añadieron las células a las células en cada placa y se incubó en una incubadora con CO<sub>2</sub> (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) durante 4-5 horas. A continuación, se añadieron 6,9 ml de medio CHO-S-SFM-II (Invitrogen) que contenía suero bovino fetal al 1 % (Invitrogen) y a continuación se incubaron las células en una incubadora de CO<sub>2</sub> durante 3 días. Se recuperó el sobrenadante de cultivo, a continuación se retiraron las células por centrifugación (aproximadamente a 2000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente), y se esterilizó la solución pasándola a través de un filtro MILLEX<sup>®</sup>-GV de 0,22 µm (Millipore). Se almacenó la muestra a 4 °C hasta su uso.

#### 1-4. Purificación del anticuerpo biespecífico humanizado

Se añadieron 100 µl de rProtein A Sepharose™ Fast Flow (Amersham Biosciences) al sobrenadante de cultivo obtenido de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 1-2, y se mezcló la solución por inversión a 4 °C durante 4 horas o más. Se transfirió la solución a un recipiente de filtro de 0,22 µm, Ultrafree<sup>®</sup>-MC (Millipore), y después de lavar 3 veces con 500 µl de TBS que contenía Tween<sup>®</sup> 20 al 0,01 %, se suspendió la resina rProtein A Sepharose™ en 100 µl de solución de acetato de sodio 50 mM que contenía Tween<sup>®</sup> 20 al 0,01 % a pH 3,3 y se dejó en reposo durante 2 minutos. A continuación, se eluyó el anticuerpo, y se neutralizó inmediatamente el eluato añadiendo 6,7 µl de Tris-HCl 1,5 M, pH 7,8.

#### 1-5. Cuantificación de la concentración de anticuerpo biespecífico humanizado

Se determinó la concentración de anticuerpo usando los siguientes dos tipos de procedimientos.

Se ajustó anti-IgG humana de cabra (Biosource International) a 1 µg/ml con un tampón de recubrimiento, y se inmovilizó en una placa Nunc-Immuno (Nunc). Después del bloqueo con un tampón de diluyente (D.B.), se añadió una muestra del sobrenadante de cultivo diluida de forma adecuada con D.B. Además, como patrón para calcular la concentración de anticuerpo, se añadió de forma similar IgG4 humana (anticuerpo anti-TF humanizado, véase el documento WO 99/51743) diluida con D.B. en una serie de dilución triple hasta once fases partiendo de 2000 ng/ml. Después de tres lavados, se hizo reaccionar una fosfatasa alcalina anti-IgG humana de cabra (Biosource International). Después de cinco lavados, se desarrolló el color usando sustrato de fosfatasa Sigma 104<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich) como sustrato, y se midió la absorbancia a 405 nm en un lector de absorbancia Model 3550 (Bio-Rad Laboratories) con una longitud de onda de referencia de 655 nm. Usando el programa informático Microplate Manager III (Bio-Rad Laboratories), se calculó la concentración de IgG humana en el sobrenadante de cultivo a partir de la curva estándar.

Además, se cuantificó la concentración de anticuerpo usando Sensor Chip CM5 (BIACORE) en el que se había inmovilizado la proteína A, con Biacore 1000 o Biacore Q (BIACORE). Más específicamente, se preparó un chip de sensor con proteína A inmovilizada de acuerdo con el protocolo del fabricante haciendo reaccionar un chip de sensor activado con una solución de proteína A (SIGMA) diluida a 50 µg/ml con solución de acetato de sodio acuosa 10 mM (pH 4,0, BIACORE) a 5 µl/min durante 30 minutos, y realizando a continuación una operación de bloqueo. Se usó este chip de sensor para medir la concentración del sobrenadante de cultivo y el producto purificado usando Biacore 1000 (BIACORE). Se usó el tampón HBS-EP (BIACORE) para la inmovilización del chip de sensor y para las medidas de concentración. Como patrón para las medidas de concentración, se usó anticuerpo IgG4 humanizado (anticuerpo anti-factor tisular humanizado, véase el documento WO 99/51743) diluido con tampón HBS-EP en una serie de dilución doble hasta seis fases comenzando a 4000 ng/ml.

#### 1-6. Evaluación de la actividad de coagulación sanguínea de anticuerpo biespecífico humanizado

Para determinar si un anticuerpo biespecífico corrige la capacidad de coagulación de sangre hemofílica A, se examinaron los efectos del anticuerpo biespecífico sobre el tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa) usando plasma deficitario en factor VIII. Se calentó una solución mezclada que comprende 50 µl de una solución de anticuerpo en varias concentraciones, 50 µl de plasma deficitario en factor VIII (Biomerieux), y 50 µl de reactivo TTPa (Dade Behring) a 37 °C durante 3 minutos. Se inició la reacción de coagulación añadiendo 50 µl de CaCl<sub>2</sub> 20 mM (Dade Behring) a esta solución mezclada. Se midió el tiempo requerido para la coagulación con KC10A (Amelung) conectado con CR-A (Amelung).

Usando una curva de calibrado proporcionada definiendo el tiempo de coagulación de plasma deficitario en factor VIII como en el 0 % y el del plasma normal como en el 100 %, se calculó la actividad de tipo factor VIII (%) de un anticuerpo biespecífico a partir del tiempo de coagulación medido cuando se añadió el anticuerpo biespecífico.

#### 1-7. Preparación de anticuerpo biespecífico humanizado que retiene la actividad de coagulación sanguínea

Para los anticuerpos biespecíficos humanizados que habían reducido su capacidad de coagulación sanguínea en la evaluación de la actividad de coagulación sanguínea descrita anteriormente, se modificaron los aminoácidos de sus FR de anticuerpo humano para incrementar sus actividades. Específicamente, se introdujeron mutaciones en la región variable del anticuerpo humanizado usando un kit de mutagénesis dirigida a sitio QuikChange (Stratagene) de

acuerdo con el procedimiento descrito en el manual de instrucciones. Se confirmó que el plásmido con el fragmento de la región variable de la cadena H insertado y el plásmido con el fragmento de la región variable de la cadena L insertado tienen las secuencias génicas de la región variable del anticuerpo humanizado de interés y se digirieron con XhoI y SfiI, y EcoRI respectivamente. Se sometió la solución de reacción a electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Se purificaron los fragmentos de ADN que tenían el tamaño de interés (aproximadamente 400 pb) usando un kit de extracción de gel QIAquick (QIAGEN) de acuerdo con el procedimiento descrito en el manual de instrucciones, y se eluyeron con 30 µl de agua estéril. A continuación, se prepararon los vectores de expresión para células animales de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 1-2. Se preparó un anticuerpo biespecífico humanizado de acuerdo con el procedimiento descrito en los ejemplos 1-3, 1-4, y 1-5 y se evaluó la actividad de coagulación sanguínea de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 1-6.

Al repetir las modificaciones de aminoácidos de las secuencias de FR y la evaluación de la capacidad de coagulación sanguínea, se obtuvo un anticuerpo biespecífico humanizado (A69 humanizado (hA69a)/B26 humanizado (hB26-F123e4)/BBA humanizado (hAL-F123j4)) que tenía el mismo nivel de actividad que el anticuerpo biespecífico quimérico (A69/B26/BBA) (Fig. 1). Cada una de las secuencias de la región variable del anticuerpo se indica en las siguientes SEQ ID NO.

(1) VH de anticuerpo A69 humanizado (hA69a) SEQ ID NO: 1 (secuencia de nucleótidos), SEQ ID NO: 2 (secuencia de aminoácidos)

(2) VH de anticuerpo B26 humanizado (hB26-F123e4) SEQ ID NO: 3 (secuencia de nucleótidos), SEQ ID NO: 4 (secuencia de aminoácidos)

(3) VL de anticuerpo BBA humanizado (hAL-F123j4) SEQ ID NO: 5 (secuencia de nucleótidos), SEQ ID NO: 6 (secuencia de aminoácidos)

[Ejemplo 2] Selección de sitios de modificación de aminoácido en regiones variables para aislar un anticuerpo biespecífico

Se prepararon modelos de región Fv de anticuerpo para los anticuerpos A69 y B26 humanizados por modelado de homología usando el programa informático MOE (Chemical Computing Group Inc.) para confirmar los residuos de aminoácidos expuestos en la superficie de las regiones variables de estos anticuerpos. Los modelos se muestran en la fig. 2. Un análisis detallado de los modelos sugirió que entre los aminoácidos expuestos en la superficie en las secuencias de FR distintas de CDR, los que estaban en las posiciones H10, H12, H23, H39, H43 y H105 (de acuerdo con la numeración Kabat; Kabat EA *et al.* 1991. Sequences of Proteins of Immunological Interest. NIH) eran aminoácidos candidatos que se podían modificar para desplazar el punto isoelectrónico sin reducción de la actividad. Se seleccionó el aminoácido en H97 como aminoácido expuesto en la superficie en las CDR.

[Ejemplo 3] Modificación de las secuencias de aminoácidos de región variable del anticuerpo A69 humanizado y forma modificada del mismo, y anticuerpo B26 humanizado

Se modificaron los aminoácidos de las regiones variables de la cadena H de los anticuerpos A69 y B26 humanizados para desplazar los puntos isoelectrónicos de los anticuerpos. Específicamente, se introdujeron mutaciones en las regiones variables de la cadena H del anticuerpo A69 humanizado (hA69a; secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 1) y anticuerpo B26 humanizado (hB26-F123e4; secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 3) preparados usando un kit de mutagénesis dirigida a sitio QuikChange (Stratagene) de acuerdo con el procedimiento descrito en el manual de instrucciones adjunto. Se digirieron los plásmidos con fragmento de la región variable de la cadena H insertado, que se había confirmado que tenían la secuencia del gen de la región variable de anticuerpo humanizado de interés, con XhoI y SfiI, y a continuación las mezclas de reacción se sometieron a electroforesis usando gel de agarosa al 1 %. Se purificaron los fragmentos de ADN que tenían el tamaño de interés (aproximadamente 400 pb) usando un kit de extracción de gel QIAquick (QIAGEN) de acuerdo con el procedimiento descrito en el manual de instrucciones adjunto, y a continuación se eluyeron usando 30 µl de agua estéril. Se insertaron los fragmentos de ADN en un plásmido de expresión que llevaba la región constante natural por el procedimiento descrito en el ejemplo 1-2 para la construir vectores de expresión de cadena H. Los residuos de aminoácidos modificados en los anticuerpos respectivos y sus SEQ ID se muestran en la tabla 1. Se prepararon (hA69-N97R, hA69-p18), y anticuerpo B26 humanizado (hB26-F123e4) y su forma modificada (hB26-p15). Se expresaron un anticuerpo A69 humanizado (hA69a) y sus formas modificadas (hA69-N97R, hA69-p18) usando una combinación de vectores de expresión de cadena H (la región variable es hA69-N97R, hA69-p18) y un vector de expresión de cadena L (la región variable es hAL-F123j4; SEQ ID NO: 6) de acuerdo con el ejemplo 1-3. Mientras tanto, se expresaron un anticuerpo B26 humanizado (hB26-F123e4) y su forma modificada (hB26-p15) usando una combinación de vectores de expresión de cadena H (la región variable es hB26-F123e4, hB26-p15) y un vector de expresión de cadena L (la región variable es B26-VL; la secuencia de aminoácidos se describe en el documento WO2005/035756 (SEQ ID NO: 18)) de acuerdo con el ejemplo 1-3. Se purificaron los anticuerpos a partir de sobrenadantes de cultivo por el procedimiento descrito en el ejemplo 1-4.

Tabla 1

Nombre	Región variable de cadena H-A69 humanizado	
	Sitio de modificación	Aminoácido, SEQ ID NO:
hA69a	-	2
hA69-p18	Q43E, Q105E	7
hA69-N97R	N97R	9

Nombre	Región variable de cadena H-B26 humanizado	
	Sitio de modificación	Aminoácido, SEQ ID NO:
hB26-F123e4	-	4
hB26-p15	Q39K, Q43K, Q105R	10

[Ejemplo 4] Establecimiento de una línea celular que expresa un anticuerpo biespecifico derivado de anticuerpos A69 o B26 humanizados

- 5 Para preparar un anticuerpo biespecifico humanizado, se estableció una línea celular de expresión de anticuerpo por el procedimiento descrito a continuación.

Se amplificó una región constante de la cadena H por PCR usando un gen de la región constante de la cadena H de IgG4 humana natural como molde y usando un cebador 5'-terminal diseñado de modo que la secuencia de nucleótidos que codifica dos aminoácidos (Ala-Ser) en el lado N terminal de la región constante de la cadena H será una secuencia de reconocimiento NheI (GCTAGC) y un cebador que se hibrida en el extremo 3' y que lleva un sitio de reconocimiento NotI. A continuación, se unieron los fragmentos amplificados al vector pBluescriptKS (TOYOBO) digerido con NheI y NoI (ambos de Takara) para preparar pBCH4 (que comprende un gen de región constante de IgG4). Se realizó la PCR usando cebadores que son complementarios a la secuencia de nucleótidos 5'-terminal de las regiones variables de la cadena H del anticuerpo de cadena H-A69 humanizado (hA69-PFL: SEQ ID NO: 11) y anticuerpo de cadena H-B26 humanizado (hB26-PF: SEQ ID NO: 12) y que tienen una secuencia de Kozak (CCACC) y una secuencia de reconocimiento de EcoRI, y un cebador en la secuencia de nucleótidos 3'-terminal que tiene una secuencia de reconocimiento NheI. Se digirieron los productos de PCR obtenidos con EcoRI y NheI (ambos de Takara) y se insertaron en pBCH4 también digerido con EcoRI y NheI, y a continuación las se unieron las regiones variables y las regiones constantes. Se digirió el vector preparado para el anticuerpo de cadena H-A69 humanizado con EcoRI y NotI (ambos de Takara), y a continuación se clonó en el vector de expresión de célula animal pCXND3 digerido con EcoRI y NotI. El procedimiento para la construcción del vector pCXND3 se describe a continuación.

Se escindió DHFR-ΔE-rVH-PM 1-f (véase el documento WO92/19759) en los sitios de restricción EcoRI y SmaI para separar el esqueleto del vector del gen de cadena H de anticuerpo. Sólo se recuperó el esqueleto del vector, y a continuación se clonó en él un adaptador EcoRI-NotI-BamHI (Takara). El vector resultante se denominó pCHOI. Se clonó la región de expresión génica DHFR derivada de pCHOI en pCXN (Niwa *et al.*, Gene 108: 193-200 (1991)) en el sitio de restricción HindIII. El vector resultante se denominó pCXND3. Además, se digirió el vector preparado para el anticuerpo de cadena H-B26 humanizado con EcoRI y NotI (ambos de Takara), y a continuación se clonó en el vector de expresión de célula animal pCXZD1 digerido con EcoRI y NotI. El vector pCXZD1 es un vector de expresión obtenido de pCXND3 sustituyendo el gen de resistencia a zeocina por el gen de resistencia a neomicina. Además, se preparó un vector de expresión de cadena L insertando la región variable de cadena L del anticuerpo de cadena L-BBA humanizado (hAL-s8; SEQ ID NO: 8) en un plásmido (pCAG-gkADN) que tiene una región constante de cadena L insertada de acuerdo con ejemplo 1-2. Se linealizaron los tres tipos preparados de vectores de expresión con enzimas de restricción y después se introdujeron en células CHO-DG44 para establecer una línea celular que expresa anticuerpos.

Se preparó una línea celular de expresión estable por el procedimiento descrito a continuación. Se introdujeron genes por electroporación usando GenePulserXcell (Bio-Rad). Se combinó cada vector de expresión de anticuerpo con 0,75 ml de células CHO suspendidas en PBS ( $1 \times 10^7$  células/ml). Se enfriaron las mezclas en hielo durante diez minutos, se transfirieron a cubetas, y se pulsaron a 1,5 kV y 25 μFD. Después de un periodo de restauración diez minutos a temperatura ambiente, se suspendieron las células electroporadas en 40 ml de medio CHO-S-SFMII (Invitrogen) que contenía 1x suplemento de HT (Invitrogen). Se diluyó la suspensión 10 veces con el mismo medio y se alicuotó en placas de cultivo de 96 pocillos a 100 μl/pocillo. Después de 24 horas de cultivo en una incubadora de CO<sub>2</sub> (5% CO<sub>2</sub>), se añadieron genética y zeocina (ambos de Invitrogen) a 0,5 mg/ml y 0,6 mg/ml, respectivamente. Se cultivaron las células durante dos semanas. Se realizaron secuencialmente cultivos de expansión para colonias de transformantes resistentes a fármacos. Se usó una línea celular de expresión alta establecida para el cultivo a gran escala para obtener el sobrenadante de cultivo.

[Ejemplo 5] Separación y purificación de homodímeros de anticuerpo humanizado y un anticuerpo biespecífico humanizado

Usando el procedimiento descrito a continuación, se purificó el anticuerpo biespecífico a partir de los sobrenadantes de cultivo obtenidos en el ejemplo 4. Se cargaron los sobrenadantes de cultivo en una columna rProtein A Sepharose Fast Flow (Amersham Biosciences; 50 mm I.D. X 9,9 cm H. = 194,3 ml de resina) equilibrada con un tampón de equilibrio (20 mmol/l de tampón de fosfato de sodio, NaCl 150 mol/l, pH 7,0). Después del lavado con el tampón de lavado 1 (20 mmol/l de tampón de fosfato de sodio, NaCl 150 mol/l, pH 7,0) y el tampón de lavado 2 (50 mmol/l de tampón acetato de sodio, pH 6,0), se eluyó la columna con 50 mmol/l de ácido acético. Inmediatamente después de la elución, se ajustó el pH a 6,3 añadiendo 1,5 mol/l de Tris-HCl (pH 7,8).

- 5 Se cargó la solución purificada resultante en una columna SP TOYOPEARL 650M (Tosoh; 26 mm I.D. X 22,3 cm H. = 118,3 ml de resina) equilibrada con disolvente A (10 mmol/l de tampón de fosfato de sodio, pH 6,3). Se separaron los anticuerpos en base a sus cargas de superficie usando las soluciones y gradientes indicados a continuación.

Disolvente A: 20 mmol/l de tampón acetato de sodio (pH 6,0)

Disolvente B: 20 mmol/l de tampón acetato de sodio, 1 mol/l de NaCl (pH 6,0)

- 15 Caudal: 10 ml/min (113 cm/h); 5,3 ml/min (60 cm/h) sólo en el momento de elución

Gradiente: 0 → 15% B	en etapas	3 volúmenes de columna (CV)
15 → 35% B	gradiente	6 CV
35 → 50% B	gradiente	10 CV
50 → 100% B	gradiente	3 CV
100% B	en etapas	4 CV

Se obtuvieron dos tipos de homodímeros (hA69-PF y hB26-PF) y un único tipo de heterodímero, el anticuerpo biespecífico BiAb, recogiendo las fracciones eluidas de los tres picos detectados por separado.

[Ejemplo 6] Análisis de anticuerpos preparados por enfoque isoeléctrico

- 20 El ATF es un anticuerpo monoclonal obtenido previamente contra el factor tisular humano, y es un anticuerpo humanizado que comprende la región constante de IgG4 humana. El origen de ATF se describe en detalle en el documento WO99/051743. Las secuencias de aminoácidos de sus regiones variables de cadena H y cadena L se muestran en SEQ ID NO: 13 y 14, respectivamente. Se analizaron HA69-PF, BiAb y hB26-PF preparados en el ejemplo 5; hA69-N97R, hA69-p18, hB26-e y hB26-p15 preparados en el ejemplo 3; y ATF por enfoque isoeléctrico para evaluar los cambios en la carga de superficie debidos a lo siguiente: diferencias en las secuencias de aminoácidos de sus regiones variables y modificaciones de aminoácidos.

- 25 ATF, hA69-PF, BiAb, hB26-PF, y el anticuerpo A69 humanizado hA69-N97R y una forma modificada del mismo, hA69-p18, así como el anticuerpo B26 humanizado hB26-F123e4 y una forma modificada del mismo, hB26-p15, se sometieron a enfoque isoeléctrico, como se describe a continuación. Usando PhastSystem Cassette (Amersham Bioscience), se dejó que el gel Phast-Gel Dry IEF (Amersham Bioscience) se hinchara durante aproximadamente 30 minutos en la solución de hinchamiento indicada a continuación.

Milli-Q water	1,5 ml
Pharmalyte 5-8 para IEF (Amersham Bioscience)	50 µl
Pharmalyte 8-10,5 para IEF (Amersham Bioscience)	50 µl

Se llevó a cabo la electroforesis en PhastSystem (Amersham Bioscience) usando el gel hinchado de acuerdo con el programa indicado a continuación. Se cargaron las muestras en el gel en la etapa 2. El marcador de pI es un kit de calibración para pI (Amersham Bioscience).

Etapas	V	mA	W	°C	Vh
Etapas 1:2000	2000	2,5	3,5	15	75
Etapas 2: 200	200	2,5	3,5	15	15
Etapas 3: 2000	2000	2,5	3,5	15	410

- 35 Después de electroforesis, se fijó el gel con un 20 % de TCA, y a continuación se tiñó con plata usando una proteína del kit de tinción de plata (Amersham Bioscience) de acuerdo con el protocolo adjunto en el kit. Después de la tinción, se calcularon los pI de las muestras a partir de los pI conocidos del marcador de pI. El resultado del análisis de enfoque isoeléctrico se muestra en la fig. 3. La curva de calibrado de pI frente a movilidad preparada usando el

marcador de pl y los pl calculados a partir de la curva se muestran en la fig. 4. Se calcularon los pl en base a la movilidad de las bandas principales ya que cada muestra presentó heterogeneidad de carga derivada de anticuerpo.

El resultado mostró que se cambiaron las cargas de superficie debido a las diferencias en las secuencias de aminoácidos de las regiones variables y que se desplazaron los pl debido al cambio en la carga de superficie a través de modificaciones de aminoácidos. Los pl fueron los siguientes: aproximadamente 9,2 para hB26-PF, aproximadamente 8,7 para BiAb, aproximadamente 8,0 para hA69-PF, aproximadamente 7,2 para ATF, aproximadamente 8,9 para hA69-N97R, aproximadamente para hA69-p18, aproximadamente 8,7 para hB26-F123e4, y aproximadamente 9,0 para hB26-pl5. Se obtuvieron HA69-N97R, hA69-p18 y hA69-PF modificando la misma región variable de anticuerpo humanizado. Se pudo lograr un desplazamiento del pl de aproximadamente un 0,9 en hA69-PF en comparación con hA69-N97R, y se pudo lograr un desplazamiento del pl de aproximadamente 0,3 en hB26-p15 en comparación con hB26-F123e4. El examen descrito anteriormente demuestra que el pl se puede desplazar dependiendo de la secuencia de aminoácidos de una región variable así como por la modificación de un aminoácido de superficie en H10, H12, H23, H39, H43, H97, o H105 en una región variable seleccionada para cambiar su carga.

[Ejemplo 7] Evaluación de los anticuerpos humanizados A69 y B26 y formas modificadas de los mismos para determinar su actividad de unión

Se evaluaron las funciones del anticuerpo A69 humanizado y su forma modificada por el ensayo de sus actividades de unión al antígeno de Factor IXa, como se describe a continuación. Se evaluaron el anticuerpo A69 humanizado (hA69a) y su forma modificada, hA69-N97R, por el siguiente procedimiento. Se alicuotó (100 µl/pocillo) el factor IXaβ (Enzyme Research Laboratories) diluido a 1 µg/ml con un tampón de recubrimiento (bicarbonato de sodio 100 mM (pH 9,6), azida de sodio al 0,02 %) en una placa de Nunc-Immuno (una placa MaxiSorp™ de 96 MicroWell™ Nunc-Immuno™ (Nalge Nunc International)), y a continuación se incubó la placa durante la noche a 4 °C. Después de lavar tres veces con PBS (-) que contenía Tween<sup>(R)</sup> 20, se bloqueó la placa con un tampón diluyente (Tris-HCl 50 mM (pH 8,1), seroalbúmina bovina al 1 %, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, NaCl 0,15 M, Tween<sup>(R)</sup> 20 al 0,05 %, azida de sodio al 0,02 %) a temperatura ambiente durante dos horas. Después de la retirada del tampón, se añadieron los anticuerpos purificados diluidos con el tampón de diluyente a la placa a 100 µl/pocillo. A continuación, se incubó la placa a temperatura ambiente durante una hora. Después de que se lavara la placa tres veces, se añadió anticuerpo anti-IgG de ratón de cabra marcado con fosfatasa (BIOSOURCE) diluido a 1/4000 con el tampón de diluyente a 100 µl/pocillo. A continuación, se incubó la placa a temperatura ambiente durante una hora. Después de lavar la placa cinco veces, se añadió un sustrato cromogénico (Sigma) a 100 µl/pocillo. A continuación, se incubó la placa a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se midió la absorbancia a 405 nm (referencia a 655 nm) usando el lector de microplacas Model 3550 (Bio-Rad Laboratories).

Se evaluaron los anticuerpos modificados (hA69-N97R, hA69-p18 y hA69-PF) usados en el ejemplo 8 por el siguiente procedimiento. Después de que se alicuotara (100 µl/pocillo) el factor IXa (Enzyme Research Laboratories) diluido a 1 µg/ml con un tampón de recubrimiento (tampón de carbonato-bicarbonato 0,05 M, pH 9,6) en una placa de Nunc-Immuno (una placa MaxiSorp™ de 96 MicroWell™ Nunc-Immuno™ (Nalge Nunc International)), se incubó la placa a 4 °C durante la noche o durante un período más largo. Después de lavar tres veces con PBS que contenía Tween<sup>(R)</sup> 20 al 0,05 %, se añadió un tampón de diluyente (solución salina tamponada con Tris que contenía Tween 20 (pH 8,0) (Sigma), seroalbúmina bovina al 1 %, azida de sodio al 0,02 %) a la placa a 200 µl/pocillo. A continuación, se bloqueó la placa a temperatura ambiente durante dos horas. Después de la retirada del tampón, se añadieron los anticuerpos purificados diluidos con el tampón de diluyente a 100 µl/pocillo. A continuación, se incubó la placa durante la noche a 4 °C. Después de lavar la placa tres veces, se añadió anti-IgG humana de ratón marcado con fosfatasa alcalina (Southern Biotechnology) diluido a 1/500 con el tampón de diluyente a 100 µl/pocillo. Se incubó la placa a temperatura ambiente durante dos horas. Después de lavar la placa cinco veces, se añadió el sistema BluePhos Microwell Phosphatase Substrates System (Kirkegaard & Perry Laboratories) como sustrato a 100 µl/pocillo. A continuación, se incubó la placa a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos. Se midió la absorbancia a 650 nm usando el lector de microplacas Vmax (Molecular Devices). Como se muestra en la fig. 5, los resultados demuestran que los anticuerpos en los que se había modificado la región variable para cambiar la carga de superficie mostraron una actividad de unión comparable a la de los anticuerpos originales antes de la modificación.

Además, se evaluaron las funciones del anticuerpo B26 humanizado hB26-F123e4 y su forma modificada, hB26-p15, por el ensayo de sus actividades de unión al antígeno de Factor X. Se alicuotó (100 µl/pocillo) el factor X (Enzyme Research Laboratories) diluido a 1 µg/ml con un tampón de recubrimiento (bicarbonato de sodio 100 mM (pH 9,6), azida de sodio al 0,02 %) en una placa de Nunc-Immuno (una placa MaxiSorp™ de 96 MicroWell™ Nunc-Immuno™), y a continuación se incubó la placa durante la noche a 4 °C. Después de lavar tres veces con PBS (-) que contenía Tween<sup>(R)</sup> 20, se bloqueó la placa con un tampón diluyente (Tris-HCl 50 mM (pH 8,1), seroalbúmina bovina al 1 %, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, NaCl 0,15 M, Tween<sup>(R)</sup> 20 al 0,05 %, azida de sodio al 0,02 %) a temperatura ambiente durante dos horas. Después de la retirada del tampón, se añadieron los anticuerpos purificados diluidos con el tampón de diluyente a 100 µl/pocillo a la placa. Se incubó la placa a temperatura ambiente durante una hora. Después de que se lavara la placa tres veces, se añadió anticuerpo anti-IgG de ratón de cabra marcado con fosfatasa (BIOSOURCE) diluido a 1/4000 con el tampón de diluyente a 100 µl/pocillo. A continuación, se incubó la placa a temperatura ambiente durante una hora. Después de lavar la placa cinco veces, se añadió un sustrato

cromogénico (Sigma) a 100 µl/pocillo. A continuación, se incubó la placa a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se midió la absorbancia a 405 nm (referencia a 655 nm) usando el lector de microplacas Model 3550 (Bio-Rad Laboratories). Como se muestra en la fig. 6, los resultados demostraron que el anticuerpo en el que se había modificado la región variable para cambiar la carga de superficie mostraron una actividad de unión comparable a la del anticuerpo original antes de la modificación.

Los hallazgos descritos anteriormente demuestran que las modificaciones de las regiones variables realizadas en los ejemplos no tienen influencia sobre la actividad de unión a antígeno de los anticuerpos.

[Ejemplo 8] Evaluación de los anticuerpos preparados para determinar la farmacocinética 8-1. Prueba de farmacocinética usando ratones

Se obtuvo el ATF como un anticuerpo monoclonal frente al factor tisular humano, y es un anticuerpo humanizado que comprende las regiones constantes de la IgG4 humana. El origen de ATF se describe en detalle en el documento WO99/051743. Las secuencias de aminoácidos de sus regiones variables de cadena H y cadena L se muestran en SEQ ID NO: 13 y 14, respectivamente. Se evaluaron HA69-PF, BiAb y hB26-PF preparados en el ejemplo 5, hA69-N97R, hA69-p18, hB26-e y hB26-p15 preparados en el ejemplo 3, y ATF para determinar la cinética *in vivo* en ratones (C57BL/6J; Charles River Japón, Inc.). Se administraron por vía intravenosa ATF, hA69-PF, BiAb y hB26-PF una vez a 5 mg/kg a los ratones (C57BL/6J; Charles River Japón, Inc.). Se extrajo sangre antes de la administración y 15 minutos, dos horas, ocho horas, y uno, dos, cuatro, siete, 11, 14, 21 y 28 días después de la administración. Se centrifugó de inmediato la sangre extraída a 4 °C y 15.000 rpm durante 15 minutos para obtener plasma. Se almacenó el plasma separado en un congelador a -20 °C o menos hasta su uso. Asimismo, se administró por vía intravenosa hA69-N97R, hA69-p18, hB26-F123e4 y hB26-p15 una vez a 1 mg/kg a ratones (C57BL/6J; Charles River, Japón, Inc.). Se extrajo sangre antes de la administración y 15 minutos, dos horas, ocho horas, y uno, dos, cinco, siete, nueve, 14, 21 y 28 días después de la administración. Se centrifugó de inmediato la sangre extraída a 4 °C y 15.000 rpm durante 15 minutos para obtener plasma. Se almacenó el plasma separado en un congelador a -20 °C o menos hasta su uso.

8-2. Medida de la concentración plasmática por ELISA

Se determinaron las concentraciones plasmáticas en ratones por ELISA. Se prepararon muestras de plasma de curvas de calibrado de concentraciones plasmáticas 6,4, 3,2, 1,6, 0,8, 0,4, 0,2, y 0,1 µg/ml. Se alicuotaron muestras de curvas estándar y muestras de plasma de ratón que se van a someter a prueba en inmunoplasmas (placas MaxiSorp Nunc-Immuno (Nalge nunc International) inmovilizadas con un F(ab')<sub>2</sub> anti-IgG humana (específico de  $\gamma$ -cadena) (Sigma). Se dejaron las muestras en reposo a temperatura ambiente durante una hora, y a continuación se hicieron reaccionar con BIOT anti-IgG humana de cabra (Southern Biotechnology Associates) y conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina (Roche Diagnostics) sucesivamente. Se llevó a cabo el desarrollo de color usando el sistema BluePhos Microwell Phosphatase Substrates System (Kirkegaard & Perry Laboratories) como sustrato. Se midió la absorbancia a 650 nm usando un lector de microplaca. Se calcularon las concentraciones plasmáticas en ratones a partir de la absorbancia en la curva de calibración usando el programa informático de análisis SOFTmax PRO (Molecular Devices). Las evoluciones temporales de las concentraciones plasmáticas de ATF, hA69-PF, BiAb y hB26-PF se muestran en la fig. 7.

8-3. Procedimiento para calcular los datos farmacocinéticos

Se evaluaron los datos obtenidos sobre las evoluciones temporales de las concentraciones plasmáticas por un análisis independiente del modelo usando el programa informático de análisis farmacocinético WinNonlin (Pharsight) para calcular los parámetros farmacocinéticos (aclaramiento (CL), semivida (T<sub>1/2</sub>)). Se calculó la T<sub>1/2</sub> a partir de las concentraciones plasmáticas en los tres últimos puntos o en la fase terminal seleccionada automáticamente por WinNonlin. Los parámetros farmacocinéticos determinados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2

	hA69-N97R	hA69-p18	hA69-PF	ATF
pl	8,9	8,5	8,0	7,2
CL ml/h/kg	0,412	0,300	0,204	0,136
T1/2 día	12,6	15,0	18,7	26,1

	hB26-F123e4	hB26-p15	hB26-PF	BiAb
pl	8,7	9,0	9,2	8,7

CL	ml/h/kg	0,346	0,450	0,600	0,362
T1/2	día	13,4	11,9	10,8	13,6

Además, las curvas de aclaramiento (CL) y semivida (T1/2) de anticuerpo con relación al pl se muestran en la fig. 8. Aunque los anticuerpos respectivos usados comparten las mismas secuencias de la región constante, cada uno del aclaramiento (CL) y semivida (T1/2) están estrechamente correlacionados con pl. Esto demuestra que, como el pl es menor, el aclaramiento es menor y la semivida en sangre es más prolongada. Por tanto, se puede controlar la semivida en sangre por los valores de pl incluso cuando los anticuerpos comparten las mismas secuencias de la región constante. En consecuencia, se sugiere que se puede prolongar la semivida en sangre disminuyendo el pl o se puede reducir incrementando el pl. En este ejemplo, se demuestra que la semivida en sangre se pudo prolongar realmente disminuyendo el pl a través de la modificación de los aminoácidos de superficie (los sitios de modificación se muestran en la tabla 3) en las regiones variables de hA69-N97R. Se puede reducir la semivida en sangre incrementando el pl a través de la modificación de los aminoácidos de superficie (los sitios de modificación se muestran en la tabla 4) en las regiones variables de hB26-F123e4. Estos hallazgos sugieren que se puede controlar la farmacocinética de las IgG en sangre cambiando las cargas de los aminoácidos de superficie (por ejemplo, en las posiciones H10, H12, H23, H39, H43, H97 y H105) en sus regiones variables a través de modificaciones.

Tabla 3

Nombre	H1	H12	H23	H27	H43	H97	H103	L99
hA69-N97R	Pyr(Q)	K	K	G	Q	R	Q	G
hA69-p18	Pyr(Q)	K	K	G	E	N	E	G
hA69-PF	E	V	T	Y	E	L	E	Q

\* \* \* \* \*

Tabla 4

Nombre	H1	H9	H10	H28	H37	H39	H43	H103	L99
hB26-F123e4	Pyr(Q)	P	D	M	A	Q	Q	Q	G
hB26-p15	Pyr(Q)	P	D	M	A	K	K	R	G
hB26-PF	E	A	Q	T	V	Q	K	R	Q

\* \* \* \*

En las tablas 3 y 4 anteriores, Pyr (Q) representa un residuo de glutamina N terminal, que se supone que está piroglutamilado. Puesto que el grupo amino N terminal está protegido, no existe una diferencia significativa de carga entre Pyr (Q carga) y E. Además, los sitios de la sustitución de aminoácidos que da como resultado un desplazamiento de pl están indicados por un asterisco.

La presente invención descubrió que la semivida en sangre de una IgG se pudo prolongar o reducir disminuyendo o incrementando el pl de la IgG a través de la sustitución de aminoácidos de superficie en las regiones variables, respectivamente.

De acuerdo con un documento distinto de patente (Nat Biotechnol. 1997; 15: 637-640) en la farmacocinética en sangre en ratones, se pudo prolongar la semivida en sangre (T1/2) aproximadamente en 1,5 veces incrementando la afinidad para FcRn a través de la modificación de aminoácidos en el Fc en la región constante. Además, disminuyendo el pl a través de la modificación de aminoácidos de superficie en regiones variables, se pudo prolongar la semivida en sangre (T1/2) aproximadamente en 1,5 veces en la comparación entre hA69-N97R y hA69-PF que comparten las mismas secuencias de la región constante. Además, cuando se compara hA69-N97R con hA69-PF y ATF, la T1/2 de ATF con el pl menor es mayor aproximadamente en 2,1 veces que la de hA69-N97R. Por tanto, se puede prolongar adicionalmente la semivida de hA69-N97R en sangre disminuyendo su pl a través de la modificación adicional de aminoácidos de superficie en las regiones variables de hA69-N97R. Cuando los anticuerpos usados en este ejemplo se comparan entre sí, la semivida en sangre es diferente aproximadamente en 2,4 veces entre hB26-PF con el pl mayor y ATF con el pl menor. En consecuencia, se espera que el control de la farmacocinética en sangre a través de modificaciones de aminoácidos en regiones variables sea más eficaz en comparación con técnicas de control previas. Además, se desea que el número de sustituciones de aminoácidos introducidos artificialmente en regiones constantes sea más pequeño desde el punto de vista de la inmunogenicidad. Por tanto, se espera que la presente invención, en la que se controla la semivida en sangre modificando aminoácidos de superficie en regiones variables, sea útil en el desarrollo de productos farmacéuticos.

#### Aplicabilidad industrial

5 En un modo de realización preferente de los procedimientos de la presente invención, se realizan sustituciones de aminoácidos en regiones variables, y, por tanto, el riesgo de inmunogenicidad es bajo en comparación con los procedimientos convencionales que modifican regiones constantes. Además, los procedimientos de la presente invención pueden ser más eficaces en la prolongación de la semivida en sangre en comparación con los procedimientos convencionales que modifican regiones constantes. Además, se puede controlar la semivida en sangre de polipéptidos que comprenden un dominio de unión a FcRn, tales como anticuerpos IgG, controlando la carga de superficie en regiones variables sin cambiar la estructura o función (actividad). Se pueden obtener polipéptidos que comprenden un dominio de unión a FcRn, que mantienen la actividad original y con una semivida en sangre que está controlada, usando los procedimientos divulgados en el presente documento.

10

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA  
 <120> Procedimientos para regular la cinética de anticuerpos en sangre
- 5 <130> C1-A0605P  
 <150> JP 2006-097796  
 <151> 2006-03-31
- 10 <160> 18  
 <170> PatentIn versión 3.3  
 <210> 1
- 15 <211> 354  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>
- 20 <223> Una secuencia de nucleótidos sintetizada artificialmente  
 <400> 1  
 caggtccagc ttgtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc agtgaagggt 60  
 tcctgcaagg cctctggagg caccttcagt gactactata tgcactgggt gcgccaggcc 120  
 cccggacaag ggcttgagtg gatgggatac attaatccta gcagtgggta tactaagtac 180  
 aatcggaagt tcaggacag agtcaccatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240  
 atggagctga gcagcctgag atctgaagac acggctgtgt attactgtgc gagagggggt 300  
 aacggttact accttgacta ctggggccag ggcaccacgg tcaccgtctc ctca 354
- <210> 2  
 <211> 118  
 <212> PRT
- 25 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
- 30 <400> 2



ES 2 568 436 T3

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

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

Ala Arg Gly Gly Asn Gly Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 3

<211> 357

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de nucleótidos sintetizada artificialmente

<400> 3  
caggtgcagc tgggtgcagtc tggacctgac gtgaagaagc cgggggcctc agtgaaggtc 60  
tcctgcaagg cctctggcta catgttttcc gacaacaaca tggactgggc gcgacaggcc 120  
cctggacaag ggcttgagtg gatgggagat attaatacta aaagtgggtg ttctatctac 180  
aaccagaagt tcaagggcag agtcatcatg accatagaca aatccacggg cacagcctac 240  
atggaattga ggagcctgag atcagacgac acggccatat attactgtgc gaggaggagg 300  
agctacggct actactttga ctactggggc caggggaacco tggtcaccgt ctctctca 357

10

<210> 4

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 4



ES 2 568 436 T3

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

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

Ala Arg Arg Arg Ser Tyr Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 5

<211> 318

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de nucleótidos sintetizada artificialmente

<400> 5  
 gacatcgtga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
 atcacttgca aggccagtc gaatgtgggg actgctgtag cctgggtatca gcagaaacca 120  
 gggaaagccc ctaagctcct gatctattog gcacccacc ggtacagtgg ggtcccatca 180  
 aggttcagtg gcagtcgata tgggacagat ttcactctca ccatctcaag cttgcaacct 240  
 gaagatttag caacttacta ctgtcagcaa tatagcaact atatcacgtt cggcggaggg 300  
 accaaggtgg agatcaaa 318

10

<210> 6

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 6

ES 2 568 436 T3

Asp Ile Val 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 Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala  
          20                   25                   30

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
          50                   55                   60

ES 2 568 436 T3

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

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 7

<211> 118

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

10 <400> 7

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 8

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

5 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

ES 2 568 436 T3

<400> 8

Asp Ile Val 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 Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala  
 20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

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

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 9

<211> 118

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

10 <400> 9

ES 2 568 436 T3

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

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

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

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

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

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

ES 2 568 436 T3

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

Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 10

<211> 119

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptidica sintetizada artificialmente

10 <400> 10

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Met Phe Ser Asp Asn  
 20 25 30

Asn Met Asp Trp Ala Arg Lys Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

Gly Asp Ile Asn Thr Lys Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 11

<211> 118

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

5 <400> 11

**Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ser**





ES 2 568 436 T3

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 13

<211> 463

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 13

ES 2 568 436 T3

Met Asp Trp Thr Trp Arg Phe Leu Phe Val Val Ala Ala Ala Thr Gly  
 1 5 10 15

Val Gln Ser Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg  
 20 25 30

Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile  
 35 40 45

Lys Asp Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu  
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Gly His Ser Met Tyr Asp  
 65 70 75 80

Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser  
 85 90 95

Thr Val Phe Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val  
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 115 120 125

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

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala  
 145 150 155 160

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
 165 170 175

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 180 185 190

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

ES 2 568 436 T3

435

440

445

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
450 455 460

<210> 14

<211> 236

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 14

ES 2 568 436 T3

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp  
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser  
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser  
35 40 45

Gln Asp Ile Lys Ser Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys  
50 55 60

Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val  
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr  
85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln  
100 105 110

His Gly Glu Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile  
115 120 125

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp  
130 135 140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn  
145 150 155 160

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu  
165 170 175

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp  
180 185 190

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr

ES 2 568 436 T3

195

200

205

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser  
 210 215 220

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230 235

<210> 15

<211> 119

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 15

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

Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp  
 20 25 30

Tyr Tyr Met His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45

Leu Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Asn Arg Lys  
 50 55 60

Phe Arg Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala  
 65 70 75 80

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

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

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 16

10 <211> 120

<212> PRT

<213> Mus musculus

ES 2 568 436 T3

<400> 16

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

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

ES 2 568 436 T3

Asn Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45

Ile Gly Asp Ile Asn Thr Lys Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Lys  
 50 55 60

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

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

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

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 17

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 17

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala  
 20 25 30

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

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

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

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg  
 100 105

ES 2 568 436 T3

<210> 18

<211> 108

<212> PRT

<213> Mus musculus

5

<400> 18

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

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala  
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser  
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
100 105

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para producir un anticuerpo IgG modificado, con una semivida en sangre que se prolonga o se reduce en comparación con antes de la modificación del anticuerpo, en el que el procedimiento comprende:
- 5 (a) modificar un ácido nucleico que codifica el anticuerpo para cambiar la carga de al menos un residuo de aminoácido que puede estar expuesto en la superficie del anticuerpo, en el que dicho al menos un residuo es un residuo de aminoácido en una región variable de la cadena pesada o cadena ligera del anticuerpo, y en el que se logra el cambio de carga por sustitución de aminoácidos;
- (b) cultivar una célula huésped para expresar el ácido nucleico; y
- (c) recoger el anticuerpo del cultivo de célula huésped.
- 10 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho al menos un residuo de aminoácido se selecciona del grupo que consiste en residuos de aminoácidos en las posiciones 10, 12, 23, 39, 43 y 105 de acuerdo con el sistema de numeración Kabat en la cadena pesada de la IgG.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que el al menos un residuo de aminoácido modificado se selecciona de los residuos de aminoácidos de cualquier grupo (a) o (b) a continuación:
- 15 (a) ácido glutámico (E) y ácido aspártico (D), y
- (b) lisina (K), arginina (R) e histidina (H).
4. Un procedimiento para prolongar o reducir la semivida de un anticuerpo IgG, en el que el procedimiento comprende modificar al menos un residuo de aminoácido que puede estar expuesto en la superficie del anticuerpo, en el que dicho al menos un residuo es un residuo de aminoácido en una región variable de la cadena pesada o
- 20 cadena ligera del anticuerpo, y en el que dicha modificación es por sustitución para cambiar su carga.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que dicho al menos un residuo de aminoácido se selecciona del grupo que consiste en residuos de aminoácidos en las posiciones 10, 12, 23, 39, 43 y 105 de acuerdo con el sistema de numeración Kabat en la cadena pesada de la IgG.
6. El procedimiento de la reivindicación 4 o 5, en el que dicho al menos un residuo de aminoácido se selecciona de
- 25 los residuos de aminoácidos de cualquier grupo (a) o (b) a continuación:
- (a) ácido glutámico (E) y ácido aspártico (D), y
- (b) lisina (K), arginina (R) e histidina (H).

FIG. 1

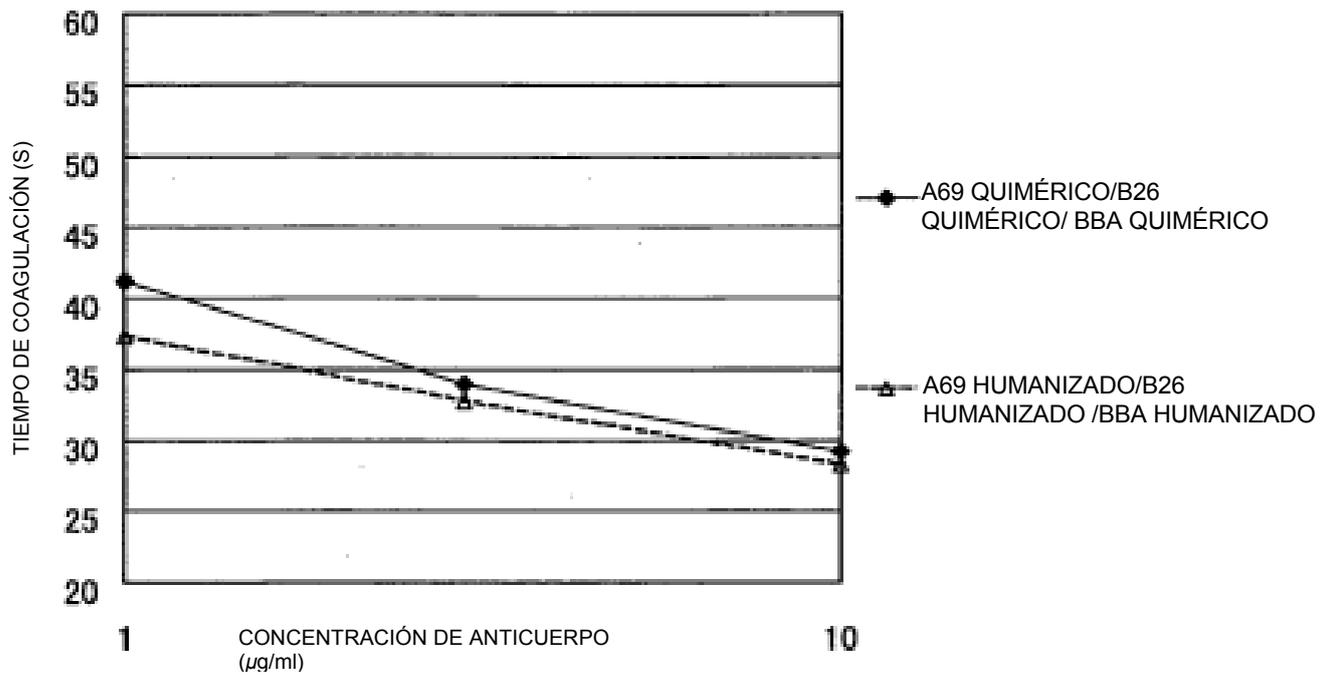
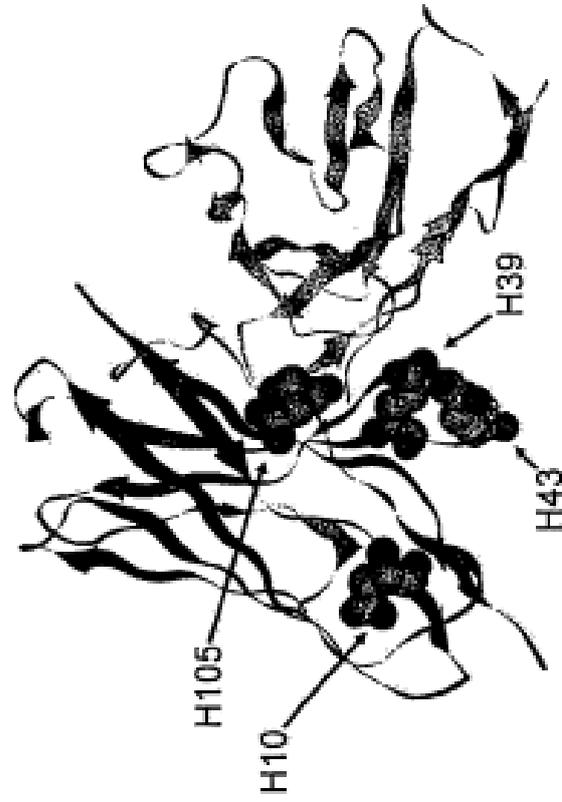


FIG. 2



ANTICUERPO B26 HUMANIZADO



ANTICUERPO A69 HUMANIZADO

FIG. 3

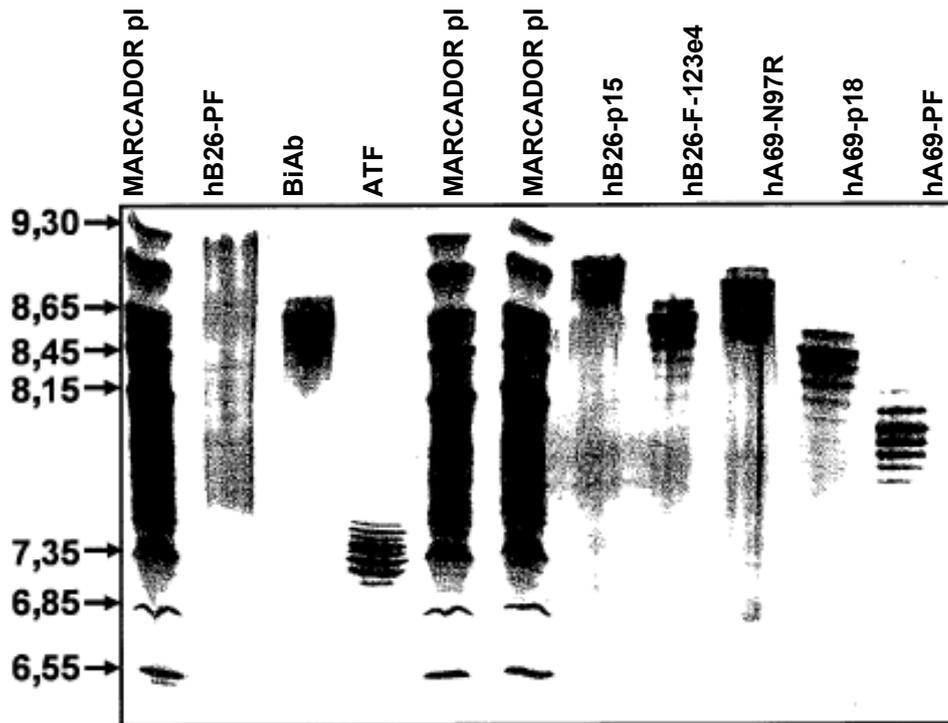


FIG. 4

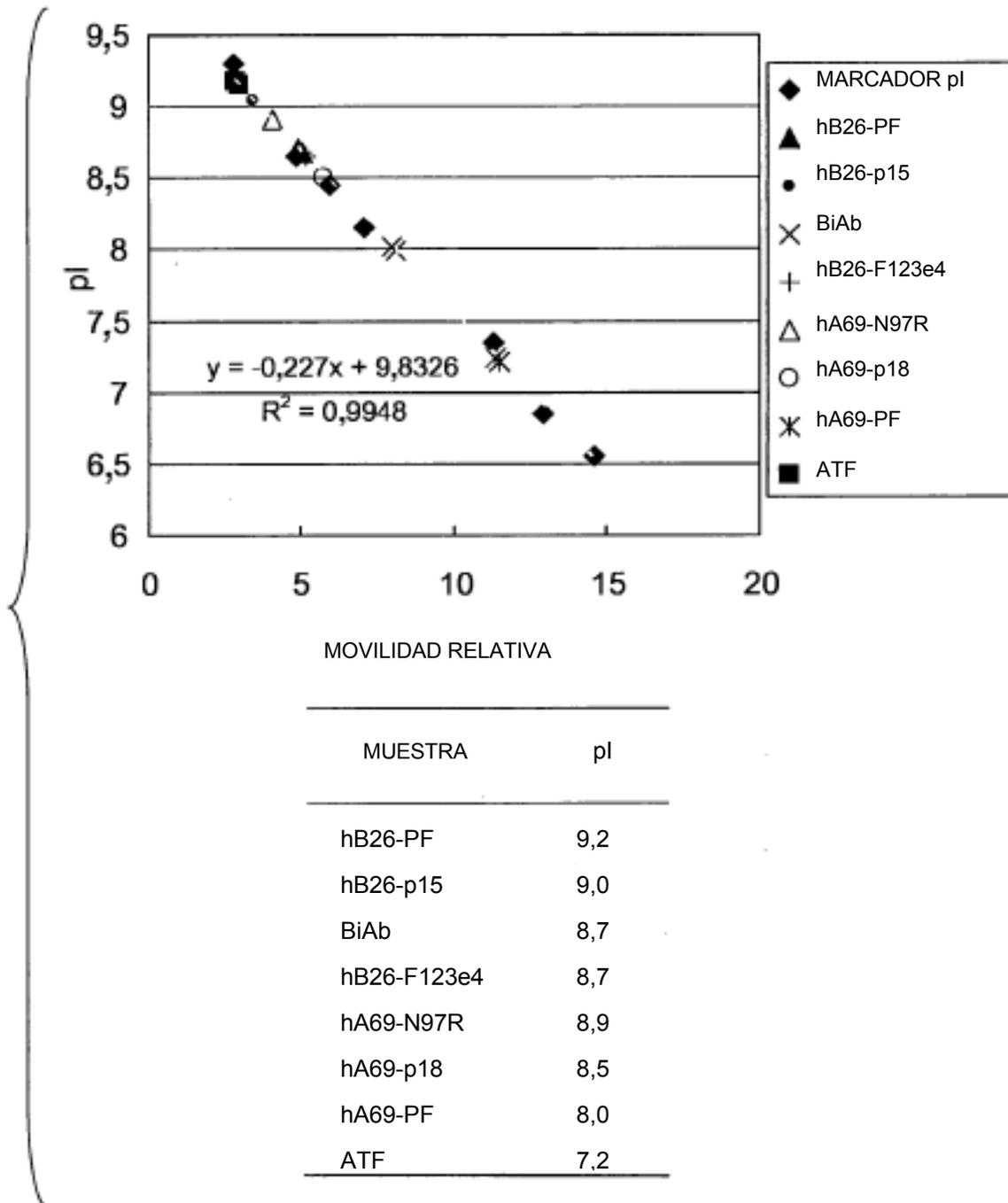


FIG. 5

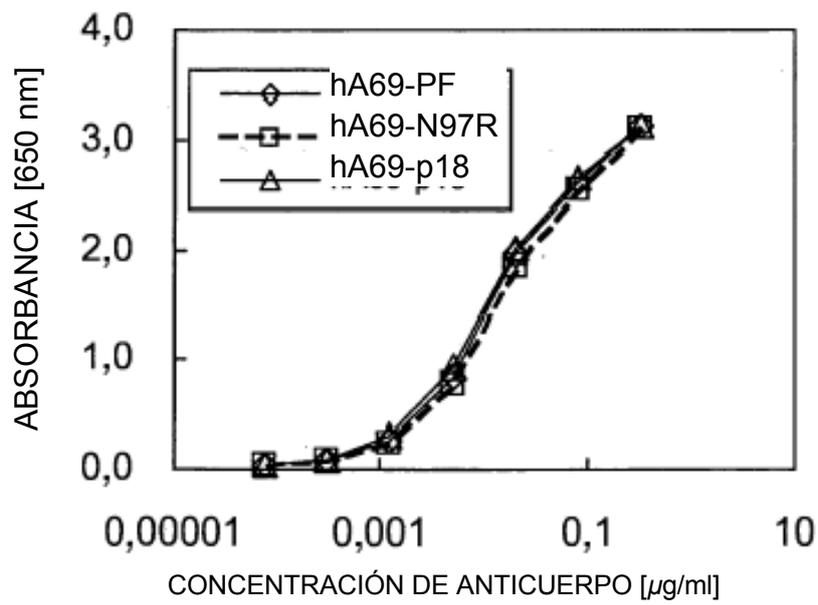
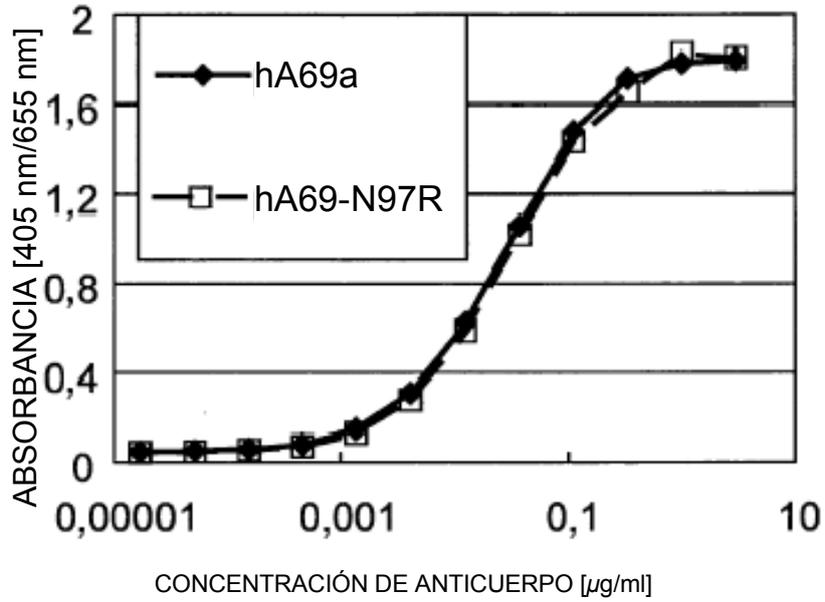


FIG. 6

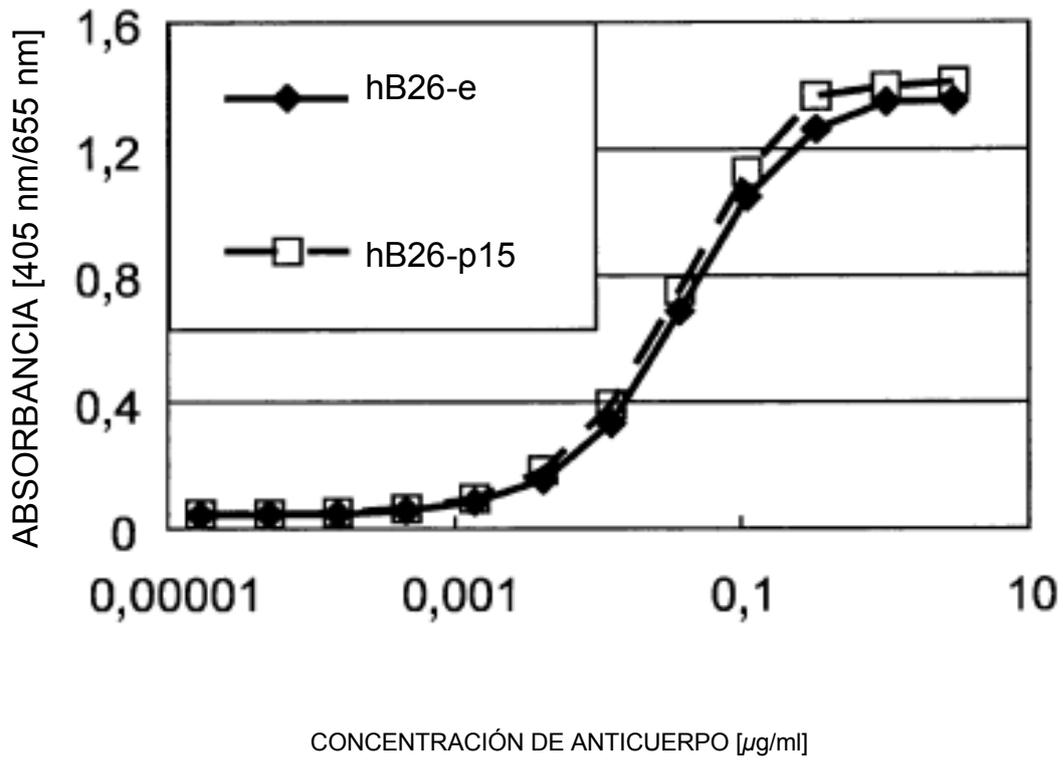


FIG. 7

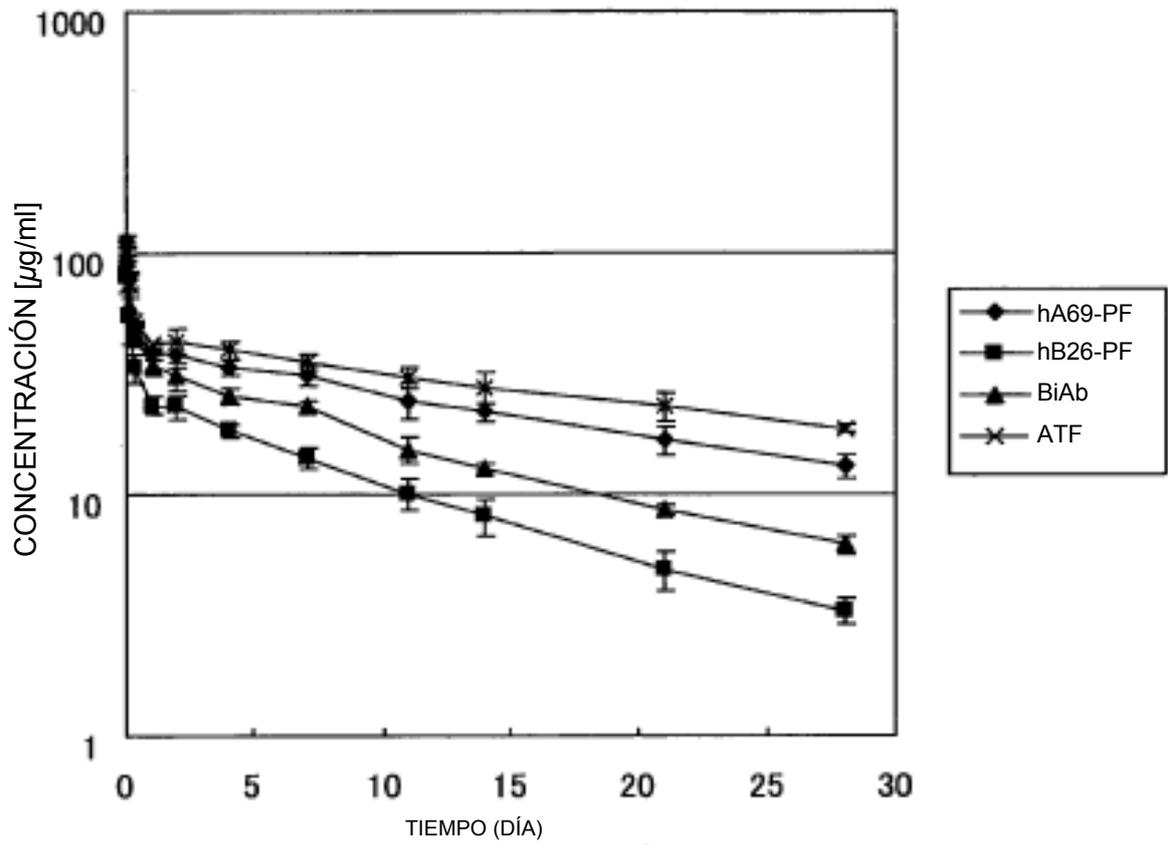


FIG. 8

