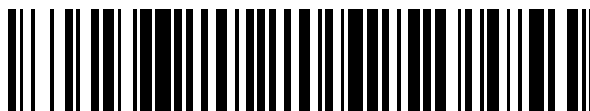


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 600 254**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.12.2009 PCT/EP2009/066205**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.06.2010 WO10063746**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.12.2009 E 09768518 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.07.2016 EP 2370464**

54 Título: **Procedimiento para la modulación de la actividad antagonista de un anticuerpo monoclonal**

30 Prioridad:

02.12.2008 IB 85566408
05.06.2009 US 184406 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.02.2017

73 Titular/es:

PIERRE FABRE MÉDICAMENT (100.0%)
45, Place Abel Gance
92100 Boulogne-Billancourt, FR

72 Inventor/es:

GOETSCH, LILIANE y
WURCH, THIERRY

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 600 254 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 la modulación de la actividad antagonista de un anticuerpo monoclonal.

5 La presente invención se refiere al campo de la genomanipulación de anticuerpos, y más particularmente, a un procedimiento para el cribado de anticuerpos y/o la modulación de la actividad agonista/antagonista de anticuerpos. Más particularmente, la invención se refiere a un método para la modulación de la actividad antagonista de un anticuerpo monoclonal, o de un fragmento funcional divalente o un derivado del mismo, por medio de la ingeniería genética. La invención se refiere asimismo a polipéptidos útiles para dicho método de modulación, y a los anticuerpos obtenidos.

10 Los términos "anticuerpo", "anticuerpos" o "inmunoglobulina" se usan de modo indistinto en el sentido más amplio, e incluyen anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpos monoclonales de longitud completa o intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes o anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada).

Más particularmente, dicha molécula consiste en una glicoproteína que comprende por lo menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas livianas (L) interconectadas por enlaces de disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta por una región (o dominio) variable de cadena pesada (que, en la presente memoria, se abrevia como HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está compuesta por tres dominios: CH1, CH2 y CH3. Cada cadena liviana está compuesta por una región variable de cadena liviana (abreviada, en la presente memoria, como LCVR o VL) y una región constante de cadena liviana. La región constante de cadena liviana está compuesta por un dominio CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones de determinación de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que son más conservadas, denominadas regiones de marco (FR). Cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el término amino hasta el término carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesadas y livianas contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina para factores o tejidos huéspedes, que incluyen diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico.

Las cadenas pesadas de inmunoglobulinas pueden dividirse en tres regiones funcionales: la región Fd, la región bisagra, la región Fc (cristalizable de fragmento), que están conectadas por una región bisagra flexible. La región Fd comprende los dominios VH y CH1, y en combinación con las cadenas livianas, forma Fab - el fragmento de unión de antígeno. El fragmento Fc es responsable de las funciones efectoras de inmunoglobulina, que incluyen, por ejemplo, la fijación de complemento y la unión a receptores Fc cognados de células efectoras. La región bisagra, hallada en las clases de inmunoglobulinas IgG, IgA e IgD, actúa como un espaciador flexible que permite que la porción Fab se mueva libremente en el espacio en relación con la región Fc. En contraste a las regiones constantes, el dominio de bisagra es estructuralmente diverso, y varía tanto en términos de secuencia como de longitud entre las clases y subclases de inmunoglobulinas.

De acuerdo con los estudios cristalográficos, la región bisagra de inmunoglobulina puede además subdividirse estructural y funcionalmente en tres regiones: la bisagra superior, el centro, y la bisagra inferior (Shin *et al.*, *Immunological Reviews*, 130: 87, 1992). La bisagra superior incluye aminoácidos del extremo carboxilo de CH1 al primer residuo en la bisagra que restringe el movimiento, en general, el primer residuo cisteína que forma un enlace de disulfuro de intercadena entre las dos cadenas pesadas. La longitud de la región bisagra superior correlaciona con la flexibilidad segmental del anticuerpo. La región bisagra de centro contiene los puentes de disulfuro de intercadena pesada. La región bisagra inferior se une al terminal amino del dominio CH2, e incluye residuos en el dominio CH2. La región bisagra de centro de IgG1 humana contiene la secuencia Cys-Pro-Pro-Cys, que, cuando es dimerizada por la formación de enlace de disulfuro, logra un octapéptido cíclico que se cree actúa como un centro de giro, para, de ese modo, conferir flexibilidad. Los cambios de conformación permitidos por la estructura y flexibilidad de la secuencia de polipéptido de la región bisagra de inmunoglobulina pueden afectar las funciones efectoras de la porción Fc del anticuerpo.

En general, para la preparación de anticuerpos monoclonales o sus fragmentos funcionales, de origen murino, es posible hacer referencia a técnicas descritas, en particular, en el manual "Antibodies" (Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, pp. 726, 1988), o a la técnica de preparación a partir de hibridomas descrita por Kohler y Milstein (*Nature*, 256: 495-497, 1975). En consecuencia, los anticuerpos monoclonales pueden, por ejemplo, ser purificados en una columna de afinidad sobre la cual el receptor de interés o uno de sus fragmentos que contiene el epítipo específicamente reconocido por dichos anticuerpos monoclonales ha sido previamente inmovilizado. Más en particular, dichos anticuerpos monoclonales pueden purificarse por medio de la cromatografía en proteína A y/o G, seguida o no seguida de la cromatografía de intercambio iónico, destinada a la eliminación de los contaminantes de proteína residuales, al igual que el ADN y los LPS, y esta, a su vez, seguida o no seguida de la cromatografía de exclusión en gel Sepharose, a fin de eliminar los potenciales productos de agregación debido a la presencia de dímeros o de otros multímeros. De un modo aun más

preferido, la totalidad de estas técnicas pueden usarse en forma simultánea o sucesiva.

Un fragmento funcional de un anticuerpo de acuerdo con la invención tiene la intención de indicar, en particular, un fragmento de anticuerpo, tal como fragmentos Fv, scFv (sc para cadena simple), Fab, F(ab')₂, Fab', scFv-Fc, o diacuerpos, o cualquier fragmento en el cual se ha incrementado la semivida mediante la modificación química, tal como la adición de poli(alquileno) glicol, tal como poli(etileno) glicol ("PEGilación") (fragmentos pegilados denominados Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, F(ab')₂-PEG o Fab'-PEG) ("PEG" para Poli(Etileno) Glicol), o mediante la incorporación en un liposoma, donde dichos fragmentos tienen por lo menos una de las CDR características del anticuerpo original.

Preferentemente, estos fragmentos funcionales serán fragmentos del tipo Fv, scFv, Fab, F(ab')₂, F(ab'), scFv-Fc o diacuerpos, que tienen generalmente la misma especificidad de unión que el anticuerpo del cual descienden. De acuerdo con la presente invención, los fragmentos de anticuerpos de la invención pueden obtenerse iniciando a partir de anticuerpos tales como se describen con anterioridad, por medio de métodos tales como la digestión por enzimas, como pepsina o papaína, o mediante la disociación de los puentes de disulfuro por medio de la reducción química. De otro modo, los fragmentos de anticuerpos comprendidos en la presente invención pueden obtenerse mediante técnicas de recombinación genética bien conocidas por el experto en la materia, o, de lo contrario, mediante la síntesis de péptidos por medio de, por ejemplo, sintetizadores de péptidos automáticos tales como aquellos suministrados por la compañía Applera, etc.

El término "antagonista", como se utiliza en la presente memoria se refiere a una molécula que es capaz de inhibir una o más de las actividades biológicas de una molécula diana, tal como un receptor extracelular o de transmembrana. Los antagonistas pueden actuar interfiriendo con la unión de un receptor a un ligando y viceversa, disminuyendo la fosforilación de receptor, y/o incapacitando o eliminando células que han sido activadas por un ligando. El antagonista puede bloquear por completo las interacciones de receptor-ligando, o puede reducir de modo sustancial dichas interacciones mediante la competición, el cambio de conformación, la muda o la regulación descendente. Todos dichos puntos de intervención por un antagonista serán considerados equivalentes para los objetivos de esta invención.

El término "agonista", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a cualquier compuesto, incluso una proteína, un polipéptido, un péptido, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un conjugado, una molécula grande, una molécula pequeña, capaz de activar una o más de las actividades biológicas de una molécula diana.

En la investigación de anticuerpos terapéuticos, a menudo se espera contar con tantos anticuerpos como antagonistas, como sean posibles.

Ejemplos clásicos de anticuerpos antagonistas son anticuerpos herceptina, pertuzumab, cetuximab, anti-VEGFR o anti-IGF-1R.

Como un ejemplo particular, puede mencionarse el anticuerpo anti-c-Met 5D5 generado por Genentech [WO 96/38557], que se comporta como un potente agonista cuando se agrega solo en diversos modelos. A fin de resolver este problema técnico, este anticuerpo tuvo que ser genomanipulado como un fragmento Fab o como un anticuerpo monovalente (5D5 de un solo brazo), de modo de poseer una actividad antagonista. En consecuencia, dicho anticuerpo no puede considerarse un anticuerpo, sino un fragmento, y no presenta todas las ventajas del formato de "anticuerpo completo" (sin funciones efectoras, menor aclaramiento y semivida [el doble de velocidad que los anticuerpos bivalentes tradicionales, como se describe en el Póster 411 del 20 simposio de EORTC-NCI-AACR, Geneva, octubre 21-24, 2008]).

El experto en la materia reconocerá que las funciones efectoras incluyen, por ejemplo, la unión C1q; la citotoxicidad dependiente de complemento; la unión de receptor Fc; la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; y la regulación descendente de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de célula B; BCR y la prolongación de la semivida a través de la incorporación del ligando de unión del receptor de salvamento (FcRn), como se describe, por ejemplo, en la patente US nº 5.739.277, concedida el 14 de abril de 1998.

El documento Cavacini et al. (J. of Immunology., vol. 155, p. 3638-3644, 1995) puede mencionarse asimismo el cual divulga un procedimiento para mejorar la actividad agonista de un anticuerpo monoclonal mediante la sustitución de la región constante de IgG1 mediante una región constante de IgG3.

Uno de los aspectos inventivos de invención de la presente invención consiste en la resolución de dichos problemas técnicos, es decir, el mejoramiento de la actividad antagonista de un anticuerpo, y a la vez, la conservación de un formato "completamente divalente".

Deben mencionarse en la presente memoria, que la invención puede aplicarse a fin de modular la actividad agonista/antagonista de anticuerpos humanos obtenidos mediante la inmunización de "ratones humanos" (ratones genéticamente modificados que producen inmunoglobulinas humanas), o usando técnicas de exhibición de fagos

para construir anticuerpos enteros a partir de fragmentos seleccionados scFv, Fab, o cualquier otro fragmento equivalente.

5 Puede encontrarse otro problema técnico clásico en el curso de la quimerización o humanización de un anticuerpo murino. Es bien sabido por el experto en la materia que, si el procedimiento de quimerización o humanización de un anticuerpo murino es muy fácil en teoría, no es tan sencillo manipular la quimerización y la humanización de dicho anticuerpo murino sin perder la totalidad o parte de las propiedades iniciales. El anticuerpo quimérico o humanizado puede perder parte de sus actividades ADCC, CDC, antagonista/agonista, de unión (TBC). La presente invención se refiere, más en particular, a la modificación de la actividad agonista/antagonista de un anticuerpo murino, luego de un procedimiento de quimerización o humanización.

10 Como ejemplo particular, un grupo de anticuerpos anti-cMet, descritos en adelante como 224G11, 2274H1 y 11E1, que se comportan como potentes anticuerpos murinos antagonistas, se tornaron agonistas parciales cuando se quimerizaron en un formato IgG1 humano. Este cambio de potentes antagonistas a agonistas parciales logró una pérdida completa de actividad *in vivo*, en modelos de xenoinjertos.

15 La presente invención tiene la intención de resolver estos problemas, y se relaciona, más en particular, con un procedimiento para mejorar la actividad antagonista de un anticuerpo monoclonal dirigido contra una molécula diana específica, o un fragmento funcional divalente o derivado de dicho anticuerpo, donde dicho anticuerpo es capaz de inhibir una o más de las actividades biológicas de dicha molécula diana, donde dicho procedimiento comprende una etapa de reconfiguración de la región bisagra, que consiste en una modificación de la secuencia de aminoácidos de dicha región bisagra mediante la eliminación, la adición o la sustitución de por lo menos un aminoácido.

20 Es claro que la expresión "mejorar la actividad antagonista" debe interpretarse en su más amplio sentido, es decir, como el resultado deseado. En términos técnicos, dicho resultado puede obtenerse por medio de una mejoría de la actividad antagonista intrínseca, y/o una disminución de la actividad agonista intrínseca de un anticuerpo.

25 Más en particular, las definiciones básicas de términos en farmacología cuantitativa se sustentan en las recomendaciones actualizadas proporcionadas por el International Union of Pharmacology (IUPHAR) Committee sobre nomenclatura de receptores (ver la referencia de Neubig *et al.*, 2003).

30 El término 'agonista' representa un ligando (cualquier tipo de molécula) que se une a un receptor y altera el estado del receptor, para lograr una respuesta biológica estimulante o mayor. Los agonistas pueden actuar como agonistas totales o agonistas parciales:

- 35 - Agonista total: cuando el estímulo del receptor inducido por un agonista alcanza la capacidad de respuesta máxima del sistema, entonces producirá la respuesta máxima del sistema y será un agonista total en dicho sistema. Varios agonistas pueden producir la misma respuesta máxima, y todos ellos son agonistas totales en dicho sistema experimental.
- 40 - Agonista parcial: una molécula que, en un tejido determinado, en condiciones específicas, no puede producir un efecto tan grande (incluso aplicado en alta concentración, de modo que todos los receptores sean ocupados) como un agonista total que actúa a través de los mismos receptores en el mismo sistema. Los agonistas parciales, en general, son también antagonistas parciales, ya que, en presencia conjunta de un agonista total, reducen la respuesta máxima de dicho agonista total a su propia respuesta máxima. Esta designación de agonista total en comparación con agonista parcial depende del sistema, y un agonista total para un sistema o una medición puede ser un agonista parcial en otro.

45 El término "antagonista" representa una molécula que reduce la acción de otro fármaco, en general, un agonista. Muchos antagonistas actúan en la misma macromolécula de receptor que el agonista.

- 50 - La eficacia del antagonismo puede consistir en el antagonismo total, donde la respuesta del sistema en presencia conjunta del antagonista y agonista corresponde a la actividad basal (sin ningún ligando) del sistema.
- 55 - Un antagonista puede actuar como antagonista parcial cuando la inhibición máxima (aun aplicado en alta concentración, de modo que todos los receptores sean ocupados por el antagonista) producida por la presencia conjunta del antagonista y el agonista es superior a la actividad basal del sistema.
- 60 - El antagonismo puede ser competitivo cuando la unión de agonista y antagonista es mutuamente excluyente. Esto puede deberse a que el agonista y el antagonista compiten por el mismo sitio de unión, o se combinan con sitios adyacentes que se superponen. Una tercera posibilidad es que haya diferentes sitios involucrados, si bien estos afectan la macromolécula de receptor de modo tal que las moléculas de agonista y antagonista no pueden unirse al mismo tiempo.
- 65 - El antagonismo no competitivo se observa cuando el agonista y el antagonista pueden unirse al receptor en

forma simultánea; la unión de antagonista reduce o evita la acción del agonista, con o sin efecto sobre la unión del agonista.

5 La eliminación, adición o sustitución puede efectuarse de manera clásica por medio de cualquier método conocido por el experto en la materia.

10 El experto en la materia podrá aplicar varios métodos para generar adiciones, deleciones o inserciones en una secuencia de ADN determinada. Entre estos métodos pueden mencionarse, sin limitación, la digestión parcial de ADN con ADNasa I pancreática, la digestión parcial de ADN con enzimas de restricción, mutantes de inserciones a base de conectores, grupos anidados de mutantes de eliminación usando nucleasa BAL31, ADNasa I o exonucleasa III. Estos métodos son descritos extensamente en manuales de laboratorio, tales como *Molecular Cloning, A laboratory manual* (Sambrook, Fritsch y Maniatis). Además, pueden emplearse varios métodos sobre la base de la PCR, a fin de generar deleciones o inserciones, o mutagénesis dirigida a sitio en una molécula de ADN tal como la PCR de extensión de superposición (Wurch *et al.*, 1998), sin limitación a ella. A fin de efectuar la mutagénesis dirigida a sitio, pueden usarse varias otras técnicas, cuyos ejemplos son, sin limitación, la mutagénesis sobre la base de oligonucleótidos, sobre la base de métodos de cebador simple o doble; y el método Kunkel, sobre la base de la incorporación de uracilo (Kunkel, 1985). Estos métodos son descritos extensamente en manuales de laboratorio tales como *Molecular Cloning, A laboratory manual* (Sambrook, Fritsch y Maniatis).

20 A título de ejemplo no limitativo de adición, puede mencionarse la adición de una prolina en la región bisagra, o adyacente a ella.

En este procedimiento divulgado, dicha modificación se selecciona de:

- 25 i) la eliminación de por lo menos un aminoácido de dicha secuencia de aminoácidos de región bisagra; y/o
ii) la adición de por lo menos un puente de disulfuro en dicha región bisagra.

30 Para poner claramente de manifiesto la invención, se describirá primero el primer aspecto (i), y a continuación, se describirá el segundo aspecto (ii). Debe entenderse que este orden solo se debe a la presentación escrita de la presente solicitud, y que ambos aspectos, como será evidente en adelante, tienen importancia similar.

35 La presente invención se refiere a un procedimiento para mejorar la actividad agonista de un anticuerpo monoclonal dirigido contra una molécula diana específica, o un fragmento funcional divalente del mismo, pudiendo dicho anticuerpo o fragmento funcional divalente del mismo inhibir una o más de las actividades biológicas de dicha molécula diana, en el que dicho procedimiento comprende una etapa de reconfiguración de la región bisagra que consiste en una modificación de la secuencia de aminoácidos de dicha región bisagra mediante la eliminación, la adición o la sustitución de por lo menos un aminoácido, y en el que dicha región bisagra reconfigurada obtenida por la modificación de su secuencia de aminoácidos da como resultado una región bisagra que presenta una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, SEC ID nº 4, SEC ID nº 6, SEC ID nº 7, SEC ID nº 23 a SEC ID nº 27, SEC ID nº 36 y SEC ID nº 42 a SEC ID nº 49.

Una forma de modificar la secuencia de aminoácidos de la región bisagra consistirá en la eliminación de, como máximo, 2, 3 o 4 aminoácidos de dicha secuencia de aminoácidos de región bisagra.

45 Es divulgado que dicho anticuerpo monoclonal es un anticuerpo divalente. En realidad, como se observa a continuación, es posible modular la actividad agonista/antagonista de un anticuerpo mediante la modificación de la estructura de dicho anticuerpo. Por primera vez, los inventores informan una manera original de modular dicha actividad agonista/antagonista, y a la vez, conservar una forma divalente del anticuerpo, destinada a la conservación de las buenas propiedades tales como la larga semivida o las funciones efectoras.

50 Asimismo, puede mencionarse en esta solicitud que, si bien la modificación de la región bisagra de un anticuerpo monoclonal, a fin de aumentar las funciones efectoras, ya ha sido indicada en la técnica, nunca se ha informado, por el contrario, de que dicha modificación en la región bisagra podría ser de interés en la modulación de la actividad agonista/antagonista de un anticuerpo monoclonal. Este es claramente el objeto de la presente invención, que es novedoso e inventivo en relación con la técnica anterior existente.

Como un aspecto de acuerdo con el procedimiento de la invención, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo quimérico.

60 El término anticuerpo "quimérico" tiene la intención de indicar un anticuerpo que contiene una región variable natural (cadena liviana y cadena pesada) derivada de un anticuerpo de una especie determinada, en combinación con las regiones constantes de cadena liviana y cadena pesada de un anticuerpo de una especie heteróloga en relación con dicha especie determinada (por ejemplo, ratón, caballo, conejo, perro, vaca, pollo, etc.).

65 Los anticuerpos o sus fragmentos de tipo quimérico de acuerdo con la invención pueden prepararse usando las técnicas de recombinación genética. Por ejemplo, el anticuerpo quimérico puede producirse mediante la clonación

- de un ADN recombinado que contiene un promotor y una secuencia que codifica la región variable de un anticuerpo monoclonal no humano, en especial, murino, de acuerdo con la invención, y una secuencia que codifica para la región constante de anticuerpo humano. Un anticuerpo quimérico de la invención codificado por dicho gen recombinado será, por ejemplo, una quimera de ratón-hombre, donde la especificidad de este anticuerpo será determinada por la región variable derivada del ADN murino, y su isotipo será determinado por la región constante derivada del ADN humano. Para los métodos de preparación de anticuerpos quiméricos, puede hacerse referencia, por ejemplo, a los documentos de Verhoeyn *et al.* (*BioEssays*, 8: 74, 1988), Morrison *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 6851-6855, 1984), o la patente US nº 4.816.567.
- Como otro aspecto de acuerdo con el procedimiento de la invención, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo humanizado.
- Un "anticuerpo humanizado" tiene la intención de indicar un anticuerpo que contiene regiones CDR derivadas de un anticuerpo de origen no humano, donde las otras partes de la molécula de anticuerpo derivan de una secuencia de línea germinal o un anticuerpo humano (o varios anticuerpos humanos). Además, algunos de los residuos de los segmentos del esqueleto (denominados FR) pueden ser modificados a fin de conservar la afinidad de la unión (Jones *et al.*, *Nature*, 321: 522-525, 1986; Verhoeyn *et al.*, *Science*, 239: 1534-1536, 1988; Riechmann *et al.*, *Nature*, 332: 323-327, 1988).
- Los anticuerpos humanizados de acuerdo con la invención, o sus fragmentos, pueden prepararse por medio de técnicas conocidas para el experto en la materia (por ejemplo, aquellas que se describen en los documentos de Singer *et al.*, *J. Immun.*, 150: 2844-2857, 1992; Mountain *et al.*, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 10: 1-142, 1992; o Bebbington *et al.*, *Bio/Technology*, 10: 169-175, 1992).
- Otros métodos de humanización son conocidos por el experto en la materia, por ejemplo, el método de "injerto de CDR" descrito por Protein Design Lab (PDL) en las solicitudes de patente EP 0 451 216, EP 0 682 040, EP 0 939 127, EP 0 566 647 o US nº 5.530.101, US nº 6.180.370, US nº 5.585.089 y US nº 5.693.761. Pueden mencionarse además las siguientes solicitudes de patente: US nº 5.639.641; US nº 6.054.297; US nº 5.886.152 y US nº 5.877.293.
- Como otro aspecto de acuerdo con el procedimiento de la invención, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo humano.
- El término "anticuerpo humano" incluye todos los anticuerpos que tienen una o más regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina humanas. En una forma de realización preferida, todos los dominios (o regiones) variables y constantes derivan de secuencia de inmunoglobulina humana (anticuerpo completamente humano). En otras palabras, comprende cualquier anticuerpo que tenga regiones variables y constantes (si se presentan) derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana, es decir, que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a aquella de un anticuerpo producido por un humano, y/o que se ha preparado empleando cualquier técnica para la preparación de anticuerpos humanos conocida por el experto en la materia.
- En una forma de realización, los anticuerpos monoclonales humanos son producidos por un hibridoma que comprende una célula B obtenida de un animal no humano transgénico, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena liviana fusionado a una célula inmortalizada.
- Como ejemplo de dicho ratón transgénico, puede mencionarse el XENOMOUSE™, que es una cepa de ratón genomanipulada que comprende fragmentos grandes de los *loci* de inmunoglobulina humana, y que carece de producción de anticuerpo de ratón (Green *et al.*, 1994, *Nature Genetics*, 7: 13-21). El XENOMOUSE™ produce un repertorio humano de tipo adulto de anticuerpos completamente humanos, y genera anticuerpos monoclonales humanos específicos de antígeno. Un XENOMOUSE™ de segunda generación contiene aproximadamente 80% del repertorio de anticuerpos humanos (Green & Jakobovits, 1998, *J. Exp. Med.*, 188: 483-495).
- Puede usarse además cualquier otra técnica conocida por el experto en la materia, tal como la técnica de exhibición de fagos, para la generación de anticuerpo humano de acuerdo con la invención.
- El procedimiento de acuerdo con la invención puede emplearse para cualquier tipo de inmunoglobulina que comprende una región bisagra, es decir, IgA, IgD e IgG.
- Como un ejemplo, para el isotipo IgA, la región bisagra de un IgA1 comprende la secuencia de aminoácidos PSTPPTSPSTPPTSPS (SEC. ID. nº 8), y la región bisagra de un IgA2 comprende la secuencia de aminoácidos PPTPP (SEC. ID. nº 9).
- De manera similar, la región bisagra de un IgD comprende la secuencia de aminoácidos SPKAQASSVPTAQPQAEGLAKATTAPATTRNTRGEEKKKEKEEQEERETKTP (SEC. ID. nº 10).

Como una forma de realización particular de la invención, se prefiere el uso de un IgG que incluye, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

5 Las respectivas secuencias de aminoácidos que corresponden a los diferentes isotipos de regiones de bisagra de IgG son:

PKSCDKTHTCPPCP (SEC. ID. nº 11) para un IgG1,

10 RKCCVECPPCP (SEC. ID. nº 7) para un IgG2,

LKTPLFTGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP (SEC. ID. nº 12) para un IgG3, y

15 SKYGPPCPSCP (SEC. ID. nº 13) para un IgG4.

Aun más en particular, se prefiere el uso de un IgG1. En realidad, en el campo de los anticuerpos terapéuticos, y más en particular, en el tratamiento del cáncer, se prefiere la generación de IgG1 a fin de lograr funciones efectoras tales como ADCC y CDC, además de funciones ligadas a la unión específica al antígeno diana.

20 El procedimiento de la invención se caracteriza por que dicho anticuerpo monoclonal es un IgG1.

Una "molécula diana", en el contexto de la invención, se refiere a cualquier molécula a la cual el anticuerpo monoclonal es capaz de unirse específicamente, o de modular su actividad. En general, dicha molécula diana puede denominarse "antígeno".

Como ejemplos no limitativos de molécula diana que puede ser dianizada por un anticuerpo monoclonal pueden mencionarse ligandos solubles, receptores tales como receptores de transmembrana, marcadores tumorales de membrana, etc.

30 En una forma de realización preferida, dicha molécula diana es un receptor transmembranario.

El término "receptor transmembranario" se refiere a una proteína que abarca la membrana plasmática de una célula, donde el dominio extracelular de la proteína tiene la capacidad de unirse a un ligando, y el dominio intracelular tiene una actividad (tal como una proteína cinasa) que puede ser alterada (aumentada o disminuida) con la unión de ligando. En otras palabras, los receptores transmembranarios son proteínas de membrana integrales que residen y funcionan típicamente dentro de la membrana plasmática de una célula, aunque también, en las membranas de algunos orgánulos y compartimientos subcelulares. Con la unión a una molécula de señalización, o a veces, a un par de dichas moléculas, en un lateral de la membrana, los receptores transmembranarios inician una respuesta en el otro lado. De este modo, cumplen una función única importante en las comunicaciones celulares y en la transducción de señal.

Muchos receptores transmembranarios están compuestos por dos o más subunidades de proteína que funcionan en forma colectiva y pueden disociarse cuando los ligandos se ligan, se caen, o en otra etapa de sus ciclos de "activación". A menudo se clasifican sobre la base de su estructura molecular, o si la estructura es desconocida en detalle para casi la totalidad de los receptores, excepto algunos, sobre la base de su hipotética (y a veces, experimentalmente verificada) topología de membrana. Se predice que las cadenas de polipéptido de los más simples cruzan la bicapa lípida solo una vez, mientras que otros la cruzan tanto como siete veces (los así denominados receptores acoplados a proteína G, o GPCR) o más.

50 Como cualquier proteína membranaria integral, un receptor transmembranario puede subdividirse en tres partes o *dominios*, un dominio extracelular, un dominio transmembranario y un dominio intracelular.

El dominio extracelular es la parte del receptor que sobresale de la membrana al exterior de la célula o del orgánulo. Si la cadena de polipéptido del receptor cruza la bicapa varias veces, el dominio externo puede comprender varias "anillas" que sobresalen de la membrana. Por definición, la principal función del receptor es reconocer y responder a un ligando específico, por ejemplo, un neurotransmisor o una hormona (si bien ciertos receptores también responden a cambios en el potencial de transmembrana), y en muchos receptores, estos ligandos se unen al dominio extracelular.

60 En la mayoría de los receptores para los cuales existe evidencia estructural, las alfa hélices de transmembrana forman la mayor parte del dominio de transmembrana. En ciertos receptores, tales como el receptor de acetilcolina nicotínico, el dominio de transmembrana forma un poro alineado con la proteína a través de la membrana, o un canal iónico. Con la activación de un dominio extracelular mediante la unión del ligando apropiado, el poro se torna accesible para los iones, que entonces pasan a través de este. En otros receptores, se presume que los dominios de transmembrana sufren un cambio de conformación con la unión, lo que ejerce un efecto en forma intracelular. En

algunos receptores, tales como miembros de la superfamilia 7TM, el dominio de transmembrana puede contener el saco de unión de ligando.

El dominio intracelular (o citoplásmico) del receptor interactúa con el interior de la célula o del orgánulo, transmitiendo la señal. Existen dos formas fundamentalmente diferentes para esta interacción: a) el dominio intracelular se comunica, mediante interacciones específicas de proteína-proteína, con *proteínas efectoras*, que, a su vez, envían la señal a lo largo de una cadena de señal, a su destino; y b) con receptores ligados a enzimas, el dominio intracelular tiene *actividad enzimática*. A menudo, esta actividad es una actividad de tirosina cinasa. La actividad enzimática además puede ubicarse en una enzima asociada con el dominio intracelular.

Existen varias formas en las que la célula regula la actividad de un receptor de transmembrana. La mayoría de ellas funcionan a través del dominio intracelular. Las formas más importantes son la fosforilación y la internalización (ver ubiquitina) o activación de cascadas mensajeras secundarias tales como cAMP, IP, Ca²⁺ o cGMP.

Todas las proteínas de membrana que muestran actividades enzimáticas además pueden ser apuntadas por anticuerpos con la modificación descrita en esta invención. Como ejemplo, pueden mencionarse, sin limitación, la familia de metaloproteasas de matriz (MMP), la familia de 'proteasas de un dominio de desintegrina y un dominio de metaloproteasa' (ADAM), adenilato ciclasas, ...

Todas las proteínas membranarias que actúan como canales iónicos, poros y transportadores también pueden ser apuntadas por anticuerpos con la modificación que se describe en esta invención. Como ejemplo, pueden mencionarse, sin limitación, la familia de canales de sodio, la familia de canales de potasio, la familia de receptores de acetilcolina nicotínicos, los receptores sigma, la familia de transportadores de monoamina.

Más ampliamente, todas las proteínas membranarias identificadas como marcadores específicos para una enfermedad determinada también pueden ser apuntadas por tratamientos de anticuerpos, donde los anticuerpos además pueden ser mejorados por las modificaciones que se describen en esta invención.

En una forma de realización preferida de la invención, dicho receptor transmembranario se selecciona del grupo que consiste en el receptor de tirosina cinasa, tetraspanina y GPCR.

En una forma de realización más preferida, dicho receptor de transmembrana es un receptor de tirosina cinasa seleccionado, preferentemente, del grupo que consiste en IGF-1R, c-Met, RON, Axl, VEGF, VEGFR, Her-2neu, homodímeros y heterodímeros de la familia ErbB, etc.

En la presente solicitud, y más en particular, en la siguiente memoria descriptiva, las secuencias se definirán haciendo referencia a IMGT (base de datos de inmunogenética). Se ha definido la numeración única de IMGT a fin de comparar los dominios variables sin consideración del receptor de antígeno, el tipo de cadena o la especie [Lefranc M. -P., *Immunology Today*, 18, 509 (1997); Lefranc M. -P., *The Immunologist*, 7, 132-136 (1999); Lefranc, M. -P., Pommié, C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. y Lefranc, *Dev. Comp. Immunol.*, 27, 55-77 (2003)]. En la numeración única de IMGT, los aminoácidos conservados siempre tienen la misma posición, por ejemplo, cisteína 23 (1^a-CYS), triptófano 41 (TRP-CONSERVADO), aminoácido hidrófobo 89, cisteína 104 (2^a-CYS), fenilalanina o triptófano 118 (J-PHE o J-TRP). La numeración única de IMGT proporciona una delimitación estandarizada de las regiones de marco (FR1-IMGT: posiciones 1 a 26, FR2-IMGT: 39 a 55, FR3-IMGT: 66 a 104 y FR4-IMGT: 118 a 128) y de las regiones de determinación de complementariedad: CDR1-IMGT: 27 a 38, CDR2-IMGT: 56 a 65 y CDR3-IMGT: 105 a 117. Debido a que los espacios representan las posiciones no ocupadas, las longitudes de CDR-IMGT (expuestas entre corchetes y separadas por puntos, por ejemplo, [8.8.13]) se toman información crucial. La numeración única de IMGT se usa en representaciones gráficas 2 D, designadas IMGT *Colliers de Perles* [Ruiz, M. y Lefranc, M. -P., *Immunogenetics*, 53, 857-883 (2002); Kaas, Q. y Lefranc, M. -P., *Current Bioinformatics*, 2, 21-30 (2007)], y en estructuras 3 D, en IMGT/3Dstructure-DB [Kaas, Q., Ruiz, M. y Lefranc, M. -P., "T cell receptor and MHC structural data". *Nucl. Acids. Res.*, 32, D208-D210 (2004)].

Para el experto en la materia, será evidente el traspaso de la invención descrita de acuerdo con el sistema IMGT, a cualquier otro sistema de numeración, tal como el sistema de numeración Kabat.

La numeración única de IMGT para todas las regiones V IG y TR de todas las especies se sustenta en la alta conservación de la estructura de la región variable. Esta numeración, establecida luego de la alineación de más de 5000 secuencias, tiene en cuenta y combina la definición de las regiones de marco (FR) y de determinación de complementariedad (CDR), la información estructural de estudios de difracción de rayos X, y la caracterización de las anillas hipervariables. Se han definido las delimitaciones de las regiones FR-IMGT y CDR-IMGT. Asimismo, la numeración única de IMGT ha sido aplicada para el dominio C, y permite la precisa delimitación de dominios de tipo Ig. El dominio C corresponde a la región C completa, a la mayor parte de la región C, o solo a parte de la región C, de acuerdo con el tipo de inmunoglobulina (IG).

La numeración de IMGT para el dominio C (IG y TR) deriva, como la numeración única de IMGT para el dominio V, de los principios de la numeración única de IMGT para la región V, hasta la posición 104. Por lo tanto, las posiciones

de aminoácidos pueden compararse sin dificultad, entre el dominio C y el dominio V.

A fin de localizar con precisión las regiones bisagra, se aplicó la numeración de IMGT del dominio C a fin de localizar en forma precisa los dominios CH1 y CH2. La región bisagra incluye todos los residuos de aminoácidos entre el último residuo de IMGT-CH1 y el primer residuo de IMGT-CH2.

Todos los otros esquemas de numeración de inmunoglobulinas, tales como el de Kabat o A. Honegger, que cubren el mismo dominio bisagra, se incluyen en la presente invención.

Sobre la base del sistema de numeración de IMGT que se describe con anterioridad, la secuencia de aminoácidos de la región bisagra de un IgG1 comprende los residuos H1 a H14, donde el segmento H1 a H9 corresponde a la bisagra superior, y el segmento H10 a H14 corresponde a la bisagra de centro. Más en particular, la región bisagra de IgG1 humano comprende la secuencia de aminoácidos PKSCDKTHTCPPCP (SEC. ID. nº 11), y la región bisagra de IgG1 murino comprende la secuencia de aminoácidos PRDCGCKPCICT (SEC. ID. nº 14).

Tabla 1.

Región bisagra	Numeración	Hu-IgG1 (SEC ID nº 11)	Mu-IgG1 (SEC ID nº 14)	Hu-IgG2 (SEC ID nº 7)	Hu-IgG4 (SEC ID nº 11)
Bisagra superior	H1	P	P	-	-
	H2	K	R	R	S
	H3	S	D	K	K
	H4	C	C	C	Y
	H5	D	G	-	-
	H6	K	-	-	-
	H7	T	C	C	G
	H8	H	K	V	P
	H9	T	P	E	P
Bisagra centro	H10	C	C	C	C
	H11	P	I	P	P
	H12	P	-	P	S
	H13	C	C	C	C
	H14	P	T	P	P

Se considera una modificación que tiene el objetivo de reducir la longitud de la secuencia de proteína que codifica para la región bisagra de un anticuerpo divalente. Más en particular, el procedimiento de acuerdo con la invención comprende una etapa de eliminación de por lo menos un aminoácido en la región bisagra.

Se divulga la eliminación de, como máximo, 2 aminoácidos de dicha región bisagra.

Se divulga la eliminación de, como máximo, 3 aminoácidos de dicha región bisagra.

Se divulga la eliminación de, como máximo, 4 aminoácidos de dicha región bisagra.

Se divulga que la modificación consiste en por lo menos una eliminación de un aminoácido seleccionado de los aminoácidos en las posiciones H1, H2, H3, H5, H6, H7, H8, H9, H11, H12 o H14.

Se divulga la implicación de residuos particulares, y la selección de ciertos residuos.

Se divulga que en el caso de un IgG1, el aminoácido en la posición H1 consiste en una prolina; el aminoácido en la posición H2 consiste en una lisina, en la versión humana, y en una arginina, en la versión murina; el aminoácido en la posición H3 consiste en una serina, en la versión humana, y en un aspartato, en la versión murina; el aminoácido en la posición H5 consiste en un aspartato, en la versión humana, y en una glicina, en la versión murina; el aminoácido en la posición H6 consiste en una lisina; el aminoácido en la posición H8 consiste en una histidina en la versión humana, y en una lisina, en la versión murina; el aminoácido en la posición H9 consiste en una treonina en la versión humana, y en una prolina, en la versión murina; el aminoácido en la posición H11 consiste en una prolina en la versión humana, y en una isoleucina, en la versión murina; y el aminoácido en la posición H12 consiste en una prolina en la versión humana.

Se divulga que esta eliminación debe efectuarse en la región "bisagra superior".

Se divulga que esta eliminación es parte de la "bisagra superior" constituida, para un IgG1, por ejemplo, por los aminoácidos H1 a H9, en comparación con la "bisagra de centro", constituida por los aminoácidos H10 a H14.

En la presente solicitud, la numeración de aminoácidos se realiza con respecto al sistema de IMGT descrito

previamente. Es evidente que cualquier otro sistema de numeración, con una modificación de la numeración, si bien sin modificación de la naturaleza de residuos implicados en la región bisagra, debe considerarse equivalente. Como un ejemplo, debe considerarse equivalente la reenumeración de la parte de aminoácidos identificada de la invención (de acuerdo con el sistema de IMGT), en el sistema de Kabat.

5 Se divulga la eliminación de por lo menos una cisteína en la región de "bisagra superior", preferentemente, ubicada en la posición H4.

10 Se divulga la adición de por lo menos un puente de disulfuro en la región bisagra.

Se divulga que el procedimiento de la invención se caracteriza porque la modificación consiste en la introducción de por lo menos una cisteína en la región "bisagra superior".

15 De acuerdo con los inventores, una explicación razonable se sustenta en un posible "rigidez" de la bisagra, resultante o bien de la reducción de la longitud, o de la introducción de otro puente de disulfuro, o de ambos. Dicha "rigidez" permitirá mantener una conformación espacial apropiada del anticuerpo, y como consecuencia, una mejor actividad antagonista.

20 Es claro que cualquier método que tenga el objetivo de aportar rigidez a la región bisagra debe considerarse un método equivalente al procedimiento de acuerdo con la presente invención.

La introducción de una cisteína puede efectuarse mediante la adición de dicho aminoácido, donde dicha adición se realiza por cualquier método conocido por el experto en la materia.

25 Otra forma preferida de introducir una cisteína en la región bisagra consiste en una sustitución de por lo menos un aminoácido.

30 Se divulga que una manera para introducir una cisteína en la región bisagra consiste en una sustitución de por lo menos un aminoácido seleccionado de H1 a H9. Dicha sustitución puede efectuarse por cualquier método conocido por el experto en la materia.

Se divulga que el procedimiento puede comprender la sustitución de la treonina en la posición H7, en la región "bisagra superior", por una cisteína.

35 Se divulga que el procedimiento puede comprender la sustitución de la lisina en la posición H6, en la región "bisagra superior", por una cisteína.

Se divulga que el procedimiento puede comprender la sustitución de la prolina en la posición H1, en la región "bisagra superior", por una cisteína.

40 Se divulga que el procedimiento puede comprender la sustitución de la lisina en la posición H2, en la región "bisagra superior", por una cisteína.

45 Se divulga que el procedimiento puede comprender la sustitución de la serina en la posición H3, en la región "bisagra superior", por una cisteína.

Se divulga que el procedimiento puede comprender la sustitución del aspartato en la posición H5, en la región "bisagra superior", por una cisteína.

50 Se divulga que el procedimiento puede comprender la sustitución de la histidina en la posición H8, en la región "bisagra superior", por una cisteína.

Se divulga que el procedimiento puede comprender la sustitución de la treonina en la posición H9, en la región "bisagra superior", por una cisteína.

55 Se divulga que el procedimiento de la invención puede reducir la longitud de la región bisagra, o agregar un puente de disulfuro, mediante el cambio de la totalidad de la secuencia de aminoácidos que codifica la región bisagra.

60 Como un ejemplo preferido, la modificación del procedimiento de la invención consiste en un reemplazo de los aminoácidos H1 a H14 de la región bisagra de IgG1, por los aminoácidos H1 a H14 de una región bisagra de IgG2, preferentemente, cuando dicho anticuerpo monoclonal que se desea para mejorar su actividad antagonista es un anticuerpo IgG1.

65 En otra aplicación, la invención se refiere a un procedimiento para el cribado de un anticuerpo monoclonal antagonista dirigido contra una molécula diana específica, o un fragmento funcional divalente o derivado de dicho anticuerpo, donde dicho anticuerpo es capaz de inhibir una o más de las actividades biológicas de dicha molécula

diana, donde dicho procedimiento comprende las etapas de:

- 5 (a) la selección de un anticuerpo inicial con un nivel inicial de inhibición de dichas una o más actividades biológicas de dicha molécula diana;
- (b) la modificación de la secuencia de aminoácidos de la región bisagra de dicho anticuerpo inicial, por medio del procedimiento de la invención;
- 10 (c) la evaluación del anticuerpo modificado de la etapa (b), a fin de establecer su capacidad para inhibir dichas una o más actividades biológicas de dicha molécula diana; y
- (d) la selección, como un resultado positivo, del anticuerpo de la etapa (c) con un nivel de inhibición de dichas una o más actividades biológicas de dicha molécula diana, superior al nivel inicial de dicha inhibición.

15 Los anticuerpos iniciales pueden seleccionarse entre los anticuerpos existentes, tales como, sin limitación, anticuerpos antagonistas para IGF-1R, c-Met, RON, Axl, CD151, VEGF, VEGFR, Her-2neu, homodímeros y heterodímeros de la familia ErbB. Como ejemplos preferidos no limitativos, dichos anticuerpos iniciales pueden consistir en herceptina, pertuzumab, cetuximab, anticuerpos anti-VEGFR o anti-IGF-1R.

20 El término "nivel de inhibición", en el contexto de la invención, ilustra la actividad antagonista de un anticuerpo. Dicho nivel de inhibición puede determinarse por cualquier método conocido por el experto en la materia, por ejemplo, sin limitación: a) el recuento celular directo, o el uso de ³[H]Timidina, sales de tetrazolina o cualquier otro medio fluorescente para la evaluación de la proliferación; b) transferencia *western*, ensayos de fosfo-ELISA o ensayos de identificación sistemática alfa, a fin de controlar la transducción de señal; c) análisis BRET o FRET, para el ensayo de dimerización; d) microscopía o métodos fluorescentes, a fin de controlar la migración, la invasión, la angiogénesis o la morfogénesis; y e) medición de calibre de tumores para evaluaciones *in vivo*.

25

Este procedimiento de calibrado puede usarse para el mejoramiento de anticuerpos validados o como una etapa de selección para anticuerpos de investigación o preclínicos.

30

Es divulgado un anticuerpo monoclonal dirigido contra una molécula diana específica, o fragmentos funcionales divalentes o derivados de dicho anticuerpo, que se obtiene por medio del procedimiento de la invención, donde dicho anticuerpo se caracteriza por que comprende una secuencia de aminoácidos de región bisagra seleccionada del grupo que consiste en SEC. ID. nº 1 (PRDCGCKPCICT), SEC. ID. nº 2 (PKSCGCKPCICT), SEC. ID. nº 3 (PKSCGCKPCICP), SEC. ID. nº 4 (PRDCGCKPCPPCP), SEC. ID. nº 5 (PRDCGCHTCPPCP), SEC. ID. nº 6 (PKSCDCHCPCPPCP), SEC. ID. nº 7 (RKCCVECPCPPCP), SEC. ID. nº 22 (CKSCDKTHTCPCPPCP), SEC. ID. nº 23 (PCSCDKTHTCPCPPCP), SEC. ID. nº 24 (PKCCDKTHTCPCPPCP), SEC. ID. nº 25 (PKSCCKTHTCPCPPCP), SEC. ID. nº 26 (PKSCDCTHTCPCPPCP) SEC. ID. nº 27 (PKSCDKCHTCPCPPCP), SEC. ID. nº 28 (PKSCDKTCTCPCPPCP), SEC. ID. nº 29 (PKSCDKTHCCPCPPCP), SEC. ID. nº 30 (PKSCDKTHTCCPCPPCP), SEC. ID. nº 31 (PKSCDKTHTCPCPPCP), SEC. ID. nº 32 (PKSCDKTHTCPCPPC), SEC. ID. nº 33 (PSCDKTHTCPCPPCP), SEC. ID. nº 34 (PKSCDTHTCPCPPCP), SEC. ID. nº 35 (PKSCDKTHCPCPPCP), SEC. ID. nº 36 (KCDKTHTCPCPPCP), SEC. ID. nº 37 (PCKTHTCPCPPCP), SEC. ID. nº 38 (PKSCDTHCPCPPCP), SEC. ID. nº 39 (PKSCTHTCPCPPCP), SEC. ID. nº 40 (PKSCDKTTCPCPPCP), SEC. ID. nº 41 (PKSCDKTHCPCPPCP), SEC. ID. nº 42 (PKSCDCHTCPCPPCP), SEC. ID. nº 43 (PKSCDCHCPCPPCP), SEC. ID. nº 44 (PCSCKHTCPCPPCP), SEC. ID. nº 45 (PSCCTHTCPCPPCP), SEC. ID. nº 46 (PSCDKHCCPCPPCP), SEC. ID. nº 47 (PKSTHTCPCPPCP), SEC. ID. nº 48 (PKSCTCPCPPCP) o SEC. ID. nº 49 (PKSCDKCVECPCPPCP).

35

40

45

Es divulgado que un anticuerpo monoclonal obtenido mediante la implementación del procedimiento de la invención puede caracterizarse porque comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC. ID. nº 1 (PRDCGCKPCICT), SEC. ID. nº 2 (PKSCGCKPCICT), SEC. ID. nº 3 (PKSCGCKPCICP), SEC. ID. nº 4 (PRDCGCKPCPPCP), SEC. ID. nº 5 (PRDCGCHTCPPCP), SEC. ID. nº 6 (PKSCDCHCPCPPCP), SEC. ID. nº 7 (RKCCVECPCPPCP), SEC. ID. nº 22 (CKSCDKTHTCPCPPCP), SEC. ID. nº 23 (PCSCDKTHTCPCPPCP), SEC. ID. nº 24 (PKCCDKTHTCPCPPCP), SEC. ID. nº 25 (PKSCCKTHTCPCPPCP), SEC. ID. nº 26 (PKSCDCTHTCPCPPCP) SEC. ID. nº 27 (PKSCDKCHTCPCPPCP), SEC. ID. nº 28 (PKSCDKTCTCPCPPCP), SEC. ID. nº 29 (PKSCDKTHCCPCPPCP), SEC. ID. nº 30 (PKSCDKTHTCCPCPPCP), SEC. ID. nº 31 (PKSCDKTHTCPCPPCP), SEC. ID. nº 32 (PKSCDKTHTCPCPPC), SEC. ID. nº 33 (PSCDKTHTCPCPPCP), SEC. ID. nº 34 (PKSCDTHTCPCPPCP), SEC. ID. nº 35 (PKSCDKTHCPCPPCP), SEC. ID. nº 36 (KCDKTHTCPCPPCP), SEC. ID. nº 37 (PCKTHTCPCPPCP), SEC. ID. nº 38 (PKSCDTHCPCPPCP), SEC. ID. nº 39 (PKSCTHTCPCPPCP), SEC. ID. nº 40 (PKSCDKTTCPCPPCP), SEC. ID. nº 41 (PKSCDKTHCPCPPCP), SEC. ID. nº 42 (PKSCDCHTCPCPPCP), SEC. ID. nº 43 (PKSCDCHCPCPPCP), SEC. ID. nº 44 (PCSCKHTCPCPPCP), SEC. ID. nº 45 (PSCCTHTCPCPPCP), SEC. ID. nº 46 (PSCDKHCCPCPPCP), SEC. ID. nº 47 (PKSTHTCPCPPCP), SEC. ID. nº 48 (PKSCTCPCPPCP) o SEC. ID. nº 49 (PKSCDKCVECPCPPCP).

50

55

60

La presente invención se refiere asimismo a un anticuerpo monoclonal, caracterizado por que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en las secuencias SEC ID nº 2, SEC ID nº 4, SEC ID nº 6, SEC ID nº 23 a SEC ID nº 26, SEC ID nº 36 y SEC ID nº 42 a SEC ID nº 49.

65

En una forma de realización preferida, dicho anticuerpo monoclonal es un anticuerpo humano, más preferentemente,

es un anticuerpo IgG1.

Es divulgado asimismo un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo monoclonal como se describe con anterioridad, es decir, que comprende una secuencia de aminoácidos de región bisagra seleccionada del grupo que consiste en SEC. ID. nº 1 (PRDCGCKPCICT), SEC. ID. nº 2 (PKSCGCKPCICT), SEC. ID. nº 3 (PKSCGCKPCICP), SEC. ID. nº 4 (PRDCGCKPCPPCP), SEC. ID. nº 5 (PRDCGCHTCPPCP), SEC. ID. nº 6 (PKSCDCHCPCPPCP), SEC. ID. nº 7 (RKCCVECPCPPCP), SEC. ID. nº 22 (CKSCDKTHTCPCPPCP), SEC. ID. nº 23 (PCSCDKTHTCPCPPCP), SEC. ID. nº 24 (PKCCDKTHTCPCPPCP), SEC. ID. nº 25 (PKSCCKTHTCPCPPCP), SEC. ID. nº 26 (PKSCDCTHTCPCPPCP) SEC. ID. nº 27 (PKSCDKCHTCPCPPCP), SEC. ID. nº 28 (PKSCDKTCTCPCPPCP), SEC. ID. nº 29 (PKSCDKTHCCPCPPCP), SEC. ID. nº 30 (PKSCDKTHTCCPCPPCP), SEC. ID. nº 31 (PKSCDKTHTCPCPPCP), SEC. ID. nº 32 (PKSCDKTHTCPCPPCC), SEC. ID. nº 33 (PSCDKTHTCPCPPCP), SEC. ID. nº 34 (PKSCDTHTCPCPPCP), SEC. ID. nº 35 (PKSCDKTHCPCPPCP), SEC. ID. nº 36 (KCDKTHTCPCPPCP), SEC. ID. nº 37 (PSCKTHTCPCPPCP), SEC. ID. nº 38 (PKSCDTHCPCPPCP), SEC. ID. nº 39 (PKSCTHTCPCPPCP), SEC. ID. nº 40 (PKSCDKTTCPCPPCP), SEC. ID. nº 41 (PKSCDKTHCPCPPC), SEC. ID. nº 42 (PKSCDCHTCPCPPCP), SEC. ID. nº 43 (PKSCDCTHCPCPPCP), SEC. ID. nº 44 (PCSCKHTCPCPPCP), SEC. ID. nº 45 (PSCCTHTCPCPPCP), SEC. ID. nº 46 (PSCDKHCCPCPPCP), SEC. ID. nº 47 (PKSTHTCPCPPCP), SEC. ID. nº 48 (PKSCTCPCPPCP) o SEC. ID. nº 49 (PKSCDKCVECPCPPCP).

Es divulgado un ácido nucleico aislado, caracterizado por que se selecciona de los siguientes ácidos nucleicos:

- a) un ácido nucleico, ADN o ARN, que codifica una región bisagra artificial de acuerdo con la invención, su correspondiente ácido nucleico de ARN o su secuencia complementaria;
 - b) una secuencia de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEC. ID. nº 15 a SEC. ID. nº 21, SEC. ID. nº 50 a SEC. ID. nº 77, su correspondiente ácido nucleico de ARN y su secuencia complementaria; y
 - c) un ácido nucleico de por lo menos 18 nucleótidos, capaz de hibridar en condiciones de alta rigurosidad, con por lo menos una de las secuencias de SEC. ID. nº 15 a 21 y 50 a 77.
- Forma parte asimismo de la invención un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEC. ID. nº 15 a SEC. ID. nº 21, y SEC. ID. nº 50 a SEC. ID. nº 77.

Es divulgado asimismo un vector de expresión o una célula huésped transformada que comprende un ácido nucleico aislado como se describe con anterioridad, más en particular, un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEC. ID. nº 15 a SEC. ID. nº 21 y SEC. ID. nº 50 a SEC. ID. nº 77, su correspondiente ácido nucleico de ARN y su secuencia complementaria.

Los términos ácido nucleico, secuencia de ácido nucleico o nucleica, polinucleótido, oligonucleótido, secuencia de polinucleótido, secuencia de nucleótido, que se emplean de modo indistinto en la presente invención, tienen la intención de indicar una unión precisa de nucleótidos, modificados o no modificados, que permite la definición de un fragmento o de una región de un ácido nucleico, que contiene o no contiene nucleótidos no naturales, y que es capaz de corresponder tanto a un ADN de doble filamento, a un ADN de filamento simple, como a los productos de transcripción de dichos ADN.

Además, debe entenderse en la presente memoria que la presente invención no se refiere a las secuencias de nucleótidos en su entorno cromosómico natural, es decir, en el estado natural. Se refiere a secuencias que han sido aisladas o purificadas, es decir, que se han seleccionado directa o indirectamente, por ejemplo, por medio de la copia, donde su entorno ha sido al menos parcialmente modificado. Por lo tanto, tiene la intención de indicar, asimismo, los ácidos nucleicos aislados obtenidos mediante la recombinación genética, por medio de, por ejemplo, las células huéspedes, u obtenidos por medio de la síntesis química.

Una hibridación en condiciones de alta rigurosidad significa que las condiciones de temperatura y concentración iónica se seleccionan de modo tal que permiten el mantenimiento de la hibridación entre dos fragmentos de ADN complementario. A modo de ilustración, convenientemente, las condiciones de alta rigurosidad de la etapa de hibridación para los propósitos de definición de los fragmentos de polinucleótidos descritos con anterioridad son las siguientes.

La hibridación de ADN-ADN o ADN-ARN se lleva a cabo en dos etapas: (1) la prehibridación a 42°C durante 3 horas en regulador de fosfato (20 mM, pH 7,5) que contiene 5 x SSC (1 x SSC corresponde a una solución de NaCl, 0,15 M, + citrato de sodio, 0,015 M), 50% de formamida, 7% de dodecil sulfato de sodio (SDS), 10 x solución de Denhardt, 5% de sulfato de dextrano y 1% de ADN de esperma de salmón; (2) La hibridación real durante 20 horas a una temperatura que depende del tamaño de la sonda (es decir: 42°C, para un tamaño de sonda de > 100 nucleótidos), seguida de 2 lavados de 20 minutos a 20°C en 2 x SSC + 2 % de SDS, 1 lavado de 20 minutos a 20°C en 0,1 x SSC + 0,1 % de SDS. El último lavado se lleva a cabo en 0,1 x SSC + 0,1 % de SDS durante 30 minutos a 60°C, para un tamaño de sonda de > 100 nucleótidos. Las condiciones de hibridación de alta rigurosidad que se describen anteriormente para un polinucleótido de tamaño definido pueden ser adaptadas por el experto en la

materia para oligonucleótidos de mayor o menor tamaño, de acuerdo con las descripciones de Sambrook *et al.* (1989, *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2ª Ed. Cold Spring Harbor).

Es divulgado un vector que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención.

5 Son divulgados vectores de clonación y/o expresión que contienen una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la invención.

10 Los vectores contienen elementos que permiten la expresión y la secreción de las secuencias de nucleótidos traducidas en una célula huésped determinada. El vector, por lo tanto, debe contener un promotor, señales de iniciación y terminación de traducción, al igual que regiones apropiadas de regulación de la transcripción. Debe poder mantenerse de manera estable en la célula huésped y, opcionalmente, puede tener señales particulares que especifican la secreción de la proteína traducida. Estos elementos diferentes son seleccionados y optimizados por el experto en la materia, como una función de la célula huésped utilizada. A estos fines, las secuencias de nucleótidos de acuerdo con la invención pueden insertarse en vectores de replicación autónoma en el huésped seleccionado, o pueden ser vectores integrantes del huésped seleccionado.

15 Dichos vectores se preparan mediante métodos actualmente utilizados por el experto en la materia, y los clones resultantes pueden introducirse en un huésped apropiado por métodos convencionales, tales como la lipofección, electroporación, choque térmico o métodos químicos.

Los vectores son, por ejemplo, vectores de origen plásmido o viral. Son útiles para la transformación de células huéspedes a fin de clonar o expresar las secuencias de nucleótidos de acuerdo con la invención.

20 Son divulgadas células huéspedes transformadas por un vector de acuerdo con la invención, o que comprenden un vector de acuerdo con la invención.

25 La célula huésped puede seleccionarse de sistemas procariontos o eucariotos, por ejemplo, células bacterianas, si bien, asimismo, células de levaduras o células de animales, en particular, células de mamíferos. Asimismo, es posible utilizar células de insectos o células de plantas.

Otras características y ventajas de la invención serán expuestas en la descripción y en los ejemplos y las figuras, en las que:

35 Figuras 1A y 1B: Efecto de una serie de Mab anti-c-Met murinos y correspondientes quiméricos producidos como un isotipo IgG1/kappa humano sobre la fosforilación de receptor de c-Met en células A549.

40 Figura 1A: efecto agonista calculado como porcentaje en comparación con la estimulación máxima de la fosforilación de c-Met por HGF [100 ng/ml].

Figura 1B: efecto antagonista calculado como porcentaje de inhibición de la estimulación máxima de fosforilación de c-Met por HGF [100 ng/ml].



45 Figuras 2A y 2B: Comparación entre Mab 224G11 murino y Mab 224G11 quiméricos que contienen diversas regiones de bisagra genomanipuladas, sobre la fosforilación de receptor de c-Met en células A549.

Figura 2A: efecto agonista calculado como porcentaje en comparación con la estimulación máxima de fosforilación de c-Met por HGF [100 ng/ml].

50 Figura 2B: efecto antagonista calculado como porcentaje de inhibición de la estimulación máxima de fosforilación de c-Met por HGF [100 ng/ml].

Figuras 3A y 3B, 4 y 5: Dimerización de c-Met y modelos BRET de activación.

55 Figuras 6A y 6B: Reconocimiento de c-Met por formas 224G11 quiméricas y humanizadas.

60 Figuras 7A, 7B y 7C: Efecto de anticuerpos murinos y quiméricos sobre la proliferación inducida por HGF, de células NCI-H441 *in vitro*. Las células NCI-H441 se colocaron en placas libres de suero. Veinticuatro horas después de la colocación en las placas (Figura 7A), se agregaron m11E1 y [11E1] quim. (Figura 7B), m227H1 y [227H1] quim. (Figura 7C), o m224G11 y [224G11] quim., o bien en ausencia o en presencia de HGF. Las flechas negras indican los pocillos con placas de células solas, en ausencia  o en presencia  de HGF. Se introdujo un IgG1 murino (mIgG1) como un control de isotipo.

65 Figura 8: Comparación *in vivo* de Mab 224G11 murinos y quiméricos en el modelo de xenoinjerto NCI-H441.

Figuras 9A y 9B: Efecto del Mab 224G11 murino y de diversas versiones quiméricas y humanizadas de este

anticuerpo sobre la proliferación inducida por HGF, de células NCI-H441 *in vitro*. Las células NCI-H441 se colocaron en placas libres de suero. Veinticuatro horas después de la colocación en las placas, se agregaron los anticuerpos para ser evaluados, o bien en ausencia o en presencia de HGF. En el panel (Figura 9A), se muestran las versiones m224G11 murina, IgG1 quimérico [224G11] quim., IgG1 humanizado [224G11] [Hz1], [224G11] [Hz2], [224G11] [Hz3]. En el panel (Figura 9B), se presentan el m224G11 murino y diversas formas quiméricas IgG1 ([224G11] quim., [224G11] [MH quim.], [224G11] [MUP9H quim.], [224G11] [MMCH quim.], [224G11] [TH7 quim.]). Las flechas negras indican los pocillos con placas de células solas en ausencia \blacktriangleleft o en presencia \blacktriangleright de HGF. Se introdujo un IgG1 murino como un control negativo para la actividad agonista. Se usó el m5D5 como un control agonista total dependiente de la dosis.

Figura 10: Efecto del Mab 224G11 murino y de diversas versiones quiméricas y humanizadas de este anticuerpo, sobre la proliferación inducida por HGF, de células NCI-H441 *in vitro*. Las células NCI-H441 se colocaron en placas en medio libre de suero. Veinticuatro horas después de la colocación en las placas, se agregaron los anticuerpos para ser evaluados, en ausencia o en presencia de HGF. Se presentan las formas quiméricas IgG1 m224G11 murino, [224G11] quim., [224G11] [TH7 quim.]) y [224G11] [TH7 Hz1], [224G11] [TH7 Hz3]). Las flechas negras indican los pocillos con placas con células solas, o bien en ausencia \blacktriangleleft o en presencia \blacktriangleright de HGF. Se introdujo un IgG1 murino como un control negativo para la actividad agonista. Se usó el m5D5 como un control agonista total dependiente de la dosis.

Figuras 11A-11B y 12A-12B: Efecto de una serie de Mab anti-c-Met, con bisagra genomanipulada, de la invención, sobre la fosforilación de receptor de c-Met en células A549.

Figuras 11A y 11B: efecto agonista calculado como porcentaje en comparación con la estimulación máxima de fosforilación de c-Met por HGF [100 ng/ml].

Figuras 12A y 12B: efecto antagonista calculado como porcentaje de inhibición de la estimulación máxima de fosforilación de c-Met por HGF [100 ng/ml].

Figuras 13A y 13B: Dimerización de c-Met y modelos de activación BRET.

Figura 14A: efecto agonista calculado como porcentaje en comparación con la estimulación máxima de fosforilación c-Met por HGF [100 ng/ml].

Figura 14B: efecto antagonista calculado como porcentaje de inhibición de la estimulación máxima de fosforilación c-Met por HGF [100 ng/ml].

Figura 15: dimerización de c-Met y modelos de activación BRET.

Figura 16: análisis microscópico del efecto de diferentes formas de Mab 214B2 sobre la adhesión celular PC3.

Figura 17: análisis del efecto de diferentes formas de Mab 214B2 sobre la adhesión celular PC3 usando un ensayo de ATP. En cada pocillo, se determinó la cantidad de células adheridas usando una curva modelo PC3, de 0 a 200000 células/pocillo. Los resultados se presentan de la siguiente manera: las células no tratadas se toman como referencia (100%), y las células tratadas se presentan como el % de referencia.

Ejemplo 1. Construcción de Mab quiméricos y evaluación funcional del estado de fosforilación de receptor c-Met.

Se reformaron varios Mab de ratón, que apuntaban un receptor de tirosina cinasa prototípico (receptor c-Met), como Mab quiméricos que portaban dominios variables de ratón y dominios constantes humanos. Se analizaron sus actividades intrínsecas sobre la base de un ensayo funcional que controlaba la inhibición de fosforilación de receptor c-Met dependiente de ligando (HGF).

Con la clonación de PCR de secuencias de dominio variable de ratón (VH, VL), se construyeron Mab quiméricos con la ligación de un fragmento de restricción {*Nhe1-Bcl1*} que portaba o bien secuencias VH o VL de ratón, en un vector pCEP4 (InVitrogen, US) que portaba la secuencia de codificación entera del dominio constante o bien de una cadena liviana humana Ckappa o una cadena pesada humana [CH1-Bisagra-CH2-CH3] de una inmunoglobulina IgG1. Todas las etapas de clonación se efectuaron de acuerdo con técnicas de biología molecular convencionales, por ejemplo, como se describe en el manual de laboratorio (Sambrook y Russel, 2001), o de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Cada construcción genética fue completamente validada por el secuenciamiento de nucleótidos usando el equipo de secuenciamiento de ciclos de terminador Big Dye (Applied Biosystems, US), y analizada usando un instrumento de análisis 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, US). La producción de los correspondientes Mab quiméricos se efectuó empleando células HEK293 EBNA adaptadas a la suspensión (InVitrogen, US), cultivadas en medio libre de suero Excell 293 (SAFC Biosciences) suplementado con glutamina, 6 mM. Se realizó la transfección temporal usando polietilenimina lineal, 25 kDa (PEI) (Polysciences). El procedimiento de cultivo se controló sobre la base de la viabilidad celular y la producción de Mab. Se purificaron los Mab usando un

enfoque de cromatografía convencional sobre una resina de Proteína A (GE Healthcare, US).

Todas las formas diferentes de Mab se produjeron en niveles adecuados, con evaluaciones funcionales. Los niveles de productividad variaron típicamente entre 15 y 30 mg/l de Mab purificados.

Se efectuaron evaluaciones funcionales en células de cáncer de pulmón humanas A549. Se controló el estado de fosforilación del receptor c-Met en lisados celulares, usando un ensayo ELISA de captura específico. Se usó un Mab anti-c-Met de cabra (R&D, ref. AF276) como anticuerpo de captura, mientras que el anticuerpo de detección correspondió a un Mab anti-fosfo-c-Met (Biosource ref. KHO0281). Se registraron las lecturas de luminiscencia en un lector de placa de multimodo Mithras LB920 (Berthold).

Los tres Mab murinos 11E1, 224G11 y 227H1, lograron actividades intrínsecas comparables sobre la fosforilación de receptor c-Met: casi ninguna actividad agonista por sí mismos (menos de 5% de efecto HGF, Figura 1A), y una fuerte inhibición de la fosforilación de c-Met inducida por HGF [100 ng/ml] (> 70% de inhibición de efecto HGF, Figura 1B). De manera muy sorprendente, mediante la modificación exclusiva del dominio constante de Mab a fin de cambiar de un IgG1/kappa de ratón a un IgG1 kappa humano, se observó una modificación completa de las actividades intrínsecas de los Mab quiméricos resultantes (Figuras 1A-1B). De hecho, se observó fuerte agonismo (que alcanzó el 20% de efecto HGF para c11E1, Figura 1A), asociado con una disminución importante en la eficacia antagonista (donde solo quedó el 60% de inhibición del efecto HGF para c224G11, Figura 1B). Este efecto fue independiente del dominio variable del anticuerpo, ya que se observó el mismo fenómeno para los tres Mab investigados (los anticuerpos monoclonales 11E1, 224G11 y 227H1 son secretados por el hibridoma depositado en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM,) (Institut Pasteur, Paris, France) el 14/03/2007, con los números CNCM I-3724 (que corresponde a 11E1), I-3731 (que corresponde a 224G11) y I-3732 (que corresponde a 227H1) (ver la Solicitud de Patente PCT publicada con el número WO 2009/007427).

Ejemplo 2: Diseño, clonación y producción de versiones de bisagra genomanipuladas.

Sobre la base de la observación realizada anteriormente, se tiene la hipótesis de que el alterado perfil farmacológico observado con la reformación del IgG1 de ratón en Mab IgG1 humanos se debió al dominio IgG1 humano.

Por una parte, se sabía en la literatura que la activación del receptor c-Met se asociaba con su dimerización, y que la inhibición de la dimerización del receptor c-Met podía inhibir la fosforilación de c-Met y la señalización corriente descendente.

Por otra parte, los Mab son, en esencia, moléculas divalentes debido a su base estructural inherente y, en consecuencia, pueden actuar como inductores de la dimerización del receptor c-Met.

Por lo tanto, se tiene la hipótesis de que, mediante la restricción de la flexibilidad de conformación de los Mab quiméricos, por ejemplo, la rotación, el doblado o la oscilación (ver la referencia de Roux *et al.*, 1997), podría ser posible recuperar las actividades intrínsecas de interés (fuerte antagonismo y débil agonismo) de los Mab murinos progenitores. Esta hipótesis se refuerza por el análisis de las respectivas secuencias de regiones de bisagra IgG1 de ratón y humanas (también denominadas regiones IgG1 H):

Región IgG1 H de ratón	PRDCGCKPCICT	(SEC. ID. nº 1)
Región IgG1 H humana	PKSCDKTHTCPPCP	(SEC. ID. nº 11)
Región IgG2 H humana	RKCCVECPPCP	(SEC. ID. nº 7)

Esta alineación muestra que la región IgG1 H de ratón es más corta y contiene un puente de disulfuro adicional (Cys), en comparación con la región IgG1 H humana. Además, muestra que la región IgG2 H humana se asemeja a aquella de la región IgG1 H de ratón, tanto en su longitud (11 AA) como en la cantidad de puentes de disulfuro (4).

Por lo tanto, se cree que la mayor rigidez de la región IgG1 H humana podría obtenerse mediante la introducción de mutaciones estabilizadoras tales como residuos Cys, y/o mediante el acortamiento de este segmento particular. Esta mayor rigidez putativa de la región H puede asociarse con mejores propiedades funcionales del Mab IgG1 humano genomanipulado.

Se ha construido una primera serie de 7 versiones genomanipuladas (Tabla 2), preparando regiones H quiméricas con el intercambio o bien de las porciones de bisagra N-terminales o C-terminales entre secuencias de ratón y humanas. Asimismo, se efectuó la construcción de un IgG2 equivalente.

Tabla 2.

WT-IgG2	WT-IgG ₁		Variantes					
Hu-IgG ₂	Hu-IgG ₁	Mu-IgG ₁	MH -IgG ₁	MMCH -IgG ₁	MMH -IgG ₁	MUP9H -IgG ₁	MUC7H -IgG ₁	TH7CΔ6,9 -IgG ₁
-	P	P	P	P	P	P	P	P

WT-IgG2	WT-IgG ₁		Variantes					
Hu-IgG ₂	Hu-IgG ₁	Mu-IgG ₁	MH -IgG ₁	MMCH -IgG ₁	MMH -IgG ₁	MUP9H -IgG ₁	MUC7H -IgG ₁	TH7CA6,9 -IgG ₁
R	K	R	R	K	K	R	R	K
K	S	D	D	S	S	D	D	S
C	C	C	C	C	C	C	C	C
-	D	G	G	G	G	G	G	D
-	K	-	-	-	-	-	-	-
C	T	C	C	C	C	C	C	C
V	H	K	K	K	K	K	H	H
E	T	P	P	P	P	P	T	-
C	C	C	C	C	C	C	C	C
P	P	I	I	I	I	P	P	P
P	P	-	-	-	-	P	P	P
C	C	C	C	C	C	C	C	C
P	P	T	T	T	P	P	P	P

Se diseñó y se construyó una serie adicional de 28 mutantes en la región H, a fin de evaluar la influencia de, o bien la introducción de un residuo cisteína adicional dentro de la región H, o la eliminación de por lo menos un aminoácido, o la combinación simultánea de la adición de una cisteína y la eliminación de por lo menos un aminoácido dentro de la región H.

5

Esta nueva serie de mutantes de bisagra se describe en la Tabla 3.

Tabla 3

10

	#01	#02	#03	#04	#05	#06	#07	#08	#09	#10	#11	#12	#13	#14
C1	C	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P
C2	P	C	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P
C3	P	K	C	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P
C5	P	K	S	C	C	K	T	H	T	C	P	P	C	P
C6	P	K	S	C	D	C	T	H	T	C	P	P	C	P
C7	P	K	S	C	D	K	C	H	T	C	P	P	C	P
C8	P	K	S	C	D	K	T	C	T	C	P	P	C	P
C9	P	K	S	C	D	K	T	H	C	C	P	P	C	P
C11	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	C	P	C	P
C12	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	C	C	P
C14	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	C
Δ2	P	-	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P
Δ6	P	K	S	C	D	-	T	H	T	C	P	P	C	P
Δ9	P	K	S	C	D	K	T	H	-	C	P	P	C	P
Δ1-3	-	K	-	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P
Δ2-5	P	-	S	C	-	K	T	H	T	C	P	P	C	P
Δ6-9	P	K	S	C	D	-	T	H	-	C	P	P	C	P
Δ5-6	P	K	S	C	-	-	T	H	T	C	P	P	C	P
Δ8-11	P	K	S	C	D	K	T	-	T	C	-	P	C	P
Δ9-14	P	K	S	C	D	K	T	H	-	C	P	P	C	-
C7Δ6	P	K	S	C	D	-	C	H	T	C	P	P	C	P
C6Δ9	P	K	S	C	D	C	T	H	-	C	P	P	C	P
C2Δ5-7	P	C	S	C	-	K	-	H	T	C	P	P	C	P
C5Δ2-6	P	-	S	C	C	-	T	H	T	C	P	P	C	P
C9Δ2-7	P	-	S	C	D	K	-	H	C	C	P	P	C	P
Δ4-5-6	P	K	S	-	-	-	T	H	T	C	P	P	C	P
Δ5-6-7-8	P	K	S	C	-	-	-	-	T	C	P	P	C	P
IgG1/IgG2	P	K	S	C	D	K	C	V	E	C	P	P	C	P

Como un ejemplo de la genomanipulación de bisagras, se seleccionó el dominio variable (cadenas pesada y liviana) de un Mab anti-c-Met de ratón - denominado 224G11.

15 Estas secuencias de ratón se fusionaron, en un primer caso, con dominios constantes humanos [Ckappa] para la cadena liviana, y [CH1-Bisagra-CH2-CH3], para la cadena pesada IgG1 humana. La modificación de la región bisagra se efectuó mediante el intercambio de un fragmento de restricción {Nhe1-Bcl1} por la porción equivalente que portaba las modificaciones deseadas, donde cada respectivo fragmento {Nhe1-Bcl1} se sintetizó por medio de la

síntesis de genes global (Genecust, LU). Todas las nuevas mutantes de bisagra se construyeron sobre la misma base.

5 Todas las etapas de clonación se efectuaron de acuerdo con técnicas de biología molecular convencionales, como se describe en el manual de laboratorio (Sambrook y Russel, 2001), o de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Cada construcción genética fue completamente validada por el secuenciamiento de nucleótidos usando el equipo de secuenciamiento de ciclos de terminador Big Dye (Applied Biosystems, US), y se analizó empleando un equipo 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, US).

10 Las células HEK293 EBNA adaptadas a la suspensión (InVitrogen, US) se cultivaron en forma rutinaria en matraces de 250 ml en 50 ml de medio libre de suero Excell 293 (SAFC Biosciences) suplementado con glutamina, 6 mM, en una agitadora orbital (110 rpm velocidad de rotación). Se efectuó la transfección transiente con $2 \cdot 10^6$ células/ml, usando polietilenimina lineal, 25 kDa (PEI) (Polysciences), preparada en agua, en una concentración final de 1 mg/ml, ADN plásmido y mixto (concentración final de 1,25 μ g/ml, para una relación de plásmido de cadena pesada a liviana de 1:1). A las 4 horas posteriores a la transfección, el cultivo se diluyó con un volumen de medio de cultivo fresco, a fin de lograr una densidad celular final de 10^6 células/ml. El procedimiento de cultivo se controló sobre la base de la viabilidad celular y la producción de Mab. Típicamente, los cultivos se mantuvieron durante 4 a 5 días. Los Mab se purificaron empleando un enfoque de cromatografía convencional en una resina de Proteína A (GE Healthcare, US).

20 Todas las formas diferentes de Mab se produjeron en niveles adecuados, con evaluaciones funcionales. Los niveles de productividad típicamente variaron entre 15 y 30 mg/l de Mab purificados.

25 **Ejemplo 3: Evaluación de los Mab genomanipulados en un ensayo ELISA específico de fosfo-c-Met.**

30 Se sembraron células A549 en una placa de multir pocillos (MW) 12, en medio de crecimiento completo [F12K + 10% FCS]. Las células se privaron durante 16 horas antes de la estimulación con HGF [100 ng/ml], y cada Mab para ser ensayado se agregó en su concentración final de 30 μ g/ml, 15 minutos antes de la estimulación de ligando. Se agregó regulador de lisis helado 15 minutos después de la adición de HGF, a fin de detener la reacción de fosforilación. Las células se rasparon mecánicamente, y se recogieron los lisados celulares mediante la centrifugación a 13000 rpm durante 10 minutos a 4°C, que correspondieron a la fase de sobrenadante. Se cuantificó el contenido de proteína empleando un equipo BCA kit (Pierce), y se realizó el almacenamiento a -20°C hasta el uso. Se cuantificó el estado de fosforilación de c-Met por ELISA. Se usó un Mab de cabra anti-c-Met (R&D, ref. AF276) como un anticuerpo de captura (revestimiento durante la noche a 4°C), y después de una etapa de saturación con un regulador al 5% de TBS-BSA (1 hora a temperatura ambiente (TA)), se agregaron 25 μ g de lisados de proteína a cada pocillo de la placa 96MW revestida. Luego de una incubación de 90 minutos a TA, las placas se lavaron cuatro veces, y se agregó el anticuerpo de detección (Mab anti-fosfo-c-Met, dirigido contra los residuos Tyr fosforilados en las posiciones 1230, 1234 y 1235). Luego de una incubación adicional de 1 hora y de 4 lavados, se agregó un anticuerpo anticonejo acoplado a HRP (Biosource) durante un período de tiempo de 1 hora a TA, y se efectuó la detección de luminiscencia mediante la adición de Luminol. Las lecturas de luminiscencia se realizaron en un lector de placa de multimodo Mithras LB920 (Berthold).

45 Se construyó una serie de versiones genomanipuladas del dominio de bisagra de cadena pesada, y se ensayó en el ensayo de fosforilación de receptor c-Met. Como se muestra en la Figura 2A, en comparación con 224G11[IgG1-Quim], se observó una importante reducción del efecto agonista asociado con el isotipo hlgG1/kappa, tanto para la construcción sobre la base de IgG2 como para algunas construcciones genomanipuladas IgG1/kappa [MH, MUP9H y TH7, Figura 2A]. Se obtuvieron actividades de agonismo más débiles y comparables, con 224G11[MH-IgG1], que contenía una región bisagra IgG1 completamente murina, y con 224G11[TH7], que contenía la región bisagra IgG1 genomanipulada más humana. Se obtuvo además un incremento concomitante en la eficacia antagonista [Figura 2B]. En consecuencia, tanto la mutante de bisagra TH7 sobre la base de IgG2 como aquella sobre la base de hlgG1/kapa genomanipulada asociada con el dominio variable 224G11 murino lograron actividades funcionales casi similares a aquella del Mab de ratón 224G11. Sin embargo, la comparación de las actividades agonistas/antagonistas de 224G11[MMCH-IgG1-quim] con 224G11[IgG1-quim] demostró que pudo obtenerse una actividad antagonista mayor por medio de la genomanipulación de anticuerpo, sin consideración de las propiedades agonistas intrínsecas de dicho anticuerpo.

60 Se construyó una segunda serie de versiones genomanipuladas del dominio de bisagra de cadena pesada, y se ensayó en el ensayo de fosforilación de receptor c-Met. Como se muestra en la Figura 11A, la sustitución de aminoácidos en el dominio de bisagra de cadena pesada para la introducción de residuo cisteína modificó el efecto agonista de los anticuerpos. De hecho, por una parte, algunas versiones mutadas exhibieron efecto agonista más débil que c224G11, por ejemplo, c224G11[C2], c224G11[C3], c224G11[C5], c224G11[C6] o c224G11[C7], mientras que otras incrementaron el efecto agonista, como c224G11[C11], c224G11[C12] y c224G11[C14]. Asimismo, las deleciones de aminoácidos en el dominio de bisagra de cadena pesada, asociadas o no con sustituciones de aminoácidos, modificaron también las propiedades agonistas de los anticuerpos [Figura 11B]. Por ejemplo, c224G11[Δ1-3], c224G11[Δ4-5-6], c224G11[Δ5-6-7-8], c224G11[C7Δ6], c224G11[C6Δ9], c224G11[C2Δ5-7], c224G11[C5Δ2-6] o c224G11[C9Δ2-7] mostraron un efecto agonista más débil que c224G11, mientras que

c224G11[Δ8-11] exhibió un efecto agonista más fuerte. Como c224G11[TH7], todas las nuevas versiones que exhibían un efecto agonista más débil mostraron un incremento concomitante en la eficacia antagonista [Figuras 12A y 12B], mientras que aquellas que exhibían un efecto agonista mayor tuvieron una eficacia antagonista más débil.

5 En la presente solicitud, el uso de corchetes no es necesario; como ejemplo, la referencia [224G11][IgG2quim] debe considerarse idéntica a 224G11IgG2quim. Del mismo modo, a fin de indicar que el anticuerpo es un anticuerpo murino, pueden agregarse el término "murino" o la letra m; para indicar que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, pueden agregarse el término quim ("*chim*") o la letra c; y para indicar que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado, pueden agregarse el término "hum" o la letra h. Como ejemplo, el anticuerpo quimérico 224G11IgG2 puede denominarse c224G11IgG2, c224G11[IgG2], c[224G11]IgG2, c[224G11][IgG2], 224G11IgG2quim, 224G11[IgG2quim], [224G11]IgG2quim o [224G11][IgG2quim].

El símbolo Δ significa eliminación.

15 **Ejemplo 4: Análisis BRET.**

En un primer grupo de experimentos, se controló que IgG1 de ratón, IgG1 humano e IgG2 humano irrelevantes no tuvieran efecto de señal BRET inducida por HGF, en ambos modelos BRET (Figura. 3). Dichos Mab se usaron adicionalmente como controles.

20 Se evaluó entonces el efecto de formas quiméricas IgG1 de Mab 224G11 de ratón ([224G11] quim), Mab 11E1 de ratón ([11E1] quim) y Mab 227H1 de ratón ([227H1] quim) sobre la dimerización de c-Met y el modelo BRET de activación c-met.

25 Si bien Mab 224G11 de ratón inhibió el 59% de la señal BRET inducida por HGF sobre el modelo de dimerización de c-Met, Mab [224G11] quim inhibió solo el 29% (Figura 4). El anticuerpo [224G11] quim también fue menos eficaz en la inhibición de la activación de c-Met inducida por HGF, ya que los anticuerpos [224G11] quim y m224G11 inhibieron 34,5% y 56,4% de la señal BRET inducida por HGF (Figura 5). Además, m224G11 solo no tuvo efecto sobre la activación de c-Met, mientras que [224G11] quim tuvo un efecto agonista parcial sobre la activación de c-Met que correspondió al 32,9% de la señal inducida por HGF. Este efecto agonista parcial del [224G11] quim también se observó en el modelo BRET de dimerización de c-Met, ya que [224G11] quim solo indujo un incremento BRET que correspondió al 46,6% de señal inducida por HGF, en comparación con 21,3%, para m224G11.

35 La eficacia agonista de la segunda serie de versiones genomanipuladas del dominio de bisagra de cadena pesada se evaluó en el modelo BRET de activación de c-Met (Figuras 13A y 13B). En contraste a c224G11, que tuvo un efecto agonista parcial sobre la activación de c-Met, diferentes formas quiméricas mutadas de bisagra de anticuerpo 224G11 que comprendían sustitución de aminoácidos, eliminación de aminoácidos, o ambas, no mostraron efecto significativo sobre la activación de c-Met sola para c224G11[C2], c224G11[C3], c224G11[C5], c224G11[C6], c224G11[C7], c224G11[Δ1-3], c224G11[Δ4-5-6], c224G11[Δ5-6-7-8], c224G11[C7Δ6], c224G11[C6Δ9], c224G11[C2Δ5-7], c224G11[C5Δ2-6] o c224G11[C9Δ2-7], respectivamente. En contraste, otras formas quiméricas mutadas de bisagra mostraron mayor efecto agonista, como c224G11[Δ6], c224G11[C11], c224G11[C12] y c224G11[C14].

45 **Ejemplo 5: Reconocimiento de c-Met por formas 224G11 quiméricas y humanizadas.**

Se ha establecido un ensayo ELISA directo a fin de determinar la capacidad de unión de las diversas formas quiméricas y humanizadas, sobre c-Met recombinado. Brevemente, se recubrieron placas de 96 pocillos Immulon II con c-Met dímero recombinado, de R&D Systems, en una concentración de 1,25 μg/ml. Después de la incubación durante la noche a 4°C, los pocillos fueron saturados con una solución de 0,5% de gelatina/PBS. Las placas entonces se incubaron durante 1 hora a 37°C, antes de la adición de diluciones dobladas de anticuerpos para ser ensayados. Las placas se incubaron una hora adicional, antes de la adición de un IgG antirratón de cabra HRP para la detección del anticuerpo murino, y una cadena liviana Kappa antihumana de cabra HRP, para el reconocimiento de anticuerpo quimérico y humanizado. Las placas se incubaron durante una hora, y se agregó el sustrato de peroxidasa TMB Uptima 5 mn antes de la neutralización con H₂SO₄, 1 M. Los resultados que se presentan en las Figuras 6A y 6B mostraron que todas las formas ensayadas fueron comparables para el reconocimiento de c-Met.

55 **Ejemplo 6: Efecto de anticuerpos murinos y quiméricos sobre la proliferación inducida por HGF, de células NCI-H441 *in vitro*.**

60 Se cultivaron de manera rutinaria células NCI-H441 de ATCC, en medio RPMI 1640 (Invitrogen Corporation, Scotland, UK), 10% de FCS (Invitrogen Corporation), 1% de L-Glutamina (Invitrogen Corporation). Para los ensayos de proliferación, las células se dividieron tres días antes del uso, para encontrarse en la fase confluyente de crecimiento, antes de la colocación en las placas. Las células NCI-H441 se colocaron en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos a una densidad de 3,75 x 10⁴ células/pocillo, en 200 μl de medio libre de suero (medio RPMI 1640 más 1% de L-Glutamina). Veinticuatro horas después de la colocación en las placas, se agregaron los anticuerpos para ser ensayados a NCI-H441 y se incubaron a 37°C durante 30 minutos, antes de agregar HGF en una

65

concentración final de 400 ng/ml (5 nM), durante 142 horas adicionales. El intervalo de dosis ensayado para cada anticuerpo fue de 10 a 0,0097 µg/ml (concentración final en cada pocillo). En este experimento, se agregó un Mab IgG1 murino como un control de isotipo murino, y los anticuerpos ensayados fueron los siguientes: m224G11, m11E1, m227H1 y sus formas quiméricas IgG1 humanas, respectivamente, identificadas como [224G11] quim, [11E1] quim y [227H1] quim. Se incluyeron también pocillos de placas con células solas +/- HGF. A continuación, las células se pulsaron con 0,25 µCi de [³H]Timidina (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden) durante 7 horas 30 minutos. La magnitud de [³H]Timidina incorporada en ácido tricloroacético-ADN insoluble se cuantificó por medio del recuento de centelleo líquido. Los resultados se expresan como información cpm no transformada a fin de evaluar mejor la potencial actividad agonista intrínseca que pudo producirse con Mab anti-c-Met agregados solos a células tumorales.

Los resultados descritos en las Figuras 7A, 7B y 7C demostraron que, como se esperaba, los anticuerpos murinos no exhibieron efecto agonista cuando se agregaron solos a células neoplásicas, sin consideración de la dosis ensayada. No se observó inhibición significativa de la proliferación inducida por HGF, con el isotipo de control, con respecto a las altas variaciones de cpm observadas para este control de isotipo en este experimento. Cuando se agregó solo, ni m224G11 murino ni m11E1 o m227H1 mostraron efecto agonista, en comparación con el Mab de control de isotipo mIgG1 o células solas. Las actividades antiproliferativas dependientes de la dosis que alcanzaron el 78%, 80% u 80% fueron, respectivamente, para Mab m224G11, m11E1 o m227H1 (cálculo de % de inhibición: $100 - [(cpm \text{ células} + \text{Mab para ser ensayado} - \text{media cpm fondo mIgG1}) \times 100 / (\text{media cpm células} + \text{HGF} - \text{media cpm células solas})]$). Sorprendentemente, la forma quimérica de estos tres Mab indujo un efecto agonista significativo dependiente de la dosis, cuando se agregó sola con estimulaciones de crecimiento cercanas a aquella observada con HGF para [11E1] quim y [227H1] quim, respectivamente. Para estos dos anticuerpos que exhibían actividades agonistas intrínsecas particularmente altas, el efecto antagonista disminuyó de manera significativa, con 53% y 21% de efectos inhibitorios, en comparación con el 80% observado para sus ambas formas murinas. El efecto agonista observado con el quimérico [224G11] quim también fue dependiente de la dosis, si bien fue inferior a aquellos observados para [11E1] quim y [227H1] quim. Sin embargo, este efecto agonista tuvo un impacto sobre la inhibición *in vitro* de la proliferación inducida por HGF, que cambió de 78% para el m224G11 murino, al 50%, para su forma quimérica. A fin de determinar si dicha actividad agonista intrínseca *in vitro* "menor" era compatible con un efecto no cambiado *in vivo*, se produjeron tanto m224G11 como [224G11] quim para el ensayo *in vivo*. Como en estudios previos, la dosis de 30 µg/ratón había demostrado una actividad significativa *in vivo*, se seleccionó dicha dosis para la evaluación *in vivo*.

Ejemplo 7: Comparación *in vivo* de Mab murinos y quiméricos 224G11 sobre el modelo de xenoinjerto NCI-H441.

NCI-H441 deriva de adenocarcinoma pulmonar papilar, expresa altas concentraciones de c-Met, y demuestra fosforilación constitutiva de c-Met RTK.

A fin de evaluar el efecto *in vivo* de anticuerpos sobre el modelo de xenoinjerto NCI-H441, se alojaron ratones atómicos de seis a ocho semanas de edad en jaulas esterilizadas con la parte superior de filtro, se mantuvieron en condiciones estériles y se manipularon de acuerdo con las pautas francesas y europeas. Se inyectaron los ratones por vía subcutánea 9×10^6 células. A continuación, seis días después de la implantación de células, los tumores podían medirse (aproximadamente 100 mm³), y los animales se dividieron en grupos de seis ratones con tamaños de tumor comparables, y se trataron, en primer lugar, con una dosis de carga de 60 µg de anticuerpo/ratón, y luego, dos veces por semana, con 1 mg/dosis de cada anticuerpo para ser ensayado. Los ratones se siguieron para la observación del índice de crecimiento de xenoinjerto. Se calculó el volumen tumoral mediante la fórmula: $\pi (Pi)/6 \times \text{longitud} \times \text{ancho} \times \text{altura}$. Los resultados descritos en la Figura 8 demuestran que el Mab murino privado de actividad agonista *in vivo* se comportó, como se esperaba, como un potente antagonista, aun en la baja dosis ensayada. En contraste a lo observado con el Mab murino, el Mab quimérico exhibió una actividad *in vivo* muy transitoria, y el tumor evadió por completo el tratamiento al Día 20 luego de la inyección de células. Este experimento demuestra claramente que el incremento de efecto agonista *in vitro* que logró una disminución de la actividad antagonista también fue responsable de una pérdida significativa *in vivo* de actividad antagonista.

Ejemplo 8: Efecto del Mab 224G11 murino y de diversas versiones quiméricas y humanizadas de este anticuerpo, sobre la proliferación inducida por HGF, de células NCI-H441 *in vitro*.

Se cultivaron en forma rutinaria células NCI-H441 de ATCC, en medio RPMI 1640 (Invitrogen Corporation, Scotland, UK), 10% de FCS (Invitrogen Corporation), 1% de L-Glutamina (Invitrogen Corporation). Para los ensayos de proliferación, las células se dividieron tres días antes del uso, para encontrarse en la fase confluyente de crecimiento, antes de la colocación en las placas. Las células NCI-H441 se colocaron en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos a una densidad de $3,75 \times 10^4$ células/pocillo, en 200 µl de medio libre de suero (medio RPMI 1640 más 1% de L-Glutamina). Veinticuatro horas después de la colocación en las placas, se agregaron los anticuerpos para ser ensayados a NCI-H441 y se incubaron a 37°C durante 30 minutos, antes de agregar HGF en una concentración final de 400 ng/ml (5 nM), durante 142 horas adicionales. El intervalo de dosis ensayado para cada anticuerpo fue de 10 a 0,0097 µg/ml (concentración final en cada pocillo). En este experimento, se agregó Mab IgG1 murino como un control de isotipo murino, y como un control negativo agonista. Los anticuerpos ensayados fueron los siguientes: i)

m224G11, ii) sus formas quiméricas IgG1 humanas, identificadas, respectivamente, como [224G11] quim, [224G11] [MH quim], [224G11] [MUP9H quim], [224G11] [MMCH quim], [224G11] [TH7 quim], iii) sus formas IgG1 humanizadas, respectivamente, descritas como [224G11] [Hz1], [224G11] [Hz2], [224G11] [Hz3]. Se incluyeron también pocillos de placas con células solas +/- HGF. El anticuerpo entero 5D5 de Genentech, que puede obtenerse en el mercado en la ATCC, como una estirpe celular de hibridoma, se introdujo como un control positivo agonista total, y luego se denominó m5D5. A continuación, las células se pulsaron con 0,25 μ Ci de [³H]Timidina (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden) durante 7 horas 30 minutos. La magnitud de [³H]Timidina incorporada en ácido tricloroacético-ADN insoluble se cuantificó por medio del recuento de centelleo líquido. Los resultados se expresan como información cpm no transformada a fin de evaluar mejor la potencial actividad agonista intrínseca que pudo producirse con Mab anti-c-Met agregados solos a células tumorales.

Los resultados descritos en la Figura 9A demostraron que, como se esperaba, ni el control de isotipo ni el m224G11 exhibieron ninguna actividad agonista sobre la proliferación de NCI-H441. El control de isotipo no tuvo efecto sobre la proliferación celular inducida por HGF, mientras que m224G11 mostró una inhibición del 66%, cuando se agregó en la concentración final de 10 μ g/ml. El m5D5 utilizado como un control agonista mostró, como se esperaba, un efecto agonista dependiente de la dosis total, cuando se agregó solo a las células. Como ya se observó, el Mab [224G11] quim exhibió un efecto agonista dependiente de la dosis significativo, y se observó una menor actividad inhibitoria de esta forma quimérica: 19% en lugar de 66% para la forma murina. Cuando se agregaron solos, los tres Mab humanizados IgG1 demostraron efectos agonistas dependientes de la dosis, en comparación con la forma m224G11. [224G11] [Hz1], [224G11] [Hz2] y [224G11] [Hz3] tuvieron actividades antagonistas comparables de aproximadamente 46, 30 y 35%. Estas actividades son significativamente inferiores a aquella observada para m224G11. En la Figura 9B, se ensayaron diversas formas quiméricas IgG1. En comparación con la forma [224G11] quim, que exhibió un efecto agonista dependiente de la dosis cuando se agregó solo a células NCI-H441, las formas [224G11] [MH quim], [224G11] [MUP9H quim], [224G11] [MMCH quim], [224G11] [TH7 quim] no tuvieron efecto agonista intrínseco significativo. Su actividad antagonista fue superior a la observada para el Mab m224G11 (57%), con inhibiciones que alcanzaron 79, 78, 84 y 93%, respectivamente, para [224G11] [MH quim], [224G11] [MUP9H quim], [224G11] [MMCH quim] y [224G11] [TH7 quim].

Ejemplo 9: Efecto *in vitro* de diversas formas IgG1 quiméricas y humanizadas del Mab 224G11.

Se cultivaron de manera rutinaria células NCI-H441 de ATCC, en medio RPMI 1640 (Invitrogen Corporation, Scotland, UK), 10% de FCS (Invitrogen Corporation), 1% de L-Glutamina (Invitrogen Corporation). Para los ensayos de proliferación, las células se dividieron tres días antes del uso, de modo de encontrarse en la fase confluyente de crecimiento, antes de la colocación en las placas. Las células NCI-H441 se colocaron en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos a una densidad de $3,75 \times 10^4$ células/pocillo, en 200 μ l de medio libre de suero (medio RPMI 1640 más 1% de L-Glutamina). Veinticuatro horas después de la colocación en las placas, se agregaron los anticuerpos para ser ensayados a NCI-H441 y se incubaron a 37°C durante 30 minutos, antes de agregar HGF en una concentración final de 400 ng/ml (5 nM), durante 142 horas adicionales. El intervalo de dosis ensayado para cada anticuerpo fue de 10 a 0,0097 μ g/ml (concentración final en cada pocillo). En este experimento, se agregó Mab IgG1 murino como un control negativo de fondo para la actividad agonista, y los anticuerpos ensayados fueron los siguientes: i) m224G11, ii) sus formas quiméricas IgG1 humanas, identificadas, respectivamente, como [224G11] quim, [224G11] [TH7 quim], iii) sus formas IgG1 humanizadas, respectivamente, descritas como [224G11] [TH7 Hz1], [224G11] [TH7 Hz3]. Se incluyeron también pocillos de placas con células solas +/- HGF. El anticuerpo entero 5D5 de Genentech, que puede obtenerse en el mercado en la ATCC, como una estirpe celular de hibridoma, se introdujo como un control positivo agonista total, y luego se denominó m5D5. A continuación, las células se pulsaron con 0,25 μ Ci de [³H]Timidina (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden) durante 7 horas 30 minutos. La magnitud de [³H]Timidina incorporada en ácido tricloroacético-ADN insoluble se cuantificó por medio del recuento de centelleo líquido. Los resultados se expresan como información cpm no transformada a fin de evaluar mejor la potencial actividad agonista intrínseca que pudo producirse con Mab anti-c-Met agregados solos a células tumorales.

La figura 10 muestra que Mab m224G11 exhibió el efecto inhibitorio habitual (74% de inhibición). La forma IgG1 quimérica [224G11] quim tuvo, como se esperaba, un efecto agonista intrínseco dependiente de la dosis, y un menor efecto antagonista, en comparación con la forma murina: 33% en comparación con 74% de inhibición. El [224G11] [TH7 quim] tuvo una actividad agonista muy débil en este experimento. Además, exhibió un alto efecto inhibitorio (81%), cercano a aquel observado para el Mab murino. Las dos formas humanizadas no tuvieron efecto agonista intrínseco, y tuvieron una actividad antagonista cercana a aquellas observadas para el Mab murino o el [224G11] [TH7 quim], respectivamente, con 67 y 76% de inhibición para [224G11] [TH7 Hz1] y [224G11] [TH7 Hz3].

Ejemplo 10: Cambio de isotipo para la región bisagra [TH7] genomanipulada.

A fin de evaluar la modulación de las propiedades farmacológicas inducida por la secuencia de bisagra [TH7], que corresponde a PKSCDCHPCPP, en esqueletos de isotipos de inmunoglobulina diferentes del IgG1 humano, se transfiere genéticamente la secuencia [TH7] descrita anteriormente a esqueletos de IgG2 e IgG4 humanos. La modificación de la región bisagra se efectuó mediante el intercambio de un fragmento de restricción {Nhe1-Bcl1} por la porción equivalente que portaba la modificación [TH7], donde el fragmento {Nhe1-Bcl1} fue sintetizado por medio de la síntesis genética global (Genecust, LU). Las etapas de clonación se llevaron a cabo de acuerdo con técnicas

de biología molecular convencionales, como se describen en el manual de laboratorio (Sambrook y Russel, 2001), o de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Cada construcción genética fue validada por completo por el secuenciamiento de nucleótidos, usando el equipo de secuenciamiento de ciclos de terminador Big Dye (Applied Biosystems, US), y analizada usando un instrumento de análisis 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, US).
 5 Las secuencias resultantes se describen como SEC. ID. nº: 78; 79; 80 y 81, para, respectivamente, las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de los isotipos IgG2 e IgG4 humanos genomanipulados con TH7 (solo cadena pesada; la cadena liviana fue idéntica a la c224G11/humana Ckappa utilizada para todas las otras construcciones a base de IgG1). Estas nuevas construcciones se aplicaron al Mab anti-c-Met 224G11 quimérico, tal como se describe con anterioridad en el Ejemplo 2.

10 Los correspondientes anticuerpos genomanipulados, c224G11[IgG2TH7] y c224G11[IgG4TH7] se produjeron como se describe con anterioridad, mediante la expresión temporal en células EBNA HEK293 adaptadas a la suspensión.

15 **Ejemplo 11: Evaluación de los Mab genomanipulados c224G11[IgG2TH7] y c224G11[IgG4TH7] en un ensayo ELISA específico de fosfo-c-Met y un ensayo BRET.**

20 La bisagra TH7 también se introdujo en Mab 224G11 quiméricos IgG2 e IgG4 y se evaluó en el ensayo de fosforilación de receptor c-Met. Como se muestra en las figuras 14A y 14B, c224G11[IgG2TH7] y c224G11[IgG4TH7] indujeron un leve efecto agonista solos, si bien significativamente más débil que el Mab c224G11, y exhibieron un efecto antagonista comparable con la forma murina de Mab 224G11 (m224G11). Este resultado fue confirmado en el modelo BRET de activación de c-Met (figura 15), donde c224G11[IgG2TH7] y c224G11[IgG4TH7] mostraron también un efecto agonista más débil que Mab c224G11.

25 En consecuencia, la mutación de bisagra TH7 introducida en el formato de Mab IgG2 o IgG4 proporcionó anticuerpos funcionales con propiedades similares a c224G11[TH7].

Ejemplo 12: Ensayo de adhesión celular.

30 Se desprendieron células de cáncer de próstata PC3 de los discos, con tripsina, se lavaron tres veces con medio F12k libre de suero, y se resuspendieron en el mismo medio. Las células (100.000 células/pocillo) se colocaron en placas de 96 pocillos revestidas con laminina 1, en una concentración de 1 µg/ml. Se agregaron simultáneamente las siguientes formas del Mab anti-CD151 para evaluar, en la concentración final de 10 µg/ml: el Mab IgG1 murino m214B2, la forma de anticuerpo IgG1 quimérico no modificado denominada c214B2, y la forma de anticuerpo IgG1 quimérico con la modificación TH7 denominada cTH7-214B2.

35 La CD151 es una proteína de membrana que pertenece a la familia de tetraspaninas, y el Mab anti-CD151 214B2, producido por el hibridoma I-3919, presentado en la CNCM el 21 de febrero de 2008, se describe en la solicitud de patente publicada WO 2009/136070.

40 Se usaron los anticuerpos IgG1 murinos y humanos como anticuerpos de control de isotipo. Las condiciones finales fueron las siguientes: 100.000 células/pocillo, y anticuerpos en concentraciones de 10 µg/ml. Después de una hora de incubación a 37°C, las placas se sacudieron y se lavaron dos veces con medio F12k libre de suero. Antes del análisis, se distribuyeron 100 µl de medio F12k libre de suero en cada pocillo. A fin de evaluar el efecto de los anticuerpos sobre la adhesión celular, los pocillos se fotografiaron bajo un microscopio de contraste de fases (figura 16). A continuación, se determinó la cantidad de células adheridas usando un ensayo de ATP (figura 17).

50 Los anticuerpos TH7-214B2 quimérico y 214B2 murino fueron capaces de modificar las interacciones de célula a célula (figura 16) y de incrementar la adhesión celular PC3 de manera equivalente (figura 17), mientras que no se observó ningún efecto con la forma quimérica no modificada de 214B2 (c214B2), comparable con el anticuerpo de control de isotipo IgG1 humano.

Listado de secuencias

55 <110> PIERRE FABRE MEDICAMENT
Liliane, GOETSCH
Thierry, WURCH

60 <120> Procedimiento para la modulación de la actividad antagonista de un anticuerpo monoclonal

<130> D27128

<150> IB2008/055664

<151> 02-12-2008

65 <150> US 61/184406

<151> 05-06-2009

<160> 81
 <170> PatentIn version 3.3
 5 <210> 1
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 10 <223> región bisagra modificada artificial
 <400> 1
 Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr
 15 1 5 10
 <210> 2
 <211> 12
 <212> PRT
 20 <213> artificial
 <220>
 <223> región bisagra modificada artificial
 25 <400> 2
 Pro Lys Ser Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr
 30 1 5 10
 <210> 3
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> artificial
 35 <220>
 <223> región bisagra modificada artificial
 <400> 3
 40 Pro Lys Ser Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Pro
 1 5 10
 <210> 4
 <211> 13
 45 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> región bisagra modificada artificial
 50 <400> 4
 Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Pro Pro Cys Pro
 55 1 5 10
 <210> 5
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> artificial
 60 <220>
 <223> región bisagra modificada artificial
 <400> 5
 65 Pro Arg Asp Cys Gly Cys His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10
 <210> 6
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> artificial
 70 <220>
 <223> región bisagra modificada artificial
 75 <400> 6

ES 2 600 254 T3

<400> 6
 Pro Lys Ser Cys Asp Cys His Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10
 5
 <210> 7
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 10
 <400> 7
 Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10
 15
 <210> 8
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 20
 <400> 8
 Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser
 1 5 10 15
 25
 Pro Ser
 <210> 9
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 30
 <400> 9
 Pro Pro Pro Pro Pro
 1 5
 35
 <210> 10
 <211> 56
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 40
 <400> 10
 45
 Ser Pro Lys Ala Gln Ala Ser Ser Val Pro Thr Ala Gln Pro Gln Ala
 1 5 10 15
 50
 Glu Gly Ser Leu Ala Lys Ala Thr Thr Ala Pro Ala Thr Thr Arg Asn
 20 25 30
 Thr Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys Glu Lys Glu Glu Gln
 35 40 45
 55
 Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro
 50 55
 <210> 11
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 60
 <400> 11
 65
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10
 <210> 12
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 70
 <400> 12
 75
 Leu Lys Thr Pro Leu Phe Thr Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg
 1 5 10 15

ES 2 600 254 T3

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
 20 25 30
 5 Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
 35 40 45
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
 50 55 60
 10 <210> 13
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 15 <400> 13
 Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro
 1 5 10
 20 <210> 14
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> mus musculus
 25 <400> 14
 Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr
 1 5 10
 30 <210> 15
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 35 <220>
 <223> región bisagra modificada artificial
 <400> 15
 40 ccccgggact gtgggtgcaa gccttgatt tgtacc 36
 <210> 16
 <211> 36
 45 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> región bisagra modificada artificial
 50 <400> 16
 cccaagact gtgggtgcaa gccttgatt tgtacc 36
 55 <210> 17
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 60 <220>
 <223> región bisagra modificada artificial
 <400> 17
 65 ccaaagact gcggctgcaa gccttgatc tgtccc 36
 <210> 18
 <211> 39
 <212> ADN
 70 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> región bisagra modificada artificial
 75 <400> 18

ccacgggact gtggctgcaa gccctgccct ccggtgccca 39

5 <210> 19
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> región bisagra modificada artificial
 <400> 19

cccagagact gtgggtgtca cacctgccct cctgtgccct 39

15 <210> 20
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

20 <220>
 <223> región bisagra modificada artificial
 <400> 20

25 cccaaaagct gcgattgccca ctgtcctcca tgtcca 36

30 <210> 21
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> homo sapiens

<400> 21

35 aggaagtgct gtgtggagtg cccccctgc cca 33

40 <210> 22
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> artificial

45 <220>
 <223> región bisagra modificada artificial
 <400> 22

Cys Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

50 <210> 23
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> artificial

55 <220>
 <223> región bisagra modificada artificial
 <400> 23

60 Pro Cys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

65 <210> 24
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> artificial

70 <220>
 <223> región bisagra modificada artificial
 <400> 24

Pro Lys Cys Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

75 <210> 25
 <211> 14

ES 2 600 254 T3

<212> PRT
 <213> artificial

 <220>
 5 <223> región bisagra modificada artificial
 <400> 25

 10 Pro Lys Ser Cys Cys Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10
 <210> 26
 <211> 14
 <212> PRT
 15 <213> artificial
 <220>
 <223> región bisagra modificada artificial
 20 <400> 26

 Pro Lys Ser Cys Asp Cys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10
 25 <210> 27
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> artificial
 30 <220>
 <223> región bisagra modificada artificial
 <400> 27
 35 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Cys His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10
 <210> 28
 <211> 14
 40 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> región bisagra modificada artificial
 45 <400> 28

 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr Cys Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10
 50 <210> 29
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> artificial
 55 <220>
 <223> región bisagra modificada artificial
 <400> 29
 60 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Cys Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10
 <210> 30
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> artificial
 65 <220>
 <223> región bisagra modificada artificial
 <400> 30
 70 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Cys Pro Cys Pro
 1 5 10
 75

ES 2 600 254 T3

<210> 31
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> artificial
 5
 <220>
 <223> región bisagra modificada artificial
 <400> 31
 10
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Cys Cys Pro
 1 5 10
 <210> 32
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> artificial
 15
 <220>
 <223> región bisagra modificada artificial
 20
 <400> 32
 25
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Cys
 1 5 10
 <210> 33
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> artificial
 30
 <220>
 <223> región bisagra modificada artificial
 35
 <400> 33
 Pro Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10
 40
 <210> 34
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> artificial
 45
 <220>
 <223> región bisagra modificada artificial
 <400> 34
 50
 Pro Lys Ser Cys Asp Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10
 <210> 35
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> artificial
 55
 <220>
 <223> región bisagra modificada artificial
 60
 <400> 35
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10
 65
 <210> 36
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> artificial
 70
 <220>
 <223> región bisagra modificada artificial
 <400> 36
 75
 Lys Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

ES 2 600 254 T3

Pro Lys Ser Cys Asp Cys His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

5 <210> 43
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <220>
 <223> región bisagra modificada artificial
 <400> 43

15 Pro Lys Ser Cys Asp Cys Thr His Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

20 <210> 44
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> artificial

25 <220>
 <223> región bisagra modificada artificial
 <400> 44

30 Pro Cys Ser Cys Lys His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

35 <210> 45
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> artificial

40 <220>
 <223> región bisagra modificada artificial
 <400> 45

45 Pro Ser Cys Cys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

50 <210> 46
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> artificial

55 <220>
 <223> región bisagra modificada artificial
 <400> 46

60 Pro Ser Cys Asp Lys His Cys Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

65 <210> 47
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> artificial

70 <220>
 <223> región bisagra modificada artificial
 <400> 47

75 Pro Lys Ser Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

80 <210> 48
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> artificial

85 <220>
 <223> región bisagra modificada artificial

<400> 48
 5 Pro Lys Ser Cys Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10
 <210> 49
 <211> 14
 <212> PRT
 10 <213> artificial
 <220>
 <223> región bisagra modificada artificial
 15 <400> 49
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10
 20 <210> 50
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> artificial
 25 <220>
 <223> región bisagra modificada artificial
 <400> 50
 30 tgcaagagct gcgacaagac ccacacctgt cccccctgcc ct 42
 <210> 51
 <211> 42
 <212> ADN
 35 <213> artificial
 <220>
 <223> región bisagra modificada artificial
 40 <400> 51 42
 cctgcagct gcgacaagac ccacacctgt cccccctgcc ct
 <210> 52
 <211> 42
 45 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> región bisagra modificada artificial
 50 <400> 52
 cccaagtgct gcgacaagac ccacacctgt cccccctgcc ct 42
 55 <210> 53
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> artificial
 60 <220>
 <223> región bisagra modificada artificial
 <400> 53
 65 cctaagagct gttgcaagac ccacacctgt cccccctgcc ct 42
 <210> 54
 <211> 42
 <212> ADN
 70 <213> artificial
 <220>
 <223> región bisagra modificada artificial
 75 <400> 54

	cccaagagct gcgactgcac ccacacctgt cccccctgcc ct	42
	<210> 55	
	<211> 42	
5	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
10	<223> región bisagra modificada artificial	
	<400> 55	
	cccaagagct gcgacaagtg ccacacctgt cccccctgcc ct	42
15	<210> 56	
	<211> 42	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
20	<220>	
	<223> región bisagra modificada artificial	
	<400> 56	
25	cccaagagct gcgacaagac ctgtacctgt cccccctgcc ct	42
	<210> 57	
	<211> 42	
30	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> región bisagra modificada artificial	
35	<400> 57	
	cccaagagct gcgacaagac ccactgctgt cccccctgcc ct	42
40	<210> 58	
	<211> 42	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
45	<220>	
	<223> región bisagra modificada artificial	
	<400> 58	
50	cccaagagct gcgacaagac ccacacctgt tgcccctgcc ct	42
	<210> 59	
	<211> 42	
	<212> ADN	
55	<213> artificial	
	<220>	
	<223> región bisagra modificada artificial	
	<400> 59	
60	cccaagagct gcgacaagac ccacacctgt ccctgctgcc ct	42
	<210> 60	
	<211> 42	
65	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
70	<223> región bisagra modificada artificial	
	<400> 60	
	cccaagagct gcgacaagac ccacacctgt cccccctgct gc	42
75	<210> 61	
	<211> 39	

<212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 5 <223> región bisagra modificada artificial
 <400> 61
 cccagctgcg acaagaccca cacctgtccc ccctgccc 39
 10 <210> 62
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> artificial
 15 <220>
 <223> región bisagra modificada artificial
 <400> 62
 20 cccaagagct gcgacaccca cacctgtccc ccctgccc 39
 <210> 63
 <211> 39
 25 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> región bisagra modificada artificial
 30 <400> 63
 cccaagagct gcgacaagac ccaactgccc ccctgccc 39
 35 <210> 64
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> artificial
 40 <220>
 <223> región bisagra modificada artificial
 <400> 64
 45 aagtgcgaca agaccacac ctgtcccccc tgcct 36
 <210> 65
 <211> 36
 <212> ADN
 50 <213> artificial
 <220>
 <223> región bisagra modificada artificial
 55 <400> 65
 cccagctgca agaccacac ctgtcccccc tgcct 36
 60 <210> 66
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 65 <223> región bisagra modificada artificial
 <400> 66
 70 cccaagagct gcgacaccca ctgcccccc tgcct 36
 <210> 67
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> artificial
 75 <220>

<223> región bisagra modificada artificial
 <400> 67

5 cccaagagct gcacccacac ctgtccccc tgcct 36
 <210> 68
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> artificial

10 <220>
 <223> región bisagra modificada artificial
 <400> 68

15 cccaagagct gcgacaagac cacctgtccc tgcct 36
 <210> 69
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> artificial

20 <220>
 <223> región bisagra modificada artificial
 <400> 69

25 cccaagagct gcgacaagac ccactgcccc ccctgc 36
 <210> 70
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> artificial

30 <220>
 <223> región bisagra modificada artificial
 <400> 70

35 cccaagagct gcgactgcca cacctgtccc ccctgcct 39
 <210> 71
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> artificial

40 <220>
 <223> región bisagra modificada artificial
 <400> 71

45 cccaagagct gcgactgcac ccactgcccc ccctgcct 39
 <210> 72
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> artificial

50 <220>
 <223> región bisagra modificada artificial
 <400> 72

55 ccctgcagct gcaagcacac ctgtccccc tgcct 36
 <210> 73
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> artificial

60 <220>
 <223> región bisagra modificada artificial
 <400> 73

65 <220>
 <223> región bisagra modificada artificial
 <400> 73

70 <220>
 <223> región bisagra modificada artificial
 <400> 73

75 <220>
 <223> región bisagra modificada artificial
 <400> 73

ES 2 600 254 T3

cctagctgct gcacccacac ctgtccccc tgcct 36
 <210> 74
 <211> 36
 5 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> región bisagra modificada artificial
 10 <400> 74
 cccagctgcg acaagcactg ctgcccccc tgcct 36
 15 <210> 75
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> artificial
 20 <220>
 <223> región bisagra modificada artificial
 <400> 75
 25 cccaagagca cccacacctg tcccccttgt cct 33
 <210> 76
 <211> 30
 <212> ADN
 30 <213> artificial
 <220>
 <223> región bisagra modificada artificial
 35 <400> 76
 cccaagagct gcacctgtcc cccttgcct 30
 40 <210> 77
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 45 <223> región bisagra modificada artificial
 <400> 77
 50 cccaagagct gcgataagtg cgtggagtgc cccccttgtc ct 42
 <210> 78
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> región bisagra modificada artificial
 <400> 78
 60 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 65 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ala Tyr
 20 25 30
 Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Leu Gly Glu Ser Leu Asp Trp Ile
 35 40 45
 70 Gly Gly Ile Lys Pro Asn Asn Gly Leu Ala Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 75 Met Asp Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

ES 2 600 254 T3

<400> 79

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

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

15 Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser Leu Gly Glu Ser Leu Asp Trp Ile
 35 40 45

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

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

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

35 Ala Arg Ser Glu Ile Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

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

45 Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140

50 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160

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

60 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

65 Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
 195 200 205

70 Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Cys His
 210 215 220

75 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240

80 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255

85 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270

90 Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285

95 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300

100 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320

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

110 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350

115 Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365

120 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380

125 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400

ES 2 600 254 T3

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

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

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

10 <210> 80
<211> 1338
<212> ADN
<213> Artificial

15 <220>
<223> región bisagra modificada artificial

20 <400> 80

gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctggttaaac ctggcgccag cgtgaagatt 60
agctgtaaga ccagcggtta catctttaca gcatatacca tgcactgggt gaggcagagt 120
25 ctgggggaat ctctggactg gatcggaggt attaagcca acaatggcct ggctaactat 180
aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtcctcttc cacagcttac 240
atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgcagtg actactgagc cgggtctgag 300
30 atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggcactgcac tgaccgtctc ctccgccagc 360
accaagggcc caagcgtggt cccgctagcc ccctgcagca gaagcaccag cgagagcaca 420
35 gccgccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtcttggaa 480
agcggagccc tgaccagcgg cgtgcacacc tttccagccg tgctgcagag cagcggcctg 540
tacagcctga gcagcgtggt gacagtgcc agcagcaact tcggcaccca gacctacacc 600
40 tgtaacgtgg accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaccgtgga gcccaagagc 660
tgcgattgcc actgcccccc ttgtcctgct cctcctgtgg cgggaccag cgtgttcctg 720
45 ttcccccaa agcccaagga caccctgatg atcagccgga cccccgaagt gacctgcgtg 780
gtggtggacg tgtcccacga ggaccccgag gtgcagttca attggtacgt ggacggcgtg 840
gaggtgcaca acgccaagac caagcccgg gaggaacagt tcaacagcac cttccgggtg 900
50 gtgtccgtgc tgaccgtggt gcaccaggac tggctgaacg gcaaagagta caagtgaag 960
gtctccaaca agggcctgcc tgccccatc gagaaaacca tcagcaagac caagggccag 1020
55 cctcgggagc ctgaggtgta caccctgcc cccagccggg aggaaatgac caagaaccag 1080
gtgtccctga cctgtctggt gaaaggcttc taccacagc atatcgccgt ggagtgggag 1140
agcaacggcc agcccagaa caactacaag accaccccc ccatgctgga cagcgacggc 1200
60 agcttcttcc tgtactcaa actgaccgtg gataagagcc ggtggcagca gggcaacgtg 1260
ttcagctgca gcgtgatgca cgaggccctg cacaaccact acaccagaa gtccttgagc 1320
65 ctgagccccg gcaaatga 1338

<210> 81
<211> 1341
<212> ADN
70 <213> Artificial

<220>
<223> región bisagra modificada artificial

75 <400> 81

ES 2 600 254 T3

	gaggtccagc tgcagcagag cgggccagaa ctggttaaac ctggcgccag cgtgaagatt	60
	agctgtaaga ccagcgggta catctttaca gcatatacca tgcactgggt gaggcagagt	120
5	ctgggggaat ctctggactg gatcggaggt attaagcca acaatggcct ggctaactat	180
	aatcaaaaat tcaagggcaa agccacactg accgtcgata agtcctcttc cacagcttac	240
10	atggatctga gaagcctgac atccgaggac agtgcagtgt actactgcbc cgggtctgag	300
	atcactaccg agttcgacta ttggggacag ggcactgcac tgaccgtctc ctccgccagc	360
	accaagggcc caagcgtggt cccgctagcc ccctgcagca gaagcaccag cgagagcaca	420
15	gccgccctgg gctgcctggt gaaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt gtcttggaac	480
	agcggagccc tgaccagcgg cgtgcacacc tttccagccg tgctgcagag cagcggcctg	540
20	tacagcctga gcagcgtggt gacagtgcct agcagcagcc tgggcaccaa gacctacacc	600
	tgtaacgtgg accacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agcgggtgga gcccaagagc	660
	tgcgattgcc actgcccccc ttgccctgcc cctgagttcc tgggcggacc cagcgtgttc	720
25	ctgttcccc caaagcccaa ggacaccctg atgatcagcc ggacccccga agtgacctgc	780
	gtggtggtgg acgtgtccca ggaagatccc gaggtgcagt tcaactggta cgtggacggc	840
30	gtggaggtgc acaacgcaa gaccaagccc cgggaggaac agttcaacag cacctaccgg	900
	gtggtgtccg tgctgaccgt gctgcaccag gactggctga acggcaaaga gtacaagtgc	960
	aaggtgtcca acaagggcct gccagcagc atcgagaaaa ccatcagcaa ggccaagggc	1020
35	cagcctagag aaccccaggt gtacaccctg cccccagcc aggaagagat gaccaagaac	080
	caggtgtccc tgacctgtct ggtgaaaggc ttctaccca gcgatatcgc cgtggagtgg	1140
40	gagagcaacg gccagcccga gaacaactac aagaccacc cccctgtgct ggacagcgac	1200
	ggcagcttct tcctgtactc ccggctgacc gtggacaaga gccggtggca ggaaggcaac	1260
	gtgttcagct gcagcgtgat gcacgaggcc ctgcacaacc actacacca gaagtccctg	1320
45	agcctgagcc tgggcaaatg a	1341

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para mejorar la actividad antagonista de un anticuerpo monoclonal dirigido contra una molécula diana específica, o un fragmento funcional divalente del mismo, pudiendo dicho anticuerpo o fragmento funcional divalente del mismo inhibir una o más de las actividades biológicas de dicha molécula diana, en el que dicho procedimiento comprende una etapa de reconfiguración de la región bisagra que consiste en una modificación de la secuencia de aminoácidos de dicha región bisagra mediante la eliminación, la adición o la sustitución de por lo menos un aminoácido, y en el que dicha región bisagra reconfigurada obtenida por la modificación de su secuencia de aminoácidos da como resultado una región bisagra que presenta una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las secuencias SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, SEC ID nº 4, SEC ID nº 6, SEC ID nº 7, SEC ID nº 23 a SEC ID nº 27, SEC ID nº 36 y SEC ID nº 42 a SEC ID nº 49.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo monoclonal es un anticuerpo divalente.
3. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 y 2, en el que dicho anticuerpo monoclonal es un anticuerpo quimérico.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 y 2, en el que dicho anticuerpo monoclonal es un anticuerpo humanizado.
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 y 2, en el que dicho anticuerpo monoclonal es un anticuerpo humano.
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho anticuerpo monoclonal es una IgG1.
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha molécula diana es un receptor transmembranario.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que dicho receptor transmembranario se selecciona de entre el grupo que consiste en los receptores de tirosina cinasa, tetraspanina y GPCR.
9. Procedimiento de cribado para un anticuerpo monoclonal antagonista dirigido contra una molécula diana específica, o un fragmento funcional divalente del mismo, pudiendo dicho anticuerpo o fragmento funcional divalente del mismo inhibir una o más de las actividades biológicas de dicha molécula diana, en el que dicho procedimiento comprende las etapas de:
- (a) seleccionar un anticuerpo inicial con un nivel inicial de inhibición de dichas una o más actividades biológicas de dicha molécula diana,
 - (b) modificar la secuencia de aminoácidos de la región bisagra de dicho anticuerpo inicial mediante el procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8,
 - (c) evaluar el anticuerpo modificado de la etapa (b) para su capacidad para inhibir dichas una o más actividades biológicas de dicha molécula diana, y
 - (d) seleccionar, como un resultado positivo, el anticuerpo de la etapa (c) con un nivel de inhibición de dichas una o más actividades biológicas de dicha molécula diana superior al nivel inicial de dicha inhibición.
10. Anticuerpo monoclonal, caracterizado por que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en SEC ID nº 2, SEC ID nº 4, SEC ID nº 6, SEC ID nº 23 a SEC ID nº 26, SEC ID nº 36 y SEC ID nº 42 a SEC ID nº 49.
11. Anticuerpo monoclonal según la reivindicación 10, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo humano.
12. Anticuerpo monoclonal según una de las reivindicaciones 10 y 11, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo IgG1.
13. Ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo monoclonal según una de las reivindicaciones 10 a 12.
14. Ácido nucleico aislado según la reivindicación 13, en el que dicho ácido nucleico comprende una secuencia nucleica seleccionada de entre el grupo que consiste en SEC ID nº 16, 18, SEC ID nº 20, SEC ID nº 51 a SEC ID nº 54, SEC ID nº 64, y SEC ID nº 70 a SEC ID nº 77.

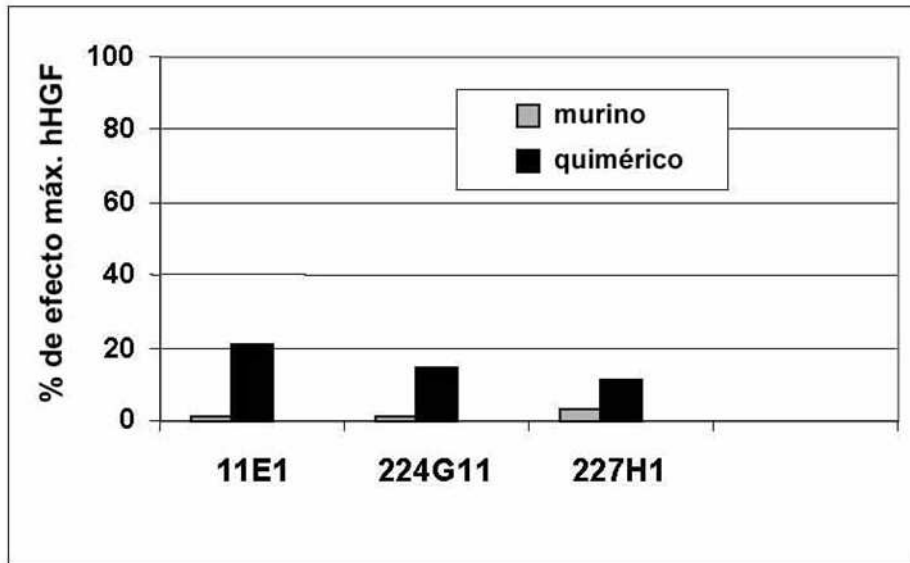


FIG. 1A

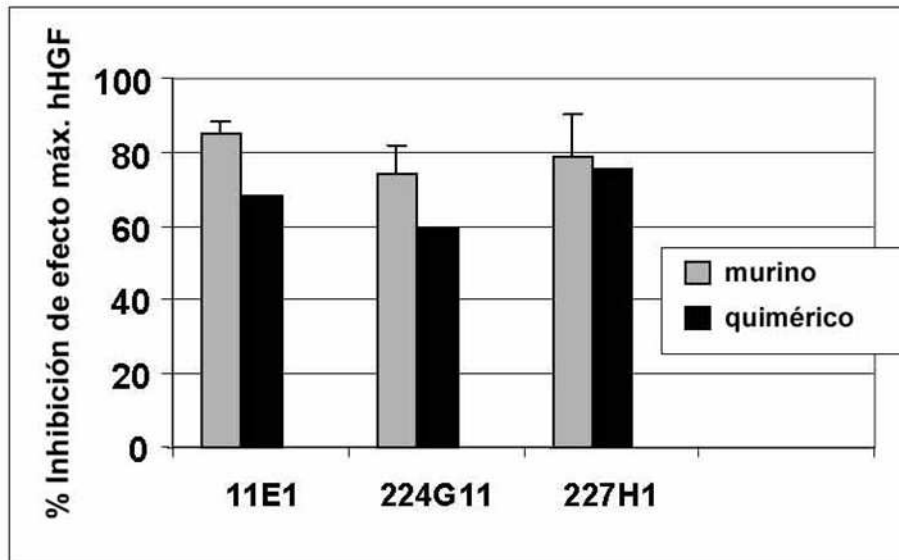


FIG. 1B

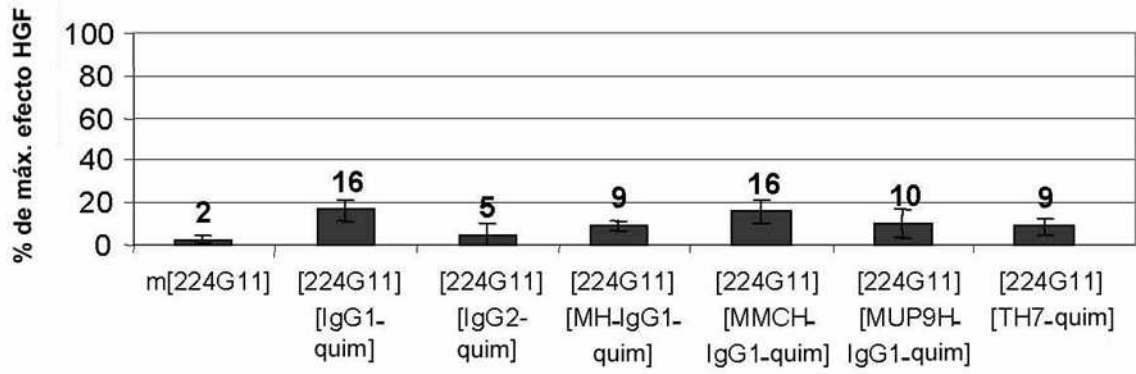


FIG. 2A

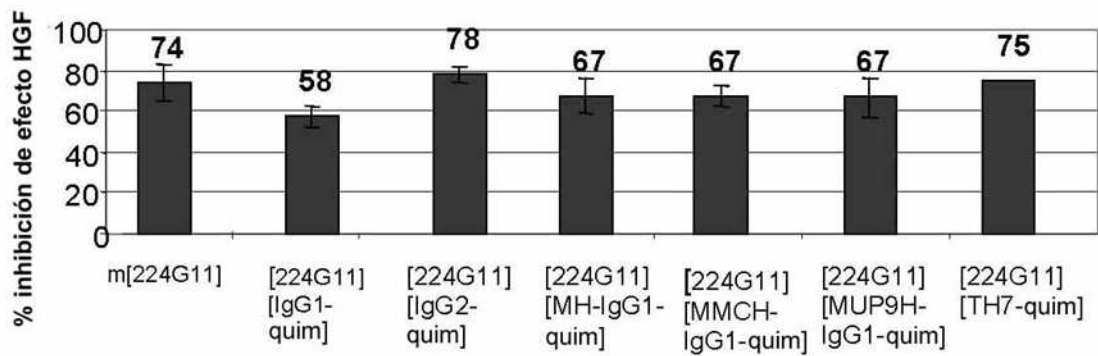


FIG. 2B

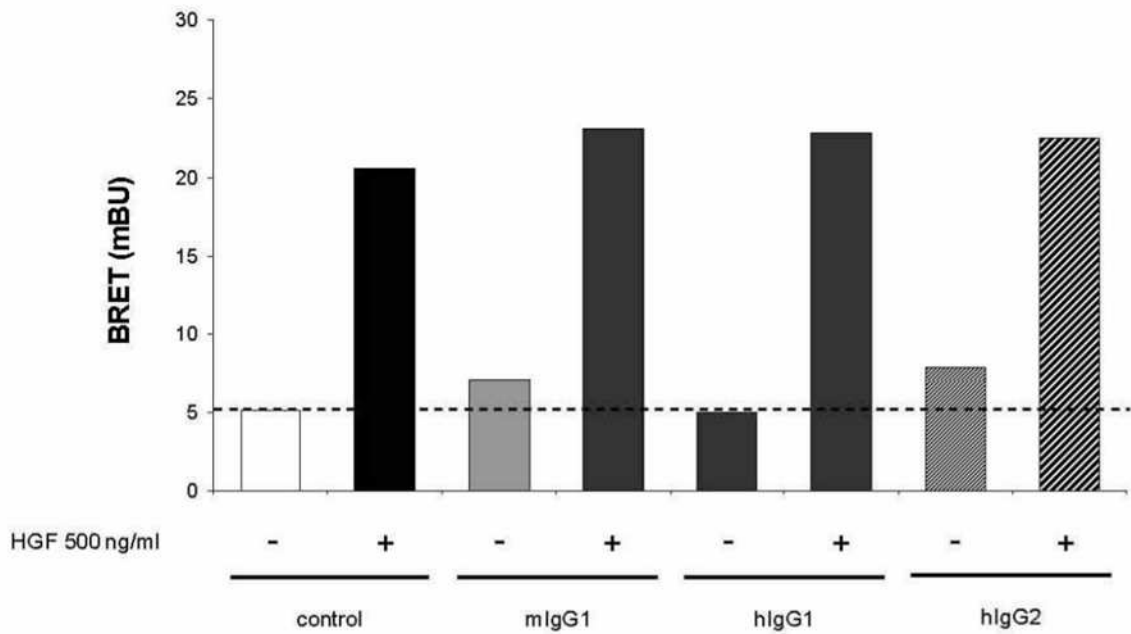


FIG. 3A

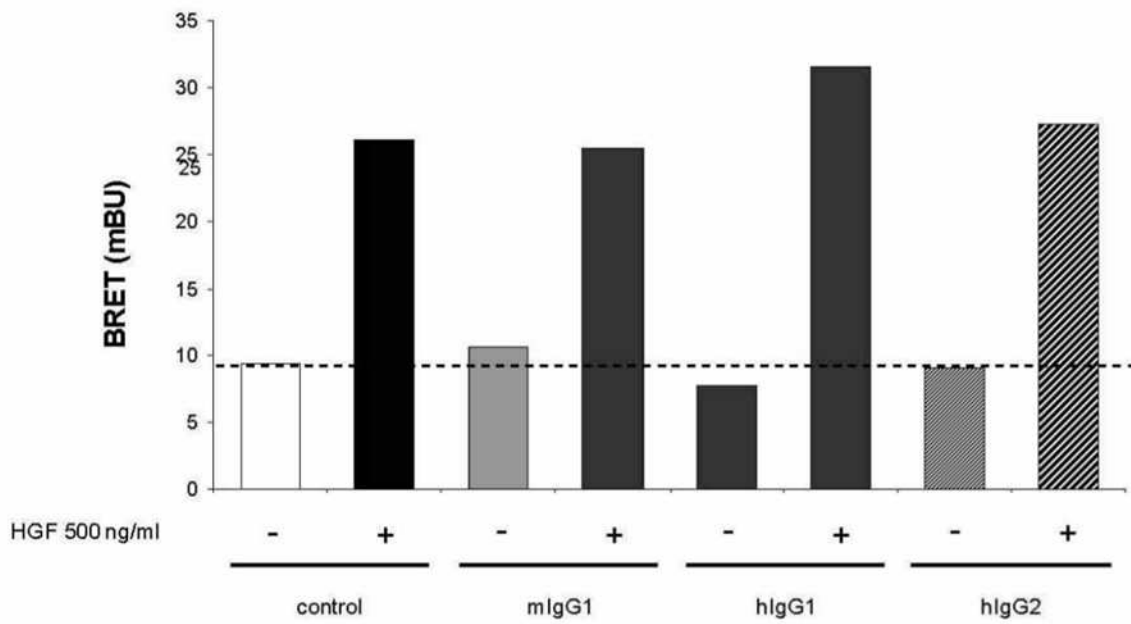


FIG. 3B

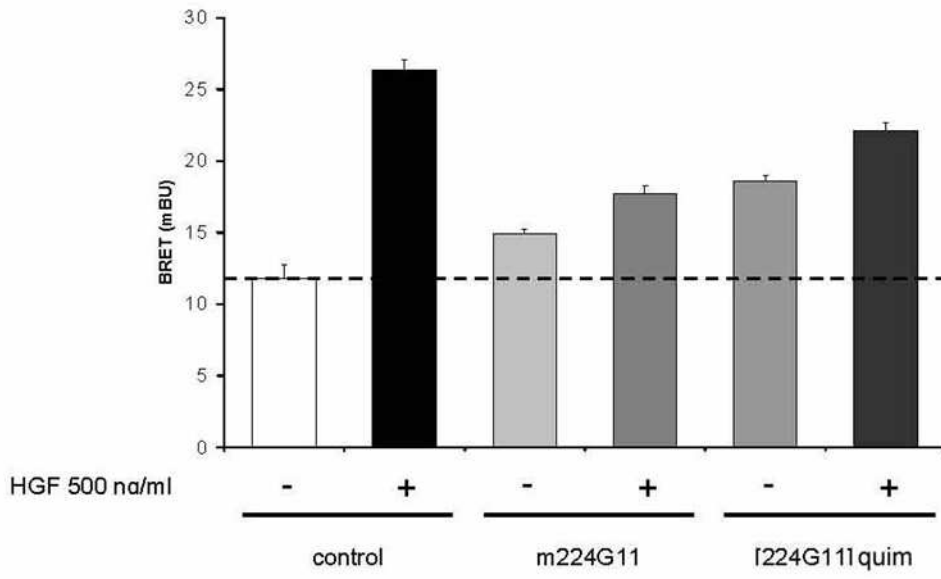


FIG. 4

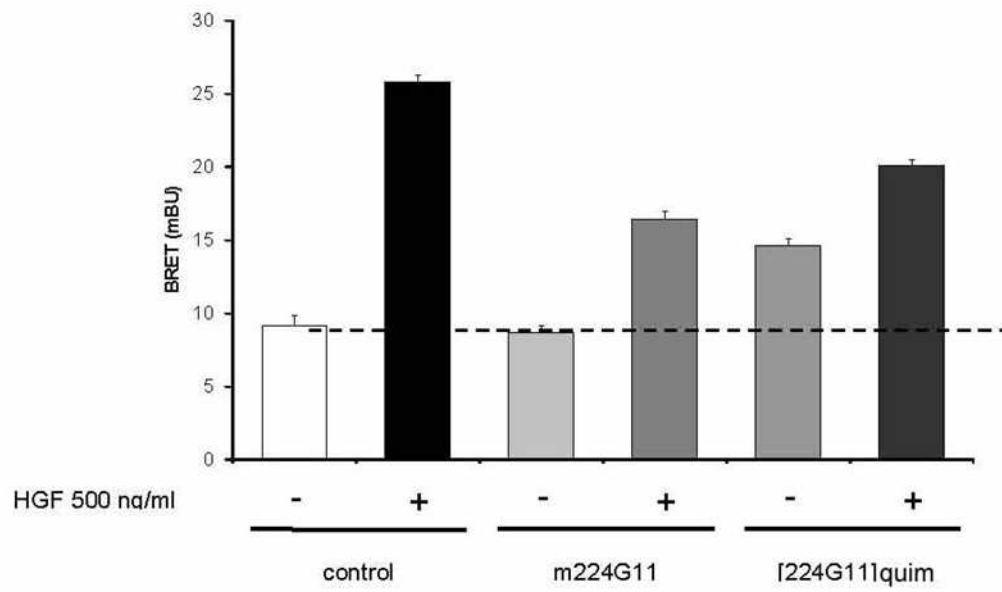


FIG. 5

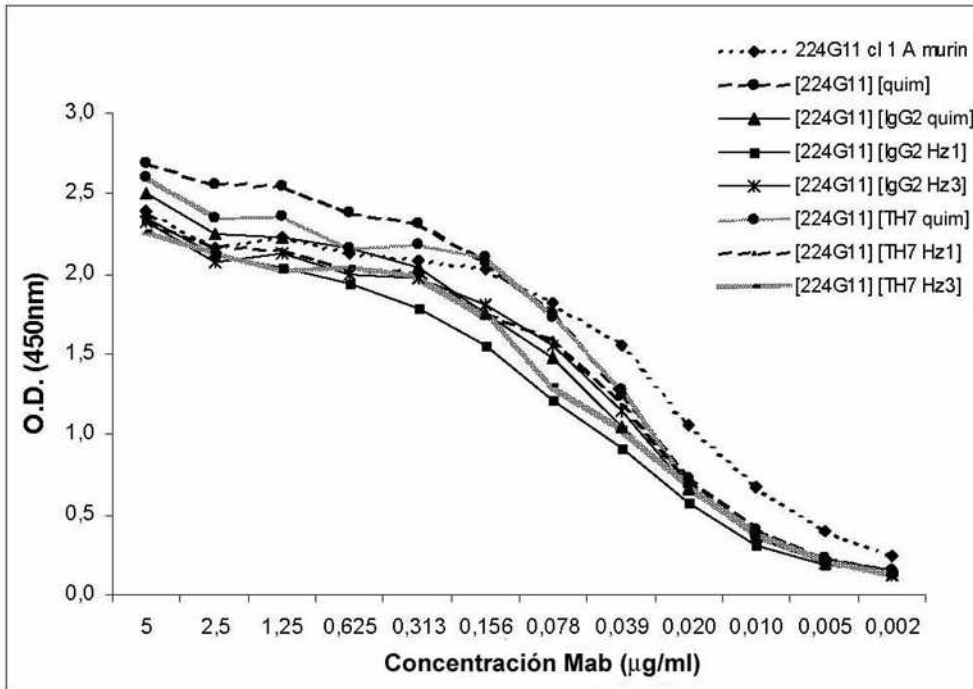


FIG. 6A

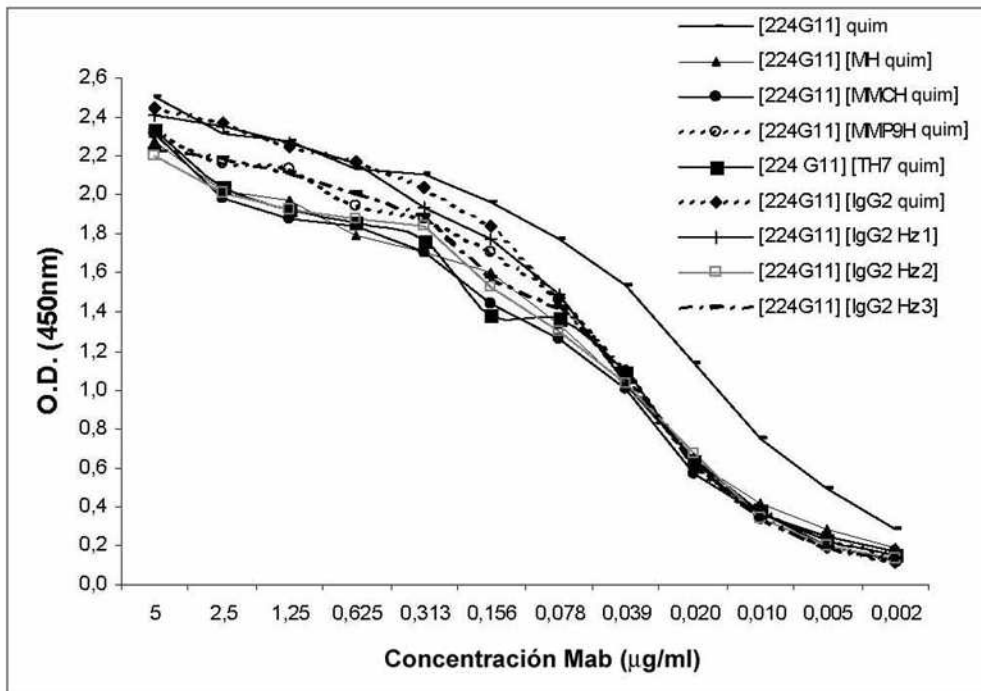


FIG. 6B

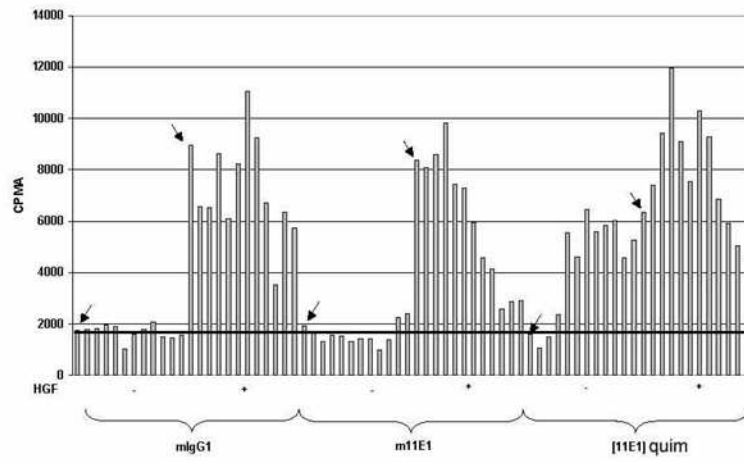


FIG. 7A

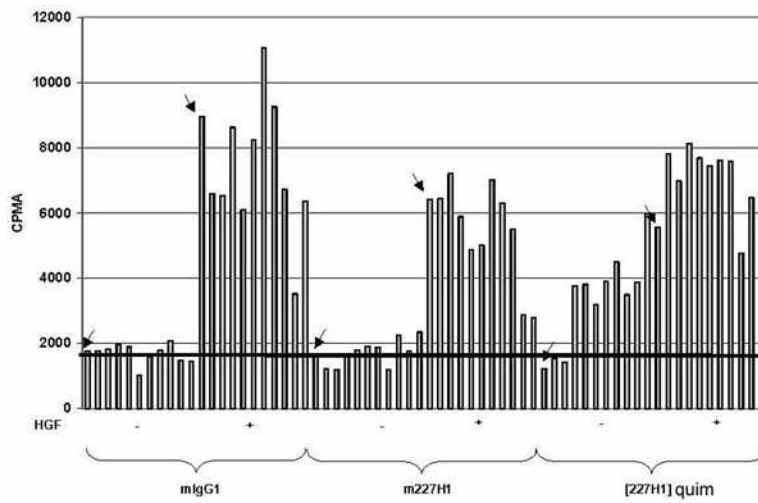


FIG. 7B

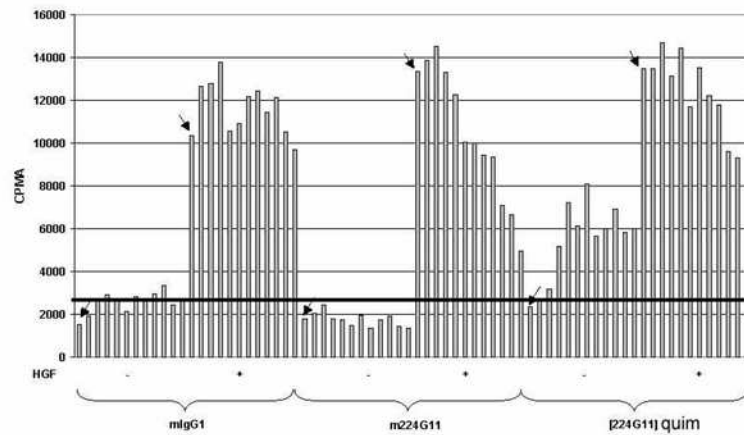


FIG. 7C

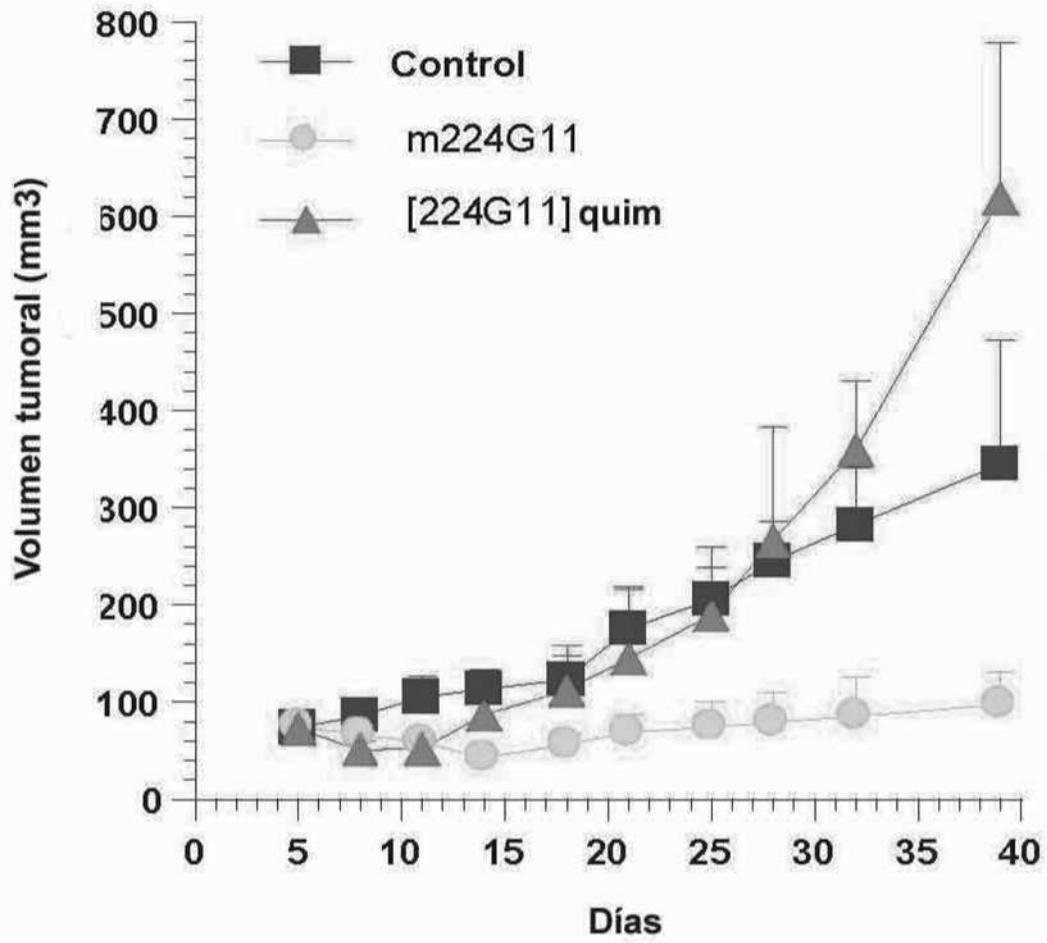


FIG. 8

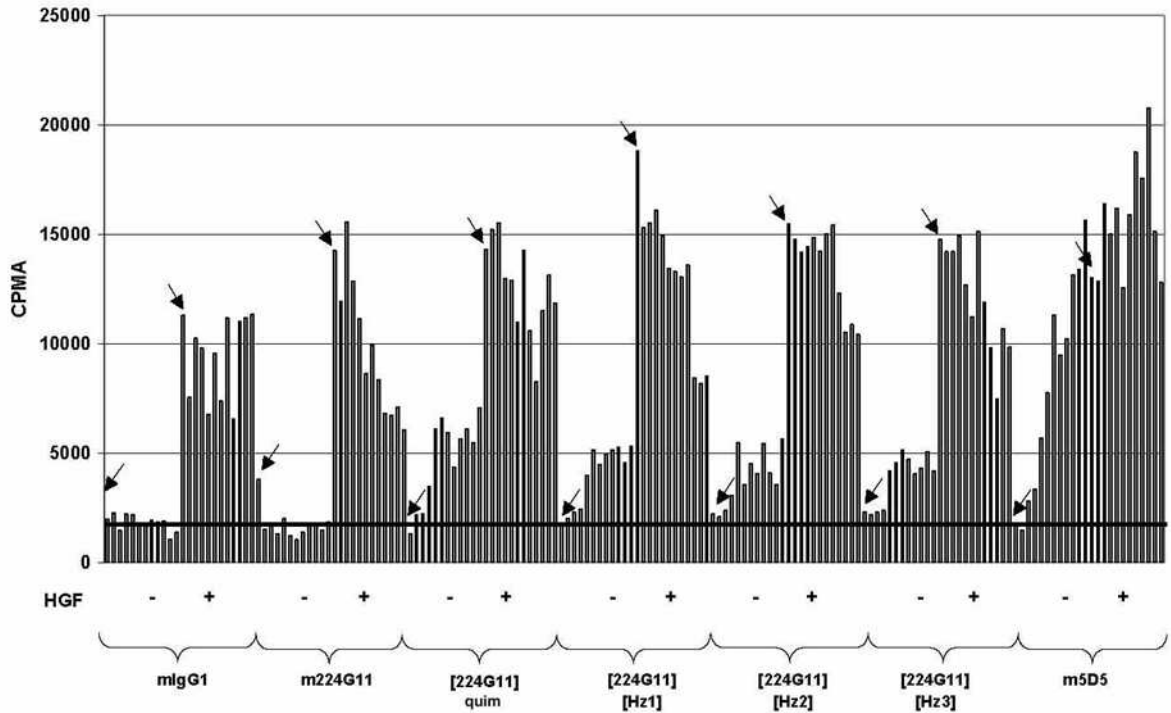


FIG. 9A

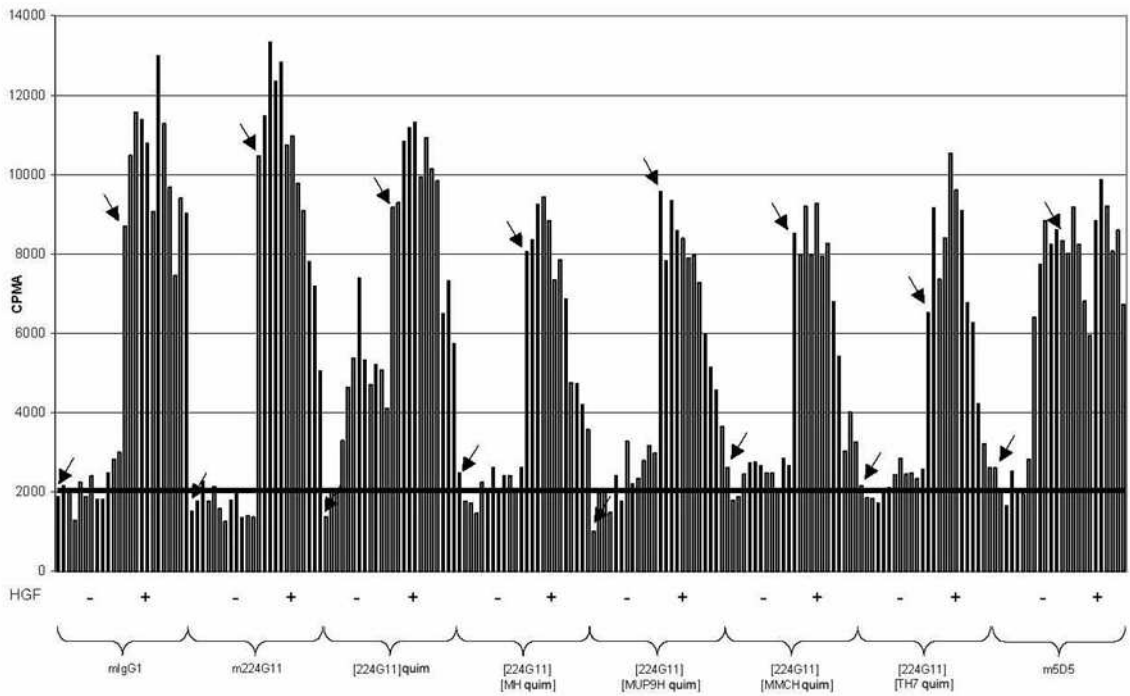


FIG. 9B

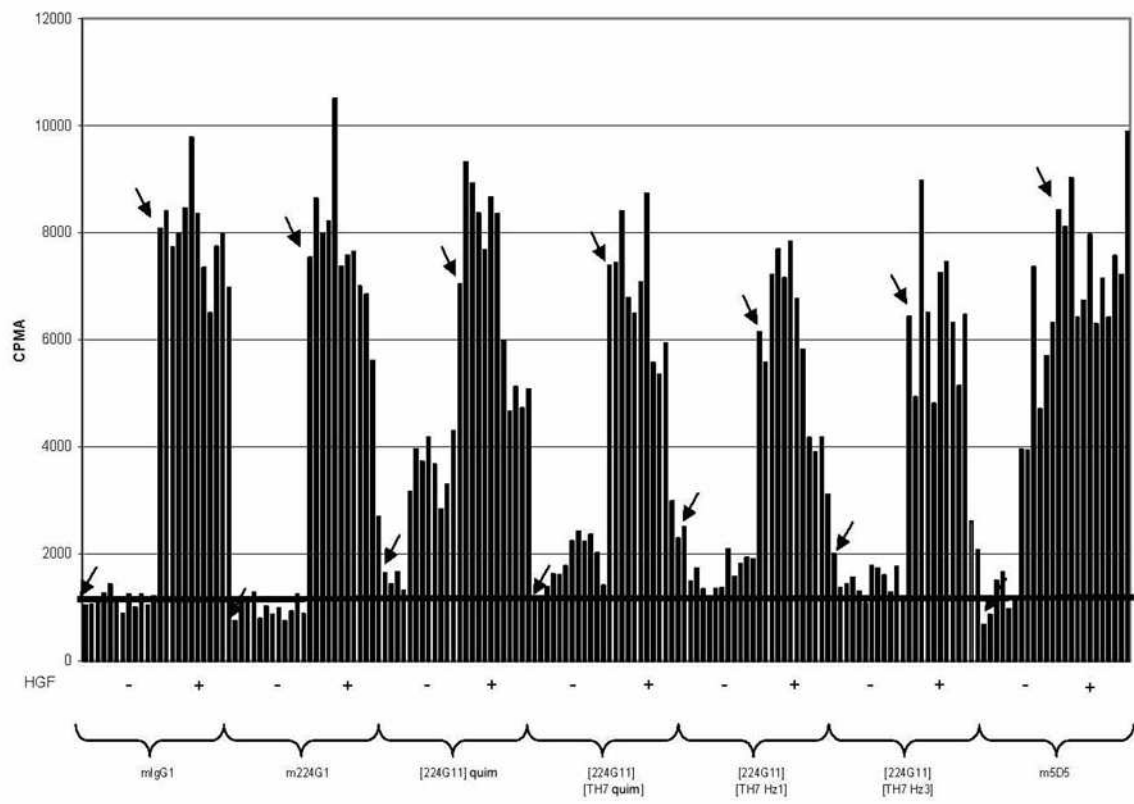


FIG. 10

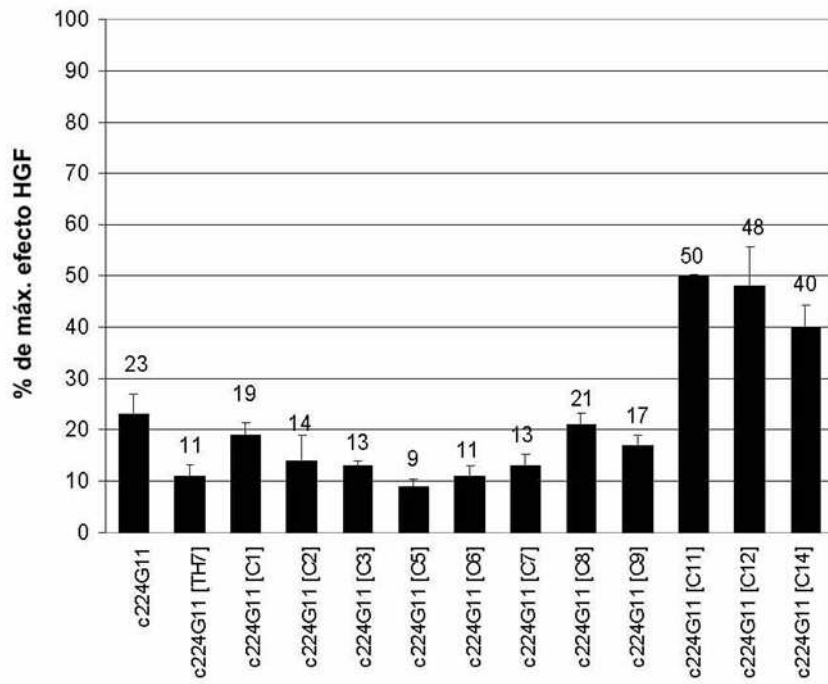


FIG. 11A

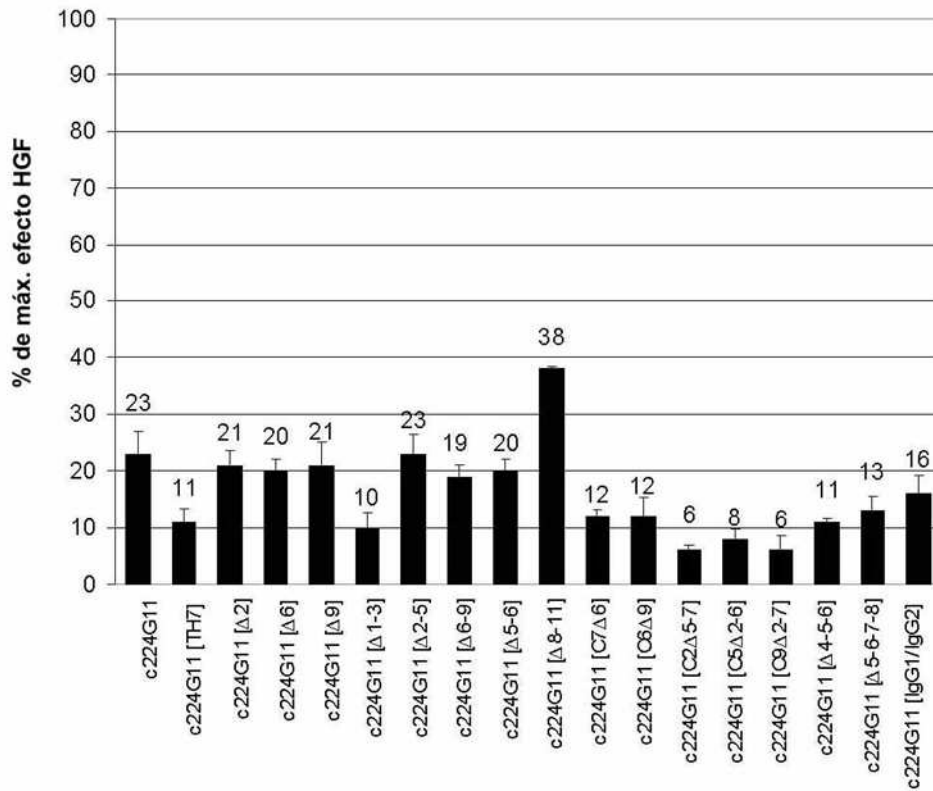


FIG. 11B

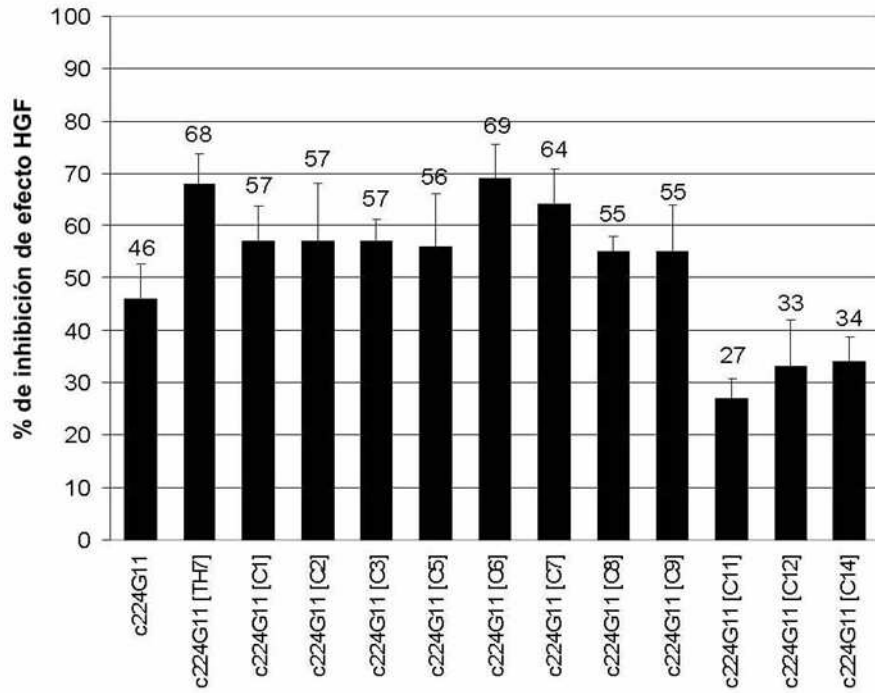


FIG. 12A

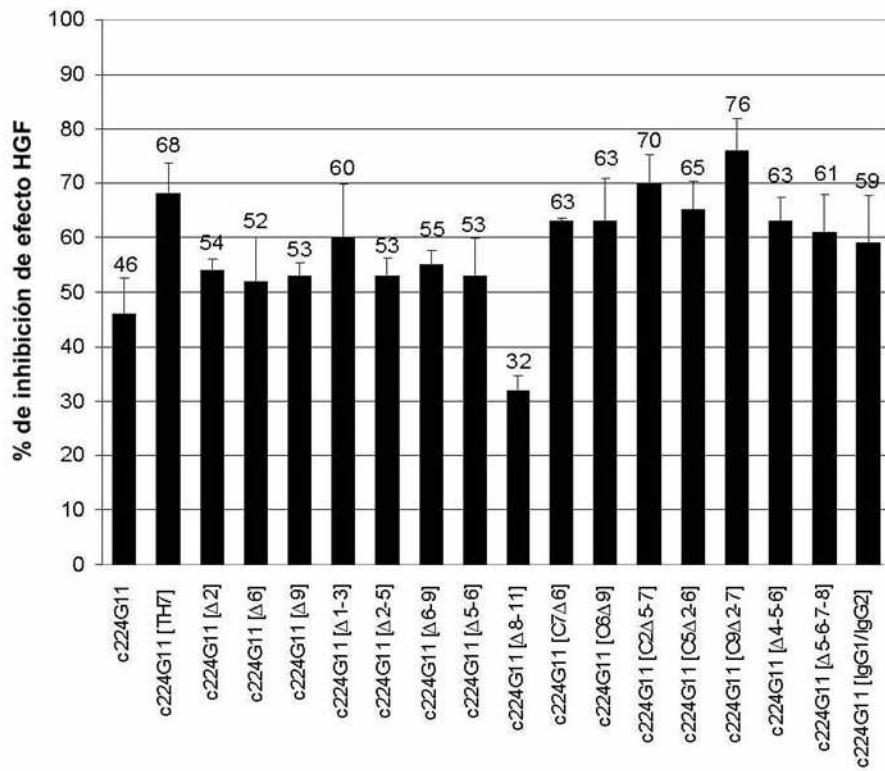


FIG. 12B

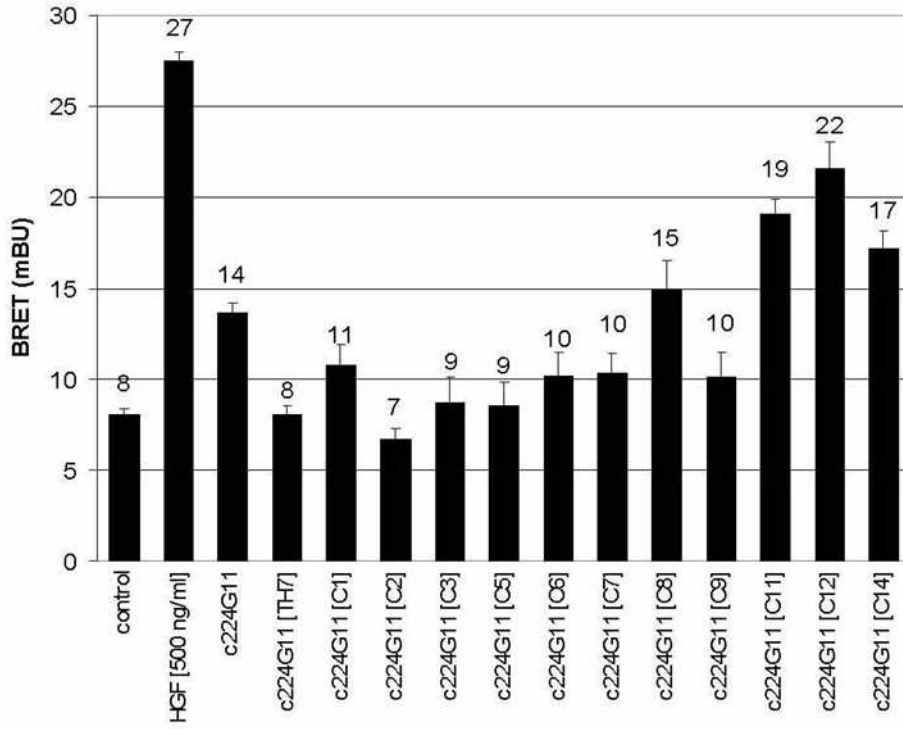


FIG. 13A

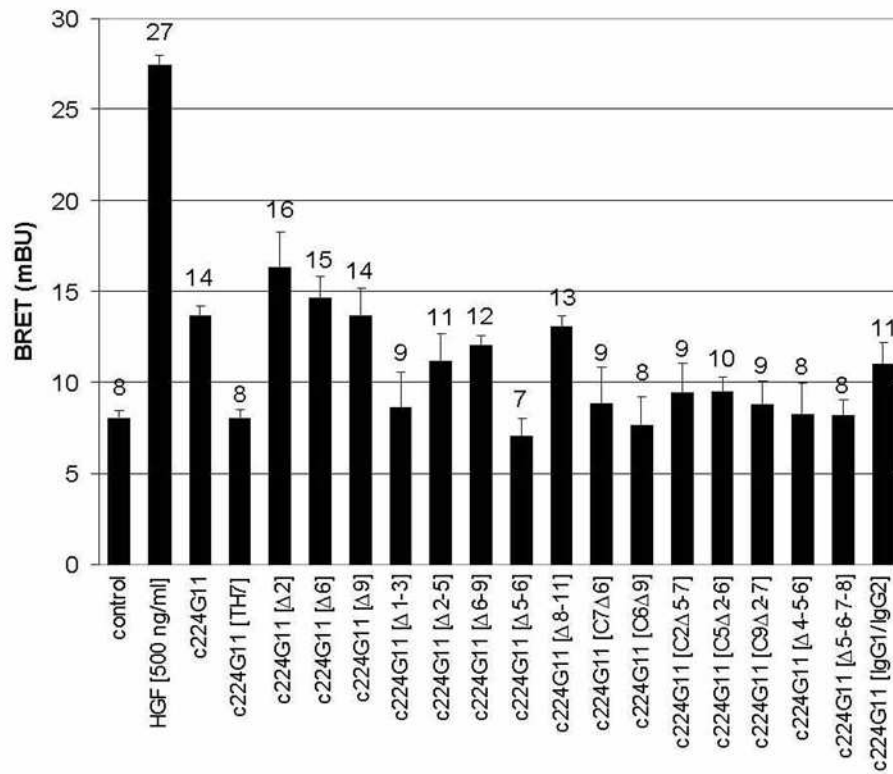


FIG. 13B

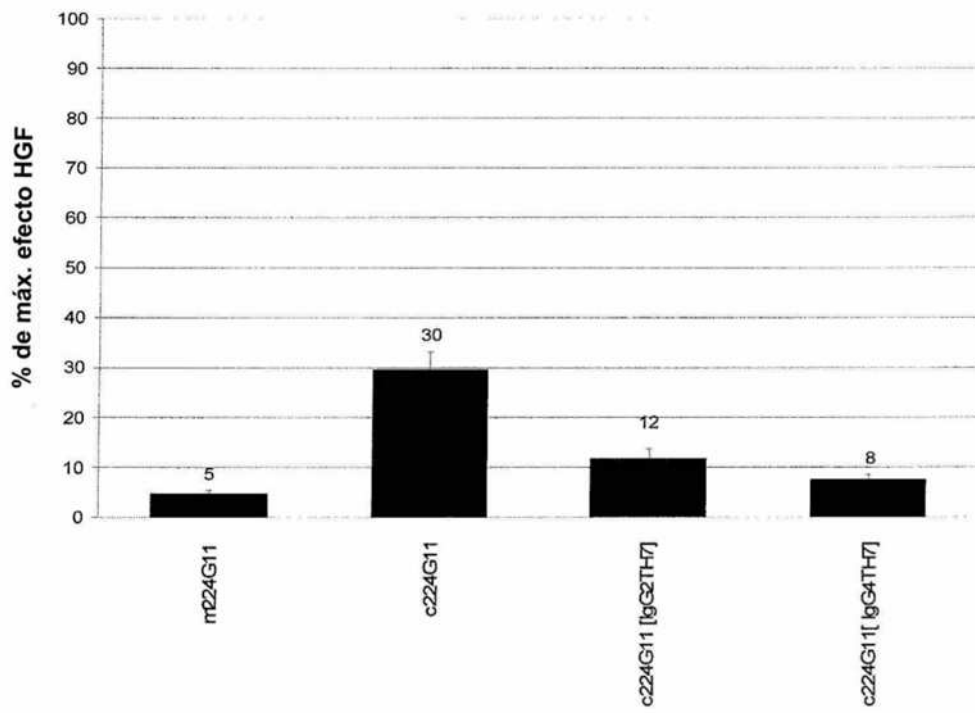


FIG. 14A

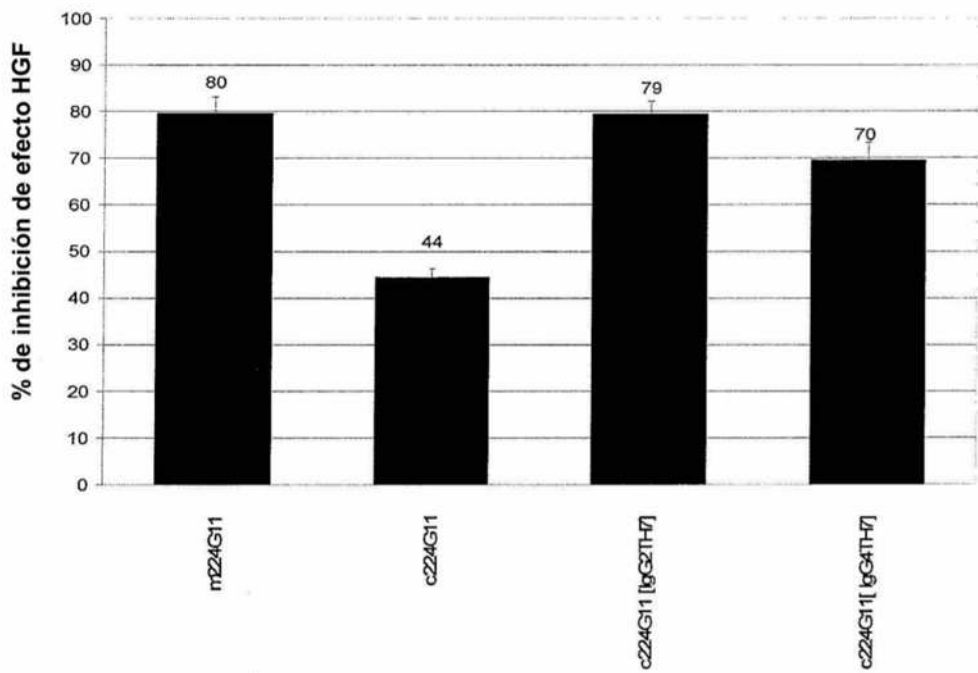


FIG. 14B

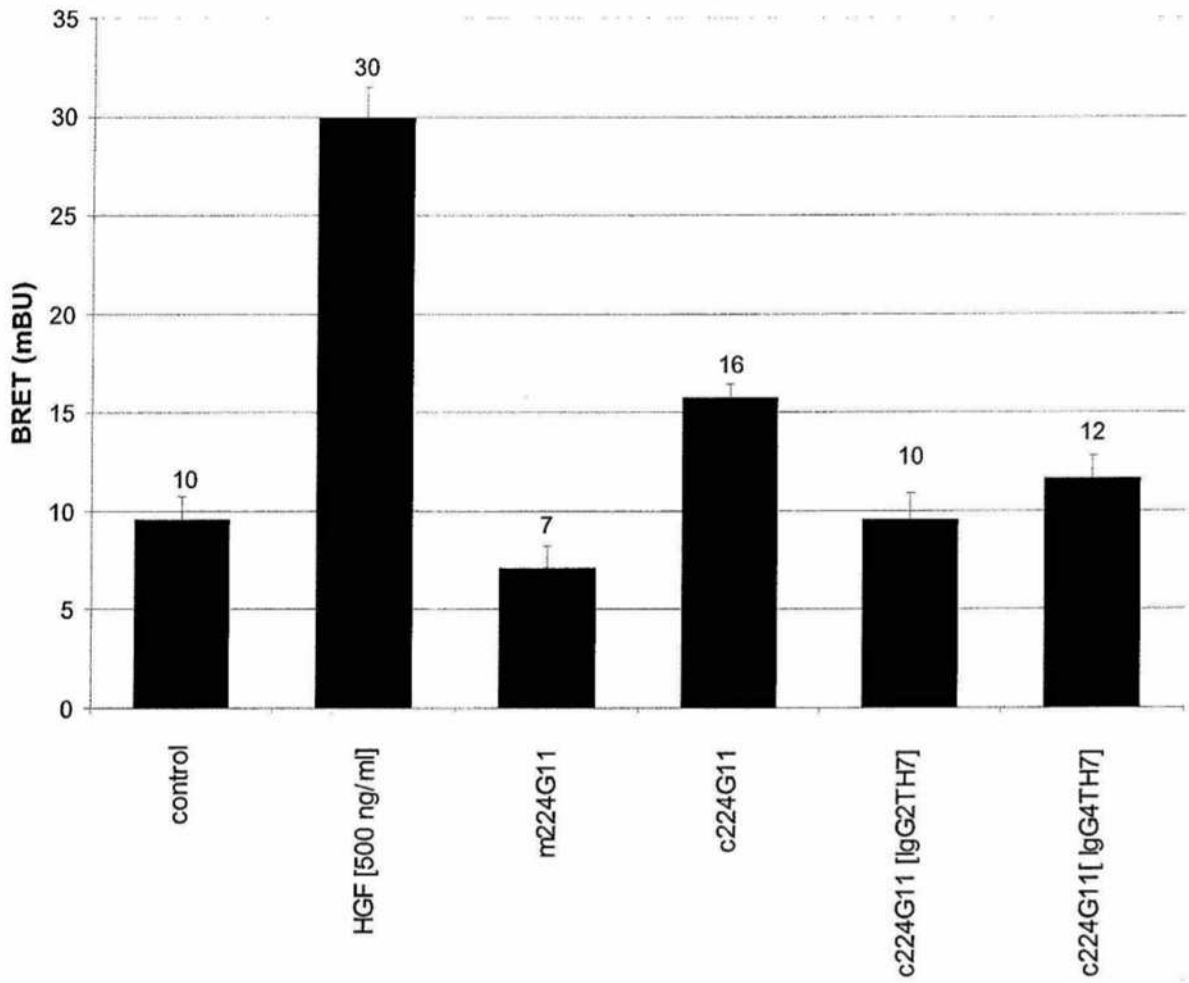


FIG. 15

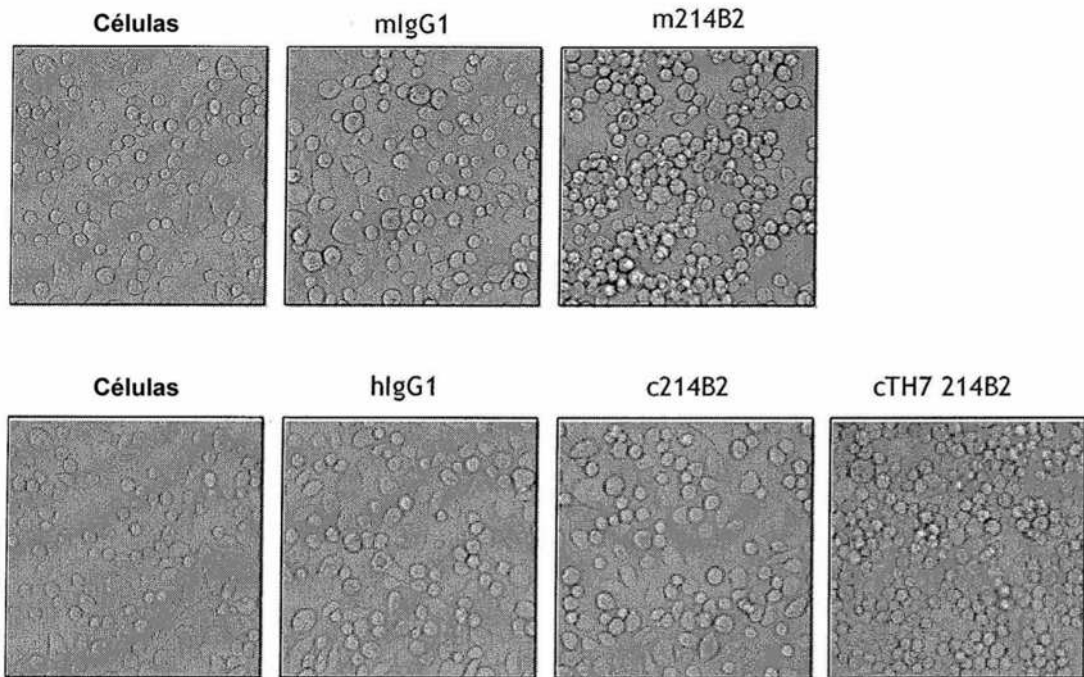


FIG. 16

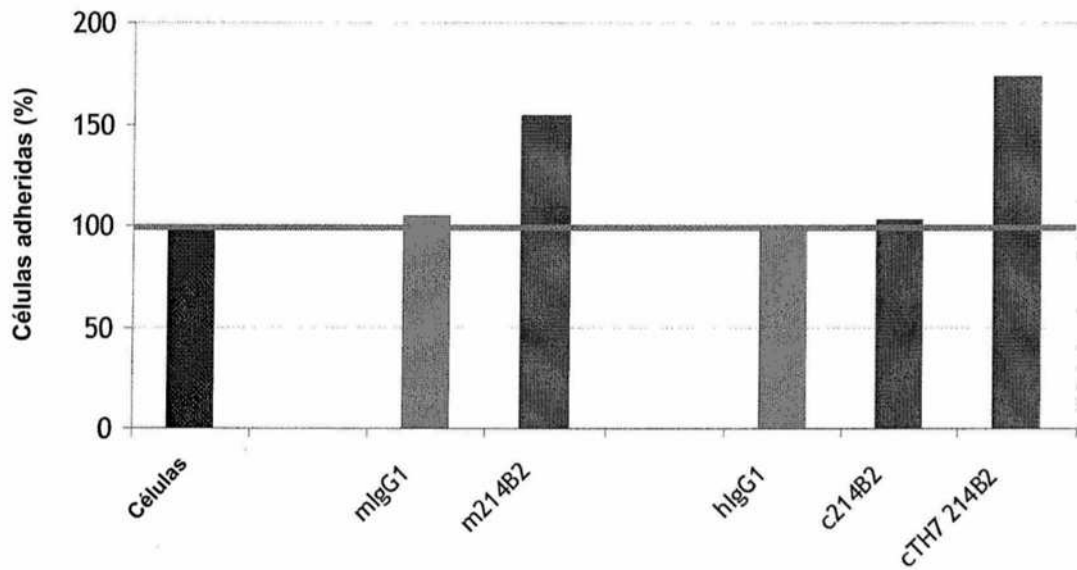


FIG. 17