

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 609 787**

51 Int. Cl.:

C07K 16/46 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.03.2011** **PCT/EP2011/053129**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.09.2011** **WO11107520**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.2011** **E 11707394 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016** **EP 2542575**

54 Título: **Expresión de anticuerpos monoclonales en Tetrahymena**

30 Prioridad:

05.03.2010 GB 201003701

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.04.2017

73 Titular/es:

CILIAN AG (100.0%)
Johann-Krane-Weg 42
48149 Münster, DE

72 Inventor/es:

HARTMANN, MARCUS y
APELT, JENNY

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 609 787 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

Expresión de anticuerpos monoclonales en *Tetrahymena*

5 La presente invención se refiere a un sistema para la expresión heteróloga de un anticuerpo monoclonal (AcMc) en una célula hospedadora ciliada.

Hoy en día, las principales indicaciones de los anticuerpos monoclonales en la terapia humana son el cáncer, las enfermedades autoinmunes y las enfermedades infecciosas.

10 Uno de los mecanismos de acción es la interrupción de las rutas de señalización de los factores de crecimiento que promueven la angiogénesis asociada al tumor, como por ejemplo lo que realiza Avastin (Bevacizumab), que se dirige al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), privando así de alimento al tumor. Otras dianas son, por ejemplo, el factor de crecimiento placentario (PLGF). Mientras que para estos fines es obligatoria una elevada
15 afinidad por la diana, que está mediada por las regiones de la Región Determinante de la Complementariedad (CDR) ubicadas en las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo (V_L y V_H), las funciones efectoras del anticuerpo, ejercidas por la región Fc, no son cruciales. Para estos fines, pueden usarse fragmentos de anticuerpos desprovistos de una región Fc (como scFv o Fab).

20 Otros mecanismos de acción son la unión a citocinas, como el TNF alfa (Humira), o el bloqueo de los receptores de factores de crecimiento, como erbB-2 (Erbtux), de los antígenos de la superficie vírica necesarios para la entrada en la célula, como la proteína F del RSV (Synagis), o de los receptores responsables de la coagulación sanguínea, como los receptores IIb/IIIa de los glóbulos rojos (ReoPro).

25 Sin embargo, los anticuerpos monoclonales también pueden usarse para aplicaciones de destrucción celular dirigida, por ejemplo, para la eliminación de células cancerosas o de patógenos. Aunque para este fin se han desarrollado anticuerpos conjugados, es decir, anticuerpos artificiales portadores de una citotoxina en particular, los anticuerpos no conjugados desprovistos de una citotoxina en particular pueden cumplir también este diana provocando las correspondientes respuestas inmunitarias. Sin embargo, para estos fines es necesaria una región Fc funcional, se proporcionan en las IgG, particularmente en la IgG1. Básicamente, se conocen cuatro mecanismos diferentes en este contexto:

- la región Fc de anticuerpos unidos a células diana puede unirse a los receptores Fc gamma ($Fc\gamma R$, particularmente el $Fc\gamma RI$, el $Fc\gamma RIIa$ y/o el $Fc\gamma RIII$) de la superficie de las células efectoras inmunitarias, y desencadenar la destrucción mediada por el $Fc\gamma R$ de las células diana por parte de los efectores inmunitarios ("citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo" o CCDA);
- la región Fc de anticuerpos unidos a células diana puede unirse a las proteínas solubles del sistema complemento que se encuentran en la sangre (por ejemplo, la C1q), y desencadenar una lisis mediada por el complemento de las células diana ("citotoxicidad dependiente del complemento", CDC);
- la unión directa del anticuerpo a las moléculas diana puede desencadenar mecanismos inductores de la muerte celular, tales como la apoptosis (apoptosis dependiente de anticuerpo), o puede bloquear la acción de los factores de supervivencia celular, tales como los factores de crecimiento;
- la opsonización de una célula diana por parte de la unión mediada por un anticuerpo de macrófagos o de neutrófilos, y la subsiguiente fagocitosis.

45 La CCDA es un mecanismo de inmunidad celular mediante el cual una célula efectora del sistema inmunitario lisa de forma activa una célula diana a la que se han unido anticuerpos específicos. Es uno de los mecanismos a través de los cuales los anticuerpos, como parte de la respuesta inmunitaria humoral, pueden actuar para limitar y contener una infección. Las células efectoras clásicas mediadoras en la CCDA son los linfocitos citolíticos naturales (NK); pero los monocitos y los eosinófilos también pueden mediar en la CCDA. La CCDA es parte de la respuesta inmunitaria adaptativa debido a su dependencia de una respuesta previa de un anticuerpo.

Los anticuerpos terapéuticos que se usan para desencadenar una CCDA en las células diana necesitan una región Fc con objeto de que sean reconocidos por los receptores Fc gamma de dichas células efectoras. Algunos ejemplos de dichos anticuerpos son Herceptin, que reconoce el erbB-2 y se une preferentemente a las células tumorales que sobreexpresan el erbB-2, o Rituxan, que se une al receptor CD20 de los linfocitos B malignos.

Otro potencial mecanismo es llevar a una estrecha proximidad dos o más entidades diferentes, a saber, utilizando una construcción de un anticuerpo biespecífico o superior. Esto es útil, por ejemplo, para redirigir los linfocitos T contra las células tumorales, en los casos en los que las células tumorales pueden escapar del ataque de los linfocitos T, por ejemplo, mediante una mutación, o la pérdida, de sus entidades del MHC de clase I, o mediante la secreción de sustancias mensajeras que suprimen la activación de los linfocitos T. Una metodología es combinar dos anticuerpos scFv, de los cuales sólo uno está dirigido contra un receptor de los linfocitos T (por ejemplo, el CD 3), mientras que el otro está dirigido contra el antígeno de la célula tumoral (por ejemplo, el EGFR).

65

Otra metodología es la conexión (mediante una molécula de fusión que comprende dos regiones determinantes de la complementariedad diferentes en ambas cadenas Fv, y una región Fc) una célula tumoral (por ejemplo, mediante una Fv que se une al EGFR o al EpCAM), un linfocito T (por ejemplo, mediante otra Fv que se une a un receptor del linfocito T, como el CD3) y una célula efectora, tal como un monocito, un macrófago o un linfocito citolítico natural (mediante la región Fc, que es detectada por los receptores Fc de dichas células efectoras). Esta metodología combina el efecto antitumoral de los linfocitos T citolíticos, que inducen la lisis y la apoptosis de las células tumorales, y de las células infectadas, que eliminan las células tumorales mediante una fagocitosis o una apoptosis, mientras liberan citocinas para estimular adicionalmente la actividad de los linfocitos T.

Otra metodología adicional es el diseño de un anticuerpo en el que dos antígenos diferentes pueden ser reconocidos por un sitio de unión al antígeno, ambos con una elevada afinidad. Dichos anticuerpos pueden sustituir en el futuro a las terapias de combinación con dos anticuerpos diferentes. Adicionalmente, dichos anticuerpos también podrían usarse para combinar epitopos diferentes del mismo antígeno, especialmente de antígenos solubles, para aumentar la avidez de unión y la potencia *in vivo*.

Actualmente, los anticuerpos o los fragmentos o los derivados de los mismos para uso terapéutico, son expresados en *E. coli* o en líneas de células de mamífero, como las células CHO (de ovario de hámster chino). Estos sistemas no permiten mejorar la CCDA ni proporcionar anticuerpos con una especificidad múltiple, y tienen algunos otros inconvenientes.

Los anticuerpos producidos en *E. coli* no tienen una glicosilación ni ninguna otra modificación post-traducciona, y tienen por lo tanto las capacidades limitadas en relación con la CCDA. Adicionalmente, las cepas de *E. coli* no secretan proteínas en el medio, por lo que las células tienen que ser lisadas y los anticuerpos requieren una profunda purificación. Otro problema bien conocido es el incorrecto plegamiento de las proteínas, que puede dar lugar a la formación de cuerpos de inclusión insolubles. Como consecuencia, *E. coli* sólo es adecuada para la producción de fragmentos Fab y scFv, que tienen una semivida en suero corta.

Los sistemas de expresión eucariotas también adolecen de diversos inconvenientes. Los sistemas de expresión de levaduras tienden a producir proteínas hiperglicosiladas ricas en manosa, que a menudo dan lugar a reacciones inmunitarias no deseadas cuando se administra el anticuerpo terapéutico a un paciente. Los sistemas de células de insectos transfectados con un baculovirus causan problemas debido a una hipoglicosilación, que afecta negativamente a la función efectora de los anticuerpos terapéuticos. Adicionalmente, el mayor inconveniente son las propiedades catalíticas de los baculovirus infecciosos, que estrechan la ventana de producción de IgG completas.

Las líneas de células de mamífero y humanas, como las células CHO y Per.C6, son difíciles de cultivar y caras en el aumento de escala. Adicionalmente, estas células tienen una elevada demanda relacionada con el medio de cultivo. Además, las líneas de células de mamífero y humanas portan riesgos de infecciones por bacterias y virus de origen humano o animal.

Objetivo de la invención

Es un objetivo de la presente invención proporcionar un sistema para la expresión de anticuerpos, o de fragmentos o derivados de los mismos, que no tengan los inconvenientes establecidos anteriormente.

Es otro objetivo de la presente invención proporcionar un sistema que permita la producción de anticuerpos, o de fragmentos o derivados de los mismos, con un aumento en la CCDA, en la CDC, en la apoptosis dependiente de anticuerpo o en la opsonización dependiente de anticuerpo.

Es otro objetivo de la presente invención proporcionar un sistema que permita la producción de anticuerpos, o de fragmentos o derivados de los mismos, con una especificidad múltiple.

Es otro objetivo de la presente invención proporcionar un sistema que permita la producción de anticuerpos, o de fragmentos o derivados de los mismos, con una semivida sérica prolongada.

Estos objetivos se consiguen con un sistema según la reivindicación independiente. Las reivindicaciones dependientes describen realizaciones preferidas, mientras que otras reivindicaciones independientes describen variantes y/o alternativas.

Sumario de la invención

Según la invención, se proporciona un sistema para la expresión heteróloga de un anticuerpo monoclonal (AcMc) o de un fragmento o de un derivado del mismo, comprendiendo dicho sistema

a) al menos una célula hospedadora ciliada, y

b) incorporada en dicha célula hospedadora ciliada, al menos una molécula de un ácido nucleico heterólogo que codifica dicho anticuerpo monoclonal, o un fragmento o un derivado del mismo.

El sistema comprende adicionalmente una secuencia de señalización unida operativamente a dicha molécula de ácido nucleico, siendo la secuencia de señalización responsable de la secreción del anticuerpo monoclonal, o del fragmento del mismo, codificado por dicha molécula de ácido nucleico, en el medio extracelular. El ciliado es un miembro de la familia *Tetrahymenidae*, y el derivado de unión al antígeno es al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en scFv, o construcciones de anticuerpos biespecíficos, triespecíficos o superiores.

El término "expresión heteróloga", según se usa en el presente documento, debe referirse a la expresión de una proteína de un gen, de un ácido nucleico o de un ADNc, que es foránea al organismo en el que se produce la expresión.

Según se usa en el presente documento, el término "molécula ácido nucleico" pretende indicar cualquier molécula mono o bicatenaria de un ácido nucleico que comprende ADN (ADNc y/o ADN genómico), ARN (preferentemente ARNm), PNA, LNA y/o Morfolino. Preferiblemente, dicha molécula de ácido nucleico comprende un ADNc que codifica un anticuerpo monoclonal, o un fragmento o un derivado del mismo.

El término "ADNc", según se usa en el presente documento, debe referirse a una molécula de ADN que codifica una proteína que va a ser expresada, y que está desprovista de cualquier parte no codificante, tal como intrones. En muchos casos, un ADNc se ha sintetizado directamente a partir de un molde de ARN utilizando una transcriptasa inversa y un cebador de oligo dT. Sin embargo, el término debe comprender asimismo los genes sintéticos y los que codifican ADN obtenidos de otro modo.

Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos monoclonales dados contra las dianas dadas pueden obtenerse de la bibliografía. En la Patente Europea EP0590058B1, por ejemplo, se divulgan las secuencias de aminoácidos del dominio V_L y del dominio V_H del anticuerpo monoclonal humanizado anti-Her-2/neu Herceptin (Trastuzumab). Otras referencias describen incluso las secuencias de aminoácidos de IgG completas. Con esta información, la persona experta podría diseñar un ADNc que codifica dicho anticuerpo, y usarlo para el fin de la presente invención.

Otros recursos son, por ejemplo, la base de datos pública DrugBank (<http://www.drugbank.ca>), que proporciona la información de la secuencia de la mayoría de los anticuerpos monoclonales, o de fragmentos o derivados de los mismos.

Según se usa en el presente documento, el término "anticuerpo monoclonal (AcMc)", debe referirse a una composición de anticuerpo que tiene una población de anticuerpos homogénea, es decir, una población homogénea que consiste en una inmunoglobulina completa. Particularmente preferido, dicho anticuerpo se selecciona entre el grupo que consiste en IgG, IgD, IgE, IgA y/o IgM.

Según se usa en el presente documento, el término "fragmento" debe referirse a fragmentos de dicho anticuerpo que conservan, en algunos casos, capacidades de unión a una diana, por ejemplo

- una CDR (región determinante de la complementariedad)
- una región hipervariable,
- un dominio variable (Fv)
- una cadena pesada de una IgG (que consiste en las regiones V_H , C_{H1} , de bisagra, C_{H2} y C_{H3})
- una cadena pesada de una IgG (que consiste en las regiones V_L y C_L), y/o
- un Fab y/o F(ab)2.

y tiene al menos un efecto seleccionado entre el grupo que consiste en

- un aumento en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA)
- un aumento en la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC),
- un aumento en la apoptosis dependiente de anticuerpo, y/o
- un aumento en la opsonización dependiente de anticuerpo o una semivida sérica prolongada.

Según se usa en el presente documento, el término "derivado" debe referirse a construcciones de proteínas que son formas estructuralmente diferentes, pero que todavía conservan alguna relación estructural con el concepto de anticuerpo habitual, por ejemplo, scFv, así como construcciones de anticuerpos biespecíficos, triespecíficos o superiores, y tienen al menos un efecto seleccionado entre el grupo que consiste en

- un aumento en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA)
- un aumento en la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC),
- un aumento en la apoptosis dependiente de anticuerpo, y/o
- un aumento en la opsonización dependiente de anticuerpo o una semivida sérica prolongada.

Todos estos puntos se explican a continuación.

El término "célula hospedadora", según se usa en el presente documento, tiene dos significados diferentes que pueden ser comprendidos según el correspondiente contexto. En el contexto de la expresión de proteínas heterólogas, el término "célula hospedadora" se refiere a una célula transgénica que se usa como hospedador de expresión. Dicha célula, o su progenitora, ha sido por lo tanto transfectada con un vector adecuado que comprende el ADNc de la proteína que va a expresarse.

Según se usa en el presente documento, el término "célula hospedadora ciliada" debe referirse a una célula de la división *Ciliophora* (anteriormente: *Ciliata*), por ejemplo, protozoos caracterizados por la presencia de orgánulos pseudopilosos denominados cilios, y un dimorfismo nuclear.

Según se usa en el presente documento, el término "incorporado" debe referirse al hecho de que dicho ácido nucleico ha entrado en la célula hospedadora de tal forma que está listo para la expresión de la proteína. Dicha incorporación puede ser de diferentes tipos en los ciliados, por ejemplo "incorporación episómica" (por ejemplo, la molécula de ácido nucleico, como un plásmido, no ha entrado en el núcleo de la célula, pero se replica y es traducido en el citoplasma), y una "incorporación integradora" (por ejemplo, la molécula de ácido nucleico se ha integrado en el genoma de la célula).

Los ciliados tienen algunas propiedades sorprendentes que los hacen adecuados para su uso como hospedadores de expresión de anticuerpos monoclonales, o de fragmentos o de derivados de los mismos. Al contrario que *E. coli*, pueden producir no sólo scFv y Fab, sino también inmunoglobulinas a escala completa (IgG). Adicionalmente, el anticuerpo producido puede ser secretado al medio, por lo que no es necesaria la lisis celular y la extracción del sedimento de células.

El documento WO2007/028106 desvela la producción de anticuerpos en líneas de células de mamífero.

En comparación con las líneas de células de mamífero, la expresión de anticuerpos es muy barata, ya que los ciliados tienen una baja demanda con respecto al medio de cultivo, y pueden ser cultivados en cultivos líquidos.

Adicionalmente, los inventores se han dado cuenta de que para los ciliados, al contrario que para las bacterias o para los eucariotas superiores, hasta ahora no se conocen virus específicos. Esto podría ser debido al dimorfismo nuclear, que es habitual en los ciliados. Otra razón para esto podría ser el inhabitual uso de los codones, y el genoma rico en AT de los ciliados. Los inventores asumen por lo tanto que los virus patógenos de otros organismos superiores no pueden amplificarse en la mayoría de los ciliados. El hecho de que, según se sabe hasta ahora, los ciliados no son susceptibles a los virus, surge como una sorprendente ventaja. Esto significa que en los procesos de producción basados en ciliados, no se produce la amplificación ni el crecimiento de virus adventicios. Adicionalmente, esto significa que en el caso de que se produzca una proteína para uso terapéutico, pueden omitirse los costosos procedimientos de eliminación de virus necesarios en los procesos industriales con cultivos de células humanas y de animales.

Sin embargo, los sistemas de ciliados tienen otras ventajas con respecto a la expresión de anticuerpos monoclonales. Estas se analizarán a continuación.

A pesar de dichas ventajas, los sistemas de expresión de ciliados todavía son relativamente desconocidos, y cuando a la persona experta en la materia se le pregunta sobre potenciales sistemas de expresión de proteínas heterólogas, pensaría más bien en *E. coli*, en levaduras, en sistemas de células de insectos (baculovirus) y en líneas de células de mamífero.

Algunos de los métodos para la transformación de ciliados, que pueden usarse en el contexto de la presente invención, comprenden, entre otros, una microinyección, una electroporación y un bombardeo con partículas, y se describen, por ejemplo, en Tondravi & Yao (1986), en Gaertig & Gorovsky (1992) y en Cassidy-Hanley et al (1997).

Se han descrito métodos para la transformación y la expresión de proteínas heterólogas para unos pocos protistas (documento WO 00/58483 y documento WO 00/46381). La generación de transformantes mitóticamente estables del ciliado *Tetrahymena thermophila* puede conseguirse después de una transfección del macronúcleo somático o del micronúcleo generativo mediante una microinyección, una electroporación o mediante un bombardeo con partículas.

La selección de los transformantes puede llevarse a cabo utilizando diferentes marcadores de selección, como la resistencia a la neomicina (Weide et al. 2006, BMC) y la integración de los genes heterólogos mediante una recombinación de ADN homólogo, que da como resultado células estables de *Tetrahymena* auxótrofes para timidina (Weide et al. 2006, BMC). Además, también se ha considerado el uso de la resistencia a la blasticidina S (Weide et al. 2007, BMC) o al paclitaxel (documento WO 00/46381).

Preferiblemente, el ácido nucleico codificante está optimizado con codones para un hospedador de expresión ciliado. La expresión "optimizado con codones", como se usa en el presente documento, se refiere a un proceso en el que el ADNc que codifica la proteína heteróloga que se va a expresar está adaptado a un uso de codones específico del hospedador que procede del esquema del código genético universal. Los ciliados tienen un genoma rico en AT,

consistiendo el ADN de *Tetrahymena* en aproximadamente un 75 % de AT (véase la Fig. 9). El uso de codones difiere del de otros organismos particularmente en la frecuencia de uso de codones para codificar un aminoácido dado ("sesgo codónico"). Si el ADNc no optimizado que codifica una proteína heteróloga usa codones que raramente se usan en los ciliados, esto podría afectar considerablemente a la eficacia de la expresión de la proteína.

Esto significa, a su vez, que la expresión de proteínas heterólogas puede mejorar drásticamente cuando la frecuencia de codón del gen en estudio está emparejada con la del sistema de expresión de ciliado. Además, muchos ciliados, entre ellos *Tetrahymena*, utilizan códigos de nucleótidos no canónicos con tripletes de UAA y de UAG que codifican glutamina, mientras que, en la mayoría de los demás organismos, estos codones se usan como codón de detención para terminar la traducción. Esto puede dar lugar al hecho de que los genes foráneos (no ciliados) portadores de tripletes de UAA y de UAG como codón de detención no sean usados de forma correcta. Con este fin, antes de la transformación de la célula hospedadora ciliada, el ADNc que codifica una proteína heteróloga debe ser optimizado en su código de tal forma que se corrijan los tripletes de UAA y de UAG por UAA. La optimización del código puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante una mutagénesis dirigida o mediante una síntesis *de novo* del ADNc.

En una realización preferida de la presente invención, dicho anticuerpo monoclonal (AcMc), o un fragmento o un derivado del mismo, tiene una estructura de N-glicano que está esencialmente exenta de fucosa. Las proteínas expresadas en sistemas de expresión eucariotas experimentan un proceso de modificación post-traduccional que implica una glicosilación. Los sistemas de expresión eucariotas que se han establecido hoy en día para la producción de IgG y de otros anticuerpos monoclonales que comprenden una región Fc añaden N-glicanos a las cadenas de polipéptidos. En la IgG, el N-glicano más importante está unido a la Asn 297 de ambas cadenas CH2 (véase la Fig. 1), que comprende, entre otros, residuos de ácido N-acetil-neuramínico (ácido siálico), de N-acetil-glucosamina, de galactosa, de manosa y de fucosa. Esto es de aplicación, básicamente, para los sistemas de expresión de plantas transgénicas, así como para las líneas de células de mamífero (véase la Fig. 2), las líneas de células de insecto, etc. En todos estos casos, el N-glicano comprende al menos un residuo de fucosa que está unido α -3-glicosídicamente o α -6-glicosídicamente al residuo de N-acetil-glucosamina unido al residuo de Asn de la cadena del polipéptido.

Por el contrario, los ciliados producen una estructura de N-glicano que es significativamente diferente de los patrones de glicosilación producidos por los sistemas de expresión mencionados anteriormente, ya que no contiene fucosa.

Según se usa en el presente documento, el término "esencialmente exento de fucosa" significa que la porción de los anticuerpos monoclonales, o de los fragmentos o de los derivados de los mismos, portadora de uno o más residuos de fucosa en uno o más N-glicanos, preferentemente en los N-Glicanos de la Asn 297, no excede el 10 %, preferentemente el 5 %, más preferentemente el 1 %, y lo más preferentemente el 0,1 % del total de anticuerpos monoclonales, o fragmentos o derivados de los mismos, producidos con el sistema según la invención.

Adicionalmente, la producción de anticuerpos recombinantes en líneas de células humanas (PerC6), así como en las líneas de células de mamífero habituales, da lugar a unos perfiles de glicosilación que varían según las condiciones de cultivo y en el transcurso del periodo de cultivo. Esta reducción en la fidelidad del patrón de glicosilación del anticuerpo contribuye a una disminución en la eficacia terapéutica y aumenta el riesgo de efectos adversos (Jefferis 2005). Por el contrario, los ciliados son capaces de secretar proteínas con una estructura de N-glicosilación de oligomanosa biantenaria muy reproducible (Banno et al. 1993). El consistente patrón de glicosilación similar da lugar a una semivida sérica uniforme, a una reducción en el riesgo de efectos adversos, y probablemente permite un efecto terapéutico uniforme y fácilmente controlable.

En otra realización preferida, dicho anticuerpo monoclonal (AcMc), o un fragmento o un derivado del mismo, tiene al menos un efecto seleccionado entre el grupo que consiste en

- un aumento en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA)
- un aumento en la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC),
- un aumento en la apoptosis dependiente de anticuerpo, y/o
- un aumento en la opsonización dependiente de anticuerpo.

Algunos estudios recientes han demostrado que los anticuerpos monoclonales que tienen una cantidad reducida de fucosa en su patrón de glicosilación, muestran una actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA) mucho mayor en comparación con los anticuerpos fucosilados. De nuevo, básicamente es la posición de la Asn 297, donde una ausencia de residuos de fucosa da lugar a un aumento en la CCDA. El mecanismo subyacente en el aumento de la CCDA de un anticuerpo con poca / ninguna fucosa parece estar mediado por un aumento en la afinidad de una región Fc así modificada a una Fc γ R, por ejemplo, Fc γ IIIa (CD16), el principal receptor Fc para la CCDA en las células efectoras inmunitarias humanas (Shields et al, 2002).

Las potenciales dianas de los anticuerpos terapéuticos según la presente invención, que desencadenan una CCDA, se muestran en la siguiente tabla, (las abreviaturas de las dianas se han tomado a partir de la bibliografía habitual):

Tabla 1

Diana	Indicación potencial	Ejemplo de anticuerpo
CD3	Enfermedad del injerto contra el hospedador, trasplante de riñón	OKT3
CD4	Linfoma de linfocitos T	HuMAX CD4
CD5	Antígeno de los linfocitos B/T: MCL, CLL, CTCL, autoinmune	
CD19	Linfoma no Hodgkin, neoplasias de linfocitos B y enfermedades autoinmunes	AFM12, XAcMc 5574; XAcMc587I
CD20	Linfoma no Hodgkin, artritis reumatoide, leucemia linfocítica crónica, linfoma folicular no Hodgkin, linfoma difuso de linfocitos B grandes	Rituxan, Bexxar, HuMAX CD20, Zevalin
CD22	Linfoma no Hodgkin	LymphoCide
CD30	Tratamiento del linfoma de Hodgkin y del linfoma de células grandes anaplásicas	XAcMc25I3; MDX060 (5F11)
CD33	Leucemia mieloide aguda	Mylotarg
CD38	Mieloma múltiple	HuMAX CD38
CD40	Patogenia de la enfermedad de Alzheimer; neoplasias de linfocitos B y enfermedades autoinmunes	XAcMc 5485
CD52	Leucemia linfocítica crónica de linfocitos B	Campath
CD70	Neoplasias hematológicas	SGN70 y SGN75
CEA	Cáncer colorrectal / de pulmón / de mama	CEA-Scan
CTAA 16.88	Cáncer colorrectal / de mama / de próstata / de pulmón / de ovario / de páncreas	HumaSpect-Tc
GD2	Cánceres sólidos	BIW-8137
VEGF-R/FLT-1	Cáncer de mama y de colon	BIW-8556
GM2	Cáncer de pulmón y brheumatoid arthritisin	BIW-8962
Receptor de la IL-5	Asma	BIW-8405
EGFR/Her2-neu	Cáncer colorrectal metastásico y cáncer de cabeza y cuello, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello (SCCHN)	Erbix, HuMAX EGFr
EpCAM	Cáncer de colon, de mama y de próstata (tumores sólidos)	MT201, Panorex
ErbB2	Cáncer de mama metastásico que sobreexpresa el erbb2	Herceptin
FOLR1	Cáncer de ovario	
PLAC1	Cáncer de mama, NSCL, cánceres de ovario	GT468
CLDN18.2	Cánceres gástricos y de páncreas	GC182
Histona H1	Gliomasarcoma de pulmón / cáncer de útero	Cotara
CD317	Mieloma múltiple	anti-HM1.24
Muc1	Carcinoma de colon	PankoMab
PSMA	Cáncer de próstata	ProstaScint
VEGF	Cáncer colorrectal metastásico	Avastin

Es importante comprender que la persona experta tiene un acceso completo a los protocolos de fabricación y a las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos mencionados anteriormente, y por lo tanto será capaz de aplicar las enseñanzas de la presente invención a todos esos anticuerpos, por ejemplo, con objeto de mejorar la CCDA provocada por estos últimos.

La empresa estadounidense Xencor ha desarrollado una serie modular de componentes de anticuerpos mediante la modificación de las regiones Fc de anticuerpos con cambios en aminoácidos seleccionados. En algunos casos, se ha demostrado, según se informa, que estas Fc aumentan la CCDA más de 100 veces, dando como resultado, entre otros, una destrucción por parte de la CCDA incluso contra las líneas de células que expresan unos bajos niveles de antígeno, y la reducción de las dosis del AcMc mientras se mantiene el mismo efecto citotóxico. Sin embargo, los autores no extraen una relación causal entre sus modificaciones, que parecen estar basadas en un proceso de mutación/selección aleatorio, y los efectos resultantes, es decir, un aumento en la CCDA. Por esta razón, el concepto no es totalmente reproducible, y no se sabe si podrá ser generalizado o no a otros anticuerpos.

La empresa japonesa BOWA ha desarrollado una línea de células de CHO (ovario de hámster chino) para la expresión de AcMc con un aumento en la CCDA. En esta línea celular, el gen que codifica la enzima α -1,6 fucosiltransferasa ("FUT8") se ha inactivado. Por lo tanto, durante la glicosilación post-traduccional, no pueden

añadirse residuos de fucosa al sitio de N-glicosilación de los anticuerpos. Se reivindica que los AcMc así producidos muestran un aumento en la actividad de CCDA. El método se describe en el documento EP1176195. Un importante inconveniente de esta técnica es que no asegura un producto 100 % exento de fucosa. La desfucosilación es muy dependiente de la actividad enzimática potencialmente remanente de la α -1,6 fucosiltransferasa, y por lo tanto está sometida a una significativa variación, particularmente en una comparación entre lotes. Adicionalmente, el sistema sólo está disponible en células CHO (las denominadas células CHO inactivadas para FUT8), que son unos hospedadores de expresión subóptimos para algunas aplicaciones de expresión de AcMc.

La empresa estadounidense Glycart ha desarrollado líneas de células para la producción de AcMc que portan un gen heterólogo que codifica la enzima modificadora de oligosacáridos beta (1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnT III). Cuando estas células son posteriormente transfectadas con un ADN que codifica un AcMc, producirán los AcMc, que en primer lugar experimentan un proceso normal de glicosilación, que incluye la incorporación de residuos de fucosa. En una segunda etapa, los residuos de fucosa son escindidos a continuación mediante la enzima GnT III. Las proteínas resultantes están por lo tanto más o menos no fucosiladas y muestran un aumento en la CCDA. De nuevo, esta técnica no asegura un producto 100 % exento de fucosa. La desfucosilación es muy dependiente de la actividad de dicha enzima GnT III, y por lo tanto está sometida a una significativa variación, particularmente en una comparación entre lotes.

La empresa estadounidense Eureka Therapeutics está anunciando que han desarrollado un método para mejorar la CCDA en anticuerpos terapéuticos que han denominado MAGE ("aumento en la CCDA a través de una modificación en la glicosilación"). Sin embargo, no se han revelado los detalles técnicos del método.

Sorprendentemente, los inventores de la presente invención han averiguado en sus experimentos que los ciliados producen anticuerpos que pueden inducir una CCDA, a pesar de que la estructura del N-glicano es diferente de la de los anticuerpos típicos expresados en células de mamífero. Posteriormente, los inventores de la presente solicitud averiguaron en sus experimentos que los ciliados producen anticuerpos con una estructura del N-glicano en la región Fc, que no contiene fucosa. Esto puede ser una explicación para el aumento en la función efectora de CCDA, en comparación con los anticuerpos expresados en células de mamífero.

El sistema según la invención proporciona por lo tanto un método económico, simple y fiable para la producción de anticuerpos monoclonales, o de fragmentos o derivados de los mismos, que tienen un drástico aumento en la CCDA, y por lo tanto, un potencial terapéutico muy aumentado.

Es importante mencionar que los sistemas de expresión basados en levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces sp.* o *Pichia sp.*) también producen N-glicanos no fucosilados (véase la Fig. 2) ricos en manosa. Aunque estos sistemas de expresión son el objeto de una intensiva investigación, particularmente para la producción de anticuerpos, o de fragmentos o derivados de los mismos (Wei et al, 2008), parece que el foco de investigación más importante se refiere a la modificación del patrón de glicosilación de un sistema de expresión basado en levadura de tal forma que sea similar a los patrones de glicosilación humanos (Gerngross, 2004). Esto, a su vez, podría ser útil no sólo para los anticuerpos, o los fragmentos y los derivados de los mismos, sino también para otros productos biofarmacéuticos expresados.

Actualmente no hay informes disponibles que indiquen que los anticuerpos, o los fragmentos o los derivados de los mismos, producidos en cepas de levadura, tengan un aumento en la CCDA, o en la CDC, o en la apoptosis dependiente de anticuerpo, ni que la ausencia de fucosilación tenga ningún otro efecto en particular. Esto indica de nuevo que únicamente la ausencia de fucosilación no significa automáticamente un aumento en la CCDA - un hecho bien conocido por la persona experta.

Adicionalmente, parece que los anticuerpos terapéuticos, o los derivados o los fragmentos de los mismos, producidos con el sistema según la invención, también tienen un aumento en la CDC.

Adicionalmente, parece que los anticuerpos terapéuticos, o los derivados o los fragmentos de los mismos, producidos con el sistema según la invención, también tienen un aumento en los efectos apoptóticos dependientes de anticuerpo.

Adicionalmente, parece que los anticuerpos terapéuticos, o los derivados o los fragmentos de los mismos, producidos con el sistema según la invención, también tienen un aumento en los efectos de opsonización dependiente de anticuerpo.

En una realización particularmente preferida, se prevé la introducción de sitios de N-glicosilación adicionales en el anticuerpo, o en el fragmento o en el derivado del mismo, que va a ser expresado. Esto puede realizarse mediante la introducción, por ejemplo, mediante una mutagénesis dirigida o mediante el intercambio deliberado de residuos de aminoácidos, de motivos de N-glicosilación adicionales, es decir, secuencias tripeptídicas de Asn-X-Ser o de Asn-X-Thr, en las que X puede ser cualquier aminoácido, aunque la Pro y la Asp raramente se encuentran. Si, por ejemplo, el anticuerpo, o el fragmento o el derivado del mismo, tiene en algún punto de su cadena, el motivo "Gly-X-Ser", se podría sustituir la "Gly" por una "Asn", con objeto de crear un sitio adicional de N-glicosilación. Por supuesto, es

necesario asegurarse de que la sustitución no afecta a propiedades importantes de la proteína, como la afinidad por la diana, la unión a los receptores Fc gamma (Fc γ R) o similares.

Sin embargo, el excepcional patrón de N-glicosilación, descarta, en principio, el uso de *Tetrahymena thermophila* como sistema de expresión para anticuerpos de uso terapéutico, ya que la persona experta consideraría que dicho patrón de glicosilación anormal afecta a la inmunocompatibilidad de los anticuerpos así producidos. Sin embargo, los inventores han demostrado que estas presunciones no son correctas.

Adicionalmente, los sistemas de expresión de ciliados tienen otras ventajas en comparación con otros sistemas de expresión de proteínas, como las líneas de células de mamífero, que se analizan a continuación.

En otra realización preferida, dicho anticuerpo monoclonal (AcMc), o un fragmento o un derivado del mismo, tiene una semivida sérica prolongada.

La semivida sérica es un aspecto importante en los anticuerpos monoclonales usados con fines terapéuticos, ya que una prolongación de la misma podría ayudar a reducir la dosis y/o la frecuencia de administración. Dado que los anticuerpos monoclonales no pueden ser administrados por vía oral, esto ayudaría a mejorar el cumplimiento por parte del paciente, mientras que se reducirían los costes debido a la reducción en las dosis y a la minimización en los riesgos relacionados con la vía de administración.

Una importante ruta para la eliminación de las proteínas disueltas en el suero es el aclaramiento mediado por el receptor de asialoglicoproteína en el hígado. Habitualmente, las proteínas de los mamíferos son N-glicosiladas con N-glicanos bifurcados que tienen dos más residuos terminales de ácido siálico (ácido N-acetil-neuramínico), que están respaldados por residuos de beta-galactosa (véase la Fig. 2). Esto se aplica tanto a las proteínas intrínsecas del sujeto como a las proteínas heterólogas expresadas, por ejemplo, en una línea de células de mamífero, y administradas a dicho sujeto.

Durante la vida útil de la proteína, los residuos terminales de ácido siálico son eliminados gradualmente de la cadena de glicano debido a las neuraminidasas ubicuas, hasta que son expuestos los residuos de galactosa. A continuación estos son reconocidos por los receptores de asialoglicoproteína, que son unas lectinas abundantes en los residuos de galactosa que se unen en el hígado de muchas proteínas plasmáticas desialiladas. Después de ser reconocidas, dichas proteínas son sometidas a una endocitosis, y después serán degradadas en el hígado.

Como se ha demostrado anteriormente, las proteínas heterólogas expresadas en los ciliados no tienen ningún residuo terminal de ácido siálico, que pudiera ser eliminado por las neuraminidasas flotantes libres, ni residuos de galactosa que pudieran servir como diana para los receptores de asialoglicoproteína. Por esta razón, los anticuerpos monoclonales, o los fragmentos o los derivados de los mismos, que han sido expresados heterológamente en ciliados, no están sometidos al aclaramiento mediado por el receptor de asialoglicoproteína, y por lo tanto tienen una semivida sérica aumentada. La metodología de expresión en ciliados tiene algunas ventajas significativas con respecto a otras metodologías para prolongar la semivida sérica del anticuerpo, todas las cuales implican modificaciones más o menos drásticas del concepto básico de anticuerpo, cuyas consecuencias para la inmunogenicidad y similares son difíciles de predecir. Estas metodologías se analizan a continuación.

La empresa estadounidense Domantis intenta prolongar la semivida sérica utilizando un dominio anti-albúmina unido a los anticuerpos, mientras que Genentech Inc. ha desarrollado una metodología en la que el contenido en galactosa de los CH₂-N-glicanos está aumentado. PDL BioPharma Inc. desarrolló una metodología en la que algunos residuos de aminoácidos de la región Fc están sustituidos por otros, dando lugar así a una prolongación de la semivida sérica. Adicionalmente, el concepto de PEGilación es bien conocido por el experto con objeto de prolongar la semivida sérica de una proteína.

En otra realización preferida más de la invención, dicho sistema comprende adicionalmente

c) un promotor unido operativamente a dicha molécula de ácido nucleico, y/o

d) una secuencia de señalización unida operativamente a dicha molécula de ácido nucleico, secuencia de señalización que es responsable de la secreción del anticuerpo monoclonal, o del fragmento del mismo, codificado por dicha molécula de ácido nucleico, en el medio extracelular.

El término "unido operativamente", según se usa en el presente documento, significa que una secuencia de nucleótidos, que puede codificar para un producto génico, está unida a un promotor y/o a una secuencia de señalización de tal forma que el promotor regula la expresión del producto génico en las condiciones apropiadas.

El término "promotor", según se usa en el presente documento, debe referirse a una región reguladora del ADN ubicada generalmente secuencia arriba (hacia la región 5' de la hebra sentido) de un gen o de un ADNc, que contiene elementos genéticos esenciales que permiten o incluso mejoran la transcripción del gen o del ADNc.

El término "secuencia de señalización", según se usa en el presente documento, debe referirse a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un oligopéptido ("péptido de señalización" o "péptido de tránsito") que dirige el transporte de una proteína a ciertos orgánulos tales como el núcleo, la matriz mitocondrial, el retículo endoplásmico, el cloroplasto, el apoplasto y el peroxisoma. Prácticamente la totalidad de las proteínas que son transportadas al retículo endoplásmico tienen una secuencia que consiste en 5-10 aminoácidos hidrófobos en el N terminal. Estos péptidos de señalización son escindidos de la proteína por una peptidasa de señalización después de la inserción co-traducciona de la proteína en la luz del RE. Después, la mayor parte de las proteínas son transportadas a través del aparato de Golgi secuencia abajo de la ruta secretora.

Algunos promotores adecuados para la expresión de anticuerpos en ciliados se divulgan, por ejemplo, en el documento WO2007006812A1 que también está registrado por el solicitante de la presente invención, cuyo contenido debe ser incorporado al presente documento como referencia. En el mismo se divulga un promotor termoinducible y un promotor de metalotioneína que también pueden ser usados para los fines de la presente invención.

Algunas secuencias de señalización adecuadas se divulgan, por ejemplo, en el documento WO03078566A1 que también está registrado por el solicitante de la presente invención, cuyo contenido debe ser incorporado al presente documento como referencia. En el mismo se divulgan dos péptidos de señalización particularmente preferidos en el contexto de la presente invención, a saber, el péptido de señalización endógeno de la cadena pesada y ligera del anticuerpo, y el péptido de señalización de la lipasa del ciliado.

Adicionalmente, se proporciona un vector para la transfección de una célula hospedadora ciliada, comprendiendo dicho vector al menos una molécula de un ácido nucleico que codifica un anticuerpo monoclonal (AcMc), o para un fragmento o un derivado del mismo.

El término "vector", según se usa en el presente documento, se refiere a un vehículo molecular usado para la transferencia de material genético foráneo en otra célula. El propio vector es generalmente una secuencia de ADN que consiste en un inserto (secuencia de interés) y una secuencia mayor que sirve como "esqueleto" del vector. El fin de un vector de transferir información genética a otra célula es normalmente para aislar, multiplicar o expresar el inserto en la célula diana.

El término "plásmido", según se usa en el presente documento, se refiere a vectores de plásmidos, es decir, a secuencias de ADN circulares que son capaces de una replicación autónoma en un hospedador adecuado gracias a un origen de replicación ("ORI"). Adicionalmente, un plásmido puede comprender un marcador seleccionable para indicar el éxito de la transformación, u otros procedimientos destinados a la introducción de ADN foráneo en una célula, y un sitio de clonación múltiple que incluye múltiples sitios consenso de enzimas de restricción para permitir la inserción de un inserto. Los vectores de plásmidos denominados vectores de clonación o donantes se usan para facilitar la clonación y para amplificar una secuencia de interés. Los vectores de plásmidos denominados vectores de expresión o aceptores son específicamente para la expresión de un gen de interés en una célula diana definida. Esos vectores de plásmidos muestran generalmente un casete de expresión, que consiste en un promotor, el transgen y una secuencia de terminación. Los plásmidos de expresión pueden ser plásmidos lanzadera que contienen elementos que permiten la propagación y la selección en diferentes células hospedadoras.

En otra realización más de la presente invención, se proporciona un sistema para la expresión heteróloga de un anticuerpo monoclonal (AcMc) o de un fragmento o un derivado del mismo, comprendiendo dicho sistema una célula hospedadora ciliada que se ha obtenido mediante la conjugación de al menos dos células hospedadoras ciliadas según la invención, en el que el ciliado es un miembro de la familia *Tetrahymenidae*.

Todos los ciliados muestran un dimorfismo nuclear, con dos tipos de núcleos estructural y funcionalmente diferentes. El gran macronúcleo somático (MAC) es expresado activamente durante la multiplicación vegetativa. El MAC contiene 45 copias de cromosomas y se divide mediante una amitosis. El pequeño micronúcleo diploide (MIC) es la línea germinal y contiene 5 pares de cromosomas. El MIC almacena la información genética de la progenie sexual. Durante la fase vegetativa, el MIC se divide mitóticamente. El ciclo de vida de los ciliados consiste en haplofases y diplofases alternantes con respecto a la línea germinal. La reproducción de la célula es exclusivamente asexual y se produce únicamente en la diplofase.

La metodología anterior utiliza una característica única de las células hospedadoras ciliadas, a saber, que pueden intercambiar material genético mediante una conjugación. En ciertas condiciones, los ciliados entrarán en un ciclo de conjugación, la fase sexual del ciclo vital. En *Tetrahymena*, por ejemplo, las células pueden ser inducidas a conjugación mediante la mezcla de células pertenecientes a al menos dos de los siete tipos diferentes de acoplamiento, y con una privación moderada de alimento. Durante esta etapa, dos pares de células van a intercambiar los núcleos gaméticos haploides. Los acontecimientos de conjugación nuclear normalmente incluyen una meiosis, la formación de los núcleos de los gametos, la fertilización y la diferenciación nuclear. La conjugación incluye la única - y muy breve - fase haploide del ciclo vital del ciliado; sigue a las meiosis y finaliza rápidamente en la fertilización. Este proceso está conservado entre la mayoría de los ciliados.

La metodología reivindicada utiliza la característica única de las células hospedadoras ciliadas, a saber, el intercambio de material genético durante una conjugación. Las principales estaciones del proceso de conjugación se muestran en la Fig. 6.

5 Al inicio de la conjugación, los micronúcleos de las células apareadas experimentan una meiosis, produciendo cuatro pronúcleos haploides. Tres de estos pronúcleos son destruidos, mientras que el que queda se divide para formar dos núcleos gaméticos: un pronúcleo "migratorio" y un pronúcleo "estacionario". Los pronúcleos migratorios son intercambiados a través de una unión temporal de las dos células; después, éstas se fusionan con un pronúcleo estacionario para formar un núcleo cigótico en cada célula.

10 El núcleo cigótico se divide dos veces para formar cuatro núcleos genéticamente idénticos, mientras que el viejo macronúcleo es degradado. Dos de los cuatro clones cigóticos (los productos anteriores) se desarrollan en nuevos macronúcleos, que experimentan un amplio abanico de reordenaciones genómicas, que incluyen la ruptura del cromosoma, una eliminación programada del ADN y una adición de telómero. En *Tetrahymena*, estos procesos
15 generan aproximadamente 300 cromosomas macronucleares individuales. Después, cada cromosoma es amplificado hasta 45 copias, completando el desarrollo del genoma macronuclear.

Uno de los dos clones cigóticos restantes es degradado; el otro, el nuevo micronúcleo, se divide mitóticamente durante el primer ciclo reproductor asexual. Las células hijas reciben, cada una, un micronúcleo y un macronúcleo en esta división, produciendo el complemento normal de núcleos que se encuentra en las células de ciliados que crecen vegetativamente.

25 El principio de conjugación está ausente en los sistemas de expresión procariotas, así como en la mayoría de los otros sistemas de expresión eucariotas, como las levaduras, los sistemas de células de insecto (baculovirus), los sistemas de expresión de mamífero, como las células CHO, o las plantas o los mamíferos transgénicos. Las células hospedadoras ciliadas que se usan para la expresión recombinante de anticuerpos biespecíficos o superiores utilizando la conjugación de dos células hospedadoras que expresan anticuerpos diferentes según el sistema anterior deben cumplir algunos requisitos:

- 30 a) las al menos dos células ciliadas deben ser de dos tipos diferentes de acoplamiento
b) las al menos dos células ciliadas deben tener incorporada una molécula de ácido nucleico, que codifica un anticuerpo monoclonal (AcMc), o para un fragmento o un derivado del mismo, en su micronúcleo.

35 Mediante la conjugación de las células puede producirse una célula que porta una combinación de ambas moléculas de ácidos nucleicos, y por lo tanto pueden producir un nuevo anticuerpo monoclonal o una construcción de anticuerpo, o fragmentos o derivados de los mismos, formados por la combinación de los dos anticuerpos parentales, que constituyen, por ejemplo, ambas especificidades de antígeno.

40 La siguiente tabla proporciona una visión global de algunas potenciales constelaciones que están en el ámbito de dicha invención. Se indican los posibles anticuerpos de recombinación resultantes, los fragmentos o los derivados de los mismos después de la conjugación de dos células hospedadoras que portan, cada una, un ácido nucleico que codifica un anticuerpo monoclonal.

Tabla 2

célula 1 antes de la conjugación	célula 2 antes de la conjugación	después de la conjugación
IgG A completa	IgG B completa	F(ab) ₂ de la IgG A completo biespecífico + Fc B
cadena pesada (V _H) + cadena ligera (V _L)	cadena pesada (V _H) + cadena ligera (V _L)	IgG completa
cadena pesada (V _H) + cadena ligera (V _L) contra la diana 1	cadena pesada (V _H) + cadena ligera (V _L) contra la diana 2	quadroma (biespecífico)
scFv específico contra la diana 1 (por ejemplo, el EGFR)	scFv específico contra la diana 2 (por ejemplo, el CD3)	diacuerpo o scFv en tándem
cadena pesada (V _H) + cadena ligera (V _L) contra la diana de la célula tumoral (por ejemplo, el EGFR)	cadena pesada (V _H) + cadena ligera (V _L) contra el receptor de los linfocitos T (por ejemplo, el CD3)	anticuerpo triespecífico que se une a células tumorales, a linfocitos T y a células efectoras
Fab del anticuerpo A	Fab del anticuerpo B	F(ab) ₂ biespecífico
Fab del anticuerpo A	Fab del anticuerpo B	F(ab) ₂ con un sitio de unión al antígeno biespecífico (V _L (A) + V _H (B))
IgG (A + B) completa biespecífica	IgG C completa	IgG completa triespecífica: F(ab) ₂ A + B + Fc de C

45 En otra realización de la invención, se proporciona una célula hospedadora ciliada transfectada con al menos un vector según la invención, o se obtiene mediante la conjugación de al menos dos células hospedadoras ciliadas según la invención.

Adicionalmente, según otra realización de la presente invención, se proporciona una biblioteca que comprende al menos dos células hospedadoras ciliadas según la invención, o al menos dos sistemas según la invención, en los que cada célula hospedadora ha incorporado al menos una molécula de un ácido nucleico heterólogo que codifica un anticuerpo, o para un fragmento o un derivado del mismo, preferentemente en forma de un vector, y en los que se seleccionan al menos dos ciliados de tal forma que puedan conjugarse entre sí.

Dicha biblioteca podría comprender, por ejemplo, células hospedadoras ciliadas transfectadas de forma estable que portan, cada una, una molécula de un ácido nucleico que codifica un anticuerpo o para un fragmento o un derivado del mismo (véase a continuación) específico contra una diana dada (véanse, por ejemplo, las Tablas 1 y 3). Para cada ácido nucleico que debería codificar para un anticuerpo dado, o un fragmento o un derivado del mismo, debería haber disponibles células hospedadoras de al menos dos, preferentemente más, tipos de acoplamiento diferentes. En el caso de la creación de una construcción de un anticuerpo biespecífico, pueden seleccionarse de la biblioteca dos células hospedadoras que portan las moléculas de ácidos nucleicos para los dos anticuerpos o los fragmentos o derivados de los mismos necesarios para dicha construcción. Dichas células hospedadoras deberían ser de diferentes tipos de acoplamiento con objeto de conjugarse.

En una realización preferida del sistema según la invención, o de una célula hospedadora ciliada según la invención, dicho ciliado es un miembro de la familia *Tetrahymenidae*.

En una realización particularmente preferida, dicho ciliado transgénico es *Tetrahymena* sp. (particularmente *Tetrahymena thermophila*). *Tetrahymena* es un microorganismo eucariota unicelular no patógeno que se ha establecido en algunos laboratorios como hospedador de expresión. Presenta varias ventajas que lo hacen adecuado para la expresión de proteínas heterólogas. *Tetrahymena* es un modelo de organismo muy estudiado, y durante 50 años de investigación básica, no se observaron virus ni endoparásitos. Los análisis realizados con líneas celulares indicadoras no revelaron agentes infecciosos endógenos como virus o micoplasma, que puedan infectar a animales superiores.

En primer lugar, las consideraciones anteriores relacionadas con el uso de los codones en los ciliados, son aplicables también en *Tetrahymena*. Adicionalmente, se dispone de plásmidos con un elevado número de copias para *Tetrahymena*, que contienen un origen de replicación (ori) a partir de un ADNr minicromosómico. Este ADNr minicromosómico está presente hasta en 9.000 copias por célula. Además de que puede tener lugar una integración estable en el ADN macronuclear, en el que están presentes todos los genes en un número de copias de 45 veces. La elevada dosis de genes es la condición previa ideal para una biosíntesis eficaz de proteínas, y por lo tanto para una elevada productividad. Al contrario que las bacterias, los ciliados del género *Tetrahymena* secretan biológicamente proteínas muy eficazmente en el sobrenadante.

Tetrahymena es capaz de añadir modificaciones post-traduccionales a las proteínas, como puentes de disulfuro, anclajes de GPI, fosforilación, acetilación y glicosilación, que son más similares a las de las células de mamífero que a las detectadas en levaduras o en otros sistemas de expresión eucariotas.

Al contrario que las células de mamífero, *Tetrahymena* combina la facilidad de crecimiento con unos tiempos de generación cortos (1,5 - 3 h) y una reducción en los costes, ya que puede usarse un medio químicamente definido y no es necesario que existan péptidos o componentes séricos, como factores de crecimiento.

Se establece una fermentación por lotes, semicontinua y continua de *Tetrahymena*, con unas densidades celulares de hasta 2×10^7 células/ml y unos pesos en seco de hasta 80 g/l, y podrían demostrarse unos incrementos en la producción (aumento de escala) de hasta 1.000 l sin ningún problema. En estudios de viabilidad con proteínas indicadoras, ya podrían conseguirse unos rendimientos espaciotemporales de 50 - 90 pg/célula al día. Los primeros experimentos con expresión homóloga dieron como resultado un rendimiento de más de 200 mg/l al día en proteínas secretadas. *Tetrahymena* puede ser fermentada en instalaciones de producción convencionales para sistemas de expresión microbiológicos (bacterias o levaduras). Esto significa que no son necesarias costosas modificaciones en las plantas de producción existentes ni la construcción de nuevas instalaciones de producción.

En otra realización preferida de la presente invención, se proporciona un anticuerpo monoclonal (AcMc), o un fragmento o un derivado del mismo, siendo producido dicho anticuerpo o fragmento con un sistema según la invención, con una célula hospedadora ciliada según la invención y/o con un proceso según la invención. El ciliado es un miembro de la familia *Tetrahymenidae*

El anticuerpo monoclonal, el fragmento o el derivado según la invención, se une a al menos una de las dianas establecidas en la Tabla 1 (CCDA) o en la 3 (no CCDA)

Las dianas que no están implicadas en la CCDA están recogidas en la siguiente tabla.

Tabla 3

diana	indicación	ejemplo de anticuerpo
TNF- α	artritis reumatoide, psoriasis, Morbus Bechterew, Morbus Crohn	Adalimumab, Golimumab, Infliximab
CD25	profilaxis del rechazo del tejido después de un trasplante de riñón	Basiliximab, Daclizumab
CD3	tratamiento del rechazo del tejido después de un trasplante de órganos	Muromonab-CD3 (murino)
CD49d (integrina α_4)	esclerosis múltiple	Natalizumab
receptor de la interleucina 6	artritis reumatoide	Tocilizumab
Interleucina 12/23	psoriasis en placas	Ustekinumab
Antígeno de superficie del RSV	profilaxis del RSV en recién nacidos	Motavizumab Palivizumab
VEGF-A	degeneración macular húmeda	Lucentis
antígeno CD11a	psoriasis	Efalizumab
Inmunoglobulina E	asma bronquial	Omalizumab

De nuevo, es importante comprender que la persona experta tiene acceso total a los protocolos de elaboración y a las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos mencionados anteriormente, y por lo tanto será capaz de aplicar las enseñanzas de la presente invención a dichos anticuerpos, por ejemplo, con objeto de mejorar la semivida sérica de los mismos.

Adicionalmente, el anticuerpo monoclonal, el fragmento o el derivado según la invención, se selecciona entre el grupo que consiste en

- un AcMc murino, quimérico, humanizado y/o humano,
- una IgG, un scFv, un Fab y/o un F(ab)2,
- un formato de anticuerpo modificado

Los métodos para la producción y/o la selección de AcMc quiméricos, humanizados y/o humanos son conocidos en la materia. Por ejemplo, el documento US6331415 de Genentech describe la producción de anticuerpos quiméricos, mientras que el documento US6548640 de Medical Research Council describe técnicas de injerto de CDR, y el documento US5859205 de Celltech describe la producción de anticuerpos humanizados. Las colecciones de anticuerpos *in vitro* se divulgan, entre otros, en el documento US6300064 de MorphoSys y en el documento US6248516 de MRC/Scripps/Stratagene. Las técnicas de expresión en fagos se divulgan, por ejemplo, en el documento US5223409 de Dyax. Las plataformas de mamíferos transgénicos se describen, por ejemplo, en el documento US200302048621 de TaconicArtemis.

La IgG, el scFv, el Fab y/o el F(ab)2 son formatos de anticuerpos bien conocidos por la persona experta. Las técnicas de habilitación relacionadas están disponibles en los correspondientes libros de texto.

Según se usa en el presente documento, el término "Fab" se refiere a un fragmento de una IgG que comprende la región de unión al antígeno, estando formado dicho fragmento por un dominio constante y uno variable de cada cadena pesada y ligera del anticuerpo

Según se usa en el presente documento, el término "F(ab)2" se refiere a un fragmento de una IgG que consiste en dos fragmentos Fab conectados entre sí por puentes de disulfuro.

Según se usa en el presente documento, el término "scFv" se refiere a un fragmento variable de cadena única que es una fusión de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de las inmunoglobulinas, unidas junto con un conector corto, habitualmente de serina (S) o de glicina (G). Esta molécula quimérica conserva la especificidad de la inmunoglobulina original, a pesar de la eliminación de las regiones constantes y de la introducción de un péptido conector.

Algunos formatos de anticuerpos modificados son, por ejemplo, construcción de anticuerpos bi o triespecíficos, como por ejemplo, los proporcionados en la Tabla 2, proteínas de fusión basadas en anticuerpos, conjugados de anticuerpo-fármaco, inmunotoxinas y similares. Algunos de estos formatos están recogidos en la siguiente tabla.

Tabla 4

Empresa	Formato
Affirmed	scFv - diacuerpo - scFv
Unilever	Anticuerpos de camélido
Ablynx	VHH de camélido
Domantis	Regiones variables de la cadena pesada (V _H) o ligera (V _L)
Scancélula	Epítomos tumorales en una estructura de IgG con un dominio FC no modificado
Hybritech	Anticuerpos trifuncionales
Trion Pharma	IgG trifuncional
Affitech	Anticuerpos con epítomos de linfocitos T entre hebras β de dominios constantes, y nuevas regiones V específicas para las células presentadoras del antígeno
Affitech	Fragmentos de anticuerpo que pueden reticular el antígeno y las moléculas efectoras de anticuerpos
Vaccibody AS	Homodímeros bivalentes, consistiendo cada cadena en una unidad de direccionamiento scFv específica para las células presentadoras del antígeno
Planet Biotechnology	IgA (dos estructuras de IgG unidas por una cadena J y un componente secretor), expresada en un hospedador vegetal, estando el componente secretor sustituido por una proteína protectora
Trubion	Regiones variables de la cadena pesada (V _H) y ligera (V _L) + Fc
Haptogen	Complejo homodimérico de cadena pesada que se encuentra en tiburones nodriza inmunizados, que carece de cadenas ligeras
AdAlta	Biblioteca de dominios de anticuerpos recombinantes de tiburón
Xencor	Región Fc alterada para mejorar la afinidad por los receptores Fc, mejorando así la CCDA
Arana	Regiones en marco de platirinos + CDR de no platirinos
City of Hope	"Minicuerpo"
Seattle Genetics	Tecnología de conjugado de anticuerpo-fármaco con conectores escindibles enzimáticamente

En otras realizaciones preferidas, el anticuerpo monoclonal, el fragmento o el derivado según la invención, tiene al menos una característica seleccionada del grupo que consiste en

- 5
 - un aumento en la CCDA, en la CDC y/o en la apoptosis dependiente de anticuerpo,
 - una semivida sérica prolongada, y/o
 - bi, tri o multiespecificidad.
- 10 Según se usa en el presente documento, las expresiones "aumento en la CCDA", "aumento en la CDC", "aumento en la apoptosis dependiente de anticuerpo", "aumento en la opsonización dependiente de anticuerpo" y "semivida sérica prolongada" se refieren a una comparación con los anticuerpos que han sido producidos con sistemas de expresión de anticuerpos convencionales, por ejemplo, células de mamífero o de *E. coli*. La CCDA, la CDC, la apoptosis dependiente de anticuerpo y la semivida sérica pueden medirse con ensayos disponibles comercialmente.
- 15 Los términos "bi", "tri" o "multiespecificidad" se refieren a anticuerpos, a fragmentos o a derivados de los mismos que tienen al menos dos dominios que muestran afinidad frente a al menos dos epítomos diferentes, preferentemente de al menos dos dianas diferentes. Algunos ejemplos de dichos anticuerpos, fragmentos o derivados se proporcionan en la Tabla 2 y en la Fig. 4.
- 20 El fin de dichos anticuerpos, fragmentos o derivados de los mismos es poner en estrecho contacto dos o más entidades diferentes, a saber, utilizando una construcción de un anticuerpo biespecífico o superior. Esto es útil, por ejemplo, para redirigir los linfocitos T contra las células tumorales, en los casos en los que las células tumorales pueden escapar del ataque de los linfocitos T, por ejemplo, mediante una mutación o una pérdida de sus entidades de MHC de clase I, o mediante la secreción de sustancias mensajeras que suprimen la activación de los linfocitos T.
- 25 Una metodología es la combinación de dos anticuerpos scFv, uno de los cuales está dirigido contra un receptor de los linfocitos T (por ejemplo, el CD 3), mientras que el otro está dirigido contra un antígeno de una célula tumoral (por ejemplo, el EGFR).
- 30 Otra metodología es la conexión, mediante dos regiones determinantes de la complementariedad diferentes de ambas cadenas Fv, y mediante la región Fc, de una célula tumoral (por ejemplo, mediante la unión de un Fv al EGFR), de un linfocito T (por ejemplo, mediante otra unión de un Fv a un receptor de un linfocito T, como el CD3) y de una célula efectora, tal como un monocito, un macrófago o un linfocito citolítico natural (mediante la región Fc, que es detectada por los receptores Fc gamma de dichas células efectoras). Esta metodología combina el efecto antitumoral de los linfocitos T citolíticos, que inducen la lisis y la apoptosis de las células tumorales, y el de las

células efectoras, que eliminan las células tumorales mediante una fagocitosis o una apoptosis, mientras liberan citocinas que estimulan adicionalmente la actividad de los linfocitos T.

La siguiente tabla proporciona una revisión de algunos ejemplos de dianas de anticuerpos biespecíficos (primera y segunda columna) y anticuerpos trispecíficos (las tres columnas).

Otros epítomos diana adecuados están recogidos en la Tabla 1.

Tabla 6

Epítomo de la célula efectora	Epítomo de la célula efectora	Epítomo de activación del linfocito T
Fc γ RI	EGFR	CD3
Fc γ RIIa	EpCAM	CD64
Fc γ RIII	CD20	CD16
Fc γ RIII	CEA	CD89
Fc γ RIII	CD19	CD89

Algunas características de los anticuerpos biespecíficos, incluyendo los potenciales formatos, así como las dianas, se analizan en Kufer et. al (2004), mientras que las características de los anticuerpos trispecíficos, incluyendo los potenciales formatos, así como las dianas, se analizan, por ejemplo, en Ruf y Lindhofer (2001).

Adicionalmente, se proporciona un proceso para la producción de al menos un anticuerpo monoclonal (AcMc), o de un fragmento o un derivado del mismo, en una célula hospedadora ciliada, comprendiendo dicho proceso las etapas de

- a) transfectar al menos una célula hospedadora ciliada con al menos una molécula de un ácido nucleico que codifica dicho anticuerpo monoclonal, o para un fragmento o un derivado del mismo, o, preferentemente, con al menos un vector según la invención, y
- b) cultivar la célula hospedadora en unas condiciones que permitan la expresión de una proteína.

En otra realización preferida de la presente invención, se proporciona un proceso para la producción de al menos un anticuerpo monoclonal (AcMc), o de un fragmento o un derivado del mismo, en una célula hospedadora ciliada, comprendiendo dicho proceso las etapas de

- c) transfectar al menos dos células hospedadoras ciliadas diferentes con al menos una molécula de un ácido nucleico que codifica un anticuerpo, o para un fragmento o un derivado del mismo, o, preferentemente, con al menos un vector según la invención,
- d) conjugar dichas dos células hospedadoras ciliadas, o la progenie de las mismas, con objeto de obtener al menos una célula ciliada portadora de al menos dos moléculas diferentes de ácidos nucleicos que codifican al menos dos anticuerpos diferentes, o fragmentos o derivados de los mismos, y
- e) cultivar la célula ciliada así producida en unas condiciones que permitan la expresión de una proteína.

Adicionalmente, se proporciona un proceso para la producción de una composición farmacéutica, comprendiendo dicho proceso las etapas de

- a) expresar un anticuerpo, o un fragmento o un derivado proteico del mismo según la invención en un sistema de expresión ciliado según la invención, y
- b) aislar y/o purificar la proteína así obtenida.

Adicionalmente, se proporciona una composición farmacéutica, comprendiendo dicha composición un anticuerpo, o un fragmento o un derivado del mismo, según las reivindicaciones y/o producido con un método según las reivindicaciones.

Exención de responsabilidad

Ejemplos

1. Construcción de los vectores de expresión

Los genes sintéticos de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo Gk1.5 (véanse las SEQ ID NOs 1 y 2) se clonaron en el vector donante. Los casetes de expresión de todos los vectores donantes se transfirieron al vector aceptor (véase la Fig. 5) utilizando un sistema de recombinasa dependiente de Cre.

2. Cultivo de *Tetrahymena* natural y transformación de los plásmidos de expresión

Se cultivaron cepas naturales de *Tetrahymena thermophila* (por ejemplo, B 1868/4, B 1868/7 y B 2068/1) en medio con leche desnatada, en SPP o en un medio químicamente definido. La transformación de las células de *T. thermophila* se llevó a cabo según se ha descrito previamente en Cassidy-Hanley et al. 1997.

3. Detección del anticuerpo Gk1.5

Las células transformadas de *Tetrahymena* se cultivaron en medio SPP bajo una presión de selección a 30 °C en un agitador a 80 rpm. La expresión del gen diana fue inducida mediante un choque térmico a 41 °C (HSP-P) o mediante la adición de Cd²⁺ 20 nM (MTT 1P) de los cultivos en crecimiento logarítmico.

Las alícuotas del cultivo se recogieron 24 h después de la inducción de la expresión del gen diana. A continuación, se obtuvieron las células y el sobrenadante exento de células, respectivamente. Las células se solubilizaron en tampón RIPA enfriado en hielo (5.000 células/μl en NaCl 150 mM, Tris HCl 10 mM, EDTA 5 mM, un 0,1 % de SDS, un 0,1 % de DOC, un 1 % de Triton X100, 2,5 μg/ml de E64, a pH 7,4) y se incubaron durante 15 minutos en un aplicador de ultrasonidos. Se realizaron análisis de SDS-PAGE y de inmunotransferencia Western de acuerdo con la técnica. En resumen, las alícuotas de las células alteradas (es decir 10.000 células) o del sobrenadante exento de células se añadieron a tampón de muestra Laemmli (Tris HCl 125 mM a pH 6,8, un 10 % de glicerol, un 4 % de SDS) y se separaron utilizando SDS-PAGE al 8-16 %. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se bloquearon con PBS que contenía Tween 20 al 0,05 % y albúmina sérica bovina (PBS/TBSA) al 5 %. La expresión de la cadena pesada y ligera recombinante del anticuerpo en los Ciliados transformados fue detectada mediante un anticuerpo anti-IgG total de rata conjugado con Hrp. Después de lavar los transferidos, fueron desarrollados mediante una quimioluminiscencia utilizando el sustrato quimioluminiscente Super Signal West Pico (Perbio, Fischer Scientific) junto con el desarrollo de una película de rayos X convencional. La Fig. 8 muestra los inmunotransferidos Western de los lisados celulares y de los sobrenadantes de las células transformadas en diferentes puntos temporales después de la inducción de la expresión del gen diana.

4. Producción del anticuerpo Gk1.5

Para las fermentaciones se usó un multif fermentador Sixforce (de 0,5 litros) equipado con propulsores marinos estándar. La velocidad del agitador se limitó a 900 rpm; la pO₂ se estableció en un 25 % y el pH se estableció en 7,0, respectivamente. Las fragmentaciones se llevaron a cabo en un medio estándar.

Figuras

La Fig. 1 muestra una representación esquemática de una inmunoglobulina G (IgG). Una IgG está formada por dos cadenas ligeras idénticas (formada cada una por dos dominios, V_L y V_H) y dos cadenas pesadas idénticas (formada cada una por cuatro dominios, V_H, C_H1, C_H2 y C_H3). La superficie de unión al antígeno se forma mediante los dominios variables de las cadenas pesada y ligera, y la función efectora, tal como la activación del complemento y la unión de las células citotóxicas, está mediada por la región V_c del anticuerpo.

La Fig. 2 muestra una visión global de las estructuras del N-glicano de diferentes taxones. Generalmente, el término "N-glicosilación" se refiere a la glicosilación de un residuo del aminoácido asparragina (N). Aquí, una cadena de oligosacárido es unida mediante una oligosacariltransferasa a los residuos de asparragina que aparecen en las secuencias tripeptídicas Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, en las que X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro. Es evidente que, mientras que los procariotas no tienen ninguna N-glicosilación, los ciliados presentan estructuras de N-glicano que están desprovistas de la cadena lateral de fucosa y que además, carecen de residuos terminales de ácido siálico (ácido n-acetil-neuramínico) respaldados por residuos de beta-galactosa. La Fig. 2b muestra las potenciales variaciones en dicho patrón en algunas especies de ciliados.

La Fig. 3 muestra una representación esquemática de una IgG y sus fragmentos y derivados. La Fig. 3A representa un anticuerpo IgG completo. En la Fig. 3B se muestra un fragmento F(ab)₂ y en la Fig. 3C un fragmento Fab (eliminación del fragmento Fc). La inclusión de una cremallera de leucina modificada genéticamente permite la asociación del dímero. Utilizando la tecnología recombinante es posible la generación de fragmentos de anticuerpos más pequeños. El fragmento variable de cadena única (scFv, Fig. 3E) combina los dominios V_L y V_H unidos por una secuencia conectora sintética flexible. El acortamiento de la secuencia conectora da como resultado la formación de diacuerpos (Fig. 3F) y de triacuerpos (Fig. 3G) o incluso de tetracuerpos (no mostrado). Adicionalmente, el fragmento scFv se ha modificado para que incluya los dominios constantes del anticuerpo, como el dominio C_H3, dando como resultado el desarrollo de minicuerpos, Fig. 3D.

La Fig. 4 muestra una representación esquemática de las posibles combinaciones de anticuerpos y de fragmentos de anticuerpo para generar especificidades bi y trivalentes. La combinación de dos anticuerpos diferentes (por ejemplo, de los anticuerpos A y B) mediante el acoplamiento de células de *Tetrahymena* transfectadas de forma estable, da como resultado diferentes posibles anticuerpos bispecíficos, que se muestran en la Fig. 4A. En la Fig. 4B se muestra la posible combinación de fragmentos de anticuerpos que da

como resultado diferentes F(ab)₂ bi y triespecíficos, y dia y minicuerpos. En la Fig 4C se muestra la posible combinación de un anticuerpo (por ejemplo, el anticuerpo C) o de un fragmento de anticuerpo con un anticuerpo biespecífico o un fragmento de anticuerpo mediante el acoplamiento de células de *Tetrahymena* transfectadas de forma estable, que da como resultado diferentes posibles anticuerpos tri y multiespecíficos y fragmentos de anticuerpos.

La Fig. 5A muestra plásmidos de expresión para su uso en el ciliado *Tetrahymena thermophila* que codifican la cadena pesada y ligera del anticuerpo, que representan la metodología con un plásmido. El plásmido contiene un gen de resistencia a ampicilina (AmpR) y a cloranfenicol (CmR) para una selección en *E. coli*, un origen específico de *T. thermophila* (rADN ori) para la estabilidad del plásmido en *T. thermophila*, un casete de selección basado en neomicina (NeoR) para la identificación de los ciliados transformados, y dos marcos de lectura abierta del gen diana (cadena pesada y ligera) bajo el control de un promotor inducible, y seguido por una secuencia de terminación [beta]-tubulina 2 (BTU2) de *T. thermophila*.

En las Fig. 5B y C se muestran plásmidos de expresión para su uso en el ciliado *Tetrahymena thermophila* que representan la metodología con dos plásmidos. En la Fig. 5B el plásmido contiene las regiones flanqueantes de 5' y de 3' del gen de la DHFR de *Tetrahymena* para una integración dirigida del gen heterólogo, un gen de resistencia a la ampicilina (AmpR) y al cloranfenicol (CmR) para una selección en *E. coli*, y un casete de selección de blastidina S (BsdR) para la identificación de los ciliados transformados, y el marco de lectura abierta de cualquiera de las cadenas pesada o ligera del anticuerpo deseado bajo el control de un promotor inducible, y seguido por una secuencia de terminación [beta]-tubulina 2 (BTU2) de *T. thermophila* (BTU2). En la Fig. 5C, el plásmido de expresión que codifica la correspondiente cadena pesada o ligera del anticuerpo y que contiene las mismas características que las recogidas en la Fig. 5A.

La Fig. 6 muestra una revisión esquemática de las diferentes etapas de la conjugación de *Tetrahymena*. El proceso de conjugación comienza con el apareamiento de las células homocigóticas en alelos alternativos de un locus. El MIC (círculos pequeños) está anidado pero separado físicamente del MAC (círculos grandes). Los MIC experimentan una meiosis y generan cuatro núcleos haploides, sólo uno de ellos sigue siendo funcional (el producto de la anterior meiosis) y los otros tres se desintegran. En esta fase se produce el cruzamiento meiótico, seguido del intercambio recíproco de los pronúcleos migratorios, que se fusionan con el pronúcleo estacionario de la célula receptora, formando el núcleo del cigoto. El núcleo del cigoto experimenta dos divisiones mitóticas que dan como resultado cuatro núcleos diploides diferentes genéticamente idénticos. En esta fase, el viejo MAC es degradado. Después, los productos anteriores se diferencian en nuevos MAC, y los posteriores productos siguen siendo MIC diploides. Las células se separan (ahora se denominan ex-conjugantes) y experimentan la primera división celular postcigótica, formando cuatro células cariónicas. Cada cariónide recibe un nuevo MAC diferenciado independientemente y una copia mitótica de un MIC funcional. Después, las cariónides comienzan una multiplicación vegetativa mediante una fisión binaria.

La Fig. 7 muestra una revisión esquemática de la transformación de células de *Tetrahymena* utilizando un plásmido de expresión episomal y uno integrativo. Esta metodología con dos plásmidos da lugar a células de *Tetrahymena* transfectadas de forma estable que producen una IgG completa y muestran una auxotrofia de timidina.

La Fig. 8 muestra inmunotransferidos representativos del anticuerpo anti-CD4 Gk1.5 y sus fragmentos expresados en células de *Tetrahymena thermophila*. En la Fig. 8A se muestra la expresión de Gk1.5 y de sus fragmentos en el sedimento de células y en el sobrenadante de las células transformadas de forma estable después de diferentes tiempos de inducción de la expresión de la proteína recombinante (p.i.) que fueron cultivadas en un multif fermentador (de 0,5 l, a escala de laboratorio). El clon Gk1.5 del anticuerpo anti-CD4 de eBioscience sirvió como control positivo. La tinción se llevó a cabo utilizando un anti-IgG de rata conjugado con Hrp. En la Fig. 8B se muestra un inmunotransferido representativo del anticuerpo Gk1.5 expresado en *Tetrahymena* y sus fragmentos después de la purificación del sobrenadante producido utilizando una columna de proteína G.

La Fig. 9 muestra una comparación entre el uso de codones de *Tetrahymena thermophila* y de *Homo sapiens*. El último es aplicable para los anticuerpos monoclonales, o los fragmentos o derivados de los mismos, que son expresados en una línea de células de mamífero. Véase a continuación para una explicación adicional.

La Fig. 10 muestra el código genético según lo usan los ciliados, particularmente *Tetrahymena*. El nucleótido no canónico codifica UAA y UAG, que codifica glutamina, está impreso en negrita. Según el código genético general, estos tripletes son, sin embargo, codones de detención (véanse los tripletes tachados). "1LC" significa "código de una letra", mientras que "3LC" significa "código de tres letras".

Referencias

Tondravi, MM; Yao, M-C (1986): Transformation of Tetrahymena thermophila by microinjection of ribosomal RNA genes. PNAS 83, 4369-4373.

Gaertig, J; Gorovsky, MA (1992): Efficient mass transformation of Tetrahymena thermophila by electroporation of conjugants. PNAS 89, 9196-9200.

Cassidy-Hanley, D; Bowen, J; Lee, JH; Cole, E; VerPlank, LA; Gaertig, J; Gorovsky, MA;

Bruns, PJ (1997): Germ line and somatic transformation of mating Tetrahymena thermophila by particle bombardment. Genetics 146, 135-147.

Kufer, P; Lutterbüse, R; Baeuerle, PA (2004): A revival of bispecific antibodies. Trends in Biotechnology, Volumen 22, publicación 5, 238-244, 1 de mayo de 2004

Ruf, P; Lindhofer, H (2001): Induction of a long-lasting antitumor immunity by a trifunctional bispecific Antibody. Blood, 15 de octubre de 2001, Vol. 98, No. 8, págs. 2526-2534

Shields, RL et al, (2002): Lack of Fucose on Human IgG1 N-Linked Oligosaccharide Improves Binding to Human Fc_{RI} 11 and Antibody-dependent Cellular Toxicity. J Biol Chem Vol. 277, No. 30, págs. 26733-26740

Wei,Y et al, (2008) Glyco-engineering of human IgG1-Fc through combined yeast expression and in vitro chemoenzymatic glycosylation. Biochemistry 30; 47(39): 10294

Gerngross (2004): Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. Nature Biotechnology 22 (11), 1409

Weide, T.; Bockau, U.; Rave, A.; Herrmann, L. & Hartmann, M. W. W.: A recombinase system facilitates cloning of expression cassettes in the ciliate Tetrahymena thermophila. BMC Microbiol, Vol. 7, págs. 12, 2007

Weide, T.; Herrmann, L.; Bockau, U.; Niebur, N.; Aldag, I.; Laroy, W.; Contreras, R.; Tiedtke, A. & Hartmann, M. W. W.: Secretion of functional human enzymes by Tetrahymena thermophila. BMC Biotechnol, Vol. 6, págs. 19, 2006

Banno, Y., Yano, K. & Nozawa, Y.: Purification and characterization of a secreted protease from Tetrahymena pyriformis. Eur J Biochem, Vol. 132 (3), págs. 563-8, 1983

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Cilian AG

<120> Método para la preparación de proteínas

<130> CD40318

<160> 8

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 1416

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> secuencia de nucleótidos con codones optimizados de la cadena pesada de Gk1.5

<400> 1

catatgaagt gttcttggat tatcctotc cttatggctc ttaccactgg tgtcaattcc	60
gaagttcaac tccaataaga cgggtgctgaa cttggtaagc ccggtacttc tgttaagctt	120
tcctgcaagg ttccgatta caacattaga agaacttata tgcaactgggt caaccaaaga	180
cccggtaagg gtttggaatg gattggtaga attgatcctg ccaacggtaa cactatctat	240
ggtgaaaagt tcaagtctaa ggccaccttg actgctgaca cctcttccaa cactgcttac	300
atgcaattgt ctcaattgaa gtcgacgat actgctatct atttctgtgc catcggtgtc	360
caatacctcg attactgggg tcaagggtgt atggtoacgg tctcctctgc ttaaaccact	420
gctccctctg tttaacccct cgtcctgggt tgcggtgata ccacttcttc cactgttact	480
ttgggttgcc tcgtcaaggg ttatttcccc gaaccogtta ctgtcacctg gaactccggt	540
gccttatctt ccgacgttca cactttccct gctgttttac aatctgggtct ttacaccctc	600
acttcttccg ttacctctc tacctggccc tcccaaaccg tcacttgtaa cgtcgtcac	660
cctgcttctt ccaccaagggt cgataagaag gtcgaaagaa gaaacgggtg tatcggtcac	720
aagtgcocca cctgtcctac ctgccacaag tgcocogtcc ccgaattatt ggggtggtct	780
tccgtcttca ttttcccccc taagoccaaag gatattctac ttatttctta aaacgctaag	840
gtcacttgcg ttgtcggtga tgtttctgaa gaagaacotg acgtttaatt ctcttggttc	900
gtcaacaatg ttgaagtcca cacogcttaa acccaaccca gagaagaata atacaactct	960
actttcagag tcgtttctgc tttaacctat caacactaag attggatgtc cggtaaggaa	1020
ttcaagtgtg aggtcaacaa taaggctctc ccctctctta tcgaaaagac catttccaag	1080
cctaagggtc tcgttagaaa gccccaagtt tacgttatgg gtccocctac cgaacaactc	1140
actgaacaaa ctgtttcctt aacttgctta acctcoggtt tcttgcccaa cgatatcggt	1200
gttgaatgga cctccaatgg tcacatogaa aagaactaca agaacaaccg acctgtcatg	1260
gactccgatg gttctttctt catgtactct aagcttaacg tcgaaagatc cagatgggat	1320
tccagagccc ccttcgtttg ctccgtctgc cacgaagggt tacacaacca ccacgtcgaa	1380
aagtctatct ctagaccccc cggtaagtga agatct	1416

<210> 2
 <211> 708
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> secuencia de nucleótidos con codones optimizados de la cadena ligera kappa de Gk1.5

<400> 2

```

atggaaactg atagattatt gctctgggtc ttacttttat gggccccga ctctaccggt      60
gataccgtcc tcaactaatc tcctgcttta gctgtctctc ctggtgaaag agttaccatc      120
tcctgcagag ctactgaaag attctctact cttatccact gggtacaaca aagacctggt      180
caacaaccca agttgcttat ttacttgacc tcccacttag attctgggtg tcccgctaga      240
ttctccgggt ctgggttctgg tactgacttc acccttacca ttgaccctgt tgaagctgat      300
gatactgcta cctactactg ctaataaacc tggaacgata cctggacctt cgggtggggg      360
actaagctcg aactcaagag agccgatgcc gctccactg tttccatctt ccctccctct      420
actgaataac ttgctaccgg tgggtgcttct gtcgtttgct tgatgaataa cttctacccc      480
agagacattt ctgttaagtg gaagatcgac ggtaccgaaa gaagagatgg tgcctcgat      540
tcogtcaccg atcaagattc caaggactcc acttattcca tgcctctac tctctctctc      600
actaaggccg attacgaatc tcacaacttg tatacctgcg aagttgtcca caagacttcc      660
tcctcccccg tcgttaagtc cttcaacaga aacgaatggt gaagatct      708

```

<210> 3
 <211> 135
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> secuencia de aminoácidos codificada por la Secuencia No.1

<400> 3

```

Met Lys Cys Ser Trp Ile Ile Leu Phe Leu Met Ala Leu Thr Thr Gly
1           5           10           15

Val Asn Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Asp Gly Ala Glu Leu Gly Lys
          20           25           30

Pro Gly Thr Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Val Ser Asp Tyr Asn Ile
          35           40           45

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

```

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Ile Tyr Gly
65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Gln Leu Lys Ser Asp Asp Thr Ala Ile
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Ile Gly Val Gln Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
115 120 125

Val Met Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 4
<211> 127
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> secuencia de aminoácidos codificada por la Secuencia No. 2

<400> 4

Met Glu Thr Asp Arg Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Asp Ser Thr Gly Asp Thr Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Ala Val
20 25 30

Ser Pro Gly Glu Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Thr Glu Arg Phe
35 40 45

Ser Thr Leu Ile His Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Gln Pro Lys
50 55 60

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

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp Pro
85 90 95

Val Glu Ala Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Trp Asn
100 105 110

Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
115 120 125

5

10

15

ES 2 609 787 T3

5 <210> 5
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia de nucleótidos con codones optimizados de péptido señal de la cadena pesada de Gk1.5 endógeno
 10 <400> 5
 catatgaagt gtcttggat taccctctc cttatggctc ttaccactgg tgtcaattcc 60
 <210> 6
 <211> 19
 15 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos codificada por la Secuencia No. 5
 20 <400> 6
 Met Lys Cys Ser Trp Ile Ile Leu Phe Leu Met Ala Leu Thr Thr Gly
 1 5 10 15
 Val Asn Ser
 25 <210> 7
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> secuencia de nucleótidos con codones optimizados de péptido señal de la cadena ligera kappa de Gk1.5 endógeno
 35 <400> 7
 atggaaactg atagattatt gctctgggctc ttactttat gggctcccga cctaccggt 60
 <210> 8
 <211> 20
 <212> PRT
 40 <213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos codificada por la Secuencia No. 7
 45 <400> 8
 Met Glu Thr Asp Arg Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15
 Asp Ser Thr Gly
 20

REIVINDICACIONES

1. Un sistema para la expresión heteróloga de un anticuerpo monoclonal (AcMc) o de un fragmento de unión al antígeno o de un derivado del mismo, comprendiendo dicho sistema

a) al menos una célula hospedadora ciliada, y

b) incorporada, en dicha célula hospedadora ciliada, al menos una molécula de un ácido nucleico heterólogo que codifica dicho anticuerpo monoclonal, o un fragmento o un derivado del mismo, y

el sistema comprende adicionalmente una secuencia de señalización unida operativamente a dicha molécula de ácido nucleico, siendo dicha secuencia de señalización responsable de la secreción del anticuerpo monoclonal, o del fragmento del mismo, codificado por dicha molécula de ácido nucleico, en el medio extracelular, en el que el ciliado es un miembro de la familia *Tetrahymenidae*, y en el que el derivado de unión al antígeno es al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en

• scFv, o

• construcciones de anticuerpos biespecíficos, triespecíficos o de especificidad superior.

2. El sistema de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo monoclonal (AcMc), o un fragmento de unión al antígeno o un derivado del mismo, tiene una estructura de N-glicano que está esencialmente exenta de fucosa.

3. El sistema según las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicho anticuerpo monoclonal (AcMc), o un fragmento de unión al antígeno o un derivado del mismo, tiene al menos un efecto seleccionado entre el grupo que consiste en

• un aumento en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA)

• un aumento en la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC),

• un aumento en la apoptosis dependiente de anticuerpo,

• un aumento en la opsonización dependiente de anticuerpo o una semivida sérica prolongada.

4. Un sistema para la expresión heteróloga de un anticuerpo monoclonal (AcMc) o de un fragmento de unión al antígeno o de un derivado del mismo, comprendiendo dicho sistema una célula hospedadora ciliada que se ha obtenido mediante la conjugación de al menos dos células hospedadoras ciliadas del sistema de la reivindicación 1, en el que el ciliado es un miembro de la familia *Tetrahymenidae*

5. Una célula hospedadora ciliada transfectada con al menos un vector que comprende al menos una molécula de un ácido nucleico que codifica un anticuerpo monoclonal (AcMc), o un fragmento de unión al antígeno o un derivado del mismo, de acuerdo con la reivindicación 4, u obtenida mediante la conjugación de al menos dos células hospedadoras ciliadas del sistema de la reivindicación 1, en el que el ciliado es un miembro de la familia *Tetrahymenidae*

6. Una biblioteca que comprende al menos dos células hospedadoras ciliadas de acuerdo con la reivindicación 5, o al menos dos sistemas de acuerdo con la reivindicación 5, en donde cada célula hospedadora ha incorporado al menos una molécula de ácido nucleico heterólogo que codifica un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno o un derivado del mismo, preferentemente en forma de un vector, y en donde se seleccionan al menos dos ciliados de tal forma que puedan conjugarse entre sí, siendo el ciliado un miembro de la familia *Tetrahymenidae*.

7. Un anticuerpo monoclonal (AcMc) que se produce con un sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, o con una célula hospedadora ciliada de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el ciliado es un miembro de la familia *Tetrahymenidae*, cuyo anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno o un derivado, se une adicionalmente a al menos una de las dianas expuestas en la Tabla 1 (CCDA) o en la 3 (no CCDA).

8. El anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 7, que tiene al menos una característica seleccionada entre el grupo que consiste en

• un aumento en la CCDA, en la CDC y/o en la apoptosis dependiente de anticuerpo,

• una semivida sérica prolongada, y/o

• bi-, tri- o superior especificidad.

9. Un proceso para la producción de al menos un anticuerpo monoclonal (AcMc), o de un fragmento de unión al antígeno o de un derivado del mismo, en una célula hospedadora ciliada, comprendiendo dicho proceso las etapas de

a) transfectar al menos dos células hospedadoras ciliadas diferentes con al menos una molécula de un ácido nucleico que codifica un anticuerpo, o un fragmento o un derivado del mismo, o, preferentemente, con al menos un vector que comprende al menos una molécula de un ácido nucleico que codifica un anticuerpo monoclonal

(AcMc), o un fragmento de unión al antígeno o un derivado del mismo,

b) conjugar dichas dos células hospedadoras ciliadas, o la progenie de las mismas, para obtener al menos una célula ciliada portadora de al menos dos moléculas diferentes de ácido nucleico que codifican al menos dos anticuerpos diferentes, o fragmentos o derivados de los mismos, y

5 c) cultivar la célula ciliada así producida en condiciones que permitan la expresión de una proteína, en donde el ciliado es un miembro de la familia *Tetrahymenidae*.

10. Un anticuerpo monoclonal (AcMc) que se produce con un proceso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el ciliado es un miembro de la familia *Tetrahymenidae*, cuyo anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno o

10 derivado, se une adicionalmente a al menos una de las dianas expuestas en la Tabla 1 (CCDA) o en la 3 (no CCDA).

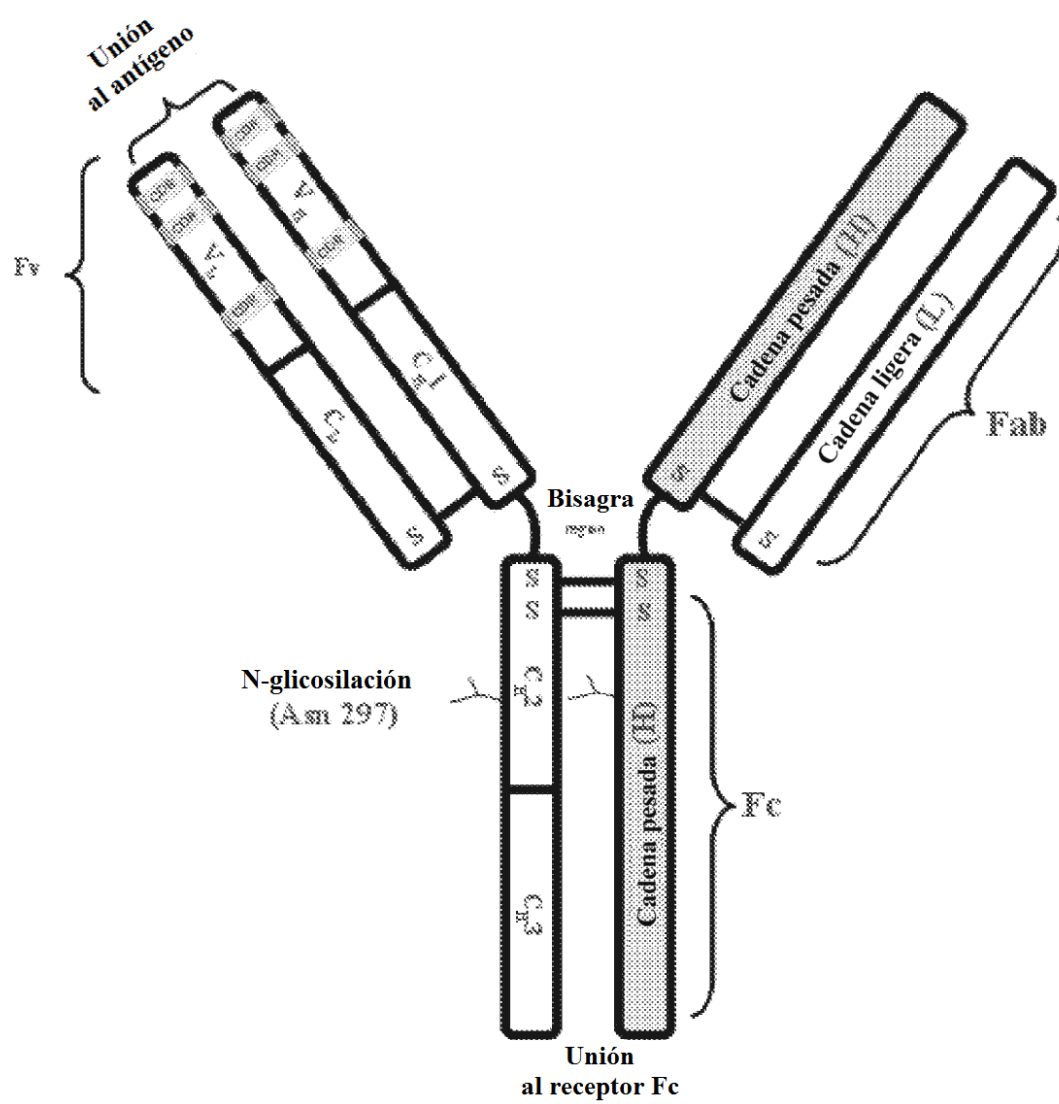


Fig. 1

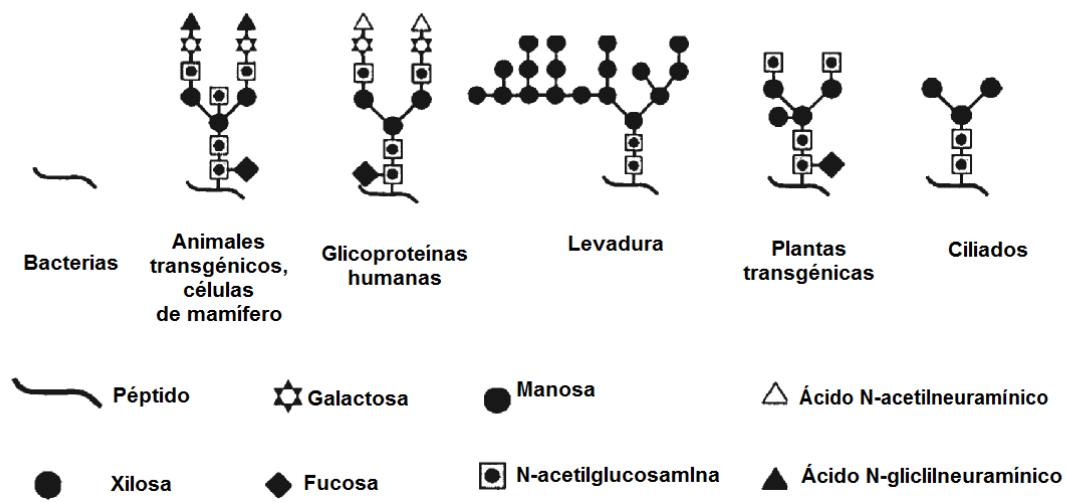


Fig. 2a

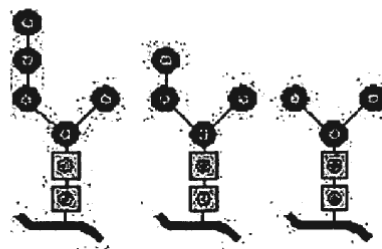


Fig. 2b

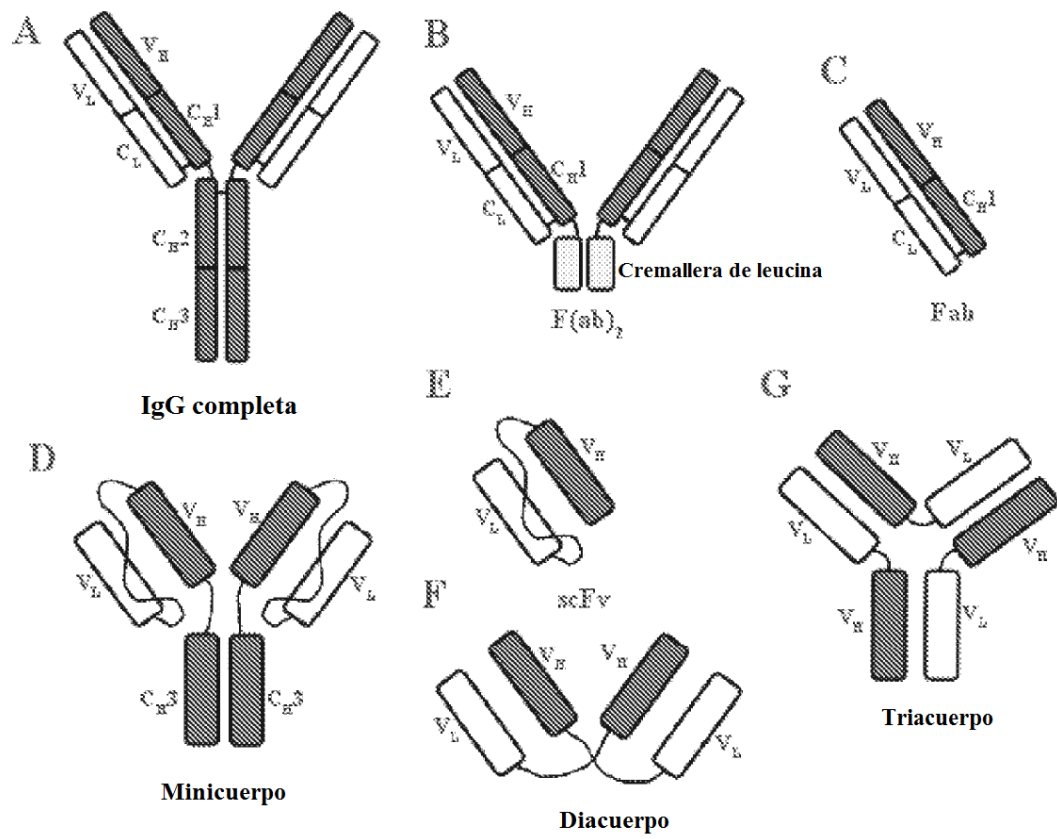


Fig. 3

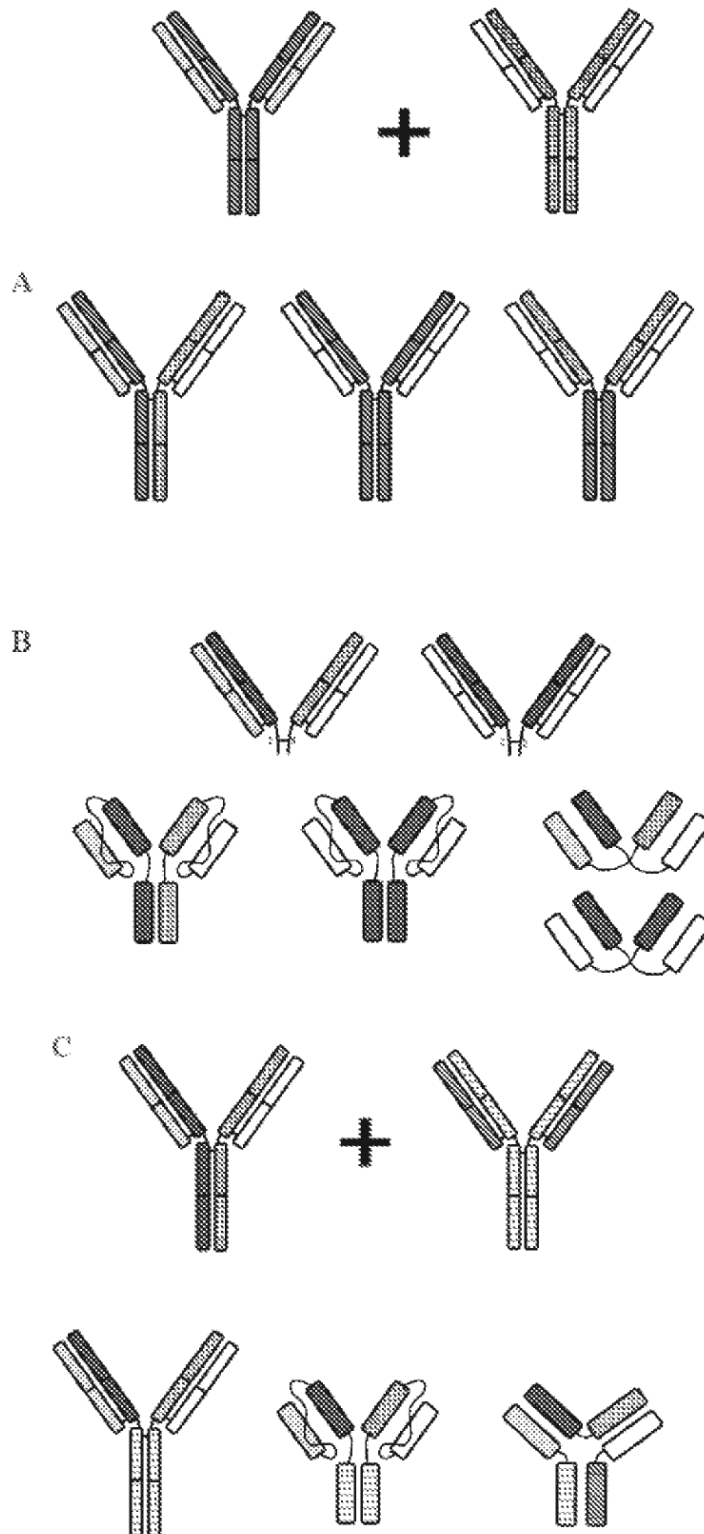


Fig. 4

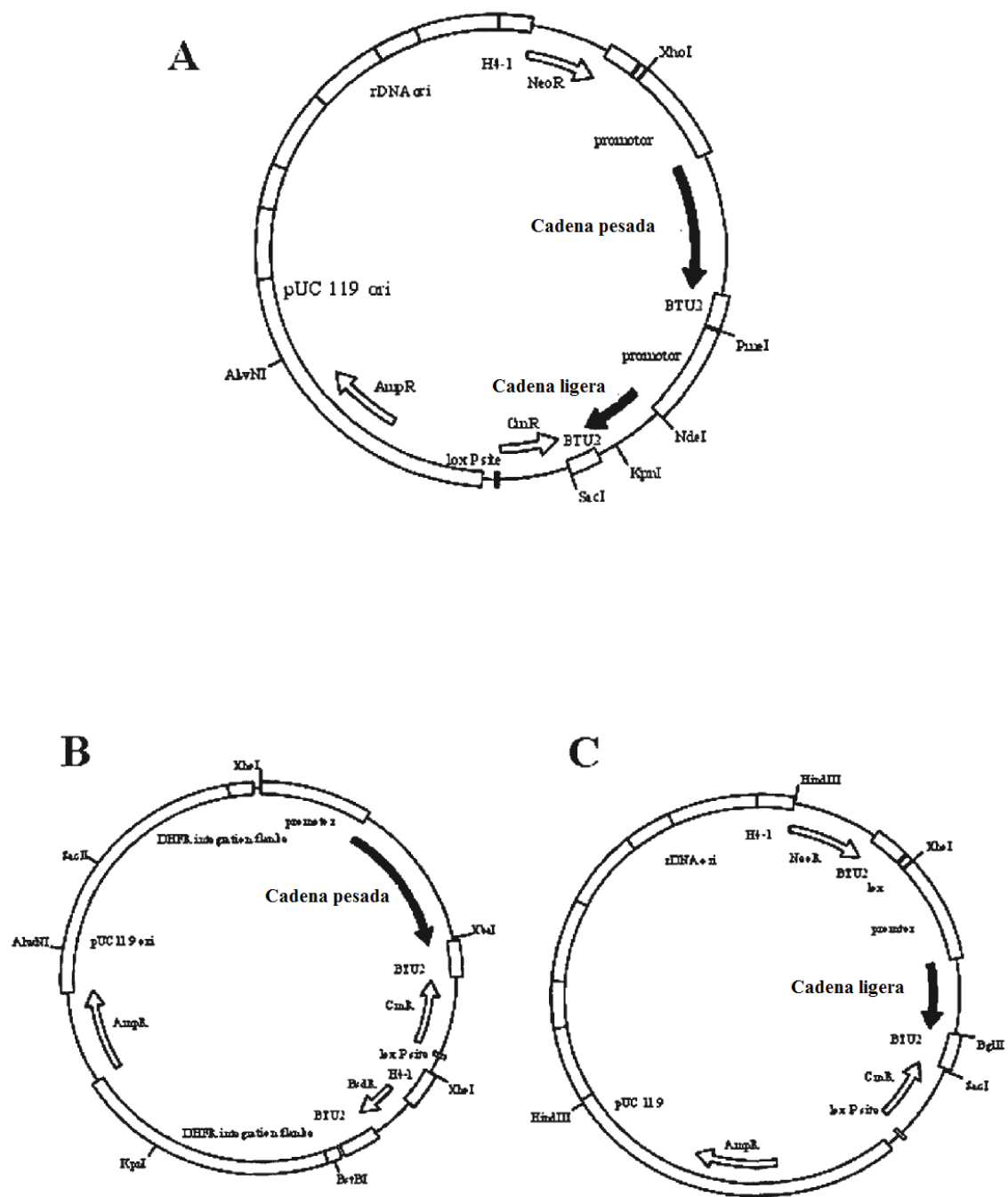


Fig. 5

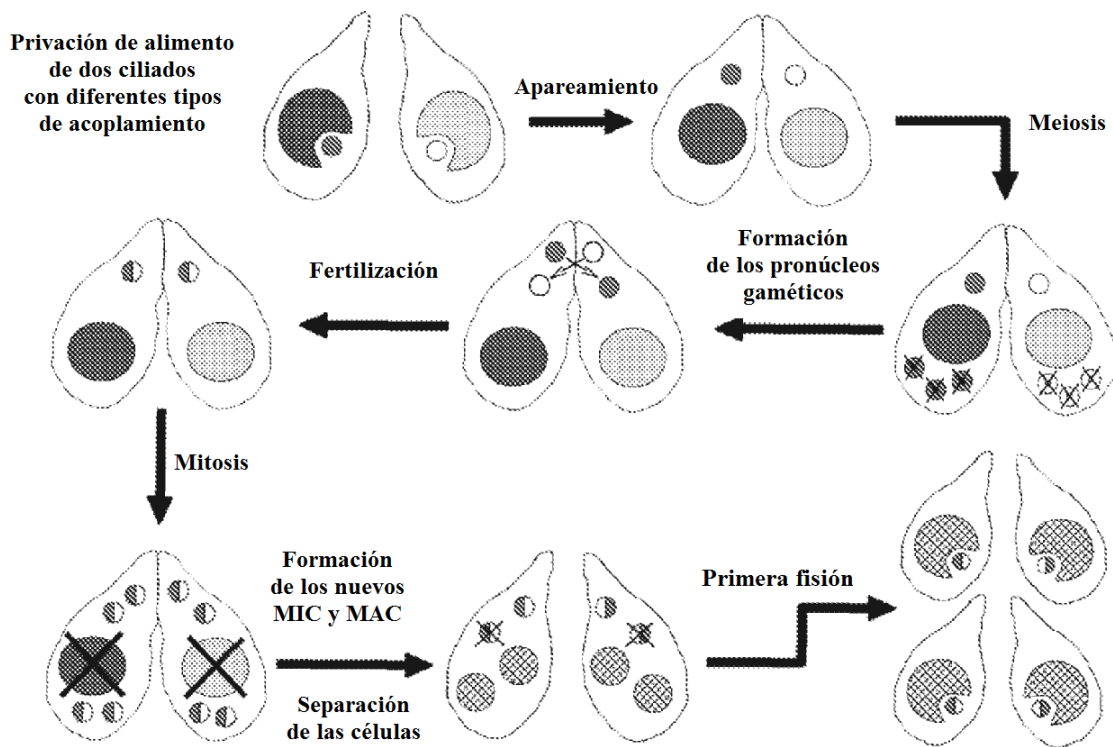


Fig. 6

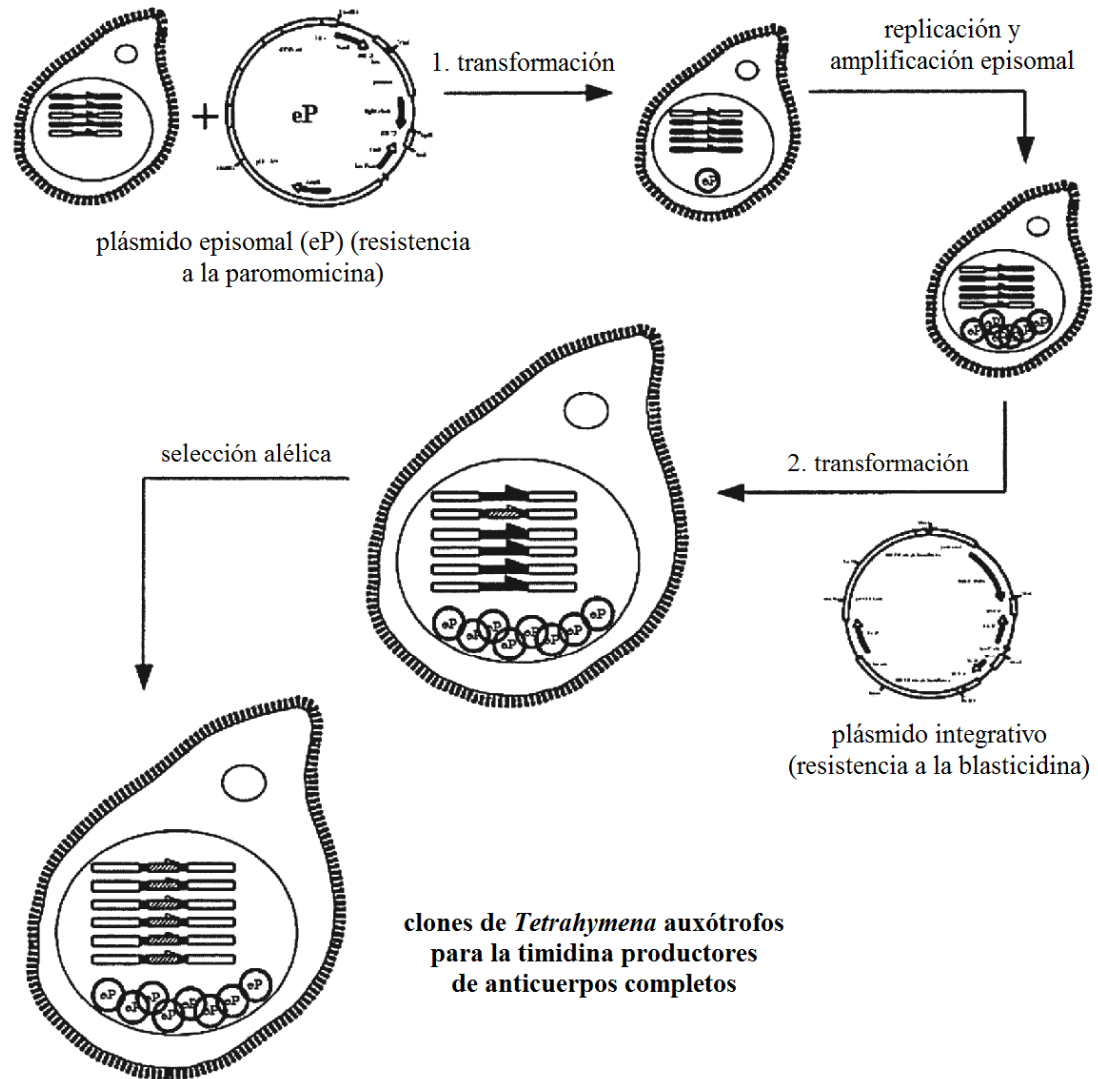


Fig. 7

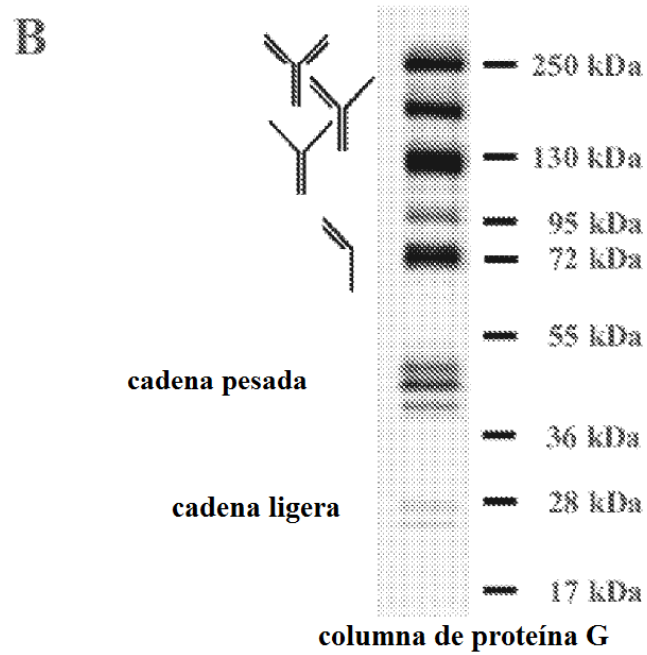
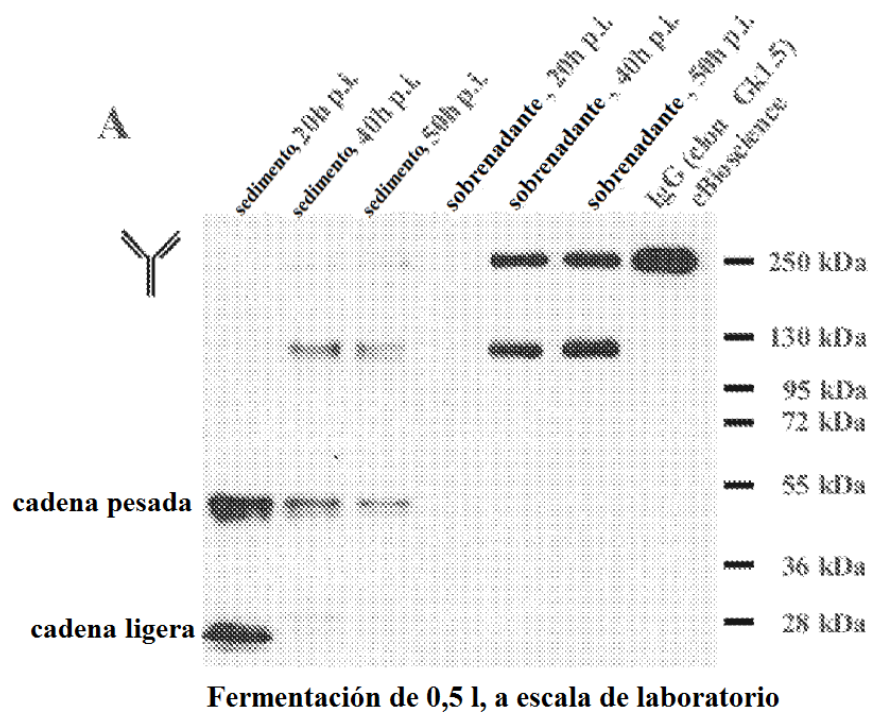


Fig. 8

***Tetrahymena thermophila* [gbinv]: 283 CDS (145922 codones)**

campos: [triplete] [frecuencia: por mil] ([número])

UUU 26,1(3815)	UCU 24,4(3557)	UAU 23,3(3407)	UGU 9,7(1412)
UUC 19,4(2827)	UCC 6,5(948)	UAC 14,5(2110)	UGC 8,8(1282)
UUA 29,8(4346)	UCA 16,8(2453)	UAA 36,8(5366)	UGA 2,0(286)
UUG 14,1(2054)	UCG 1,5(222)	UAG 11,0(1606)	UGG 7,4(1080)
CUU 20,3(2955)	CCU 17,6(2574)	CAU 8,7(1267)	CGU 4,6(677)
CUC 10,3(1497)	CCC 4,6(676)	CAC 6,4(930)	CGC 0,9(136)
CUA 7,4(1078)	CCA 8,2(1202)	CAA 19,8(2894)	CGA 0,5(73)
CUG 2,6(378)	CCG 0,5(68)	CAG 3,3(477)	CGG 0,1(8)
AUU 39,3(5733)	ACU 27,2(3968)	AAU 48,0(7002)	AGU 13,5(1963)
AUC 16,2(2367)	ACC 7,8(1140)	AAC 24,2(3530)	AGC 9,2(1344)
AUA 19,1(2783)	ACA 14,8(2153)	AAA 58,7(8562)	AGA 26,6(3887)
AUG 19,3(2811)	ACG 0,8(111)	AAG 34,3(5001)	AGG 2,8(412)
GUU 25,8(3763)	GCU 30,3(4428)	GAU 42,5(6208)	GGU 24,5(3576)
GUC 10,1(1469)	GCC 7,5(1098)	GAC 12,4(1815)	GGC 4,3(629)
GUA 11,6(1693)	GCA 11,8(1726)	GAA 58,2(8499)	GGA 15,1(2205)
GUG 3,1(451)	GCG 0,6(88)	GAG 11,2(1630)	GGG 1,5(216)

Codificación de GC 32,53 % 1ª letra GC 38,64 % 2ª letra GC 31,25 % 3ª letra GC 27,69 %

***Homo sapiens* [gbpri]: 93487 CDS (40662582 codones)**

campos: [triplete] [frecuencia: por mil] ([número])

UUU 17,6(714298)	UCU 15,2(618711)	UAU 12,2(495699)	UGU 10,6(430311)
UUC 20,3(824692)	UCC 17,7(718892)	UAC 15,3(622407)	UGC 12,6(513028)
UUA 7,7(311881)	UCA 12,2(496448)	UAA 1,0(40285)	UGA 1,6(63237)
UUG 12,9(525688)	UCG 4,4(179419)	UAG 0,8(32109)	UGG 13,2(535595)
CUU 13,2(536515)	CCU 17,5(713233)	CAU 10,9(441711)	CGU 4,5(184609)
CUC 19,6(796638)	CCC 19,8(804620)	CAC 15,1(613713)	CGC 10,4(423516)
CUA 7,2(290751)	CCA 16,9(688038)	CAA 12,3(501911)	CGA 6,2(250760)
CUG 39,6(1611801)	CCG 6,9(281570)	CAG 34,2(1391973)	CGG 11,4(464485)
AUU 16,0(650473)	ACU 13,1(533609)	AAU 17,0(689701)	AGU 12,1(493429)
AUC 20,8(846466)	ACC 18,9(768147)	AAC 19,1(776603)	AGC 19,5(791383)
AUA 7,5(304565)	ACA 15,1(614523)	AAA 24,4(993621)	AGA 12,2(494682)
AUG 22,0(896005)	ACG 6,1(246105)	AAG 31,9(1295568)	AGG 12,0(486463)
GUU 11,0(448607)	GCU 18,4(750096)	GAU 21,8(885429)	GGU 10,8(437126)
GUC 14,5(588138)	GCC 27,7(1127679)	GAC 25,1(1020595)	GGC 22,2(903565)
GUA 7,1(287712)	GCA 15,8(643471)	GAA 29,0(1177632)	GGA 16,5(669873)
GUG 28,1(1143534)	GCG 7,4(299495)	GAG 39,6(1609975)	GGG 16,5(669768)

Codificación de GC 52,27 % 1ª letra GC 55,72 % 2ª letra GC 42,54 % 3ª letra GC 58,55 %

Fig. 9

1LC	3LC	aminoácido	Codones					
A	Ala	Alanina	GCU	GCA	GCC	GCG		
C	Cys	Cisteína	UGU	UGC				
D	Asp	Ácido aspártico	GAU	GAC				
E	Glu	Ácido glutámico	GAA	GAG				
F	Phe	Fenilalanina	UUU	UUC				
G	Gly	Glicina	GGU	GGA	GGC	GGG		
H	His	Histidina	CAU	CAC				
I	Ile	Isoleucina	AUU	AUA	AUC			
K	Lys	Lisina	AAA	AAG				
L	Leu	Leucina	UUA	CUU	UUG	CUC	CUA	CUG
M	Met	Metionina / INICIO	AUG					
N	Asn	Asparagina	AAU	AAC				
P	Pro	Prolina	CCU	CCA	CCC	CCG		
Q	Gln	Glutamina	CAA	CAG	UAA	UAG		
R	Arg	Arginina	AGA	CGU	AGG	CGC	CGA	CGG
S	Ser	Serina	UCU	UCA	AGU	AGC	UCC	UCG
T	Thr	Treonina	ACU	ACA	ACC	ACG		
V	Val	Valina	GUU	GUA	GUC	GUG		
W	Trp	Triptófano	UGG					
Y	Tyr	Tirosina	UAU	UAC				
		DETENCIÓN	UGA	UAA	UAG			

Fig. 10