

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 636 971**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 15/67 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.11.2010 PCT/US2010/055702**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.05.2011 WO11057120**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.11.2010 E 10776910 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2017 EP 2496601**

54 Título: **Procedimientos y composición para la secreción de polipéptidos heterógenos**

30 Prioridad:

05.11.2009 US 258565 P

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

10.10.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MARRICHI, MATTHEW y
REILLY, DOROTHEA E.**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 636 971 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

Procedimientos y composición para la secreción de polipéptidos heterógenos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere generalmente a los campos de la biología molecular y tecnología de proteínas. Más específicamente, la invención se refiere a secuencias señal para la secreción de polipéptidos heterógenos a partir de bacterias. La invención también se refiere a polipéptidos recombinantes producidos de manera procariota y usos de los mismos.

Antecedentes de la invención

La secreción de polipéptidos heterógenos en el espacio periplásmico de *E. coli* y otros procariotas o en sus medios de cultivo está sujeta a una variedad de parámetros. Típicamente, se genomanipulan vectores para la secreción de un polipéptido de interés para posicionar ADN que codifica una secuencia señal secretora en 5' frente al ADN que codifica el polipéptido de interés.

En los últimos años se han observado promesas crecientes del uso del polipéptido heterógeno, por ejemplo, anticuerpos, como agentes terapéuticos y de diagnóstico para diversos trastornos y enfermedades. Muchas investigaciones y aplicaciones clínicas requieren grandes cantidades de polipéptido funcional, precisando, de esta manera, sistemas aumentados a escala, pero económicos, para la producción de polipéptidos. Es particularmente útil la producción recombinante de anticuerpos que usan una variedad de huéspedes de expresión, que varían desde procariotas, tales como *E. coli* o *B. subtilis*, a levaduras, plantas, células de insecto y células de mamífero. Kipriyanov and Little (1999) *Mal. Biotech.* 12: 173-201.

En comparación con otros sistemas de producción de polipéptidos, las bacterias, particularmente *E. coli*, proporcionan muchas ventajas únicas. Las materias primas usadas (es decir, células bacterianas) son baratas y fáciles de cultivar, reduciendo así el coste de los productos. Los huéspedes procarióticos crecen mucho más deprisa que, por ejemplo, las células de mamífero, lo que permite un análisis más rápido de las manipulaciones genéticas. El tiempo de generación más corto y la facilidad para aumentar a escala también hacen que la fermentación bacteriana sea un medio más atractivo para la producción de proteínas en grandes cantidades. Se han estudiado bien la estructura genómica y la actividad biológica de muchas especies bacterianas incluyendo *E. coli* y está disponible una amplia gama de vectores adecuados, lo que hace más conveniente la expresión de un anticuerpo deseable. En comparación con los eucariotas, están implicadas menos etapas en el procedimiento de producción, incluyendo la manipulación de genes recombinantes, la transformación estable de múltiples copias en el huésped, la inducción de la expresión y la caracterización de los productos. Pluckthun and Pack (1997) *Immunotech* 3:83-105.

Se han usado diversos enfoques para preparar polipéptidos recombinantes en bacterias. Las proteínas recombinantes se pueden obtener a partir de bacterias a través del replegamiento de cuerpos de inclusión expresados en el citoplasma o bien a través de la expresión seguida de secreción al periplasma bacteriano. La elección entre secreción y replegamiento está guiada generalmente por varias consideraciones. La secreción es habitualmente la estrategia más rápida y más comúnmente usada para producir anticuerpos. Kipriyanov and Little (1999), *supra*.

La expresión de anticuerpos en sistemas procarióticos se puede llevar a cabo en diferentes escalas. Los cultivos en matraces agitados (en el intervalo de 2-5 litros) típicamente generan menos de 5 mg/litro de productos. Carter *et al.* (1992) *Bio/Technology* 10:12-16 desarrollaron un sistema de fermentación de alta densidad celular en el que se obtuvo expresión de alto nivel (hasta 2 g/litro) de fragmentos de anticuerpo. Los valores de gramo por litro de Fab' obtenidos por Carter *et al.* se deben en gran medida a densidades celulares más altas que resultan del entorno controlado con más precisión de un fermentador que el de un simple matraz agitado. El sistema contiene un operón dicistrónico diseñado para coexpresar los fragmentos de cadena ligera y cadena pesada. El operón dicistrónico está bajo el control de un único promotor de *phoA* de *E. coli* que es inducible mediante inanición de fosfato. Cada cadena de anticuerpo está precedida por la secuencia señal de la enterotoxina termoestable II (stII) de *E. coli* para dirigir la secreción al espacio periplásmico.

Para obtener revisiones generales de producción de anticuerpos en *E. coli*, véase Pluckthun and Pack (1997) *Immunotech* 3:83-105; Pluckthun *et al.* (1996) in ANTIBODY ENGINEERING: A PRACTICAL APPROACH, pp. 203-252 (Oxford Press); Pluckthun (1994) en HANDBOOK OF EXP PHARMCOL VOL 3: THE PHARMCOL OF MONOCLONAL ANTIBODIES, pp. 269-315 (ed. M. Rosenberg and G.P. Moore; Springer-Verlag, Berlin).

Muchos ensayos biológicos (tales como cristalografía de rayos X) y aplicaciones clínicas (tales como tratamiento con proteínas) requieren grandes cantidades de proteínas. Por consiguiente, existe una necesidad de obtener sistemas de alto rendimiento, pero simples, para producir polipéptidos heterógenos solubles y funcionales apropiadamente ensamblados, tales como anticuerpos.

El documento WO 2005/038031 describe procedimientos para secretar un anticuerpo expresado en un espacio periplásmico usando la secuencia señal de la enterotoxina termoestable (STII) de *E. coli* o la secuencia señal de la proteína de membrana externa A (OmpA) de *E. coli* (p. 3 l. 17-23).

5 El documento WO 96/27016 describe un procedimiento de optimización de la secreción de un polipéptido heterógeno en una célula bacteriana que comprende comparar los niveles de expresión de dicho polipéptido bajo el control de variantes de secuencia señal, por ejemplo, variantes de la secuencia señal de STII, OmpA, phoE, LamB, MBP o phoA (p. 2 l. 33 - p. 3 l. 4, p. 5 l. 16-17).

10 El documento WO 02/061090 describe anticuerpos producidos en *E. coli* usando las variantes de secuencia señal de STII identificadas mediante el procedimiento descrito en el documento WO 96/27016.

El documento EP 1 908 769 A1 describe la expresión de anticuerpos de longitud completa en *E. coli* usando dos promotores diferentes que controlan por separado las cadenas ligera y pesada (p. 3 l. 9-16).

15 SIMMONS *et al.*: "Expression of full-length immunoglobulins in *Escherichia coli*: rapid and efficient production of aglycosylated antibodies", JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 263, n.º 1-2, 1 mayo de 2002 (01-05-2002), páginas 133-147, XP004354391, ISSN: 0022-1759, DOI: DOI:10.1016/S0022-1759(02)00036-4 describen la expresión de anticuerpos de longitud completa en *E. coli* usando variantes de secuencia señal de STII.

20

SIMMONS *et al.*: "Translational level is a critical factor for the secretion of heterologous proteins in *Escherichia coli*", BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING CO. NEW YORK, US, vol. 14, n.º 5, 1 de mayo de 1996 (01-05-1996), páginas 629-634, XP001179503, ISSN: 0733-222X, DOI: DOI: 10.1038/NBT0596-629 describen la alteración aleatoria de la TIR de la secuencia señal de STII que da como resultado una colección de vectores con fuerzas traduccionales variadas.

25

El documento WO 2005/063816 A2 describe un procedimiento que comprende expresar en *E.coli* un anticuerpo, en el que cada ácido nucleico que codifica un componente de dicho anticuerpo comprende una TIR de fuerza aproximadamente igual (p. 11 l. 25-32).

30

Sumario de la invención

35 La invención proporciona un medio novedoso para incrementar la producción de proteínas heterógenas que comprende el uso de variantes de la región de iniciación traduccional (TIR) novedosas, incluyendo variantes de TIR que comprenden péptidos señal de secreción cotraduccionales (péptidos señal que dirigen la translocación de una manera cotraduccional) y/o variantes de TIR que comprenden péptidos señal de secreción postraduccionales (péptidos señal que dirigen la translocación de una manera postraduccionales). Adicionalmente, en el presente documento se demuestra la producción de anticuerpos incrementada usando vectores que comprenden una cadena ligera de anticuerpo enlazada funcionalmente a una TIR que comprende un péptido señal de secreción co- o postraduccionales y una cadena pesada de anticuerpo enlazada funcionalmente a una TIR que comprende un péptido señal de secreción cotraduccional para su expresión máxima. En el presente documento también se proporcionan variantes de TIR novedosas.

40

45 En un aspecto, la invención proporciona regiones de iniciación de la traducción variantes. En algunos modos de realización, la variante comprende una región de iniciación de la traducción variante (en algunos modos de realización, una secuencia señal de secreción postraduccionales procarriótica o una secuencia señal de secreción cotraduccional procarriótica). En algunos modos de realización, la variante comprende variantes de ácido nucleico de una secuencia señal de secreción, tal como PhoA, MalE, DsbA o STII. En algunos aspectos, la variante comprende adicionalmente un sitio de restricción para *MlaI*, *BssHIII* o *XbaI*. En algunos aspectos, la variante comprende una variante de la región de iniciación de la traducción que comprende una secuencia mostrada en la tabla 3.

50

En un aspecto, la invención proporciona secuencias señal de secreción variantes. En algunos modos de realización, la secuencia señal de secreción es una secuencia señal de secreción postraduccionales procarriótica o una secuencia señal de secreción cotraduccional procarriótica. En algunos aspectos, la secuencia señal de secreción es una secuencia señal de secreción postraduccionales eucariótica o una secuencia señal de secreción cotraduccional eucariótica. En algunos modos de realización, las variantes son variantes de ácido nucleico de una secuencia señal de secreción de PhoA, MalE, DsbA o STII. En algunos aspectos, las variantes comprenden una secuencia señal de secreción mostrada en la tabla 3. Las secuencias señal de secreción variantes de la invención son adecuadas para su uso, por ejemplo, en cualquiera de los procedimientos divulgados en el presente documento.

55

60

En otro aspecto, la invención proporciona un polinucleótido que comprende una región de iniciación de la traducción de la invención. En algunos aspectos, la región de iniciación de la traducción comprende la secuencia mostrada en la tabla 3 (por ejemplo, una de las SEQ ID NO: 1-42). En algunos aspectos, la región de iniciación de la traducción comprende una de las SEQ ID NO: 1-14, 16-24, 26-39, 41-42. Los polinucleótidos son adecuados para su uso, por ejemplo, en cualquiera de los procedimientos divulgados en el presente documento.

65

5 En otro aspecto, la invención proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia señal de secreción de la invención. En algunos aspectos, la secuencia señal de secreción comprende la secuencia mostrada en la tabla 3 (por ejemplo, una de las SEQ ID NO: 1-42). En algunos aspectos, la región de iniciación de la traducción comprende una de las SEQ ID NO: 1-14, 16-24, 26-39, 41-42. Los polinucleótidos son adecuados para su uso, por ejemplo, en cualquiera de los procedimientos divulgados en el presente documento.

10 En otro aspecto, la invención proporciona un polinucleótido que comprende una región de iniciación de la traducción de la invención enlazada funcionalmente a un polinucleótido que codifica un polipéptido heterógeno, por lo que tras la expresión del polipéptido heterógeno en una célula huésped (por ejemplo, una célula huésped procariótica, por ejemplo, una célula huésped de *E. coli*), el polipéptido heterógeno se pliega y ensambla para formar un polipéptido heterógeno biológicamente activo. Los ejemplos de polipéptidos heterógenos se divulgan adicionalmente en el presente documento. En algunos aspectos, el polipéptido heterógeno es una cadena pesada de anticuerpo. En algunos aspectos, el polipéptido heterógeno es una cadena ligera de anticuerpo. En algunos aspectos, el polipéptido heterógeno es un polipéptido heterógeno es un polipéptido de Fc. En algunos aspectos, el polipéptido heterógeno es un polipéptido multimérico. En algunos aspectos, el polipéptido heterógeno es un heteromultímero. En algunos aspectos, la región de iniciación de la traducción es cualquier región de iniciación de la traducción divulgada en el presente documento, por ejemplo, una región de iniciación de la traducción que comprende la secuencia mostrada en la tabla 3. En algunos aspectos, la región de iniciación de la traducción comprende la secuencia de una de las SEQ ID NO: 1-42. En algunos aspectos, la región de iniciación de la traducción comprende la secuencia de una de las SEQ ID NO: 1-14, 36-39, 41-42. En algunos aspectos, la región de iniciación de la traducción comprende una secuencia señal de STII, Dsbl, PhoA o MalE variante.

25 En otro aspecto, la invención proporciona un polinucleótido que comprende (1) una primera región de iniciación de la traducción (TIR) enlazada funcionalmente a un polinucleótido que codifica un primer polipéptido heterógeno, en el que la TIR comprende una secuencia señal de secreción procariótica cotraduccional; y (2) una segunda TIR enlazada funcionalmente a un polinucleótido que codifica un segundo heterógeno, en el que la segunda TIR comprende una secuencia señal de secreción procariótica de cotraducción o postraducción, por lo que tras la expresión del anticuerpo en una célula huésped, los primer y segundo polipéptidos heterógenos se pliegan y ensamblan para formar un complejo de polipéptidos biológicamente activos.

35 En otro aspecto, la invención proporciona un polinucleótido que codifica un anticuerpo, comprendiendo dicho polinucleótido (1) una primera región de iniciación de la traducción de la invención enlazada funcionalmente a un polinucleótido que codifica una cadena pesada de anticuerpo y (2) una segunda región de iniciación de la traducción enlazada funcionalmente a un polinucleótido que codifica una cadena ligera de anticuerpo, por lo que tras la expresión del anticuerpo en una célula huésped (por ejemplo, una célula huésped procariótica, por ejemplo, una célula huésped de *E. coli*), las cadenas ligera y pesada se pliegan y ensamblan para formar un anticuerpo biológicamente activo.

40 En algunos modos de realización, la primera región de iniciación de la traducción comprende una secuencia señal de secreción procariótica cotraduccional (por ejemplo, una secuencia señal que dirige la traducción a través del péptido de reconocimiento de señal). En algunos aspectos, la primera región de iniciación de la traducción comprende una secuencia señal de STII o DsbA. En algunos modos de realización, la primera región de iniciación de la traducción comprende una secuencia señal de DsbA. En algunos aspectos, la primera región de iniciación de la traducción comprende una secuencia señal de PhoA o MalE. En algunos aspectos, la primera región de iniciación de la traducción comprende la secuencia de una de las SEQ ID NO: 1-10 y 36-42. En algunos aspectos, la primera región de iniciación de la traducción comprende la secuencia de una de las SEQ ID NO: 1-10 y 36-29 y 41 y 42. En algunos aspectos, la primera región de iniciación de la traducción comprende la secuencia de una de las SEQ ID NO 1-42. En algunos aspectos, la primera región de iniciación de la traducción comprende la secuencia de una de las SEQ ID NO: 1-14, 16-24, 26-39, 41-42.

45 En algunos modos de realización, la segunda región de iniciación de la traducción comprende (i) una secuencia señal de secreción procariótica cotraduccional o una secuencia señal de secreción procariótica postraduccional (por ejemplo, una secuencia señal que dirige la traducción a través de la vía *sec*). En algunos modos de realización, la segunda región de iniciación de la traducción comprende una secuencia señal de STII, DsbA, MalE o PhoA. En algunos modos de realización, la segunda región de iniciación de la traducción comprende una secuencia señal de PhoA o MalE. En algunos aspectos, la segunda región de iniciación de la traducción comprende la secuencia de una de las SEQ ID NO: 1-42. En algunos modos de realización, la segunda región de iniciación de la traducción comprende la secuencia de una de las SEQ ID NO: 1-14, 16-24, 26-39, 41-42.

50 En algunos aspectos, el polinucleótido que codifica un anticuerpo comprende adicionalmente (3) una tercera región de iniciación de la traducción enlazada funcionalmente a un polinucleótido que codifica un polipéptido de Fc. En algunos aspectos, la tercera región de iniciación de la traducción comprende una secuencia señal de STII, PhoA o DsbA. En algunos aspectos, la tercera región de iniciación de la traducción comprende una secuencia señal de DsbA. En algunos aspectos, la tercera región de iniciación de la traducción comprende una secuencia señal de PhoA.

En otro aspecto, la invención proporciona un polinucleótido que comprende (1) una primera región de iniciación de la traducción (TIR) enlazada funcionalmente a un polinucleótido que codifica una cadena pesada de anticuerpo, en el que la TIR comprende una secuencia señal de secreción procariótica de cotraducción; y (2) una segunda TIR enlazada funcionalmente a un polinucleótido que codifica una cadena ligera de anticuerpo, en el que la segunda TIR comprende una secuencia señal de secreción procariótica de cotraducción o postraducción, por lo que tras la expresión del anticuerpo en una célula huésped, las cadenas ligera y pesada se pliegan y ensamblan para formar un anticuerpo biológicamente activo.

En otro aspecto, la invención proporciona un polinucleótido que codifica un fragmento de anticuerpo (tal como un fragmento de anticuerpo monovalente), comprendiendo dicho polinucleótido (1) una primera región de iniciación de la traducción de la invención enlazada funcionalmente a un polinucleótido que codifica una cadena pesada de anticuerpo; (2) una segunda región de iniciación de la traducción enlazada funcionalmente a un polinucleótido que codifica una cadena ligera de anticuerpo; y (3) una tercera región de iniciación de la traducción enlazada funcionalmente a un polinucleótido que codifica un polipéptido de Fc, por lo que tras la expresión del anticuerpo en una célula huésped (por ejemplo, una célula huésped procariótica), la cadena pesada, la cadena ligera y el polipéptido de Fc se pliegan y ensamblan para formar un anticuerpo biológicamente activo (tal como un anticuerpo de un brazo). En algunos aspectos, la tercera región de iniciación de la traducción comprende una secuencia señal de secreción procariótica cotraduccional o una secuencia señal de secreción procariótica postraduccional. En algunos aspectos, la tercera región de iniciación de la traducción comprende una secuencia señal de STII, PhoA, MalE o DsbA. En algunos aspectos, la tercera región de iniciación de la traducción comprende una secuencia señal de DsbA. En algunos aspectos, la tercera región de iniciación de la traducción comprende una secuencia señal de PhoA. En algunos aspectos, la tercera región de iniciación de la traducción comprende la secuencia de una de las SEQ ID NO: 1-42. En algunos aspectos, la tercera región de iniciación de la traducción comprende la secuencia de una de las SEQ ID NO: 1-14, 16-24, 26-39, 41-42.

En otro aspecto, la invención proporciona un polinucleótido que codifica un anticuerpo, comprendiendo dicho polinucleótido (1) una primera región de iniciación de la traducción de la invención enlazada funcionalmente a un polinucleótido que codifica una cadena pesada de anticuerpo, en el que la primera región de iniciación de la traducción comprende una secuencia señal de STII o DsbA y (2) una segunda región de iniciación de la traducción enlazada funcionalmente a un polinucleótido que codifica una cadena ligera de anticuerpo, en el que la segunda región de iniciación de la traducción comprende una secuencia señal de STII, DsbA, MalE o PhoA, por lo que tras la expresión del anticuerpo en una célula huésped (por ejemplo, una célula huésped procariótica), las cadenas ligera y pesada se pliegan y ensamblan para formar un anticuerpo biológicamente activo. En algunos modos de realización, la primera región de iniciación de la traducción comprende una secuencia señal de DsbA y la segunda región de iniciación de la traducción comprende una secuencia señal de MalE o PhoA. En algunos aspectos, el polinucleótido que codifica un anticuerpo comprende adicionalmente (3) una tercera región de iniciación de la traducción enlazada funcionalmente a un polinucleótido que codifica un polipéptido de Fc. En algunos aspectos, la tercera región de iniciación de la traducción comprende una secuencia señal de STII, PhoA o DsbA. En algunos aspectos, la tercera región de iniciación de la traducción comprende una secuencia señal de PhoA. En algunos aspectos, la tercera región de iniciación de la traducción comprende una secuencia señal de DsbA.

En algunos aspectos, la fuerza traduccional de dicha región de iniciación de la traducción variante es menor que la fuerza traduccional de la región de iniciación de la traducción natural. En algunos aspectos, la fuerza traduccional de dicha región de iniciación de la traducción variante es mayor que la fuerza traduccional de la región de iniciación de la traducción natural. En algunos aspectos, la secuencia aminoacídica de la variante de iniciación de la traducción no está alterada con respecto a la secuencia aminoacídica natural. En algunos aspectos, la secuencia aminoacídica de la variante de iniciación de la traducción está alterada con respecto a la secuencia aminoacídica natural. En algunos aspectos, la región de iniciación de la traducción incluye una secuencia señal de secreción procariótica.

En algunos modos de realización, las primera y segunda regiones de iniciación traduccional (y en algún aspecto, la tercera región de iniciación traduccional) proporcionan fuerzas traduccionales aproximadamente iguales. En algunos aspectos, la fuerza de traducción relativa es aproximadamente de uno o dos. En algunos aspectos, la fuerza de traducción relativa es aproximadamente de uno. En algunos aspectos, la fuerza de traducción relativa es aproximadamente de dos. En algunos aspectos, la fuerza de traducción relativa es de uno y/o dos. En algunos aspectos, la fuerza de traducción relativa es aproximadamente de tres o aproximadamente de cuatro. En algunos aspectos, la fuerza de traducción relativa se selecciona de una o más de una, dos, tres, cuatro, cinco o más (tal como seis o siete o más).

En algunos modos de realización, el polinucleótido de la invención comprende adicionalmente un promotor enlazado funcionalmente al polipéptido heterógeno. En algunos modos de realización, el promotor es un promotor procariótico seleccionado del grupo que consiste en promotor de phoA, tac, lpp, lac-lpp, lac, ara, trp y T7. En algunos modos de realización, el promotor es un promotor de phoA. En algunos aspectos que implican la expresión de la cadena pesada y ligera de anticuerpo, el polinucleótido comprende adicionalmente (a) un primer promotor, en el que el primer promotor está enlazado funcionalmente a una cadena ligera y (b) un segundo promotor, en el que el segundo promotor está enlazado funcionalmente a una cadena pesada. En algunos aspectos, los primer y segundo

promotores son ambos promotores de *phoA*. En algunos aspectos que implican la expresión de la cadena pesada y ligera de anticuerpo y polipéptido de Fc, el polinucleótido comprende adicionalmente (c) un tercer promotor, en el que el tercer promotor está enlazado funcionalmente a un polipéptido de Fc. En algunos aspectos, el tercer promotor es un polipéptido de Fc.

5 Cuando se expresan polipéptidos que comprenden más de un polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo que comprende una cadena pesada y una cadena ligera), el polinucleótido para expresar el polipéptido puede ser un polinucleótido policistrónico (es decir, un único polinucleótido que contiene y expresa múltiples cistrones bajo el control regulador de un único promotor). Un ejemplo común de un vector policistrónico es un vector "dicistrónico" que
10 contiene y expresa dos polipéptidos diferentes bajo el control de un promotor. Tras la expresión de un vector dicistrónico o policistrónico, se transcriben en primer lugar múltiples regiones codificantes (por ejemplo, genes) como una única unidad transcripcional, y, a continuación, se traducen por separado. Un cistrón se refiere a un elemento genético ampliamente equivalente a una unidad traduccional que comprende la secuencia nucleotídica que codifica una cadena polipeptídica y regiones de control adyacentes (incluyendo, por ejemplo, una TIR). En otros aspectos, el
15 polinucleótido puede comprender cistrones separados, que se refiere a un único polinucleótido que comprende al menos dos pares promotor-citrón separados, en el que cada cistrón está bajo el control de su propio promotor. Tras la expresión de un vector de expresión de cistrón separado, tanto los procesos de transcripción como de traducción de diferentes genes son separados e independientes. En aún otro aspecto, el polinucleótido puede comprender una porción policistrónica y una porción de cistrón separada.

20 En aún otro aspecto, la invención proporciona vectores que comprenden un polinucleótido de la invención. En algunos modos de realización, los vectores son vectores de expresión.

25 En un aspecto adicional, la invención proporciona composiciones que comprenden uno o más polinucleótidos de la invención y un vehículo. En un modo de realización, el vehículo es farmacéuticamente aceptable.

30 En un aspecto, la invención proporciona células huésped que comprenden el polinucleótido o vector de la invención. En algunos modos de realización, las células huésped comprenden un polinucleótido de la invención que codifica un anticuerpo (en algunos aspectos, un anticuerpo biespecífico o de un brazo). La célula huésped puede comprender uno o más polinucleótidos que codifican colectivamente el anticuerpo. Un vector puede ser de cualquier tipo, por ejemplo, un vector recombinante, tal como un vector de expresión. Se puede usar cualquiera de una variedad de células huésped. En un modo de realización, una célula huésped es una célula procariótica, por ejemplo, *E. coli*. En algunos modos de realización, la *E. coli* es de una cepa deficitaria en actividades de proteasa endógena. En algunos modos de realización, el genotipo de la *E. coli* carece de los genes *degP* y *prc* y alberga un gen *spr* mutante.

35 En algunos aspectos, la célula huésped comprende adicionalmente un polinucleótido que codifica una proteína chaperona procariótica (tal como proteínas Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD, FkpA y/o DsbG). En algunos aspectos, la proteína chaperona se sobreexpresa en la célula huésped. En algunos modos de realización, la proteína chaperona es Dsb A y/o DsbC.

40 En un aspecto, la célula huésped comprende uno o más polinucleótidos que codifican colectivamente un anticuerpo de un brazo. En un aspecto, un único polinucleótido codifica (a) los componentes de cadena ligera y pesada del anticuerpo de un brazo, y (b) el polipéptido de Fc. En un aspecto, un único polinucleótido codifica los componentes de polipéptido de Fc y cadena ligera del anticuerpo de un brazo, y un polinucleótido separado codifica el polipéptido
45 de cadena pesada. En un aspecto, un único polinucleótido codifica los componentes de polipéptido de Fc y cadena pesada del anticuerpo de un brazo y un polinucleótido separado codifica el componente de cadena ligera del anticuerpo de un brazo. En un aspecto, los polinucleótidos separados codifican el componente de cadena ligera del anticuerpo de un brazo, el componente de cadena pesada del anticuerpo de un brazo y el polipéptido de Fc, respectivamente.

50 En el presente documento se describen polipéptidos heterógenos. En algunos modos de realización, el polipéptido heterógeno es un anticuerpo. En algunos modos de realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En otros aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal. En algunos modos de realización, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo quimérico, un anticuerpo madurado en afinidad, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo humano. En determinados modos de realización, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico. En determinados modos de realización, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo. En algunos aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo monovalente. En algunos aspectos, el anticuerpo es un Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂ o scFv. En algunos aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo de un brazo (es decir, el dominio variable de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera forman un único brazo de unión a antígeno) que comprende una
55 región Fc, en el que la región Fc comprende un primer y un segundo polipéptido de Fc, en el que el primer y segundo polipéptidos de Fc están presentes en un complejo y forman una región Fc que incrementa la estabilidad de dicho fragmento de anticuerpo en comparación con una molécula de Fab que comprende dicho brazo de unión a antígeno.

60 En algunos aspectos, la descripción divulga un anticuerpo que se une (en algunos aspectos, se une específicamente) a c-met. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-c-met comprende (a) un primer polipéptido que comprende un

dominio variable de la cadena pesada que tiene la secuencia:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWLHWVRQAPGKGLEWVGMIDPS

NSDTRFNPVFKDRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRSYVTPLDYW GQGTLVTVSS

(SEQ ID NO:43), secuencia de CH1, y un primer polipéptido de Fc; (b) un segundo polipéptido que comprende un dominio variable de la cadena ligera que tiene la secuencia:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKSSQSLLYTSSQKNYLAWYQQKPGKAPKLLIYW

5 ASTR

ESGVPSRFRSGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQYYAYPWTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:44), y secuencia de CL1; y

(c) un tercer polipéptido que comprende un segundo polipéptido de Fc, en el que el dominio variable de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera están presentes como un complejo y forman un único brazo de unión a antígeno, en el que el primer y segundo polipéptidos de Fc están presentes en un complejo y forman una región Fc que incrementa la estabilidad de dicho fragmento de anticuerpo en comparación con una molécula de Fab que comprende dicho brazo de unión a antígeno. En algunos aspectos, el primer polipéptido comprende la secuencia de Fc representada en la figura 7 (SEQ ID NO: 68) y el segundo polipéptido comprende la secuencia de Fc representada en la figura 8 (SEQ ID NO: 47). En algunos aspectos, el primer polipéptido comprende la secuencia de Fc representada en la figura 8 (SEQ ID NO: 47) y el segundo polipéptido comprende la secuencia de Fc representada en la figura 7 (SEQ ID NO: 68).

En algunos aspectos, el anticuerpo anti-c-met comprende (a) un primer polipéptido que comprende un dominio variable de la cadena pesada, comprendiendo dicho polipéptido la secuencia:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWLHWVRQAPGKGLEWVGMIDPS

NSDTRFNPVFKDRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRSYVTPLDYW

GQGTLVTVSSASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGAL

TSGVHTFPVAVLQSSGLYLSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKS

CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN

WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP

APIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNG

QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKS

20 LSLSPGK (SEQ ID NO: 45); (b) un segundo polipéptido que comprende un dominio variable de la cadena ligera, comprendiendo el polipéptido la secuencia

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKSSQSLLYTSSQKNYLAWYQQKPGKAPKLLIYW

ASTRESGVPSRFRSGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQYYAYPWTFGQGTKVEIK

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV

TEQDSKDYSLSSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ

TEQDSKDYSLSSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:46); y un tercer polipéptido que comprende un polipéptido de Fc, comprendiendo el polipéptido la secuencia

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN

WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP

APIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG

25 QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKS

LSLSPGK (SEQ ID NO: 47), en el que el dominio variable de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera están presentes como un complejo y forman un único brazo de unión a antígeno, en el que el primer y segundo polipéptidos de Fc están presentes en un complejo y forman una región Fc que incrementa la estabilidad de dicho fragmento de anticuerpo en comparación con una molécula de Fab que comprende dicho brazo de unión a antígeno.

En un aspecto, el anticuerpo anti-c-met comprende un dominio variable de la cadena pesada que comprende una o más de la secuencia de CDR1-HC, CDR2-HC y CDR3-HC representada en la figura 7 (SEQ ID NO: 52-53 y 66). En algunos aspectos, el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena ligera que comprende una o más de la secuencia de CDR1-LC, CDR2-LC y CDR3-LC representada en la figura 7 (SEQ ID NO: 49-51). En algunos aspectos, el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia de FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC y FR4-HC representada en la figura 7 (SEQ ID NO: 62-65). En algunos aspectos, el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia de FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC y FR4-LC representada en la figura 7 (SEQ ID NO: 57-60).

40 En algunos aspectos, el anticuerpo comprende al menos una característica que promueve la heterodimerización, al

tiempo que minimiza la homodimerización, de las secuencias de Fc en el fragmento de anticuerpo. Dicha(s) característica(s) mejora(n) el rendimiento y/o pureza y/o homogeneidad de las poblaciones de inmunoglobulina obtenibles mediante procedimientos de la invención como se describe en el presente documento. En un aspecto, un primer polipéptido de Fc y un segundo polipéptido de Fc se encuentran/interaccionan en una interfase. En algunos aspectos en los que los primer y segundo polipéptidos de Fc se encuentran en una interfase, la interfase del segundo polipéptido de Fc (secuencia) comprende una protuberancia (también denominada "nudo") que se puede posicionar en una cavidad (también denominada "hueco") en la interfase del primer polipéptido de Fc (secuencia). En un aspecto, el anticuerpo comprende mutaciones en Fc que constituyen "nudos" y "huecos" como se describe en el documento W02005/063816. Por ejemplo, una mutación de hueco puede ser una o más de T366A, L368A y/o Y407V en un polipéptido de Fc, y una mutación de nudo puede ser T366W.

La invención también proporciona procedimientos que usan las secuencias señal y TIR variantes de la invención. Se entiende que cualquiera de los polinucleótidos, secuencias señal y TIR variantes divulgados en el presente documento son adecuados para su uso en procedimientos, por ejemplo, los procedimientos de la invención divulgados en el presente documento. En un aspecto adicional, la invención proporciona procedimientos de preparación de un polipéptido heterógeno de la invención. Por ejemplo, la invención proporciona procedimientos de preparación de un polipéptido heterógeno (por ejemplo, un anticuerpo que, como se define en el presente documento, incluye un anticuerpo de longitud completa y fragmentos del mismo), comprendiendo dicho procedimiento cultivar una célula huésped que comprende un polinucleótido de la invención (por ejemplo, un polinucleótido que comprende una región de iniciación de la traducción) de modo que se exprese el polinucleótido, por lo que tras la expresión de dicho polinucleótido en una célula huésped (por ejemplo, una célula huésped procarionótica), el polipéptido heterógeno se pliega para formar un polipéptido heterógeno biológicamente activo. En modos de realización que implican la expresión de anticuerpos, tras la expresión de dicho polinucleótido en una célula huésped, las cadenas ligera y pesada se pliegan y ensamblan para formar un anticuerpo biológicamente activo. En algunos modos de realización, el procedimiento comprende adicionalmente recuperar el polipéptido heterógeno (por ejemplo, un anticuerpo) del cultivo de células huésped. En algunos modos de realización, el polipéptido heterógeno se recupera del medio de cultivo de células huésped. En algunos modos de realización, el procedimiento comprende adicionalmente combinar el polipéptido heterógeno recuperado (por ejemplo, un anticuerpo) con un vehículo, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable para preparar una formulación farmacéutica que comprende el polipéptido heterógeno (por ejemplo, anticuerpo).

En un aspecto, la invención proporciona procedimientos de secreción de un polipéptido heterógeno de interés a partir de una célula, comprendiendo dicho procedimiento cultivar una célula huésped que comprende un polinucleótido de la invención de modo que se exprese el polinucleótido y se secrete el polipéptido heterógeno.

En un aspecto, la invención proporciona procedimientos de translocación de un polipéptido heterógeno de interés a partir de una célula, comprendiendo dicho procedimiento cultivar una célula huésped que comprende un polinucleótido de la invención de modo que se exprese el polinucleótido y se transloque el polipéptido heterógeno.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento de optimización de la secreción de un polipéptido heterógeno de interés en una célula que comprende comparar los niveles de expresión del polipéptido bajo control de un conjunto de variantes polinucleotídicas de una región de iniciación de la traducción, en el que el conjunto de variantes representa un intervalo de fuerzas traduccionales, y determinar la fuerza traduccional óptima para la producción del polipéptido maduro. En algunos aspectos, la fuerza traduccional óptima es menor que la fuerza traduccional de la región de iniciación de la traducción natural. En algunos aspectos, la fuerza traduccional óptima es mayor que la fuerza traduccional de la región de iniciación de la traducción natural. En algunos aspectos, las variantes comprenden variantes polinucleotídicas de una secuencia señal de secreción. En algunos aspectos, las secuencias señal de secreción variantes son secuencias señal de la vía sec y/o secuencias señal de la vía SRP. En algunos aspectos, las secuencias señal de secreción variantes son secuencias señal variantes de PhoA, MalE, DsbA o STII. En algunos aspectos, la variante es una o más variantes mostradas en la tabla 3. En algunos aspectos, la variante comprende la secuencia de una de las SEQ ID NO: 1-14, 36-39, 41-42.

En un aspecto, la invención proporciona un polipéptido heterógeno obtenido mediante un procedimiento de la invención como se describe en el presente documento. En algunos modos de realización, el polipéptido heterógeno es un anticuerpo.

En un aspecto, la invención proporciona usos de un polipéptido heterógeno generado usando los procedimientos de la invención, en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un cáncer, un tumor, un trastorno proliferativo celular y/o un trastorno inmunitario (tal como autoinmunitario). El polipéptido heterógeno puede ser de cualquier forma descrita en el presente documento, incluyendo anticuerpo, fragmento de anticuerpo, polipéptido (por ejemplo, un oligopéptido) o una combinación de los mismos.

En un aspecto, la invención proporciona el uso de un polinucleótido de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un cáncer, un tumor, un trastorno proliferativo celular y/o un trastorno inmunitario (tal como autoinmunitario).

En un aspecto, la invención proporciona el uso de un vector de expresión de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un cáncer, un tumor, un trastorno proliferativo celular y/o un trastorno inmunitario (tal como autoinmunitario).

5 En un aspecto, la invención proporciona el uso de una célula huésped de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un cáncer, un tumor, un trastorno proliferativo celular y/o un trastorno inmunitario (tal como autoinmunitario).

10 En un aspecto, la invención proporciona el uso de un artículo de fabricación de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un cáncer, un tumor, un trastorno proliferativo celular, un trastorno inmunitario (tal como autoinmunitario) y/o un trastorno relacionado con la angiogénesis (cicatrización).

15 En un aspecto, la descripción divulga el uso de un kit de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un cáncer, un tumor, un trastorno proliferativo celular y/o un trastorno inmunitario (tal como autoinmunitario).

Breve descripción de los dibujos

20 FIGURA 1: Translocación de péptidos señal indicados a través de la membrana interna de las bacterias. Los péptidos señal de la proteína periplásmica de unión a maltosa (MalE) y fosfatasa alcalina (PhoA) dirigen la translocación desde el citoplasma al periplasma de una manera postraduccional con ayuda del motor molecular SecA. Los péptidos señal de la enterotoxina termoestable II (StII) y proteína de intercambio tiol:disulfuro (DsbA) dirigen la translocación de una manera cotraduccional con ayuda de la partícula de reconocimiento de señal (SRP).

FIGURA 2: Fuerza de la región de iniciación de la translocación relativa de variantes de péptido señal. Actividad de fosfatasa alcalina basal normalizada de células 27C7 que portan un vector con una fusión entre un péptido señal de STII, MalE, PhoA o bien DsbA y el dominio maduro del gen fosfatasa alcalina (BAP) de *E. coli*. Cada barra representa un cultivo individual incubado con el sustrato cromogénico PNPP y se determinó la actividad enzimática como la absorbancia de ese cultivo a 410 nm menos la absorbancia de un cultivo que portaba un vector vacío (pBR322). Las actividades se normalizaron a la actividad basal de las células 27C7 que portaban el plásmido pPho41. Las barras blancas representan variantes de péptido señal con un sitio de restricción para *BssHII* en la posición -9 con respecto al primer par de bases del codón de iniciación. Las barras grises o rayadas representan un sitio para *MluI* o *XbaI* en la posición -9, respectivamente. Todas las actividades son la media de entre siete y diez experimentos repetidos. Se registran las barras de error como la incertidumbre en la media con un límite de confianza de un 95 %. Las diferencias en la fuerza de TIR relativa entre barras adyacentes son en conjunto estadísticamente significativas ($P < 0,001$). Las barras representan los clones de SH1.2, SH2.41, SH3.38, SH4.60, SH5.34, SH6.52, SH8.36, SL1.2, SL2.74, SL3.72, MH1.92, MH2.100, ML1.97, ML2.123, MX1.wt, MX2.15, MX3.12, MX5.37, MX6.4, MX7.25, MX8.13, MX11.34, PH1.70, PH2.64, PH3.wt, PH4.67, PH5.71, PH6.77, PL1.104, PX2.41, PX3.wt, PX5.53, PX6.15, PX8.24, PX10.23, DH1.48, DH2.wt, DH3.79, DH7.72, DL1.wt, DL2.3, DL3.37 (en orden, de izquierda a derecha).

FIGURA 3: Ensamblaje de comprobación de especies de anticuerpos con manipulación de péptidos señal de cadena pesada. Se cultivaron células 64B4 en 25 ml de medio limitante de fosfato C.R.A.P durante 24 horas y se prepararon fracciones solubles, así como sedimentos de proteínas totales normalizados mediante densidad óptica (DO) para el análisis SDS-PAGE. (A) Las muestras de células que portaban el plásmido pBR-SS-5D5-1.1 (SS1.1), pBR-MS-5D5-1.1 (MS1.1), pBR-DS-5D5-1.1 (DS1.1) o pBR-PS-5D5-1.1 (PS1.1) se separaron mediante electroforesis en gel SDS-PAGE (masa en kDa indicada en el lado izquierdo), se transfirieron a nitrocelulosa y se sometieron a prueba para determinar la presencia de especies que contuvieran cadenas pesadas con un anticuerpo específico de α -Fc. Las muestras solubles (transferencia de parte superior) consistían en las bandas supuestamente identificadas correspondientes a (desde parte superior a parte inferior): anticuerpo de longitud completa, dímero de cadena pesada-pesada-ligera (HHL), pesada-ligera (HL) o cadena pesada libre (monómero de cadena pesada). Las muestras de proteínas totales normalizadas (transferencia de parte inferior) se redujeron con DTT 0,2 M para romper la estructura de enlaces disulfuro y cada carril individual migró a una banda única con una masa aparente de ~49 kDa. (B) Las muestras de (A) se pasaron a un gel de SDS-PAGE separado (masa en kDa indicada en el lado derecho), se transfirieron a nitrocelulosa y se sometieron a prueba para determinar complejos que contuvieran una cadena ligera con un anticuerpo específico de α -kLc. Las muestras solubles (transferencia de parte superior) consistían en las bandas supuestamente identificadas correspondientes a (desde parte superior a parte inferior): anticuerpo de longitud completa, dímero de cadena ligera-ligera (LL), HL o cadena ligera libre (monómero de cadena ligera). Las muestras de proteínas totales normalizadas (transferencia de parte inferior) se redujeron con DTT 0,2 M y cada carril individual migró a una banda única con una masa aparente de ~25 kDa. Abreviaturas: S=secuencia señal de STII, M=secuencia señal de MalE, D=secuencia señal de DsbA, P=secuencia señal de PhoA. XXn.^o.n.^o (por ejemplo, DS1.1) se refiere a la secuencia señal de cadena pesada, secuencia señal de cadena ligera, TIR de cadena pesada, TIR de cadena ligera usadas en el experimento.

FIGURA 4: Ensamblaje de comprobación de especies de anticuerpos con manipulación de péptidos señal de cadena ligera. Se cultivaron células 64B4 en 25 ml de medio limitante de fosfato C.R.A.P durante 24 horas y se prepararon fracciones solubles, así como sedimentos de proteínas totales normalizados mediante densidad óptica (DO) para el análisis SDS-PAGE. Las muestras de células que portaban el plásmido pBR-DS-5D5-1.1 (DS1.1), pBR-DS-5D5-1.2 (DS1.2), pBR-DM-5D5-1.1 (DM1.1), pBR-DM-5D5-1.2 (DM1.2), pBR-DD-5D5-1.1 (DD1.1), pBR-DD-5D5-1.2 (DD1.2), pBR-DP-5D5-1.1 (DP1.1) o pBR-DP-5D5-1.2 se separaron mediante electroforesis en gel SDS-PAGE (masa en kDa indicada en el lado izquierdo), se transfirieron a nitrocelulosa y se sondearon para determinar la presencia de especies que contuvieran cadenas pesadas o ligeras con un anticuerpo específico de α -Fc o α -kLc, respectivamente, como se indica a lo largo del lado derecho de las imágenes. Las muestras solubles (transferencia de parte superior) consistían en las bandas supuestamente identificadas correspondientes a (desde parte superior a parte inferior): anticuerpo de longitud completa, dímero de cadena pesada-pesada-ligera (HHL), pesada-ligera (HL) o cadena pesada libre. Las muestras de proteínas totales normalizadas (transferencia de parte central, parte inferior) se redujeron con DTT 0,2 M para romper la estructura de enlaces disulfuro y cada carril individual migró a una banda única con una masa aparente de ~49 kDa cuando se sondeó con un anticuerpo de α -Fc. Cuando se sondearon con un anticuerpo específico de α -kLc, todos los carriles migraron a una banda única o doble con una masa aparente de ~25 kDa o bien ~27 kDa y ~25 kDa. Abreviaturas: S=secuencia señal de STII, M=secuencia señal de MalE, D=secuencia señal de DsbA, P=secuencia señal de PhoA. XXn.^o.n.^o (por ejemplo, DS1.1) se refiere a la secuencia señal de cadena pesada, secuencia señal de cadena ligera, TIR de cadena pesada, TIR de cadena ligera usadas en el experimento.

FIGURA 5: Ensamblaje de comprobación de especies de anticuerpos con el tiempo a partir de fermentaciones de 10 l. Se cultivaron células 64B4 hasta una densidad celular alta en una fermentación de 10 l durante tres días con muestras tomadas en intervalos de tiempo regulares (muestra en tiempos tomada por encima de cada carril en horas posteriores a la inoculación) a partir de las cuales se prepararon fracciones solubles, así como sedimentos de proteínas totales normalizados mediante densidad óptica (DO) para el análisis SDS-PAGE. Las muestras de células que portaban el plásmido pBR-SS-5D5-1.1 que coexpresaban el plásmido portador de chaperonas pJJ247 (SS1.1 + chaperonas), pBR-DD-5D5-1.1 con pJJ247 (DD1.1 + chaperonas), pBR-DS-5D5-1.1 con pJJ247 (DM1.1 + chaperonas) o pBR-DP-5D5-1.1 con pJJ247 (DP1.1 + chaperonas) se separaron mediante electroforesis en gel SDS-PAGE (masa en kDa indicada en el lado izquierdo), se transfirieron a nitrocelulosa y se sometieron a prueba para determinar la presencia de especies que contuvieran cadenas pesadas o ligeras con un anticuerpo específico de α -Fc o α -kLc, respectivamente, como se indica a lo largo del lado derecho de las imágenes. Las muestras solubles (transferencia de parte superior) consistían en las bandas supuestamente identificadas correspondientes a (desde parte superior a parte inferior): anticuerpo de longitud completa, dímero de cadena pesada-pesada-ligera (HHL), pesada-ligera (HL), dímero de cadena ligera-ligera (LL) o cadena ligera libre. Las muestras de proteínas totales normalizadas (transferencia de parte central, parte inferior) se redujeron con DTT 0,2 mM para romper la estructura de enlaces disulfuro y cada carril individual migró a una banda única con una masa aparente de ~49 kDa cuando se sometió a prueba con un α -Fc. Cuando se sometieron a prueba con un anticuerpo específico de α -kLc, todos los carriles migraron a una banda única con una masa aparente de ~25 kDa. Abreviaturas: S=secuencia señal de STII, M=secuencia señal de MalE, D=secuencia señal de DsbA, P=secuencia señal de PhoA. XXn.^o.n.^o (por ejemplo, DS1.1) se refiere a la secuencia señal de cadena pesada, secuencia señal de cadena ligera, TIR de cadena pesada, TIR de cadena ligera usadas en el experimento.

FIGURA 6: Acumulación de PhoA madura en condiciones de inducción. Se cultivaron células 27C7 en 25 ml de medio limitante de fosfato C.R.A.P durante 24 horas y las fracciones solubles se normalizaron mediante densidad óptica (DO) y se prepararon para el análisis SDS-PAGE. El dominio maduro del gen *phoA* de *E. coli* se fusionó con las variantes de TIR (parte superior) de DsbA o STII (parte inferior) indicadas. Se visualizó el gel para determinar la presencia de proteína mediante tinción con azul de Commassie. Apareció una banda supuestamente identificada correspondiente al dominio maduro de PhoA (derecha) a una masa de ~47 kDa (masa indicada en el lado izquierdo).

FIGURA 7: representa secuencias aminoacídicas de la región estructural (FR), CDR, primer dominio constante (CL o CH1) y región Fc (Fc) de MetMAb (OA5D5v2). La figura divulga secuencias de la cadena ligera como las SEQ ID NO: 57-60, 49-51 y 61, respectivamente, en orden de aparición, y secuencias de la cadena pesada como las SEQ ID NO: 62-65, 52-53 y 66-68, respectivamente, en orden de aparición. La secuencia de Fc representada comprende las mutaciones de "hueco" (cavidad) T366S, L368A y Y407V, como se describe en el documento WO 2005/063816.

FIGURA 8: representa la secuencia de un polipéptido de Fc (SEQ ID NO: 47) que comprende la mutación de "nudo" (protuberancia) T366W, como se describe en el documento WO 2005/063816. En un aspecto, un polipéptido de Fc que comprende esta secuencia forma un complejo con un polipéptido de Fc que comprende la secuencia de Fc de la fig. 7 para generar una región Fc.

Descripción detallada de la invención

Técnicas generales

Las técnicas y los procedimientos descritos o a los que se hace referencia en el presente documento generalmente se comprenden bien y se emplean comúnmente usando una metodología convencional por los expertos en la

técnica, tales como, por ejemplo, las metodologías ampliamente utilizadas descritas en Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3.^a edición (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel, *et al.* eds., (2003)); la serie METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M. J. MacPherson, B. D. Hames and G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL y ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney, ed. (1987)).

Definiciones

El término "vector", como se usa en el presente documento, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico que puede transportar otro ácido nucleico al que se ha enlazado. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector de fago. Otro tipo de vector es un vector vírico, en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales al genoma vírico. Determinados vectores se pueden replicar de manera autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores de mamífero episómicos). Se pueden integrar otros vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episómicos) en el genoma de una célula huésped tras su introducción en la célula huésped, y, de este modo se replican junto con el genoma del huésped. Además, determinados vectores pueden dirigir la expresión de los genes a los que se enlazan funcionalmente. En el presente documento dichos vectores se denominan "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente "vectores recombinantes"). En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante a menudo están en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" se pueden usar indistintamente, ya que el plásmido es la forma de vector más comúnmente usada.

El término "cistrón", como se usa en el presente documento, pretende referirse a un elemento genético ampliamente equivalente a una unidad traduccional que comprende la secuencia nucleotídica que codifica una cadena polipeptídica y regiones de control adyacentes. Las "regiones de control adyacentes" incluyen, por ejemplo, una región de iniciación traduccional (TIR, como se define a continuación en el presente documento) y una región de terminación.

Un vector de expresión "policistrónico" se refiere a un único vector que contiene y expresa múltiples cistrones bajo el control regulador de un único promotor. Un ejemplo común de vector policistrónico es un vector "dicistrónico" que contiene y expresa dos polipéptidos diferentes bajo el control de un promotor. Tras la expresión de un vector dicistrónico o policistrónico, se transcriben en primer lugar múltiples genes como una única unidad transcripcional, y, a continuación, se traducen por separado.

Un vector de expresión de "cistrón separado" de acuerdo con la presente invención se refiere a un único vector que comprende al menos dos pares promotor-cistrón separados, en el que cada cistrón está bajo el control de su propio promotor. Tras la expresión de un vector de expresión de cistrón separado, tanto los procesos de transcripción como de traducción de diferentes genes son separados e independientes.

La "región de iniciación de la traducción" o TIR o región de iniciación traduccional o secuencia de iniciación traduccional, como se usa en el presente documento, se refiere a una región de ácido nucleico que proporciona la eficacia de iniciación traduccional de un gen de interés. En general, una TIR en un cistrón particular abarca el sitio de unión a ribosoma (RBS) y las secuencias 5' y 3' con respecto al RBS. El RBS se define para que contenga, mínimamente, la región de Shine-Dalgarno y el codón de iniciación (AUG). Por consiguiente, una TIR también incluye al menos una porción de la secuencia de ácido nucleico que se va a traducir. Preferentemente, una TIR de la invención incluye una secuencia señal de secreción que codifica un péptido señal que precede a la secuencia que codifica la cadena ligera o pesada en un cistrón. Una variante de TIR contiene variantes de secuencia (particularmente sustituciones) en la región TIR que alteran la propiedad de la TIR, tal como su fuerza traduccional como se define a continuación en el presente documento. Preferentemente, una variante de TIR de la invención contiene sustituciones de secuencia en los primeros 2 a aproximadamente 14, preferentemente aproximadamente 4 a 12, más preferentemente aproximadamente 6 codones de la secuencia señal de secreción que precede a la secuencia que codifica la cadena ligera o pesada en un cistrón.

El término "fuerza traduccional" como se usa en el presente documento se refiere a una medición de un polipéptido secretado en un sistema de control en la que se usan una o más variantes de una TIR para dirigir la secreción de un polipéptido y los resultados se comparan con la TIR natural o algún otro control bajo las mismas condiciones de ensayo y cultivo. Sin estar limitada a ninguna teoría, la "fuerza traduccional" como se usa en el presente documento puede incluir, por ejemplo, una medida de la estabilidad del ARNm, eficacia de la unión del ribosoma al sitio de unión a ribosoma y modo de translocación a través de una membrana.

"Secuencia señal de secreción" o "secuencia señal" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido señal corto que se puede usar para dirigir una proteína recién sintetizada de interés a través de una membrana celular, habitualmente la membrana interna o ambas membranas interna y externa de los procariontes. Como tal, la proteína de interés, tal como el polipéptido de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina se secreta en el periplasma de las células huésped procariontes o en el medio de cultivo. El péptido señal codificado por la

5 secuencia señal de secreción puede ser endógeno a las células huésped, o pueden ser exógenos, incluyendo péptidos señal naturales con respecto al polipéptido que se va a expresar. Las secuencias señal de secreción están típicamente presentes en el extremo amínico de un polipéptido que se va a expresar, y típicamente se eliminan enzimáticamente entre la biosíntesis y secreción del polipéptido desde el citoplasma. De esta manera, el péptido señal no está presente habitualmente en un producto de proteína madura.

10 “Enlazada funcionalmente” se refiere a una yuxtaposición de dos o más componentes, en la que los componentes así descritos están en una relación que les permite funcionar de su manera pretendida. Por ejemplo, un promotor está enlazado funcionalmente a una secuencia codificante si actúa en cis para controlar o modular la transcripción de la secuencia enlazada. Generalmente, pero no necesariamente, las secuencias de ADN que están “enlazadas funcionalmente” son contiguas y, si fuera necesario, unen dos regiones codificantes de proteínas o, en el caso de un líder secretor, contiguas y en marco de lectura. Sin embargo, aunque un promotor enlazado funcionalmente se localiza generalmente en dirección 5' de la secuencia codificante, no es necesariamente contiguo con ella. Los potenciadores enlazados funcionalmente se pueden localizar en dirección 5', dentro o en dirección 3' de las secuencias codificantes y a distancias considerables del promotor. El enlace se logra mediante procedimientos recombinantes conocidos en la técnica, por ejemplo, usando metodología de PCR, mediante hibridación o mediante ligación en sitios de restricción convenientes. Si no existen sitios de restricción convenientes, entonces se usan los enlazadores o adaptadores oligonucleotídicos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

20 Los “elementos reguladores”, como se usa en el presente documento, se refieren a secuencias nucleotídicas presentes en cis, necesarias para la transcripción y traducción de un polinucleótido que codifica un polipéptido heterógeno en polipéptidos. Los elementos reguladores transcripcionales comprenden normalmente un promotor en 5' de la secuencia génica que se va a expresar, sitios de terminación e iniciación transcripcional y una secuencia señal de poliadenilación. El término “sitio de iniciación transcripcional” se refiere al ácido nucleico en la construcción correspondiente al primer ácido nucleico incorporado en el transcrito primario, es decir, el precursor del ARNm; el sitio de iniciación transcripcional se puede solapar con las secuencias promotoras.

30 Un “promotor” se refiere a una secuencia polinucleotídica que controla la transcripción de un gen o secuencia a la que está enlazada funcionalmente. Un promotor incluye señales para la unión a ARN polimerasa e iniciación de la transcripción. Los promotores usados son funcionales en el tipo celular de la célula huésped en la que se contempla la expresión de la secuencia seleccionada.

35 En la técnica se conocen bien un gran número de promotores, incluyendo promotores constitutivos, inducibles y reprimibles de una variedad de fuentes diferentes (e identificados en bases de datos, tales como GenBank) y están disponibles como o dentro de polinucleótidos clonados (a partir de, por ejemplo, depositarios, tales como ATCC, así como otras fuentes comerciales o individuales). Con los promotores inducibles, la actividad del promotor se incrementa o disminuye en respuesta a una señal.

40 El término “célula huésped” (o “célula huésped recombinante”), como se usa en el presente documento, pretende referirse a una célula que se ha alterado genéticamente, o se puede alterar genéticamente mediante la introducción de un polinucleótido exógeno, tal como un vector o plásmido recombinante. Se debe entender que dichos términos no solo pretenden referirse a la célula objeto particular, sino a la descendencia de dicha célula. Puesto que se pueden producir determinadas modificaciones en generaciones subsiguientes debido a mutaciones o bien influencias ambientales, dicha descendencia no puede, de hecho, ser idéntica a la célula madre, pero todavía se incluye dentro del alcance del término “célula huésped” como se usa en el presente documento.

50 Un polipéptido “aislado” (por ejemplo, un anticuerpo) es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interfieren con los usos terapéuticos o de diagnóstico para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En aspectos preferentes, el polipéptido se purifica (1) hasta más de un 95 % en peso de polipéptido como se determina mediante el procedimiento de Lowry, y lo más preferentemente más de un 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia aminoacídica interna o de extremo N mediante el uso de un secuenciador de cubilete giratorio o (3) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio) en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción con plata. El polipéptido aislado incluye el polipéptido *in situ* en células recombinantes, puesto que al menos un componente del entorno natural del polipéptido no está presente. De manera ordinaria, sin embargo, el polipéptido aislado se prepara mediante al menos una etapa de purificación.

60 Una molécula de ácido nucleico “aislada” es una molécula de ácido nucleico que se identifica y separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que se asocia de manera ordinaria en la fuente natural del ácido nucleico. Una molécula de ácido nucleico aislada es distinta en la forma o configuración en la que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas se distinguen de la molécula de ácido nucleico, como existe en las células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que expresan de manera ordinaria el ácido nucleico (por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un anticuerpo) donde, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en

una localización cromosómica diferente de la de las células naturales.

“Polinucleótido” o “ácido nucleico”, como se usan indistintamente en el presente documento, se refieren a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, bases o nucleótidos modificados, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que se pueda incorporar en un polímero mediante ADN o ARN polimerasa, o mediante una reacción sintética. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si están presentes, se puede conferir una modificación en la estructura de los nucleótidos antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos se puede interrumpir por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido se puede modificar adicionalmente después de la síntesis, tal como mediante conjugación con un marcador. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, “caperuzas”, sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales con un análogo, modificaciones internucleotídicas, tales como, por ejemplo, aquellas con enlaces no cargados (por ejemplo, metilfosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y con enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), aquellas que contienen restos laterales, tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, poli-L-lisina, etc.), aquellas con intercalantes (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), aquellas que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radiactivos, boro, metales oxidativos, etc.), aquellas que contienen alquilantes, aquellas con enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.), así como formas no modificadas del/de los polinucleótido(s). Adicionalmente, se puede reemplazar cualquiera de los grupos hidroxilo presentes de manera ordinaria en los azúcares, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, proteger mediante grupos protectores estándar o activar para preparar enlaces adicionales a nucleótidos adicionales, o se puede conjugar a soportes semisólidos o sólidos. El OH de extremo 5' y 3' se puede fosforilar o sustituir con aminas o restos del grupo de remate orgánico de desde 1 a 20 átomos de carbono. También se pueden derivatizar otros hidroxilos a grupos protectores estándar. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de los azúcares ribosa o desoxirribosa que se conocen generalmente en la técnica, incluyendo, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-allyl-, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcares carbocíclicos, azúcares alfa anoméricos, azúcares epiméricos, tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósidos básicos, tales como metil-ribósido. Se pueden reemplazar uno o más enlaces fosfodiéster por grupos de enlace alternativos. Estos grupos de enlace alternativos incluyen, pero no se limitan a, aspectos en los que fosfato se reemplaza por P(O)S (“tioato”), P(S)S (“dilitioato”), (O)NR₂ (“amidato”), P(O)R, P(O)OR', CO o CH₂ (“formacetal”), en los que cada R o R' es independientemente H o alquilo (1-20 C) sustituido o no sustituido que contiene opcionalmente un enlace éter (-O-), arilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno o araldilo. No es necesario que todos los enlaces en un polinucleótido sean idénticos. La descripción precedente se aplica a todos los polinucleótidos a los que se hace referencia en el presente documento, incluyendo ARN y ADN.

“Oligonucleótido”, como se usa en el presente documento, se refiere generalmente a polinucleótidos generalmente sintéticos, generalmente monocatenarios y cortos, que generalmente tienen, pero no necesariamente, una longitud de menos de aproximadamente 200 nucleótidos. Los términos “oligonucleótido” y “polinucleótido” no son mutuamente excluyentes. La descripción anterior para polinucleótidos es igual y completamente aplicable a los oligonucleótidos.

Como se usa en el presente documento, “polipéptido” se refiere generalmente a péptidos y proteínas de cualquier fuente celular que tengan más de aproximadamente diez aminoácidos. Los polipéptidos “heterógenos” son aquellos polipéptidos exógenos a la célula huésped que se utiliza, tales como una proteína humana producida por *E. coli*. Aunque el polipéptido heterógeno puede ser procariótico o eucariótico, es preferentemente eucariótico, más preferentemente, de mamífero, y lo más preferentemente, humano. Preferentemente, es un polipéptido recombinante o producido de manera recombinante. Los polipéptidos “heterógenos” son aquellos polipéptidos exógenos a la célula huésped que se utiliza, tales como una proteína humana producida por *E. coli*. Aunque el polipéptido heterógeno puede ser procariótico o eucariótico, es preferentemente eucariótico, más preferentemente, de mamífero, y lo más preferentemente, humano. Preferentemente, es un polipéptido recombinante o producido de manera recombinante.

Los ejemplos de polipéptidos de mamífero incluyen moléculas, tales como, por ejemplo, renina, una hormona del crecimiento, incluyendo hormona del crecimiento humana; hormona del crecimiento bovina; factor liberador de la hormona del crecimiento; hormona paratiroidea; hormona estimulante del tiroides; lipoproteínas; 1-antitripsina; cadena A de insulina; cadena B de insulina; proinsulina; trombopoyetina; hormona foliculoestimulante; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación, tales como factor VIIIIC, factor IX, tromboplastina tisular y factor de Von Willebrand; factores anticoagulantes, tales como proteína C; péptido natriurético auricular; tensioactivo pulmonar; un activador del plasminógeno, tal como urocinasa u orina humana o activador tisular del plasminógeno (t-PA) y variantes de los mismos, tales como RETEVASE™ y TNKASE™; bombesina; trombina; factor de crecimiento hematopoyético; factor de necrosis tumoral alfa y beta; anticuerpos frente a dominio(s) de ErbB2, tal como 2C4 (documento WO 01/00245, hibridoma ATCC HB-12697), que se une a una región en el dominio extracelular de ErbB2 (por ejemplo, uno o más residuos cualquiera en la región desde aproximadamente el residuo 22 a aproximadamente el residuo 584 de ErbB2, inclusive), encefalinasa; una seroalbúmina, tal como seroalbúmina humana; hormona antimülleriana; cadena A de relaxina; cadena B de relaxina; prorrelaxina; péptido asociado a gonadotropinas de ratón; una proteína

microbiana, tal como beta-lactamasa; DNasa; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores para hormonas o factores de crecimiento; integrina; proteína A o D; factores reumatoideos; un factor neurotrófico, tal como el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5 o -6 (NT-3, NT-4, NT-5 o NT-6), o un factor de crecimiento nervioso, tal como NGF; cardiotrofinas (factor de hipertrofia cardíaca), tales como cardiotrofina-1 (CT-1); factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblastos, tal como aFGF y bFGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento y transformación (TGF), tal como TGF-alfa y TGF-beta, incluyendo TGF-1, TGF-2, TGF-3, TGF-4 o TGF-5; factor de crecimiento similar a la insulina-I y -II (IGF-I e IGF-II); des(I-3)-IGF-I (IGF-I cerebral), proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina; proteínas CD, tales como CD-3, CD-4, CD-8 y CD-19; eritropoyetina; factores osteoinductores; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón, tal como interferón alfa, beta y gamma; seroalbúmina, tal como seroalbúmina humana (HSA) o seroalbúmina bovina (BSA); factores estimulantes de colonias (CSF), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleucinas (IL), por ejemplo, IL-1 a IL-10; anticuerpo anti-HER-2; ligando Apo2; superóxido dismutasa; receptores de linfocitos T; proteínas de membrana de superficie; factor de aceleración del decaimiento; antígeno vírico, tal como, por ejemplo, una porción de la envoltura del sida; proteínas de transporte; receptores de asentamiento; adresinas; proteínas reguladoras; anticuerpos; y fragmentos de cualquiera de los polipéptidos enumerados anteriormente.

Los polipéptidos preferentes en el presente documento incluyen seroalbúmina humana (HSA), 2C4, tromboplastina tisular, anti-tromboplastina tisular, anti-CD20, anti-HER-2, heregulina, anti-IgE, anti-CD11a, anti-CD18, VEGF y receptores y anticuerpos del mismo, tales como rhuFab V2 y AVASTIN™, hormona del crecimiento y sus variantes, tales como hGH, receptores de la hormona del crecimiento, proteína liberadora de la hormona del crecimiento (GHRP), LIV-1 (documento EP 1.263.780), TRAIL, factor de necrosis tumoral (TNF) y anticuerpos del mismo, receptor de TNF y anticuerpos relacionados, receptor de TNF-IgG, factores asociados al receptor de TNF (TRAF) e inhibidores de los mismos, factor VIII, dominio B del factor VIII, interferones, tales como interferón gamma, factores de crecimiento y transformación (TGF), tales como TGF-beta, anti-TGF, tal como anti-TGF-beta, activina, inhibina, anti-activina, anti-inhibina, activadores tisulares del plasminógeno y sus variantes, tales como t-PA, RETEPLASE™ y TNKasa, anticuerpos anti-Fas, ligando Apo-2; inhibidor del ligando Apo-2; receptor Apo-2, Apo-3, factores apoptóticos, Ced-4, Dcr3, anticuerpos agonistas del receptor de muerte (DR4, DR5), linfotóxina (LT), prolactina, receptor de prolactina, proteínas SOB, WISP (proteínas secretadas inducidas por wnt-1), neurotoxina-3 (NT-3), factor de crecimiento nervioso (NGF) y anti-NGF, DNasa, antígeno de hepatitis, antígeno de herpes simple, leptina, factores de crecimiento similares a la insulina (IGF), tales como IGF-1 e IGF-2 y sus proteínas de unión y receptores, tales como IGFBP-1-IGFBP-6, insulina, factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), tales como FGF-17, proteína Toll, ligandos TIE, CD40 y anti-CD40, inmunoadhesinas, subtilisina, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), trombopoyetina (TPO), interleucinas, tales como IL-2, IL-12, IL-17, IL-22, IL-8, IL-9, y anticuerpos frente a las mismas, y antígeno específico del cáncer de próstata (PSCA).

Los polipéptidos particularmente preferentes son polipéptidos recombinantes, más preferentemente, anticuerpos, que incluyen anticuerpos monoclonales y anticuerpos humanizados. Dichos anticuerpos pueden ser anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo. Más preferentemente, estos anticuerpos son anticuerpos humanos o humanizados. Todavía más preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo anti-c-met, anti-IgE, anti-CD18, anti-VEGF, anti-tromboplastina tisular, 2C4, anti-Her-2, anti-CD20, anti-CD40 o anti-CD11a. Los fragmentos de anticuerpo abarcados en la definición de polipéptido comprenden preferentemente una cadena ligera, más preferentemente, una cadena ligera kappa. Dichos fragmentos preferentes incluyen, por ejemplo, un Fab, Fab', F(ab')₂ o fusión F(ab')₂-cremallera de leucinas (CL) y un anticuerpo de un brazo.

La "expresión" de proteínas se refiere a la conversión de la información codificada en un gen en ARN mensajero (ARNm) y, a continuación, a la proteína.

Un "inmunoconjugado" (denominado indistintamente "conjugado anticuerpo-fármaco" o "CAF") quiere decir un anticuerpo conjugado a uno o más agentes citotóxicos, tales como un agente quimioterápico, un fármaco, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina proteica, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma) o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado).

Un anticuerpo "de bloqueo" o un anticuerpo "antagonista" es uno que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno al que se une. En algunos aspectos, los anticuerpos de bloqueo o anticuerpos antagonistas inhiben completamente la actividad biológica del antígeno.

Un "anticuerpo agonista", como se usa en el presente documento, es un anticuerpo que imita al menos una de las actividades funcionales de un polipéptido de interés (por ejemplo, HGF).

La "afinidad de unión" se refiere generalmente a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y ligando (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, como se usa en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de una pareja de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su ligando Y generalmente se puede representar por la constante de

disociación (Kd). De manera deseable, Kd es 1×10^{-7} , 1×10^{-8} , 5×10^{-8} , 1×10^{-9} , 3×10^{-9} , 5×10^{-9} , o incluso 1×10^{-10} o más fuerte. La afinidad se puede medir mediante procedimientos comunes conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. Los anticuerpos de baja afinidad generalmente se unen al antígeno lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad generalmente se unen al antígeno más deprisa y tienden a permanecer unidos más tiempo. Se conoce en la técnica una variedad de procedimientos de medición de la afinidad de unión, cualquiera de los cuales se puede usar para los propósitos de la presente invención. Los aspectos ilustrativos específicos se describen a continuación.

En un aspecto, la "Kd" o "valor de Kd" de acuerdo con la presente invención se mide mediante un ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RIA) realizado con la versión de Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno como se describe por el siguiente ensayo que mide la afinidad de unión en solución de Fab para el antígeno equilibrando Fab con una concentración mínima de antígeno marcado con (125 I) en presencia de una serie de valoraciones de antígeno no marcado, a continuación, capturando el antígeno unido con una placa recubierta con anticuerpo anti-Fab (Chen, *et al.*, (1999) J. Mol. Biol. 293:865-881). Para establecer las condiciones para el ensayo, se recubren placas de microvaloración (Dynex) durante la noche con $5 \mu\text{g/ml}$ de un anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) en carbonato de sodio 50 mM (pH 9,6) y posteriormente se bloquean con seroalbúmina bovina al 2 % (p/v) en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente $23 \text{ }^\circ\text{C}$). En una placa no adsorbente (Nunc n.º 269620), se mezcla [125 I]-antígeno 100 pM o 26 pM con diluciones en serie de un Fab de interés (por ejemplo, consistente con la evaluación de un anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta *et al.*, (1997) Cancer Res. 57:4593-4599). A continuación, el Fab de interés se incuba durante la noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un periodo más largo (por ejemplo, 65 horas) para asegurar que se alcanza el equilibrio. Después, las mezclas se transfieren a la placa de captura para su incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). A continuación, se elimina la solución y se lava la placa ocho veces con Tween-20 al 0,1 % en PBS. Cuando las placas hayan secado, se añaden $150 \mu\text{l}$ /pocillo de centelleador (MicroScint-20; Packard) y se cuentan las placas en un contador gamma Topcount (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de cada Fab que dan menos que o igual a un 20 % de unión máxima se eligen para su uso en ensayos de unión competitiva. De acuerdo con otro aspecto, la Kd o valor de Kd se mide usando ensayos de resonancia de plasmón superficial que usan un BIAcore™-2000 o un BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ con chips CM5 de antígeno inmovilizado a ~ 10 unidades de respuesta (UR). En resumen, los chips de biosensor de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore, Inc.) se activan con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM , pH 4,8 en $5 \mu\text{g/ml}$ ($\sim 0,2 \mu\text{M}$) antes de la inyección a un caudal de $5 \mu\text{l}/\text{minuto}$ para conseguir aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Tras la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos que no han reaccionado. Para mediciones cinéticas, se inyectan dos veces diluciones en serie de Fab ($0,78 \text{ nM}$ a 500 nM) en PBS con Tween 20 al 0,05 % (PBST) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ a un caudal de aproximadamente $25 \mu\text{l}/\text{min}$. En algunos aspectos, se usan las siguientes modificaciones para el procedimiento de ensayo de resonancia de plasmón superficial: el anticuerpo se inmoviliza en chips de biosensor CM5 para conseguir aproximadamente 400 UR, y para las mediciones cinéticas, se inyectan dos veces diluciones en serie de la proteína diana en tampón PBST a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ con un caudal de aproximadamente $30 \mu\text{l}/\text{minuto}$. Las tasas de asociación (k_{as}) y tasas de disociación (k_{dis}) se calculan usando un simple modelo de unión uno a uno de Langmuir (BIAcore Evaluation Software version 3.2) mediante el ajuste simultáneo del sensograma de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (Kd) se calcula como la proporción $k_{\text{dis}}/k_{\text{as}}$. Véase, por ejemplo, Chen, Y., *et al.*, (1999) J. Mol. Biol. 293:865-881. Si la tasa as excede $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ mediante el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, entonces la tasa as se puede determinar usando una técnica de extinción fluorescente que mide el incremento o disminución de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación= 295 nm ; emisión= 340 nm , paso de banda de 16 nm) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno medida en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con detención de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro 8000-series SLM-Aminco (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

Una "tasa as" o "tasa de asociación" o " k_{as} " de acuerdo con la presente invención también se puede determinar con la misma técnica de resonancia de plasmón superficial descrita anteriormente usando un BIAcore™-2000 o un BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ con chips CM5 de antígeno inmovilizado a ~ 10 unidades de respuesta (UR). En resumen, los chips de biosensor de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore, Inc.) se activan con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM , pH 4,8 en $5 \mu\text{g/ml}$ ($\sim 0,2 \mu\text{M}$) antes de la inyección a un caudal de $5 \mu\text{l}/\text{minuto}$ para conseguir aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Tras la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos que no han reaccionado. Para mediciones cinéticas, se inyectan dos veces diluciones en serie de Fab ($0,78 \text{ nM}$ a 500 nM) en PBS con Tween 20 al 0,05 % (PBST) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ a un caudal de aproximadamente $25 \mu\text{l}/\text{min}$. En algunos aspectos, se usan las siguientes modificaciones para el procedimiento de ensayo de resonancia de plasmón superficial: el anticuerpo se inmoviliza en chips de biosensor CM5 para conseguir aproximadamente 400 UR, y para las mediciones cinéticas, se inyectan dos veces diluciones en serie de la proteína diana en tampón PBST a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ con un caudal de aproximadamente $30 \mu\text{l}/\text{minuto}$. Las tasas de asociación (k_{as}) y tasas de disociación (k_{dis}) se calculan usando un simple modelo de unión uno a uno de Langmuir (BIAcore Evaluation Software version 3.2) mediante el ajuste simultáneo del sensograma de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (Kd) se calculó como la proporción $k_{\text{dis}}/k_{\text{as}}$. Véase, por ejemplo, Chen, Y., *et al.*, (1999) J. Mol. Biol. 293:865-881. Sin

embrago, si la tasa as excede $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ mediante el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, entonces la tasa as se determina preferentemente usando una técnica de extinción fluorescente que mide el incremento o disminución de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación=295 nm; emisión=340 nm, paso de banda de 16 nm) a 25 °C de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno medida en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con detención de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro 8000-series SLM-Aminco (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

Un “anticuerpo no marcado” es un anticuerpo que no está conjugado a una molécula heterógena, tal como un resto citotóxico o radiomarcador.

Un anticuerpo que tiene una “característica biológica” de un anticuerpo designado es uno que posee una o más de las características biológicas de ese anticuerpo que lo distinguen de otros anticuerpos que se unen al mismo antígeno.

A fin de cribar para determinar anticuerpos que se unen a un epítipo en un antígeno unido por un anticuerpo de interés, se puede realizar un ensayo de bloqueo cruzado rutinario, tal como el que se describe en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988).

Para incrementar la semivida de los anticuerpos o polipéptidos que contienen las secuencias aminoacídicas de la presente invención, se puede fijar un epítipo de unión a receptor de rescate al anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo), como se describe, por ejemplo, en la patente de EE. UU. 5.739.277. Por ejemplo, se puede enlazar en marco una molécula de ácido nucleico que codifica el epítipo de unión a receptor de rescate a un ácido nucleico que codifica una secuencia polipeptídica de la presente invención de modo que la proteína de fusión expresada por la molécula de ácido nucleico genomanipulada comprenda el epítipo de unión a receptor de rescate y una secuencia polipeptídica de la presente invención. Como se usa en el presente documento, el término “epítipo de unión a receptor de rescate” se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄) que es responsable de incrementar la semivida en suero *in vivo* de la molécula de IgG (por ejemplo, Ghetie *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.* 18:739-766 (2000), tabla 1). Los anticuerpos con sustituciones en una región Fc de los mismos y semividas en suero incrementadas también se describen en los documentos WO00/42072, WO 02/060919; Shields *et al.*, *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604 (2001); Hinton, *J. Biol. Chem.* 279:6213-6216 (2004)). En otro aspecto, la semivida en suero también se puede incrementar, por ejemplo, fijando otras secuencias polipeptídicas. Por ejemplo, se pueden fijar anticuerpos u otros polipéptidos útiles en los procedimientos de la invención a seroalbúmina o a una porción de seroalbúmina que se una al receptor FcRn o un péptido de unión a seroalbúmina de modo que la seroalbúmina se una al anticuerpo o polipéptido, por ejemplo, dichas secuencias polipeptídicas se divulgan en el documento WO01/45746. En un aspecto preferente, el péptido con seroalbúmina que se va a fijar comprende una secuencia aminoacídica de DICLPRWGCLW (SEQ ID NO: 48). En otro aspecto, la semivida de un Fab se incrementa mediante estos procedimientos. Véase también Dennis *et al.* *J. Biol. Chem.* 277:35035-35043 (2002) para secuencias de péptidos de unión a seroalbúmina. Por “fragmento” se quiere decir una porción de un polipéptido o molécula de ácido nucleico que contiene, preferentemente, al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más de toda la longitud del polipéptido o molécula de ácido nucleico de referencia. Un fragmento puede contener 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, o 100, 200, 300, 400, 500, 600 o más nucleótidos o 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 190, 200 aminoácidos o más.

Los términos “anticuerpo” e “inmunoglobulina” se usan indistintamente en el sentido más amplio e incluyen anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpos monoclonales de longitud completa o intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos siempre que presenten la actividad biológica deseada) y también pueden incluir determinados fragmentos de anticuerpo (como se describe con mayor detalle en el presente documento). Un anticuerpo puede ser humano, humanizado y/o madurado en afinidad.

El término “variable” se refiere al hecho de que determinadas porciones de los dominios variables difieren extensamente en la secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente por todos los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos llamados regiones determinantes de la complementariedad (CDR) o regiones hipervariables tanto en los dominios variables de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se llaman la región estructural (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera naturales comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina β , que se conectan mediante tres CDR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos, forman parte de, la estructura de lámina β . Las CDR en cada cadena se mantienen unidas en estrecha proximidad mediante las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpos.

La digestión de los anticuerpos con papaína produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión a antígeno y un fragmento "Fc" residual, cuya designación refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación de antígeno y todavía se puede reticular con el antígeno.

5 "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de unión a y de reconocimiento de antígeno completo. En una especie de Fv bicatenario, esta región consiste en un dímero de un dominio variable de la cadena ligera y uno de la pesada y en cercana asociación no covalente. En una especie de Fv monocatenario, se pueden enlazar covalentemente un dominio variable de la cadena ligera y uno de la pesada mediante un enlazador peptídico flexible, de tal manera que las cadenas ligera y pesada se puedan asociar en una estructura "dimérica" análoga a la de una especie de Fv bicatenario. Es en esta configuración en la que las tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, las seis CDR confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende únicamente tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad para reconocer y unirse al antígeno, aunque a una afinidad más baja que todo el sitio de unión.

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxílico del dominio CH1 de la cadena pesada, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para un Fab' en el que el/los residuo(s) de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamiento químicos de fragmentos de anticuerpo.

25 Se pueden asignar las "cadenas ligeras" de los anticuerpos (immunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado a uno de dos tipos claramente distintos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), basándose en las secuencias aminoácidas de sus dominios constantes.

Dependiendo de la secuencia aminoácida del dominio constante de sus cadenas pesadas, se pueden asignar immunoglobulinas a diferentes clases. Hay cinco clases principales de immunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Los dominios constantes de la cadena pesada que se corresponden a las diferentes clases de immunoglobulinas se llaman α, δ, ε, γ y μ, respectivamente. Se conocen bien las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de immunoglobulinas. Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden únicamente una porción de un anticuerpo intacto, en los que la porción retiene preferentemente al menos una, preferentemente la mayor parte o la totalidad, de las funciones asociadas normalmente con esa porción cuando está presente en un anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; dímeros; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenario; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. En un modo de realización, un fragmento de anticuerpo comprende un sitio de unión a antígeno del anticuerpo intacto y, de esta manera, retiene la capacidad para unirse al antígeno. En otro modo de realización, un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, uno que comprende la región Fc, retiene al menos una de las funciones biológicas asociadas normalmente con la región Fc cuando está presente en un anticuerpo intacto, tal como la unión a FcRn, la modulación de la semivida del anticuerpo, la función ADCC y la unión a complemento. En un modo de realización, un fragmento de anticuerpo es un anticuerpo monovalente que tiene una semivida *in vivo* sustancialmente similar a un anticuerpo intacto. Por ejemplo, dicho fragmento de anticuerpo puede comprender un brazo de unión a antígeno enlazado a una secuencia de Fc que puede conferir estabilidad *in vivo* al fragmento.

El término "región hipervariable", "HVR" o "HV", cuando se usa en el presente documento, se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son de secuencia hipervariable y/o forman bucles estructuralmente definidos. Generalmente, los anticuerpos comprenden seis regiones hipervariables; tres en la VH (H1, H2, H3) y tres en la VL (L1, L2, L3). Se usa una serie de delimitaciones de región hipervariable y se abarcan en el presente documento. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de Kabat se basan en la variabilidad de secuencia y son las más comúnmente usadas (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). En cambio, Chothia se refiere a la localización de los bucles estructurales (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Las regiones hipervariables del AbM representan un compromiso entre las CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y se usan por el programa informático de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. Las regiones hipervariables de "contacto" se basan en un análisis de las estructuras cristalinas de los complejos disponibles. Los residuos de cada una de estas regiones hipervariables se indican a continuación.

Bucle	Kabat	AbM	Chothia	Contacto
	-----	---	-----	-----
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36

ES 2 636 971 T3

L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
(Numeración de Kabat)				
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
(Numeración de Chothia)				
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

Las regiones hipervariables pueden comprender las “regiones hipervariables extendidas” como sigue: 24-36 o 24-34 (L1), 46-56 o 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en la VL y 26-35 (H1), 50-65 o 49-65 (H2) y 93-102, 94-102 o 95-102 (H3) en la VH. Los residuos del dominio variable se numeran de acuerdo con Kabat *et al.*, *supra* para cada una de estas definiciones.

Los residuos de la “región estructural” o “FR” son los residuos del dominio variable distintos a los residuos de la región hipervariable, como se define en el presente documento.

Las formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano, que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región estructural (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Se hacen estas modificaciones para refinar adicionalmente el funcionamiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprende sustancialmente todos de al menos un, y típicamente dos, dominios variables en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprende al menos una porción de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para obtener más detalles, véanse Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). Véanse también los siguientes artículos de revisión y referencias citadas en los mismos: Vaswani and Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurlle and Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994).

Los anticuerpos “quiméricos” (inmunoglobulinas) tienen una porción de la cadena pesada y/o ligera idéntica a u homóloga a las secuencias correspondientes de anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico a u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (patente de EE. UU. n.º 4.816.567; y Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)). El anticuerpo humanizado como se usa en el presente documento es un subconjunto de anticuerpos quiméricos.

Los fragmentos de anticuerpo “Fv monocatenario” o “scFv” comprenden los dominios de VH y VL del anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Generalmente, el polipéptido de scFv comprende adicionalmente un enlazador polipeptídico entre los dominios de VH y VL, que posibilita que el scFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de los scFv, véase Pluckthun, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

Un “antígeno” es un antígeno predeterminado al que se puede unir selectivamente un anticuerpo. El antígeno diana puede ser un polipéptido, carbohidrato, ácido nucleico, lípido, hapteno u otro compuesto natural o sintético. Preferentemente, el antígeno diana es un polipéptido.

El término “diacuerpos” se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo los fragmentos un dominio variable de la cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Al usar un enlazador que sea demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se fuerza a que los dominios se emparejen con los dominios complementarios de otra cadena y creen dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen más en detalle, por ejemplo, en los documentos EP 404,097; WO 93/11161; y Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia aminoacídica que se corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o se ha preparado usando cualquiera de las técnicas para preparar anticuerpos humanos como se divulga en el presente documento. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos.

Un anticuerpo "madurado en afinidad" es uno con una o más alteraciones en una o más CDR del mismo que dan como resultado una mejora de la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo original que no posee dicha(s) alteración/alteraciones. Los anticuerpos madurados en afinidad preferentes tienen afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Los anticuerpos madurados en afinidad se producen mediante procedimientos conocidos en la técnica. Marks *et al.* Bio/Technology 10:779-783 (1992) describe la maduración de la afinidad mediante barajado de los dominios de VH y VL. La mutagénesis aleatoria de los residuos de la región estructural y/o CDR se describe por: Barbas *et al.*, Proc Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813 (1994); Schier *et al.*, Gene 169:147-155 (1995); Yelton *et al.*, J. Immunol. 155:1994-2004 (1995); Jackson *et al.*, J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995); y Hawkins *et al.*, J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992).

El "receptor de Fc" o "FcR" describe un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferente es un FcR humano de secuencia natural. Además, un FcR preferente es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y alternativamente formas empalmadas de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor de activación") y FcγRIIB (un "receptor de inhibición"), que tienen secuencias aminoacídicas similares que difieren primordialmente en los dominios citoplásmicos de los mismos. El receptor de activación FcγRIIA contiene un motivo de activación de inmunoreceptor basado en tirosina (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor de inhibición FcγRIIB contiene un motivo de inhibición de inmunoreceptor basado en tirosina (ITIM) en su dominio citoplásmico (véase la revisión de M. en Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). Los FcR se revisan en Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991); Capel *et al.*, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); y de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). Se abarcan otros FcR, incluyendo los que se van a identificar en el futuro, por el término "FcR" en el presente documento. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto ((Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)) y regula la homeostasis de las inmunoglobulinas. El documento WO 00/42072 (Presta) describe variantes de anticuerpo con unión mejorada o reducida a los FcR. Véase también Shields *et al.*, *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001).

Se conocen procedimientos de medición de la unión a FcRn (véase, por ejemplo, Ghetie 1997, Hinton 2004). Se pueden someter a ensayo la unión al FcRn humano *in vivo* y la semivida en suero de polipéptidos de unión de alta afinidad a FcRn humanos, por ejemplo, en ratones transgénicos o líneas celulares humanas transfectadas que expresan el FcRn humano, o en primates a los que se administran los polipéptidos variantes de Fc.

Las variantes de polipéptido con secuencias aminoacídicas de la región Fc alteradas y capacidad de unión a C1q incrementada o disminuida se describen en la patente de EE. UU. n.º 6.194.551B1 y el documento WO 99/51642. Véase, por ejemplo, Idusogie *et al.*, *J. Immunol.* 164:4178-4184 (2000).

El término "región Fc", como se usa en el presente documento, se refiere generalmente a un complejo dimérico que comprende las secuencias polipeptídicas de extremo C de una cadena pesada de inmunoglobulina, en el que una secuencia polipeptídica de extremo C es la que es obtenible mediante digestión con papaína de un anticuerpo intacto. La región Fc puede comprender secuencias de Fc variantes o naturales. Aunque los límites de la secuencia de Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, la secuencia de Fc de la cadena pesada de IgG humana se define habitualmente para que se expanda desde un residuo aminoacídico en aproximadamente la posición Cys226, o desde aproximadamente la posición Pro230, hasta el extremo carboxílico de la secuencia de Fc. La secuencia de Fc de una inmunoglobulina comprende generalmente dos dominios constantes, un dominio CH2 y un dominio CH3, y opcionalmente comprende un dominio CH4. Por "polipéptido de Fc" en el presente documento se quiere decir uno de los polipéptidos que conforman una región Fc. Se puede obtener un polipéptido de Fc a partir de cualquier inmunoglobulina adecuada, tal como los subtipos IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, IgA, IgE, IgD o IgM. En algunos aspectos, un polipéptido de Fc comprende parte o toda una secuencia bisagra natural (generalmente en su extremo N). En algunos aspectos, un polipéptido de Fc no comprende una secuencia bisagra natural o funcional.

Como se usa en el presente documento, "mutante de anticuerpo" o "variante de anticuerpo" se refiere a una variante de secuencia aminoacídica de un anticuerpo en la que se han modificado uno o más de los residuos aminoacídicos del anticuerpo dependiente de la especie. Dichos mutantes tienen necesariamente menos de un 100 % de identidad de secuencia o similitud con el anticuerpo dependiente de la especie. En un aspecto, el mutante de anticuerpo tiene una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 75 % de identidad de secuencia aminoacídica o similitud con la secuencia aminoacídica del dominio variable de la cadena pesada o bien de la ligera del anticuerpo dependiente de la especie, más preferentemente al menos un 80 %, más preferentemente al menos un 85 %, más preferentemente al menos un 90 % y lo más preferentemente al menos un 95 %. En el presente documento se define identidad o similitud con respecto a esta secuencia como el porcentaje de residuos aminoacídicos en la secuencia candidata que son idénticos (es decir, el mismo residuo) o similares (es decir, el residuo aminoacídico del mismo grupo basándose en propiedades de cadena lateral comunes, véase a continuación) con los residuos de anticuerpos

dependientes de la especie, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para conseguir el porcentaje de identidad de secuencia máximo. No se deben interpretar ninguna de las inserciones, deleciones o extensiones internas, de extremo C o de extremo N en la secuencia de anticuerpo fuera del dominio variable como que afectan a la identidad o similitud de secuencia.

5 Un “trastorno” o “enfermedad” es cualquier afección que se beneficia del tratamiento con una sustancia/molécula o procedimiento de la invención. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas, incluyendo las afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Los ejemplos no limitantes de trastornos que se van a tratar en el presente documento incluyen tumores malignos y benignos; carcinoma, blastoma y sarcoma.

10 “Tratamiento” se refiere tanto al tratamiento terapéutico como profiláctico o a medidas preventivas. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya tienen un tumor benigno, precanceroso o no metastásico, así como aquellos en los que se va a prevenir la aparición o recidiva del cáncer.

15 El término “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de un agente terapéutico para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno en un mamífero. En el caso de cánceres, la cantidad terapéuticamente eficaz del agente terapéutico puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor primario; inhibir (es decir, ralentizar en cierta medida y preferentemente detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar en cierta medida y preferentemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, en cierta medida, el crecimiento tumoral; y/o aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas asociados con el trastorno. En la medida en la que el fármaco pueda prevenir el crecimiento y/o destruir las células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. Para el tratamiento del cáncer, la eficacia *in vivo* se puede medir, por ejemplo, evaluando la duración de la supervivencia, tiempo de evolución de la enfermedad (TTP), las tasas de respuesta (RR), la duración de la respuesta y/o la calidad de vida.

25 Una “enfermedad autoinmunitaria” en el presente documento es una enfermedad o trastorno no maligno que surge de y se dirige contra los propios tejidos de una persona. Las enfermedades autoinmunitarias en el presente documento

30 excluyen específicamente enfermedades o afecciones malignas o cancerosas, que excluyen especialmente linfoma de linfocitos B, leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (CLL), tricoleucemia y leucemia mieloblástica crónica. Los ejemplos de enfermedades o trastornos autoinmunitarios incluyen, pero no se limitan a, respuestas inflamatorias, tales como dermatosis inflamatorias, incluyendo psoriasis y dermatitis (por ejemplo, dermatitis atópica); esclerodermia generalizada y esclerosis; respuestas asociadas con la enfermedad inflamatoria intestinal (tales como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa); síndrome de dificultad respiratoria (incluyendo síndrome de dificultad respiratoria del adulto, SDRA); dermatitis; meningitis; encefalitis; uveítis; colitis; glomerulonefritis; afecciones alérgicas, tales como eccema y asma y otras afecciones que implican infiltración de linfocitos T y respuestas inflamatorias crónicas; aterosclerosis; deficiencia de adhesión de leucocitos; artritis reumatoide; lupus eritematoso diseminado (LED); diabetes mellitus (por ejemplo, diabetes mellitus de tipo I o diabetes mellitus insulino dependiente); esclerosis múltiple; síndrome de Raynaud; tiroiditis autoinmunitaria; encefalomielitis alérgica; síndrome de Sjögren; diabetes de tipo 1; y respuestas inmunitarias asociadas con hipersensibilidad aguda y retardada mediada por citocinas y linfocitos T encontrados típicamente en tuberculosis, sarcoidosis, polimiositis, granulomatosis y vasculitis; anemia perniciosa (enfermedad de Addison); enfermedades que implican diapedesis leucocitaria; trastorno inflamatorio del sistema nervioso central (SNC); síndrome de lesión multiorgánica; anemia hemolítica (incluyendo, pero no limitada a, crioglobulinemia o anemia positiva de Coombs);

45 miastenia grave; enfermedades mediadas por complejos antígeno-anticuerpo; enfermedad por anticuerpos anti-membrana basal glomerular; síndrome antifosfolípídico; neuritis alérgica; enfermedad de Graves-Basedow; síndrome miasténico de Lambert-Eaton; pénfigo ampolloso; pénfigo; poliendocrinopatías autoinmunitarias; enfermedad de Reiter; síndrome del hombre rígido; enfermedad de Behçet; arteritis de células gigantes; nefritis por inmunocomplejos; nefropatía por IgA; polineuropatías por IgM; púrpura trombocitopénica inmunitaria (PTI) o trombocitopenia autoinmunitaria, etc.

Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren a o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado. En esta definición se incluyen los cánceres benignos y malignos. Por “cáncer en estadio temprano” o “tumor en estadio temprano” se quiere decir un cáncer que no es invasivo ni

55 metastásico o se clasifica como un cáncer en estadio 0, I o II. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma (incluyendo meduloblastoma y retinoblastoma), sarcoma (incluyendo liposarcoma y sarcoma de células sinoviales), tumores neuroendocrinos (incluyendo tumores carcinoides, gastrinoma e insulino), mesotelioma, schwannoma (incluyendo neurinoma del acústico), meningioma, adenocarcinoma, melanoma y leucemia o neoplasias malignas linfoides. Los ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen carcinoma de células escamosas (por ejemplo, carcinoma de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón, incluyendo carcinoma microcítico (SCLC), carcinoma no microcítico (NSCLC), adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago, incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama (incluyendo cáncer de mama metastásico), cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o útero, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer renal o de riñón, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene,

cáncer testicular, cáncer esofágico, tumores de las vías biliares, así como cáncer de cabeza y cuello y mieloma múltiple.

5 El término “precanceroso” se refiere a una afección o un crecimiento que típicamente precede o se convierte en un cáncer. Un crecimiento “precanceroso” tiene células que se caracterizan por una regulación, proliferación o diferenciación anómala del ciclo celular, que se puede determinar mediante marcadores de regulación del ciclo celular, proliferación celular o diferenciación.

10 Por “displasia” se quiere decir cualquier crecimiento o desarrollo anómalo de tejido, órgano o células. Preferentemente, la displasia es de alto grado o precancerosa.

15 Por “metástasis” se quiere decir la diseminación del cáncer desde su sitio primario a otras partes del cuerpo. Las células cancerosas se pueden separar de un tumor primario, penetrar en los vasos linfáticos y sanguíneos, circular a través del torrente circulatorio y crecer en un foco a distancia (metastatizar) en los tejidos normales de cualquier parte del cuerpo. Las metástasis pueden ser locales o a distancia. La metástasis es un proceso secuencial, dependiente de que las células tumorales se separen del tumor primario, se desplacen a través del torrente circulatorio y se detengan en un sitio a distancia. En el nuevo sitio, las células establecen un suministro de sangre y pueden crecer para formar una masa potencialmente mortal.

20 Tanto las vías moleculares estimuladoras como las inhibidoras en la célula tumoral regulan este comportamiento, y las interacciones entre la célula tumoral y las células huésped en el sitio a distancia también son significativas.

25 Por “no metastásico” se quiere decir un cáncer que es benigno o que permanece en el sitio primario y no ha penetrado en el sistema de vasos linfáticos o sanguíneos ni en tejidos distintos del sitio primario. Generalmente, un cáncer no metastásico es cualquier cáncer que es un cáncer en estadio 0, I o II y ocasionalmente un cáncer en estadio III.

30 Por “tumor primario” o “cáncer primario” se quiere decir el cáncer original y no una lesión metastásica localizada en otro tejido, órgano o localización en el cuerpo del sujeto.

Por “tumor benigno” o “cáncer benigno” se quiere decir un tumor que permanece localizado en el sitio de origen y no tiene la capacidad de infiltrarse, invadir o metastatizar en un sitio a distancia.

35 Por “masa tumoral” se quiere decir el número de células cancerosas, el tamaño de un tumor o la cantidad de cáncer en el cuerpo. La masa tumoral también se denomina carga tumoral.

Por “número de tumores” se quiere decir el número de tumores.

40 Por “sujeto” se quiere decir un mamífero, incluyendo, pero no limitado a, un mamífero humano o no humano, tal como bovino, equino, canino, ovino o felino. Preferentemente, el sujeto es un ser humano.

45 El término “tratamiento antineoplásico” se refiere a un tratamiento útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes terapéuticos antineoplásicos incluyen, pero se limitan a, por ejemplo, agentes quimioterápicos, agentes inhibidores del crecimiento, agentes citotóxicos, agentes usados en radioterapia, agentes antiangiogénesis, agentes apoptóticos, agentes antitubulina y otros agentes para tratar el cáncer, anticuerpos anti-CD20, inhibidores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (por ejemplo, Gleevec™ (mesilato de imatinib)), un inhibidor de la COX-2 (por ejemplo, celecoxib), interferones, citocinas, antagonistas (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes) que se unen a una o más de las siguientes dianas ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-beta, BlyS, APRIL, BCMA o receptor(es) de VEGF, TRAIL/Apo2 y otros agentes químicos bioactivos y orgánicos, etc. También se incluyen en la invención combinaciones de los mismos.

50 El término “agente citotóxico” como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de las células y/o provoca la destrucción de las células. El término pretende incluir isótopos radiactivos (por ejemplo, ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y y ^{186}Re), agentes quimioterápicos, y toxinas, tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas.

55 Un “agente quimioterápico” es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterápicos incluyen un compuesto químico útil para el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterápicos incluyen agentes alquilantes, tales como tiotepa y ciclofosfamida CYTOXAN®; sulfonatos de alquilo, tales como busulfano, improsulfano y piposulfano; aziridinas, tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán), briostatina, callistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina;

espongistatina; mostazas nitrogenadas, tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, uramustina; nitrosoureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos, tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma II y caliqueamicina omega II (véase, por ejemplo, Agnew, *Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)); dinemicina, incluyendo dinemicina A; bisfosfonatos, tales como clodronato, una esperamicina; así como cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos antibióticos de cromoproteína enediina relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, 6-mercaptopurina, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina ADRIAMYCIN® (incluyendo morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas, tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; anti-metabolitos, tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico, tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina, tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidina, tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; sustancias antipararrenales, tales como aminoglucetimidina, mitotano, trilostano; suplemento de ácido fólico, tal como ácido folínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epitolina; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxifurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides, tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidracida; procarbazona; complejo polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirán; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromán; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel TAXOL® (Bristol- Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE™ libre de cromóforo, formulación de nanopartículas de paclitaxel estabilizadas con albúmina (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) y doxetaxel TAXOTERE® (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina GEMZAR®; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino, tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina NAVELBINE®; novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; irinotecán (Camptosar, CPT-11) (incluyendo el tratamiento de irinotecán con 5-FU y leucovorina); inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides, tales como ácido retinoico; capecitabina; combretastatina; bortezomib VELCADE; lenalidomida REVLIMID; leucovorina (LV); oxaliplatino, incluyendo el tratamiento con oxaliplatino (FOLFOX); inhibidores de PKC-alfa, Raf, H-Ras, EGFR (por ejemplo, erlotinib (Tarceva™)) y VEGF-A que reducen la proliferación celular y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

También se incluyen en esta definición agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal en tumores, tales como antiestrógenos y moduladores selectivos de receptores de estrógenos (SERM), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno FARESTON; inhibidores de la aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglucetimidina, acetato de megestrol MEGASE®, exemestano AROMASIN®, formestania, fadrozol, vorozol RIVISOR®, letrozol FEMARA® y anastrozol ARIMIDEX®; y antiandrógenos, tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; así como troxacitabina (un análogo de nucleósido de citosina de 1,3-dioxolano); oligonucleótidos antisentido, particularmente los que inhiben la expresión de genes en las vías de señalización implicadas en la proliferación celular anómala, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf y H-Ras; ribozimas, tales como un inhibidor de la expresión de VEGF (por ejemplo, ribozima ANGIOZYME®) y un inhibidor de la expresión de HER2; vacunas, tales como vacunas de terapia génica, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN® y vacuna VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; inhibidor de la topoisomerasa 1 LURTOTECAN®; ABARELIX® rmRH; vinorelbina y esperamicinas (véase la patente de EE. UU. n.º 4.675.187), y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

El término "profármaco" como se usa en esta solicitud se refiere a un precursor o forma derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxica para las células tumorales en comparación con el fármaco original y se puede activar o convertir enzimáticamente en la forma original más activa. Véase, por ejemplo, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" *Biochemical Society Transactions*, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) y Stella *et al.*, "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," *Directed Drug Delivery*, Borchardt *et al.*, (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985). Los profármacos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptidos, profármacos modificados con aminoácidos D, profármacos glucosilados, profármacos que contienen β-lactama, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituida o profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituida, 5-fluorocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina que se pueden convertir en el fármaco libre citotóxico más activo. Los ejemplos de fármacos citotóxicos que se pueden derivatizar en una forma de profármaco para su uso en la presente invención incluyen, pero no se

limitan a, los agentes quimioterápicos descritos anteriormente.

Por "radioterapia" se quiere decir el uso de rayos beta o rayos gamma dirigidos para inducir suficiente daño a una célula para limitar su capacidad de funcionar normalmente o destruir la célula por completo. Se aprecia que hay muchas maneras conocidas en la técnica para determinar la dosificación y duración del tratamiento. Los tratamientos típicos se proporcionan como una administración en una sola dosis y las dosificaciones típicas varían desde 10 a 200 unidades (grays) por día.

Un polipéptido "biológicamente activo" o "funcional" (tal como un polipéptido heterógeno) es uno que puede ejercer una o más de sus actividades naturales en acontecimientos estructurales, reguladores, bioquímicos o biofísicos.

Un anticuerpo "biológicamente activo" o "funcional" es uno que puede ejercer una o más de sus actividades naturales en acontecimientos estructurales, reguladores, bioquímicos o biofísicos. Por ejemplo, un anticuerpo biológicamente activo puede tener la capacidad para unirse específicamente a un antígeno y la unión, a su vez, puede desencadenar o alterar un acontecimiento celular o molecular, tal como la transducción de señales o la actividad enzimática. Un anticuerpo biológicamente activo también puede bloquear la activación del ligando de un receptor o actuar como un anticuerpo agonista. La capacidad de un anticuerpo para ejercer una o más de sus actividades naturales depende de varios factores, incluyendo el plegamiento y ensamblaje apropiados de las cadenas polipeptídicas. Como se usa en el presente documento, el anticuerpo biológicamente activo generado mediante los procedimientos divulgados comprende típicamente heterotetrámeros que tienen dos cadenas L idénticas y dos cadenas H idénticas que están enlazadas mediante múltiples puentes disulfuro y plegadas apropiadamente.

Composiciones de la invención y procedimientos que usan las mismas

En un aspecto, la presente invención proporciona variantes de TIR. De esta manera, para una TIR dada, se puede crear una serie de variantes de secuencia aminoacídica o de ácido nucleico con un intervalo de fuerzas traduccionales, proporcionando de este modo un medio conveniente mediante el que se ajuste este factor para la secreción óptima de muchos polipéptidos diferentes. El uso de un gen indicador expresado bajo el control de estas variantes, tales como PhoA, proporciona un procedimiento para cuantificar las fuerzas traduccionales relativas de regiones de iniciación de la traducción diferentes. Las TIR variantes o mutantes se pueden proporcionar en el fondo de un vector plasmídico, proporcionando de este modo un conjunto de plásmidos en los que se puede insertar un gen de interés y medir su expresión, para establecer un intervalo óptimo de fuerzas traduccionales para la máxima expresión del polipéptido maduro.

La mutagénesis de la TIR se hace mediante técnicas convencionales que dan como resultado cambios en codones que pueden alterar la secuencia aminoacídica, aunque son preferentes cambios sinónimos en la secuencia nucleotídica. Las alteraciones en la TIR pueden incluir, por ejemplo, alteraciones en el número o espaciamiento de secuencias de Shine-Dalgarno, junto con alteraciones en la secuencia señal. Un procedimiento para generar secuencias señal mutantes es la generación de un "banco de codones" al comienzo de una secuencia codificante que no cambia la secuencia aminoacídica de la secuencia señal (es decir, los cambios son sinónimos). Esto se puede lograr cambiando la tercera posición nucleotídica de cada codón; adicionalmente, algunos aminoácidos, tales como leucina, serina y arginina, tienen múltiples primera y segunda posiciones que pueden añadir complejidad en la preparación del banco. Este procedimiento de mutagénesis se describe en detalle en Yansura *et al.* (METHODS: A Companion to Methods in Enzymol.4:151-158 (1992)). Básicamente, un fragmento de ADN que codifica la secuencia señal y el comienzo del polipéptido maduro se sintetiza de tal manera que se altera la tercera posición (y, posiblemente, la primera y la segunda, como se describe anteriormente) de cada uno de los primeros 6 a 12 codones. Los nucleótidos adicionales en dirección 3' de estos codones proporcionan un sitio para la unión de un cebador complementario usado en la preparación de la cadena inferior. El tratamiento de la cadena codificante superior y el cebador de la cadena inferior con ADN polimerasa I (Klenow) da como resultado un conjunto de fragmentos de ADN bicatenario que contienen codones aleatorios. Los cebadores se diseñan para que contengan sitios de clonación útiles que, a continuación, se pueden usar para insertar los fragmentos de ADN en un vector apropiado, permitiendo de este modo la amplificación del banco de codones. Los procedimientos alternativos incluyen, por ejemplo, el reemplazo de todo el rbs con nucleótidos aleatorios (Wilson *et al.*, BioTechniques17:944-952 (1994)), y el uso de genotecas de presentación en fagos (véase, por ejemplo, Barbas *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.89:4457-4461 (1992); Garrard *et al.*, Genel28:103-109 (1993)).

La Sec translocasa bacteriana facilita la exportación de proteínas en los procariontes. Las proteínas secretoras pueden seleccionar como diana la Sec translocasa mediante dos mecanismos diferentes, es decir, la selección como diana cotraduccional y la postraduccional. En esta última, la secuencia señal que contiene la proteína secretora se libera del ribosoma en su estado completo de síntesis y se dirige a la Sec-translocasa. En diversas bacterias gramnegativas, las proteínas secretoras se guían a la Sec-translocasa mediante la secreción de la chaperona específica SecB, que mantiene estas proteínas en un estado no plegado competente para la translocación. Durante la selección como diana cotraduccional, la partícula de reconocimiento de señal (SRP) se une a la secuencia señal de la proteína secretora, mientras que emerge del ribosoma y todo el complejo ternario de cadena de proteína secretora naciente/ribosoma/SRP selecciona como diana la Sec-translocasa.

Por ejemplo, los péptidos señal de la proteína periplásmica de unión a maltosa (MalE) y fosfatasa alcalina (PhoA) dirigen la translocación desde el citoplasma al periplasma de una manera postraduccional con ayuda del motor molecular SecA. Otros péptidos señal ejemplares que dirigen la translocación de una manera postraduccional son dsbC, lolA, ompA, lamb y 1pp. Los péptidos señal de la enterotoxina termoestable II (stII) y proteína de intercambio tiol:disulfuro (dsbA) dirigen la translocación de una manera cotraduccional con ayuda de la partícula de reconocimiento de señal (SRP). Otros péptidos señal ejemplares que dirigen la translocación de una manera cotraduccional son yral, tort, tolB, sfmC, nikA y sfmC. Véase también Natale *et al.* para una revisión de la secreción de proteínas mediada por Sec y Tat a través de la membrana citoplásmica bacteriana. (Natale *et al.* (2008) Biochemica et Biophysica Acta 1778:1735-56.)

Se han desarrollado novedosas colecciones de péptidos señal de la región de iniciación traduccional (TIR) variante (figura 2, tabla 2) para péptidos señal que representan dos de las vías de secreción principales para el transporte a través de la membrana interna en *E. coli*: sec (PhoA, MalE) y SRP (DsbA, STII). Cada colección comprende un panel de vectores que comprenden TIR variantes de diferentes fuerzas traduccionales, lo que proporciona un medio mediante el que se ajusta fácilmente el nivel de traducción para una proteína dada de interés.

Típicamente, las variantes de TIR se proporcionan en un vector plasmídico con elementos apropiados para la expresión de un gen de interés. Por ejemplo, una construcción típica contiene un promotor en 5' con respecto a la secuencia señal, un sitio de reconocimiento de enzima de restricción en 3' con respecto a la secuencia señal para la inserción de un gen de interés o un gen indicador, y un marcador seleccionable, tal como un marcador de resistencia a fármaco, para la selección y/o mantenimiento de las bacterias transformadas con los plásmidos resultantes. Los vectores plasmídicos se analizan adicionalmente y se ejemplifican en el presente documento. Los promotores adecuados para su uso con huéspedes procarióticos se conocen en la técnica y algunos se ejemplifican y describen en el presente documento.

Se puede usar cualquier gen indicador que se pueda cuantificar de alguna manera. De esta manera, por ejemplo, la producción de fosfatasa alcalina se puede cuantificar como una medida del nivel secretado del producto del gen phoA. Otros ejemplos incluyen, por ejemplo, los genes β -lactamasa.

Generalmente, se puede generar un conjunto de vectores con un intervalo de fuerzas de TIR para cada cistrón del vector en el mismo. Este conjunto limitado proporciona una comparación de los niveles de expresión de cada cadena, así como el rendimiento de los productos de longitud completa en diversas combinaciones de fuerzas de TIR. Las fuerzas de TIR se pueden determinar cuantificando el nivel de expresión de un gen indicador como se describe en detalle en Simmons *et al.* patente de EE. UU. n.º 5.840.523. Para el propósito de la presente invención, la combinación de fuerzas traduccionales para un par particular de TIR en un vector se representa por (N-ligera, M-pesada), en la que N es la fuerza de TIR relativa de la cadena ligera y M es la fuerza de TIR relativa de la cadena pesada. Por ejemplo, (3-ligera, 7-pesada) quiere decir que el vector proporciona una fuerza de TIR relativa de aproximadamente 3 para la expresión de la cadena ligera y una fuerza de TIR relativa de aproximadamente 7 para la expresión de la cadena pesada. Basándose en la comparación de las fuerzas traduccionales, se seleccionan las TIR individuales deseadas para combinarse en las construcciones de vectores de expresión de la invención. Se pueden usar los vectores así contruidos para transformar un huésped apropiado. Preferentemente, el huésped es un huésped procariótico. Más preferentemente, el huésped es *E. coli*.

El nivel secretado de polipéptidos se puede determinar, por ejemplo, mediante un ensayo funcional para el polipéptido de interés, si está disponible, radioinmunoensayos (RIA), inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) o mediante PAGE y visualización del peso molecular correcto del polipéptido de interés. Los procedimientos para determinar el nivel de polipéptido secretado se conocen bien en la técnica y algunos se ejemplifican en el presente documento.

Anticuerpos

Los anticuerpos de la invención son preferentemente monoclonales. También se abarcan dentro del alcance de la invención los fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH y F(ab')₂ de los anticuerpos proporcionados en el presente documento. Estos fragmentos de anticuerpo se pueden crear mediante medios tradicionales, tales como digestión enzimática, o se pueden generar mediante técnicas recombinantes. Dichos fragmentos de anticuerpo pueden ser quiméricos o humanizados. Estos fragmentos son útiles para los propósitos terapéuticos y de diagnóstico expuestos a continuación.

Por consiguiente, en algún aspecto, el anticuerpo anti-c-met es un anticuerpo de un brazo (es decir, el dominio variable de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera forman un único brazo de unión a antígeno) que comprende una región Fc, en el que la región Fc comprende un primer y un segundo polipéptido de Fc, en el que el primer y segundo polipéptidos de Fc están presentes en un complejo y forman una región Fc que incrementa la estabilidad de dicho fragmento de anticuerpo en comparación con una molécula de Fab que comprende dicho brazo de unión a antígeno. Para el tratamiento de afecciones patológicas que requieren una función antagonista, y si la bivalencia de un anticuerpo da como resultado un efecto agonista no deseable, el rasgo monovalente de un

anticuerpo de un brazo (es decir, un anticuerpo que comprende un único brazo de unión a antígeno) da como resultado y/o asegura una función antagonista tras la unión del anticuerpo a una molécula diana. Además, el anticuerpo de un brazo que comprende una región Fc se caracteriza por atributos farmacocinéticos superiores (tales como una semivida potenciada y/o tasa de aclaramiento reducida *in vivo*) en comparación con formas Fab que tienen características de unión a antígeno similar/sustancialmente idénticas, superando de esta manera un inconveniente principal en el uso de anticuerpos Fab monovalentes convencionales. Los anticuerpos de un brazo se divulgan, por ejemplo, en el documento W02005/063816; Martens *et al*, Clin Cancer Res (2006), 12: 6144. En algunos aspectos, el anticuerpo de un brazo es un fragmento de anticuerpo monovalente, en el que el fragmento de anticuerpo comprende un primer polipéptido que comprende un dominio variable de la cadena ligera, un segundo polipéptido que comprende un dominio variable de la cadena pesada y dicho primer polipéptido de Fc, y un tercer polipéptido que comprende dicho segundo polipéptido de Fc, por lo que el dominio variable de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera forman un único brazo de unión a antígeno, y por lo que los primer y segundo polipéptidos de Fc están presentes en un complejo y forman una región Fc que incrementa la estabilidad de dicho fragmento de anticuerpo en comparación con una molécula de Fab que comprende dicho brazo de unión a antígeno.

En algunos aspectos, el anticuerpo se une (en algunos aspectos, se une específicamente) a c-met. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-c-met comprende (a) un primer polipéptido que comprende un dominio variable de la cadena pesada que tiene la secuencia:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWLHWVRQAPGKGLEWVGMIDPS

NSDTRFNPFKDRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRSYVTPLDYW

GQGLTVTVSS (SEQ ID NO:

43), secuencia de CH1, y un primer polipéptido de Fc; (b) un segundo polipéptido que comprende un dominio variable de la cadena ligera que tiene la secuencia:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKSSQSLLYTSSQKNYLAWYQKPGKAPKLLIYW

ASTRESGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQYYAYPWTFGQGTKVEIK

R (SEQ ID NO: 44), y secuencia de CL1; y (c) un tercer polipéptido que comprende un segundo polipéptido de Fc, en el que el dominio variable de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera están presentes como un complejo y forman un único brazo de unión a antígeno, en el que el primer y segundo polipéptidos de Fc están presentes en un complejo y forman una región Fc que incrementa la estabilidad de dicho fragmento de anticuerpo en comparación con una molécula de Fab que comprende dicho brazo de unión a antígeno. En algunos aspectos, el primer polipéptido comprende la secuencia de Fc representada en la figura 7 (SEQ ID NO: 68) y el segundo polipéptido comprende la secuencia de Fc representada en la figura 8 (SEQ ID NO: 47). En algunos aspectos, el primer polipéptido comprende la secuencia de Fc representada en la figura 8 (SEQ ID NO: 47) y el segundo polipéptido comprende la secuencia de Fc representada en la figura 7 (SEQ ID NO: 68).

En algunos aspectos, el anticuerpo anti-c-met comprende (a) un primer polipéptido que comprende un dominio variable de la cadena pesada, comprendiendo dicho polipéptido la secuencia:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWLHWVRQAPGKGLEWVGMIDPS

NSDTRFNPFKDRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRSYVTPLDYW

GQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL

TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKS

CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN

WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP

APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNG

QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKS

LSLSPGK (SEQ ID NO:

45); (b) un segundo polipéptido que comprende un dominio variable de la cadena ligera, comprendiendo el polipéptido la secuencia

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKSSQSLLYTSSQKNYLAWYQKPGKAPKLLIYW

ASTRESGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQYYAYPWTFGQGTKVEIK

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV

TEODSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHOGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 46); y un tercer polipéptido que comprende una secuencia de Fc, comprendiendo el polipéptido la secuencia

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN

WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP

APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG

QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKS

LSLSPGK (SEQ ID NO: 47), en el que el dominio variable de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera están presentes como un complejo y forman un único brazo de unión a antígeno, en el que el primer y

segundo polipéptidos de Fc están presentes en un complejo y forman una región Fc que incrementa la estabilidad de dicho fragmento de anticuerpo en comparación con una molécula de Fab que comprende dicho brazo de unión a antígeno.

5 En un aspecto, el anticuerpo anti-c-met comprende:

(a) al menos una, dos, tres, cuatro o cinco secuencias de región hipervariable (CDR) seleccionadas del grupo que consiste en:

10 (i) CDR-L1 que comprende la secuencia A1-A17, en la que A1-A17 es KSSQSLLYTSSQKNYLA (SEQ ID NO:49)

(ii) CDR-L2 que comprende la secuencia B1-B7, en la que B1-B7 es WASTRES (SEQ ID NO:50)

15 (iii) CDR-L3 que comprende la secuencia C1-C9, en la que C1-C9 es QQYYAYPWT (SEQ ID NO:51)

(iv) CDR-H1 que comprende la secuencia D1-D10, en la que D1-D10 es GYTFTSYWLH (SEQ ID NO:52)

(v) CDR-H2 que comprende la secuencia E1-E18, en la que E1-E18 es GMIDPSNSDTRFNPNFKD (SEQ ID NO:53)
y

20 (vi) CDR-H3 que comprende la secuencia F1-F11, en la que F1-F11 es T/SYGSYVSPLDY (SEQ ID NO:54);

y (b) al menos una CDR variante, en la que la secuencia de CDR variante comprende la modificación de al menos un residuo de la secuencia representada en (i)-(vi). En un aspecto, CDR-H3 comprende TYGSYVSPLDY (SEQ ID NO: 55). En un aspecto, CDR-H3 comprende SYGSYVSPLDY (SEQ ID NO: 56). En un aspecto, un anticuerpo de la invención que comprende estas secuencias (en combinación como se describe en el presente documento) es humanizado o humano.

30 En un aspecto, el anticuerpo anti-c-met comprende un dominio variable de la cadena pesada que comprende una o más de la secuencia de CDR1-HC, CDR2-HC y CDR3-HC representada en la figura 7 (SEQ ID NO: 52-53 y 66). En algunos aspectos, el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena ligera que comprende una o más de la secuencia de CDR1-LC, CDR2-LC y CDR3-LC representada en la figura 7 (SEQ ID NO: 49-51). En algunos aspectos, el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia de FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC y FR4-HC representada en la figura 7 (SEQ ID NO: 62-65). En algunos aspectos, el dominio variable de la cadena ligera
35 comprende la secuencia de FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC y FR4-LC representada en la figura 7 (SEQ ID NO: 57-60).

Las HVR variantes en un anticuerpo anti-c-met de la invención pueden tener modificaciones de uno o más residuos en la HVR. En un aspecto, una variante de HVR-L2 comprende 1-5 (1, 2, 3, 4 o 5) sustituciones en cualquier combinación de las siguientes posiciones: B1 (M o L), B2 (P, T, G o S), B3 (N, G, R o T), B4 (I, N o F), B5 (P, I, L o G), B6 (A, D, T o V) y B7 (R, I, M o G). En un aspecto, una variante de HVR-H1 comprende 1-5 (1, 2, 3, 4 o 5) sustituciones en cualquier combinación de las siguientes posiciones: D3 (N, P, L, S, A, I), D5 (I, S o Y), D6 (G, D, T, K, R), D7 (F, H, R, S, T o V) y D9 (M o V). En un aspecto, una variante de HVR-H2 comprende 1-4 (1, 2, 3 o 4) sustituciones en cualquier combinación de las siguientes posiciones: E7 (Y), E9 (I), E10 (I), E14 (T o Q), E15 (D, K, S, T o V), E16 (L), E17 (E, H, N o D) y E18 (Y, E o H). En un aspecto, una variante de HVR-H3 comprende 1-5 (1, 2, 3, 4 o 5) sustituciones en cualquier combinación de las siguientes posiciones: F1 (T, S), F3 (R, S, H, T, A, K), F4 (G), F6 (R, F, M, T, E, K, A, L, W), F7 (L, I, T, R, K, V), F8 (S, A), F10 (Y, N) y F11 (Q, S, H, F). La(s) letra(s) entre paréntesis después de cada posición indica un aminoácido de sustitución (es decir, reemplazo) ilustrativo; como es evidente para un experto en la técnica, la idoneidad de otros aminoácidos como aminoácidos de sustitución en el contexto descrito en el presente documento se puede evaluar de manera rutinaria usando técnicas conocidas en la técnica y/o descritas en el presente documento. En un aspecto, HVR-L1 comprende la secuencia de la SEQ ID NO:49. En un aspecto, F1 en una HVR-H3 variante es T. En un aspecto, F1 en una HVR-H3 variante es S. En un aspecto, F3 en una HVR-H3 variante es R. En un aspecto, F3 en una HVR-H3 variante es S. En un aspecto, F7 en una HVR-H3 variante es T. En un aspecto, un anticuerpo de la invención comprende una HVR-H3 variante, en el que F1 es T o S, F3 es R o S y F7 es T.

55 En un aspecto, un anticuerpo anti-c-met de la invención comprende una HVR-H3 variante, en el que F1 es T, F3 es R y F7 es T. En un aspecto, un anticuerpo de la invención comprende una HVR-H3 variante, en el que F1 es S. En un aspecto, un anticuerpo de la invención comprende una HVR-H3 variante, en el que F1 es T y F3 es R. En un aspecto, un anticuerpo de la invención comprende una HVR-H3 variante, en el que F1 es S, F3 es R y F7 es T. En un aspecto, un anticuerpo de la invención comprende una HVR-H3 variante, en el que F1 es T, F3 es S, F7 es T y F8 es S. En un aspecto, un anticuerpo de la invención comprende una HVR-H3 variante, en el que F1 es T, F3 es S, F7 es T y F8 es A. En algunos aspectos, dicho anticuerpo con HVR-H3 variante comprende adicionalmente HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1 y HVR-H2, en el que cada una comprende, en orden, la secuencia representada en las SEQ ID NO: 49, 50, 51, 52 y 53. En algunos aspectos, estos anticuerpos comprenden adicionalmente una secuencia consenso con región estructural de la cadena pesada H1 del subgrupo humano. En un aspecto de estos anticuerpos, la secuencia consenso con región estructural comprende la sustitución en la posición 71, 73 y/o 78. En algunos

aspectos de estos anticuerpos, la posición 71 es A, 73 es T y/o 78 es A. En un aspecto de estos anticuerpos, estos anticuerpos comprenden adicionalmente una secuencia consenso con región estructural de la cadena ligera kl humana.

5 En un aspecto, un anticuerpo anti-c-met de la invención comprende una HVR-L2 variante, en el que B6 es V. En algunos aspectos, dicho anticuerpo con HVR-H2 variante comprende adicionalmente HVR-L1, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, en el que cada una comprende, en orden, la secuencia representada en las SEQ ID NO: 49, 51, 52, 53, 54. En algunos aspectos, dicho anticuerpo con HVR-H2 variante comprende adicionalmente HVR-L1, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, en el que cada una comprende, en orden, la secuencia representada en las SEQ ID NO: 49, 51, 52, 53, 55. En algunos aspectos, dicho anticuerpo con HVR-H2 variante comprende adicionalmente HVR-L1, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3, en el que cada una comprende, en orden, la secuencia representada en las SEQ ID NO: 49, 51, 52, 53, 56. En algunos aspectos, estos anticuerpos comprenden adicionalmente una secuencia consenso con región estructural de la cadena pesada III del subgrupo humano. En un aspecto de estos anticuerpos, la secuencia consenso con región estructural comprende la sustitución en la posición 71, 73 y/o 78. En algunos aspectos de estos anticuerpos, la posición 71 es A, 73 es T y/o 78 es A. En un aspecto de estos anticuerpos, estos anticuerpos comprenden adicionalmente una secuencia consenso con región estructural de la cadena ligera kl humana.
Se conocen en la técnica otros anticuerpos anti-c-met adecuados para su uso en los procedimientos de la invención.

20 En un aspecto, el anticuerpo anti-c-met comprende al menos una característica que promueve la heterodimerización, al tiempo que minimiza la homodimerización, de las secuencias de Fc en el fragmento de anticuerpo. Dicha(s) característica(s) mejora(n) el rendimiento y/o pureza y/o homogeneidad de las poblaciones de inmunoglobulina. En un aspecto, el anticuerpo comprende mutaciones en Fc que constituyen "nudos" y "huecos" como se describe en el documento WO2005/063816. Por ejemplo, una mutación de hueco puede ser una o más de T366A, L368A y/o Y407V en un polipéptido de Fc, y una mutación de nudo puede ser T366W. Las mutaciones en Fc de nudo y hueco se describen adicionalmente en el presente documento.

Los anticuerpos monoclonales se obtienen a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. De esta manera, el modificador "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo no es una mezcla de anticuerpos discretos.

Los anticuerpos monoclonales de la invención se pueden preparar usando el procedimiento de hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975) o se pueden preparar mediante procedimientos de ADN recombinante (patente de EE. UU. n.º 4.816.567).

En el procedimiento de hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado, tal como un hámster, se inmuniza para producir linfocitos que producen o pueden producir anticuerpos que se unen específicamente a la proteína usada para la inmunización. Se pueden obtener anticuerpos frente a un antígeno en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) de antígeno y un adyuvante. El antígeno se puede preparar usando procedimientos bien conocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen adicionalmente en el presente documento. Por ejemplo, la producción recombinante de antígeno humano y de ratón se describe a continuación. En un aspecto, los animales se inmunizan con un antígeno fusionado a la porción Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina. En un aspecto preferente, los animales se inmunizan con una proteína de fusión antígeno-IgG1. Los animales se inmunizan de manera ordinaria frente a conjugados o derivados inmunogénicos del antígeno con monofosforil lípido A (MPL)/dicrinomicolato de trehalosa (TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT) y la solución se inyecta por vía intradérmica en múltiples sitios. Dos semanas más tarde se refuerza a los animales. 7 a 14 días más tarde se extrae sangre de los animales y el suero se somete a ensayo para determinar el valor de anticuerpos. Se refuerza a los animales hasta alcanzar una meseta de valores.
50 Alternativamente, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*. A continuación, los linfocitos se fusionan con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)).

Las células de hibridoma preparadas de esta manera se siembran y cultivan en un medio de cultivo adecuado que contenga preferentemente una o más sustancias que inhiban el crecimiento o supervivencia de las células madre de mieloma no fusionadas. Por ejemplo, si las células madre de mieloma carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosiltransferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluye típicamente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), previniendo estas sustancias el crecimiento de células deficitarias en HGPRT.

60 Las células de mieloma preferentes son las que se fusionan eficazmente, soportan una producción estable de alto nivel de anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio, tal como el medio HAT. Entre estas, las líneas celulares de mieloma preferentes son líneas de mieloma murino, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles de Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, EE. UU., y células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles de la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, EE. UU. También se han descrito líneas celulares de heteromieloma ratón-humano y mieloma humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*,

Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

El medio de cultivo en el que crecen las células de hibridoma se somete a ensayo para determinar la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos frente al antígeno. Preferentemente, se determina la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA).

La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se puede determinar, por ejemplo, mediante el análisis de Scatchard de Munson *et al.*, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

Después de que se identifican las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitantes y cultivar mediante procedimientos estándar (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Adicionalmente, las células de hibridoma se pueden cultivar *in vivo* como tumores ascíticos en un animal.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, líquido ascítico o suero mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales, tales como, por ejemplo, proteína A-sefarosa, cromatografía con hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

Los anticuerpos de la invención se pueden preparar mediante el uso de colecciones combinatorias para cribar para determinar clones de anticuerpos sintéticos con la actividad o actividades deseadas. En principio, se seleccionan clones de anticuerpos sintéticos cribando genotecas de fagos que contienen fagos que presentan diversos fragmentos de la región variable del anticuerpo (Fv) fusionados a la proteína de la cápside del fago. Dichas genotecas de fagos se seleccionan por cromatografía de afinidad frente al antígeno deseado. Los clones que expresan los fragmentos Fv que se pueden unir al antígeno deseado se adsorben en el antígeno y, de esta manera, se separan de los clones de no unión en la genoteca. A continuación, los clones de unión se eluyen del antígeno, y se pueden enriquecer adicionalmente mediante ciclos adicionales de adsorción/elución de antígeno. Cualquiera de los anticuerpos de la invención se puede obtener diseñando un procedimiento de cribado de antígenos adecuado para seleccionar el clon de fago de interés seguido de la construcción de un clon de anticuerpo usando las secuencias de Fv del clon de fago de interés y secuencias de la región constante (Fc) adecuadas descritas en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3. Un procedimiento ejemplar para generar anticuerpos se divulga en los ejemplos.

El dominio de unión a antígeno de un anticuerpo se forma a partir de dos regiones variables (V) de aproximadamente 110 aminoácidos, cada una de las cadenas ligera (VL) y pesada (VH), presentando ambas tres bucles hipervariables o regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Los dominios variables se pueden presentar funcionalmente en fago, como fragmentos Fv monocatenarios (scFv), en los que VH y VL están enlazadas covalentemente a través de un péptido corto y flexible, o bien como fragmentos Fab, en los que están fusionados cada uno con un dominio constante e interaccionan no covalentemente, como se describe en Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Como se usa en el presente documento, los clones de fago que codifican scFv y los clones de fago que codifican Fab se denominan colectivamente "clones de fago Fv" o "clones Fv".

Los repertorios de genes de VH y VL se pueden clonar por separado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y recombinarse aleatoriamente en genotecas de fagos, que, a continuación, se pueden examinar para determinar clones de unión a antígeno como se describe en Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Las colecciones de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad frente al inmunógeno sin el requisito de construir hibridomas. Alternativamente, se puede clonar el repertorio sin exposición previa para proporcionar una única fuente de anticuerpos humanos frente a una amplia gama de antígenos propios y también no propios sin ninguna inmunización como se describe por Griffiths *et al.*, *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993). Por último, también se pueden preparar sintéticamente colecciones sin exposición previa clonando los segmentos de genes de V no reordenados a partir de células madre y usando cebadores de PCR que contengan una secuencia aleatoria para codificar las regiones CDR3 altamente variables y para lograr el reordenamiento *in vitro* como se describe en Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992).

El fago filamentoso se usa para presentar fragmentos de anticuerpo mediante fusión a la proteína de la cápside menor pIII. Los fragmentos de anticuerpo se pueden presentar como fragmentos Fv monocatenarios, en los que los dominios de VH y VL se conectan en la misma cadena polipeptídica mediante un espaciador polipeptídico flexible, por ejemplo, como se describe por Marks Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), o como fragmentos Fab, en los que una cadena se fusiona a pIII y la otra se secreta en el periplasma de la célula huésped bacteriana donde se produce el ensamblaje de una estructura de Fab-proteína de la cápside que se presenta en la superficie del fago desplazando algunas de las proteínas de la cápside naturales, por ejemplo, como se describe en Hoogenboom *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 19: 4133-4137 (1991).

En general, los ácidos nucleicos que codifican fragmentos de genes de anticuerpos se obtienen a partir de células

inmunitarias obtenidas a partir de seres humanos o animales. Si se desea una colección sesgada en favor de clones que seleccionan como diana un antígeno particular, se inmuniza a la persona con antígeno para generar una respuesta de anticuerpos, y se recuperan las células de bazo y/o linfocitos B en circulación, otros linfocitos de sangre periférica (LSP) para la construcción de colecciones. En un aspecto preferente, se obtiene una colección de fragmentos de genes de anticuerpos humanos sesgada en favor de los clones reactivos con antígeno generando una respuesta de anticuerpos en ratones transgénicos que portan una micromatriz genética de inmunoglobulina humana funcional (y que carecen de un sistema de producción de anticuerpos endógenos funcionales), de tal manera que la inmunización con antígeno dé lugar a linfocitos B que producen anticuerpos humanos frente al antígeno. La generación de ratones transgénicos que producen anticuerpos humanos se describe a continuación.

Se puede obtener un enriquecimiento adicional en cuanto a las poblaciones celulares reactivas con antígeno usando un procedimiento de cribado adecuado para aislar linfocitos B que expresan un anticuerpo unido a membrana específico de antígeno, por ejemplo, mediante separación celular con cromatografía de afinidad para antígeno o adsorción de células sobre antígeno marcado con fluorocromo seguido de clasificación de células activadas por flujo (FACS).

Alternativamente, el uso de células de bazo y/o linfocitos B u otros LSP de un donante no inmunizado proporciona una mejor representación del posible repertorio de anticuerpos, y también permite la construcción de una colección de anticuerpos usando cualquier especie animal (humana o no humana) en la que el antígeno no sea antigénico. Para colecciones que incorporan una construcción de genes de anticuerpos *in vitro*, se obtienen células madre de la persona para proporcionar ácidos nucleicos que codifiquen segmentos de genes de anticuerpos no reordenados. Las células inmunitarias de interés se pueden obtener a partir de una variedad de especies animales, tales como las especies humana, ratón, rata, lagomorfa, luprina, canina, felina, porcina, bovina, equina y aviar, etc.

Los ácidos nucleicos que codifican segmentos de genes variables de anticuerpo (incluyendo los segmentos de VH y VL) se recuperan de las células de interés y se amplifican. En el caso de las colecciones de genes de VH y VL reordenados, se puede obtener el ADN deseado aislando ADN genómico o ARNm de linfocitos seguido de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores que coincidan con los extremos 5' y 3' de genes de VH y VL reordenados como se describe en Orlandi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86: 3833-3837 (1989), preparando de este modo diversos repertorios de genes de V para su expresión. Los genes de V se pueden amplificar a partir de ADNc y ADN genómico, con los cebadores inversos en el extremo 5' del exón que codifica el dominio de V maduro y los cebadores directos basados en el segmento de J como se describe en Orlandi *et al.* (1989) y en Ward *et al.*, *Nature*, 341: 544-546 (1989). Sin embargo, para amplificar a partir de ADNc, los cebadores inversos también pueden estar basados en el exón líder, como se describe en Jones *et al.*, *Biotechnol.*, 9: 88-89 (1991), y los cebadores directos en la región constante como se describe en Sastry *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86: 5728-5732 (1989). Para maximizar la complementariedad, se puede incorporar redundancia en los cebadores como se describe en Orlandi *et al.* (1989) o Sastry *et al.* (1989). Preferentemente, la diversidad de la colección se maximiza usando cebadores de PCR que seleccionan como diana cada familia de genes de V a fin de amplificar todos los ordenamientos de VH y VL disponibles presentes en la muestra de ácido nucleico de células inmunitarias, por ejemplo, como se describe en el procedimiento de Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) o como se describe en el procedimiento de Oram *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 21: 4491-4498 (1993). Para clonar el ADN amplificado en vectores de expresión, se pueden introducir sitios de restricción infrecuentes en el cebador de PCR como una etiqueta en un extremo como se describe en Orlandi *et al.* (1989), o mediante amplificación por PCR adicional con un cebador con etiqueta como se describe en Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991).

Los repertorios de genes de V reordenados sintéticamente se pueden derivar *in vitro* de segmentos de genes de V. La mayor parte de los segmentos de genes de VH humanos se han clonado y secuenciado (registrados en Tomlinson *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 227: 776-798 (1992)) y cartografiado (registrados en Matsuda *et al.*, *Nature Genet.*, 3: 88-94 (1993)); estos segmentos clonados (incluyendo todas las conformaciones principales del bucle de H1 y H2) se pueden usar para generar diversos repertorios de genes de VH con cebadores de PCR que codifican bucles de H3 de diversa secuencia y longitud como se describe en Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). También se pueden preparar repertorios de VH con toda la diversidad de secuencia enfocada en un bucle de H3 largo de una única longitud como se describe en Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4457-4461 (1992). Los segmentos de V_k y V_λ humanas se han clonado y secuenciado (registrados en Williams and Winter, *Eur. J. Immunol.*, 23: 1456-1461 (1993)) y se pueden usar para preparar repertorios de cadenas ligeras sintéticas. Los repertorios de genes de V sintéticos, basados en una gama de pliegues de VH y VL, y longitudes de L3 y H3, codifican anticuerpos de considerable diversidad estructural. Después de la amplificación de los ADN que codifican genes de V, se pueden reordenar *in vitro* segmentos de genes de V de la estirpe germinal de acuerdo con los procedimientos de Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992).

Los repertorios de fragmentos de anticuerpo se pueden construir combinando los repertorios de genes de VH y VL entre sí de varias maneras. Cada repertorio se puede crear en vectores diferentes y recombinar *in vitro* los vectores, por ejemplo, como se describe en Hogrefe *et al.*, *Gene*, 128:119-126 (1993), o *in vivo* mediante infección combinatoria, por ejemplo, el sistema loxP descrito en Waterhouse *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 21:2265-2266 (1993). El enfoque de recombinación *in vivo* explota la naturaleza bicatenaria de fragmentos Fab para superar el límite del tamaño de la colección impuesto por la eficacia de transformación de *E. coli*. Los repertorios de VH y VL sin

exposición previa se clonan por separado, uno en un fagémido y el otro en un vector de fago. A continuación, se combinan las dos colecciones mediante infección por fagos de bacterias que contienen fagémidos, de modo que cada célula contenga una combinación diferente y el tamaño de la colección esté limitado únicamente por el número de células presentes (aproximadamente 10^{12} clones). Ambos vectores contienen señales de recombinación *in vivo* de modo que los genes de VH y VL se recombinen en un único replicón y se coempaqueten en viriones de fago. Estas inmensas colecciones proporcionan grandes números de diversos anticuerpos de buena afinidad (K_d^{-1} de aproximadamente 10^8 M).

Alternativamente, se pueden clonar secuencialmente los repertorios en el mismo vector, por ejemplo, como se describe en Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:7978-7982 (1991), o ensamblar entre sí mediante PCR y, a continuación, clonar, por ejemplo, como se describe en Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991). También se puede usar ensamblaje por PCR para unir los ADN de VH y VL con ADN que codifica un espaciador peptídico flexible para formar repertorios de Fv monocatenarios (scFv). En aún otra técnica, se usa "ensamblaje por PCR en célula" para combinar genes de VH y VL en linfocitos mediante PCR y, a continuación, repertorios de clones de genes enlazados como se describe en Embleton *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 20:3831-3837 (1992).

Los anticuerpos producidos por las colecciones sin exposición previa (naturales o bien sintéticas) pueden ser de afinidad moderada (K_d^{-1} de aproximadamente 10^6 a 10^7 M⁻¹), pero la maduración de la afinidad también se puede imitar *in vitro* construyendo y reselectionando a partir de colecciones secundarias como se describe en Winter *et al.* (1994), *supra*. Por ejemplo, las mutaciones se pueden introducir aleatoriamente *in vitro* usando polimerasa propensa a errores (registrada en Leung *et al.*, *Technique*, 1:11-15 (1989)) en el procedimiento de Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 226: 889-896 (1992) o en el procedimiento de Gram *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 89: 3576-3580 (1992). Adicionalmente, la maduración de la afinidad se puede realizar mutando aleatoriamente una o más CDR, por ejemplo, usando PCR con cebadores que portan secuencias aleatorias que se extienden a lo largo de la CDR de interés, en clones Fv individuales seleccionados y cribando para determinar clones de afinidad más alta. El documento WO 96/07754 (publicado el 14 de marzo de 1996) describió un procedimiento para inducir mutagénesis en una región determinante de la complementariedad de una cadena ligera de inmunoglobulina para crear una colección de genes de cadena ligera. Otro enfoque eficaz es recombinar los dominios de VH o VL seleccionados mediante presentación en fagos con repertorios de variantes de dominios de V naturales obtenidas a partir de donantes no inmunizados y cribar para determinar la afinidad más alta en varias tandas de reorganización de cadenas como se describe en Marks *et al.*, *Biotechnol.*, 10:779-783 (1992). Esta técnica permite la producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo con afinidades en el intervalo de 10^9 M.

La secuencia de ácido nucleico que codifica el antígeno diana deseado se puede diseñar usando la secuencia aminoacídica de la región deseada del antígeno.

Los ácidos nucleicos que codifican el antígeno diana se pueden preparar mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, síntesis química mediante cualquiera de los procedimientos descritos en Engels *et al.*, *Agnew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 28: 716-734 (1989), tales como los procedimientos de triéster, fosfito, fosforamidita y H-fosfonato. En un aspecto, se usan los codones preferentes por la célula huésped de expresión en el diseño del ADN que codifica el antígeno. Alternativamente, el ADN que codifica el antígeno se puede aislar a partir de una genoteca de ADNc o genómico.

Después de la construcción de la molécula de ADN que codifica el antígeno, la molécula de ADN se enlaza funcionalmente a una secuencia de control de expresión en un vector de expresión, tal como un plásmido, en la que la secuencia de control se reconoce por una célula huésped transformada con el vector. En general, los vectores plasmídicos contienen secuencias de replicación y control que derivan de especies compatibles con la célula huésped. El vector porta de manera ordinaria un sitio de replicación, así como secuencias que codifican proteínas que pueden proporcionar una selección fenotípica en las células transformadas. Los vectores adecuados para su expresión en células huésped procarionóticas y eucarióticas se conocen en la técnica y algunos se describen adicionalmente en el presente documento. Se pueden usar organismos eucarióticos, tales como levaduras, o células derivadas de organismos multicelulares, tales como mamíferos.

Opcionalmente, el ADN que codifica el antígeno se enlaza funcionalmente a una secuencia líder secretora que da como resultado la secreción del producto de expresión por la célula huésped en el medio de cultivo. Los ejemplos de secuencias líder secretoras incluyen stII, ecotina, lamB, herpes GD, lpp, fosfatasa alcalina, invertasa y factor alfa. También es adecuado para su uso en la presente invención la secuencia líder de 36 aminoácidos de la proteína A (Abrahmsen *et al.*, *EMBO J.*, 4: 3901 (1985)).

Las células huésped se transfectan y preferentemente se transforman con los vectores de clonación o expresión descritos anteriormente de la presente invención y se cultivan en medios de nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

La transfección se refiere a la adopción de un vector de expresión por una célula huésped ya sea que se exprese o no, de hecho, alguna secuencia codificante. Se conocen numerosos procedimientos de transfección por el experto

en la técnica, por ejemplo, precipitación con CaPO_4 y electroporación. La transfección satisfactoria se reconoce generalmente cuando se produce cualquier indicación de la operación de este vector en la célula huésped. Los procedimientos para la transfección se conocen bien en la técnica y algunos se describen adicionalmente en el presente documento.

5 La transformación quiere decir introducir ADN en un organismo de modo que el ADN sea replicable, como un elemento extracromosómico o bien como integrante cromosómico. Dependiendo de la célula huésped usada, la transformación se hace usando técnicas estándar apropiadas para dichas células. Los procedimientos para la transformación se conocen bien en la técnica y algunos se describen adicionalmente en el presente documento.

10 Las células huésped procarióticas usadas para producir el antígeno se pueden cultivar como se describe generalmente en Sambrook *et al.*, *supra*.

15 Las células huésped de mamífero usadas para producir el antígeno se pueden cultivar en una variedad de medios, lo que se conoce bien en la técnica, y algunos de los cuales se describen en el presente documento.

Las células huésped a las que se hace referencia en esta divulgación abarcan células en cultivos *in vitro*, así como células que están en un animal huésped.

20 Se puede lograr la purificación del antígeno usando procedimientos reconocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen en el presente documento.

25 El antígeno purificado se puede fijar a una matriz adecuada, tal como microesferas de agarosa, microesferas de acrilamida, microesferas de vidrio, celulosa, diversos copolímeros acrílicos, geles de hidroximetacrilato, copolímeros poliacrílicos y polimetacrílicos, nailon, vehículos neutros e iónicos y similares, para su uso en la separación cromatográfica por afinidad de clones de presentación en fagos. Se puede lograr la fijación de la proteína antigénica a la matriz mediante los procedimientos descritos en *Methods in Enzymology*, vol. 44 (1976). Una técnica empleada comúnmente para fijar ligandos proteicos a matrices de polisacáridos, por ejemplo, agarosa, dextrano o celulosa, implica la activación del vehículo con haluros de cianógeno y el acoplamiento posterior de las aminas primarias alifáticas o aromáticas de los ligandos peptídicos a la matriz activada.

30 Alternativamente, se puede usar el antígeno para recubrir los pocillos de las placas de adsorción, expresar en células huésped fijadas a placas de adsorción o usar en la clasificación de células, o conjugar a biotina para la captura con microesferas recubiertas con estreptavidina o usar en cualquier otro procedimiento conocido en la técnica para seleccionar genotecas de presentación en fagos.

35 Las muestras de las genotecas de fagos se ponen en contacto con el antígeno inmovilizado en condiciones adecuadas para la unión de al menos una porción de las partículas de fago con el adsorbente. Normalmente, las condiciones, incluyendo pH, fuerza iónica, temperatura y similares se seleccionan para imitar las condiciones fisiológicas. Los fagos unidos a la fase sólida se lavan y, a continuación, se eluyen por ácido, por ejemplo, como se describe en Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 88: 7978-7982 (1991), o por álcali, por ejemplo, como se describe en Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), o por competición antígeno antígeno, por ejemplo, en un procedimiento similar al procedimiento de competición de antígenos de Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991). Los fagos se pueden enriquecer entre 20-1000 veces en una única tanda de selección. Además, se pueden cultivar los fagos enriquecidos en cultivos bacterianos y someterse a nuevas tandas de selección.

40 La eficacia de la selección depende de muchos factores, incluyendo la cinética de disociación durante el lavado, e independientemente de si múltiples fragmentos de anticuerpo en un único fago se pueden engarzar simultáneamente con el antígeno. Los anticuerpos con cinética de disociación rápida (y afinidades de unión débiles) se pueden retener mediante el uso de lavados cortos, presentación en fagos multivalente y alta densidad de recubrimiento del antígeno en fase sólida. La alta densidad no solo estabiliza el fago a través de interacciones multivalentes, sino que favorece la reunión del fago que se ha disociado. La selección de anticuerpos con cinética de disociación lenta (y buenas afinidades de unión) se puede promover mediante el uso de lavados largos y presentación en fagos monovalente como se describe en Bass *et al.*, *Proteins*, 8: 309-314 (1990) y en el documento WO 92/09690, y una baja densidad de recubrimiento del antígeno como se describe en Marks *et al.*, *Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992).

45 Es posible seleccionar entre anticuerpos de fago de diferentes afinidades, incluso con afinidades que difieran ligeramente, para el antígeno. Sin embargo, es probable que la mutación aleatoria de un anticuerpo seleccionado (por ejemplo, como se realiza en algunas de las técnicas de maduración de la afinidad descritas anteriormente) dé lugar a muchos mutantes, uniéndose la mayor parte al antígeno, y unos pocos con afinidad más alta. Con antígeno limitante, el fago de alta afinidad infrecuente podría quedar fuera. Para retener todos los mutantes de afinidad más alta, los fagos se pueden incubar con exceso de antígeno biotinilado, pero con el antígeno biotinilado a una concentración de molaridad más baja que la constante de afinidad molar diana para el antígeno. A continuación, los fagos de unión de alta afinidad se pueden capturar por microesferas paramagnéticas recubiertas con estreptavidina. Dicha "captura en equilibrio" permite que se seleccionen los anticuerpos de acuerdo con sus afinidades de unión,

con una sensibilidad que permita el aislamiento de clones mutantes con una afinidad tan solo dos veces más alta a partir de un gran exceso de fagos con afinidad más baja. También se pueden manipular las condiciones usadas en el lavado de los fagos unidos a una fase sólida para discriminar basándose en la cinética de disociación.

5 Los clones de antígeno se pueden seleccionar por actividad. Los clones Fv correspondientes a dichos anticuerpos antigénicos se pueden seleccionar (1) aislando clones de antígeno a partir de una genoteca de fagos como se describe anteriormente, y opcionalmente, amplificando la población aislada de clones de fago cultivando la población en un huésped bacteriano adecuado; (2) seleccionando el antígeno y una segunda proteína frente a la que se desea actividad de bloqueo y de no bloqueo, respectivamente; (3) adsorbiendo los clones de fago de unión a antígeno sobre el antígeno inmovilizado; (4) usando un exceso de la segunda proteína para eluir cualquier clon no deseado que reconozca determinantes de unión a antígeno que se solapan o se comparten con los determinantes de unión de la segunda proteína; y (5) eluyendo los clones que permanecen adsorbidos después de la etapa (4). Opcionalmente, los clones con las propiedades de bloqueo/no bloqueo deseadas se pueden enriquecer adicionalmente repitiendo los procedimientos de selección descritos en el presente documento una o más veces.

15 El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales derivados de hibridoma o los clones Fv de presentación en fagos de la invención se aísla y secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando cebadores oligonucleotídicos diseñados para amplificar específicamente las regiones codificantes de la cadena pesada y ligera de interés a partir de un molde de ADN de fago o hibridoma). Una vez aislado, el ADN se puede disponer en vectores de expresión, que, a continuación, se transfectan en células huésped, tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma, que de otro modo no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de los anticuerpos monoclonales deseados en las células huésped recombinantes. Los artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica anticuerpos incluyen Skerra *et al.*, *Curr. Opinion in Immunol.*, 5: 256 (1993) y Pluckthun, *Immunol. Revs.*, 130:151 (1992).

20 El ADN que codifica los clones Fv de la invención se puede combinar con secuencias de ADN conocidas que codifican regiones constantes de la cadena pesada y/o cadena ligera (por ejemplo, las secuencias de ADN apropiadas se pueden obtener de Kabat *et al.*, *supra*) para formar clones que codifican las cadenas pesada y/o ligera de longitud parcial o completa. Se aprecia que se pueden usar para este propósito regiones constantes de cualquier isotipo, incluyendo las regiones constantes de IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, y que dichas regiones constantes se pueden obtener a partir de cualquier especie humana o animal. Un clon Fv derivado del ADN del dominio variable de una especie animal (tal como humana) y, a continuación, fusionado a ADN de la región constante de otra especie animal para formar secuencia(s) codificante(s) para la cadena pesada y/o cadena ligera de longitud completa "híbrida" se incluye en la definición de anticuerpo "quimérico" e "híbrido" como se usa en el presente documento. En un aspecto preferente, un clon Fv derivado de ADN variable humano se fusiona a ADN de la región constante humana para formar secuencia(s) codificante(s) para todas las cadenas pesadas y/o ligeras de longitud parcial o completa humanas.

30 También se puede modificar ADN que codifica anticuerpos derivados de un hibridoma de la invención, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante con dominios constantes de la cadena pesada y ligera humanos en lugar de secuencias murinas homólogas derivadas del clon de hibridoma (por ejemplo, como en el procedimiento de Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). Se puede modificar adicionalmente ADN que codifica un hibridoma o fragmento o anticuerpo derivado de clones Fv uniendo covalentemente a la secuencia codificante de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido no inmunoglobulínico. De esta manera, se preparan anticuerpos "quiméricos" o "híbridos" que tienen la especificidad de unión del clon Fv o anticuerpos derivados de clones de hibridoma de la invención.

50 **Especificidad por el antígeno**

La presente invención es aplicable a anticuerpos de cualquier especificidad de unión a antígeno apropiada. Preferentemente, los anticuerpos de la invención son específicos para antígenos que sean polipéptidos biológicamente importantes. Más preferentemente, los anticuerpos de la invención son útiles para el tratamiento o diagnóstico de enfermedades o trastornos en un mamífero. Los ejemplos no limitantes de anticuerpos terapéuticos incluyen anticuerpos anti-VEGF, anti-c-met, anti-IgE, anti-CD11, anti-CD18, anti-CD40, anti-tromboplastina tisular (TF), anti-HER2 y anti-TrkC. También se contemplan anticuerpos dirigidos frente a antígenos no polipeptídicos (tales como antígenos glucolipídicos asociados a tumor).

60 Si el antígeno es un polipéptido, puede ser una molécula transmembranaria, (por ejemplo, un receptor, tal como un receptor de tirosina cinasa), o un ligando, tal como un factor de crecimiento. Los antígenos ejemplares incluyen moléculas tales como renina; una hormona del crecimiento, incluyendo hormona del crecimiento humana y hormona del crecimiento bovina; factor liberador de la hormona del crecimiento; hormona paratiroidea; hormona estimulante del tiroides; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadena A de insulina; cadena B de insulina; proinsulina; hormona foliculoestimulante; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación, tales como factor VIIIc, factor IX, tromboplastina tisular (TF) y factor de Von Willebrand; factores anticoagulantes, tales como proteína C; péptido natriurético auricular; tensioactivo pulmonar; un activador del plasminógeno, tal como urocinasa u orina

humana o activador tisular del plasminógeno (t-PA); bombesina; trombina; factor de crecimiento hematopoyético; factor de necrosis tumoral alfa y beta; encefalina; RANTES (expresadas y secretadas por linfocitos T normales y reguladas en función de su grado de activación); proteína inflamatoria de macrófagos (MIP-1-alfa) humana; una seroalbúmina, tal como seroalbúmina humana; hormona antimülleriana; cadena A de relaxina; cadena B de relaxina; prorrelaxina; péptido asociado a gonadotropinas de ratón; una proteína microbiana, tal como beta-lactamasa; DNasa; IgE; un antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA), tal como CTLA-4; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores para hormonas o factores de crecimiento; proteína A o D; factores reumatoideos; un factor neurotrófico, tal como el factor neurotrófico derivado de hueso (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5 o -6 (NT-3, NT-4, NT-5 o NT-6) o un factor de crecimiento nervioso, tal como NGF- β ; factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblastos, tal como aFGF y bFGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento y transformación (TGF), tal como TGF-alfa y TGF-beta, incluyendo TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 o TGF- β 5; factor de crecimiento similar a la insulina-I y -II (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral), proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina; proteínas CD, tales como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20 y CD40; eritropoyetina; factores osteoinductores; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón, tal como interferón alfa, beta y gamma; factores estimulantes de colonias (CSF), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleucinas (IL), por ejemplo, IL-1 a IL-10; superóxido dismutasa; receptores de linfocitos T; proteínas de membrana de superficie; factor de aceleración del decaimiento; antígeno vírico, tal como, por ejemplo, una porción de la envoltura del sida; proteínas de transporte; receptores de migración dirigida; adhesinas; proteínas reguladoras; integrinas, tales como CD11a, CD11b, CD11c, CD18, una ICAM, VLA-4 y VCAM; un antígeno asociado a tumor, tal como el receptor HER2, HER3 o HER4; y fragmentos de cualquiera de los polipéptidos enumerados anteriormente.

Los antígenos ejemplares para anticuerpos abarcados por la presente invención incluyen proteínas CD tales como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD34 y CD46; miembros de la familia de receptores ErbB, tales como el receptor de EGF, receptor HER2, HER3 o HER4; moléculas de adhesión celular, tales como LFA-1, Macl, p150.95, VLA-4, ICAM-1, VCAM, integrina α 4/ β 7 e integrina α v/ β 3, incluyendo las subunidades α o bien β de las mismas (por ejemplo, anticuerpos anti-CD11a, anti-CD18 o anti-CD11b); factores de crecimiento, tales como VEGF; tromboplastina tisular (TF); TGF- \exists interferón alfa (∇ -IFN); una interleucina, tal como IL-8; IgE; antígenos del grupo sanguíneo Apo2, receptor de muerte; receptor flk2/flt3; receptor de obesidad (OB); receptor *mpl*; CTLA-4; proteína C, etc. En algunos aspectos, el anticuerpo de la invención se une (en algunos aspectos se une específicamente) a c-met.

Fragmentos de anticuerpo

La presente invención abarca fragmentos de anticuerpo. En determinadas circunstancias hay ventajas de usar fragmentos de anticuerpo, en lugar de anticuerpos enteros. El tamaño más pequeño de los fragmentos permite un aclaramiento rápido y puede dar lugar a un acceso mejorado a tumores sólidos.

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaban por medio de digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto *et al.*, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992); y Brennan *et al.*, Science, 229:81 (1985)). Sin embargo, ahora se pueden producir directamente estos fragmentos mediante células huésped recombinantes. Los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y ScFv se pueden expresar en y secretarse a partir de *E. coli*, permitiendo de esta manera una fácil producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpo se pueden aislar a partir de las genotecas de fagos de anticuerpos analizadas anteriormente. Alternativamente, se pueden recuperar directamente fragmentos Fab'-SH de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, Bio/Technology 10:163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, se pueden aislar directamente fragmentos F(ab')₂ a partir del cultivo de células huésped recombinantes. Se describen el fragmento Fab y F(ab')₂ con semivida *in vivo* incrementada que comprende residuos de epítipo de unión a receptor de rescate en la patente de EE. UU. n.º 5.869.046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo son evidentes para el facultativo experto. En otros aspectos, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv monocatenario (scFv) (véase, por ejemplo, el documento WO 93/16185; patente de EE. UU. n.º 5.571.894 y 5.587.458). Fv y sFv son las únicas especies con sitios de combinación intactos que carecen de regiones constantes; de esta manera, son adecuados para la unión no específica reducida durante el uso *in vivo*. Las proteínas de fusión de sFv se pueden construir para producir la fusión de una proteína efectora en el extremo amínico o bien carboxílico de un sFv. Véase Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, *supra*. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 5.641.870. Dichos fragmentos de anticuerpo lineal pueden ser mono-específicos o biespecíficos.

Por consiguiente, en algún aspecto, el anticuerpo anti-c-met es un anticuerpo de un brazo (es decir, el dominio variable de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera forman un único brazo de unión a antígeno) que comprende una región Fc, en el que la región Fc comprende un primer y un segundo polipéptido de Fc, en el que el primer y segundo polipéptidos de Fc están presentes en un complejo y forman una región Fc que incrementa la estabilidad de dicho fragmento de anticuerpo en comparación con una molécula de Fab que comprende dicho brazo de unión a antígeno. Los anticuerpos de un brazo se describen adicionalmente en el presente documento.

Anticuerpos humanizados

La presente invención abarca anticuerpos humanizados. Se conocen en la técnica diversos procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado puede tener uno o más residuos aminoacídicos introducidos en él a partir de una fuente que no sea humana. Estos residuos aminoacídicos no humanos se denominan a menudo residuos de "importación", que se toman típicamente de un dominio variable de "importación". La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y sus compañeros (Jones *et al.* (1986) *Nature* 321:522-525; Riechmann *et al.* (1988) *Nature* 332:323-327; Verhoeven *et al.* (1988) *Science* 239:1534-1536), sustituyendo secuencias de la región hipervariable con las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de EE. UU. n.º 4.816.567) en los que se ha sustituido sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto con la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de la región hipervariable y posiblemente algunos residuos de FR se sustituyen con residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

La elección de los dominios variables humanos, tanto de la cadena pesada como ligera, que se van a usar en la preparación de anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el así llamado procedimiento de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba frente a toda la colección de secuencias del dominio variable humanas conocidas. A continuación, la secuencia humana que es más próxima a la del roedor se acepta como la región estructural humana para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.* (1993) *J. Immunol.* 151:2296; Chothia *et al.* (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901. Otro procedimiento usa una región estructural particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de las cadenas ligera o pesada. Se puede usar la misma región estructural para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285; Presta *et al.* (1993) *J. Immunol.*, 151:2623.

Es adicionalmente importante que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, de acuerdo con un procedimiento, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un procedimiento de análisis de las secuencias originales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias originales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están disponibles comúnmente y son familiares para los expertos en la técnica. Están disponibles programas de ordenador que ilustran y presentan estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidata seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, se pueden seleccionar y combinar residuos de FR a partir de las secuencias de importación y de receptor de modo que se consiga la característica del anticuerpo deseada, tal como afinidad incrementada por el/los antígeno(s) diana. En general, los residuos de la región hipervariable están directa y más sustancialmente implicados en la influencia de la unión a antígeno.

Anticuerpos humanos

Los anticuerpos humanos de la invención se pueden construir combinando secuencia(s) del dominio variable de clones Fv seleccionadas de genotecas de presentación en fagos derivadas de seres humanos con secuencia(s) del dominio constante humanas conocidas como se describe anteriormente. Alternativamente, se pueden preparar anticuerpos monoclonales humanos de la invención mediante el procedimiento de hibridoma. Las líneas celulares de heteromioma ratón-humano y mieloma humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos se han descrito, por ejemplo, por Kozbor *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); y Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147:86 (1991).

Ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que, tras la inmunización, pueden producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión de cadena pesada (JH) del anticuerpo en ratones mutantes quiméricos y de la estirpe germinal da como resultado la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de la micromatriz genética de inmunoglobulina humana de la estirpe germinal a dichos ratones mutantes de la estirpe germinal da como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición a antígenos. Véase, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362: 255 (1993); Bruggermann *et al.*, *Year in Immunol.*, 7:33 (1993).

También se puede usar el barajado de genes para derivar anticuerpos humanos de anticuerpos no humanos, por ejemplo, de roedor, donde el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades similares al anticuerpo no humano de partida. De acuerdo con este procedimiento, que también se llama "sellado de epítipo", la región variable de la cadena pesada o bien ligera de un fragmento de anticuerpo no humano obtenido mediante técnicas de presentación en fagos como se describe anteriormente se reemplaza por un repertorio de genes de dominio de V humanos, creando una población de quimeras de scFv o Fab de cadena humana/cadena no humana. La selección

con antígeno da como resultado el aislamiento de un scFv o Fab quimérico de cadena humana/cadena no humana, en el que la cadena humana restablece el sitio de unión a antígeno destruido tras la eliminación de la cadena no humana correspondiente en el clon de presentación en fagos primario, es decir, el epítipo regula (sella) la elección del ligando de cadena humana. Cuando se repite el procedimiento a fin de reemplazar la cadena no humana restante, se obtiene un anticuerpo humano (véase documento de PCT WO 93/06213 publicado el 1 de abril de 1993). A diferencia de la humanización tradicional de anticuerpos no humanos mediante injerto de CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos, que no tienen residuos de FR o CDR de origen no humano.

Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferentemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión por al menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de unión es por un antígeno y la otra por cualquier otro antígeno. Los anticuerpos biespecíficos ejemplares se pueden unir a dos epítopos diferentes del antígeno. También se pueden usar anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos con respecto a las células que expresan el antígeno. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a antígeno y un brazo que se une al agente citotóxico (por ejemplo, saporina, anti-interferón- α , alcaloide de la vinca, cadena A de ricina, metotrexato o hapteno con isótopo radiactivo). Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos de F(ab')₂).

Los procedimientos para preparar anticuerpos biespecíficos se conocen bien en la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein and Cuello, *Nature*, 305: 537 (1983)). Debido al abanico aleatorio de cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, estos híbridos (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales únicamente una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se hace habitualmente mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante engorrosa, y los rendimientos del producto son bajos. Se divulgan procedimientos similares en el documento WO 93/08829, publicado el 13 de mayo de 1993, y en Trauneker *et al.*, *EMBO J.*, 10: 3655 (1991).

De acuerdo con un enfoque diferente y más preferente, los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan a secuencias del dominio constante de inmunoglobulina. La fusión es preferentemente con un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones CH₂, CH₃ y bisagra. Es preferente tener la primera región constante de la cadena pesada (CH₁) que contenga el sitio necesario para la unión a la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones con la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos polipeptídicos en los aspectos cuando las proporciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en proporciones iguales dé como resultado rendimientos altos o cuando las proporciones no sean de particular importancia.

En un aspecto preferente de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos están compuestos de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se encontró que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en únicamente la mitad de la molécula biespecífica proporciona una fácil manera de separación. Este enfoque se divulga en el documento WO 94/04690. Para obtener más detalles de la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

De acuerdo con otro enfoque, se puede genomanipular la interfase entre un par de moléculas de anticuerpo para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La interfase preferente comprende al menos una parte del dominio C_{H3} de un dominio constante de anticuerpo. En este procedimiento, se reemplazan una o más cadenas laterales aminoácidas pequeñas de la interfase de la primera molécula de anticuerpo por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano) (nudos o protuberancias). Se crean "cavidades" (huecos) compensatorias de tamaño idéntico o similar a la(s) cadena(s) lateral(es) grande(s) en la interfase de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando cadenas laterales aminoácidas grandes por otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para incrementar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados, tales como homodímeros. Los nudos y huecos se describen adicionalmente en el presente documento.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado se puede acoplar a avidina, el otro, a biotina. Por ejemplo, dichos anticuerpos se

han propuesto para que células del sistema inmunitario seleccionen como diana células no deseadas (patente de EE. UU. n.º 4.676.980) y para el tratamiento de la infección por VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/00373 y EP 03089). Se pueden preparar anticuerpos heteroconjugados usando cualquier procedimiento de reticulación conveniente. Los agentes de reticulación adecuados se conocen bien en la técnica y se divulgan en la patente de EE. UU. n.º 4.676.980, junto con una serie de técnicas de reticulación.

Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpo también se han descrito en la literatura. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos usando un enlace químico. Brennan *et al.*, *Science*, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que los anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente formador de complejos con ditiol arsenito de sodio para estabilizar los ditiolos vecinos y prevenir la formación de disulfuro intermolecular. A continuación, los fragmentos Fab' generados se convierten en derivados de tionitrobenzoato (TNB). A continuación, uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierte al Fab'-tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden usar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Los recientes progresos han facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que se pueden acoplar químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de F(ab')₂ de anticuerpo biespecífico completamente humanizado. Cada fragmento Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico directo *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de esta manera se pudo unir a células que sobreexpresaban el receptor HER2 y linfocitos T humanos normales, así como iniciar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos frente a dianas de tumor de mama humanas.

También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar directamente fragmentos de anticuerpo biespecífico a partir de cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos de la cremallera de leucinas de las proteínas Fos y Jun se enlazaron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Se redujeron los homodímeros de anticuerpo en la región bisagra para formar monómeros y, a continuación, se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpo. También se puede utilizar este procedimiento para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpos" descrita por Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico. Los fragmentos comprenden un dominio variable de la cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (VL) mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, se fuerza que los dominios de VH y VL de un fragmento se emparejen con los dominios de VL y VH complementarios de otro fragmento, formando de este modo dos sitios de unión a antígeno. También se ha registrado otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico mediante el uso de dímeros de Fv monocatenarios (sFv). Véase Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos trispecíficos. Tutt *et al.* *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

Anticuerpos multivalentes

Un anticuerpo multivalente se puede internalizar (y/o catabolizar) más deprisa que un anticuerpo bivalente por una célula que expresa un antígeno al que se unen los anticuerpos. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos multivalentes (que son distintos de la clase IgM) con tres o más sitios de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos tetravalentes), que se pueden producir fácilmente mediante expresión recombinante de ácido nucleico que codifica las cadenas polipeptídicas del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión a antígeno. El dominio de dimerización preferente comprende (o consiste en) una región Fc o una región bisagra. En esta situación, el anticuerpo comprende una región Fc y tres o más sitios de unión a antígeno en el extremo amínico con respecto a la región Fe. El anticuerpo multivalente preferente en el presente documento comprende (o consiste en) de tres a aproximadamente ocho, pero preferentemente cuatro, sitios de unión a antígeno. El anticuerpo multivalente comprende al menos una cadena polipeptídica (y preferentemente dos cadenas polipeptídicas), en el que la(s) cadena(s) polipeptídica(s) comprende(n) dos o más dominios variables. Por ejemplo, la(s) cadena(s) polipeptídica(s) puede(n) comprender VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc, en la que VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena polipeptídica de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o polipéptido, y n es 0 o 1. Por ejemplo, la(s) cadena(s) polipeptídica(s) puede(n) comprender: cadena VH-CH1-enlazador flexible-VH-CH1-región Fc; o cadena VH-CH1-VH-CH1-región Fc. El anticuerpo multivalente en el presente documento preferentemente comprende adicionalmente al menos dos (y preferentemente cuatro) polipéptidos de dominio variable de la cadena ligera. El anticuerpo multivalente en el presente documento, por ejemplo, puede comprender desde aproximadamente dos a aproximadamente ocho polipéptidos de dominio variable de la cadena ligera. Los polipéptidos de dominio variable de la cadena ligera contemplados aquí comprenden un dominio variable de la cadena ligera y, opcionalmente, comprenden adicionalmente un dominio de CL.

Variantes de anticuerpo

5 En algunos aspectos, se contempla una modificación/modificaciones de secuencia aminoacídica de los anticuerpos descritos en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencia aminoacídica del anticuerpo se preparan introduciendo cambios nucleotídicos apropiados en el ácido nucleico del anticuerpo, o mediante síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de y/o inserciones en y/o sustituciones de residuos en las secuencias aminoacídicas del anticuerpo. Se hace cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para 10 llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Las alteraciones aminoacídicas se pueden introducir en la secuencia aminoacídica del anticuerpo objeto en el momento en que se realiza la secuencia.

15 Un procedimiento útil para la identificación de determinados residuos o regiones del anticuerpo que son localizaciones preferentes para la mutagénesis se llama "mutagénesis por barrido de alanina" como se describe por Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. Aquí, un residuo o grupo de residuos diana (por ejemplo, residuos cargados, tales como arg, asp, his, lys y glu) se identifican y remplazan por un aminoácido neutro o cargado negativamente (lo más preferente alanina o polialanina) para que afecten a la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Las localizaciones aminoacídicas que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan, a 20 continuación, introduciendo más u otras variantes en, o para, los sitios de sustitución. De esta manera, aunque el sitio para introducir una variación de secuencia aminoacídica está predeterminado, la naturaleza de la mutación *per se* no está necesariamente predeterminada. Por ejemplo, para analizar el funcionamiento de una mutación en un sitio dado, se lleva a cabo mutagénesis aleatoria o por barrido de ala en la región o codón diana y las inmunoglobulinas expresadas se criban para determinar la actividad deseada.

25 Las inserciones en la secuencia aminoacídica incluyen fusiones de extremo amínico y/o carboxílico que varían en longitud desde un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuencia de residuos aminoacídicos únicos o múltiples. Los ejemplos de inserciones de extremo incluyen un anticuerpo con un residuo metionilo de extremo N o el anticuerpo fusionado a un polipéptido citotóxico. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al extremo N o C del anticuerpo a una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que incrementa la semivida en suero del anticuerpo.

35 La glucosilación de polipéptidos es típicamente con enlaces N o bien con enlaces O. Con enlaces N se refiere a la fijación del resto glucídico a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la fijación enzimática del resto glucídico a la cadena lateral de asparagina. De esta manera, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glucosilación potencial. La glucosilación con enlaces O se refiere a la fijación de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, aunque también se puede usar 5-hidroxi prolina o 5-hidroxisilina.

40 La adición de sitios de glucosilación al anticuerpo se logra convenientemente alterando la secuencia aminoacídica de tal manera que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para sitios de glucosilación con enlaces N). La alteración también se puede hacer mediante la adición de o sustitución con uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glucosilación con enlaces O).

45 Si el anticuerpo comprende una región Fc, se puede alterar el carbohidrato fijado al mismo. Por ejemplo, se describen anticuerpos con una estructura glucídica madura que carece de fucosa fijada a una región Fc del anticuerpo en la solicitud de patente de EE. UU. n.º US 2003/0157108 (Presta, L.). Véase también el documento US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Se hace referencia a anticuerpos con una N-acetilglucosamina (GlcNAc) divisora en el carbohidrato fijado a una región Fc del anticuerpo en el documento WO 2003/011878, Jean-Mairet *et al.* y la patente de EE. UU. n.º 6.602.684, Umana *et al.* Se registran anticuerpos con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido fijado a una región Fc del anticuerpo en el documento WO 1997/30087, Patel *et al.* Véase también el documento WO 1998/58964 (Raju, S.) y el documento WO 1999/22764 (Raju, S.) que se refieren a anticuerpos con carbohidrato alterado fijado a la región Fc de los mismos. Véase también el documento US 50 2005/0123546 (Umana *et al.*) sobre moléculas de unión a antígeno con glucosilación modificada.

55 La variante de glucosilación preferente en el presente documento comprende una región Fc, en la que una estructura glucídica fijada a la región Fc carece de fucosa. Dichas variantes tienen una función ADCC mejorada. Opcionalmente, la región Fc comprende adicionalmente una o más sustituciones aminoacídicas en la misma que mejoran adicionalmente la ADCC, por ejemplo, las sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración Eu de residuos). Los ejemplos de publicaciones relacionadas con anticuerpos "desfucosilados" o "deficitarios en fucosa" incluyen: los documentos US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; Okazaki *et al.* *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki *et al.* *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Los 60 65

ejemplos de líneas celulares que producen anticuerpos defucosilados incluyen células CHO Lec 13 deficitarias en fucosilación de proteínas (Ripka *et al. Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); solicitud de patente de EE. UU. n.º US 2003/0157108 A1, Presta, L; y documento WO 2004/056312 A1, Adams *et al.*, especialmente en el ejemplo 11) y líneas celulares con desactivación génica, tales como el gen alfa-1,6-fucosiltransferasa, *FUT8*, células CHO con desactivación génica (Yamane-Ohnuki *et al. Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004)).

En un aspecto, la invención proporciona un fragmento de anticuerpo que comprende al menos una característica que promueve la heterodimerización, al tiempo que minimiza la homodimerización, de las secuencias de Fc en el fragmento de anticuerpo. Dicha(s) característica(s) mejora(n) el rendimiento y/o pureza y/o homogeneidad de las poblaciones de inmunoglobulina obtenibles mediante procedimientos de la invención como se describe en el presente documento. En un aspecto, un primer polipéptido de Fc y un segundo polipéptido de Fc se encuentran/interaccionan en una interfase. En algunos aspectos en los que los primer y segundo polipéptidos de Fc se encuentran en una interfase, la interfase del segundo polipéptido de Fc (secuencia) comprende una protuberancia (también denominada "nudo") que se puede posicionar en una cavidad (también denominada "hueco") en la interfase del primer polipéptido de Fc (secuencia). En un aspecto, el primer polipéptido de Fc se ha alterado a partir de un polipéptido molde/original para codificar la cavidad o el segundo polipéptido de Fc se ha alterado a partir de un polipéptido molde/original para codificar la protuberancia, o ambos. En un aspecto, el primer polipéptido de Fc se ha alterado a partir de un polipéptido molde/original para codificar la cavidad y el segundo polipéptido de Fc se ha alterado a partir de un polipéptido molde/original para codificar la protuberancia. En un aspecto, la interfase del segundo polipéptido de Fc comprende una protuberancia que se puede posicionar en una cavidad en la interfase del primer polipéptido de Fc, en la que la cavidad o protuberancia, o ambas, se han introducido en la interfase del primer y segundo polipéptidos de Fc, respectivamente. En algunos aspectos en los que los primer y segundo polipéptidos de Fc se encuentran en una interfase, la interfase del primer polipéptido de Fc (secuencia) comprende una protuberancia que se puede posicionar en una cavidad en la interfase del segundo polipéptido de Fc (secuencia). En un aspecto, el segundo polipéptido de Fc se ha alterado a partir de un polipéptido molde/original para codificar la cavidad o el primer polipéptido de Fc se ha alterado a partir de un polipéptido molde/original para codificar la protuberancia, o ambos. En un aspecto, el segundo polipéptido de Fc se ha alterado a partir de un polipéptido molde/original para codificar la cavidad y el primer polipéptido de Fc se ha alterado a partir de un polipéptido molde/original para codificar la protuberancia. En un aspecto, la interfase del primer polipéptido de Fc comprende una protuberancia que se puede posicionar en una cavidad en la interfase del segundo polipéptido de Fc, en la que la protuberancia o cavidad, o ambas, se han introducido en la interfase del primer y segundo polipéptidos de Fc, respectivamente.

En un aspecto, la protuberancia y cavidad comprenden cada una un residuo aminoácido natural. En un aspecto, el polipéptido de Fc que comprende la protuberancia se genera reemplazando un residuo original de la interfase de un polipéptido molde/original por un residuo de importación que tenga un volumen de cadena lateral más grande que el residuo original. En un aspecto, el polipéptido de Fc que comprende la protuberancia se genera mediante un procedimiento que comprende una etapa en la que el polinucleótido que codifica un residuo original de la interfase de dicho polipéptido se reemplaza por un polinucleótido que codifica un residuo de importación que tenga un volumen de cadena lateral más grande que el original. En un aspecto, el residuo original es treonina. En un aspecto, el residuo original es T366. En un aspecto, el residuo de importación es arginina (R). En un aspecto, el residuo de importación es fenilalanina (F). En un aspecto, el residuo de importación es tirosina (Y). En un aspecto, el residuo de importación es triptófano (W). En un aspecto, el residuo de importación es R, F, Y o W. En un aspecto, se genera una protuberancia reemplazando dos o más residuos en un polipéptido molde/original. En un aspecto, el polipéptido de Fc que comprende una protuberancia comprende el reemplazo de treonina en la posición 366 por triptófano, numeración de aminoácidos de acuerdo con el esquema de numeración EU de Kabat *et al.* (pp. 688-696 in *Sequences of proteins of immunological interest*, 5.ª ed., Vol. 1 (1991; NIH, Bethesda, MD)).

En algunos aspectos, el polipéptido de Fc que comprende una cavidad se genera reemplazando un residuo original en la interfase de un polipéptido molde/original con un residuo de importación que tenga un volumen de cadena lateral más pequeño que el residuo original. Por ejemplo, el polipéptido de Fc que comprende la cavidad se puede generar mediante un procedimiento que comprende una etapa en la que el polinucleótido que codifica un residuo original de la interfase de dicho polipéptido se reemplaza por un polinucleótido que codifica un residuo de importación que tenga un volumen de cadena lateral más pequeño que el original. En un aspecto, el residuo original es treonina. En un aspecto, el residuo original es leucina. En un aspecto, el residuo original es tirosina. En un aspecto, el residuo de importación no es cisteína (C). En un aspecto, el residuo de importación es alanina (A). En un aspecto, el residuo de importación es serina (S). En un aspecto, el residuo de importación es treonina (T).

En un aspecto, el residuo de importación es valina (V). Se puede generar una cavidad reemplazando uno o más residuos originales de un polipéptido molde/original. Por ejemplo, en un aspecto, el polipéptido de Fc que comprende una cavidad comprende el reemplazo de dos o más aminoácidos originales seleccionados del grupo que consiste en treonina, leucina y tirosina. En un aspecto, el polipéptido de Fc que comprende una cavidad comprende dos o más residuos de importación seleccionados del grupo que consiste en alanina, serina, treonina y valina. En algunos aspectos, el polipéptido de Fc que comprende una cavidad comprende el reemplazo de dos o más aminoácidos originales seleccionados del grupo que consiste en treonina, leucina y tirosina, y en el que dichos aminoácidos originales se reemplazan por residuos de importación seleccionados del grupo que consiste en alanina, serina, treonina y valina. En algunos aspectos, un aminoácido original que se reemplaza es T366, L368 y/o Y407. En un

5 aspecto, el polipéptido de Fc que comprende una cavidad comprende el reemplazo de treonina en la posición 366 por serina, numeración de aminoácidos de acuerdo con el esquema de numeración EU de Kabat *et al. supra*. En un aspecto, el polipéptido de Fc que comprende una cavidad comprende el reemplazo de leucina en la posición 368 por alanina, numeración de aminoácidos de acuerdo con el esquema de numeración EU de Kabat *et al. supra*. En un aspecto, el polipéptido de Fc que comprende una cavidad comprende el reemplazo de tirosina en la posición 407 por valina, numeración de aminoácidos de acuerdo con el esquema de numeración EU de Kabat *et al. supra*. En un aspecto, el polipéptido de Fc que comprende una cavidad comprende dos o más reemplazos aminoacídicos seleccionados del grupo que consiste en T366S, L368A y Y407V, numeración de aminoácidos de acuerdo con el esquema de numeración EU de Kabat *et al. supra*. En algunos aspectos de estos fragmentos de anticuerpo, el polipéptido de Fc que comprende la protuberancia comprende el reemplazo de treonina en la posición 366 por triptófano, numeración de aminoácidos de acuerdo con el esquema de numeración EU de Kabat *et al. supra*.

10 En un aspecto, el anticuerpo comprende mutaciones en Fc que constituyen "nudos" y "huecos" como se describe en el documento W02005/063816. Por ejemplo, una mutación de hueco puede ser una o más de T366A, L368A y/o Y407V en un polipéptido de Fc, y una mutación de nudo puede ser T366W.

15 Otro tipo de variante es una variante de sustitución aminoacídica. Estas variantes tienen al menos un residuo aminoacídico (al menos dos, al menos tres, al menos 4 o más) en la molécula de anticuerpo reemplazado por un residuo diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones en FR. Las sustituciones conservadoras se muestran en la tabla A bajo el encabezamiento de "sustituciones preferentes". Si dichas sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces se pueden introducir más cambios sustanciales, denominados "sustituciones ejemplares" en la tabla A, o como se describe adicionalmente a continuación con referencia a las clases de aminoácidos, y cribar los productos.

25

Tabla A

Residuo original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferentes
Ala (A)	Val; Leu; lie	Val
Arg (R)	Lys; Gin; Asn	Lys
Asn (N)	Gin; His; Asp, Lys; Arg	Gin
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gin (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gin	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gin; Lys; Arg	Arg
He (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; lie; Val; Met; Ala; Phe	He
Lys (K)	Arg; Gin; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; lie	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; lie; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr

Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; norleucina	Leu

Las modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo se logran seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto de mantener (a) la estructura de la cadena principal del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de lámina o hélice, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana o (c) el volumen de la cadena lateral. Los residuos naturales se dividen en grupos basándose en las propiedades de cadena lateral comunes:

(1) hidrófobos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;

(2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gin;

(3) ácidos: asp, glu;

(4) básicos: his, lys, arg;

(5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y

(6) aromáticos: trp, tyr, phe.

Las sustituciones no conservadoras conllevan el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

Un tipo de variante de sustitución implica sustituir uno o más residuos de la región hipervariable de un anticuerpo original (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para el desarrollo adicional tiene(n) propiedades biológicas mejoradas con respecto al anticuerpo original a partir del que se generan. Una manera conveniente para generar dichas variantes de sustitución implica la maduración de la afinidad usando presentación en fagos. En resumen, varios sitios de la región hipervariable (por ejemplo, los sitios 6-7) se mutan para generar todas las posibles sustituciones aminoacídicas en cada sitio. Los anticuerpos generados de esta manera se presentan a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones con el producto de gen III de M13 empaquetado dentro de cada partícula. A continuación, las variantes presentadas en fagos se criban para determinar su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) como se divulga en el presente documento. A fin de identificar sitios de la región hipervariable candidatos para la modificación, se puede realizar mutagénesis por barrido de alanina para identificar los residuos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión a antígeno. Alternativamente, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos residuos de contacto y los residuos adyacentes son candidatos para la sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en el presente documento. Una vez que se generan dichas variantes, el panel de variantes se somete a cribado como se describe en el presente documento y se pueden seleccionar los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos pertinentes para el desarrollo adicional.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencia aminoacídica del anticuerpo se pueden preparar mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, aislamiento a partir de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencia aminoacídica naturales) o preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (dirigida a sitio), mutagénesis por PCR, y mutagénesis por casete de una variante preparada anteriormente o una versión no variante del anticuerpo.

Puede ser deseable introducir una o más modificaciones aminoacídicas en una región Fc de los polipéptidos de inmunoglobulina de la invención, generando de este modo una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprenda una modificación aminoacídica (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones aminoacídicas, incluyendo la de la cisteína de bisagra.

De acuerdo con esta descripción y las enseñanzas de la técnica, se contempla que en algunos aspectos, un anticuerpo usado en los procedimientos de la invención pueda comprender una o más alteraciones en comparación con el anticuerpo homólogo natural, por ejemplo, en la región Fc. No obstante, estos anticuerpos retienen substancialmente las mismas características requeridas para la utilidad terapéutica en comparación con su homólogo natural. Por ejemplo, se cree que se pueden realizar determinadas alteraciones en la región Fc que darían como resultado una unión a C1q alterada (es decir, mejorada o bien reducida) y/o citotoxicidad dependiente del

complemento (CDC), por ejemplo, como se describe en el documento WO99/51642. Véase también Duncan & Winter *Nature* 322:738-40 (1988); patente de EE. UU. n.º 5.648.260; patente de EE. UU. n.º 5.624.821; y documento WO94/29351 en referencia a otros ejemplos de variantes de la región Fc. Los documentos WO00/42072 (Presta) y WO 2004/056312 (Lowman) describen variantes de anticuerpo con unión mejorada o reducida a los FcR. Véase también Shields *et al. J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001). Los anticuerpos con semivididas incrementadas y unión mejorada al receptor de Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer *et al., J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim *et al., J. Immunol.* 24:249 (1994)), se describen en el documento US 2005/0014934A1 (Hinton *et al.*).

Estos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en la misma que mejoran la unión de la región Fc al FcRn. Las variantes de polipéptido con secuencias aminoacídicas de la región Fc alteradas y capacidad de unión a C1q incrementada o disminuida se describen en la patente de EE. UU. n.º 6.194.551B1 y el documento WO99/51642. Véase también Idusogie *et al., J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

Derivados de anticuerpo

Los anticuerpos de la presente invención se pueden modificar adicionalmente para que contengan restos no proteicos adicionales que son conocidos en la técnica y están fácilmente disponibles. Preferentemente, los restos adecuados para la derivatización del anticuerpo son polímeros solubles en agua. Los ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o bien copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol), poli(alcohol vinílico) y mezclas de los mismos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en su fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular, y puede estar ramificado o no ramificado. El número de polímeros fijados al anticuerpo puede variar, y si se fija más de un polímero, pueden ser las mismas moléculas o diferentes. En general, el número y/o tipo de polímeros usados para la derivatización se puede determinar basándose en consideraciones que incluyen, pero no limitadas a, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo que se va a mejorar, independientemente de si el derivado de anticuerpo se usa en un tratamiento en condiciones definidas, etc.

Cribado para determinar anticuerpos con propiedades deseadas

Los anticuerpos de la presente invención se pueden caracterizar por sus propiedades físicas/químicas y funciones biológicas mediante diversos ensayos conocidos en la técnica (algunos de los cuales se divulgan en el presente documento). Por ejemplo, los anticuerpos se pueden caracterizar adicionalmente por una serie de ensayos que incluyen, pero no limitados a, secuenciación de extremo N, análisis de aminoácidos, cromatografía líquida de alta presión por exclusión de tamaño no desnaturizante (HPLC), espectrometría de masas, cromatografía de intercambio iónico y digestión con papaína.

En determinados aspectos de la invención, los anticuerpos producidos en el presente documento se analizan en cuanto a su actividad biológica. En algunos aspectos, los anticuerpos de la presente invención se someten a prueba en cuanto a su actividad de unión a antígeno. Los ensayos de unión a antígeno que son conocidos en la técnica y se pueden usar en la presente invención incluyen sin limitación cualquier ensayo de unión competitiva o directa usando técnicas tales como inmunoelctrotransferencias, radioinmunoensayos, ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción), inmunoanálisis de tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, inmunoensayos fluorescentes e inmunoensayos de proteína A. Se proporcionan a continuación ensayos ilustrativos en la sección de ejemplos.

Vectores, células huésped y procedimientos recombinantes

Para la producción recombinante de un polipéptido heterógeno (por ejemplo, un anticuerpo), el ácido nucleico que lo codifica se aísla e inserta en un vector replicable para su clonación adicional (amplificación del ADN) o para su expresión. El ADN que codifica el polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo) se aísla y secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que se puedan unir específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo). Están disponibles muchos vectores. La elección del vector depende en parte de la célula huésped que se va a usar. Generalmente, las células huésped preferentes son de cualquier origen procariontico. Se aprecia que se pueden usar para este propósito regiones constantes de cualquier isotipo, incluyendo las regiones constantes de IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, y que dichas regiones constantes se pueden obtener a partir de cualquier especie humana o animal.

a. Generación de anticuerpos usando células huésped procarionticas:

i. Construcción de vectores

Las secuencias polinucleotídicas que codifican componentes polipeptídicos del polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo) de la invención se pueden obtener usando técnicas recombinantes estándar. Las secuencias de polinucleótidos deseadas se pueden aislar y secuenciar a partir de células productoras de anticuerpos, tales como

células de hibridoma. Alternativamente, los polinucleótidos se pueden sintetizar utilizando un sintetizador de nucleótidos o técnicas de PCR. Una vez obtenidas, las secuencias que codifican los polipéptidos se insertan en un vector recombinante que puede replicar y expresar polinucleótidos heterógenos en huéspedes procarióticos. Se pueden usar muchos vectores que están disponibles y se conocen en la técnica para el propósito de la presente invención. La selección de un vector apropiado depende principalmente del tamaño de los ácidos nucleicos que se van a insertar en el vector y la célula huésped particular que se va a transformar con el vector. Cada vector contiene diversos componentes, dependiendo de su función (amplificación o expresión de polinucleótido heterógeno, o ambas) y de su compatibilidad con la célula huésped particular en la que reside. Los componentes del vector generalmente incluyen, pero no se limitan a: un origen de replicación, un gen marcador de selección, un promotor, un sitio de unión a ribosoma (RBS), una secuencia señal, el inserto de ácido nucleico heterógeno y una secuencia de terminación de la transcripción.

En general, se usan los vectores plasmídicos que contienen secuencias de control y replicón que derivan de especies compatibles con la célula huésped en conexión con estos huéspedes. El vector porta de manera ordinaria un sitio de replicación, así como secuencias de marcaje que pueden proporcionar una selección fenotípica en las células transformadas. Por ejemplo, *E. coli* se transforma típicamente usando pBR322, un plásmido derivado de una especie de *E. coli*. pBR322 contiene genes que codifican la resistencia a ampicilina (Amp) y tetraciclina (Tet) y, de esta manera, proporciona medios fáciles para identificar a las células transformadas. pBR322, sus derivados u otros plásmidos microbianos o bacteriófagos también pueden contener, o modificarse para que contengan, promotores que se pueden usar por el organismo microbiano para la expresión de proteínas endógenas. Los ejemplos de derivados de pBR322 usados para la expresión de anticuerpos particulares se describen en detalle en Carter *et al.*, patente de EE. UU. n.º 5.648.237.

Adicionalmente, se pueden usar vectores de fago que contienen secuencias de control y replicón que son compatibles con el microorganismo huésped como vectores de transformación en conexión con estos huéspedes. Por ejemplo, se puede utilizar un bacteriófago, tal como λ GEM.TM.-11, en la preparación de un vector recombinante que se puede usar para transformar células huésped susceptibles, tales como *E. coli* LE392.

El vector de expresión de la invención puede comprender dos o más pares de promotor-cistrón, que codifican cada uno de los componentes polipeptídicos. Un promotor es una secuencia reguladora no traducida localizada en dirección 5' con respecto a un cistrón que modula su expresión. Los promotores procarióticos típicamente se dividen en dos clases, inducibles y constitutivos. Un promotor inducible es un promotor que inicia niveles de transcripción incrementados del cistrón bajo su control en respuesta a cambios en las condiciones de cultivo, por ejemplo, la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura.

Se conocen bien un gran número de promotores reconocidos por una variedad de células huésped potenciales. El promotor seleccionado se puede enlazar funcionalmente a ADN cistrónico que codifica la cadena ligera o pesada eliminando el promotor del ADN fuente por medio de digestión con enzimas de restricción e insertando la secuencia promotora aislada en el vector de la invención. Tanto la secuencia del promotor natural como muchos promotores heterógenos se pueden usar para dirigir la amplificación y/o expresión de los genes diana. En algunos aspectos, se utilizan promotores heterógenos, ya que generalmente permiten una mayor transcripción y rendimientos más altos del gen diana expresado en comparación con el promotor polipeptídico diana natural.

Los promotores adecuados para su uso con huéspedes procarióticos incluyen el promotor de *phoA*, los sistemas promotores de β -lactamasa y lactosa, un sistema promotor de triptófano (*trp*) y promotores híbridos, tales como el promotor de *tac* o el de *trc*. Sin embargo, otros promotores que son funcionales en bacterias (tales como otros promotores bacterianos o de fagos conocidos) también son adecuados. Se han publicado sus secuencias nucleotídicas, permitiendo de este modo que un trabajador experto los ligue funcionalmente a cistrones que codifican las cadenas ligera y pesada diana (Siebenlist *et al.*, (1980) Cell 20: 269) usando enlazadores o adaptadores para suministrar cualquier sitio de restricción requerido.

En un aspecto de la invención, cada cistrón en el vector recombinante comprende un componente de secuencia señal de secreción que dirige la translocación de los polipéptidos expresados a través de una membrana. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN del polipéptido diana que se inserta en el vector. La secuencia señal seleccionada para el propósito de la presente invención debe ser una que se reconozca y procese (es decir, se escinda por una peptidasa señal) por la célula huésped. Para las células huésped procarióticas que no reconocen y procesan las secuencias señal naturales con respecto a los polipéptidos heterógenos, la secuencia señal se sustituye con una secuencia señal procariótica seleccionada, por ejemplo, de los polipéptidos señal de la presente invención. Adicionalmente, el vector puede comprender una secuencia señal seleccionada del grupo que consiste en los líderes de enterotoxina termoestable II (STII) o *Lpp*, penicilinasas, fosfatasa alcalina, *LamB*, *PhoE*, *PeIB*, *OmpA* y *MBP*.

En un aspecto de la invención, uno o más polinucleótidos (por ejemplo, vectores de expresión) codifican colectivamente un anticuerpo de un brazo. En un aspecto, un único polinucleótido codifica (a) los componentes de cadena ligera y pesada del anticuerpo de un brazo, y (b) el polipéptido de Fc. En un aspecto, un único polinucleótido codifica los componentes de cadena ligera y pesada del anticuerpo de un brazo, y un polinucleótido separado

codifica el polipéptido de Fc. En un aspecto, los polinucleótidos separados codifican el componente de cadena ligera del anticuerpo de un brazo, el componente de cadena pesada del anticuerpo de un brazo y el polipéptido de Fc, respectivamente. La producción de un anticuerpo de un brazo se describe, por ejemplo, en el documento WO2005063816.

5 Las células huésped procarióticas adecuadas para expresar los anticuerpos de la invención incluyen Archaeobacteria y Eubacteria, tales como organismos gramnegativas o grampositivos. Los ejemplos de bacterias útiles incluyen Escherichia (por ejemplo, *E. coli*), Bacilli (por ejemplo, *B. subtilis*), Enterobacteria, especies de Pseudomonas (por ejemplo, *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescans*, Klebsiella, Proteus, Shigella, Rhizobia, Vitreoscilla o Paracoccus.

10 En un aspecto, se usan células gramnegativas. En un aspecto, se usan las células de *E. coli* como huéspedes para la invención. Los ejemplos de cepas de *E. coli* incluyen la cepa W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219; n.º de depósito de ATCC 27.325) y derivados de la misma, incluyendo la cepa 33D3 que tiene el genotipo W3110 Δ fhuA (Δ tonA) ptr3 lac lq lacL8 Δ ompT Δ (nmpc-fepE) degP41 kanR (patente de EE. UU. n.º 5.639.635) y las cepas 63C1 y 64B4. También son adecuadas otras cepas y derivados de las mismas, tales como *E. coli* 294 (ATCC 31.446), *E. coli* B, *E. coli* λ 1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* RV308 (ATCC 31.608). Estos ejemplos son ilustrativos en lugar de limitantes. Se conocen en la técnica procedimientos para construir derivados de cualquiera de las bacterias mencionadas anteriormente que tienen genotipos definidos y se describen, por ejemplo, en Bass *et al.*, Proteins, 8:309-314 (1990). En general, es necesario seleccionar las bacterias apropiadas tomando en consideración la replicabilidad del replicón en las células de una bacteria. Por ejemplo, se pueden usar adecuadamente las especies *E. coli*, *Serratia* o *Salmonella* como huésped cuando se usan plásmidos bien conocidos, tales como pBR322, pBR325, pACYC177 o pKN410 para suministrar el replicón. Típicamente, la célula huésped debe secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas y se pueden incorporar de manera deseable inhibidores de la proteasa adicionales en el cultivo de células.

ii. Producción de anticuerpos

30 Las células huésped se transforman con los vectores de expresión descritos anteriormente y se cultivan en medios de nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

35 La transformación quiere decir introducir ADN en el huésped procariótico de modo que el ADN sea replicable, como un elemento extracromosómico o bien como integrante cromosómico. Dependiendo de la célula huésped usada, la transformación se hace usando técnicas estándar apropiadas para dichas células. El tratamiento con calcio que emplea cloruro de calcio se usa generalmente para células bacterianas que contienen barreras de pared celular sustanciales. Otro procedimiento para la transformación emplea polietilenglicol/DMSO. Aún otra técnica usada es la electroporación.

40 Las células procarióticas usadas para producir los polipéptidos de la invención se cultivan en medios conocidos en la técnica y adecuados para el cultivo de las células huésped seleccionadas. Los ejemplos de medios adecuados incluyen caldo Luria (LB) más los complementos de nutrientes necesarios. En algunos aspectos, el medio también contiene un agente de selección, elegido basándose en la construcción del vector de expresión, para permitir selectivamente el crecimiento de las células procarióticas que contienen el vector de expresión. Por ejemplo, se añade ampicilina a los medios para el crecimiento de células que expresan el gen resistente a ampicilina.

45 También se puede incluir cualquier complemento necesario, además de las fuentes de carbono, nitrógeno y fosfato inorgánico, en concentraciones apropiadas introducido solo o como una mezcla con otro complemento o medio tal como una fuente de nitrógeno complejo. Opcionalmente, el medio de cultivo puede contener uno o más agentes reductores seleccionados del grupo que consiste en glutatión, cisteína, cistamina, tioglicolato, ditioneitol y ditioneitol. Las células huésped procarióticas se cultivan a temperaturas adecuadas. Para el crecimiento de *E. coli*, por ejemplo, la temperatura preferente varía desde aproximadamente 20 °C a aproximadamente 39 °C, más preferentemente desde aproximadamente 25 °C a aproximadamente 37 °C, incluso más preferentemente a aproximadamente 30 °C. El pH del medio puede ser cualquier pH que varíe desde aproximadamente 5 a aproximadamente 9, dependiendo principalmente del organismo huésped. Para *E. coli*, el pH es preferentemente desde aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,4 y más preferentemente de aproximadamente 7,0.

50 Si se usa un promotor inducible en el vector de expresión de la invención, se induce la expresión de proteínas en condiciones adecuadas para la activación del promotor. En un aspecto de la invención, se usan promotores de phoA para controlar la transcripción de los polipéptidos. Por consiguiente, las células huésped transformadas se cultivan en un medio limitante de fosfato para la inducción. Preferentemente, el medio limitante de fosfato es el medio C.R.A.P (véase, por ejemplo, Simmons *et al.*, J. Immunol. Methods (2002), 263:133-147) o los medios descritos en el documento WO2002/061090. Se puede usar una variedad de inductores, de acuerdo con la construcción de vectores empleada, como se conoce en la técnica.

65 En un modo de realización, los polipéptidos expresados de la presente invención se secretan en y recuperan del

periplasma de las células huésped. La recuperación de proteínas normalmente implica romper el microorganismo, generalmente mediante medios tales como choque osmótico, sonicación o lisis. Una vez que se rompen las células, se pueden eliminar los restos celulares o las células enteras mediante centrifugación o filtración. Las proteínas se pueden purificar adicionalmente, por ejemplo, mediante cromatografía en resina de afinidad. Alternativamente, se pueden transportar las proteínas en el medio de cultivo y aislarse en el mismo. Se pueden eliminar las células del cultivo y filtrar y concentrar el sobrenadante del cultivo para una purificación adicional de las proteínas producidas. Los polipéptidos expresados se pueden aislar e identificar adicionalmente usando procedimientos comúnmente conocidos, tales como electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y ensayo de inmunoelectrotransferencia.

En un aspecto de la invención, la producción de anticuerpos se lleva a cabo en grandes cantidades mediante un procedimiento de fermentación. Están disponibles diversos procedimientos de fermentación por lote alimentado a gran escala para la producción de proteínas recombinantes. Las fermentaciones a gran escala tienen al menos 1000 litros de capacidad, preferentemente de aproximadamente 1000 a 100.000 litros de capacidad. Estos fermentadores usan impulsores de agitador para distribuir oxígeno y nutrientes, especialmente glucosa (la fuente de carbono/energía preferente). La fermentación a pequeña escala se refiere generalmente a la fermentación en un fermentador que no tiene más de aproximadamente 100 litros de capacidad volumétrica, y que puede variar desde aproximadamente 1 litro a aproximadamente 100 litros.

En un procedimiento de fermentación, la inducción de la expresión de proteínas se inicia típicamente después de que las células se hayan cultivado en condiciones adecuadas hasta una densidad deseada, por ejemplo, una DO550 de aproximadamente 180-220, etapa en la que las células están en la fase estacionaria temprana. Se puede usar una variedad de inductores, de acuerdo con la construcción de vectores empleada, como se conoce en la técnica y se describe anteriormente. Las células se pueden cultivar durante periodos más cortos antes de la inducción. Las células se inducen habitualmente durante aproximadamente 12-50 horas, aunque se puede usar un tiempo de inducción más corto o más largo.

Para mejorar el rendimiento de producción y la calidad de los polipéptidos de la invención, se pueden modificar diversas condiciones de fermentación. Por ejemplo, para mejorar el ensamblaje apropiado y el plegamiento de los polipéptidos de anticuerpo secretados, se pueden usar vectores adicionales que sobreexpresan proteínas chaperonas, tales como proteínas Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD y/o DsbG) o FkpA (una peptidilproilil *cis*,*trans*-isomerasa con actividad de chaperona) para cotransformar las células procarióticas huésped. Las proteínas chaperonas han demostrado facilitar el plegamiento apropiado y la solubilidad de proteínas heterógenas producidas en células huésped bacterianas. Chen *et al.*, (1999) J. Biol. Chem. 274:19601-19605; Georgiou *et al.*, patente de EE. UU. n.º 6.083.715; Georgiou *et al.*, patente de EE. UU. n.º 6.027.888; Bothmann and Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17100-17105; Ramm and Pluckthun, (2000) J. Biol. Chem. 275:17106-17113; Arie *et al.*, (2001) Mol. Microbiol. 39:199-210. En algunos modos de realización, se expresan DsbA y C en la célula huésped bacteriana.

Para minimizar la proteólisis de proteínas heterógenas expresadas (especialmente las que son proteolíticamente sensibles), se pueden usar para la presente invención determinadas cepas huésped deficitarias en enzimas proteolíticas. Por ejemplo, se pueden modificar cepas de células huésped para efectuar una mutación/mutaciones genética(s) en los genes que codifican proteasas bacterianas conocidas, tales como proteasa III, OmpT, DegP, Tsp, proteasa I, proteasa Mi, proteasa V, proteasa VI y combinaciones de las mismas. Están disponibles algunas cepas deficitarias en proteasa de *E. coli* y se describen, por ejemplo, en Joly *et al.*, (1998), *supra*; Georgiou *et al.*, patente de EE. UU. n.º 5.264.365; Georgiou *et al.*, patente de EE. UU. n.º 5.508.192; Hara *et al.*, Microbial Drug Resistance, 2:63-72 (1996).

En un modo de realización, se usan cepas de *E. coli* deficitarias en enzimas proteolíticas y transformadas con plásmidos que sobreexpresan una o más proteínas chaperonas o células huésped en el sistema de expresión de la invención.

iii. Purificación de anticuerpos

Se pueden emplear procedimientos de purificación de proteínas estándar conocidos en la técnica. Los siguientes procedimientos son ejemplares de procedimientos de purificación adecuados: fraccionamiento en columnas de inmunoafinidad o de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC en fase inversa, cromatografía en sílice o en una resina de intercambio catiónico, tal como DEAE, cromatofoco, SDS-PAGE, precipitación con sulfato de amonio y filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75.

En un aspecto, se usa proteína A inmovilizada sobre una fase sólida para la purificación por inmunoafinidad de los productos de anticuerpo de la invención. La proteína A es una proteína de la pared celular de 41 kD de *Staphylococcus aureus* que se une con alta afinidad a la región Fc de los anticuerpos. Lindmark *et al.*, (1983) J. Immunol. Meth. 62:1-13. La fase sólida en la que se inmoviliza la proteína A es preferentemente una columna que comprende una superficie de vidrio o sílice, más preferentemente una columna de vidrio de poro controlado o una columna de ácido silícico. En algunas aplicaciones, la columna se ha recubierto con un reactivo, tal como glicerol, en un intento de prevenir la adherencia no específica de contaminantes.

Como primera etapa de purificación, la preparación derivada del cultivo de células como se describe anteriormente se aplica en la fase sólida con la proteína A inmovilizada para permitir la unión específica del anticuerpo de interés a la proteína A. A continuación, la fase sólida se lava para eliminar los contaminantes no unidos específicamente a la fase sólida. Por último, se recupera el anticuerpo de interés de la fase sólida mediante elución.

5 **Inmunocombinados**

La invención también proporciona inmunocombinados (denominados indistintamente "combinados anticuerpo-fármaco" o "CAF") que comprenden cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento combinado a un agente citotóxico, tal como un agente quimioterápico, un fármaco, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma) o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado).

El uso de combinados anticuerpo-fármaco para la administración local de agentes citotóxicos o citostáticos, es decir, fármacos para destruir o inhibir células tumorales en el tratamiento del cáncer (Syrigos and Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz and Springer (1997) *Adv. Drg. Del. Rev.* 26:151-172; patente de EE. UU. n.º 4.975.278) permite la administración dirigida del resto de fármaco a tumores, y la acumulación intracelular en los mismos, donde la administración sistémica de estos agentes de fármacos no combinados puede dar como resultado niveles inaceptables de toxicidad para las células normales, así como para las células tumorales que se busca eliminar (Baldwin *et al.*, (1986) *Lancet* pp. (Mar. 15, 1986):603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, A. Pinchera *et al.* (eds), pp. 475-506). De este modo se busca la eficacia máxima con la mínima toxicidad. Tanto los anticuerpos policlonales como los anticuerpos monoclonales se han registrado como útiles en estas estrategias (Rowland *et al.*, (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21:183-87). Los fármacos usados en estos procedimientos incluyen daunomicina, doxorubicina, metotrexato y vindesina (Rowland *et al.*, (1986) *supra*). Las toxinas usadas en los combinados anticuerpo-toxina incluyen toxinas bacterianas, tales como toxina de difteria, toxinas vegetales, tales como ricina, toxinas de moléculas pequeñas, tales como geldanamicina (Mandler *et al.* (2000) *Jour. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19): 1573-1581; Mandler *et al.*, (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028; Mandler *et al.*, (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791), maitansinoides (documento EP 1391213; Liu *et al.*, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618- 8623) y caliqueamicina (Lode *et al.*, (1998) *Cancer Res.* 58:2928; Hinman *et al.*, (1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342). Las toxinas pueden ejercer sus efectos citotóxico y citostático mediante mecanismos que incluyen la unión a tubulina, unión a ADN o inhibición de topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tienden a ser inactivos o menos activos cuando se combinan a ligandos de receptores de proteínas o anticuerpos grandes.

ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetán, Biogen/Idec) es un combinado anticuerpo-radioisótopo compuesto de un anticuerpo monoclonal IgG1 kappa murino dirigido frente al antígeno CD20 encontrado en la superficie de linfocitos B normales y malignos y el radioisótopo ¹¹¹In o ⁹⁰Y unido mediante un enlazador-quelante de tiourea (Wiseman *et al.*, (2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27(7):766-77; Wiseman *et al.*, (2002) *Blood* 99(12):4336-42; Witzig *et al.*, (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(10):2453-63; Witzig *et al.*, (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(15):3262-69). Aunque ZEVALIN tiene actividad frente al linfoma no hodgkiniano (LNH) de linfocitos B, su administración da como resultado citopenias graves y prolongadas en la mayoría de los pacientes. MYLOTARG™ (gemtuzumab ozogamicina, Wyeth Pharmaceuticals), un combinado anticuerpo-fármaco compuesto de un anticuerpo hu CD33 enlazado a caliqueamicina, se aprobó en el 2000 para el tratamiento de leucemia mieloide aguda mediante inyección (*Drugs of the Future* (2000) 25(7):686; patentes n.ºs 4.970.198; 5.079.233; 5.585.089; 5.606.040; 5.6937.62; 5.739.116; 5.767.285; 5.773.001). Cantuzumab mertansina (Immunogen Inc.), un combinado anticuerpo-fármaco compuesto del anticuerpo huC242 enlazado por medio del enlazador de disulfuro SPP al resto de fármaco de maitansinoide, DM1, está progresando en ensayos de fase II para el tratamiento de cánceres que expresan CanAg, tales como de colon, pancreático, gástrico y otros. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologies, Immunogen Inc.), un combinado anticuerpo-fármaco compuesto del anticuerpo monoclonal anti-antígeno prostático específico de membrana (PSMA) enlazado al resto de fármaco de maitansinoide, DM1, está en desarrollo para el tratamiento potencial de los tumores de próstata. Los péptidos de auristatina, auristatina E (AE) y monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de dolastatina, se combinaron a los anticuerpos monoclonales quiméricos cBR96 (específico para Lewis Y en carcinomas) y cAC10 (específico para CD30 en neoplasias malignas hematológicas) (Doronina *et al.*, (2003) *Nature Biotechnology* 21(7):778-784) y están en desarrollo terapéutico.

Los agentes quimioterápicos útiles en la generación de inmunocombinados se describen en el presente documento (por ejemplo, anteriormente). Las toxinas enzimáticamente activas y los fragmentos de las mismas que se pueden usar incluyen la cadena A de difteria, fragmentos activos de no unión de la toxina de difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993. Están disponibles una variedad de radionúclidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y y ¹⁸⁶Re. Se preparan combinados del anticuerpo y agente citotóxico usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales, tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol)propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales

como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen-2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta *et al.*, Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentriaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono¹⁴ es un agente quelante ejemplar para la conjugación del radionucleótido al anticuerpo. Véase el documento WO94/11026.

Los conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de moléculas pequeñas, tales como una caliqueamicina, maitansinoides, dolastatinas, aurostatinas, un tricoteceno y CC1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad de toxina, también se contemplan en el presente documento.

i. Maitansina y maitansinoides

En algunos aspectos, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo (de longitud completa o fragmentos) de la invención conjugado a una o más moléculas de maitansinoide.

Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de tubulina. La maitansina se aisló por primera a partir del arbusto del África oriental *Maytenus serrata* (patente de EE. UU. n.º 3.896.111). Posteriormente, se descubrió que determinados microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres C-3 de maitansinol (patente de EE. UU. n.º 4.151.042). Se divulgan maitansinol sintético y derivados y análogos del mismo, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.º 4.137.230; 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663 y 4.371.533.

Los restos de fármaco de maitansinoide son restos de fármaco atractivos en los conjugados anticuerpo-fármaco debido a que son: (i) relativamente accesibles para preparar mediante fermentación o modificación química, derivatización de productos de fermentación, (ii) susceptibles de derivatización con grupos funcionales adecuados para la conjugación a través de los enlazadores de no disulfuro a anticuerpos, (iii) estables en el plasma y (iv) eficaces frente a una variedad de líneas celulares tumorales.

Se divulgan inmunoconjugados que contienen maitansinoides, procedimientos de preparación de los mismos y su uso terapéutico, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.º 5.208.020, 5.416.064 y en la patente europea EP 0 425 235 B1. Liu *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996) describieron inmunoconjugados que comprendían un maitansinoide designado como DM1 enlazado al anticuerpo monoclonal C242 dirigido frente al cáncer colorrectal humano. Se descubrió que el conjugado era altamente citotóxico hacia las células del cáncer de colon cultivadas y mostró actividad antitumoral en un ensayo de crecimiento tumoral *in vivo*. Chari *et al.*, Cancer Research 52:127-131 (1992) describen inmunoconjugados en los que un maitansinoide se conjugó por medio de un enlazador de disulfuro con el anticuerpo murino A7 que se une a un antígeno en líneas celulares de cáncer de colon humano o a otro anticuerpo monoclonal murino TA.1 que se une al oncogén HER-2/neu. La citotoxicidad del conjugado TA.1-maitansinoide se sometió a prueba *in vitro* en la línea celular de cáncer de mama humano SK-BR-3, que expresa 3 x 10⁵ antígenos de superficie HER-2 por célula. El conjugado de fármaco consiguió un grado de citotoxicidad similar al del fármaco de maitansinoide libre, que se podía incrementar incrementando el número de moléculas de maitansinoide por molécula de anticuerpo. El conjugado A7-maitansinoide mostró baja citotoxicidad sistémica en ratones.

Los conjugados anticuerpo-maitansinoide se preparan enlazando químicamente un anticuerpo a una molécula de maitansinoide sin disminuir significativamente la actividad biológica del anticuerpo o bien de la molécula de maitansinoide. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.208.020. Un promedio de 3-4 moléculas de maitansinoide conjugadas por molécula de anticuerpo ha demostrado eficacia en la potenciación de la citotoxicidad de células diana sin afectar negativamente a la función ni a la solubilidad del anticuerpo, aunque incluso se espera que una molécula de toxina/anticuerpo potencie la citotoxicidad frente al uso del anticuerpo no marcado. Los maitansinoides se conocen bien en la técnica y se pueden sintetizar mediante técnicas conocidas o aislar a partir de fuentes naturales. Se divulgan maitansinoides adecuados, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 5.208.020 y en las otras publicaciones de patente y de no patente mencionadas anteriormente en el presente documento. Los maitansinoides preferentes son maitansinol y análogos de maitansinol modificados en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula de maitansinol, tales como diversos ésteres de maitansinol.

Hay muchos grupos de enlace conocidos en la técnica para preparar conjugados anticuerpo-maitansinoide, incluyendo, por ejemplo, los divulgados en la patente de EE. UU. n.º 5.208.020 o en la patente EP 0 425 235 B1, Chari *et al.*, Cancer Research 52:127-131 (1992) y en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 2005/0169933, presentada el 8 de octubre de 2004. Los conjugados anticuerpo-maitansinoide que comprenden el componente enlazador SMCC se pueden preparar como se divulga en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 2005/0169933, presentada el 8 de octubre de 2004. Los grupos de enlace incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles en ácido, grupos fotolábiles, grupos lábiles en peptidasa o grupos lábiles en esterasa, como se divulgan en las patentes identificadas anteriormente, siendo preferentes los grupos disulfuro y tioéter. Se

describen y ejemplifican grupos de enlace adicionales en el presente documento.

Los conjugados del anticuerpo y maitansinoide se pueden preparar usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen-2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Los agentes de acoplamiento particularmente preferentes incluyen N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) (Carlsson *et al.*, Biochem. J. 173:723-737 (1978)) y N-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato (SPP) para proporcionar un enlace disulfuro.

El enlazador se puede fijar a la molécula de maitansinoide en diversas posiciones, dependiendo del tipo de enlace. Por ejemplo, se puede formar un enlace éster mediante reacción con un grupo hidroxilo usando técnicas de acoplamiento convencionales. La reacción se puede producir en la posición C-3 que tenga un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo y la posición C-20 que tenga un grupo hidroxilo. En un aspecto preferente, el enlace se forma en la posición C-3 del maitansinol o un análogo de maitansinol.

ii. Auristatinas y dolastatinas

En algunos aspectos, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo de la invención conjugado a dolastatinas o análogos y derivados peptídicos de dolostatina, las auristatinas (patentes de EE. UU. n.ºs 5.635.483 y 5.780.588). Las dolastatinas y auristatinas han demostrado que interfieren en la dinámica de microtúbulos, la hidrólisis de GTP y la división nuclear y celular (Woyke *et al.* (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584) y tienen actividad antineoplásica (patente de EE. UU. n.º 5.663.149) y antifúngica (Pettit *et al.*, (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965). El resto de fármaco de dolostatina o auristatina se puede fijar al anticuerpo a través del extremo N (amínico) o el extremo C (carboxílico) del resto de fármaco peptídico (documento WO 02/088172).

Los aspectos de auristatina ejemplar incluyen los restos de fármaco de monometilauristatina enlazados al extremo N DE y DF, divulgados en "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands," publicación de solicitud de patente de EE. UU. US 2005/0238649, presentada el 5 de noviembre de 2004.

Típicamente, se pueden preparar restos de fármaco basados en péptidos formando un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos peptídicos. Dichos enlaces peptídicos se pueden preparar, por ejemplo, de acuerdo con el procedimiento de síntesis en fase líquida (véase E. Schroder and K. Lübke, "The Peptides," volume 1, pp. 76-136, 1965, Academic Press) que se conoce bien en el campo de la química de péptidos. Los restos de fármaco de auristatina/dolostatina se pueden preparar de acuerdo con los procedimientos de: las patentes de EE. UU. n.ºs 5.635.483 y 5.780.588.; Pettit *et al.*, (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465; Pettit *et al.*, (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277; Pettit, G.R., *et al.*, Synthesis, 1996, 719-725; y Pettit *et al.*, (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863. Véase también Doronina (2003) Nat. Biotechnol. 21(7):778-784; "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º US2005/0238649, presentada el 5 de noviembre de 2004 (que divulga, por ejemplo, enlazadores y procedimientos de preparación de compuestos de monometilvalina, tales como MMAE y MMAF conjugados a enlazadores).

iii. Caliqueamicina

En otros aspectos, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo de la invención conjugado a una o más moléculas de caliqueamicina. La familia de caliqueamicinas de antibióticos puede producir roturas en el ADN bicatenario a concentraciones subpicomolares. Para la preparación de conjugados de la familia de caliqueamicinas, véanse las patentes de EE. UU. n.ºs 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001 y 5.877.296 (todas conferidas a American Cyanamid Company). Los análogos estructurales de caliqueamicina que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, γ_1^1 , α_2^1 , α_3^1 N-acetil- γ_1^1 , PSAG y u¹ (Hinman *et al.*, Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode *et al.*, Cancer Research 58:2925-2928 (1998) y las patentes de EE. UU. mencionadas anteriormente conferidas a American Cyanamid). Otro fármaco antitumoral al que se puede conjugar el anticuerpo es QFA, que es un antifolato. Tanto la caliqueamicina como QFA tienen sitios intracelulares de acción y no atraviesan fácilmente la membrana plasmática. Por lo tanto, la captación celular de estos agentes a través de internalización mediada por anticuerpos potencia enormemente sus efectos citotóxicos.

iv. Otros agentes citotóxicos

Otros agentes antitumorales que se pueden conjugar a los anticuerpos de la invención incluyen BCNU, estreptozaicina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocidos colectivamente como complejo LL-E33288 descrita en las patentes de EE. UU. n.ºs 5.053.394 y 5.770.710, así como esperamicinas (patente de EE. UU. n.º 5.877.296).

Las toxinas enzimáticamente activas y los fragmentos de las mismas que se pueden usar incluyen la cadena A de difteria, fragmentos activos de no unión de la toxina de difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993.

La presente invención contempla adicionalmente un inmunoconjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una ADN endonucleasa, tal como una desoxirribonucleasa; DNasa).

Para la destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo altamente radiactivo. Una variedad de isótopos radiactivos están disponibles para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} y los isótopos radiactivos de Lu. Cuando el conjugado se usa para detección, puede comprender un átomo radiactivo para estudios de gammagrafía, por ejemplo, tc^{99m} o I^{123} , o un marcador de espín para la resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como resonancia magnética, RM), tal como yodo-123 de nuevo, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

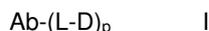
Los radiomarcadores u otros se pueden incorporar en el conjugado de maneras conocidas. Por ejemplo, el péptido se puede biosintetizar o se puede sintetizar mediante síntesis química de aminoácidos usando precursores aminoácidos adecuados que implican, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Los marcadores tales como tc^{99m} o I^{123} , Re^{186} , Re^{188} e In^{111} se pueden fijar por medio de un residuo de cisteína en el péptido. El itrio-90 se puede fijar por medio de un residuo de lisina. El procedimiento IODOGEN (Fraker *et al* (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57 se puede usar para incorporar yodo-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describe otros procedimientos en detalle.

Los conjugados del anticuerpo y agente citotóxico se pueden preparar usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen-2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta *et al.*, *Science* 238:1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentríaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono-14 es un agente quelante ejemplar para la conjugación del radionucleótido al anticuerpo. Véase el documento WO94/11026. El enlazador puede ser un "enlazador escindible" que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, se puede usar un enlazador lábil en ácido, enlazador sensible a la peptidasa, enlazador fotolábil, enlazador de dimetilo o enlazador que contiene disulfuro (Chari *et al.*, *Cancer Research* 52:127-131 (1992); patente de EE. UU. n.º 5.208.020).

Los compuestos de la invención contemplan expresamente, pero no se limitan a, CAF preparado con reactivos reticulantes: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) que están disponibles comercialmente (por ejemplo, de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., EE. UU.). Véanse las páginas 467-498 de 2003-2004 Applications Handbook and Catalog.

v. Preparación de conjugados anticuerpo-fármaco

En los conjugados anticuerpo-fármaco (CAF) de la invención, se conjuga un anticuerpo (Ab) a uno o más restos de fármaco (D), por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 restos de fármaco por anticuerpo, a través de un enlazador (L). El CAF de fórmula I se puede preparar mediante varias rutas, empleando reacciones, condiciones y reactivos de química orgánica conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo: (1) reacción de un grupo nucleófilo de un anticuerpo con un reactivo enlazador bivalente, para formar Ab-L, a través de un enlace covalente, seguido de reacción con un resto de fármaco D; y (2) reacción de un grupo nucleófilo de un resto de fármaco con un reactivo enlazador bivalente, para formar D-L, por medio de un enlace covalente, seguido de reacción con el grupo nucleófilo de un anticuerpo. Se describen en el presente documento procedimientos adicionales para preparar el CAF.



El enlazador puede estar compuesto de uno o más componentes enlazadores. Los componentes enlazadores ejemplares incluyen 6-maleimidocaproilo ("MC"), maleimidopropanoilo ("MP"), valina-citrulina ("val-cit"), alanina-fenilalanina ("ala-phe"), p-aminobenciloicarbonilo ("PAB"), N-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato ("SPP"), N-succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato ("SMCC") y N-succinimidil(4-yodo-acetil)aminobenzoato ("SIAB"). Se conocen en la técnica componentes enlazadores adicionales y algunos se describen en el presente

documento. Véase también "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands," publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º US2005/0238649, presentada el 5 de noviembre de 2004.

En algunos aspectos, el enlazador puede comprender residuos aminoácidos. Los componentes enlazadores aminoácidos ejemplares incluyen un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido o un pentapéptido. Los dipéptidos ejemplares incluyen: valina-citrulina (vc o val-cit), alanina-fenilalanina (af o ala-phe). Los tripéptidos ejemplares incluyen: glicina-valina-citrulina (gly-val-cit) y glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly). Los residuos aminoácidos que comprenden un componente enlazador aminoácido incluyen los naturales, así como los aminoácidos secundarios y los análogos de aminoácidos no naturales, tales como citrulina. Los componentes enlazadores aminoácidos se pueden diseñar y optimizar en su selectividad por la escisión enzimática por una enzima particular, por ejemplo, una proteasa asociada a tumor, antígeno de CAT B, C y D, o una proteasa plasmina.

Los grupos nucleófilos en los anticuerpos incluyen, pero no se limitan a: (i) grupos amina de extremo N, (ii) grupos amina de cadena lateral, por ejemplo, lisina, (iii) grupos tiol de cadena lateral, por ejemplo, cisteína, y (iv) grupos hidroxilo o amino de azúcar si el anticuerpo se glucosila. Los grupos amina, tiol e hidroxilo son nucleófilos y pueden reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en los restos de enlazador y de reactivos enlazadores que incluyen: (i) ésteres activos, tales como ésteres NHS, ésteres HOBt, haloformatos y haluros de ácido; (ii) haluros de alquilo y bencilo, tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, grupos carboxílico y maleimido. Determinados anticuerpos tienen disulfuros intercatenarios reducibles, es decir, puentes de cisteína. Los anticuerpos se pueden hacer reactivos para su conjugación con reactivos enlazadores mediante tratamiento con un agente reductor, tal como DTT (ditiotreitól). Cada puente de cisteína forma de esta manera, teóricamente, dos nucleófilos de tiol reactivos. Se pueden introducir grupos nucleófilos adicionales en los anticuerpos a través de la reacción de lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) lo que da como resultado la conversión de una amina en un tiol. Se pueden introducir grupos tiol reactivos en el anticuerpo introduciendo uno, dos, tres, cuatro o más residuos de cisteína (por ejemplo, preparando anticuerpos mutantes que comprenden uno o más residuos aminoácidos de cisteína no naturales).

Los conjugados anticuerpo-fármaco de la invención también se pueden producir mediante modificación del anticuerpo para introducir restos electrófilos, que pueden reaccionar con los sustituyentes nucleófilos en el reactivo enlazador o fármaco. Los azúcares de anticuerpos glucosilados se pueden oxidar, por ejemplo, con reactivos oxidantes de peryodato, para formar grupos aldehído o cetona que pueden reaccionar con el grupo amina de reactivos enlazadores o restos de fármaco. Los grupos de base de Schiff imina resultantes pueden formar un enlace estable, o se pueden reducir, por ejemplo, mediante reactivos de borohidruro para formar enlaces de amina estables. En un aspecto, la reacción de la porción glucídica de un anticuerpo glucosilado con galactosa oxidasa o bien metaperyodato de sodio puede producir grupos carbonilo (aldehído y cetona) en la proteína que pueden reaccionar con grupos apropiados en el fármaco (Hermanson, Bioconjugate Techniques). En otro aspecto, las proteínas que contienen residuos de serina o treonina de extremo N pueden reaccionar con metaperyodato de sodio, lo que da como resultado la producción de un aldehído en lugar del primer aminoácido (Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146; patente de EE. UU. n.º 5.362.852). Dicho aldehído se puede hacer reaccionar con un resto de fármaco o nucleófilo enlazador.

Asimismo, los grupos nucleófilos en un resto de fármaco incluyen, pero no se limitan a: amina, tiol, hidroxilo, hidracida, oxima, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina, y grupos arilhidracida que pueden reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en los restos de enlazador y reactivos enlazadores que incluyen: (i) ésteres activos, tales como ésteres NHS, ésteres HOBt, haloformatos y haluros de ácido; (ii) haluros de alquilo y bencilo, tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, grupos carboxílico y maleimido.

Alternativamente, se pueden preparar una proteína de fusión que comprende el anticuerpo y agente citotóxico, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. La longitud del ADN puede comprender regiones respectivas que codifican las dos porciones del conjugado, adyacentes entre sí o bien separadas por una región que codifica un péptido enlazador que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

En aún otro aspecto, el anticuerpo se puede conjugar a un "receptor" (tal como estreptavidina) para su utilización en la preselección como diana de tumores, en el que el conjugado anticuerpo-receptor se administra a la persona, seguido de la eliminación del conjugado no unido de la circulación usando un agente de aclaramiento y, a continuación, la administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que se conjuga a un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

Formulaciones farmacéuticas

Se preparan formulaciones terapéuticas del polipéptido heterógeno para su almacenamiento mezclando el polipéptido heterógeno que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizantes fisiológicamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16.^a edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de soluciones acuosas, formulaciones liofilizadas u otras secas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones, tales como fosfato, citrato, histidina y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina;

conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos, tales como metil- o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos de metal (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos, tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

La formulación en el presente documento también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se está tratando, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan negativamente entre sí. Dichas moléculas están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito pretendido.

Los ingredientes activos también se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsula de gelatina y microcápsula de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16.^a edición, Osol, A. Ed. (1980).

Las formulaciones que se van a usar para su administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se logra fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, estando las matrices en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) o poli(alcohol vinílico), polilactidas (patente de EE. UU. n.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables, tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y poli-ácido-D(-)-3-hidroxibutírico. Mientras que los polímeros, tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico posibilitan la liberación de moléculas durante más de 100 días, determinados hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un largo tiempo, se pueden desnaturalizar o agregar como resultado de la exposición a la humedad a 37 °C, lo que da como resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenia. Se pueden ingeniar estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través de intercambio tio-disulfuro, la estabilización se puede conseguir modificando los residuos sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matriz polimérica específicas.

Usos

Se puede usar un polipéptido heterógeno de la presente invención, por ejemplo, para purificar, detectar y seleccionar como diana un polipéptido específico que reconoce, incluyendo tanto procedimientos terapéuticos y de diagnóstico *in vitro* e *in vivo*.

En un aspecto, se puede usar un anticuerpo de la invención en inmunoensayos para medir cualitativa y cuantitativamente antígenos específicos en muestras biológicas. Los procedimientos convencionales para detectar la unión antígeno-anticuerpo incluyen, por ejemplo, un enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA) o inmunohistoquímica tisular. Muchos procedimientos pueden usar un marcador unido al anticuerpo para propósitos de detección. El marcador usado con el anticuerpo es cualquier funcionalidad detectable que no interfiera con su unión al anticuerpo. Se conocen numerosos marcadores, incluyendo los radioisótopos ³²P, ³²S, ¹⁴C, ¹²⁵I, ³H e ¹³¹I, fluoróforos, tales como quelatos de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferinas, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (patente de EE. UU. n.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinedionas, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas, por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas, tales como uricasa y xantina oxidasa, lactoperoxidasa, biotina/avidina, marcadores de espín, marcadores de bacteriófago, radicales libres estables, radionúclidos de formación de imágenes (tales como tecnecio) y similares.

Están disponibles procedimientos convencionales para unir covalentemente estos marcadores a los polipéptidos heterógenos. Por ejemplo, se pueden usar agentes de acoplamiento, tales como dialdehídos, carbodiimidas, dimaleimidas, bisimidatos, benzidina bisdiazotizada y similares, para etiquetar los anticuerpos con los marcadores

enzimáticos quimioluminiscentes y fluorescentes descritos anteriormente. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 3.940.475 (fluorimetría) y la patente de EE. UU. n.º 3.645.090 (enzimas); Hunter *et al.* *Nature* 144: 945 (1962); David *et al.* *Biochemistry* 13:1014-1021 (1974); Pain *et al.* *J. Immunol. Methods* 40:219-230 (1981); y Nygren *Histochem. and Cytochem* 30:407-412 (1982). Los marcadores preferentes en el presente documento son enzimas, tales como peroxidasa de rábano picante y fosfatasa alcalina. La conjugación de dicho marcador, incluyendo las enzimas, al polipéptido de anticuerpo es un procedimiento de manipulación estándar para un experto en técnicas de inmunoensayo. Véase, por ejemplo, O'Sullivan *et al.*, "Methods for the Preparation of Enzyme-antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay," en *Methods in Enzymology*, ed. J. J. Langone and H. Van Vunakis, vol. 73 (Academic Press, New York, N.Y., 1981), pp. 147-166. Dichos procedimientos de unión son adecuados para su uso con los polipéptidos heterógenos de la presente invención.

Alternativamente al marcaje del polipéptido heterógeno, el antígeno se puede someter a ensayo en fluidos biológicos mediante un inmunoensayo competitivo utilizando un patrón de antígeno competitivo marcado con una sustancia detectable y un polipéptido heterógeno no marcado. En este ensayo, se combinan la muestra biológica, los patrones de antígeno marcados y el polipéptido heterógeno y se determina la cantidad de patrón de antígeno marcado unido al polipéptido heterógeno no marcado. La cantidad de antígeno sometido a prueba en la muestra biológica es inversamente proporcional a la cantidad de patrón de antígeno marcado unido al polipéptido heterógeno.

En un aspecto, un polipéptido heterógeno (tal como un anticuerpo) de la invención es particularmente útil para detectar y determinar el perfil de expresiones de antígenos de superficie específicos *in vitro* o *in vivo*. Como se analiza anteriormente, generalmente, un anticuerpo no glucosilado no ejerce funciones efectoras (es decir, actividad ADCC o CDC). Por lo tanto, cuando el anticuerpo se une al antígeno de superficie celular, no inicia acontecimientos citotóxicos no deseables. El antígeno de superficie puede ser específico para un tipo celular o tisular particular, por lo tanto, sirve como marcador del tipo celular o tisular. Preferentemente, el marcador de antígeno de superficie se expresa diferencialmente en diversas fases de diferenciación de tipos celulares o tisulares particulares. De esta manera, se puede usar el anticuerpo que selecciona como diana dicho antígeno de superficie para el cribado de poblaciones celulares o tisulares que expresan el marcador. Por ejemplo, se puede usar el anticuerpo de la invención para el cribado y aislamiento de células madre, tales como embriocitoblastos, hemocitoblastos y células madre mesenquimatosas. También se puede usar el anticuerpo de la invención para detectar células tumorales que expresan antígenos de superficie asociados a tumor, tales como los receptores c-met, HER2, HER3 o HER4.

Se puede usar un anticuerpo u otro polipéptido heterógeno de la invención como agente de purificación por afinidad. En este procedimiento, se inmoviliza el polipéptido en una fase sólida tal como una resina Sephadex o papel de filtro, usando procedimientos bien conocidos en la técnica. El polipéptido inmovilizado se pone en contacto con una muestra que contiene el antígeno que se va a purificar y después se lava el soporte con un disolvente adecuado que elimina sustancialmente todo el material en la muestra excepto el antígeno que se va a purificar, que está unido al polipéptido inmovilizado. Por último, se lava el soporte con otro disolvente adecuado, tal como tampón glicina, pH 5,0, que libera el antígeno del polipéptido.

En un aspecto, la invención proporciona usos de un polipéptido heterógeno generado usando los procedimientos de la invención, en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un cáncer, un tumor, un trastorno proliferativo celular y/o un trastorno inmunitario (tal como autoinmunitario). El polipéptido heterógeno puede ser de cualquier forma descrita en el presente documento, incluyendo anticuerpo, fragmento de anticuerpo, polipéptido (por ejemplo, un oligopéptido) o una combinación de los mismos. En algunos aspectos, el antígeno es una molécula de proteína humana y el sujeto es un sujeto humano.

Se pueden usar los polipéptidos heterógenos de la invención para diagnosticar, tratar, inhibir o prevenir enfermedades, trastornos o afecciones asociados con una expresión y/o actividad anómala de una o más moléculas de antígeno, incluyendo, pero no limitados a, tumores malignos y benignos; no leucemias y neoplasias malignas linfoides; trastornos neuronales, neurogliales, astrocitales, hipotalámicos y otros trastornos glandulares, de los macrófagos, epiteliales, estromales y blastocóelicos; y trastornos inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos.

En determinados aspectos, se administra al sujeto un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo. Preferentemente, el inmunoconjugado y/o antígeno al que se une está(n) internalizado(s) por la célula.

Los polipéptidos heterógenos de la presente invención se pueden usar solos o bien en combinación con otras composiciones en un tratamiento. Por ejemplo, el polipéptido heterógeno se puede coadministrar con un anticuerpo, agente(s) quimioterápico(s) (incluyendo combinados de agentes quimioterápicos), otro(s) agente(s) citotóxico(s), agente(s) antiangiogénico(s), citocinas y/o agente(s) inhibidor(es) del crecimiento. Cuando el polipéptido heterógeno inhibe el crecimiento tumoral, puede ser particularmente deseable combinar el polipéptido heterógeno con uno o más de otro(s) agente(s) terapéutico(s) que también inhibe(n) el crecimiento tumoral. Alternativamente, o adicionalmente, el paciente puede recibir radioterapia combinada (por ejemplo, irradiación con haz externo o tratamiento con un agente marcado radiactivo, tal como un anticuerpo). Dichos tratamientos combinados indicados anteriormente incluyen la administración combinada (donde los dos o más agentes se incluyen en la misma o en formulaciones separadas) y la administración separada, en cuyo caso, se puede producir la administración del anticuerpo antes de y/o tras la administración del tratamiento o tratamientos complementario(s).

El polipéptido heterógeno (y opcionalmente, un agente terapéutico complementario) se administra(n) mediante cualquier medio adecuado, incluyendo administración parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para el tratamiento local, intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intrarterial, intraperitoneal o subcutánea. Adicionalmente, el anticuerpo se administra adecuadamente mediante infusión pulsada, particularmente con dosis decrecientes del anticuerpo. Preferentemente, la dosificación se administra mediante inyecciones, lo más preferentemente inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica.

La composición de polipéptido heterógeno de la invención se formula, dosifica y administra de una manera consistente con la buena práctica médica. Los factores que se deben considerar en este contexto incluyen el trastorno particular que vaya a tratarse, el mamífero particular que vaya a tratarse, la afección clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el procedimiento de administración, la programación de la administración y otros factores conocidos por los médicos. Aunque no se necesita, el anticuerpo se formula opcionalmente con uno o más agentes usados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, del tipo de trastorno o tratamiento y de otros factores analizados anteriormente. Estos se usan generalmente en las mismas dosificaciones y con las mismas vías de administración que las usadas anteriormente en el presente documento o aproximadamente desde un 1 a un 99 % de las dosificaciones empleadas hasta ahora.

Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada del anticuerpo (cuando se usa solo o en combinación con otros agentes, tales como agentes quimioterápicos) depende del tipo de enfermedad que se va a tratar, el tipo de anticuerpo, la gravedad y curso de la enfermedad, de si el anticuerpo se administra con propósitos preventivos o terapéuticos, tratamiento previo, la anamnesis del paciente y respuesta al anticuerpo y el criterio del médico responsable. El anticuerpo se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, de aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1 mg/kg-10 mg/kg) de anticuerpo es una dosis candidata inicial para su administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o mediante infusión continua. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, se sostiene el tratamiento hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. La dosis preferente del anticuerpo está en el intervalo desde aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Se puede administrar una dosis de carga más alta inicial, seguido de una o más dosis más bajas. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas posológicas. La evolución de este tratamiento se comprueba fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

Artículos de fabricación

En otro aspecto de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto del envase en o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringuilla, etc. Los recipientes se pueden formar a partir de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es eficaz para tratar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tenga un tapón perforable por una aguja para inyección subcutánea). Al menos un agente activo de la composición es un anticuerpo de la invención. La etiqueta o prospecto del envase indica que la composición se usa para tratar la afección de elección, tal como cáncer. Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un anticuerpo; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un agente citotóxico adicional. El artículo de fabricación en este aspecto de la invención puede comprender adicionalmente un prospecto del envase que indique que las primera y segunda composiciones de anticuerpo se pueden usar para tratar cáncer. Alternativamente, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender adicionalmente un segundo (o tercer) recipiente que comprenda un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWF), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir adicionalmente otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringuillas.

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar meramente la práctica de la presente invención y no se proporcionan a modo de limitación.

EJEMPLOS

Materiales y procedimientos

Medios y cepas bacterianas – Las cepas y plásmidos usados en este estudio se enumeran en la tabla 1. Para cultivos en matraces agitados, se cultivaron todas las cepas en medio limitante de fosfato C.R.A.P (1) o Lauria-Bertani (LB) a 30 o 37 °C cuando se indicó. El medio del fermentador fue esencialmente como se describe en la referencia 1. Se añadieron antibióticos a las siguientes concentraciones: 50 µg/ml de carbenicilina, 50 µg/ml de

canamicina, 12,5 µg/ml de cloranfenicol o 20 µg/ml de tetraciclina.

Construcción y evaluación de colecciones de TIR relativas – Los péptidos señal de la enterotoxina termoestable II (*stII*), proteína periplásmica de unión a maltosa (*malE*), fosfatasa alcalina (*phoA*) o proteína de intercambio tiol:disulfuro (*dsbA*) se amplificaron por PCR y se fusionaron al dominio maduro del gen *phoA* usando cebadores redundantes que introdujeron mutaciones de codones sinónimas de tambaleo (2) en los primeros seis aminoácidos después del codón de iniciación del gen original con un sitio de restricción para *BssHII*, *MluI*, o *XbaI* nueve pares de bases (pb) en dirección 5' de dicho codón de iniciación (véase la tabla 2). También se generaron ADN que codificaban los codones naturales de cada secuencia señal. A continuación, se clonaron de manera rutinaria estos insertos en los sitios *SpeI/NotI* (New England Biolabs) del plásmido pPho41 (3) y se transformaron en células JM109 competentes (Promega), se recuperaron durante una hora y se subcultivaron en 200 ml de LB complementado con cabicilina a 37 °C durante dieciséis horas y posteriormente se purificaron a gran escala (Qiagen). Se sembró una alícuota de células recuperadas de cada colección en placas de LB-agar selectivas a fin de determinar el tamaño de la colección; todas las colecciones produjeron entre ~10-100x de cobertura frente a los tamaños de la colección teóricos. A continuación, el ADN purificado se transformó en células 27C7 competentes y se sembró en placas de agar-LB complementadas con carbenicilina y 100 µg/ml de fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo (BCIP; Sigma) y se cultivó a 37 °C durante dieciséis horas. Las colonias que aparecieron en azul claro indicaban supuestamente que albergaban una variante de TIR que presentaba al menos un bajo nivel de actividad de PhoA, mientras que las colonias en azul oscuro eran indicativas de células que albergaban variantes de TIR fuertes (4), y las colonias en blanco implicaban que las células portaban variantes de TIR con poca a ninguna expresión de PhoA; el porcentaje de colonias en azul en una placa de agar dada para cada colección varió entre ~2-70 %. El ADN de las colonias individuales que presentaban diversos tonos de azul se purificó a pequeña escala (Qiagen), se secuenció mediante SRS Analysis (Genentech, Inc.), se retransformó en células 27C7 competentes y, a continuación, se sometió a ensayo para determinar sus actividades de PhoA basales como se describe previamente (3). En resumen, las colonias se cultivaron en LB selectivo a 30 °C durante dieciséis horas y se diluyeron a 1:100 en medio recién preparado y se cultivaron durante cuatro horas adicionales a 30 °C. A continuación, los cultivos se normalizaron basándose en la densidad óptica (DO₅₅₀) y se resuspendieron en medio AP estricto (3), a continuación, se almacenaron a -20 °C durante la noche. A continuación, las células se descongelaron, se permeabilizaron parcialmente con tratamiento con tolueno (Sigma) (5) y se airearon a 37 °C durante una hora. A continuación, se añadieron 40 microlitros de cada cultivo a una solución que contenía 4-nitrofenilfosfato disódico hexahidratado 1 mM (PNPP, Promega) en tampón Tris-HCl 1 M (pH 8,0) y se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente durante una hora. Las reacciones se detuvieron con la adición de 100 µl de tampón fosfato de sodio (pH 6,5) y se leyó la absorbancia a 410 nm (A₄₁₀) en 20 minutos. Se calcularon las fuerzas de TIR relativas sustrayendo en primer lugar la A₄₁₀ de cada muestra la absorbancia de fondo de un cultivo que contenía un vector vacío (pBR322) y, a continuación, dividiendo por la absorbancia corregida de un cultivo que portaba el plásmido pPho41. Todos los valores de TIR registrados son el resultado de al menos siete experimentos repetidos.

Construcción de vectores de expresión de anticuerpos – Los péptidos señal se clonaron de manera rutinaria en el sistema de dos cistrones descrito previamente (1). Se crearon variantes de péptido señal de cadena pesada fusionando el péptido señal de interés por medio de empalme por PCR de extensión por solapamiento (SOE) a la cadena pesada de interés y se clonaron en sitios para *BssHII/HpaI* (New England Biolabs). Se prepararon de manera similar las variantes de péptido señal de cadena ligera usando SOE-PCR y se clonaron en sitios para *MluI/PacI* (New England Biolabs) o *XbaI/PacI* (New England Biolabs) como se especifica mediante la secuencia nucleotídica de variante de TIR individual (tabla 2). Todas las secuencias de construcción se confirmaron mediante SRS Analysis (Genentech, Inc).

Análisis e inducción a pequeña escala – Las células se cultivaron en 5 ml de LB selectivo complementado con fosfato de sodio 5 mM (pH 7,0) a 30 °C durante 16 horas. A continuación, se usó una alícuota de 500 µl de células para inocular 25 ml de medio limitante de fosfato C.R.A.P selectivo y se cultivó durante 24 horas a 30 °C. Cuando se indicó, las células que portaban el plásmido pJJ247 se indujeron con isopropil-β-D-tiogalactósido (IPTG) hasta una concentración final de 1,0 mM cuando las células alcanzaron una DO₆₀₀ ~2,0. Se tomaron muestras enteras de caldo de punto final y se diluyeron hasta una DO₆₀₀ de ~3,0 en tampón de lisis (Tris 10 mM, pH 6,8, EDTA 5 mM, 0,2 mg/ml de lisozima (Sigma), ácido yodoacético 5 mM (Sigma)) y se incubaron en hielo durante 10 minutos. Las muestras se sonicaron, se centrifugaron para eliminar los restos celulares y, a continuación, se analizaron usando análisis SDS-PAGE (Bis-Tris al 10 %, Invitrogen). Las muestras de lisados de células enteras se normalizaron a densidades ópticas equivalentes reducidas con ditiotreitolo 0,2 M (DTT, Sigma) y se analizaron usando análisis SDS-PAGE. Todos los carriles se cargaron con volúmenes equivalentes de muestras y se sometieron a prueba usando un anticuerpo anti-Fc humano (Southern Biotech) a una dilución de 1:200.000 o bien un anticuerpo anti-kLc de ratón (Southern Biotech) a una dilución de 1:200.000. Todos los anticuerpos se conjugaron con HRP y las inmunotransferencias se visualizaron usando Western Lightning-ECL (PerkinElmer) y exponiendo la membrana a película Biomax XAR (Kodak). Las muestras de proteínas también se analizaron por medio de tinción con azul de Coomassie siguiendo técnicas estándar.

Inducción a gran escala – Las fermentaciones se realizaron como se describe previamente (1). En resumen, se usó una alícuota de 500 µl de células criopreservadas de un cultivo de LB selectivo de 5 ml para inocular 500 ml de LB selectivo y se cultivaron a 30 °C durante 16 horas. A continuación, se inoculó un fermentador de 10 l (esencialmente

- 5 como se describe en la referencia 1) y se cultivaron las células hasta una densidad alta usando un algoritmo basado en ordenador para alimentar una solución de glucosa concentrada basándose en las demandas de la fermentación. Cuando se indicó, se indujeron células que portaban el plásmido pJJ247. Cuando se indicó, las células que portaban el plásmido pJJ247 se indujeron con isopropil-β-D-tiogalactósido (IPTG) hasta una concentración final de 1,0 M cuando las células alcanzaron una DO₅₅₀ -200. Se tomaron muestras enteras de caldo y normalizadas a DO₅₅₀ a intervalos de tiempo regulares y todas las fermentaciones se terminaron después de 2-3 días. Se comprobó de manera rutinaria la idoneidad para el cultivo usando parámetros medidos en línea y fuera de línea. Las muestras se analizaron usando análisis SDS-PAGE como se describe anteriormente.
- 10 *Análisis por HPLC de muestras* – Las muestras de experimentos de inducción a pequeña o bien a gran escala se analizaron para determinar las concentraciones totales de cadena pesada o ligera (insolubles y solubles) a través de una técnica de análisis por HPLC de fase inversa previamente desarrollada (Lisa Wong, comunicación personal). Las muestras se analizaron para determinar las especies de anticuerpos que contenían la cadena ligera mediante un ensayo de HPLC basado en fase inversa de proteína L de doble columna, (Analytical Operations, Genentech, Inc.).
- 15 Se obtuvieron los valores de anticuerpos comparando las áreas de máximos de cromatograma con las de una curva estándar generada agregando muestras en blanco con cantidades conocidas de la molécula de interés.

Tabla 1: Cepas y plásmidos usados en este estudio

Cepa o plásmido	Genotipo/fenotipo pertinente	Referencia o fuente
Cepas de <i>E. coli</i>		
27C7	$\Delta fhuA$ ($\Delta tonA$) $phoA\Delta E15$ $\Delta(argF-lac)$ 169 ptr3 degP41 kan ^R $ompT\Delta(nmpc-fepE)$	(3)
64B4	W3110 $\Delta fhuA$ $\Delta phoA$ $ilvG+$ Δprc $spr43H1$ $\Delta degP$ $\Delta manA$ lac^f $\Delta ompT$	Reservas de laboratorio
JM109	e14 ^(Mcr^A) $recA1$ $endA1$ $gyrA96$ $thi-1$ $hsdR17$ (r_{K^-} m_{K^+}) $supE44$ $relA1$ $\Delta.(lac-proAB)$ [F ['] $traD36$ $proAB$ lac^f $Z\Delta M15$]	Promega
Plásmidos		
pPho41	Cb ^r	(3)
pBR322	Cb ^r , Tc ^r	Reservas de laboratorio
ph5D5	Anticuerpo 5D5 humanizado (denominado indistintamente anticuerpo 5D5.v2) clonado en pBR322	Reservas de laboratorio
pJJ247	$dsbA$ y $dsbC$ de <i>E. coli</i> bajo el control del promotor tac en un vector derivado de pACYC, Km ^r	Reservas de laboratorio
pBR-STIIHc 1.0-PhoA	<i>E. coli</i> $BssHIII$ -ssSTII TIRv.1 fusionada a $\Delta(1-22)$ PhoA en pPho41	Este estudio
pBR-STIIHc2.41-PhoA	<i>E. coli</i> $BssHIII$ -ssSTII TIRv.2 fusionada a $\Delta(1-22)$ PhoA en pPho41	Este estudio
pBR-STIIHc3.38-PhoA	<i>E. coli</i> $BssHIII$ -ssSTII TIRv.3 fusionada a $\Delta(1-22)$ PhoA en pPho41	Este estudio
pBR-STIIHc4.60-PhoA	<i>E. coli</i> $BssHIII$ -ssSTII TIRv.4 fusionada a $\Delta(1-22)$ PhoA en pPho41	Este estudio
pBR-STIIHc5.34-PhoA	<i>E. coli</i> $BssHIII$ -ssSTII TIRv.5 fusionada a $\Delta(1-22)$ PhoA en pPho41	Este estudio
pBR-STIIHc6.52-PhoA	<i>E. coli</i> $BssHIII$ -ssSTII TIRv.6 fusionada a $\Delta(1-22)$ PhoA en pPho41	Este estudio
pBR-STIIHc8.36-PhoA	<i>E. coli</i> $BssHIII$ -ssSTII TIRv.8 fusionada a $\Delta(1-22)$ PhoA en pPho41	Este estudio
pBR-STIIlc1.0-PhoA	<i>E. coli</i> $MluI$ -ssSTII TIRv.1 fusionada a $\Delta(1-22)$ PhoA en pPho41	Este estudio
pBR-STIIlc2.74-PhoA	<i>E. coli</i> $MluI$ -ssSTII TIRv.2 fusionada	Este estudio

ES 2 636 971 T3

pBR-STIIc3.72-PhoA	<i>E. coli</i> <i>Mlul</i> -ssSTII TIRv.3 fusionada a $\Delta(1-22)$ PhoA en pPho41	Este estudio
pBR-DsbAHc1.48-PhoA	<i>E. coli</i> <i>BssHII</i> -ssDsbA TIRv.1 fusionada a $\Delta(1-22)$ PhoA en pPho41	Este estudio
pBR-DsbAHc2.WT-PhoA	<i>E. coli</i> <i>BssHII</i> -ssDsbA TIRv.2 fusionada a $\Delta(1-22)$ PhoA en pPho41	Este estudio
pBR-DsbAHc3.79-PhoA	<i>E. coli</i> <i>BssHII</i> -ssDsbA TIRv.3 fusionada a $\Delta(1-22)$ PhoA en pPho41	Este estudio
pBR-DsbAHc7.72-PhoA	<i>E. coli</i> <i>BssHII</i> -ssDsbA TIRv.7 fusionada a $\Delta(1-22)$ PhoA en pPho41	Este estudio
pBR-DsbALc1.WT-PhoA	<i>E. coli</i> <i>Mlul</i> -ssDsbA TIRv.1 fusionada a $\Delta(1-22)$ PhoA en pPho41	Este estudio
pBR-DsbALc2.3-PhoA	<i>E. coli</i> <i>Mlul</i> -ssDsbA TIRv.2 fusionada a $\Delta(1-22)$ PhoA en pPho41	Este estudio
pBR-DsbALc3.37-PhoA	<i>E. coli</i> <i>Mlul</i> -ssDsbA TIRv.3 fusionada a $\Delta(1-22)$ PhoA en pPho41	Este estudio
pBR-PhoAHc1.70-PhoA	<i>E. coli</i> <i>BssHII</i> -ssDsbA TIRv.1 fusionada a $\Delta(1-22)$ PhoA en pPho41	Este estudio
pBR-PhoAHc2.64-PhoA	<i>E. coli</i> <i>BssHII</i> -ssDsbA TIRv.2 fusionada a $\Delta(1-22)$ PhoA en pPho41	Este estudio
pBR-PhoAHc3.WT-PhoA	<i>E. coli</i> <i>BssHII</i> -ssDsbA TIRv.3 fusionada a $\Delta(1-22)$ PhoA en pPho41	Este estudio
pBR-PhoAHc4.67-PhoA	<i>E. coli</i> <i>BssHII</i> -ssDsbA TIRv.4 fusionada a $\Delta(1-22)$ PhoA en pPho41	Este estudio
pBR-PhoAHc5.71-PhoA	<i>E. coli</i> <i>BssHII</i> -ssDsbA TIRv.5 fusionada a $\Delta(1-22)$ PhoA en pPho41	Este estudio
pBR-PhoAHc6.77-PhoA	<i>E. coli</i> <i>BssHII</i> -ssPhoA TIRv.6 fusionada a $\Delta(1-22)$ PhoA en pPho41	Este estudio
pBR-PhoALc1.104-PhoA	<i>E. coli</i> <i>Mlul</i> -ssPhoA TIRv.1 fusionada a $\Delta(1-22)$ PhoA en pPho41	Este estudio
pBR-PhoAXb2.41-PhoA	<i>E. coli</i> <i>XbaI</i> -ssPhoA TIRv.2 fusionada a $\Delta(1-22)$ PhoA en pPho41	Este estudio
pBR-PhoAXb3.WT-PhoA	<i>E. coli</i> <i>XbaI</i> -ssPhoA TIRv.3 fusionada a $\Delta(1-22)$ PhoA en pPho41	Este estudio
pBR-PhoAXb5.53-PhoA	<i>E. coli</i> <i>XbaI</i> -ssPhoA TIRv.5 fusionada a $\Delta(1-22)$ PhoA en pPho41	Este estudio
pBR-PhoAXb6.15-PhoA	<i>E. coli</i> <i>XbaI</i> -ssPhoA TIRv.6 fusionada a $\Delta(1-22)$ PhoA en pPho41	Este estudio
pBR-PhoAXb7.1-PhoA	<i>E. coli</i> <i>XbaI</i> -ssPhoA TIRv.7 fusionada a $\Delta(1-22)$ PhoA en pPho41	Este estudio
pBR-PhoAXb8.24-PhoA	<i>E. coli</i> <i>XbaI</i> -ssPhoA TIRv.8 fusionada a $\Delta(1-22)$ PhoA en pPho41	Este estudio
pBR-PhoAXb10.23-PhoA	<i>E. coli</i> <i>XbaI</i> -ssPhoA TIRv.10 fusionada a $\Delta(1-22)$ PhoA en pPho41	Este estudio

ES 2 636 971 T3

pBR-MalEHc1.92-PhoA	pPho41 <i>E. coli</i> BssHII-ssMalE TIRv.1 fusionada a $\Delta(1-22)$ PhoA en pPho41		Este estudio
pBR-MalEHc2.100-PhoA	<i>E. coli</i> BssHII-ssMalE TIRv.2 fusionada a $\Delta(1-22)$ PhoA en pPho41		Este estudio
pBR-MalELc1.97-PhoA	<i>E. coli</i> MluI-ssMalE TIRv.1 fusionada a $\Delta(1-22)$ PhoA en pPho41		Este estudio
pBR-MalELc2.123-PhoA	<i>E. coli</i> MluI-ssMalE TIRv.2 fusionada a $\Delta(1-22)$ PhoA en pPho41		Este estudio
pBR-MalEXb1.WT-PhoA	<i>E. coli</i> XbaI-ssMalE TIRv.1 fusionada a $\Delta(1-22)$ PhoA en pPho41		Este estudio
pBR-MalEXb2.15-PhoA	<i>E. coli</i> XbaI-ssMalE TIRv.2 fusionada a $\Delta(1-22)$ PhoA en pPho41		Este estudio
pBR-MalEXb3.12-PhoA	<i>E. coli</i> XbaI-ssMalE TIRv.3 fusionada a $\Delta(1-22)$ PhoA en pPho41		Este estudio
pBR-MalEXb5.37-PhoA	<i>E. coli</i> XbaI-ssMalE TIRv.5 fusionada a $\Delta(1-22)$ PhoA en pPho41		Este estudio
pBR-MalEXb6.4-PhoA	<i>E. coli</i> XbaI-ssMalE TIRv.6 fusionada a $\Delta(1-22)$ PhoA en pPho41		Este estudio
pBR-MalEXb7.25-PhoA	<i>E. coli</i> XbaI-ssMalE TIRv.7 fusionada a $\Delta(1-22)$ PhoA en pPho41		Este estudio
pBR-MalEXb8.13-PhoA	<i>E. coli</i> XbaI-ssMalE TIRv.8 fusionada a $\Delta(1-22)$ PhoA en pPho41		Este estudio
pBR-MalEXb11.34-PhoA	<i>E. coli</i> XbaI-ssMalE TIRv.11 fusionada a $\Delta(1-22)$ PhoA en pPho41		Este estudio
pBR-SS-5D5-1.1	STII TIRv.1 fusionada a 5D5 Hc, STII TIRv.1 fusionada a 5D5 Lc		Este estudio
pBR-SS-5D5-1.2	STII TIRv.1 fusionada a 5D5 Hc, STII TIRv.2 fusionada a 5D5 Lc		Este estudio
pBR-SS-5D5-2.1	STII TIRv.2 fusionada a 5D5 Hc, STII TIRv.1 fusionada a 5D5 Lc		Este estudio
pBR-SS-5D5-2.2	STII TIRv.2 fusionada a 5D5 Hc, STII TIRv.2 fusionada a 5D5 Lc		Este estudio
pBR-SM-5D5-1.1	STII TIRv.1 fusionada a 5D5 Hc, MalE TIRv.1 fusionada a 5D5 Lc		Este estudio
pBR-SM-5D5-1.2	STII TIRv.1 fusionada a 5D5 Hc, MalE TIRv.2 fusionada a 5D5 Lc		Este estudio
pBR-SM-5D5-2.1	STII TIRv.2 fusionada a 5D5 Hc, MalE TIRv.1 fusionada a 5D5 Lc		Este estudio
pBR-SM-5D5-2.2	STII TIRv.2 fusionada a 5D5 Hc, MalE TIRv.2 fusionada a 5D5 Lc		Este estudio
pBR-SD-5D5-1.1	STII TIRv.1 fusionada a 5D5 Hc, DsbA TIRv.1 fusionada a 5D5 Lc		Este estudio
pBR-SD-5D5-1.2	STII TIRv.1 fusionada a 5D5 Hc, DsbA TIRv.2 fusionada a 5D5 Lc		Este estudio
pBR-SD-5D5-2.1	STII TIRv.2 fusionada a 5D5 Hc, DsbA TIRv.1 fusionada a 5D5 Lc		Este estudio
pBR-SD-5D5-2.2	STII TIRv.2 fusionada a 5D5 Hc, DsbA TIRv.2 fusionada a 5D5 Lc		Este estudio
pBR-SP-5D5-1.1	STII TIRv.1 fusionada a 5D5 Hc, PhoA TIRv.1 fusionada a 5D5 Lc		Este estudio
pBR-SP-5D5-1.2	STII TIRv.1 fusionada a 5D5 Hc,		Este estudio

pBR-DP-5D5-2.2	PhoA TIRv.1 fusionada a 5D5 Lc DsbA TIRv.2 fusionada a 5D5 Hc,	Este estudio
pBR-PS-5D5-1.1	PhoA TIRv.2 fusionada a 5D5 Lc PhoA TIRv.1 fusionada a 5D5 Hc,	Este estudio
pBR-PS-5D5-1.2	STII TIRv.1 fusionada a 5D5 Lc PhoA TIRv.1 fusionada a 5D5 Hc,	Este estudio
pBR-PS-5D5-2.1	STII TIRv.2 fusionada a 5D5 Lc PhoA TIRv.2 fusionada a 5D5 Hc,	Este estudio
pBR-PS-5D5-2.2	STII TIRv.1 fusionada a 5D5 Lc PhoA TIRv.2 fusionada a 5D5 Hc,	Este estudio
pBR-PM-5D5-1.1	STII TIRv.2 fusionada a 5D5 Lc PhoA TIRv.1 fusionada a 5D5 Hc,	Este estudio
pBR-PM-5D5-1.2	MalE TIRv.1 fusionada a 5D5 Lc PhoA TIRv.1 fusionada a 5D5 Hc,	Este estudio
pBR-PM-5D5-2.1	MalE TIRv.2 fusionada a 5D5 Lc PhoA TIRv.2 fusionada a 5D5 Hc,	Este estudio
pBR-PM-5D5-2.2	MalE TIRv.1 fusionada a 5D5 Lc PhoA TIRv.2 fusionada a 5D5 Hc,	Este estudio
pBR-PD-5D5-1.1	MalE TIRv.2 fusionada a 5D5 Lc PhoA TIRv.1 fusionada a 5D5 Hc,	Este estudio
pBR-PD-5D5-1.2	DsbA TIRv.1 fusionada a 5D5 Lc PhoA TIRv.1 fusionada a 5D5 Hc,	Este estudio
pBR-PD-5D5-2.1	DsbA TIRv.2 fusionada a 5D5 Lc PhoA TIRv.2 fusionada a 5D5 Hc,	Este estudio
pBR-PD-5D5-2.2	DsbA TIRv.1 fusionada a 5D5 Lc PhoA TIRv.2 fusionada a 5D5 Hc,	Este estudio
pBR-PP-5D5-1.1	DsbA TIRv.2 fusionada a 5D5 Lc PhoA TIRv.1 fusionada a 5D5 Hc,	Este estudio
pBR-PP-5D5-1.2	PhoA TIRv.1 fusionada a 5D5 Lc PhoA TIRv.1 fusionada a 5D5 Hc,	
pBR-PP-5D5-2.1	PhoA TIRv.2 fusionada a 5D5 Lc PhoA TIRv.2 fusionada a 5D5 Hc,	
pBR-PP-5D5-2.2	PhoA TIRv.1 fusionada a 5D5 Lc PhoA TIRv.2 fusionada a 5D5 Hc,	
	PhoA TIRv.2 fusionada a 5D5 Lc	

Hc=cadena pesada

Lc=cadena ligera

5 5D5=clon 5D5.v2 de anticuerpo monoclonal anti-c-met. Las secuencias de la cadena pesada y ligera de 5D5.v2 se muestran en la figura 7 y también se describen, por ejemplo, en el documento WO2006/015371; Jin *et al.*, Cancer Res (2008) 68:4360.

10 **Tabla 2:** Variantes de secuencia señal

Cursiva en negrita=secuencia que ha sido variada (es decir, los primeros seis aminoácidos después del codón de iniciación)

15 **Cursiva**=sitio de restricción para *BssHII*, *MluI* o *XbaI*

Gen original	ID de clon	Genotipo/fenotipo pertinente	Fuerza de TIR relativa	SEQ ID NO:
<i>stII</i>	SH1.2	<i>GCGCGCATTATGAAGAAAAACATCGCTT</i> <i>TT</i> CTTCTTGCATCTATGTTTCGTTTTTCTAT T GCTACAAACGCTTACGCT	0,99 ± 0,07	1

SH2.41	<i>GCGCGCATTATGAAAAAAAAATATAGCGT</i> <i>T</i> <i>TCTTCTTGCATCTATGTTTCGTTTTTTCTA</i> <i>TTGCTACAAACGCTTACGCT</i>	$1,94 \pm 0,05$	2
SH3.38	<i>GCGCGCATTATGAAAAAAAAACATTGCCT</i> <i>TTC</i> <i>TTCTTGCATCTATGTTTCGTTTTTTCTATT</i> <i>GC</i> <i>TACAAACGCTTACGCT</i>	$2,9 \pm 0,2$	3
SH4.60	<i>GCGCGCATTATGAAAAAGAATATTGCCT</i> <i>TT</i> <i>CTTCTTGCATCTATGTTTCGTTTTTTCTAT</i> <i>T</i> <i>GCTACAAACGCTTACGCT</i>	$4,1 \pm 0,1$	4
SH5.34	<i>GCGCGCATTATGAAGAAAAATATTGCAT</i> <i>TC</i> <i>CTTCTTGCATCTATGTTTCGTTTTTTCTA</i> <i>TTGCTACAAACGCTTACGCT</i>	$5,0 \pm 0,2$	5
SH6.52	<i>GCGCGCATTATGAAAAAAAAATATTGCAT</i> <i>TTCTTCTTGCATCTATGTTTCGTTTTTTCT</i> <i>ATTGCTACAAACGCTTACGCT</i>	$5,9 \pm 0,2$	6
SH8.36	<i>GCGCGCATTATGAAAAAAAAATATTGCTT</i> <i>TTCTTCTTGCATCTATGTTTCGTTTTTTCT</i> <i>ATTGCTACAAACGCTTACGCT</i>	$7,7 \pm 0,1$	7
SL1.2	<i>ACGCGTATTATGAAGAAAAACATCGCTT</i> <i>TTCTTCTTGCATCTATGTTTCGTTTTTTCT</i> <i>ATTGCTACAAACGCTTACGCT</i>	$0,75 \pm 0,07$	8
SL2.74	<i>ACGCGTATTATGAAAAAGAATATCGCCT</i> <i>TTCTTCTTGCATCTATGTTTCGTTTTTTCT</i> <i>ATTGCTACAAACGCTTACGCT</i>	$1,9 \pm 0,2$	9
SL3.72	<i>ACGCGTATTATGAAAAAAAAATATTGCTT</i> <i>TTCTTCTTGCATCTATGTTTCGTTTTTTCT</i> <i>ATTGCTACAAACGCTTACGCT</i>	$2,9 \pm 0,2$	10

ES 2 636 971 T3

<i>malE</i>	MH1.92	<i>GCGCGCATTATGAAAATTAAGACTGGAG CACGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC GACGATGATGTTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC</i>	1,1 ± 0,1	11
	MH2.100	<i>GCGCGCATTATGAAGATTA AAAACCGGAG CCC GCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC GACGATGATGTTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC</i>	1,9 ± 0,1	12
	ML1.97	<i>ACGCGTATTATGAAGATCAAGACAGGCG CGCGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC GACGATGATGTTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC</i>	1,1 ± 0,1	13
	ML2.123	<i>ACGCGTATTATGAAGATCAAGACAGGGG CCC GCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC GACGATGATGTTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC</i>	2,0 ± 0,1	14
	MX1.wt	<i>TCTAGAATTATGAAAATAAAAACAGGTG CACGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC GACGATGATGTTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC</i>	1,1 ± 0,1	15
	MX2.15	<i>TCTAGAATTATGAAAATTAAGACGGGGG CGCGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC GACGATGATGTTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC</i>	2,0 ± 0,1	16
	MX3.12	<i>TCTAGAATTATGAAAATCAAAAACCGGCG CTCGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC GACGATGATGTTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC</i>	3,01 ± 0,09	17
	MX5.37	<i>TCTAGAATTATGAAGATCAAGACTGGAG CTCGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC GACGATGATGTTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC</i>	5,0 ± 0,2	18
	MX6.4	<i>TCTAGAATTATGAAAATAAAGACGGGAG CTCGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC GACGATGATGTTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC</i>	5,8 ± 0,3	19

ES 2 636 971 T3

	MX7.25	<i>TCTAGAATTATGAAGATAAAGACTGGTG CGCGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC GACGATGATGTTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC</i>	7,1 ± 0,2	20
	MX8.13	<i>TCTAGAATTATGAAAATTAAGACGGGAG CACGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC GACGATGATGTTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC</i>	8,2 ± 0,3	21
	MX11.34	<i>TCTAGAATTATGAAGATTAAGACGGGCG CTCGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAC GACGATGATGTTTTCCGCCTCGGCTCTC GCC</i>	10,8 ± 0,5	22
<i>phoA</i>	PH1.70	<i>GCGCGCATTATGAAACAATCCACGATTG CCCTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTAC CCCTGTGACAAAAGCC</i>	1,14 ± 0,05	23
	PH2.64	<i>GCGCGCATTATGAAACAGTCGACGATCG CACTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTAC CCCTGTGACAAAAGCC</i>	1,93 ± 0,03	24
	PH3.wt	<i>GCGCGCATTATGAAACAAAGCACTATTG CACTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTAC CCCTGTGACAAAAGCC</i>	2,8 ± 0,1	25
	PH4.67	<i>GCGCGCATTATGAAGCAATCTACTATCG CTCTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTAC CCCTGTGACAAAAGCC</i>	3,7 ± 0,1	26
	PH5.71	<i>GCGCGCATTATGAAGCAATCAACTATCG CACTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTAC CCCTGTGACAAAAGCC</i>	5,1 ± 0,3	27
	PH6.77	<i>GCGCGCATTATGAAACAATCTACTATTG CACTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTAC CCCTGTGACAAAAGCC</i>	6,0 ± 0,4	28
	PL1.104	<i>ACGCGTATTATGAAACAGTCTACTATCG CTCTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTAC CCCTGTGACAAAAGCC</i>	1,00 ± 0,07	29

ES 2 636 971 T3

	PX2.41	<i>TCTAGAATTATGAAGCAGAGTACGATTG CTCTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTAC CCCTGTGACAAAAGCC</i>	2,0 ± 0,1	30
	PX3.wt	<i>TCTAGAATTATGAAACAAAGCACTATTG CACTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTAC CCCTGTGACAAAAGCC</i>	3,39 ± 0,09	31
	PX5.53	<i>TCTAGAATTATGAAGCAATCCACAATAG CTCTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTAC CCCTGTGACAAAAGCC</i>	4,9 ± 0,1	32
	PX6.15	<i>TCTAGAATTATGAAACAATCCACCATTGC CCTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTACC CCTGTGACAAAAGCC</i>	5,9 ± 0,2	33
	PX8.24	<i>TCTAGAATTATGAAACAGTCTACTATCGC GCTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTACC CCTGTGACAAAAGCC</i>	8,0 ± 0,1	34
	PX10.23	<i>TCTAGAATTATGAAACAATCCACAATCG CACTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTAC CCCTGTGACAAAAGCC</i>	10,0 ± 0,4	35
<i>dsbA</i>	DH1.48	<i>GCGCGCATTATGAAAAAATTTGGCTCG CCCTGGCTGGTTTAGTTTTAGCGTTTAG CGCATCGGCG</i>	0,80 ± 0,03	36
	DH2.wt	<i>GCGCGCATTATGAAAAAGATTTGGCTGG CGCTGGCTGGTTTAGTTTTAGCGTTTAG CGCATCGGCG</i>	1,89 ± 0,09	37
	DH3.79	<i>GCGCGCATTATGAAAAAGATATGGCTGG CTCTGGCTGGTTTAGTTTTAGCGTTTAG CGCATCGGCG</i>	2,92 ± 0,08	38
	DH7.72	<i>GCGCGCATTATGAAAAAGATATGGTTGG CTCTGGCTGGTTTAGTTTTAGCGTTTAG CGCATCGGCG</i>	6,7 ± 0,2	39
	DL1.wt	<i>ACGCGTATTATGAAAAAGATTTGGCTGG CGCTGGCTGGTTTAGTTTTAGCGTTTAG CGCATCGGCG</i>	1,0 ± 0,1	40

DL2.3	ACGCGTATTATGAAGAAAATTTGGTTGG CTCTGGCTGGTTTAGTTTTAGCGTTTAG CGCATCGGCG	1,87 ± 0,09	41
DL3.37	ACGCGTATTATGAAGAAGATTTGGTTA GCACTGGCTGGTTTAGTTTTAGCGTTTA GCGCATCGGCG	2,6 ± 0,1	42

Leyenda: La convención para los nombres de clones es la siguiente: XY.n.^o = X designa la secuencia señal (S=STH, P=PhoA y así sucesivamente); Y designa la secuencia de restricción (H quiere decir el sitio de restricción para Bssh11, X designa el sitio para XbaI, L designa el sitio de restricción para MluI) y n.^o designa la fuerza de TIR (por ejemplo, 1=TIR de 1, 7,72=TIR de 7,72). wt=secuencia de TIR natural.

5

Tabla 3: Valores de fermentación de puntos de tiempo finales

Secuencia señal de cadena pesada (TIR)/secuencia señal de cadena ligera (TIR)	DsbA/C (+/-)	Valor de Ab de longitud completa relativo*
STI I(1)/STII (1)	-	1,0
STII (1)/STII (1)	+	4,9
STII (1)/PhoA (1)	-	0,6
STII (1)/PhoA (1)	+	5,6
STII (2)/STII (2)	+	0,8
MalE (1)/STII (1)	-	0,4
MalE (1)/PhoA (1)	-	0,4
MalE (1)/PhoA (1)	+	1,5
DsbA (1)/STII (1)	-	1,4
DsbA (1)/STII (1)	+	3,3
DsbA (1)/STII (2)	+	3,6
DsbA (2)/STH (1)	-	0,9
DsbA (1)/MalE (1)	-	1,7
DsbA (1)/MalE (1)	+	10,1
DsbA (1)/DsbA (1)	-	1,9
DsbA (1)/DsbA (1)	+	12,7
DsbA (2)/DsbA (2)	+	10,6
DsbA (1)/PhoA (1)	-	1,9
DsbA (1)/PhoA (1)	+	10,0
DsbA (2)/PhoA (1)	-	1,5

DsbA (2)/PhoA (1)	+	6,7
PhoA (1)/STII (1)	-	0,3

*Todas las muestras normalizadas al valor de la muestra STII (1)/STII (1), que comprendía anticuerpo de longitud completa expresado sin las chaperonas DsbA y DsbC presentes.

5 Resultados/análisis

Se han desarrollado novedosas colecciones de péptidos señal de la región de iniciación traduccional (TIR) variante (figura 2, tabla 2) para péptidos señal que representan dos de las vías de secreción principales para el transporte a través de la membrana interna en *E. coli*: sec (PhoA, MalE) y SRP (DsbA, STII). Cada colección comprende un panel de vectores que comprenden TIR variantes de diferentes fuerzas traduccionales, lo que proporciona un medio mediante el que se ajusta fácilmente el nivel de traducción para una proteína dada de interés. Los péptidos señal de la proteína periplásmica de unión a maltosa (MalE) y fosfatasa alcalina (PhoA) dirigen la translocación desde el citoplasma al periplasma de una manera postraduccional con ayuda del motor molecular SecA. Los péptidos señal de la enterotoxina termoestable II (stII) y proteína de intercambio tiol:disulfuro (DsbA) dirigen la translocación de una manera cotraduccional con ayuda de la partícula de reconocimiento de señal (SRP) (figura 1).

Durante la construcción de la colección, se insertó un sitio de restricción para *BssHII*, *MluI* o *XbaI* nueve pares de bases (pb) en dirección 5' del codón de iniciación del gen original. Dependiendo del tipo de sitio de restricción presente, se observaron diferentes intervalos de fuerzas de TIR (figura 2). En general, las secuencias que llevaban un sitio para *MluI* presentaron el intervalo más pequeño de fuerzas de TIR (~1-3), mientras que un sitio para *BssHII* en dirección 5' permitió un intervalo moderado de fuerzas de TIR (~1-8) y un sitio para *XbaI* el intervalo más alto (~1-11). Estos sitios de restricción presentes en la región no traducida están abarcados en la TIR (3). Aunque no se pueda descartar que puedan existir variantes de TIR más altas para cualquiera de las combinaciones péptido señal/sitio de restricción examinadas, estos resultados parecen ser representativos de la media de fuerzas de TIR de cada colección de péptidos señal examinada.

Se construyó una serie de plásmidos para ilustrar el efecto del nivel traduccional y péptido señal en la secreción. En cada caso, el gen de interés se insertó en dirección 3' del promotor de *phoA*, Shine-Dalgarno con *trp* y una secuencia señal que poseía una fuerza de TIR relativa diferente. Después de la transformación e inducción del promotor de *phoA* a la escala de matraz agitado, los lisados de células enteras que expresaban la proteína heterógena, el clon 5D5.v2 de anticuerpo monoclonal anti-c-met, se analizaron mediante SDS-PAGE. En estos experimentos, se varió la TIR de cadena pesada o bien de cadena ligera, manteniéndose invariable la correspondiente cadena ligera o cadena pesada, respectivamente.

La figura 3 muestra los resultados de la manipulación de péptidos señal de cadena pesada. Cuando se sometió a prueba con un anticuerpo específico de α -Fc, la variante uno de TIR de cadena pesada-ssDsbA dio un claro incremento del anticuerpo de longitud completa (FL-Ab), así como dímero de cadena ligera-pesada (HL) y especies de cadena pesada-pesada-ligera (HHL), frente a las demás variantes de péptido señal (figura 3A, transferencia de parte superior). Un examen de la cadena pesada total de estas muestras reveló niveles relativamente similares entre todas las fusiones de péptidos señal examinadas (figura 3A, transferencia de parte inferior). Cuando se visualizó la cadena ligera con un anticuerpo α -kLc, se obtuvieron resultados similares, presentando de nuevo la variante uno de TIR de cadena pesada-ssDsbA el nivel más alto de FL-Ab (figura 3B, transferencia de parte superior). Sorprendentemente, la muestra de fusión de una cadena pesada de TIR de DsbA carecía de las especies de masa más baja —el dímero de cadena ligera-ligera (LL) y la cadena ligera libre previstos— observadas en las demás muestras. Generalmente, en el caso en el que las señales postraduccionales (MalE, PhoA) se fusionen a la cadena pesada, la cadena ligera total parece estar más expresada que en los casos de las fusiones de péptidos señal cotraduccionales (STII, DsbA) (figura 3B, transferencia de parte inferior). En general, se observó la siguiente jerarquía con respecto al péptido señal fusionado a la cadena pesada y producción de anticuerpos de longitud completa: DsbA>STII>MalE>PhoA. Notablemente, la TIR variante de DsbA dio como resultado una expresión incrementada (por ejemplo, del anticuerpo de longitud completa) en comparación con la TIR variante de STII, aunque la fuerza de TIR relativa no cambió (es decir, ambas TIR tenían fuerza de uno).

La figura 4 muestra los resultados de la manipulación de péptidos señal de cadena ligera. El cambio del péptido señal de cadena ligera desde una variante uno de TIR de STII a una variante uno o bien dos de TIR de PhoA produjo un notable incremento en el valor de FL-Ab (figura 4, transferencia de parte superior). La modificación del péptido señal fusionado a la cadena ligera no parecía afectar a la cantidad total de cadena pesada expresada (figura 4, transferencia de parte central), pero sí alteró significativamente la cantidad total de cadena ligera presente, apareciendo la acumulación más grande de cadena ligera procesada en muestras con una variante dos de TIR de STII o DsbA fusionada a la cadena ligera (figura 4, transferencia de parte inferior). Al fusionar a los péptidos señal postraduccionales, se observaron dos bandas en las muestras de cadenas ligeras totales, indicativas de cadena ligera no procesada. En general, se observó la siguiente jerarquía con respecto a las fusiones de péptidos señal a la

cadena ligera y producción de anticuerpos de longitud completa: PhoA \geq MalE > STII > DsbA.

El ensamblaje de comprobación de especies de anticuerpos con el tiempo a partir de fermentaciones de 10 l reveló resultados similares a los experimentos con matraces agitados mostrados en las figuras 3 y 4. Se observó la cantidad más alta de FL-Ab a partir de muestras con una variante de TIR derivada de DsbA fusionada a la cadena pesada y un péptido señal derivado de DsbA o bien PhoA fusionado a la cadena ligera (figura 5, transferencia de parte superior). Estas muestras también presentaron más especies de dímeros de HHL y HL que la fusión de cadena pesada uno de TIR de STE. Adicionalmente, el dímero de LL y la cadena ligera libre fueron visibles fácilmente en muestras con el péptido señal uno de TIR de PhoA unido a la cadena ligera. El examen de muestras de proteínas totales reducidas reveló que la fusión de péptidos señal de DsbA dio como resultado más cadena pesada total que la fusión de STII en condiciones de inducción de la expresión de la fermentación (figura 5, transferencia de parte central). De manera similar, para las fusiones de péptidos señal de cadena ligera, se observó una acumulación más alta de cadena ligera con las fusiones de péptidos señal uno de TIR de DsbA que la uno de TIR de STII (figura 5, transferencia de parte inferior). Sin embargo, se observó la acumulación más alta de cadena ligera con la fusión de péptidos señal uno de TIR de PhoA. Las dos bandas observadas en las muestras de cadenas ligeras totales tomadas a partir de los matraces agitados aparecen como una única banda en las muestras de fermentación, indicativa de que la cadena ligera se procesa más eficazmente durante la fermentación de 10 l.

Se fusionaron diferentes péptidos señal al dominio maduro del gen *phoA* de *E. coli* (mPhoA) para examinar adicionalmente las diferencias en los niveles de expresión de la cadena ligera o pesada totales cuando se fusionan a las variantes de TIR derivadas de STII o bien DsbA y se expresaron en cultivos en matraces agitados en condiciones de inducción. Se observaron efectos similares en los niveles de expresión de la cadena ligera y pesada totales (figura 6). Cuando se indujo la expresión de proteínas, la expresión de mPhoA mostró un aumento simultáneo con una fuerza de TIR incrementada para las fusiones de péptidos señal de DsbA, hasta una fuerza de TIR de siete (la fuerza de TIR más alta usada en este estudio). Se observó un aumento similar en la expresión de mPhoA con un aumento de la fuerza de TIR para las fusiones de péptidos señal STE hasta alcanzar una fuerza de TIR de seis u ocho, por lo que la cantidad de mPhoA parece disminuir en comparación con el mPhoA presente en la muestra STE TIR tres. Sorprendentemente, se produjo más cadena pesada y ligera usando una TIR uno de fuerza de DsbA que usando una TIR uno de fuerza de STE, y la translocación accionada por STII de PhoA alcanzó una cantidad máxima a una concentración de proteínas total más baja que la translocación accionada por DsbA de PhoA. Además, el cambio de la secuencia de TIR desde STII a DsbA incrementó el intervalo dinámico del efecto de TIR.

Las muestras de fermentaciones de 10 l se analizaron para determinar los valores de anticuerpos usando un ensayo de HPLC basado en proteína-L (tabla 3). Los datos de HPLC estaban en buena concordancia con los niveles de valores cualitativos revelados mediante análisis de inmunoelectrotransferencia (figuras 3, 4). Cuando se cambió la secuencia señal de cadena pesada desde una variante de TIR derivada de STII a una variante de TIR derivada de DsbA, se incrementaron los valores de FL-Ab ~40-90 %. Los valores más altos se produjeron cuando una fusión de cadena pesada uno de DsbA se agrupó con una cadena ligera fusionada a los péptidos señal de TIR de DsbA, MalE o bien PhoA. Se generaron los valores más altos cuando la cadena ligera se fusionó a los péptidos señal de TIR de MalE o PhoA.

Por el contrario, el valor de FL-Ab cayó cuando se fusionó un péptido señal postraducciona a la cadena pesada, mostrando una fusión de péptidos señal uno de TIR de PhoA y uno de TIR de MalE un descenso de un 70 % y un 60 % en el valor, respectivamente. Se concluye que la expresión de la cadena pesada se optimizó cuando se usó un péptido señal cotraducciona (por ejemplo, DsbA) para accionar la traducción.

Se ha sometido a prueba el efecto de la sobreexpresión de chaperonas. La sobreexpresión de las chaperonas DsbA y DsbC (a veces denominadas DsbA/C en el presente documento) potenció los beneficios del péptido señal de DsbA fusionado a la cadena pesada y las señales de DsbA, PhoA o MalE fusionadas a la cadena ligera. Cuando se comparó la expresión del FL-Ab mediante una señal uno de TIR de STII fusionada a las cadenas pesada y ligera (SS1.1 + chaperonas), se observó un incremento aproximado de 2 a 2,5 veces en el valor de FL-Ab con una fusión de cadena pesada uno de TIR de DsbA acoplada con una fusión de cadena ligera uno de TIR de MalE, PhoA o DsbA.

Se examinó la relación entre el péptido señal fusionado a la cadena ligera y cadena pesada de un anticuerpo y los valores de anticuerpos finales. Los valores de anticuerpos completamente ensamblados (FL-Ab) fueron más altos cuando se fusionó un péptido señal cotraducciona (por ejemplo, DsbA o STII) al extremo N de la cadena pesada, dando como resultado las variantes de TIR derivadas de DsbA el máximo observado en los rendimientos de FL-Ab. De esta manera, las variantes de TIR de DsbA pueden permitir niveles de traducción más altos de la proteína pasajera que las variantes de TIR de STII en condiciones de inducción, dando como resultado de este modo niveles de expresión más altos de proteína pasajera procesada. Por el contrario, los valores de anticuerpos cayeron drásticamente cuando cualquier péptido señal postraducciona (es decir, MalE o PhoA) se fusionó a la cadena pesada. Este efecto puede ser debido a la proteólisis o puede ser debido a una vía de plegamiento diferente seguida de la cadena pesada (6). Un examen de los niveles de la cadena pesada totales a partir de muestras que expresan un péptido señal uno de TIR de PhoA o bien MalE fusionado a la cadena pesada reveló un ligero cambio en la masa aparente, potencialmente debido a la presencia de cadena pesada no procesada (figura 3A, transferencia de parte

inferior).

La fusión de variantes de TIR derivadas de MalE o derivadas de PhoA de péptido señal postraducciona a la cadena ligera dio como resultado una gran acumulación de cadena ligera procesada y valores de anticuerpos incrementados frente a la translocación mediada por STII durante la fermentación de 10 l (figura 5, transferencia de parte inferior). También se observaron rendimientos incrementados tanto de la cadena ligera como también FL-Ab cuando la cadena ligera se translocó por las variantes de TIR de DsbA en comparación con la cadena ligera translocada por las variantes de TIR de STII. Sin embargo, la cantidad de cadena ligera total expresada a partir de la variante uno de TIR de DsbA no fue tan buena como la de las variantes uno de TIR de PhoA o MalE. Curiosamente, el análisis de muestras tomadas con el tiempo a partir de fermentaciones de 10 l indican que los valores de FL-Ab de las tandas con la cadena ligera fusionada a las variantes de TIR de MalE, DsbA o bien PhoA continuaron aumentando con el tiempo mientras que las fusiones a las variantes de TIR de STII no solo alcanzaron un valor máximo más bajo, sino que alcanzaron ese nivel de valores en un punto de tiempo mucho más temprano (figura 5, transferencia de parte superior). De esta manera, estos datos sugieren que la cadena ligera se puede translocar eficazmente de una manera co- o bien postraducciona, mientras que la cadena pesada requiere translocación cotraducciona para su expresión máxima.

Expresión de un anticuerpo anti-c-met de un brazo: Se evaluó la relación entre el péptido señal fusionado a la cadena ligera, la cadena pesada y Fc de un anticuerpo de un brazo, y los valores de anticuerpos finales. Se construyeron los plásmidos usando secuencias señal de STII con unas TIR de 1 para la cadena ligera, cadena pesada y el polipéptido de Fc, usando la secuencia señal de PhoA con una TIR de 1 (SEQ ID NO: 29) para la cadena ligera y secuencia señal de DsbA con una TIR de 1 (SEQ ID NO: 40) para la cadena pesada y el fragmento Fc; y usando la secuencia señal de PhoA con una TIR de 1 para la cadena ligera y el fragmento Fc y la secuencia señal de DsbA con una TIR de 1 para HC. Los números de valores relativos fueron de muestras de final de tanda y se midieron usando el ensayo de HPLC en fase inversa de proteína L descrito anteriormente. Los valores relativos se normalizaron al valor para el caso en la primera fila de las secuencias señal de STII de la tabla 4 y TIR=1 para LC, HC y Fc sin la coexpresión de DsbA/C.

Los resultados se muestran en la tabla 4. Los valores relativos de anticuerpos de un brazo fueron más altos cuando se fusionó un péptido señal cotraducciona (por ejemplo, DsbA) al extremo N de la cadena pesada, un péptido señal postraducciona (por ejemplo, PhoA) se fusionó al extremo N de la cadena ligera y un péptido señal postraducciona (por ejemplo, PhoA) se fusionó a la región Fc, y la expresión fue en presencia de DsbA/C. En general, se observó la siguiente jerarquía con respecto al péptido señal fusionado a la cadena ligera, cadena pesada y fragmento Fc, y expresión de anticuerpos de un brazo en presencia de DsbA/C: P.D.D > P.D.P> S.S.S. Los niveles de expresión en ausencia de DsbA/C fueron similares en todas las muestras sometidas a prueba, en las que se agregó la mayor parte del anticuerpo secretado al periplasma. La coexpresión de chaperonas de enlaces disulfuro incrementó el anticuerpo plegado producido, revelando de esta manera la expresión de anticuerpos incrementada realizada mediante optimización de TIR.

Tabla 4: Expresión del anticuerpo anti-c-met de un brazo monovalente (MetMAB).

Plásmido	LC, HC, Fc	DsbA/C	Valor relativo
pxCM11H.v2.H.Fc.1.K.2192	STII TIR 1 para Lc, Hc y Fc	-	1,0
pxCM11H.v2.H.Fc.1.K.2192	STII TIR 1 para Lc, Hc y Fc	+	1,7
pPDD. 111.MetMAB	PhoA TIR 1 para Lc, DsbA TIR 1 para Hc y Fc		1,0
pPDD. 111.MetMAB	PhoA TIR 1 para Lc, DsbA TIR 1 para Hc y Fc	+	3,8
pPDP. 111.MetMAB	PhoA TIR 1 para Lc, DsbA TIR 1 para Hc, PhoA TIR para Fc	-	0,7

pPDP. 111.MetMAb	PhoA TIR 1 para Lc, DsbA TIR 1 para Hc, PhoA TIR para Fc	+	2,5
------------------	--	---	-----

Abreviaturas: D=secuencia señal de DsbA P=secuencia señal de PhoA. XXX.n.^o.n.^o.n.^o (por ejemplo, PDP.111) se refiere a la secuencia señal de cadena ligera, secuencia señal de cadena pesada, secuencia señal de Fc, TIR de cadena ligera, TIR de cadena pesada, TIR de Fc usadas en el experimento.

5 En resumen, esta tecnología ofrece un medio novedoso para incrementar los rendimientos de anticuerpos plegados, por ejemplo, en *E. coli*, a través de la manipulación de la expresión de la cadena ligera y la cadena pesada por medio de la selección a partir de un nuevo conjunto de variantes de TIR y adicionalmente mediante el uso de secuencias señal co- y postraduccionales para la cadena ligera y secuencia señal cotraducciona

10 para la cadena pesada. La expresión mejorada de anticuerpos de un brazo que comprenden una cadena pesada, una cadena ligera y una región Fc también se logró usando las variantes de TIR novedosas divulgadas en el presente documento y adicionalmente mediante el uso de secuencias señal co- o postraduccionales para la cadena ligera, dio como resultado una secuencia señal cotraducciona

15 para el polipéptido de Fc. La utilidad de este procedimiento parece ser ampliamente aplicable a una amplia gama de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos que comprenden mutaciones de nudo y hueco), derivados de anticuerpo y producción de proteínas recombinantes basadas en bacterias en conjunto.

Lista parcial de referencias

- 20 1. Simmons, L. C., Reilly, D., Klimowski, L., Raju, T. S., Meng, G., Sims, P., Hong, K., Shields, R. L., Damico, L. A., Rancatore, P., and Yansura, D. G. (2002) *Journal of immunological methods* 263(1-2), 133-147
2. Stemmer, W. P., Morris, S. K., Kautzer, C. R., and Wilson, B. S. (1993) *Gene* 123(1), 1-7
- 25 3. Simmons, L. C., and Yansura, D. G. (1996) *Nature biotechnology* 14(5), 629-634
4. Le Calvez, H., Green, J. M., and Baty, D. (1996) *Gene* 170(1), 51-55
5. Jackson, R. W., and DeMoss, J. A. (1965) *Journal of bacteriology* 90(5), 1420-1425
- 30 6. Kadokura, H., and Beckwith, J. (2009) *Cell* 138(6), 1164-1173

ES 2 636 971 T3

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> GENENTECH INC. *et al.*
- <120> PROCEDIMIENTOS Y COMPOSICIÓN PARA LA SECRECIÓN DE POLIPÉPTIDOS HETERÓGENOS
- 10 <130> P4386R1 WO
- <140>
<141>
- 15 <150> 61/258.565
<151> 05-11-2009
- <160> 68
- 20 <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
<211> 78
<212> ADN
- 25 <213> Secuencia artificial
- <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"
- 30 <400> 1
- gcgcgcatta tgaagaaaaa catcgctttt cttcttgcgcat ctatgttcgct tttttctatt
60
- gctacaaacg cttacgct
78
- 35 <210> 2
<211> 78
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 40 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"
- 45 <400> 2
- gcgcgcatta tgaaaaaaa tatagcgcttt cttcttgcgcat ctatgttcgct tttttctatt
60
- gctacaaacg cttacgct
78

ES 2 636 971 T3

<210> 3
<211> 78
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

10

<400> 3

gcgcgcatta tgaaaaaaaa cattgccttt cttcttgcac ctatgttcgt tttttctatt
60

gctacaaaacg cttacgct
78

15

<210> 4
<211> 78
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

25

<400> 4

gcgcgcatta tgaaaaagaa tattgccttt cttcttgcac ctatgttcgt tttttctatt
60

gctacaaaacg cttacgct
78

30

<210> 5
<211> 78
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

35

<400> 5

40

gcgcgcatta tgaagaaaaa tattgcattc cttcttgcac ctatgttcgt tttttctatt
60

gctacaaaacg cttacgct
78

<210> 6
<211> 78

ES 2 636 971 T3

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
5 <221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

<400> 6
10
gcgcgcatta tgaaaaaaaaa tattgcattt cttcttgcac ctatgttcgt ttttctatt
60
gctacaaacg cttacgct
78

<210> 7
<211> 78
15 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
20 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

<400> 7
gcgcgcatta tgaaaaaaaaa tattgctttt cttcttgcac ctatgttcgt ttttctatt
60
gctacaaacg cttacgct
25 78

<210> 8
<211> 78
<212> ADN
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"
35

<400> 8
acgcgtatta tgaagaaaaa catcgctttt cttcttgcac ctatgttcgt ttttctatt
60
gctacaaacg cttacgct
40 78

<210> 9
<211> 78
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
45

ES 2 636 971 T3

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"
5
<400> 9

acgcgtatta tgaaaaagaa tatcgccttt cttcttgcac ctatgttcgt tttttctatt
60

gctacaaacg cttacgct
78

10 <210> 10
<211> 78
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

20 <400> 10

acgcgtatta tgaaaaaaaa tattgctttt cttcttgcac ctatgttcgt tttttctatt
60

gctacaaacg cttacgct
78

25 <210> 11
<211> 87
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

35 <400> 11

gcgcgatta tgaaaattaa gactggagca cgcacctcg cattatccgc attaacgacg
60

atgatgtttt ccgcctcggc tctcgcc
87

40 <210> 12
<211> 87
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido

ES 2 636 971 T3

sintético"

<400> 12

5 ggcgcgatta tgaagattaa aaccggagcc cgcacacctg cattatccgc attaacgacg
60
atgatgtttt ccgcctcggc tctcgcc
87

<210> 13

<211> 87

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

15 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido
sintético"

<400> 13

acgcgtatta tgaagatcaa gacagggcgc cgcacacctg cattatccgc attaacgacg
60

20 atgatgtttt ccgcctcggc tctcgcc
87

<210> 14

<211> 87

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

30 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido
sintético"

<400> 14

acgcgtatta tgaagatcaa gacagggggc cgcacacctg cattatccgc attaacgacg
60

35 atgatgtttt ccgcctcggc tctcgcc
87

<210> 15

<211> 87

<212> ADN

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

45 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido
sintético"

<400> 15

ES 2 636 971 T3

tctagaatta tgaaaataaa aacaggtgca cgcctcctcg cattatccgc attaacgacg
60

atgatgtttt cgcctcggc tctcgcc
87

5 <210> 16
<211> 87
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
10 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido
sintético"

<400> 16

tctagaatta tgaaaattaa gacgggggcg cgcctcctcg cattatccgc attaacgacg
60

15 atgatgtttt cgcctcggc tctcgcc
87

<210> 17
<211> 87
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
25 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido
sintético"

<400> 17

tctagaatta tgaaaatcaa aaccggcgct cgcctcctcg cattatccgc attaacgacg
60

30 atgatgtttt cgcctcggc tctcgcc
87

<210> 18
<211> 87
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido
sintético"

40 <400> 18

ES 2 636 971 T3

tctagaatta tgaagatcaa gactggagct cgcacacctg cattatccgc attaacgacg
60

atgatgtttt cgcctcggc tctcgcc
87

<210> 19

<211> 87

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

<400> 19

tctagaatta tgaaaataaa gacgggagct cgcacacctg cattatccgc attaacgacg
60

atgatgtttt cgcctcggc tctcgcc
87

15

<210> 20

<211> 87

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

25 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

<400> 20

tctagaatta tgaagataaa gactggtgcg cgcacacctg cattatccgc attaacgacg
60

atgatgtttt cgcctcggc tctcgcc
87

30

<210> 21

<211> 87

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

40

<400> 21

ES 2 636 971 T3

tctagaatta tgaaaattaa gacgggagca cgcacacctg cattatccgc attaacgacg
60

atgatgtttt ccgcctcggc tctcgcc
87

5 <210> 22
<211> 87
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
10 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido
sintético"

<400> 22

tctagaatta tgaagattaa gacgggagct cgcacacctg cattatccgc attaacgacg
60

15 atgatgtttt ccgcctcggc tctcgcc
87

<210> 23
<211> 72
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
25 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido
sintético"

<400> 23

gcgcgatta tgaacaatc cacgattgcc ctggcactct taccgttact gtttaccct
60

30 gtagacaaaag cc
72

<210> 24
<211> 72
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
40 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido
sintético"

<400> 24

ES 2 636 971 T3

gcgcgcatta tgaaacagtc gacgatcgca ctggcactct taccgttact gtttaccct
60

gtgacaaaag cc
72

5 <210> 25
<211> 72
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido
sintético"

<400> 25

gcgcgcatta tgaacaaaag cactattgca ctggcactct taccgttact gtttaccct
60

15 gtgacaaaag cc
72

20 <210> 26
<211> 72
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido
sintético"

<400> 26

gcgcgcatta tgaagcaatc tactatcgct ctggcactct taccgttact gtttaccct
60

30 gtgacaaaag cc
72

35 <210> 27
<211> 72
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido
sintético"

40 <400> 27

ES 2 636 971 T3

gcgcgcatta tgaagcaatc aactatcgca ctggcactct taccgttact gttaccacct
60

gtgacaaaag cc
72

5 <210> 28
<211> 72
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
10 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido
sintético"

<400> 28

15 gcgcgcatta tgaacaatc tactattgca ctggcactct taccgttact gttaccacct
60
gtgacaaaag cc
72

20 <210> 29
<211> 72
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
25 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido
sintético"

<400> 29

acgcgtatta tgaaacagtc tactatcgct ctggcactct taccgttact gttaccacct
60

30 gtgacaaaag cc
72

<210> 30
<211> 72
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
40 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido
sintético"

<400> 30

tctagaatta tgaagcagag tacgattgct ctggcactct taccgttact gttaccacct
60

gtgacaaaag cc
72

ES 2 636 971 T3

<210> 31
<211> 72
<212> ADN
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
10 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

<400> 31

tctagaatta tgaacaaaag cactattgca ctggcactct taccgttact gtttaccct
60

gtgacaaaag cc
72

15 <210> 32
<211> 72
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

25 <400> 32

tctagaatta tgaagcaatc cacaatagct ctggcactct taccgttact gtttaccct
60

gtgacaaaag cc
72

30 <210> 33
<211> 72
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

40 <400> 33

tctagaatta tgaacaaatc caccattgcc ctggcactct taccgttact gtttaccct
60

gtgacaaaag cc
72

<210> 34
45 <211> 72

ES 2 636 971 T3

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
5 <221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

<400> 34
10 tctagaatta tgaacagtc tactatcgcg ctggcactct taccgttact gtttaccct
60
gtgacaaaag cc
72

<210> 35
<211> 72
15 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
20 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

<400> 35
tctagaatta tgaacaatc cacaatcgca ctggcactct taccgttact gtttaccct
60
gtgacaaaag cc
25 72

<210> 36
<211> 66
<212> ADN
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
35 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

<400> 36
gcgcgatta tgaaaaaaat ttggctcgcc ctggctggt tagtttagc gtttagcgca
60
tcggcg
40 66

<210> 37
<211> 66
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
45

<220>

ES 2 636 971 T3

<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

5 <400> 37

gcgcgcatta tgaaaaagat ttggctggcg ctggctggtt tagtttttagc gtttagcgca
60

tcggcg
66

10 <210> 38
<211> 66
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

15 <221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

<400> 38

20 gcgcgcatta tgaaaaagat atggctggct ctggctggtt tagtttttagc gtttagcgca
60

tcggcg
66

25 <210> 39
<211> 66
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

30 <221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

<400> 39

gcgcgcatta tgaaaaagat atggttggct ctggctggtt tagtttttagc gtttagcgca
60

tcggcg
66

35 <210> 40
<211> 66
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

40 <221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

45 <221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

ES 2 636 971 T3

<400> 40

acgcgtatta tgaaaaagat ttggctggcg ctggctgggt tagttttagc gtttagcgca
60

tcggcg
66

5 <210> 41
<211> 66
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido
sintético"

15 <400> 41

acgcgtatta tgaagaaaat ttggttggct ctggctgggt tagttttagc gtttagcgca
60

tcggcg
66

20 <210> 42
<211> 66
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido
sintético"

<400> 42

30 acgcgtatta tgaagaagat ttggtttagca ctggctgggt tagttttagc gtttagcgca
60

tcggcg
66

35 <210> 43
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
40 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido
sintético"

<400> 43

ES 2 636 971 T3

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

- 5 <210> 44
- <211> 114
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <221> fuente
- <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"
- <400> 44
- 15

ES 2 636 971 T3

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

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

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

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

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

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

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

Lys Arg

<210> 45

<211> 449

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 45

ES 2 636 971 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Met Ile Asp Pro Ser Asn Ser Asp Thr Arg Phe Asn Pro Asn Phe
 50 55 60
 Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Tyr Arg Ser Tyr Val Thr Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205

ES 2 636 971 T3

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

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240

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

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270

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

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

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320

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

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

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

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

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

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

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430

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

ES 2 636 971 T3

Lys

<210> 46

<211> 220

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 46

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

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

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

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

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

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

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

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
130 135 140

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

15 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp

ES 2 636 971 T3

165

170

175

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

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
195 200 205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215 220

<210> 47

<211> 227

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 47

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

15 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

ES 2 636 971 T3

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 210 215 220

Pro Gly Lys
 225

<210> 48

<211> 11

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 48

Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
 1 5 10

15

<210> 49

<211> 17

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

25 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 49

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15

30 Ala

ES 2 636 971 T3

<210> 50
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5
<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

10
<400> 50

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

15
<210> 51
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20
<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

25
<400> 51

Gln Gln Tyr Tyr Ala Tyr Pro Trp Thr
1 5

30
<210> 52
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35
<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

40
<400> 52

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Leu His
1 5 10

45
<210> 53
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50
<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 53

ES 2 636 971 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 60

10 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 1 5 10

<210> 61
 <211> 106

15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 20 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 61

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 1 5 10 15

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

25 <210> 62
 <211> 25
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

ES 2 636 971 T3

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"
5
<400> 62
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25
10 <210> 63
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
15 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"
20 <400> 63
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
1 5 10
<210> 64
25 <211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
30 <221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"
<400> 64
35 Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30
<210> 65
<211> 11
40 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> fuente
45 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

ES 2 636 971 T3

<211> 222
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

10 <400> 68

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 1 5 10 15

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 20 25 30

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 35 40 45

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 50 55 60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 65 70 75 80

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 85 90 95

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 100 105 110

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 115 120 125

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val
 130 135 140

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

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

ES 2 636 971 T3

165

170

175

Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
180 185 190

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
195 200 205

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215 220

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento de preparación de un anticuerpo, comprendiendo dicho procedimiento cultivar una célula huésped que comprende un polinucleótido que comprende (1) una primera región de iniciación de la traducción (TIR) enlazada funcionalmente a un polinucleótido que codifica una cadena pesada de anticuerpo, en el que la TIR comprende una secuencia señal de secreción procariótica de cotraducción de DsbA seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 36-39, 41 y 42; y (2) una segunda TIR enlazada funcionalmente a un polinucleótido que codifica una cadena ligera de anticuerpo, en el que la segunda TIR comprende una secuencia señal de secreción procariótica de cotraducción o postraducción, por lo que tras la expresión del anticuerpo en una célula huésped, las cadenas ligera y pesada se pliegan y ensamblan para formar un anticuerpo biológicamente activo.
- 10 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la segunda región de iniciación de la traducción comprende (i) una secuencia señal de STII, DsbA, MalE o PhoA seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-14, 16-24, 26-39 y 41-42.
- 15 3. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que las primera y segunda regiones de iniciación de la traducción proporcionan fuerzas de traducción iguales.
- 20 4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el polinucleótido en la célula huésped comprende adicionalmente un promotor, o un promotor procariótico seleccionado del grupo que consiste en promotor de phoA, tac, lpp, lac-ipp, lac, ara y T7.
- 25 5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la célula huésped es una célula procariótica.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que la célula procariótica es *E. coli* o una *E. coli* de una cepa deficitaria en actividades de proteasa endógena.
- 30 7. El procedimiento de las reivindicaciones 5 o 6, en el que el genotipo de la *E. coli* carece de los genes degP y prc y alberga un gen spr mutante.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la célula huésped comprende adicionalmente un polinucleótido que codifica al menos un polipéptido procariótico seleccionado del grupo que consiste en DsbA, DsbC, DsbG y FkpA, o un polinucleótido que codifica tanto DsbA como DsbC.
- 35 9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 40 10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo madurado en afinidad, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.
- 45 11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que la célula huésped comprende uno o más polinucleótidos que codifican colectivamente el anticuerpo.
- 50 12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que el procedimiento (i) comprende adicionalmente recuperar el anticuerpo del cultivo de células huésped y combinar el anticuerpo recuperado con un vehículo, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable para preparar una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo y (ii) opcionalmente comprende adicionalmente recuperar el anticuerpo del cultivo de células huésped y en el que al menos un 50 % de los complejos de polipéptidos de inmunoglobulina que se forman son el anticuerpo.
- 55 13. Un polinucleótido que comprende (1) una TIR enlazada funcionalmente a un polinucleótido que codifica una cadena pesada de anticuerpo, en el que la TIR comprende una secuencia señal de secreción procariótica de cotraducción de DsbA seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 36-39, 41 y 42; y (2) una segunda TIR enlazada funcionalmente a un polinucleótido que codifica una cadena ligera de anticuerpo, en el que la segunda TIR comprende una secuencia señal de secreción procariótica de cotraducción o postraducción, por lo que tras la expresión del anticuerpo en una célula huésped, las cadenas ligera y pesada se pliegan y ensamblan para formar un anticuerpo biológicamente activo.
- 60 14. El polinucleótido de la reivindicación 13, en el que la segunda región de iniciación de la traducción comprende (i) una secuencia señal de STII, DsbA, MalE o PhoA seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-14, 16-24, 26-39 y 41-42.
- 65 15. Una célula huésped que comprende el polinucleótido de las reivindicaciones 13 o 14.

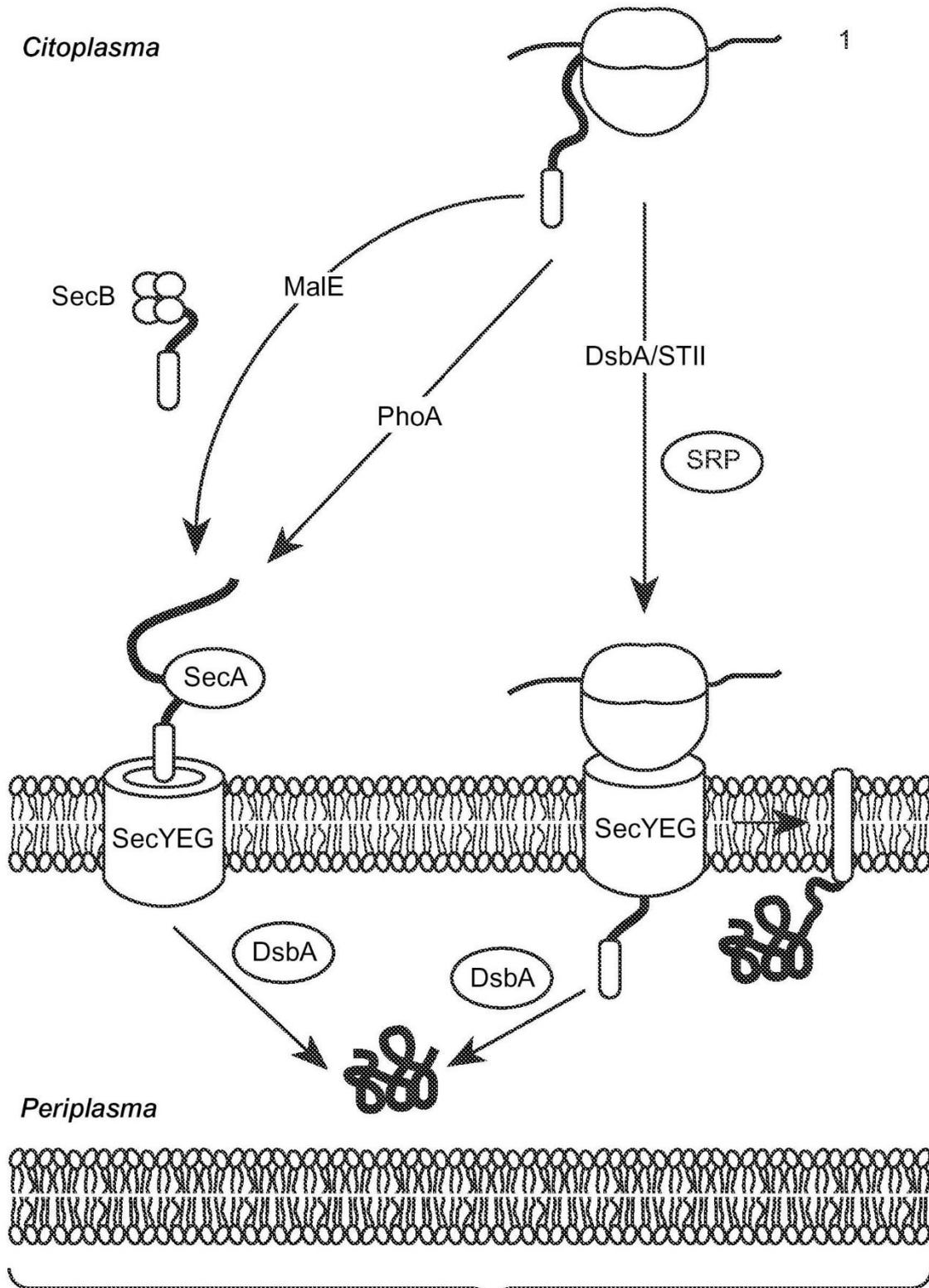


FIG. 1

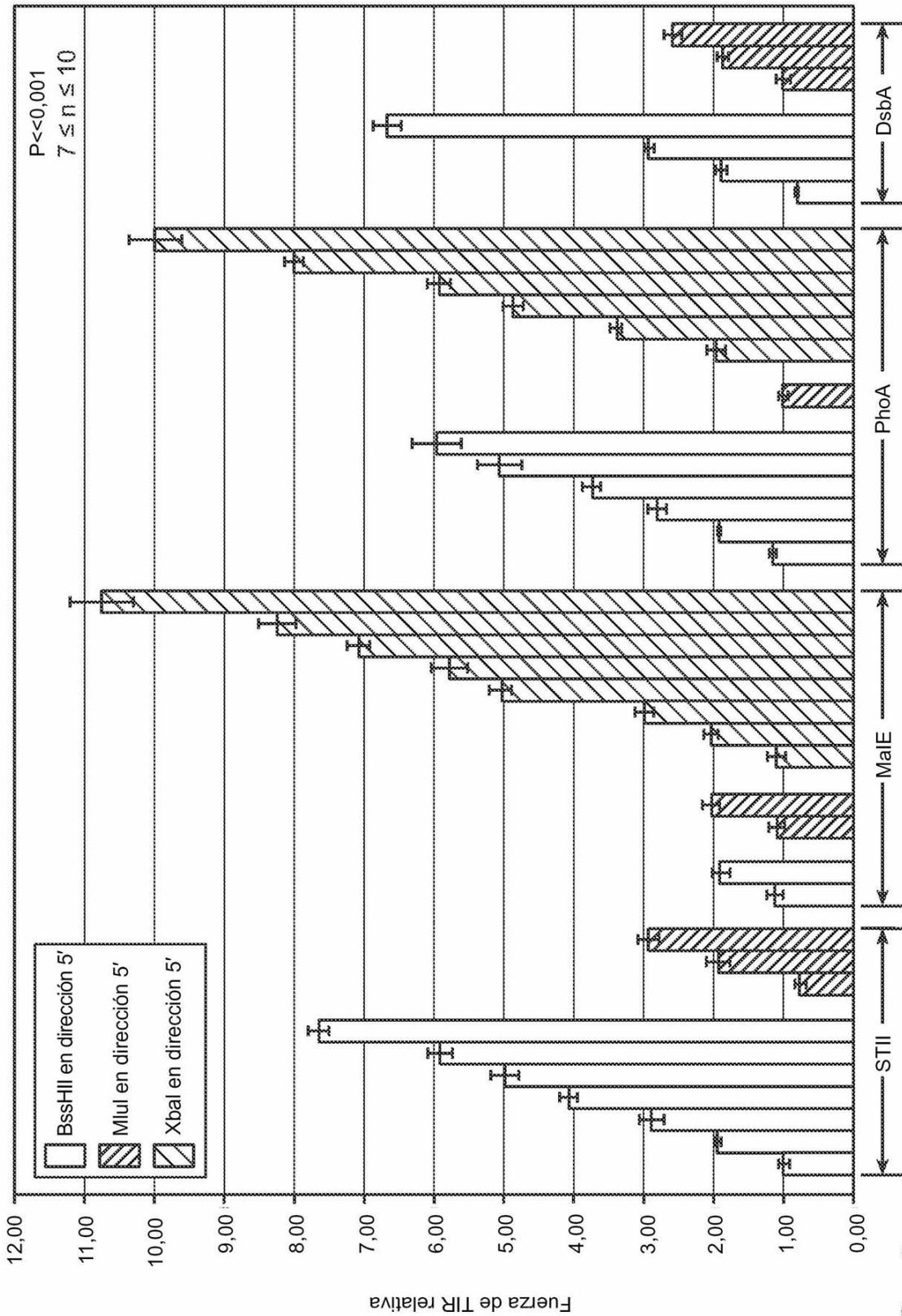


FIG. 2

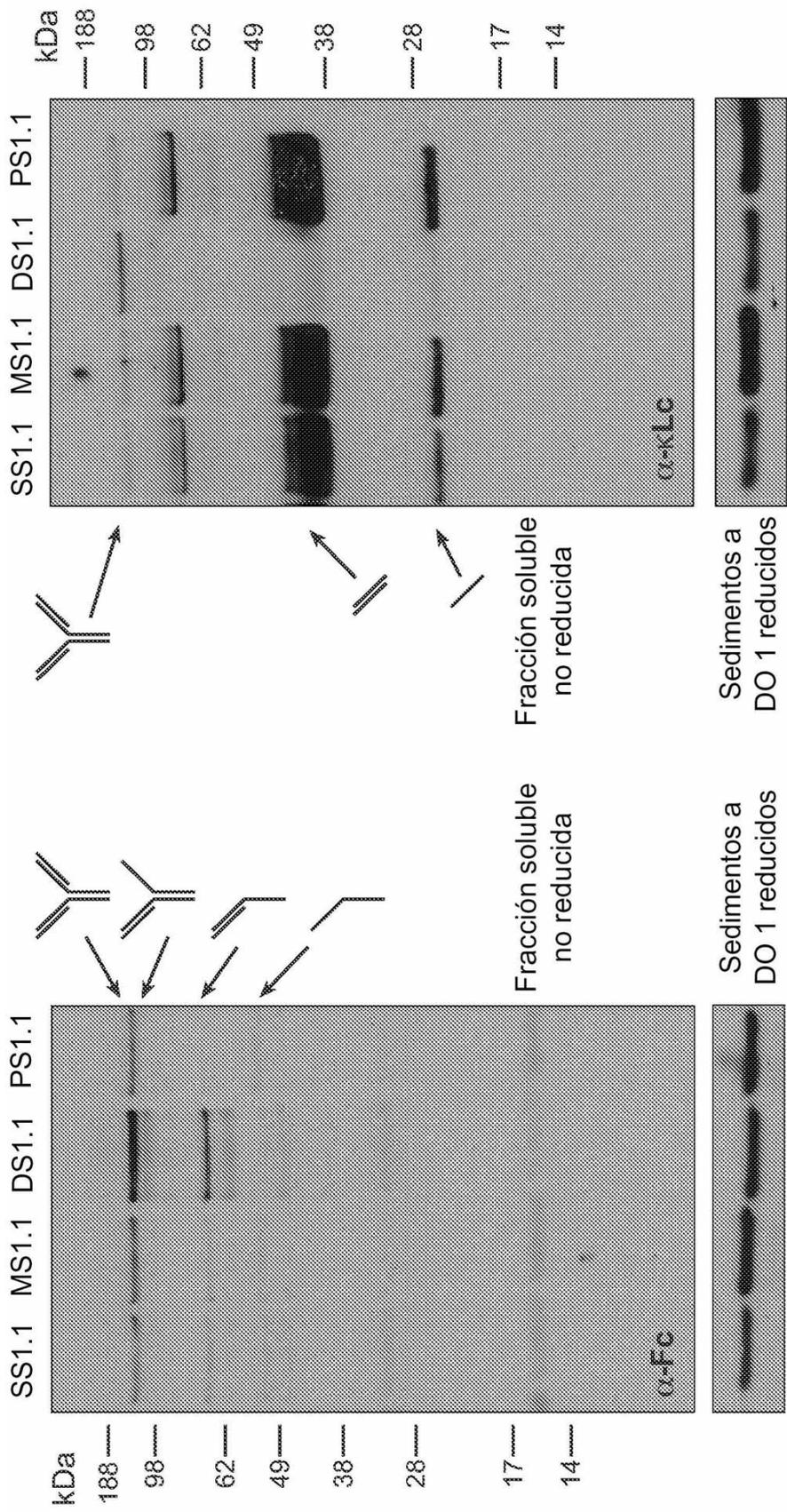


FIG. 3B

FIG. 3A

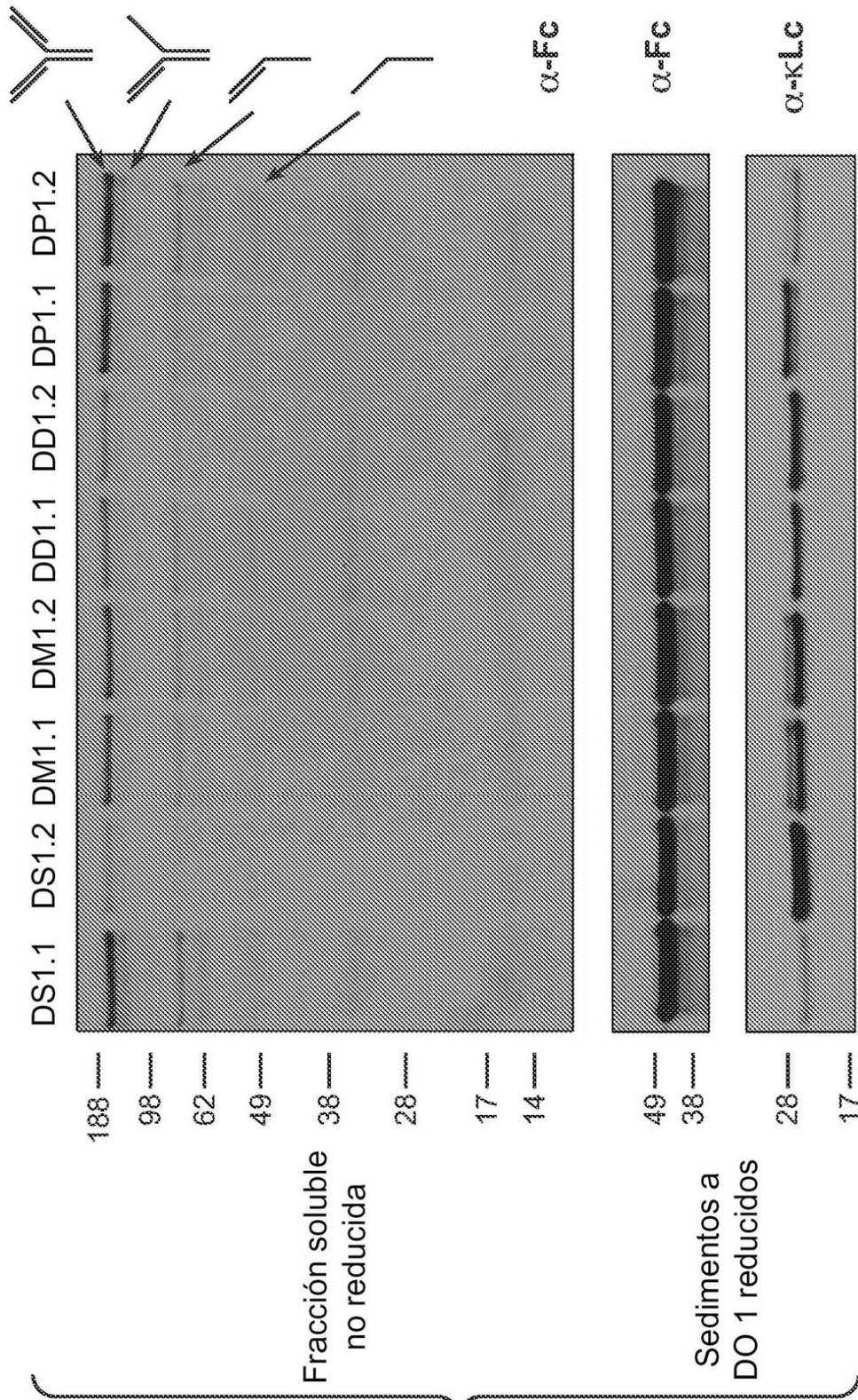


FIG. 4

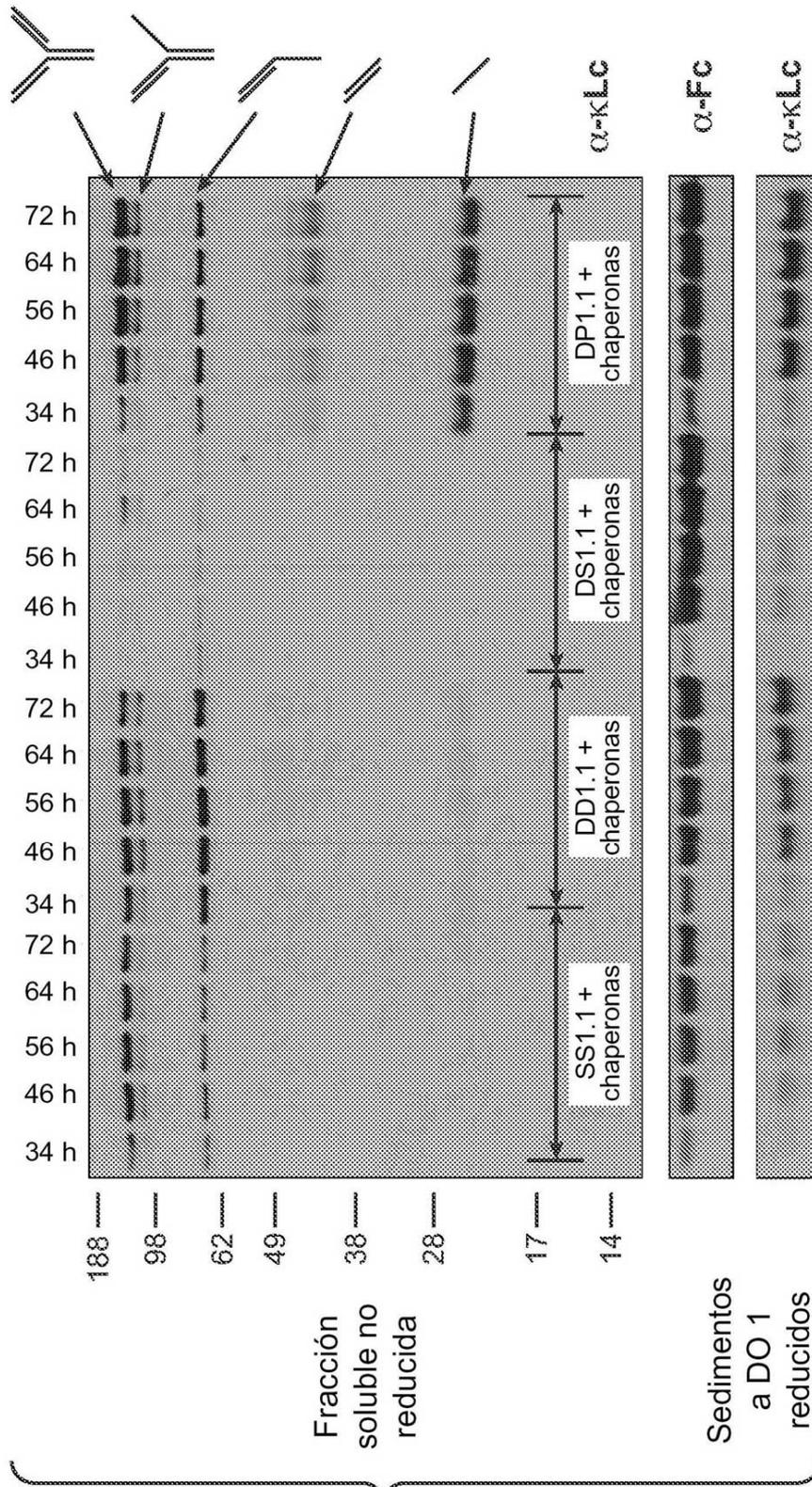


FIG. 5

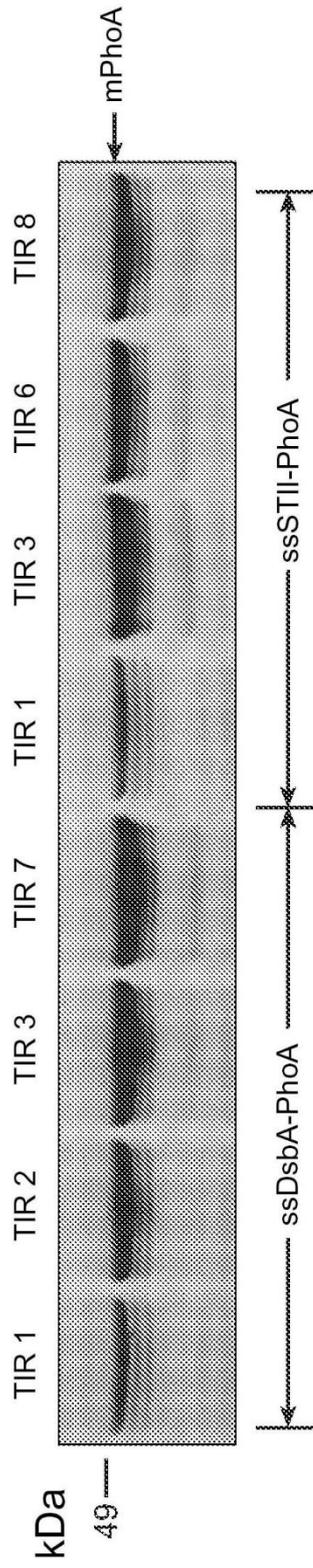


FIG. 6

FIG. 7**Cadena ligera de 5D5.v2**

FR1-LC: DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC
 FR2-LC: WYQQKPGKAPKLLIY
 FR3-LC: GVPSTRFSGSGGTDFLTITSSLOPEDFATYYC
 FR4-LC: FGQGTKVEIKR
 CDR1-LC: KSSQSLLYTSSQKNYLA
 CDR2-LC: WASTRES
 CDR3-LC: QQYYAYPWT
 CL1: TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
 DSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Cadena pesada de 5D5.v2

FR1-HC: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
 FR2-HC: WVRQAPGKGLEWV
 FR3-HC: RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC
 FR4-HC: WGQGTLVTVSS
 CDR1-HC: GYFTFSYWLH
 CDR2-HC: GMIDPSNSDTRFNPFDK
 CDR3-HC: ATYRSYVTPLDY
 CH1: ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
 CPPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
 QVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
 VSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 8

DKTHTCPPEPELLGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED
 PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKE
 YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCL
 VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
 QQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK