

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 866**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.01.2014 PCT/US2014/014175**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.08.2014 WO14121087**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.01.2014 E 14706169 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.08.2018 EP 2951207**

54 Título: **Anticuerpos que comprenden dominios constantes quiméricos**

30 Prioridad:

01.02.2013 US 201361759578 P

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

29.10.2018

73 Titular/es:

**REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.
(100.0%)
777 Old Saw Mill River Road
Tarrytown, NY 10591, US**

72 Inventor/es:

**DAVIS, SAMUEL;
SMITH, ERIC;
PATEL, SUPRIYA y
RAFIQUE, ASHIQUE**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 687 866 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

Anticuerpos que comprenden dominios constantes quiméricos

5 **Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

La presente solicitud reivindica el beneficio a tenor de 35 U.S.C. § 119(e) de la Solicitud Provisional de los EE.UU. N.º 61/759.578, presentada el 1 de febrero de 2013.

10 **Listado de secuencias**

La presente solicitud incorpora por referencia el Listado de Secuencias presentado en Forma Legible por Ordenador como archivo 8550PCT_ST25.txt creado el 29 de enero de 2014 (43.512 bytes).

15 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a anticuerpos modificados mediante ingeniería genética con polipéptidos recombinantes que comprenden una región constante quimérica, más específicamente que incluyen una región bisagra quimérica en la región constante de la cadena pesada. La presente invención se refiere a anticuerpos que comprenden dichos polipéptidos recombinantes que reducen las funciones efectoras y proporcionan una ventaja para el uso en terapia.

Antecedentes de la invención

25 Las inmunoglobulinas de la clase IgG son atractivas como agentes terapéuticos. Las IgG existen como cuatro subclases en seres humanos, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. La región constante de la cadena pesada (C_H) de IgG comprende tres dominios, C_H1, C_H2, C_H3, donde C_H1 y C_H2 están unidos por una bisagra. Aunque el papel de cada subclase parece variar entre especies, se sabe que el dominio constante de la cadena pesada es responsable de
30 inmunitarias celulares a través de su interacción con receptores Fcγ (FcγR), tales como la muerte celular, la activación del complemento, la fagocitosis y la opsonización. En un intento de comprender y manipular los efectos de la unión de la subclase IgG a FcγR, los investigadores han realizado diversas mutaciones en los dominios constantes de las IgG y han estudiado la interacción IgG/FcγR resultante (véase, por ejemplo, el documento WO2013/012733; Canfield y Morrison *J Exp Med* 73, 1483-1491 (1991), Chappel, M.S., et al., *JBC* 268 (33), 25124-31 (1993) y Armour, K.L., et al., *Eur J Immunol* 29, 2613-24 (1999)).

La actividad citotóxica dependiente del Fc de los anticuerpos IgG humanos requiere la unión de la región Fc del anticuerpo (que consiste en al menos un dominio CH2 y CH3 funcional) a un FcγR en la superficie de una célula efectora, tal como un linfocito citolítico natural, un macrófago activado o similar. La lisis mediada por complemento
40 también puede desencadenarse por la interacción de la región Fc con diversos componentes del complemento. Con respecto a la unión a FcγR, se ha sugerido que varios restos de aminoácidos en la región bisagra y en el dominio C_H2 del anticuerpo son importantes (véase Sarmay, G., et al. *Mol Immunol* 29, 633-9 (1992); Greenwood, J, et. al., *Eur. J. Immunol*, 23 (5), 1098 (1993), Morgan, A., et. al., *Immunology*, 86, 319 (1995), Stevenson, GT, *Chemical Immunology*, 65, 57-72 (1997)). La glucosilación de un sitio (N297) en el dominio CH2 y las variaciones en la
45 composición de sus hidratos de carbono también afectan fuertemente a la interacción IgG/FcγR (Stevenson, G.T., *Chemical Immunology*, 65, 57-72 (1997); Sibérl et al. *Immunol Ltrs* 106, 111-118 (2006)).

Para determinadas terapias con anticuerpos, puede ser ventajoso modificar mediante ingeniería genética las propiedades de unión al receptor de Fc para activar todos, algunos o ninguno de los mecanismos efectores disponibles, sin afectar a las propiedades farmacocinéticas del anticuerpo. La combinación deseada de propiedades terapéuticas puede no estar disponible en el repertorio de anticuerpos naturales. El diseño de anticuerpos con función efectora reducida debería ser eficaz, por ejemplo, cuando el objetivo terapéutico no es destruir una célula diana, sino bloquear o activar una molécula de superficie celular en su superficie sin desencadenar citotoxicidad. Otro escenario en el que podría ser deseable la unión reducida a receptores de Fc es cuando el anticuerpo es
50 biespecífico y sus propiedades terapéuticas deseadas surgen de las diferentes especificidades de unión. Por ejemplo, un uso común de anticuerpos biespecíficos es combinar una especificidad de direccionamiento a tumor con una especificidad de activación de linfocitos T con el fin de desencadenar la destrucción de linfocitos T específicas de tumor. En este caso, si la porción Fc se une a un receptor de Fc, entonces potencialmente podría desencadenar la destrucción indeseable de células que llevan receptores Fc por linfocitos T o la destrucción de linfocitos T por
60 células que llevan receptores Fc tales como linfocitos citolíticos naturales o macrófagos.

Por tanto, existe la necesidad de terapias biológicas mejoradas, tales como anticuerpos con propiedades deseables para su uso en dichas terapias. Los solicitantes han descubierto que proteínas recombinantes que contienen cadenas pesadas de anticuerpos sustituidas o modificadas, incluyendo anticuerpos recombinantes y proteínas de
65 fusión receptor-Fc recombinantes, tienen una actividad de unión al receptor de Fc alterada, que reduce el riesgo de efectos secundarios no deseados y proporciona de este modo un efecto terapéutico mejorado.

Sumario de la invención

Los anticuerpos, proteínas de unión a antígeno y proteínas de fusión de Fc que se desvelan en el presente documento se modifican mediante ingeniería genética para que tengan una unión reducida a receptores de Fc.

5 La presente invención proporciona un anticuerpo que comprende una región constante de la cadena pesada (CH) que comprende, desde el extremo N hasta el extremo C, un dominio CH1, una bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3 en el que:

- 10 (a) el dominio CH1 comprende un dominio CH1 de IgG1 humana o un dominio CH1 de IgG4 humana que tiene la secuencia de aminoácidos DKKV o DKRV de las posiciones 212 a 215 (numeración EU),
 (b) la bisagra comprende una secuencia de aminoácidos de bisagra superior de IgG1 humana o IgG4 humana de las posiciones 216 a 227 (numeración EU) y una secuencia de aminoácidos de bisagra inferior de IgG2 humana PCPAPPVA (SEQ ID NO: 3) de las posiciones 228 a 236 (numeración EU),
 15 (c) el dominio CH2 comprende una secuencia de aminoácidos del dominio CH2 de IgG4 humana de las posiciones 237 a 340 (numeración EU), y
 (d) el dominio CH3 comprende una secuencia del dominio CH3 de IgG1 humana o IgG4 humana de las posiciones 341 a 447 (numeración EU) y

20 en la que el anticuerpo es capaz de unirse a un FcγR con menor afinidad que un anticuerpo correspondiente que comprende una región constante de la cadena pesada de IgG1 de tipo silvestre o de IgG4 de tipo silvestre, el anticuerpo es capaz de unirse a FcγRIIA y opcionalmente a FcγRIIB, y el anticuerpo es capaz de unirse a FcγRIIA con mayor afinidad en comparación con su afinidad de unión a FcγRIIB.

25 En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo es uno en el que el dominio CH1 comprende una secuencia de aminoácidos de CH1 de IgG1 humana (SEQ ID NO: 43) y la bisagra quimérica comprende la secuencia de aminoácidos EPKSCDKTHTCPPCPAPPVA (SEQ ID NO: 8). En otra realización más de la invención, el anticuerpo es uno en el que el dominio CH1 comprende una secuencia de aminoácidos de CH1 de IgG4 humana (SEQ ID NO: 44) y la bisagra quimérica comprende la secuencia de aminoácidos ESKYGPPCPPCPAPPVA (SEQ ID NO: 9).

30 En otra realización de la invención, el anticuerpo es uno en el que el dominio CH1 comprende la secuencia de aminoácidos DKKV (SEQ ID NO: 4) y la bisagra quimérica comprende la secuencia de aminoácidos EPKSCDKTHTCPPCPAPPVA (SEQ ID NO: 8). En otra realización más de la invención, el anticuerpo es uno en el que el dominio CH1 comprende la secuencia de aminoácidos DKRV (SEQ ID NO: 5) y la bisagra quimérica
 35 comprende la secuencia de aminoácidos ESKYGPPCPPCPAPPVA (SEQ ID NO: 9). En otro aspecto, el dominio CH1 comprende una variante de la SEQ ID NO: 43 o 44.

Otra realización de la invención proporciona un polipéptido recombinante en el que el dominio CH2 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 10. Otra realización más de la invención proporciona un polipéptido
 40 recombinante en el que el dominio CH3 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 12. En otro aspecto, el dominio CH3 comprende la SEQ ID NO: 41 o 42.

También se desvela un polipéptido recombinante, en el que el polipéptido comprende N'-VD1-X1_n-Y1-Y2-X2-X3-C', en el que:

- 45 N' es el extremo N y C' es el extremo C del polipéptido,
 VD1 es una secuencia de aminoácidos que comprende un dominio de unión a antígeno,
 X1 es una secuencia de aminoácidos que comprende un dominio seleccionado entre el grupo que consiste en un dominio CH1 de IgG1 o una variante del mismo, un dominio CH1 de IgG4 o una variante del mismo y al menos
 50 las posiciones 212-215 (numeración EU) de un dominio CH1 de IgG1 o IgG4,
 Y1 comprende una secuencia de aminoácidos de las posiciones 216-227 (numeración EU) de una región bisagra de IgG1 o IgG4,
 Y2 comprende la secuencia de aminoácidos de la región de bisagra inferior de IgG2 humana PCPAPPVA (SEQ ID NO: 3) de las posiciones 228 a 236 (numeración EU),
 55 X2 es una secuencia de aminoácidos que comprende un dominio CH2 de IgG4, o una variante del mismo, y X3 es una secuencia de aminoácidos que comprende un dominio CH3 de IgG1 o un dominio CH3 de IgG4, o una variante de los mismos; en el que n = 0 o 1.

En algunos casos, n = 1. En otro caso más, X1 comprende la secuencia de aminoácidos DKKV (SEQ ID NO: 4) y Y1-Y2 comprende una bisagra quimérica que consiste en la secuencia de aminoácidos EPKSCDKTHTCPPCPAPPVA (SEQ ID NO: 8). En otro caso más, X1 comprende la secuencia de aminoácidos DKRV (SEQ ID NO: 5) y Y1-Y2 comprende una bisagra quimérica que consiste en la secuencia de aminoácidos ESKYGPPCPPCPAPPVA (SEQ ID NO: 9). En un caso más, X1 comprende la SEQ ID NO 43 o la SEQ ID NO: 44. En otro caso, X2 comprende la SEQ ID NO: 10. En otro caso, X3 comprende la SEQ ID NO: 11 o la SEQ ID NO: 12.
 65 Aún otra instancia, X3 comprende la SEQ ID NO: 41 o la SEQ ID NO: 42.

También se desvela un polipéptido recombinante en el que la región constante de la cadena pesada (CH) comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 99 % idéntica a una cualquiera de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 37 o SEQ ID NO: 38.

- 5 En algunos casos, n = 0 y Y1-Y2 comprende una bisagra quimérica que tiene la secuencia de aminoácidos EPKSCDKTHTCPPCPAPPVA (SEQ ID NO: 8). En otras realizaciones, n = 0 y Y1-Y2 comprende una bisagra quimérica que tiene la secuencia de aminoácidos ESKYGPPCPPCPAPPVA (SEQ ID NO: 9).

El polipéptido recombinante es un anticuerpo.

- 10 En un aspecto adicional de la invención, el anticuerpo presenta funciones efectoras disminuidas cuando se compara con un anticuerpo correspondiente que comprende la región constante de la cadena pesada de IgG1 o IgG4 de tipo silvestre, a una concentración de al menos 10 nM. Por tanto, el anticuerpo puede ser uno que tenga una unión, una actividad citotóxica y una proliferación celular disminuidas.

- 15 El anticuerpo de la invención puede presentar una actividad citotóxica inferior a aproximadamente el 50 %, a una concentración de al menos 10 nM o al menos 100 nM. El anticuerpo de la invención puede presentar una actividad citotóxica inferior a aproximadamente el 40 %, o inferior a aproximadamente el 30 %, o inferior a aproximadamente el 20 %, o inferior a aproximadamente el 10 %, o inferior a aproximadamente el 5 %, o incluso indetectable, en una concentración de al menos 10 nM o al menos 100 nM.

- 20 En otras realizaciones, el anticuerpo presenta una actividad de CDC inferior a aproximadamente el 50 % de citotoxicidad, o inferior al 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, o el 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, o incluso del 0 %, o una citotoxicidad indetectable, medida en un ensayo *in vitro* o *ex vivo* de muerte celular. En ciertas realizaciones, la actividad de CDC es inferior al 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, o el 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, o incluso del 0 % o indetectable, a una concentración de 100 nM. En más realizaciones, el anticuerpo muestra una actividad de CCDA inferior a aproximadamente el 50 % de citotoxicidad, o inferior a una citotoxicidad del 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, o del 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, o incluso del 0 %, o una citotoxicidad indetectable, medida en un ensayo *in vitro* o *ex vivo* de muerte celular. En ciertas realizaciones, la actividad de CCDA es inferior al 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, o el 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, o incluso del 0 %, o una actividad de CCDA indetectable, a una concentración de 100 nM.

- 25 En otras realizaciones más, el anticuerpo presenta una actividad de FCDA inferior a aproximadamente el 50 % de actividad de FCDA, o inferior al 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, o el 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, o incluso del 0 % o una actividad de FCDA indetectable, medida en un ensayo *in vitro* o *ex vivo* de fagocitosis celular. En ciertas realizaciones, la actividad de FCDA es inferior al 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, o el 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, o incluso del 0 % o una actividad de FCDA indetectable, a una concentración de 100 nM.

- 30 La invención proporciona adicionalmente que el anticuerpo proporcionado sea uno en el que la actividad citotóxica es de al menos aproximadamente 10 veces inferior a la actividad citotóxica de un anticuerpo correspondiente que comprende una región constante de la cadena pesada de IgG1 de tipo silvestre o IgG4 de tipo silvestre. La invención también proporciona un polipéptido recombinante en el que la actividad citotóxica es al menos aproximadamente 10 veces inferior, aproximadamente 20 veces inferior, aproximadamente 50 veces inferior, o aproximadamente 100 veces inferior, o aproximadamente 1000 veces inferior a la actividad citotóxica de un polipéptido correspondiente que comprende una región constante de la cadena pesada de IgG1 de tipo silvestre o IgG4 de tipo silvestre.

- 35 Un aspecto de la invención proporciona una composición que comprende el anticuerpo de la invención.

- Otro aspecto de la invención proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo de la invención. La invención proporciona adicionalmente una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo de la invención, en la que el polipéptido recombinante comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 37.

- 40 La invención proporciona adicionalmente una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo de la invención que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de secuencia superior al 99 % con la SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 32 o SEQ ID NO: 33. La invención también proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo de la invención que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de secuencia superior al 99 % con la SEQ ID NO: 36 o SEQ ID NO: 35.

- 45 La invención también proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo de la invención que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 36 y SEQ ID NO: 35.

- 50 Un aspecto de la invención proporciona un vector que comprende una cualquiera de las moléculas de ácido nucleico de la invención. La invención proporciona adicionalmente un vector en el que la molécula de ácido nucleico de la invención se une operativamente a una secuencia de control de la expresión adecuada para la expresión en una célula hospedadora. La invención también proporciona un vector de la invención en el que la secuencia de control de

la expresión comprende un promotor seleccionado entre el grupo que consiste en SV40, CMV, CMVIE, CMV-MIE, UbC, RSV, SL3-3, MMTV, Ubi y LTR de HIV. La invención proporciona adicionalmente un vector de la invención en el que el promotor es un promotor híbrido CMV-MIE/TetO o CMV-MIE/Arc. La invención también proporciona un vector de la invención que comprende uno o más genes marcadores seleccionables seleccionados entre el grupo
 5 que consiste en bla, bls, BSD, bsr, Shble, hpt, tetR, tetM, npt, kanR y pac.

Otro aspecto de la invención proporciona una célula que comprende un ácido nucleico de la invención. La invención proporciona adicionalmente una célula que comprende un vector de la invención.

10 La invención proporciona adicionalmente una célula que comprende un ácido nucleico de la invención, en el que el ácido nucleico está integrado en el genoma de la célula. La invención también proporciona una célula que comprende un ácido nucleico que codifica un potenciador de la expresión proteica. La invención proporciona además una célula que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido XBP.

15 En una realización de la invención, la célula es una célula eucariota. En una realización de la invención, la célula es una célula animal. En una realización de la invención, la célula es una célula de mamífero. En otra realización de la invención, la célula es una célula CHO. En una realización de la invención, la célula es una célula CHO-K1.

20 También se desvela un método de preparación de un anticuerpo que comprende una región bisagra quimérica, comprendiendo dicho método:

(a) transfectar una célula hospedadora con una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena ligera de dicho anticuerpo, comprendiendo dicha molécula de ácido nucleico una secuencia de nucleótidos que codifica la región
 25 V_L de un anticuerpo específico de antígeno seleccionado y una secuencia de nucleótidos que codifica la región C_L constante de una Ig, en la que dicha secuencia de nucleótidos que codifica la región V_L de un anticuerpo específico de antígeno seleccionado y dicha secuencia de nucleótidos que codifica la región C_L de una Ig están operativamente unidas entre sí; (b) transfectar la célula hospedadora de la etapa (a) con una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena pesada de dicho anticuerpo, comprendiendo dicha molécula de ácido nucleico una secuencia de nucleótidos que codifica la región V_H de un anticuerpo específico de antígeno seleccionado y una secuencia nucleotídica que codifica una región C_H constante de una Ig humana, en la que la secuencia de nucleótidos que codifica la región C_H comprende la secuencia de nucleótidos que codifica SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 37, en la que dicha secuencia de nucleótidos que codifica la región V_H de un anticuerpo específico de antígeno seleccionado y dicha secuencia de nucleótidos que codifica la región C_H de dicha Ig están operativamente unidas entre sí; y (c) preparar dicho anticuerpo mediante la coexpresión de las moléculas de ácido nucleico de (a) y (b) en dicha célula hospedadora.
 30
 35

También se desvela un método de preparación de un anticuerpo que comprende una región bisagra quimérica, comprendiendo dicho método:

40 (a) transfectar una célula hospedadora con una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena ligera de dicho anticuerpo, comprendiendo dicha molécula de ácido nucleico una secuencia de nucleótidos que codifica la región VL de un anticuerpo específico de antígeno seleccionado y una secuencia de nucleótidos que codifica la región CL constante de una Ig, en la que dicha secuencia de nucleótidos que codifica la región VL de un anticuerpo específico de antígeno seleccionado y dicha secuencia de nucleótidos que codifica la región CL de una Ig están operativamente unidas entre sí; (b) transfectar la célula hospedadora de la etapa (a) con una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena pesada de dicho anticuerpo, comprendiendo dicha molécula de ácido nucleico una secuencia de nucleótidos que codifica la región VH de un anticuerpo específico de antígeno seleccionado y una secuencia de nucleótidos que codifica una región CH constante de una Ig humana, en la que la secuencia de nucleótidos que codifica la región CH comprende la secuencia de nucleótidos de bisagra quimérica que codifica SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9, en la que dicha secuencia de nucleótidos codifica la región VH de un anticuerpo específico de antígeno seleccionado y dicha secuencia de nucleótidos que codifica la región CH de dicha Ig están operativamente unidas entre sí; y (c) preparar dicho anticuerpo mediante la coexpresión de las moléculas de ácido nucleico de (a) y (b) en dicha célula hospedadora.
 45
 50

55 En otro aspecto de la invención, el método de preparación de un anticuerpo comprende adicionalmente las etapas de cultivar la célula hospedadora de la etapa (b) anterior, en las que el anticuerpo se secreta en un medio de cultivo celular; y aislar el anticuerpo de los medios de cultivo celulares.

60 Un aspecto de la invención proporciona un método de preparación de una proteína de fusión receptor-Fc que comprende una región bisagra quimérica, comprendiendo dicho método:

(a) transfectar una célula hospedadora con una molécula de ácido nucleico que codifica dicha proteína de fusión receptor-Fc, comprendiendo dicha molécula de ácido nucleico una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína receptora, fusionada a una secuencia de nucleótidos que codifica una región C_H constante de una Ig humana, en la que la secuencia de nucleótidos que codifica la región C_H comprende la secuencia de nucleótidos que codifica SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 37,
 65

en la que dicha secuencia de nucleótidos que codifica la proteína receptora y dicha secuencia de nucleótidos que codifica la región C_H de dicha Ig están operativamente unidas entre sí; y (b) preparar dicha proteína de fusión receptor-Fc mediante la expresión de la molécula de ácido nucleico de (a) en dicha célula hospedadora.

- 5 En otro caso, el método de preparación de una proteína de fusión receptor-Fc comprende las etapas de cultivar la célula hospedadora de la etapa (b) anterior, en la que la proteína de fusión receptor-Fc se secreta en un medio de cultivo celular; y aislar la proteína de fusión receptor-Fc del medio de cultivo celular.

10 También se desvela un método de preparación de una proteína de fusión receptor-Fc que comprende una región bisagra quimérica, comprendiendo dicho método:

- 15 (a) transfectar una célula hospedadora con una molécula de ácido nucleico que codifica dicha proteína de fusión receptor-Fc, comprendiendo dicha molécula de ácido nucleico una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína receptora, fusionada con una secuencia de nucleótidos que codifica una región CH constante de una Ig humana, en la que la secuencia de nucleótidos que codifica la región CH comprende la secuencia de nucleótidos bisagra quimérica que codifica SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9, en la que dicha secuencia de nucleótidos codifica la proteína receptora y dicha secuencia de nucleótidos que codifica la región CH de dicha Ig están operativamente unidas entre sí; y (b) preparar dicha proteína de fusión receptor-Fc mediante la expresión de la molécula de ácido nucleico de (a) en dicha célula hospedadora.
- 20

En otros casos, el método de preparación de un anticuerpo comprende:

- 25 (a) producir un primer cultivo celular que comprende células que expresan un primer polipéptido de cadena pesada de interés;
 (b) producir un segundo cultivo celular que comprende células que expresan un segundo polipéptido de cadena pesada de interés;
 (c) combinar los cultivos celulares primero y segundo o los sobrenadantes de los mismos; y
 (d) recuperar los polipéptidos primero y segundo en forma heterodimérica;

30 en el que las cadenas pesadas de los polipéptidos de cadena pesada primero y segundo comprenden, cada una, una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 37. En los métodos anteriores, el primer cultivo celular comprende adicionalmente una primera cadena ligera homóloga de interés y el segundo cultivo celular comprende adicionalmente una segunda cadena ligera homóloga de interés, en los que las cadenas ligeras homólogas primera y segunda se unen covalentemente a los polipéptidos de cadena pesada primero y segundo y, por tanto, se recuperan. En otros casos de los métodos anteriores, las cadenas pesadas de los polipéptidos de cadena pesada primero y segundo comprenden, cada una, una secuencia de aminoácidos de bisagra quimérica seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9.

35

40 En otros casos, se desvela un método de preparación de un anticuerpo que comprende un primer fragmento Fc variable monocatenario (scFv-Fc) producido en un primer cultivo celular y un segundo scFv-Fc producido en un segundo cultivo celular, en el que el Fc del primer y el segundo scFv-Fc comprende cada uno una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 37, combinando los cultivos celulares primero y segundo, o los sobrenadantes de los mismos, y recuperando o aislando el primer y segundo scFv-Fc en forma heterodimérica. En algunos casos, el primer y segundo scFv-Fc se secretan en el medio de cultivo celular (por ejemplo, sobrenadante) y el método comprende combinar los medios de cultivo celulares primero y segundo y recuperar o aislar la proteína heterodimérica. En algunas realizaciones de los métodos anteriores, el Fc del primer y segundo scFv-Fc comprende cada uno una secuencia de aminoácidos de bisagra quimérica seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9.

45

50

En algunas realizaciones de la invención, la célula hospedadora se selecciona entre el grupo que consiste en CHO, COS, célula retiniana, Vero, CV1, 293, MDCK, HaK, BHK, HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo25, HB 8065, HL-60, Jurkat, Daudi, A431 (epidérmica), CV-1, U937, 3T3, célula L, célula C127, SP2/0, NS-0, célula MMT, célula tumoral, una estirpe celular derivada de cualquiera de las células mencionadas anteriormente y una célula PER.C6®.

55

Otro aspecto de la invención proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende:

- 60 (a) una primera cadena pesada que comprende un dominio de unión a antígeno capaz de reconocer y unirse a un primer antígeno diana, (b) una segunda cadena pesada que comprende un dominio de unión a antígeno capaz de reconocer y unirse a un segundo antígeno diana y (c) un dominio de unión a antígeno de cadena ligera común capaz de reconocer y unirse al primer o segundo antígeno diana, en el que la cadena pesada de (a) o (b) o, ambos (a) y (b), comprende la región constante de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 30 o SEQ ID NO: 31, o en el que la cadena pesada de (a) o (b), o ambos (a) y (b), comprende la región de bisagra quimérica que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9.
- 65

Un aspecto adicional de la invención proporciona un anticuerpo biespecífico de la invención que comprende: (a) una primera cadena pesada que comprende una primera región constante de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 30 o SEQ ID NO: 31 y (b) una segunda cadena pesada que comprende una segunda región constante de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 37.

Estos y otros objetos, junto con las ventajas y las características de la invención desvelada en el presente documento, se harán más evidentes a partir de la descripción, los dibujos y las reivindicaciones a continuación.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 muestra las convenciones de numeración de aminoácidos correspondientes para la región de bisagra de hlgG1, hlgG2 y hlgG4. La numeración de aminoácidos está de acuerdo con la Tabla Científica IMGT más recientemente actualizada (IMGT®, international Immunogenetics information system®, http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html (creada: 17 de mayo de 2001, última actualización: 10 de enero de 2013) y el índice EU como se publica en Kabat, E.A. et al. *Sequences of Proteins of Immunological interest*. 5ª ed. Departamento de Salud y Servicios Sociales de los EE.UU., Publicación de NIH N.º 91-3242 (1991). (wt = de tipo silvestre, por sus siglas en inglés; - significa que no se publicó ningún número correspondiente para la referencia particular; - significa que no se publicó el aminoácido correspondiente en esa posición para la referencia particular).

La FIG. 2 ilustra los aminoácidos de bisagra utilizados en la construcción de regiones bisagra quiméricas y las convenciones de aminoácidos correspondientes.

FIG. 3. Secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada de IgG1 humana que incluye los dominios CH1, bisagra, CH2 y CH3 que se describe como IGHG1 en el número de acceso UniProtKB/SwissProt N.º P01857 (SEQ ID NO: 13).

FIG. 4. Secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada de IgG2 humana que incluye los dominios CH1, bisagra, CH2 y CH3 que se describe como IGHG2 en el número de acceso UniProtKB/SwissProt N.º P01859 (SEQ ID NO: 14).

FIG. 5. Secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada de IgG4 humana que incluye los dominios CH1, bisagra, CH2 y CH3 que se describe como IGHG4 en el número de acceso UniProtKB/SwissProt N.º P01861 (SEQ ID NO: 15).

FIG. 6. Histogramas de un solo parámetro que muestran la unión de anticuerpo (% de Máx) a antígeno en células Jurkat en un ensayo de unión fluorescente. FIG. 6A: Se midió la fluorescencia de fondo para ensayos de control, es decir, células Jurkat incubadas con anticuerpo secundario solamente (sec) y células Jurkat sin teñir. FIG. 6B: Comparación de la unión de células Jurkat a un anticuerpo que contiene una región constante de la cadena pesada de bisagra quimérica (Ab1 = slgG4) (Ab = anticuerpo, por sus siglas en inglés) frente a la unión a un anticuerpo que contiene un dominio de unión a antígeno correspondiente y una región constante de IgG4 de tipo silvestre (wt) (Ab de control 2). FIG 6C: Comparación de la unión de células Jurkat a un anticuerpo que contiene una región constante de la cadena pesada de bisagra quimérica (Ab 2 = slgG1) frente a un anticuerpo que contiene un dominio de unión a antígeno correspondiente y una región constante de la cadena pesada de IgG1 de tipo silvestre (wt) (Ab de control 1).

FIG. 7. Curva de dosis-respuesta que representa la capacidad del anticuerpo de bisagra quimérica para unirse a células U937. Se proporcionan valores de concentración semimáxima (CE₅₀) con respecto a la unión (intensidad de fluorescencia media). (Anticuerpo de control 1 = C_H de IgG1 wt; Anticuerpo 2 = slgG1; Ab de control 2 = C_H de IgG4 wt; y Anticuerpo 1 = slgG4).

FIG. 8. Curva de dosis-respuesta que representa la falta de citotoxicidad del anticuerpo de bisagra quimérica con respecto a las células U937 en presencia de CMSP activadas (linfocitos T). Se reflejan valores de concentración semimáxima (CE₅₀) con respecto al % de citotoxicidad. (Anticuerpo de control 1 = C_H de IgG1 wt; Anticuerpo 1 = slgG4; Ab de control 2 = C_H de IgG4 wt; y Anticuerpo 2 = slgG1; Ab de control 3 = C_H de IgG1 wt).

FIG. 9. Curva de dosis-respuesta que representa la concentración semimáxima (CE₅₀) con respecto a la viabilidad celular en un ensayo de proliferación de CMSP. (Anticuerpo de control 1 = C_H de IgG1 wt; Anticuerpo 1 = slgG4; Ab de control 2 = C_H de IgG4 wt; Anticuerpo 2 = slgG1; Ab de control 3 = C_H de IgG1 wt; y Ab de control 4 = Ab no específico con C_H de IgG1 wt).

FIG 10. Curvas de dosis-respuesta que representan la falta de actividad de CDC con respecto a las células Daudi (FIG 10A) y Raji (FIG. 10B) en presencia de anticuerpos que tienen regiones C_H bisagra de tipo silvestre o quiméricas. (Anticuerpo de control 5 = Ab biespecífico con C_H de IgG1 wt; Anticuerpo 3 = slgG1*; Anticuerpo 4 = slgG1*; Control de isotipo IgG1 = Ab no específico con C_H de IgG1 wt).

FIG 11. Curvas de dosis-respuesta que representa la falta de actividad de CCDA con respecto a las células Daudi (FIG 11A) y Raji (FIG. 11B) en presencia de anticuerpos que tienen regiones C_H bisagra de tipo silvestre o quiméricas. (Anticuerpo de control 5 = Ab biespecífico con C_H de IgG1 wt; Anticuerpo 3 = slgG1*; Anticuerpo 4 = slgG1*; Control de isotipo IgG1 = Ab no específico con C_H de IgG1 wt).

Descripción detallada de la invención

Ha de entenderse que la presente invención no se limita a métodos particulares y a las condiciones experimentales descritas, ya que dichos métodos y condiciones pueden variar. También ha de entenderse que la terminología utilizada en el presente documento tiene el propósito de describir realizaciones particulares solamente y no tiene por

objeto ser limitante, puesto que el alcance de la presente invención se define por las reivindicaciones.

Como se usa en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una”, “el” y “la” incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, una referencia a “un método” incluye uno o más métodos, y/o etapas del tipo descrito en el presente documento y/o que serán evidentes para los expertos en la materia tras leer la presente divulgación.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque pueden usarse cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica de la presente invención, ahora se describen métodos y materiales particulares. Todas las publicaciones mencionadas en el presente documento se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad.

El término “inmunoglobulina” se refiere a una clase de glucoproteínas estructuralmente relacionadas que consiste en dos pares de cadenas de polipéptidos, un par de cadenas ligeras (L, por sus siglas en inglés) y un par de cadenas pesadas (H, por sus siglas en inglés), que pueden estar interconectadas por enlaces disulfuro. La estructura de las inmunoglobulinas se ha caracterizado bien. Véase, por ejemplo, *Fundamental Immunology*, Capítulo 7 (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N.Y. (1989)). En resumen, cada cadena pesada comprende normalmente una región variable de la cadena pesada (abreviada en el presente documento como V_H o VH) y una región constante de la cadena pesada (C_H o CH). La “región constante de la cadena pesada”, como se usa en el presente documento, comprende normalmente tres dominios, C_{H1}, C_{H2} y C_{H3}, mientras que los dominios C_{H1} y C_{H2} están unidos por una bisagra o un fragmento funcional de la misma. Cada cadena ligera comprende normalmente una región variable de la cadena ligera (abreviada en el presente documento como V_L o VL) y una región constante de la cadena ligera. Existen dos tipos de cadenas ligeras en seres humanos y otros mamíferos: cadena kappa (κ) y cadena lambda (λ). La región constante de la cadena ligera comprende normalmente un dominio (C_L). Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad (o regiones hipervariables que pueden ser hipervariables en la secuencia y/o forma de bucles estructuralmente definidos), también denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco conservadas (FR, por sus siglas en inglés). Cada V_H y V_L se compone normalmente de tres CDR y cuatro FR, dispuestas del extremo amino (extremo N) al extremo carboxilo (extremo C) en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (véase también Chothia y Lesk *J. Mol. Biol.* 196, 901-917 (1987)). Normalmente, la numeración de restos de aminoácidos en esta región es de acuerdo con IMGT, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed. Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de Salud de los EE.UU., Bethesda, MD. (1991) o mediante el sistema de numeración EU de Kabat (también conocido como “numeración EU” o “índice EU”), por ejemplo, como en Kabat, E.A. et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. 5ª ed. Departamento de Salud y Servicios Sociales de los EE.UU., Publicación de NIH N.º 91-3242 (1991).

El término “anticuerpo” (Ab, por sus siglas en inglés) como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de inmunoglobulina, o un derivado de la misma, que tiene la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de la molécula de inmunoglobulina contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno como se ha esbozado anteriormente como “inmunoglobulina”. Un anticuerpo también puede ser un anticuerpo biespecífico, un diacuerpo o una molécula similar (véase, por ejemplo, *PNAS USA* 90 (14), 6444-8 (1993) para una descripción de los diacuerpos). Adicionalmente, se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa, es decir, “fragmentos de unión a antígeno” o “proteínas de unión a antígeno”. Al igual que con las moléculas de anticuerpo completo, las proteínas de unión a antígeno pueden ser monoespecíficas o multiespecíficas (por ejemplo, biespecíficas). Los ejemplos de moléculas o fragmentos de unión incluidos dentro del término “anticuerpo” incluyen, pero sin limitación (i) un fragmento Fab' o Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L, V_H, C_L y C_{H1} o un anticuerpo monovalente como se describe en la publicación de patente internacional número WO2007059782; (ii) fragmentos F(ab')₂, fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste esencialmente en los dominios V_H y C_{H1}; (iv) un fragmento Fv que consiste esencialmente en dominios V_L y V_H, (v) un fragmento dAb (Ward et al., *Nature* 341, 544-546 (1989)), que consiste esencialmente en un dominio V_H y también se denomina anticuerpo de dominio (Holt et al., *Trends Biotechnol.* Nov de 2003; 21 (11): 484-90); (vi) camélidos o nanocuerpos (Reverts, et. al., *Expert Opin Biol Ther.* Enero de 2005; 5 (1): 111-24) y (vii) una región determinante de complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés) aislada.

La expresión “anticuerpo humano”, como se usa en el presente documento, tiene por objeto incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la estirpe germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de estirpe germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas mediante mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o durante el reordenamiento génico o mediante mutación somática *in vivo*).

Un fragmento multiespecífico de unión a antígeno de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico) comprenderá normalmente al menos dos dominios variables diferentes, en el que cada dominio variable es capaz de

unirse específicamente a un antígeno separado o a un epítipo diferente en el mismo antígeno. Cualquier formato de anticuerpo multiespecífico, incluyendo los formatos de anticuerpos biespecíficos desvelados en el presente documento, puede adaptarse para su uso en el contexto de un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente invención usando técnicas habituales disponibles en la técnica.

5 Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H, son codificados por genes separados, pueden unirse, usando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que permite prepararlos en forma de una única cadena proteica en la que las regiones V_L y V_H se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como anticuerpos monocatenarios o Fv monocatenario (scFv, por sus siglas en inglés), véase por ejemplo, Bird et al.,
10 *Science* 242, 423-426 (1988) y Huston et al., *PNAS USA* 85, 5879-5883 (1988)). Dichos anticuerpos monocatenarios se incluyen dentro del término "anticuerpo" a menos que se indique lo contrario o que se indique claramente por el contexto. Aunque dichos polipéptidos se incluyen en general dentro del significado de anticuerpo, colectivamente y cada uno independientemente, son características únicas de la presente invención, que presentan propiedades biológicas diferentes y utilidad. Estos y otros fragmentos de anticuerpos y polipéptidos recombinantes que son útiles en el contexto de la presente invención se analizan adicionalmente en el presente documento. También ha de entenderse que el término anticuerpo, a menos que se especifique lo contrario, también incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (mAbs, por sus siglas en inglés), polipéptidos similares a anticuerpos, tales como anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados, y cualesquiera fragmentos de anticuerpo que conserven la capacidad de unirse específicamente al antígeno (fragmentos o moléculas de unión a antígeno) proporcionada por cualquier técnica conocida, tal como escisión enzimática, síntesis peptídica y técnicas recombinantes. Un anticuerpo generado de este modo puede poseer cualquier isotipo de Ig o combinación de isotipos. Cualquier scFv puede fusionarse con las regiones constantes de la cadena pesada de la invención mediante técnicas conocidas.

Otros ejemplos de formatos biespecíficos que pueden usarse en el contexto de la presente invención incluyen, sin limitación, por ejemplo, formatos biespecíficos a base de scFv, fusiones IgG-scFv, dominio variable doble (DVD)-Ig, Quadroma, botón en ojal, cadena ligera común (por ejemplo, cadena ligera común con botón en ojal, etc.), CrossMab, CrossFab, cuerpo(SEED), Fab de doble acción (DAF)-IgG y formatos biespecíficos Mab2 (véase, por ejemplo, Klein et al., 2012, mAbs 4: 6, 1-11 y referencias citadas en dicho documento, para una revisión de los formatos anteriores). Los anticuerpos biespecíficos también pueden construirse usando la conjugación de péptido/ácido nucleico, por ejemplo, en la que se usan aminoácidos no naturales con reactividad química ortogonal para generar conjugados anticuerpo-oligonucleótido específicos de sitio que después se autoensamblan en complejos multiméricos con una composición, una valencia y una geometría definidas. (Véase, por ejemplo, Kazane et al., 2013, *J. Am. Chem. Soc.* 9; 135 (1): 340-6 [Epub: 21 de diciembre de 2012]).

35 Pueden usarse formatos multiespecíficos de ejemplo adicionales en el contexto de la presente invención incluyendo, sin limitación, por ejemplo, implicar un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a una molécula diana y un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a una proteína efectora de internalización, en los que dichos segundos dominios de unión a antígeno son capaces de activar e internalizar la proteína efectora, por ejemplo, un receptor. (Véase la Publicación de Solicitud de los EE.UU. N.º 2013/0243775A1, publicada el 19 de septiembre de 2013).

45 Pueden producirse proteínas recombinantes mediante técnicas convencionales de biología molecular bien conocidas por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Sambrook, J., E. F. Fritsch y T. Maniatis. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda edición, volúmenes 1, 2 y 3, 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, Editores Ausubel et al., Greene Publ. Assoc., Wiley Interscience, NY).

50 La frase "regiones determinantes de complementariedad" o el término "CDR" incluyen una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico de genes de inmunoglobulina (Ig) de un organismo. Las CDR son regiones de hipervariabilidad que normalmente (es decir, en el contexto de un animal de tipo silvestre) están intercaladas dentro de las regiones marco conservadas (FR) en una región variable de una cadena ligera o una cadena pesada de, por ejemplo, un anticuerpo o un receptor de linfocitos T (TCR, por sus siglas en inglés). Una CDR puede estar codificada, por ejemplo, por una secuencia de estirpe germinal o una secuencia reordenada o no reordenada, y, por ejemplo, por una célula B virgen o madura o un linfocito T. En algunas circunstancias (por ejemplo, para una CDR3), las CDR pueden estar codificadas por dos o más secuencias (por ejemplo, secuencias de estirpe germinal) que no son contiguas (por ejemplo, en una secuencia de ácido nucleico no reordenada) pero son contiguas en una secuencia de ácido nucleico de célula B, por ejemplo, como resultado del corte y empalme o conexión de las secuencias (por ejemplo, recombinación V-D-J para formar una CDR3 de cadena pesada).

60 La expresión "dominio de unión a antígeno", como se usa en el presente documento, es la secuencia de aminoácidos de una cadena pesada o cadena ligera capaz de reconocer selectivamente y unirse al antígeno con una K_D al menos en el intervalo micromolar. El dominio de unión a antígeno de la invención incluye al menos una CDR.

65 La frase "dominio variable" incluye una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera o pesada de inmunoglobulina (modificada según se desee) que comprende las siguientes regiones de aminoácidos, en secuencia del extremo N al extremo C (a menos que se indique lo contrario): FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Un

“dominio variable” incluye una secuencia de aminoácidos capaz de plegarse en un dominio canónico (VH o VL) que tiene una estructura de lámina beta doble en la que las láminas beta están conectadas por un enlace disulfuro entre un resto de una primera lámina beta y una segunda lámina beta.

- 5 La frase “cadena pesada” o “cadena pesada de inmunoglobulina (Ig)”, como se usa en el presente documento, incluye la secuencia de la región constante de la cadena pesada de Ig de cualquier organismo y, a menos que se especifique lo contrario, incluye un dominio variable de la cadena pesada. Los dominios variables de la cadena pesada incluyen tres CDR de cadena pesada y cuatro regiones FR, a menos que se especifique lo contrario. Los fragmentos de dominios variables de la cadena pesada incluyen CDR o tanto CDR como FR. Una región constante de la cadena pesada normal tiene, siguiendo el dominio variable (del extremo N al extremo C), un dominio CH1, una bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. Un fragmento funcional de una cadena pesada en una proteína de unión a antígeno incluye un fragmento que es capaz de reconocer específicamente un antígeno (por ejemplo, reconocer el antígeno con una K_D en el intervalo micromolar, nanomolar o picomolar), que es capaz de ser expresado y secretado por una célula y que comprende al menos una CDR. Para los fines de la presente invención, un fragmento funcional de una región constante de la cadena pesada incluye al menos un dominio Fc o fragmento del mismo.

La frase “proteína que contiene Fc” incluye anticuerpos, anticuerpos biespecíficos, fragmentos de unión a anticuerpo, moléculas trampa y otras proteínas de fusión receptor-Fc, y otras proteínas de unión que comprenden al menos una porción funcional de una región CH2 y CH3 de inmunoglobulina, tales como proteínas de fusión ligando-Fc. Una “porción funcional” se refiere a una región CH2 y CH3 que puede unirse a un receptor de Fc, por ejemplo, un FcγR (es decir, FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32a), FcγRIIb (CD32b), FcγRIIIa (CD16a) o FcγRIIIb (CD16b)) o FcRn, (el receptor de Fc neonatal, que confiere a los anticuerpos su semivida prolongada). Si la región CH2 y CH3 contiene deleciones, sustituciones y/o inserciones u otras modificaciones que la vuelven incapaz de unirse a cualquier receptor de Fc, entonces se considera que la región CH2 y CH3 no es funcional. Como tal, cuando se desea disminuir o eliminar ciertas funciones efectoras, cualquier proteína que contenga Fc puede modificarse mediante ingeniería genética para que comprenda una región o fragmento constante de la cadena pesada quimérica como se describe en el presente documento.

- 30 La frase “proteínas de fusión de Fc” y específicamente “proteínas de fusión receptor-Fc” incluyen proteínas recombinantes modificadas mediante ingeniería genética para que contengan un fragmento Fc funcional como se describe en el presente documento. Por ejemplo, una “proteína de fusión receptor-Fc” incluye una proteína quimérica que comprende una secuencia de aminoácidos de una proteína receptora fusionada con una secuencia de aminoácidos de un dominio Fc de Ig. Se conocen en la técnica ejemplos de proteínas receptoras utilizadas en proteínas de fusión (véase, por ejemplo, Klinkert, et. al., *J. Neuroimmunol.*, 72 (2): 163-8 (1997); Milligan, G., et. al., *Curr Pharm Des.* 10 (17): 1989-2001 (2004) y Schwache D. y Muller-Newen G., *Eur J Cell Biol.* 91 (6-7): 428-34 (2012), doi: 10.1016/j.ejcb.2011.07.008. Epub 29 de septiembre de 2011).

Los métodos de trampa de secreción autóloga basada en citometría de flujo (FASTR, del inglés *flow cytometry-based autologous secretion trap*) que utilizan hFcγRI permiten el aislamiento rápido de clones de alta expresión que expresan o secretan un anticuerpo o proteína de fusión receptor-Fc de la invención. (Véase, por ejemplo, el documento US20090137416 A1). Dichos clones de alta expresión pueden emplearse para aislar células que expresan proteínas que comprenden una región constante de la cadena pesada quimérica de la invención. Los métodos de FASTR pueden utilizarse para seleccionar y aislar directamente células que expresen cualquier polipéptido recombinante, proteína de unión a antígeno, anticuerpo o proteína de fusión de Fc de la invención.

La frase “cadena ligera” incluye una secuencia de región constante de la cadena ligera de inmunoglobulina de cualquier organismo y, a menos que se especifique lo contrario, incluye cadenas ligeras kappa y lambda humanas. Los dominios variables de la cadena ligera (VL) normalmente incluyen tres CDR y cuatro regiones marco conservadas (FR) de la cadena ligera. En general (es decir, en el contexto de un animal de tipo silvestre), una cadena ligera de longitud completa incluye, desde el extremo amino hasta el extremo carboxilo, un dominio VL que incluye FR1-CDR1-FR2CDR2-FR3-CDR3-FR4 y un dominio constante de la cadena ligera.

Los polipéptidos de la invención comprenden secuencias de aminoácidos que derivan de un dominio de inmunoglobulina. Una secuencia de aminoácidos o polipéptido “derivado de” una proteína designada se refiere al origen del polipéptido.

El término “bisagra”, como se usa en el presente documento, tiene por objeto incluir la región de restos de aminoácidos consecutivos que conectan el extremo C del C_{H1} con el extremo N del dominio C_{H2} de una inmunoglobulina. Varios aminoácidos del extremo N del dominio C_{H2} , que están codificados por el exón C_{H2} , también se consideran parte de la “bisagra inferior”. Sin quedar ligados a teoría alguna, los aminoácidos de la región bisagra de IgG1, IgG2 e IgG4 se han caracterizado por comprender 12-15 aminoácidos consecutivos codificados por un exón de bisagra distinto, y varios aminoácidos N-terminales del dominio C_{H2} (codificado por el exón C_{H2}) (Brekke, O.H., et. al., *Immunology Today* 16 (2): 85-90 (1995)). Por otro lado, IgG3 comprende una región de bisagra que consiste en cuatro segmentos: un segmento superior que se asemeja a la región de bisagra de IgG1 y 3 segmentos que son repeticiones de aminoácidos idénticas únicas para IgG3. En un anticuerpo de la invención, la bisagra

comprende una secuencia de aminoácidos de la bisagra superior de IgG1 humana o de IgG4 humana de las posiciones 216 a 227 (numeración EU) y una secuencia de aminoácidos de bisagra inferior de IgG2 humana PCAPPVA (SEQ ID NO: 3) de las posiciones 228 a 236 (numeración EU).

5 En la presente divulgación para la comodidad del médico de la invención, los aminoácidos de la región bisagra para IgG1, IgG2 e IgG4 humanas se han identificado en el presente documento mediante el sistema de numeración EU de Kabat (Kabat, E.A., et. al., *Sequences of Proteins of Immunological interest*. 5ª ed. Departamento de Salud y Servicios Sociales de los EE.UU., Publicación de NIH N.º 91-3242 (1991)), también conocido como “numeración EU” o el “índice EU”, actualizado de acuerdo con la Tabla Científica IMGT®, IMGT®, international ImMunoGeneTics information system®, http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html, creada el 17 de mayo de 2001, última actualización: 10 de enero de 2013.

15 Se describe la correspondencia entre la numeración EU para los aminoácidos de bisagra de IgG1, IgG2 e IgG4 humanas y la numeración de dominio único IMGT, la numeración de exones IMGT y las convenciones de numeración de Kabat (véase también Kabat, E.A., et. al., 1991, citado anteriormente) en la Figura 1 y como se indica a continuación:

Tabla 1: Numeración de la bisagra de IgG1

Aminoácidos de IgG1 (IGHG1) [SwissProt P01857]	Numeración única IMGT para la BISAGRA ^a	Numeración de exones IMGT ^a	Numeración EU	Numeración de Kabat
(E)	1	1	216	226
P	2	2	217	227
K	3	3	218	228
S	4	4	219	232 ^a [229] ^b
C	5	5	220	233 ^a [230] ^b
D	6	6	221	234 ^a [232] ^b
K	7	7	222	235
T	8	8	223	236
H	9	9	224	237
T	10	10	225	238
C	11	11	226	239
P	12	12	227	240
P	13	13	228	241
C	14	14	229	242
P	15	15	230	243

Los aminoácidos resultantes del corte y empalme de exones se muestran entre paréntesis.

20 ^a numeración de acuerdo con la última Tabla Científica IMGT actualizada

^b numeración de acuerdo con el índice EU publicado en Kabat, EA, et al. 1991

Véase también, por ejemplo, Lefranc, M.-P., et. al., *Devel Comp Immunol*, 29, 185-203 (2005); y Edelman, G.M. et al. *PNAS USA*, 63: 78-85 (1969).

25 Tabla 2: Numeración de la bisagra del dominio C de IgG1

Aminoácidos de IgG1 (IGHG1) [SwissProt P01857]	Numeración única IMGT para dominios C ^a	Numeración de exones IMGT ³	Numeración EU	Numeración de Kabat
(A)	1,6	1	231	244
P	1,5	2	232	245
E	1,4	3	233	246
L	1,3	4	234	247
L	1,2	5	235	248
G	1,1	6	236	249

Los aminoácidos resultantes del corte y empalme de exones se muestran entre paréntesis.

^a numeración de acuerdo con la última Tabla Científica IMGT actualizada

^b numeración de acuerdo con el índice EU publicado en Kabat, EA, et al. 1991

30 Véase también, por ejemplo, Lefranc, M.-P., et. al., *Devel Comp Immunol*, 29, 185-203 (2005); y Edelman, G.M. et al. *PNAS USA*, 63: 78-85 (1969).

Tabla 3: Numeración de la bisagra de IgG2

Aminoácidos de IgG2 (IGHG2) [SwissProt P01859]	Numeración única IMGT para la BISAGRA ^a	Numeración de exones IMGT ^a	Numeración EU	Numeración de Kabat
(E)	1	1	216	226
R	2	2	217	227
K	3	3	218	228
C	4	4	219 ^a (221) ^b	232
C	5	5	220 ^a (-) ^b	233
V	6	6	222	235
E	7	7	224	237
C	8	8	226	239
P	9	9	227	240
P	10	10	228	241
c	11	11	229	242
P	12	12	230	243

Los aminoácidos resultantes del corte y empalme de exones se muestran entre paréntesis.

- significa ningún número correspondiente publicado

^a numeración de acuerdo con la última Tabla Científica IMGT actualizada

5 ^b numeración de acuerdo con el índice EU publicado en Kabat, EA, et al. 1991

Véase también, por ejemplo, Lefranc, M.-P., et. al., *Devel Comp Immunol*, 29, 185-203 (2005); y Edelman, G.M. et al. *PNAS USA*, 63: 78-85 (1969).

Tabla 4: Numeración de la bisagra del dominio C de IgG2

Aminoácidos de IgG2 (IGHG2) [SwissProt P01859]	Numeración UE	Numeración de Kabat
(A)	231	244
P	232	245
P	233	246
V	234	247
A	235	248
-	236	249

Los aminoácidos resultantes del corte y empalme de exones se muestran entre paréntesis.
- significa ningún aminoácido correspondiente en esta posición

10

Tabla 5: Numeración de la bisagra de IgG4

Aminoácidos de IgG4 (IGHG4) [SwissProt P01861]	Numeración única IMGT para la BISAGRA ^a	Numeración de exones IMGT ^a	Numeración EU	Numeración de Kabat
(E)	1	1	216	226
S	2	2	217	227
K	3	3	218	228
Y	4	4	- ^a (219) ^b	229
G	5	5	- ^a (220) ^b	230
P	6	6	224	237
P	7	7	225	238
C	8	8	226	239
P	9	9	227	240
S	10	10	228	241
C	11	11	229	242
P	12	12	230	243

Los aminoácidos resultantes del corte y empalme de exones se muestran entre paréntesis.

- significa ningún número correspondiente publicado

^a numeración de acuerdo con la última Tabla Científica IMGT actualizada

15 ^b numeración de acuerdo con el índice EU publicado en Kabat, EA, et al. 1991

Véase también, por ejemplo, Lefranc, M.-P., et. al., *Devel Comp Immunol*, 29, 185-203 (2005); y Edelman, G.M. et al. *PNAS USA*, 63: 78-85 (1969).

Tabla 6: Numeración de la bisagra del dominio C de IgG4

Aminoácidos de IgG4 (IGHG4) [SwissProt P01861]	Numeración UE	Numeración de Kabat
(A)	231	244
P	232	245
E	233	246
F	234	247
L	235	248
G	236	249

Los aminoácidos resultantes del corte y empalme de exones se muestran entre paréntesis.

- significa ningún número correspondiente publicado

^a numeración de acuerdo con la última Tabla Científica IMGT actualizada

^b numeración de acuerdo con el índice EU publicado en Kabat, EA, et al. 1991

- 5 Véase también, por ejemplo, Lefranc, M.-P., et al., *Devel Comp Immunol*, 29, 185-203 (2005); y Edelman, G.M. et al. *PNAS USA*, 63: 78-85 (1969).

10 Para los fines de la presente divulgación, una región de "bisagra superior" tiene por objeto incluir restos de aminoácidos de las posiciones 216 a 227 de acuerdo con la numeración EU (restos de aminoácidos de las posiciones 226 a 240 de acuerdo con la numeración de Kabat) (véase también la Figura 2). Una región de "bisagra inferior" tiene por objeto incluir restos de aminoácidos de las posiciones 228 a 236 de acuerdo con la numeración EU (restos de aminoácidos de las posiciones 241 a 249 de acuerdo con la numeración de Kabat) (véase también la Figura 2).

15 El término "quimérico", como se usa en el presente documento, significa compuesto de partes de origen diferente. La frase "proteína quimérica" incluye una primera proteína de aminoácidos unida a una segunda proteína de aminoácidos que normalmente no está unida en la naturaleza. Las secuencias de aminoácidos pueden existir normalmente como proteínas separadas o en una disposición diferente en la misma proteína y se juntan en un nuevo polipéptido de fusión en una nueva disposición. Las proteínas quiméricas pueden crearse mediante diversos métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante síntesis química o mediante la creación de un polinucleótido que codifica aminoácidos de la proteína quimérica en la disposición deseada. Las proteínas quiméricas de ejemplo incluyen las secuencias de bisagra quiméricas que conectan dominios de la cadena pesada de IgG y las proteínas de fusión modificadas mediante ingeniería genética para preparar los anticuerpos humanos, las proteínas de unión a antígeno y las proteínas de fusión receptor-Fc de la presente invención.

20 Las proteínas quiméricas desveladas en el presente documento se diseñaron para minimizar la creación de epítomos inmunógenos en las uniones, por ejemplo, en comparación con un dominio o región Fc de la IgG de tipo silvestre. Por tanto, las proteínas modificadas mediante ingeniería genética de la invención tienen una inmunogenia reducida y muestran una unión reducida a receptores de Fc, así como también funciones efectoras reducidas o ninguna función efectora.

25 La expresión "bisagra quimérica", como se usa en el presente documento, tiene por objeto incluir una proteína quimérica que comprende una primera secuencia de aminoácidos derivada de la región bisagra de una molécula de Ig y una segunda secuencia de aminoácidos derivada de la región bisagra de una clase o subclase diferente de molécula de Ig. Las bisagras quiméricas de ejemplo de la presente invención comprenden una primera secuencia de aminoácidos, o una secuencia de "bisagra superior", derivada de una región bisagra de IgG1 o IgG4 humanas y una segunda secuencia de aminoácidos, o una secuencia de "bisagra inferior", derivada de una región de bisagra de IgG2 humana. En ciertas realizaciones, la primera secuencia o de "bisagra superior" comprende restos de aminoácidos de las posiciones 216 a 227 de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones, la segunda secuencia o de "bisagra inferior" comprende restos de aminoácidos de las posiciones 228 a 236 de acuerdo con la numeración EU.

30 La expresión "anticuerpo humanizado", como se usa en el presente documento, tiene por objeto incluir anticuerpos en los que las secuencias de CDR derivan de la estirpe germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, y se han injertado en secuencias de región marco conservada humanas. Pueden generarse anticuerpos monoclonales humanizados mediante un hibridoma que incluye una célula de linfocito B obtenida de un animal no humano transgénico o transcrómico, tal como un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera, fusionados con una célula inmortalizada. Por ejemplo, cuando se preparan anticuerpos no humanos con respecto a un antígeno particular, las regiones variables se pueden "remodelar" o "humanizar" injertando CDR derivadas de anticuerpos no humanos en las FR presentes en el anticuerpo humano que se ha de modificar. La aplicación de este enfoque ha sido publicada por Sato, K. et al. *Cancer Research* 53: 851-856 (1993); Riechmann, L., et al., *Nature* 332: 323-327 (1988); Verhoeven, M., et al., *Science* 239: 1534-1536 (1988); Kettleborough, C. A., et al., *Protein Engineering* 4: 773-778 (1991); Maeda, H., et al., *Human Antibodies Hybridoma* 2: 124-134 (1991); Gorman, S. D., et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 4181-4185 (1991); Tempest, P. R., et al., *Bio/Technology* 9: 266-271 (1991); Co, M. S., et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 2869-2873 (1991); Carter, P., et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 4285-4289 (1992); y Co, M. S. et al., *J Immunol* 148:

1149-1154 (1992). En algunas realizaciones, los anticuerpos humanizados conservan todas las secuencias de CDR (por ejemplo, un anticuerpo de ratón humanizado que contiene las seis CDR de los anticuerpos de ratón). En otras realizaciones, los anticuerpos humanizados tienen una o más (una, dos, tres, cuatro, cinco o seis) CDR que están alteradas con respecto al anticuerpo original, que también se denominan una o más CDR "derivadas de" una o más CDR del anticuerpo original. Los anticuerpos humanizados pueden referirse a moléculas quiméricas preparadas usando técnicas recombinantes.

En otra realización, los anticuerpos quiméricos que comprenden regiones variables humanas unidas a regiones constantes murinas, tales como las producidas por líneas celulares generadas por un ratón VELOCIMMUNE, se humanizan reemplazando la región constante murina por una región constante humana que comprende la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 37.

Las expresiones "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" como se usan en el presente documento se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra una única especificidad y afinidad de unión para un epítipo particular. En consecuencia, la expresión "anticuerpo monoclonal murino o de ratón" se refiere a anticuerpos que presentan una única especificidad de unión que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de estirpe germinal murina o de ratón.

Como se usa en el presente documento, el término "unión" en el contexto de la unión de un anticuerpo, Ig, fragmento de unión a anticuerpo o proteína que contiene Fc a, por ejemplo, un antígeno predeterminado o a un FcR, normalmente se refiere a una interacción o asociación entre un mínimo de dos entidades o estructuras moleculares, tal como una interacción anticuerpo-antígeno o una proteína que contiene Fc a un FcγR (en la que la proteína que contiene Fc es un anticuerpo, Ig, fragmento de unión a anticuerpo o proteína de fusión con Fc, por ejemplo, fusión receptor-Fc).

Por ejemplo, la afinidad de unión normalmente corresponde a un valor de K_D de aproximadamente 10^{-7} M o menos, tal como aproximadamente 10^{-8} M o menos, tal como aproximadamente 10^{-9} M o menos cuando se determina, por ejemplo, mediante tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR, por sus siglas en inglés) en un instrumento BIAcore 3000 usando el antígeno o FcR como ligando y el anticuerpo, Ig, fragmento de unión a anticuerpo o proteína que contiene Fc como analito (o antiligando). En consecuencia, el anticuerpo u otra proteína de unión se une al antígeno o receptor predeterminado con una afinidad correspondiente a un valor de K_D que es al menos diez veces menor, tal como al menos 100 veces menor, por ejemplo, al menos 1.000 veces menor, tal como al menos 10.000 veces menor, por ejemplo, al menos 100.000 veces inferior a su afinidad para la unión a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína).

El término " K_D " (M), como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de equilibrio de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular o la constante de equilibrio de disociación de un anticuerpo, Ig, fragmento de unión a anticuerpo o proteína que contiene Fc a un FcγR. Existe una relación inversa entre K_D y la afinidad de unión, por tanto, cuanto menor es el valor de K_D , mayor es la afinidad. Por tanto, la expresión "afinidad inferior" se refiere a una capacidad inferior para formar una interacción y, por tanto, un valor mayor de K_D .

El término " k_d " (s^{-1} o 1/s), como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de velocidad de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular o la constante de velocidad de disociación de un anticuerpo, Ig, fragmento de unión a anticuerpo o proteína que contiene Fc de un FcγR. Dicho valor también se conoce como el valor k_{off} .

El término " k_a " ($M^{-1} \times s^{-1}$ o 1/M), como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de velocidad de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular o la constante de velocidad de asociación de un anticuerpo, Ig, unión a anticuerpo fragmento o proteína que contiene Fc a un FcγR.

El término " K_A " (M^{-1} o 1/M), como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de equilibrio de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular o la constante de equilibrio de asociación de un anticuerpo, Ig, fragmento de unión a anticuerpo o proteína que contiene Fc a un FcγR. La constante de equilibrio de asociación se obtiene dividiendo k_a por k_d .

El término " CE_{50} " o " CE_{50} ", como se usa en el presente documento, se refiere a la mitad de la concentración eficaz máxima, que incluye la concentración de un anticuerpo que induce una respuesta a mitad de camino entre el valor basal y el máximo después de un tiempo de exposición especificado. La CE_{50} representa esencialmente la concentración de un anticuerpo en el que se observa el 50 % de su efecto máximo. Por tanto, se observa una unión reducida con una CE_{50} aumentada, o la mitad del valor de concentración eficaz máxima.

En una realización, la disminución de la unión puede definirse como una concentración de anticuerpo CE_{50} aumentada que permite la unión a la cantidad semimáxima de células diana.

En algunas realizaciones, la disminución de la actividad citotóxica puede definirse como una concentración de

anticuerpo CE₅₀ aumentada que permite la lisis de la cantidad semimáxima de células diana.

En otras realizaciones, la disminución de la proliferación puede definirse como una concentración de anticuerpo CE₅₀ aumentada que permite la proliferación de la cantidad semimáxima de células diana.

La frase “anticuerpo biespecífico” como se usa en el presente documento incluye anticuerpos que son específicos para diferentes epítomos de un polipéptido diana o que pueden contener dominios de unión a antígeno específicos para más de un polipéptido diana. Véase, por ejemplo, Tutt et al. (1991) *J. Immunol.* 147: 60-69. Por ejemplo, los anticuerpos humanos pueden unirse o coexpresarse con otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína. Por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo puede unirse funcionalmente (por ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo) a una o más entidades moleculares, tales como otro anticuerpo o fragmento de anticuerpo, para producir un anticuerpo biespecífico o multiespecífico con una segunda especificidad de unión. Como tal, un anticuerpo biespecífico también incluye dos anticuerpos de diferente especificidad.

Puede emplearse otra estrategia, por ejemplo, usar una cadena ligera común, como se describe en la Publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. N.º 20100331527A1, en la que dos anticuerpos de diferente especificidad usan la misma cadena ligera. En ciertas realizaciones, la cadena pesada de al menos una de las cadenas pesadas de Ig en un anticuerpo biespecífico se modifica para comprender una región constante de la cadena pesada quimérica que comprende un polipéptido recombinante de la invención. En algunas realizaciones, al menos una de las cadenas pesadas se modifica en el dominio CH3 dando como resultado una afinidad diferencial por el anticuerpo biespecífico para un reactivo de afinidad, tal como la Proteína A, para facilitar el aislamiento. En otra realización, al menos una de las cadenas pesadas en dicho anticuerpo biespecífico comprende una modificación de aminoácidos en i) 95R o ii) 95R y 96F en el sistema de numeración IMGT (95R y 96F corresponden a 435R y 436F en el sistema de numeración EU), por ejemplo, la SEQ ID NO: 37 y la SEQ ID NO: 38. (Véase el documento US20100331527A1, cuyo contenido se incorpora en el presente documento por referencia). Un fragmento de unión a antígeno multiespecífico de un anticuerpo comprenderá normalmente al menos dos dominios variables diferentes, en los que cada dominio variable es capaz de unirse específicamente a un antígeno separado o a un epítomo diferente en el mismo antígeno. Cualquier formato de anticuerpo multiespecífico puede adaptarse para su uso en el contexto de una proteína de unión a antígeno o anticuerpo de la presente invención usando técnicas habituales disponibles en la técnica.

Como se usa en el presente documento, “isotipo” se refiere a la clase de inmunoglobulina (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE o IgM) que está codificada por genes de la región constante de la cadena pesada.

El término “epítomo” significa un determinante antigénico capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. Los epítomos por lo general consisten en agrupaciones de superficie de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y por lo general tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítomos conformacionales y no conformacionales se distinguen porque la unión a los primeros, pero no a los últimos, se pierde en presencia de disolventes desnaturizantes. El epítomo puede comprender restos de aminoácidos implicados directamente en la unión (también denominados componente inmunodominante del epítomo) y otros restos de aminoácidos, que no están directamente implicados en la unión, tales como restos de aminoácidos que están bloqueados eficazmente por el péptido de unión a antígeno específico (en otras palabras, el resto de aminoácido está dentro de la huella del péptido de unión a antígeno específico).

Como se usa en el presente documento, un anticuerpo humanizado “deriva de” una secuencia de estirpe germinal particular si el anticuerpo se obtiene de un sistema que usa secuencias de inmunoglobulina humana, por ejemplo, mediante la inmunización de un ratón transgénico que porta genes de inmunoglobulina humana o mediante la selección de una biblioteca de genes de inmunoglobulina humana, y en el que la secuencia del dominio V del anticuerpo humano seleccionado es al menos un 90 %, tal como al menos un 95 %, por ejemplo, al menos un 96 %, tal como al menos un 97 %, por ejemplo, al menos un 98 % o al menos un 99 % idéntico en la secuencia del dominio de aminoácidos V a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la estirpe germinal.

Normalmente, fuera de la CDR3 de la cadena pesada, un anticuerpo humano derivado de una secuencia de estirpe germinal humana particular mostrará no más de 20 diferencias de aminoácidos, por ejemplo, no más de 10 diferencias de aminoácidos, tal como no más de 9, 8, 7, 6 o 5, por ejemplo, no más de 4, 3, 2 o 1 diferencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la estirpe germinal.

La expresión “animal transgénico no humano” se refiere a un animal no humano que tiene un genoma que comprende uno o más transgenes o transcromosomas de cadena pesada y/o ligera humana (ya sea integrados o no integrados en el ADN genómico natural del animal) y que es capaz de expresar anticuerpos completamente humanos. Se han notificado anteriormente ratones que expresan anticuerpos que son completamente humanos o parcialmente humanos y parcialmente de ratón. Por ejemplo, un ratón transgénico puede tener un transgén de cadena ligera humana y un transgén de cadena pesada humana o transcromosoma de cadena pesada humana, de manera que el ratón produce anticuerpo humano cuando se inmuniza con antígeno diana y/o células que expresan el antígeno diana. El transgén de cadena pesada humana puede integrarse en el ADN cromosómico del ratón, como

es el caso de los ratones transgénicos, por ejemplo, los ratones HuMAb, tales como los ratones HCo7 o HCo12, o el transgén de cadena pesada humana puede mantenerse extracromosómicamente, como es el caso para ratones KM transcromosómicos como se describe en el documento WO02/43478. Dichos ratones transgénicos y transcromosómicos (denominados colectivamente en el presente documento "ratones transgénicos") son capaces de producir múltiples isotipos de anticuerpos monoclonales humanos contra un antígeno dado (tales como IgG, IgA, IgM, IgD y/o IgE) experimentando la recombinación V-D-J y cambio de isotipo.

Los ratones modificados genéticamente VELOCIMMUNE® comprenden un reemplazo de segmentos génicos V(D)J no reordenados en loci de ratón endógenos con segmentos génicos V(D)J humanos. Los ratones VELOCIMMUNE® expresan anticuerpos quiméricos que tienen dominios variables humanos y dominios constantes de ratón (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 7.605.237). La mayor parte de los demás informes se refieren a ratones que expresan anticuerpos completamente humanos a partir de transgenes completamente humanos en ratones que tienen loci de inmunoglobulina endógenos desactivados.

El ratón VELOCIMMUNE® incluye, en parte, un genoma que comprende regiones variables humanas unidas operativamente a loci de región constante de ratón endógenos, de modo que el ratón produce anticuerpos que comprenden una región variable de la cadena pesada humana y una región constante de la cadena pesada de ratón en respuesta a la estimulación antigénica. El ADN que codifica las regiones variables de las cadenas pesadas de los anticuerpos puede aislarse y unirse operativamente al ADN que codifica las regiones constantes de la cadena pesada humana de la invención. Después, el ADN puede expresarse en una célula capaz de expresar la cadena pesada completamente humana del anticuerpo.

También puede usarse un animal transgénico no humano para la producción de anticuerpos contra un antígeno específico mediante la introducción en los genes animales que codifican dicho anticuerpo específico, por ejemplo, uniendo operativamente los genes a un gen que se expresa en la leche del animal.

La frase "funciones efectoras", como se usa en el presente documento, tiene por objeto incluir las capacidades funcionales transmitidas por una proteína que contiene Fc tras unirse a un FcγR. Sin quedar ligados a teoría alguna, la formación de un complejo Fc/FcγR recluta una diversidad de células efectoras en sitios de antígeno unido, normalmente dando como resultado diversos eventos de señalización dentro de las células e importantes respuestas inmunitarias posteriores.

Un "polipéptido no efector" se refiere a un polipéptido recombinante, proteína de unión a antígeno o anticuerpo que tiene una función efectora alterada o reducida en comparación con un polipéptido recombinante, proteína de unión a antígeno o anticuerpo correspondiente que comprende una región constante de la cadena pesada de tipo silvestre del isotipo IgG1 o IgG4. En algunas realizaciones, la función efectora que se reduce o se altera es una función efectora citotóxica, por ejemplo, citotoxicidad, citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), citotoxicidad dependiente del anticuerpo (CCDA) o fagocitosis celular dependiente del anticuerpo (FCDA). En una realización, la función efectora que se reduce o se altera es la citotoxicidad dependiente del complemento. En otra realización, la función efectora que se reduce o se altera es la citotoxicidad dependiente del anticuerpo. En otras realizaciones, la función efectora que se reduce o se altera es la proliferación celular.

Varias funciones efectoras de los anticuerpos están mediadas, al menos en parte, por receptores de Fc (FcR), que se unen a la región Fc de un anticuerpo en el dominio constante (específicamente, el dominio C_H2 y C_H3) de una inmunoglobulina típica. Existen varios receptores de Fc que son específicos para las diferentes clases de inmunoglobulinas, es decir, IgG, IgE, IgA, IgM e IgD. La familia del receptor de Fc de IgG humana se divide en tres grupos: FcγRI (CD64), que es capaz de unirse a IgG con alta afinidad, FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16), ambos son receptores de baja afinidad. Cada subclase de FcγR está codificada por dos o tres genes y el corte y empalme de ARN alternativo conduce a transcritos múltiples, por tanto, existe una amplia diversidad en isoformas de FcγR (por ejemplo, FcγRIA (CD64; FCGR1A), FcγRIB (CD64; FCGR1B), FcγRIIA (CD32; FCGR2A), FcγRIIB (CD32; FCGR2B), FcγRIIC (CD32; FCGR2C), FcγRIIIA (CD16a; FCGR3A) y FcγRIIIB (CD16b; FCGR3B)). Adicionalmente, el FcRn o receptor de Fc neonatal (también conocido como transportador del receptor de Fc, alfa o FCGRT) es capaz de transferir anticuerpos IgG de la madre al feto a través de la placenta. Además, los receptores de Fc se expresan en una diversidad de células, incluyendo, por ejemplo, células B, monocitos, células dendríticas, neutrófilos y determinados linfocitos. Por ejemplo, las células U937, una estirpe celular de monocitos humanos, expresan FcγRI y FcγRIIA (véase, por ejemplo, Jones, et. al., *J Immunol* 135 (5): 3348-53 (1985) y Brooks, et. al., *J Exp Med* 170: 1369-85 (octubre de 1989)).

La unión de un Fc de Ig a su receptor lleva estas células efectoras a sitios del antígeno unido, dando como resultado en última instancia una diversidad de respuestas inmunitarias y de señalización, incluyendo la activación de células B, respuestas inflamatorias, respuestas citotóxicas y respuestas fagocíticas. Como tal, la unión reducida o alterada de un Fc de Ig a su receptor puede dar como resultado la disminución de las funciones efectoras.

Como alternativa, el aumento de las "funciones efectoras" tales como citotoxicidad, citotoxicidad dependiente del complemento ("CDC"), citotoxicidad dependiente del anticuerpo ("CCDA") y la producción anormal de anticuerpos, pueden ser efectos secundarios no deseados asociados a determinados anticuerpos terapéuticos.

La frase “citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo”, “citotoxicidad dependiente de la célula y dependiente del anticuerpo” o “CCDA” significa una actividad para dañar una célula diana cuando una célula que lleva el receptor de Fc γ (una célula inmunitaria o similar) se une a una porción Fc de un anticuerpo específico a través del receptor Fc γ , cuando el anticuerpo específico se ha unido a un antígeno de superficie celular de la célula diana. Por tanto, la CCDA es un mecanismo mediante el cual las células efectoras positivas para el receptor de Fc pueden lisar células diana que tienen una molécula adherente específica de antígeno. La actividad de CCDA puede evaluarse mediante una serie de métodos bien conocidos, incluyendo la medición de la intensidad fluorescente usando un colorante fluorescente tal como calceína AM (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 349-07201). Cuando se emplea este enfoque, puede calcularse la actividad citotóxica (%), usando los valores obtenidos, de acuerdo con la ecuación: $(A-C)/(B-C) \times 100$, en la que A es un valor de fluorescencia en cada muestra, B es un valor promedio de fluorescencia de las células lisadas y liberadas en un medio con Nonidet P-40 que tiene una concentración final del 1 % y C es un valor de fluorescencia promedio cuando solamente se añadió el medio.

La frase “fagocitosis celular dependiente del anticuerpo” o “FCDA”, como se usa en el presente documento, se refiere a la función efectora que elimina (o destruye) una célula diana engullendo la célula diana en lugar de inducir la citólisis. FCDA puede ser un mecanismo *in vivo* importante para destruir células tumorales. La FCDA puede medirse mediante métodos de citometría de flujo de fluorescencia bicolor, por ejemplo, métodos que utilizan, por ejemplo, PKH2 (colorante fluorescente de color verde) y anticuerpos monoclonales conjugados con ficoeritrina (rojo) contra diferentes proteínas de la superficie celular para diferenciar las células de ensayo, determinando de este modo la actividad fagocítica y la tasa de fagocitosis. Las estrategias terapéuticas que activan selectivamente Fc γ RIIIa con respecto a Fc γ RIIb pueden potenciar la actividad fagocítica de los macrófagos (Richards, JO, et. al., 2008 *Mol Cancer Ther* 7 (8): 2517-27).

La frase “citotoxicidad dirigida por el complemento” o “CDC”, como se usa en el presente documento, incluye una actividad citotóxica por el sistema del complemento. La actividad CDC se mide mediante métodos bien conocidos, por ejemplo, se incuban células diana, anticuerpos y solución del complemento (tal como el complemento de cría de conejo (Cedarlane Technologies) y se les permite reaccionar, de acuerdo con los protocolos convencionales (*NIAID Manual of Tissue Typing Techniques* 1979-1980, editado por J.G. Ray, Publicación de NIH N.º NIH-83-545.) La actividad citotóxica puede calcularse de la misma manera que la medición de la actividad de CCDA. La actividad citotóxica también puede medirse usando un colorante fluorescente (tal como calceína) o colorantes radiactivos de forma similar a los anteriores con respecto a CCDA.

La frase “citotoxicidad” o “citotoxicidad directa” incluye cualquier actividad citotóxica incluyendo la que es independiente de linfocitos NK. La citotoxicidad puede medirse mediante técnicas bien conocidas en la técnica, por ejemplo, determinando la lisis celular o la muerte celular, es decir, la apoptosis. La lisis celular directa, o la muerte celular, puede evaluarse mediante una serie de métodos bien conocidos, incluyendo la medición de la intensidad fluorescente usando calceína y calculando un valor de fluorescencia promedio de una manera similar a la descrita con respecto a CCDA anteriormente en el presente documento. Como alternativa, una molécula citotóxica, tal como un anticuerpo, es eficaz en un ensayo de apoptosis mediante la activación de un programa genético de muerte celular controlada. La apoptosis se caracteriza por eventos citológicos y moleculares bien definidos incluyendo un cambio en el índice de refracción de la célula, la contracción citoplásmica, la condensación nuclear y la escisión del ADN en fragmentos de tamaño regular. Las células que experimentan apoptosis detienen el metabolismo, pierden la integridad de la membrana y forman ampollas de membrana. La actividad apoptótica se mide usando métodos convencionales de determinación de células moribundas y/o muertas. Con el fin de medir la apoptosis, pueden emplearse ensayos de citotoxicidad. Estos ensayos pueden ser ensayos radioactivos o no radioactivos que miden aumentos en la permeabilidad de la membrana plasmática, puesto que las células moribundas tienen fugas. Pueden emplearse ensayos colorimétricos que miden la reducción de la actividad metabólica de las mitocondrias basándose en el conocimiento de que las mitocondrias en células muertas no pueden metabolizar colorantes, mientras que las mitocondrias en las células vivas sí pueden. Se desarrollaron ensayos de citotoxicidad bioluminiscente (por ejemplo, CytoTox-Glo™, Promega) para medir la liberación de marcadores de proteasa estables en el medio de cultivo celular. La actividad proteasa se considera un marcador enzimático robusto de muerte celular y puede usarse como una medición radiométrica de células viables y muertas (Niles, A.L., et. al., *Anal Biochem*, 366 (2): 197-206, 15 de julio de 2007).

También pueden medirse indicadores tempranos de la apoptosis, tales como alteraciones en la asimetría de la membrana que dan como resultado la presencia de fosfatidilserina en el exterior de la superficie celular (ensayos a base de Anexina V). Como alternativa, las etapas posteriores de la apoptosis, tales como la activación de las caspasas, pueden medirse en poblaciones de células o en células individuales. Además, puede determinarse la medición de la liberación de citocromo C y AIF dentro del citoplasma por las mitocondrias o la fragmentación del ADN cromosómico. El marcado del extremo libre de dUTP por desoxinucleotidil transferasa (TUNEL, del inglés *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) es un método común para detectar la fragmentación del ADN que es resultado de las cascadas de señalización apoptótica. El ensayo se basa en la presencia de mellas en el ADN que pueden ser identificadas por la desoxinucleotidil transferasa terminal, una enzima que catalizará la adición de dUTP bromolados que se detectan secundariamente con un anticuerpo marcado específico.

La citotoxicidad puede estar dirigida por el complemento, dirigida por anticuerpos o puede estar directamente

asociada a la unión de una molécula citotóxica o célula.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la invención presentan una citotoxicidad inferior al 20 % de citólisis (es decir, % de citotoxicidad), o inferior al 10 % o al 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o incluso del 0 %, o una citólisis indetectable (citotoxicidad), medida en un ensayo *in vitro* o *ex vivo* de destrucción celular. En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la invención presentan menos del 20 %, 10 % o el 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o incluso del 0 %, o una citotoxicidad indetectable, a una concentración de anticuerpo de 10 nM.

En otras realizaciones, los anticuerpos presentan una actividad apoptótica inferior al 20 % de citólisis (es decir, % de citotoxicidad), o inferior al 10 % o al 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o incluso del 0 %, o una citólisis indetectable (citotoxicidad), medida en un ensayo *in vitro* o *ex vivo* de destrucción celular. En otras realizaciones más, en ciertas realizaciones, los anticuerpos de la invención presentan una actividad apoptótica inferior al 20 %, 10 % o al 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o incluso del 0 % o indetectable, a una concentración de anticuerpo de 10 nM.

En otras realizaciones más, los anticuerpos presentan una actividad de CDC inferior a aproximadamente el 50 % de citotoxicidad, o inferior a una citotoxicidad del 40 %, 30 %, 20 %, 10 % o del 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, o incluso del 0 % o una citotoxicidad indetectable, medida en un ensayo *in vitro* o *ex vivo* de destrucción celular. En otras realizaciones más, en ciertas realizaciones, los anticuerpos de la invención presentan una actividad de CDC inferior al 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 % o al 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, o incluso del 0 % o indetectable, a una concentración de anticuerpo de 100 nM. En más realizaciones, los anticuerpos presentan una actividad de CCDA inferior a aproximadamente el 50 % de citotoxicidad, o inferior a una citotoxicidad del 40 %, 30 %, 20 %, 10 % o 5 %, del 4 %, 3 %, 2 %, o incluso del 0 %, o una citotoxicidad indetectable, medida en un ensayo *in vitro* o *ex vivo* de destrucción celular. En otras realizaciones más, en ciertas realizaciones, los anticuerpos de la invención presentan una actividad de CCDA inferior al 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 % o al 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, o incluso del 0 % o indetectable, a una concentración de anticuerpo de 100 nM.

La presente invención proporciona anticuerpos que comprenden polipéptidos recombinantes que comprenden una bisagra quimérica y proporcionan adicionalmente funciones efectoras reducidas. Las propiedades de dichos polipéptidos recombinantes de la invención pueden compararse con las propiedades de una o más proteínas de referencia. Véanse los ejemplos a continuación por referencia, o anticuerpos de control y proteínas de unión a antígeno que tienen regiones variables y regiones constantes correspondientes (por ejemplo, que tienen una región C_H de IgG1 de tipo silvestre (SEQ ID NO: 13) o una región C_H de IgG4 de tipo silvestre (SEQ ID NO: 15) en comparación con los anticuerpos quiméricos de la invención, y pueden usarse en determinadas metodologías de ensayo para la comparación de las propiedades funcionales o farmacocinéticas con los anticuerpos y las proteínas de unión a antígeno de la invención. Se entiende que una región C_H de IgG de tipo silvestre correspondiente difiere de las regiones C_H quiméricas de la invención en que la región C_H de IgG "de tipo silvestre" deriva de la secuencia de aminoácidos de IgG natural que contiene (del extremo N al extremo C) un dominio CH1, una bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. La IgG de tipo silvestre puede incluir variantes que tienen una o más modificaciones de aminoácidos conservando al mismo tiempo esencialmente las mismas características funcionales que la IgG natural. Un anticuerpo o polipéptido correspondiente puede ensamblarse para que tenga el mismo dominio de unión a la diana (por ejemplo, V_H y/o V_L) que el anticuerpo o polipéptido que tiene la región C_H quimérica o, de otro modo, tiene esencialmente la misma funcionalidad para los fines de comparación en determinados ensayos.

Se ha demostrado en los Ejemplos que los anticuerpos aislados de la invención se unen débilmente a células que expresan FcγR, por ejemplo, células efectoras, pero que sin embargo carecen de funciones efectoras, tales como la citotoxicidad y la proliferación, en comparación con las funciones efectoras de un anticuerpo correspondiente que comprende una región C_H de IgG1 o IgG4 de tipo silvestre.

Aspectos adicionales de la invención

Un anticuerpo de la invención comprende una región bisagra quimérica. La región bisagra quimérica comprende una secuencia de aminoácidos de bisagra inferior de IgG2 humana PCPAPPVA (SEQ ID NO: 3) de las posiciones 228 a 236 (numeración EU). La región de bisagra quimérica también comprende: una secuencia de aminoácidos de bisagra superior de IgG1 humana o de IgG4 humana de las posiciones 216 a 227 (numeración EU) y una secuencia de aminoácidos de bisagra inferior de IgG2 humana PCPAPPVA (SEQ ID NO: 3) de las posiciones 228 a 236 (numeración EU), del extremo N al extremo C.

En otros aspectos, la región de bisagra quimérica comprende: una secuencia de aminoácidos de bisagra superior de las posiciones 216 a 227 (numeración EU) seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, y una secuencia de aminoácidos de bisagra inferior PCPAPPVA (SEQ ID NO: 3) de las posiciones 228 a 236 (numeración EU), desde el extremo N hasta el extremo C.

Por tanto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una región constante (CH) de la cadena pesada que comprende, del extremo N al extremo C, un dominio CH1, una bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3, en el que:

- (a) el dominio CH1 comprende un dominio CH1 de IgG1 humana o un dominio CH1 de IgG4 humana que tiene la secuencia de aminoácidos DKKV o DKRV de las posiciones 212 a 215 (numeración EU),
 (b) la bisagra comprende una secuencia de aminoácidos de bisagra superior de IgG1 humana o de IgG4 humana de las posiciones 216 a 227 (numeración EU) y una secuencia de aminoácidos de bisagra inferior de IgG2 humana PCPAPPVA (SEQ ID NO: 3) de las posiciones 228 a 236 (numeración EU),
 (c) el dominio CH2 comprende una secuencia de aminoácidos del dominio CH2 de IgG4 humana de las posiciones 237 a 340 (numeración EU), y
 (d) el dominio CH3 comprende una secuencia del dominio CH3 de IgG1 humana o de IgG4 humana de las posiciones 341 a 447 (numeración EU), y

en el que el anticuerpo es capaz de unirse a un FcγR con menor afinidad que un anticuerpo correspondiente que comprende una región constante de la cadena pesada de IgG1 de tipo silvestre o de IgG4 de tipo silvestre, el anticuerpo es capaz de unirse a FcγRIIA y opcionalmente a FcγRIIB, y el anticuerpo es capaz de unirse a FcγRIIA con mayor afinidad en comparación con su afinidad de unión a FcγRIIB. En una realización, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo monoclonal que comprende una región constante de la cadena pesada que comprende o consiste en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 30 o SEQ ID NO: 31. En otra realización, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo monoclonal que comprende al menos una cadena pesada con una región constante que comprende o que consiste en la SEQ ID NO: 38 o 37.

Tabla 7. Construcciones de C_H quimérica representativa

SEQ ID NO de la construcción de C _H	CH1	Bisagra superior	Bisagra inferior	CH2	CH3
1	DKRV (SEQ ID NO: 5)	ESKYGPPCP (SEQ ID NO: 7)	PCPAPPVA (SEQ ID NO: 3)	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 12
2	DKKV (SEQ ID NO: 4)	EPKSCDKTHTCP (SEQ ID NO: 6)	PCPAPPVA (SEQ ID NO: 3)	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 11
30	SEQ ID NO: 43	EPKSCDKTHTCP (SEQ ID NO: 6)	PCPAPPVA (SEQ ID NO: 3)	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 11
31	SEQ ID NO: 44	ESKYGPPCP (SEQ ID NO: 7)	PCPAPPVA (SEQ ID NO: 3)	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 12
37	SEQ ID NO: 43	EPKSCDKTHTCP (SEQ ID NO: 6)	PCPAPPVA (SEQ ID NO: 3)	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 41
38	SEQ ID NO: 44	ESKYGPPCP (SEQ ID NO: 7)	PCPAPPVA (SEQ ID NO: 3)	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 42

El polipéptido recombinante de la invención es un anticuerpo.

En algunas realizaciones, el anticuerpo aislado comprende una construcción de cadena pesada que comprende una región CH, del extremo N al extremo C, un dominio CH1, una bisagra quimérica, un dominio CH2 y un dominio CH3, en el que el dominio CH1 comprende la secuencia de aminoácidos DKKV o DKRV, la bisagra quimérica comprende una secuencia de aminoácidos de bisagra superior de IgG1 humana o IgG4 humana de las posiciones 216 a 227 (numeración EU) y una secuencia de aminoácidos de bisagra inferior de IgG2 humana de las posiciones 228 a 236 (numeración EU), el dominio CH2 comprende una secuencia del dominio CH2 de IgG4 humana de las posiciones 237 a 340 (numeración EU) y el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG1 humana o IgG4 humana de las posiciones 341 a 447 (numeración EU) y la región CH tiene una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente el 95 % o aproximadamente el 96 % o aproximadamente el 97 % o aproximadamente el 98 % o aproximadamente el 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2.

En otra realización, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado, que comprende una construcción de cadena pesada que comprende una región CH, del extremo N al extremo C, un dominio CH1, una bisagra quimérica, un dominio CH2 y un dominio CH3, en el que el dominio CH1 comprende la secuencia de aminoácidos DKKV o DKRV, la bisagra quimérica comprende una secuencia de aminoácidos de bisagra superior de IgG1 humana o IgG4 humana de las posiciones 216 a 227 (numeración EU) y una secuencia de aminoácidos de bisagra inferior de IgG2 humana de las posiciones 228 a 236 (numeración EU), el dominio CH2 comprende una secuencia de dominio CH2 de IgG4 humana de las posiciones 237 a 340 (numeración EU) y el dominio CH3 comprende una secuencia de dominio CH3 de IgG1 humana o IgG4 humana de las posiciones 341 a 447 (numeración EU) y la región CH tiene una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente el 95 %, o aproximadamente el 96 %, o aproximadamente el 97 %, o aproximadamente el 98 %, o aproximadamente el 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 30 o la SEQ ID NO: 31. En algunas realizaciones, la región CH tiene una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente el 95 %, o aproximadamente el 96 %, o aproximadamente el 97 %, o aproximadamente el 98 %, o aproximadamente el 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 38 o la SEQ ID NO: 37.

Dichas "variantes" o "variantes naturales" de los dominios C_H de la invención, por ejemplo, los dominios Fc y los fragmentos de dominio Fc comprenden una o más adiciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos cuando se

comparan con la secuencia de tipo silvestre de la que derivan dichos dominios C_H de la invención, pero funcionan esencialmente como se desea. En algunos ejemplos, el dominio C_H o el dominio Fc presentan un unión débil o nula a determinadas células que expresan FcγR, por ejemplo, células efectoras, dando como resultado funciones efectoras alteradas, tales como citotoxicidad y proliferación. En un ejemplo, dichas variantes incluyen modificaciones tales como adiciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos en el dominio CH3 modificado mediante ingeniería genética para el aislamiento de moléculas biespecíficas.

En una realización, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo monoclonal que comprende una región variable de la cadena pesada y una región constante de la cadena pesada que comprende o consiste en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 37, o una secuencia con al menos aproximadamente el 95 %, o aproximadamente el 96 %, o aproximadamente el 97 %, o aproximadamente el 98 %, o aproximadamente el 99 % de dicha región constante de la cadena pesada. En otra realización, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo monoclonal que comprende una región variable de la cadena ligera, una región variable de la cadena pesada y una región constante de la cadena pesada que comprende o consiste en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 37, o una secuencia con al menos aproximadamente el 95 %, o aproximadamente el 96 %, o aproximadamente el 97 %, o aproximadamente el 98 %, o aproximadamente el 99 % de dicha región constante de la cadena pesada.

En otra realización, la invención es un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende una región constante de la cadena pesada (C_H) que tiene (i) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o que tiene la secuencia de aminoácidos codificada por la SEQ ID NO: 33 o (ii) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 31 o que tiene la secuencia de aminoácidos codificada por la SEQ ID NO: 29 o (iii) una secuencia con al menos aproximadamente el 95 %, o aproximadamente el 96 %, o aproximadamente el 97 %, o aproximadamente el 98 %, o aproximadamente el 99 % de identidad con una secuencia descrita en (i) o (ii). En otra realización, la invención es un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende una región constante de la cadena pesada (C_H) que tiene (i) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o que tiene la secuencia de aminoácidos codificada por la SEQ ID NO: 32, o (ii) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 30 o que tiene la secuencia de aminoácidos codificada por la SEQ ID NO: 28 o (iii) una secuencia con al menos aproximadamente el 95 %, o aproximadamente el 96 %, o aproximadamente el 97 %, o aproximadamente el 98 %, o aproximadamente el 99 % de identidad con una secuencia descrita en (i) o (ii).

En otra realización más, la invención es un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende una región constante de la cadena pesada (C_H) que tiene (i) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 38 o que tiene la secuencia de aminoácidos codificada por la SEQ ID NO: 36, o (ii) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37 o que tiene la secuencia de aminoácidos codificada por la SEQ ID NO: 35, o (iii) una secuencia con al menos aproximadamente el 95 %, o aproximadamente el 96 %, o aproximadamente el 97 %, o aproximadamente el 98 %, o aproximadamente el 99 % de identidad con una secuencia descrita en (i) o (ii).

En algunas realizaciones, el anticuerpo aislado es un anticuerpo monoclonal. En otras realizaciones, el anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo, es un anticuerpo humanizado, quimérico, monocatenario o biespecífico.

También se desvela una proteína que contiene Fc que comprende (i) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o la secuencia de aminoácidos codificada por la SEQ ID NO: 33, o (ii) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 31 o la secuencia de aminoácidos codificada por la SEQ ID NO: 29, o (iii) una secuencia con al menos aproximadamente el 95 %, o aproximadamente el 96 %, o aproximadamente el 97 %, o aproximadamente el 98 %, o aproximadamente el 99 % de identidad con una secuencia descrita en (i) o (ii). También se desvela una proteína que contiene Fc que comprende (i) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o la secuencia de aminoácidos codificada por la SEQ ID NO: 32, o (ii) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 30 o la secuencia de aminoácidos codificada por la SEQ ID NO: 28, o (iii) una secuencia con al menos aproximadamente el 95 %, o aproximadamente el 96 %, o aproximadamente el 97 %, o aproximadamente el 98 %, o aproximadamente el 99 % de identidad con una secuencia descrita en (i) o (ii).

También se desvela una proteína que contiene Fc que comprende (i) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 38 o la secuencia de aminoácidos codificada por la SEQ ID NO: 36, o (ii) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37 o la secuencia de aminoácidos codificada por la SEQ ID NO: 35, o (iii) una secuencia con al menos aproximadamente el 95 %, o aproximadamente el 96 %, o aproximadamente el 97 %, o aproximadamente el 98 %, o aproximadamente el 99 % de identidad con una secuencia descrita en (i) o (ii).

En otra realización, la presente invención proporciona una composición que comprende el anticuerpo descrito.

El anticuerpo de la presente invención puede ser un anticuerpo que carece de función efectora citotóxica o citolítica. En algunos aspectos, el anticuerpo carece de función efectora citotóxica o citolítica y comprende la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 37.

El anticuerpo de la presente invención puede ser un anticuerpo o proteína de unión a antígeno que tiene una

actividad citotóxica que es al menos 10 veces inferior o al menos 50 veces inferior o al menos 100 veces inferior o al menos 1000 veces inferior o al menos 10000 veces inferior a la actividad citotóxica de un anticuerpo correspondiente que comprende una IgG1 de tipo silvestre o una región CH de IgG4 de tipo silvestre.

5 El anticuerpo de la presente invención puede ser un anticuerpo capaz de unirse a un FcγR, en el que dicho anticuerpo comprende un polipéptido recombinante que comprende la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 37. El anticuerpo de la presente invención es capaz de unirse a un FcγR con una afinidad menor en comparación con la afinidad de unión de un anticuerpo correspondiente que comprende una región constante de la cadena pesada de IgG1 de tipo silvestre o IgG4 de tipo silvestre. En algunas realizaciones, el anticuerpo es capaz de activar un FcγR a una concentración semimáxima (CE₅₀) de más de 10 aproximadamente 10 nM, o aproximadamente 20 nM, o aproximadamente 30 nM, o aproximadamente 40 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 100 nM. En algunas realizaciones, FcγR es un FcγRII humano o de macaco. En otras realizaciones, FcγR es FcγRIIA o FcγRIIB. En algunas realizaciones, el anticuerpo es capaz de unirse a FcγRIIA que tiene una afinidad (valor de K_D) de aproximadamente 10 μM, o aproximadamente 20 μM, o aproximadamente 30 μM, o aproximadamente 40 μM, o aproximadamente 50 μM, o aproximadamente 100 μM. En otras realizaciones, el anticuerpo se une a FcγRIIA con una afinidad superior a la afinidad del anticuerpo o polipéptido recombinante a FcγRIIB.

20 En algunas realizaciones, el anticuerpo es capaz de unirse a FcγRIIB que tiene una afinidad (valor K_D) de aproximadamente 10 μM, o aproximadamente 20 μM, o aproximadamente 30 μM, o aproximadamente 40 μM, aproximadamente 50 μM, aproximadamente 100 μM. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a FcγRIIA con una afinidad (K_D valor) sustancialmente similar a la afinidad del anticuerpo o polipéptido recombinante a FcγRIIB.

25 Para determinadas realizaciones, puede ser deseable que los anticuerpos quiméricos de la invención se unan, e incluso potencien indirectamente la actividad mediada por FcγRIIA, incluso aunque los anticuerpos quiméricos puedan tener afinidades de tipo silvestre para FcγRIIA. Sin quedar ligados a teoría alguna, determinados anticuerpos y, por tanto, productos terapéuticos, pueden beneficiarse de una interacción debilitada (en comparación con los anticuerpos de tipo silvestre) con el inhibidor del receptor FcγRIIB, que puede desplazar el equilibrio entre el receptor FcγRIIA activador y el receptor FcγRIIB inhibidor en favor de la activación.

30 La presente invención abarca la producción de anticuerpos monoclonales que comprenden un polipéptido recombinante que comprende la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 37 y que tienen especificidades para diversos antígenos diana. También se desvela un método para producir un anticuerpo que comprende: a) introducir el vector que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo o fragmento del mismo, de la invención, en una célula hospedadora de mamífero, b) cultivar la célula hospedadora capaz de expresar el anticuerpo y c) aislar el anticuerpo del medio de cultivo celular.

40 Los anticuerpos monoclonales de la presente invención pueden producirse, por ejemplo, mediante el método del hibridoma, descrito por primera vez por Kohler, et. al., *Nature* 256, 495 (1975), o pueden producirse mediante métodos de ADN recombinante. Los anticuerpos monoclonales también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas, por ejemplo, en Clackson et al., *Nature* 352, 624-628 (1991) y Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222, 581-597 (1991). Pueden obtenerse anticuerpos monoclonales a partir de cualquier fuente adecuada. De este modo, por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse a partir de hibridomas preparados a partir de células de linfocitos B esplénicos murinos obtenidos de ratones inmunizados con un antígeno de interés, por ejemplo, en forma de células que expresan el antígeno en la superficie o un ácido nucleico que codifica un antígeno de interés. También pueden obtenerse anticuerpos monoclonales a partir de hibridomas derivados de células que expresan anticuerpos de seres humanos o mamíferos no humanos inmunizados, tales como ratas, conejos, perros, primates, etc.

50 En una realización, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo humano. Los anticuerpos monoclonales humanos pueden generarse usando ratones transgénicos o transcromosómicos que llevan partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema del ratón. Dichos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones denominados en el presente documento ratones VELOCIMMUNE, ratones HuMAb y ratones KM, respectivamente, y que se denominan colectivamente en el presente documento "ratones transgénicos" y se han descrito anteriormente en el presente documento.

60 Pueden usarse esplenocitos de estos ratones transgénicos para generar hibridomas que secreten anticuerpos monoclonales humanos de acuerdo con técnicas bien conocidas. También pueden generarse transgénicamente anticuerpos monoclonales o policlonales humanos de la presente invención o anticuerpos de la presente invención que se originan a partir de otras especies a través de la generación de otro mamífero no humano o planta que sea transgénico para las secuencias de la cadena pesada y ligera de inmunoglobulina de interés y la producción del anticuerpo en una forma recuperable del mismo. En relación con la producción transgénica en mamíferos, los anticuerpos pueden producirse y recuperarse de la leche de cabras, vacas u otros mamíferos. Véanse, por ejemplo, los documentos US 5.827.690, US 5.756.687, US 5.750.172 y US 5.741.957. Pueden modificarse mediante ingeniería genética vectores de expresión que comprendan un promotor UP-II de ratón unido operativamente al ADN que codifica las secuencias de la cadena ligera y pesada de Ig para la expresión y la secreción de las proteínas de

interés en la orina de un animal transgénico (Véase, por ejemplo, el documento US 5.824.543).

Adicionalmente, pueden generarse anticuerpos humanos de la presente invención o anticuerpos de la presente invención de otras especies a través de tecnologías de tipo presentación, incluyendo, sin limitación, presentación en fagos, presentación retroviral, presentación ribosómica y otras técnicas, usando técnicas bien conocidas en la técnica, y las moléculas resultantes pueden someterse a maduración adicional, tal como maduración por afinidad, ya que dichas técnicas son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Hoogenboom, et. al., *J. Mol. Biol.* 227, 381 (1991) (presentación en fagos), Vaughan et al., *Nature Biotech* 14, 309 (1996) (presentación en fagos), Hanes y Plutchau, *PNAS USA* 94, 4937-4942 (1997) (presentación ribosómica), Parmley y Smith, *Gene* 73, 305-318 (1988) (presentación en fagos), Scott *TIBS* 17, 241-245 (1992), Cwirla, et. al., *PNAS USA* 87, 6378-6382 (1990), Russel, et. al., *Nucl. Acids Research* 21, 1081-1085 (1993), Hogenboom, et. al., *Immunol. Reviews* 130, 43-68 (1992), Chiswell y McCafferty *TIBTECH* 10, 80-84 (1992) y el documento US 5.733.743). Si se utilizan tecnologías de presentación para producir anticuerpos que no son humanos, dichos anticuerpos pueden humanizarse.

15 Las regiones constantes (C_H) de la cadena pesada modificadas mediante ingeniería genética de la invención proporcionarán funciones efectoras reducidas. Puede usarse cualquiera de las regiones constantes (C_L) de la cadena ligera humana, kappa o lambda. Si se desea, la clase de un anticuerpo de la presente invención puede cambiarse mediante métodos conocidos.

20 La presente invención proporciona los anticuerpos de la invención producidos por una célula hospedadora. También se desvela un método para producir un anticuerpo monoclonal que comprende a) inmunizar ratones VELOCIMMUNE® con un antígeno suficiente para provocar una respuesta inmunitaria de anticuerpos, b) obtener suero de dichos ratones y someterlo a ensayo para determinar el título de anticuerpos contra dicho antígeno, c) recoger células B de los bazo de dichos ratones inmunizados que muestran títulos de anticuerpos elevados y fusionan dichas células B con células de mieloma de ratón para formar dicho hibridoma, d) aislar anticuerpo quimérico de dicho hibridoma mediante cromatografía de proteína A, teniendo dicho anticuerpo quimérico una región variable humana y un región constante de ratón, e) seleccionar un anticuerpo quimérico que tenga características deseables y f) reemplazar las regiones constantes de ratón de dichos anticuerpos con una región constante humana de la invención, por ejemplo, dicha región constante humana que comprende la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 37.

En una realización, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo IgG de longitud completa. En otra realización, el anticuerpo de la invención es un fragmento de anticuerpo o un anticuerpo monocatenario. En otra realización más, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo IgG completamente humano.

35 En algunos aspectos de la invención, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico en el que cada dominio de unión a antígeno de dicha molécula o anticuerpo comprende una región V_H emparejada con una región V_L . En ciertas realizaciones, el anticuerpo biespecífico comprende un primer dominio de unión a antígeno y un segundo dominio de unión a antígeno, comprendiendo cada uno diferentes regiones V_H distintas con una V_L región común. En algunas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos se construyen comprendiendo un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a un primer antígeno, en el que el primer dominio de unión a antígeno comprende un par región V_H /región V_L derivado de un primer anticuerpo dirigido contra el primer antígeno; y un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a un segundo antígeno, en el que el segundo dominio de unión a antígeno comprende una región V_H derivada de un segundo anticuerpo dirigido contra un segundo antígeno emparejado con una región V_L derivada del primer anticuerpo (por ejemplo, la misma región V_L que está incluida en el dominio de unión a antígeno del primer anticuerpo). En algunas realizaciones, la cadena pesada de al menos uno de los anticuerpos, es decir, el primer anticuerpo o el segundo anticuerpo o ambos anticuerpos, en un anticuerpo biespecífico, se modifica para comprender una región constante de la cadena pesada quimérica (región C_H). En otras realizaciones, el anticuerpo biespecífico comprende la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 37.

En algunos aspectos de la invención, dos anticuerpos de diferente especificidad usan la misma cadena ligera. En ciertas realizaciones, la cadena pesada de al menos una de las cadenas pesadas de Ig en un anticuerpo biespecífico se modifica para comprender una región constante de la cadena pesada quimérica que comprende un polipéptido recombinante de la invención. En algunas realizaciones, al menos una de las cadenas pesadas se modifica en el dominio CH3 dando como resultado una afinidad diferencial por el anticuerpo biespecífico para un reactivo de afinidad, tal como la Proteína A, para facilitar el aislamiento. En otra realización, al menos una de las cadenas pesadas en dicho anticuerpo biespecífico comprende una modificación de aminoácidos en i) 95R o ii) 95R y 96F en el sistema de numeración IMGT (95R y 96F corresponden a 435R y 436F en el sistema de numeración EU).

En otros aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico en el que el anticuerpo biespecífico comprende:

- (a) una primera cadena pesada que comprende un dominio de unión a antígeno capaz de reconocer y unirse a un primer antígeno diana,
- (b) una segunda cadena pesada que comprende un dominio de unión a antígeno capaz de reconocer y unirse a un segundo antígeno diana,

(c) un dominio de unión a antígeno de la cadena ligera común capaz de reconocer y unirse al primer o segundo antígeno diana,

5 en el que la cadena pesada de (a) o (b) o ambos (a) y (b) comprende adicionalmente la región constante de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 31.

En otros aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico en el que el anticuerpo biespecífico comprende:

10 (a) una primera cadena pesada que comprende un dominio de unión a antígeno capaz de reconocer y unirse a un primer antígeno diana,

(b) una segunda cadena pesada que comprende un dominio de unión a antígeno capaz de reconocer y unirse a un segundo antígeno diana,

15 (c) un dominio de unión a antígeno de la cadena ligera común capaz de reconocer y unirse al primer o segundo antígeno diana,

en el que la cadena pesada de (a) o (b) o ambos (a) y (b) comprende adicionalmente la región constante de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 30.

20 En otro aspecto, al menos una de las cadenas pesadas de (a) o (b) en dicho anticuerpo biespecífico anterior comprende una modificación de aminoácidos en (i) 435R o (ii) 435R y 436F (numeración EU) ((i) 95R o (ii) 95R y 96F en el sistema de numeración IMG T).

25 En otros aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico en el que el anticuerpo biespecífico comprende (a) una primera cadena pesada que comprende un dominio de unión a antígeno capaz de reconocer y unirse a un primer antígeno diana y una primera región constante de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 30 o SEQ ID NO: 31; (b) una segunda cadena pesada que comprende un dominio de unión a antígeno capaz de reconocer y unirse a un segundo antígeno diana y una segunda región constante de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 37; y (c) dominio de unión a antígeno de cadena ligera común capaz de reconocer y unirse al primer o segundo antígeno diana.

30 En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo monovalente. En consecuencia, en una realización, el anticuerpo es un anticuerpo monovalente, en el que dicho anticuerpo se construye mediante un método que comprende: i) proporcionar una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena ligera de dicho anticuerpo monovalente, comprendiendo dicha construcción una secuencia de nucleótidos que codifica la región V_L de un anticuerpo específico de antígeno seleccionado y una secuencia de nucleótidos que codifica la región constante C_L de una Ig, en la que dicha secuencia de nucleótidos que codifica la región V_L de un anticuerpo específico de antígeno seleccionado y dicha secuencia de nucleótidos que codifica la región C_L de una Ig están unidas operativamente entre sí, y en la que la secuencia de nucleótidos que codifica la región C_L se ha modificado de manera que la región C_L no contenga ningún aminoácido capaz de formar enlaces disulfuro o enlaces covalentes con otros péptidos que comprendan una secuencia de aminoácidos idéntica de la región C_L en presencia de IgG humana policlonal o cuando se administra a un animal o ser humano; ii) proporcionar una construcción de ácido nucleico que codifica la cadena pesada de dicho anticuerpo monovalente, comprendiendo dicha construcción una secuencia de nucleótidos que codifica la región V_H de un anticuerpo específico de antígeno seleccionado y una secuencia de nucleótidos que codifica una región C_H constante de una Ig humana, en la que la secuencia de nucleótidos que codifica la región C_H comprende ácidos nucleicos que codifican la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 37, en la que dicha secuencia de nucleótidos se ha modificado y no comprende ningún resto de aminoácido que participe en la formación de enlaces disulfuro o enlaces entre cadenas pesadas covalentes o no covalentes estables con otros péptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos idéntica de la región C_H de la Ig humana en presencia de IgG humana policlonal o cuando se administra a un animal, tal como un ser humano, en la que dicha secuencia de nucleótidos que codifica la región V_H de un anticuerpo específico de antígeno seleccionado y dicha secuencia de nucleótidos que codifica la región C_H de dicha Ig están unidas operativamente entre sí; iii) proporcionar un sistema de expresión celular para producir dicho anticuerpo monovalente; iv) producir dicho anticuerpo monovalente mediante la coexpresión de las construcciones de ácido nucleico de (i) y (ii) en células del sistema de expresión celular de (iii).

55 De forma similar, en una realización, el anticuerpo es un anticuerpo monovalente, que comprende: i) una región variable o un dominio de unión a antígeno de dicha región y ii) una región C_H de una inmunoglobulina o un fragmento de la misma que comprende la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 37, en la que la región C_H o fragmento de la misma se ha modificado de forma que la región no comprenda ningún resto de aminoácido que sea capaz de formar enlaces disulfuro con una región C_H idéntica u otros enlaces entre cadenas pesadas covalentes o no covalentes estables con una región C_H idéntica en presencia de IgG policlonal humana.

60 En otra realización adicional, la secuencia de dicho anticuerpo monovalente se ha modificado de modo que no comprenda ningún sitio aceptor para la glucosilación ligada a N.

65

En general, los anticuerpos descritos en el presente documento pueden modificarse mediante la inclusión de cualquier número adecuado de dichos aminoácidos modificados y/o asociaciones con sustituyentes conjugados. La idoneidad en este contexto generalmente está determinada por la capacidad de conservar al menos sustancialmente la selectividad y/o especificidad asociada del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. El aminoácido modificado puede seleccionarse, por ejemplo, de entre un aminoácido glucosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido conjugado con un resto lipídico o un aminoácido conjugado con un agente derivatizante orgánico. La inclusión de uno o más aminoácidos modificados puede ser ventajosa, por ejemplo, aumentando adicionalmente la semivida en suero de los polipéptidos, reduciendo la antigenicidad de polipéptidos o aumentando la estabilidad en el almacenamiento de los polipéptidos. El o los aminoácidos se modifican, por ejemplo, cotraduccionalmente o postraduccionalmente durante la producción recombinante (por ejemplo, la glucosilación ligada a N en motivos N-X-S/T durante la expresión en células de mamífero) o se modifican por medios sintéticos. Los ejemplos no limitantes de un aminoácido modificado incluyen un aminoácido glucosilado, un aminoácido sulfatado, un aminoácido prenilado (por ejemplo, farnesilado, geranylgeranilado), un aminoácido acetilado, un aminoácido acilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido carboxilado, un aminoácido fosforilado y similares. Toda la bibliografía está repleta de referencias adecuadas para guiar un experto en la modificación de aminoácidos. Se encuentran protocolos de ejemplo en Walker (1998) *Protein Protocols on CD-Rom*, Humana Press, Totowa, NJ.

Los anticuerpos de la invención también pueden modificarse químicamente mediante conjugación covalente con un polímero para, por ejemplo, aumentar adicionalmente su semivida circulante. Se ilustran ejemplos de polímeros y métodos para unirlos a péptidos, por ejemplo, en los documentos US 4.766.106, US 4.179.337, US 4.495.285 y US 4.609.546. Los polímeros ilustrativos adicionales incluyen polioles polioxietilados y polietilenglicol (PEG) (por ejemplo, un PEG con un peso molecular de entre aproximadamente 1.000 y aproximadamente 40.000, tal como entre aproximadamente 2.000 y aproximadamente 20.000, por ejemplo, aproximadamente 3.000-12.000 g/mol).

En una realización, se proporcionan anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos radiomarcados. Un anticuerpo radiomarcado puede usarse con fines tanto diagnósticos como terapéuticos. En otra realización, los anticuerpos de la presente invención pueden conjugarse con una molécula que es un agente terapéutico o un marcador detectable. En una realización, el agente terapéutico es un agente citotóxico, tal como un radioisótopo. Los ejemplos de radioisótopos para polipéptidos incluyen, pero sin limitación, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc y ^{125}I , ^{131}I , ^{186}Re y ^{225}Ac . Se conocen en la técnica métodos para preparar aminoácidos radiomarcados y derivados de péptidos relacionados (véase, por ejemplo, Junghans et al., en *Cancer Chemotherapy and Biotherapy* 655-686 (2ª edición, Chafner y Longo, eds., Lippincott Raven (1996)) y los documentos US 4.681.581, US 4.735.210, US 5.101.827, US 5.102.990 (US RE35.500), US 5.648.471 y US 5.697.902. Por ejemplo, un radioisótopo puede conjugarse mediante un método de cloramina T. En realizaciones adicionales, un marcador detectable puede ser un radiomarcador, una enzima, un cromóforo o un marcador fluorescente.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un vector de expresión que codifica un polipéptido, por ejemplo, un anticuerpo, proteína de unión a antígeno o proteína de fusión receptor-Fc de la invención. Dichos vectores de expresión pueden usarse para la producción recombinante de polipéptidos de la invención.

Un vector de expresión en el contexto de la presente invención puede ser cualquier vector adecuado, incluyendo vectores de ácidos nucleicos cromosómicos, no cromosómicos y sintéticos (una secuenciación de ácidos nucleicos que comprende un conjunto adecuado de elementos de control de la expresión). Los ejemplos de dichos vectores incluyen derivados de SV40, plásmidos bacterianos, ADN de fago, baculovirus, plásmidos de levadura, vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fago y vectores de ácido nucleico vírico (ARN o ADN). En una realización, una molécula de ácido nucleico que codifica anticuerpos está comprendida en un vector desnudo de ADN o ARN, incluyendo, por ejemplo, un elemento de expresión lineal (como se describe, por ejemplo, en Sykes y Johnston, *Nat Biotech* 12, 355-59 (1997)), un vector de ácido nucleico compactado (como se describe por ejemplo, en los documentos US 6.077.835 y/o WO 00/70087) o un vector plasmídico tal como pBR322, pUC 19/18 o pUC 118/119. Dichos vectores de ácidos nucleicos y el uso de los mismos son bien conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, los documentos US 5.589.466 y US 5.973.972).

En otra realización, el vector comprende la molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo o polipéptido de la invención, incluyendo un vector de expresión que comprende las moléculas de ácido nucleico descritas en las que la molécula de ácido nucleico está operativamente unida a una secuencia de control de la expresión.

En una realización, el vector es adecuado para la expresión de un polipéptido o anticuerpo de la invención en una célula bacteriana. Los ejemplos de dichos vectores incluyen vectores de expresión tales como BlueScript (Stratagene), vectores pIN (Van Heeke y Schuster, *J Biol Chem* 264, 5503-5509 (1989), vectores pET (Novagen, Madison, WI) y similares).

Un vector de expresión puede ser también, o como alternativa, un vector adecuado para la expresión en un sistema de levadura. Puede emplearse cualquier vector adecuado para la expresión en un sistema de levadura. Los vectores adecuados incluyen, por ejemplo, vectores que comprenden promotores constitutivos o inducibles tales como factor alfa de levadura, alcohol oxidasa y PGH (revisado en: F. Ausubel, et. al., *Ed. Current Protocols in Molecular Biology*,

Greene Publishing y Wiley InterScience New York (1987) y Grant et al., *Methods in Enzymol* 153, 516-544 (1987)).

Se proporciona un vector que comprende una molécula de ácido nucleico de la invención, en el que la molécula de ácido nucleico se une operativamente a una secuencia de control de la expresión adecuada para la expresión en una célula hospedadora de mamífero.

Las secuencias de control de la expresión se modifican mediante ingeniería genética para controlar e impulsar la transcripción de genes de interés y la posterior expresión de proteínas en diversos sistemas celulares. Los plásmidos combinan un gen expresable de interés con secuencias de control de la expresión (es decir, casetes de expresión) que comprenden elementos deseables tales como, por ejemplo, promotores, potenciadores, marcadores seleccionables, operadores, etc. En un vector de expresión de la invención, las moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos pueden comprender o estar asociadas a cualquier promotor, potenciador, marcador seleccionable, operador, proteína represora, secuencias de terminación poliA adecuados y otros elementos facilitadores de la expresión.

“Promotor” como se usa en el presente documento indica una secuencia de ADN suficiente para dirigir la transcripción de una secuencia de ADN a la que está operativamente unida, es decir, unida de manera que permita la transcripción de la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo cuando estén presentes las señales apropiadas. La expresión de una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo puede ponerse bajo el control de cualquier promotor o elemento potenciador conocido en la técnica. Ejemplos de dichos elementos incluyen promotores de expresión fuertes (por ejemplo, promotor/potenciador de CMV IE humano o el promotor de CMV principal IE (CMV-MIE, por sus siglas en inglés), así como RSV, promotor tardío de SV40, SL3-3, MMTV, ubiquitina (Ubi), ubiquitina C (UbC) y promotores LTR de VIH).

En algunas realizaciones, el vector comprende un promotor seleccionado entre el grupo que consiste en SV40, CMV, CMV-IE, CMV-MIE, RSV, SL3-3, MMTV, Ubi, UbC y LTR de VIH.

Las moléculas de ácido nucleico de la invención también pueden unirse operativamente a una secuencia eficaz de terminación de poli (A), un origen de replicación para el producto plasmídico en *E. coli*, un gen de resistencia a antibióticos como marcador seleccionable y/o un sitio de clonación conveniente (por ejemplo, un polienlazador). Los ácidos nucleicos también pueden comprender un promotor regulable inducible (inducible, reprimible, regulado por el desarrollo) en oposición a un promotor constitutivo tal como CMV IE (el experto en la materia reconocerá que dichos términos son realmente descriptores de un grado de expresión génica en ciertas condiciones).

Los marcadores seleccionables son elementos bien conocidos en la técnica. En las condiciones selectivas, solo las células que expresan el marcador seleccionable apropiado pueden sobrevivir. Comúnmente, los genes marcadores seleccionables expresan proteínas, generalmente enzimas, que confieren resistencia a diversos antibióticos en el cultivo celular. En otras condiciones selectivas, las células que expresan un marcador de proteína fluorescente se hacen visibles y, por tanto, son seleccionables. Las realizaciones incluyen beta-lactamasa (bla) (gen de resistencia a antibióticos betalactámicos o de resistencia a la ampicilina o ampR), bls (gen de resistencia a la acetil transferasa de blasticidina), bsd (gen de resistencia a la blastidina-S desaminasa), bsr (gen de resistencia a la blasticidina-S), Sh ble (Gen de resistencia a Zeocin®), higromicina fosfotransferasa (hpt) (gen de resistencia a la higromicina), tetM (gen de resistencia a tetraciclinas o tetR), neomicina fosfotransferasa II (npt) (gen de resistencia a la neomicina o neoR), kanR (gen de resistencia a la kanamicina) y pac (gen de resistencia a la puromicina).

En ciertas realizaciones, el vector comprende uno o más genes marcadores seleccionables seleccionados entre el grupo que consiste en bla, bls, BSD, bsr, Sh ble, hpt, tetR, tetM, npt, kanR y pac. En otras realizaciones, el vector comprende uno o más genes marcadores seleccionables que codifican proteína fluorescente verde (GFP, por sus siglas en inglés), proteína fluorescente verde potenciada (eGFP, por sus siglas en inglés), ciano proteína fluorescente (CFP, por sus siglas en inglés), proteína ciano fluorescente potenciada (eCFP, por sus siglas en inglés) o proteína fluorescente amarilla (YFP, por sus siglas en inglés).

Para los fines de la presente invención, la expresión génica en células eucarióticas puede regularse estrechamente usando un promotor fuerte que esté controlado por un operador que a su vez esté regulado por una proteína de fusión reguladora (RFP, por sus siglas en inglés). La RFP consiste esencialmente en un dominio de bloqueo de la transcripción y un dominio de unión al ligando que regula su actividad. Los ejemplos de dichos sistemas de expresión se describen en el documento US20090162901A1.

Como se usa en el presente documento, “operador” indica una secuencia de ADN que se introduce dentro o cerca de un gen de manera que el gen puede ser regulado por la unión de la RFP al operador y, como resultado, previene o permite la transcripción del gen de interés, es decir, un nucleótido que codifica un polipéptido de la invención. Se han caracterizado bien varios operadores en células procarióticas y bacteriófagos (Neidhardt, ed. *Escherichia coli y Salmonella; Cellular and Molecular Biology* 2d, Vol 2, ASM Press, Washington D.C. 1996). Estos incluyen, pero sin limitación, la región del operador del gen *LexA* de *E. coli*, que se une al péptido *LexA*, y los operadores de lactosa y triptófano, que se unen a las proteínas represoras codificadas por los genes *LacI* y *trpR* de *E. coli*. Estos también incluyen los operadores de bacteriófagos del P_R lambda y los genes del fago P22 *ant/mnt* que se unen a las

- proteínas represoras codificadas por lambda cl y el P22 arc. En algunas realizaciones, cuando el dominio de bloqueo de la transcripción de la RFP es una enzima de restricción, tal como NotI, el operador es la secuencia de reconocimiento para esa enzima. Un experto en la materia reconocerá que el operador debe estar ubicado adyacente o en posición 3' con respecto al promotor de manera que sea capaz de controlar la transcripción por el
- 5 promotor. Por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 5.972.650, especifica que las secuencias *tetO* están dentro de una distancia específica de la caja TATA. En realizaciones específicas, el operador preferentemente se ubica inmediatamente corriente abajo del promotor. En otras realizaciones, el operador se ubica dentro de 10 pares de bases del promotor.
- 10 En ciertas realizaciones, el operador se selecciona entre el grupo que consiste en el operador tet (*tetO*), la secuencia de reconocimiento NotI, el operador LexA, el operador de lactosa, el operador de triptófano y el operador Arc (AO, por sus siglas en inglés). En algunas realizaciones, la proteína represora se selecciona entre el grupo que consiste en TetR, LexA, LacI, TrpR, Arc, LambdaC1 y GAL4. En otras realizaciones, el dominio de bloqueo de la transcripción deriva de una proteína represora eucariótica, por ejemplo, un dominio represor derivado de GAL4.
- 15 En un sistema de expresión celular de ejemplo, las células se modifican mediante ingeniería genética para expresar la proteína represora de tetraciclina (TetR) y una proteína de interés se pone bajo el control transcripcional de un promotor cuya actividad está regulada por TetR. Dos operadores *tetR* en tándem (*tetO*) se ubican inmediatamente corriente abajo de un promotor/potenciador CMV-MIE en el vector. La transcripción del gen que codifica la proteína de interés dirigida por el promotor CMV-MIE en dicho vector puede bloquearse mediante TetR en ausencia de tetraciclina o algún otro inductor adecuado (por ejemplo, doxiciclina). En presencia de un inductor, la proteína TetR es incapaz de unirse a *tetO*, por tanto, se produce la transcripción y después la traducción (expresión) de la proteína de interés. (Véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 7.435.553, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad).
- 20 Otro sistema de expresión celular de ejemplo incluye proteínas de fusión reguladoras tales como la proteína de fusión TetR-ER_{LBD}T2, en la que el dominio de bloqueo de la transcripción de la proteína de fusión es TetR y el dominio de unión a ligando es el dominio de unión al ligando del receptor de estrógenos (ER_{LBD}, por sus siglas en inglés) con mutaciones T2 (ER_{LBD}T2; Feil et al. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237: 752-757). Cuando se ubicaron las secuencias *tetO* corriente abajo y proximalmente al promotor fuerte CMV-MIE, la transcripción de la secuencia de nucleótidos de interés del promotor CMV-MIE/*tetO* se bloqueó en presencia de tamoxifeno y se desbloqueó mediante la retirada del tamoxifeno. En otro ejemplo, el uso de la proteína de fusión Arc2-ER_{LBD}T2, una proteína de fusión que consiste en un dímero monocatenario que consiste en dos proteínas Arc conectadas mediante un enlazador de 15 aminoácidos y ER_{LBD}T2 (citado anteriormente), implica un operador Arc (AO, por sus siglas en inglés), más específicamente dos operadores arc en tándem inmediatamente corriente abajo del promotor/potenciador CMV-MIE. Las estirpes celulares pueden estar reguladas por Arc2-ER_{LBD}T2, en las que las células que expresan la proteína de interés son impulsadas por un promotor CMV-MIE/ArcO2 y son inducibles con la retirada del tamoxifeno. (Véase, por ejemplo, el documento US 20090162901A1).
- 25 En algunas realizaciones, un vector de la invención comprende un promotor híbrido CMV-MIE/TetO o CMV-MIE/AO2.
- 30 Los vectores de la invención también pueden emplear herramientas Cre-*lox* para la tecnología de recombinación con el fin de facilitar la replicación de un gen de interés. Una estrategia Cre-*lox* requiere al menos dos componentes: 1) la recombinasa Cre, una enzima que cataliza la recombinación entre dos sitios *loxP*; y 2) sitios *loxP* (por ejemplo, una secuencia de 34 pares de bases específica que consiste en una secuencia de núcleo de 8 pb, donde tiene lugar la recombinación, y dos repeticiones invertidas flanqueantes de 13 pb) o sitios *loxP* mutantes. (Véase, por ejemplo, Araki, et. al., *PNAS* 92: 160-4 (1995); Nagy, A., et. al., *Genesis* 26: 99-109 (2000); Araki, et. al., *Nuc Acids Res* 30 (19): e103 (2002); y el documento US20100291626A1. En otra estrategia de recombinación, puede utilizarse recombinasa FLP derivada de levadura con la secuencia consenso FRT (véase también, por ejemplo, Dymecki, S. *PNAS* 93 (12): 6191-6196).
- 35 En otro aspecto, un gen (es decir, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido recombinante de la invención) se inserta dentro de una secuencia potenciadora de la expresión del casete de expresión y, opcionalmente, se une operativamente a un promotor, en el que el gen unido al promotor está flanqueado en posición 5' por un primer sitio de reconocimiento de recombinasa y en posición 3' mediante un segundo sitio de reconocimiento de recombinasa. Dichos sitios de reconocimiento de recombinasa permiten la recombinación mediada por Cre en la célula hospedadora del sistema de expresión. En algunos casos, un segundo gen ligado a un promotor está cadena abajo (posición 3') del primer gen y está flanqueado en 3' por el segundo sitio de reconocimiento de recombinasa. En otros casos más, un segundo gen unido al promotor está flanqueado en posición 5' por el segundo sitio de recombinasa y está flanqueado en posición 3' por un tercer sitio de reconocimiento de recombinasa. En algunas realizaciones, los sitios de reconocimiento de recombinasa se seleccionan entre un sitio *loxP*, un sitio *lox511*, un sitio *lox2272* y un sitio FRT. En otras realizaciones, los sitios de reconocimiento de recombinasa son diferentes. En una realización adicional, la célula hospedadora comprende un
- 40 gen capaz de expresar una recombinasa Cre.
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

En una realización, el vector comprende un primer gen que codifica una cadena ligera de un anticuerpo o una cadena pesada de un anticuerpo de la invención y un segundo gen que codifica una cadena ligera de un anticuerpo o una cadena pesada de un anticuerpo de la invención.

- 5 En algunas realizaciones, el vector comprende adicionalmente un gen de la proteína 1 de unión a la caja X (mXBP1) capaz de potenciar la producción de proteínas/secreción de proteínas mediante el control de la expresión de genes implicados en el plegamiento de proteínas en el retículo endoplásmico (RE). (Véase, por ejemplo, Ron D y Walter P. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8: 519-529 (2007)).
- 10 El término “célula” incluye cualquier célula que sea adecuada para expresar una secuencia de ácido nucleico recombinante. Las células incluyen las de procariotas y eucariotas (de una sola célula o de múltiples células), células bacterianas (por ejemplo, cepas de *E. coli*, *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., etc.), células de micobacterias, células fúngicas, células de levadura (por ejemplo, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *P. pastoris*, *P. methanolica*, etc.), células vegetales, células de insectos (por ejemplo, SF-9, SF-21, células de insectos infectadas por baculovirus,
- 15 *Trichoplusia ni*, etc.), células de animales no humanos, células humanas o fusiones celulares tales como, por ejemplo, hibridomas o cuadromas. En ciertas realizaciones, la célula es una célula humana, de mono, de simio, de hámster, de rata o de ratón. En otras realizaciones, la célula es eucariótica y se selecciona entre las siguientes células: CHO (por ejemplo, CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS (por ejemplo, COS-7), células retinianas, Vero, CV1, riñón (por ejemplo, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK21), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5,
- 20 Colo25, HB 8065, HL60, Jurkat, Daudi, A431 (epidérmica), CV-1, U937, 3T3, célula L, célula C127, SP2/0, NS-0, célula MMT, célula tumoral y una estirpe celular derivada de una célula mencionada anteriormente. En algunas realizaciones, la célula comprende uno o más genes víricos, por ejemplo, una célula retiniana que expresa un gen vírico (por ejemplo, una célula PER.C6®).
- 25 Incluso en un aspecto adicional, la invención se refiere a una célula hospedadora recombinante eucariótica o procariota, tal como un transfectoma, que produce un anticuerpo de la invención como se define en el presente documento o una molécula biespecífica de la invención como se define en el presente documento. Los ejemplos de células hospedadoras incluyen células de levadura, bacterianas y de mamífero, tales como células CHO o HEK. Por ejemplo, en una realización, la presente invención proporciona una célula que comprende un ácido nucleico integrado de manera estable en el genoma celular que comprende una secuencia que codifica la expresión de un anticuerpo que comprende un polipéptido recombinante de la presente invención. En otra realización, la presente invención proporciona una célula que comprende un ácido nucleico no integrado (es decir, episómico), tal como un plásmido, cósmido, fagémido o elemento de expresión lineal, que comprende una secuencia que codifica la expresión de un anticuerpo que comprende el polipéptido recombinante de la invención. En otras realizaciones, la presente invención proporciona una estirpe celular producida mediante la transfección estable de una célula hospedadora con un plásmido que comprende un vector de expresión de la invención.
- 30
- 35

También se desvela un método para producir un anticuerpo de la invención, comprendiendo dicho método las etapas de a) cultivar un hibridoma o una célula hospedadora de la invención como se ha descrito anteriormente en el presente documento y b) purificar el anticuerpo, o proteína de unión a antígeno, o fusión receptor-Fc (citada anteriormente) de los medios de cultivo.

40

Incluso en un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición que comprende: un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo como se define en el presente documento o una molécula biespecífica como se define en el presente documento.

45

Las composiciones pueden formularse con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables, así como con cualesquiera otros adyuvantes y excipientes conocidos de acuerdo con técnicas convencionales tales como las desveladas en *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 19ª Edición, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995.

50

Los vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables, así como cualesquiera otros adyuvantes y excipientes conocidos, deberían ser adecuados para el anticuerpo elegido de la presente invención y el modo de administración elegido. Los niveles de dosificación reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variarse para obtener una cantidad del principio activo que sea eficaz para conseguir la estabilidad apropiada de la sustancia farmacológica, la respuesta terapéutica deseada para un paciente, una composición y un modo de administración particulares. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una diversidad de factores farmacocinéticos.

55

La composición farmacéutica puede administrarse mediante cualquier vía y modo adecuados. Las vías de administración adecuadas de un anticuerpo de la presente invención *in vivo* son bien conocidas en la técnica y pueden seleccionarse por los expertos en la materia. (Daugherty, AL y Msrny, RJ, *Adv Drug Delivery Rev.* 58 (5-6): 686-706 (2006)).

60

Los anticuerpos marcados de la invención pueden usarse con fines de diagnóstico para detectar, diagnosticar o controlar enfermedades o trastornos. También se desvela la detección o el diagnóstico de una enfermedad o

65

trastorno, que comprende: (a) someter a ensayo la existencia de antígeno en células o muestras de tejido de un sujeto que usa uno o más anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente al antígeno diana; y (b) comparar el nivel del antígeno con un nivel de control, por ejemplo, niveles en muestras de tejido normal, por lo que un aumento en el nivel sometido a ensayo del antígeno comparado con el nivel de control del antígeno es indicativo de la enfermedad o trastorno, o indicativo de la gravedad de la enfermedad o trastorno.

Los anticuerpos de la invención pueden usarse para someter a ensayo niveles de antígeno en una muestra biológica usando métodos inmunohistoquímicos bien conocidos en la técnica. Otros métodos a base de anticuerpos útiles para detectar proteínas incluyen inmunoensayos tales como el inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) y el radioinmunoensayo (RIA, por sus siglas en inglés). Pueden usarse marcadores de anticuerpos adecuados en dichos kits y métodos, y los marcadores conocidos en la técnica incluyen marcadores enzimáticos, tales como fosfatasa alcalina y glucosa oxidasa; marcadores de radioisótopos, tales como yodo (^{125}I , ^{131}I), carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), tritio (^3H), indio (^{121}In) y tecnecio ($^{99\text{m}}\text{Tc}$); y marcadores luminiscentes, tales como luminol y luciferasa; y marcadores fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina.

La presencia de anticuerpos marcados puede detectarse *in vivo* con fines de diagnóstico. En un caso, el diagnóstico comprende: a) administrar a un sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo marcado; b) esperar un intervalo de tiempo después de la administración para permitir que el anticuerpo marcado se concentre en los sitios donde puede detectarse el antígeno y para permitir que el anticuerpo marcado no unido se aclare hasta el nivel de fondo; c) determinar un nivel de fondo; y d) detectar el anticuerpo marcado en el sujeto, de manera que la detección de anticuerpo marcado por encima del nivel de fondo es indicativa de que el sujeto tiene la enfermedad o trastorno, o es indicativo de la gravedad de la enfermedad o trastorno. De acuerdo con dicha realización, el anticuerpo se marca con un resto de formación de imágenes adecuado para la detección usando un sistema particular de formación de imágenes conocido por los expertos en la materia. Los niveles de fondo pueden determinarse mediante diversos métodos conocidos en la técnica, incluyendo comparar la cantidad de anticuerpo marcado detectado con un valor patrón determinado previamente para un sistema de formación de imágenes particular. Los métodos y sistemas que pueden usarse en los métodos de diagnóstico de la invención incluyen, pero sin limitación, la tomografía computarizada (TC), la exploración corporal total tal como la tomografía de emisión de positrones (TEP), formación de imágenes por resonancia magnética (IRM) y sonografía.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para describir para los expertos en la materia cómo hacer y usar los métodos y las composiciones de la invención, y no tienen por objeto limitar el alcance de lo que los inventores consideran su invención. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, concentraciones, temperatura, etc.), pero deben suponerse algunos errores y desviaciones experimentales.

Ejemplo 1: Preparación de los polipéptidos recombinantes

La generación de los polipéptidos recombinantes, por ejemplo, una C_H de IgG4 quimérica (SEQ ID NO: 31) y una C_H de IgG1 quimérica (SEQ ID NO: 30), se realizó usando técnicas de clonación convencionales. En primer lugar, la C_H de IgG4 quimérica se generó mediante un proceso de amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés) en dos etapas. Se amplificaron dos fragmentos de PCR, Fragmento 1 y 2, usando la construcción de partida pR85501 (que contiene un ADN de C_H de hIgG4 de tipo silvestre) y usando los cebadores oSP030-oSP031 y oSP032-oSP033 (véase la Tabla 8), respectivamente. Los cebadores introdujeron la secuencia de bisagra inferior de IgG2 deseada (que codifica la SEQ ID NO: 3) y los sitios de restricción flanqueantes en los fragmentos. Después, estos dos fragmentos se unieron usando los cebadores de PCR oSP031 y oSP033. La secuencia resultante se insertó en pR85501 a través de sitios de restricción Xho1-Not1 generando una construcción de vector pR85502 que contiene una C_H de IgG4 quimérica que tiene una secuencia de bisagra inferior de IgG2. La secuencia se confirmó usando los cebadores KO_oLRC120 y oKO021.

Además, se generó una C_H de IgG1 quimérica a través de la amplificación por PCR en múltiples etapas. El Fragmento 1a se generó usando cebadores oSP031 y oSP035 (véase la Tabla 8 a continuación) a partir del molde pR85503 (que contiene un ADN de C_H de IgG1 humana de tipo silvestre). El Fragmento 2a se amplificó con los cebadores oSP036 y oSP038 usando pR85502 (que contiene el ADN de C_H de IgG4 quimérica) como molde. El Fragmento 3 se preparó usando los cebadores oSP037 y oSP039 a partir del molde pR85503 (ADN de C_H de IgG1 de tipo silvestre). Los Fragmentos 1a y 2a se unieron usando los cebadores oSP031 y oSP038, que generaron el Fragmento 4. La unión de los Fragmentos 2a y 3 usando los cebadores oSP036 y oSP039 creó el Fragmento 5. Los Fragmentos 4 y 5 se fusionaron usando los cebadores oSP031 y oSP039. La secuencia resultante se insertó en pR85501 a través de los sitios de restricción Xho1-Not1 que generan una construcción pR85504 que tiene una región constante de IgG1 con la bisagra inferior IgG2 y el dominio CH_2 de IgG4. La secuencia se confirmó usando los cebadores KO_oLRC120 y oKO021.

Tabla 8: Cebadores para la generación por PCR de construcciones de ácido nucleico de C_H quimérica

Nombre del cebador	Secuencia del cebador (SEQ ID NO)
oSP030	5'-TTCGCGCAGCTTAGGTTTATGCCAGGGGGGACGGGTGGCACGGGTCGTGGTGGACACCGT-3' (antisentido) (SEQ ID NO: 16)
oSP031	5'-AAGCTTATACTCGAGCTCTAGATTGGGAACCCGGTCTCT-3' (SEQ ID NO: 17)
oSP032	5'-CCCACCGTGCCAGCACCACCTGTGGCAGGACCATCAGTCTTCTGTTCCCCCAAAA-3' (SEQ ID NO: 18)
oSP033	5'-TGTGTCTTCAGGGAGAGGGACAGAGACCCATTTACTCGCCGGCG-3' (antisentido) (SEQ ID NO: 19)
oSP035	5'-CTCGGGTTTAGAACACTGTTTTGAGTGTGTACGGGTGGCACGGGTCGTGGTGGACACCGT-3' (antisentido) (SEQ ID NO: 20)
oSP036	5'-AAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCACCTGTG-3' (SEQ ID NO: 21)
oSP037	5'-GAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACC-3' (SEQ ID NO: 22)
oSP038	5'-CTCTTTTGGTAGAGTTTCGGTTTCCCGTCGGGGCTCTTG GTGTCCACATGTGG-3' (antisentido) (SEQ ID NO: 23)
oSP039	5'-CTTCAGGGAGAGGGACAGAGGCCATTTACTCGCCGGCG-3' (antisentido) (SEQ ID NO: 24)
KO_oLRC120	5'-GCTGACAGACTAACAGACTG-3' (SEQ ID NO: 25)
KO_Fc-4-3	5'-GACCTCAGGGGTCCGGGAG ATCAT-3' (SEQ ID NO: 26)
oKO021	5'-ATACATTATACGAAGTTATACCGGTA-3' (SEQ ID NO: 27)
oKO014	5'-GTGAGCGCTCTTCGGCAGACGTCCAACCTGGTGCAGTCAGGG-3' (SEQ ID NO: 39)
oKO015	5'-CAGCTAGCTCTTCCGGCTGAGGAGACGGTGACCGTGGTGCCTTGCC-3' (SEQ ID NO: 40).

Ejemplo 2: Generación de anticuerpos de cadena pesada quiméricos

- 5 Se obtuvieron anticuerpos ejemplares usando metodologías convencionales. Se usó un anticuerpo anti-hCD3 (anticuerpo anti-hCD3 "L2K") para construir los anticuerpos quiméricos de este ejemplo. L2K se obtuvo mediante métodos bien conocidos basados en el documento WO2004/106380. Anti-hCD3_L2K, designado en el presente documento como Anticuerpo de Control 1, contiene una región constante de la cadena pesada de IgG1 humana de tipo silvestre (SEQ ID NO: 13).
- 10 Los anticuerpos biespecíficos creados de acuerdo con el presente ejemplo comprenden dos dominios de unión a antígeno separados (es decir, brazos de unión). Se obtuvo un anti-hCD3 x anti-hCD20 (anticuerpo biespecífico), designado en el presente documento como Anticuerpo de Control 2, como se describe en la Publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. N.º US20100331527A1. El anticuerpo biespecífico se construyó usando metodologías convencionales en las que una cadena pesada y una cadena ligera de un anticuerpo antiCD3 "L2K" del documento WO2004/106380 se combinaron con una cadena pesada de un anticuerpo anti-CD20 (véase, por ejemplo, la Solicitud Internacional PCT N.º PCT/US13/60511, presentada el 19 de septiembre de 2011). El Anticuerpo de Control 2 contiene regiones constantes de la cadena pesada de IgG4 humana de tipo silvestre (SEQ ID NO: 15), incluso el brazo anti-CD3 tiene un dominio CH3 modificado (SEQ ID NO: 42) para la facilidad de purificación.
- 15 El Anticuerpo de Control 3 se obtuvo usando las mismas metodologías que se describen en el presente documento para combinar las regiones variables del Ab de control 2 (Ab biespecífico Anti-hCD3 x anti-hCD20) con regiones constantes de la cadena pesada de IgG1 humana de tipo silvestre (SEQ ID NO: 13), que tiene un dominio CH3 modificado (SEQ ID NO: 41) en el brazo de la cadena pesada anti-CD3.
- 20 El Anticuerpo de Control 4 contiene un dominio de unión a antígeno capaz de unirse al antígeno CA9 y una región constante de la cadena pesada de IgG1 humana de tipo silvestre (SEQ ID NO: 13).
- 25 El Anticuerpo de Control 5 es un anticuerpo biespecífico anti-hCD3 x anti-hCD20 obtenido de acuerdo con los métodos de la Solicitud Internacional PCT N.º PCT/US13/60511, presentada el 19 de septiembre de 2013). Brevemente, se empareja un primer dominio de unión a antígeno que comprende una región variable de la cadena pesada derivada de un anticuerpo anti-CD20 ("CD20-VH") con una región variable de la cadena ligera derivada de un anticuerpo anti-CD3 ("CD3-VL"). El emparejamiento CD20-VH/CD3-VL crea un dominio de unión a antígeno que reconoce específicamente a CD20. Un segundo dominio de unión a antígeno que comprende una región variable de la cadena pesada derivada de un anticuerpo anti-CD3 ("CD3-VH") se empareja con una región variable de la cadena ligera derivada de un anticuerpo anti-CD3 ("CD3-VL"). El emparejamiento CD3-VH/CD3-VL crea un dominio de unión a antígeno que reconoce específicamente a CD3. El Anticuerpo de Control 5 se modifica mediante ingeniería genética con regiones constantes de la cadena pesada de IgG1 humana de tipo silvestre (SEQ ID NO: 13), pero el brazo antiCD3 tiene un dominio CH3 modificado (SEQ ID NO: 41) en la región constante de la cadena pesada para
- 30
- 35

facilitar la purificación.

Se prepararon controles de isotipo que no se unen al mismo antígeno diana que los anticuerpos sometidos a ensayo, por ejemplo, no se unen al antígeno CD3 o CD20. El control de isotipo de IgG1 de tipo silvestre contiene la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada wt de la SEQ ID NO: 13. El control de isotipo IgG4 "CPPC" de tipo silvestre tiene la secuencia de aminoácidos CH wt de la SEQ ID NO: 15, excepto porque tiene la mutación de bisagra "CPPC" S228P (de acuerdo con la numeración EU).

La región constante del Anticuerpo de Control 1 se reemplazó con una región constante humana quimérica de la invención, por ejemplo, la SEQ ID NO: 31 o la SEQ ID NO: 30. El reemplazo de la región constante se realizó obteniendo una secuencia de ácido nucleico de región variable de L2K (plásmido pR85505) que se amplificó usando los cebadores oKO014 y oKO015 (véase la Tabla 8). La región variable de L2K (SEQ ID NO: 34) se introdujo después en el plásmido pR85502 usando el sitio de restricción Sap1 para la clonación. La secuencia del plásmido resultante pR85506 se confirmó usando los cebadores KO_oLRC120 y oKO_Fc_4-3. Esta construcción se usó para generar el Anticuerpo 1 de la invención, slgG4-anti-CD3_L2K (también conocido en el presente documento como slgG4) (que comprende la SEQ ID NO: 31), usando metodologías convencionales para aislar anticuerpos.

En un segundo ejemplo, la región variable de L2K se amplificó usando los cebadores oKO014 y oKO015 (véase la Tabla 8) usando el plásmido pR85505 como molde. Después, la región variable se introdujo en el plásmido pR85504 usando el sitio de restricción Sap1 para la clonación. La secuencia del plásmido resultante pR85507 se confirmó usando los cebadores KO_oLRC120 y oKO_Fc_4-3. Esta construcción se usó para generar el Anticuerpo 2 de la invención, slgG1-anti-CD3_L2K (también conocido en el presente documento como slgG1) (que comprende la SEQ ID NO: 30), usando metodologías convencionales.

El Anticuerpo 3 se construyó a partir del anticuerpo biespecífico anti-CD3 x anti-CD20 del Anticuerpo de Control (Ab, por sus siglas en inglés) 5. El Ab de Control 5 tuvo sus regiones constantes de la cadena pesada reemplazadas con regiones constantes de la cadena pesada quiméricas, teniendo el brazo anti-CD20 una secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 30 y teniendo el brazo anti-CD3 una mutación en el dominio CH3 del CH (SEQ ID NO: 37) para crear el Anticuerpo 3 (también conocido en el presente documento como slgG1*).

De forma similar, el Anticuerpo 4 se creó a partir del anticuerpo biespecífico Ab de Control 5 mientras que las regiones constantes de la cadena pesada se reemplazaron con CH quimérico, teniendo el brazo anti-CD20 una secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 31 y teniendo el brazo anti-CD3 una mutación en el dominio CH3 del CH (SEQ ID NO: 38) para crear el Anticuerpo 4 (también conocido en el presente documento como slgG4*).

Los anticuerpos quiméricos que comprenden regiones constantes de la SEQ ID NO: 30 o la SEQ ID NO: 31 (o anticuerpos biespecíficos que comprenden la SEQ ID NO: 30/37 o la SEQ ID NO: 31/38), y los anticuerpos de control, se usaron en determinados experimentos establecidos en los Ejemplos a continuación.

Ejemplo 3: Anticuerpos quiméricos unidos específicamente a células Jurkat

Después de que los anticuerpos quiméricos se convirtieran en IgG completamente humanas, se determinaron las propiedades específicas de unión a antígeno. Las construcciones de anticuerpos de ejemplo y los anticuerpos de control, como se exponen en el Ejemplo 2, se sometieron a ensayo usando clasificación celular activada por fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés) para determinar su capacidad para unirse a células Jurkat (estirpe de linfocitos T humanos que expresan antígenos diana CD3+, CD20). Los datos de FACS se adquirieron usando el siguiente protocolo: se incubaron células a 2×10^5 por pocillo con anticuerpos diluidos en serie y 100 μ l de complementos durante 1 hora a 4 °C. Después de la incubación, las células se lavaron dos veces y se añadieron anticuerpos secundarios apropiados (por ejemplo, se añadieron, anti-IgG humana de FITC marcada con fluorescencia) y se incubaron durante 30 minutos adicionales a 4 °C, después se lavaron dos veces. Las células se resuspendieron en PBS frío que contenía BSA al 1 % y se analizaron mediante citometría de flujo en un citómetro de flujo FACSCanto II™ (BD Biosciences). Las células Jurkat se seleccionaron mediante clasificación por dispersión lateral y frontal. Cada CE₅₀ para la titulación de unión a células se determinó usando Prism (GraphPad Software, San Diego, CA) con valores calculados usando un análisis de regresión no lineal de 4 parámetros.

Se determinó que los anticuerpos quiméricos se unen a las células Jurkat a concentraciones iguales en comparación con los anticuerpos de control que tienen una región C_H de tipo silvestre, por tanto, los anticuerpos quiméricos con regiones C_H alteradas no han perdido su capacidad para unirse al antígeno. Véase la Figura 6.

Ejemplo 4: Caracterización de anticuerpos - Unión a células U937

Se sembraron en placa células U937, una estirpe celular de monocitos que expresa FcγRI y FcγRIIA, y se dejaron incubar con diluciones en serie de Ab (la concentración más alta de Ab utilizada es de 50 nM). Las células se incubaron con Ab durante 1 hora a 4 °C y después se lavaron dos veces. Después, las células U937 se incubaron

con Ab secundario (anti-Fab humano de cabra de FITC) durante 30 minutos a 4 °C y después se lavaron dos veces. Las células se analizaron mediante citometría de flujo usando métodos convencionales y se registró la mediana de la intensidad de fluorescencia (MIF). Los resultados se resumen en la Tabla 9 y la Figura 7, donde se demuestra que los anticuerpos Ab quiméricos, Anticuerpo 1 (slgG4) y Anticuerpo 2 (slgG1), se unen a las células U937 a altas concentraciones.

Tabla 9: Unión de Ab quiméricos frente a Ab de tipo silvestre a células U937

Anticuerpo (Ab)	CE ₅₀ (nM)
Ab de Control 1	1,3
slgG1 (Ab2)	45,4
Ab de Control 2	0,91
slgG4 (Ab 1)	33,5

Ejemplo 5: Caracterización de Anticuerpos - ensayo citotóxico de U937

Se usaron células U937 como control efector citolítico positivo en el siguiente citoensayo. Como tal, se sometió a ensayo la capacidad de los anticuerpos con regiones C_H quiméricas para destruir células U937 a través de interacciones Fc/FcγR. Los ensayos de destrucción con calceína se realizaron usando el siguiente protocolo: Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) humanas y de macaco sobre Ficoll-Paque (GE Healthcare Life Sciences) o a través de medio de separación por densidad de células Linfocito-Mamífero (Cedarlane Laboratories), respectivamente. Las CMSP aisladas se activaron a lo largo de varios días con medio que contenía IL-2 humana recombinante (30 U/ml) y perlas de activación de linfocitos T (anti-CD3/CD28 para CMSP humanas, antiCD2/CD3/CD28 para CMSP de macaco). Los linfocitos T activados se aislaron de las CMSP mediante centrifugación, después se resuspendieron en 1 ml de medio. Las perlas magnetizadas se retiraron de los linfocitos T. Las células diana (U937) se marcaron con calceína, después se lavaron y se continuaron incubando con los linfocitos T activados aislados (relación efector:diana 10:1) y anticuerpo, usando diluciones triples de anticuerpos en un curso de 3 horas a 37 °C. Después de la incubación, las placas se centrifugaron y los sobrenadantes se transfirieron a una placa inferior transparente de color negro translúcido para el análisis por fluorescencia. Cada CE₅₀, definida como la concentración molar de anticuerpo que induce una citotoxicidad del 50 %, se determinó usando Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). Los valores se calcularon usando un análisis de regresión no lineal de 4 parámetros. Los resultados se resumen en la Figura 8.

La actividad citotóxica del Anticuerpo 1 (slgG4) y del Anticuerpo 2 (slgG1) disminuye significativamente en comparación con los anticuerpos correspondientes que contienen regiones de bisagra de IgG4 e IgG1 de tipo silvestre. Véase la Figura 8. Curiosamente, aunque los Ab quiméricos se unen débilmente a concentraciones más altas como se muestra en el Ejemplo 4, no destruyen células U937 en el citoensayo.

Ejemplo 6 - Caracterización de anticuerpos - Proliferación de CMSP

La capacidad de los anticuerpos quiméricos y las construcciones de control para estimular células mononucleares de sangre periférica (CMSP) e inducir la proliferación se evaluó usando cuantificación catalizada por ATP (CellTiter Glo®). La activación de las CMSP da como resultado la liberación de citocinas, que impulsan la proliferación celular. Los datos de proliferación se obtuvieron usando el siguiente protocolo: Se incubaron CMSP derivadas de ser o de macaco (5x10⁵/pocillo) con una dilución en serie con factor de dilución 3 de anti-CD20xCD3 o anticuerpo de Control (incluyendo Ab de Control 4 específico de antígeno CA9) en placas de 96 pocillos durante 72 h a 37 °C. Después de la incubación, se añadió CellTiter Glo® y se midió la luminiscencia usando un lector de placas de múltiples marcadores VICTOR X5 (PerkinElmer). La CE₅₀ de la viabilidad celular (cuantificación catalizada por ATP) se determinó usando Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). Los valores se calcularon usando un análisis de regresión no lineal de 4 parámetros y se muestran en la Figura 9.

El Anticuerpo 1 (slgG4) y el Anticuerpo 2 (slgG1) no activan la proliferación celular en comparación con los anticuerpos correspondientes que contienen regiones bisagra de IgG4 e IgG1. Véase la Figura 9.

Ejemplo 7 - Afinidades de unión derivadas de resonancia de plasmón superficial y constantes cinéticas de anticuerpos quiméricos

Se analizaron los anticuerpos biespecíficos anti-CD3 x anti-CD20 que tienen regiones constantes de la cadena pesada quiméricas slgG1* (Anticuerpo 3) y slgG4* (Anticuerpo 4) usando tecnología de Resonancia de Plasmón Superficial (SPR, por sus siglas en inglés) (Biacore) para determinar sus parámetros cinéticos de unión a receptores Fcγ humanos y de macaco. Los controles de isotipo, es decir, el control de isotipo de IgG1 wt y el control de isotipo de CPPC de IgG4 wt, se sometieron a ensayo de manera similar.

Brevemente, los experimentos de SPR se realizaron a 25 °C en un instrumento Biacore T200 que emplea un chip recubierto con carboximetil dextrano (CM-5). Se inmovilizó un anticuerpo monoclonal anti-penta-histidina de ratón

(GE Healthcare) sobre la superficie del chip sensor CM-5 usando química de acoplamiento de amina convencional. Se capturaron 140RU-376RU de proteínas FcγR humanas o de mono marcadas con His sobre el chip CM-5 acoplado a amina anti-penta-histidina y se inyectaron soluciones madre de anticuerpos a 20 μl/min durante 2,5 min sobre las proteínas capturadas. Se controló la respuesta de unión de mAb y, para receptores de baja afinidad, se calculó el equilibrio de unión en estado estacionario. Las constantes de velocidad de asociación cinética (k_a) y de disociación (k_d) se determinaron procesando y ajustando los datos a un modelo de unión 1:1 usando el software de ajuste de curvas Scrubber 2.0. Las constantes de equilibrio de disociación de unión (K_D) y las semividas disociativas ($t_{1/2}$) se calcularon a partir de las constantes de velocidad cinética como: K_D (M) = k_d/k_a ; y $t_{1/2}$ (min) = $(\ln 2)/(60 \cdot k_d)$.

10 **Tabla 10: Parámetros de unión cinética para anticuerpos de cadena pesada de tipo silvestre (wt) y quimérica**

Unión a FcγRI humano capturado con His a 25 °C				
Anticuerpo	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D ($10^{-9}M$)	$T^{1/2}$ (min)
Control de isotipo IgG1 wt	1,74E + 05	7,48E-04	4,3	15
Control de isotipo CPPC IgG4 wt	1,71E + 05	2,36E-03	13,9	5
slgG1* (Ab 3)	SU	SU	SU	SU
slgG4* (Ab 4)	SU	SU	SU	SU

SU: Sin unión

Como demuestran los resultados de la Tabla 10, los anticuerpos biespecíficos slgG1* y slgG4* no muestran ninguna unión a FcγRI humano, en comparación con los anticuerpos que tienen la región CH de CPPC de hIgG1 o hIgG4 de tipo silvestre. Los anticuerpos de cadena pesada quimérica de la presente invención también muestran una unión débil o nula para varios de los receptores FcRγ de baja afinidad (por ejemplo, FcRγIIa, FcRγIIb) en comparación con anticuerpos con la secuencia Fc de CPPC de hIgG1 o hIgG4 wt (Tabla 11).

15

Tabla 11: Unión en equilibrio de estado estacionario para anticuerpos de tipo silvestre (wt) y de cadena pesada quimérica

Anticuerpos sometidos a ensayo	Unión a receptores FcγR humanos y de macaco de baja afinidad capturados por His a 25 °C									
	K _D (10 ⁻⁶ M) Valores para la unión de FcγR de baja afinidad a anticuerpos de cadena pesada quiméricos									
	hFcγRIIA humano (H131)	FcγRIIA humano (R131)	FcγRIIA de macaco	FcγRIIB humano	FcγRIIB de macaco	FcγRIIA humano (V176)	FcγRIIA humano (F176)	FcγRIIA de macaco	FcγRIIB humano	
Control de isotipo wtIgG1	1,1	2	4,2	2	4,2	1,5	1,3	0,6	2,3	
Control de isotipo (CPPC) wtIgG4	12	10	19,3	9,8	9,6	10	26	5,8	NB	
sigG1* (Ab 3)	11,7	20,5	23,5	233	14,6	SU	SU	42,4	NB	
sigG4* (Ab 4)	12	19,3	23,1	123	13,9	SU	SU	66,3	NB	

SU: Sin unión

Ejemplo 8 - Anticuerpos IgG1 e IgG4 que tienen regiones CH quiméricas que muestran una función efectora disminuida en ensayo de CDC

Se generaron anticuerpos con regiones CH híbridas (slgG1* y slgG4*), como se ha descrito anteriormente, para producir mAb con una función efectora alterada o reducida. En comparación con los anticuerpos que comprenden una región constante de la cadena pesada de tipo silvestre (wt) del isotipo IgG1, las sustituciones de aminoácidos en la región CH pueden obstaculizar la capacidad de un Ig Fc para unirse a su receptor. Por tanto, la señalización y las respuestas inmunitarias, tales como la activación de las células B o la fagocitosis, pueden alterarse. Se examinó el efecto de las modificaciones de aminoácidos en la región CH sobre la función efectora de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) (en este ejemplo) y citotoxicidad dependiente del anticuerpo (CCDA) (véase el Ejemplo 9).

Para examinar el efecto del Anticuerpo 3 (slgG1*) y del Anticuerpo 4 (slgG4*) sobre la función efectora de CDC, se sembraron células (diana) Raji que expresaban CD20 (5000/pocillo) o células Daudi en presencia de complemento de suero humano al 5 %. Se añadieron diluciones en serie de slgG1*, slgG4* y anticuerpos de control, comenzando a 100 nM, a las células durante 4 horas a 37 °C. La lisis de células diana se determinó usando el kit CytoTox Glo™ (Promega) y se calculó el porcentaje de citotoxicidad.

El porcentaje de citotoxicidad se calculó usando la ecuación:

$$\% \text{ de citotoxicidad} = ((L_s - L_{SR}) / (L_{MR} - L_{SR})) * 100 \%$$

donde L_{SR} es luminiscencia basal de la célula diana y L_{MR} es la liberación máxima de calceína de las células lisadas por digitonina. La CE_{50} para la citotoxicidad se determinó usando el software Prism (GraphPad). Los valores se calcularon usando análisis de regresión no lineal de 4 parámetros y se muestran en la Tabla 12 y las Figuras 10A y 10B.

La actividad de CDC del Anticuerpo 3 (slgG1*) y el Anticuerpo 4 (slgG4*) contra las células Daudi y Raji disminuye significativamente en comparación con el anticuerpo correspondiente que tiene un dominio constante de la cadena pesada wt. Véase la Tabla 12 y las Figuras 10A/B. Se observó cierta actividad de CDC con slgG4* contra células Raji, sin embargo, los resultados globales muestran que los anticuerpos quiméricos montan respuestas efectoras más débiles que los anticuerpos de control de IgG1Fc wt.

Tabla 12: Los anticuerpos slgG1* y slgG4* muestran una actividad reducida en los ensayos de CDC que miden la función efectora

CDC				
Célula diana:	Daudi		Raji	
	CE50 [M]	Citotoxicidad máxima (%)	CE50 [M]	Citotoxicidad máxima (%)
Ab de Control 5	6,12E-08	~ 95	1,98E-08	-85
Ab 3 (slgG1*)	SA	SA	3,49E-08	-10
Ab 4 (slgG4*)	SA	SA	2,86E-08	-45

SA: Sin actividad

Ejemplo 9 - Los anticuerpos IgG1 e IgG4 que tienen regiones CH híbridas muestran disminución Función efectora en el ensayo CCDA

Para examinar el efecto del Anticuerpo 3 (slgG1*) y el Anticuerpo 4 (slgG4*) frente a anticuerpos con regiones CH de tipo silvestre sobre la función efectora CCDA, se sembraron en placas linfocitos NK92 o linfocitos NK positivos para CD56 no estimulados recién aislados, modificados mediante ingeniería genética para expresar el alelo V de mayor afinidad de FcγRIIIa con células Raji o Daudi positivas para CD20 marcadas con calceína en presencia de anticuerpos CH quiméricos y anticuerpos control CH wt. Se controló la liberación de calceína de las células diana y se determinó el porcentaje de citotoxicidad. El porcentaje de citotoxicidad y la CE_{50} se calcularon como se ha descrito para el ensayo de CDC, anteriormente. Los resultados se muestran en la Tabla 13 y las Figuras 11A y 11B.

Los anticuerpos CH quiméricos, slgG1* y slgG4*, no median la actividad de CCDA (Tabla 13) contra las células Raji o Daudi.

Tabla 13: Los anticuerpos slgG1* y slgG4* presentan una actividad reducida en los ensayos de CCDA que miden la función efectora

CCDA				
Célula diana:	Daudi		Raji	
	CE50 [M]	Citotoxicidad máxima (%)	CE50 [M]	Citotoxicidad máxima (%)
Ab de Control 5	1,87E-10	~70 [#]	1,48E-09	~65 [#]
Ab 3 (slgG1*)	SA	SA	SA	SA

CCDA				
Célula diana:	Daudi		Raji	
	CE50 [M]	Citotoxicidad máxima (%)	CE50 [M]	Citotoxicidad máxima (%)
Ab 4 (slgG4*)	SA	SA	SA	SA

SA: Sin actividad; #: citotoxicidad de fondo -20 %

Ejemplo 10 - Perfil farmacocinético de anticuerpos quiméricos

El perfil toxicocinético del Anticuerpo 3 (también conocido en el presente documento como slgG1*) y el Anticuerpo 4 (también conocido en el presente documento como slgG4*) se evaluó obteniendo muestras de sangre de macacos macho (3 animales/grupo de tratamiento) que recibieron una única infusión intravenosa de 30 minutos, seguida de un período de observación de 12 semanas. Se tomaron muestras de sangre para el análisis toxicocinético de las concentraciones totales del fármaco en suero antes y después de la dosis a los 5 minutos y 5, 24, 48, 72 y 168 horas y los Días 14, 21, 35, 49, 66 y 84. Las muestras de suero resultantes se analizaron mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) directo para determinar la concentración total de fármaco del anticuerpo slgG1* o slgG4*. La toxicocinética de los artículos de ensayo se evaluó mediante análisis no compartimental (Phoenix WinNonLin) para determinar los parámetros farmacocinéticos. Los resultados se muestran en la Tabla 14 (ABC = área bajo la curva de concentración frente al tiempo, $C_{m\acute{a}x}$ = concentración máxima observada en suero).

Tabla 14: Perfil farmacocinético de anticuerpos quiméricos en suero de macacos después de una única infusión intravenosa a macacos

Parámetro	Unidades	slgG1* 1 mg/kg		slgG4* 1 mg/kg	
		Media	DT	Media	DT
$C_{m\acute{a}x}$	$\mu\text{g}/\text{mL}$	33,4	3,79	26,0	4,72
$C_{m\acute{a}x}/\text{Dosis}$	$\text{kg}^*\mu\text{g}/\text{ml}/\text{mg}$	33,4	3,79	26,0	4,72
$t_{m\acute{a}x}$	día	0,0243	0	0,0243	0
$ABC_{0-168\text{ h}}$	día. $\mu\text{g}/\text{ml}$	100	20,1	61,1	8,04
$ABC_{0-168\text{ h}}/\text{Dosis}$	día* $\text{kg}^*\mu\text{g}/\text{ml}/\text{mg}$	100	20,1	61,1	8,04
T1/2	Día	8,14	1,15	14,0	2,64

Tras una única dosis intravenosa de 1,0 mg/kg de slgG1* y slgG4* en macacos, se observaron concentraciones máximas medias ($C_{m\acute{a}x}$) de 33,4 y 26,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectivamente, y valores de $ABC_{0-168\text{ h}}$ medios de 100 y 61,1 día* $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectivamente. La semivida terminal aparente se estimó entre 8,14-14,0 días de estas dos moléculas. Los datos indican que la exposición continua a slgG1* y slgG4* se mantuvo en todos los animales durante la mayor parte del período de observación de 12 semanas y la exposición fue comparable en todos los grupos de tratamiento. No se observó inmunogenia aparente con los artículos de ensayo. Los perfiles farmacocinéticos globales de slgG1* y slgG4* son típicos de los anticuerpos monoclonales dosificados en macacos.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

<120> ANTICUERPOS QUE COMPRENEN DOMINIOS CONSTANTES QUIMÉRICOS

<130> 8550/PCT

<150> US 61/759.578

<151> 01-02-2013

<160> 44

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 232

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 1

ES 2 687 866 T3

Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10 15

Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45

Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 65 70 75 80

Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
 100 105 110

Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125

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

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175

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

Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe
 195 200 205

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

Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 225 230

<210> 2

ES 2 687 866 T3

<211> 235
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Sintética

<400> 2

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

Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
20 25 30

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
35 40 45

Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
50 55 60

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
65 70 75 80

10 Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val

ES 2 687 866 T3

85

90

95

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
100 105 110

Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
115 120 125

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
130 135 140

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

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
165 170 175

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

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
195 200 205

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
210 215 220

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230 235

5 <210> 3
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 3

10 Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala
1 5

15 <210> 4
<211> 4
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 4

20 Asp Lys Lys Val
1

<210> 5
<211> 4

ES 2 687 866 T3

<212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5
 <400> 5
 Asp Lys Arg Val
 1

<210> 6
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10
 <400> 6
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 1 5 10

15
 <210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20
 <400> 7
 Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
 1 5

25
 <210> 8
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> Sintética

35
 <400> 8
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15
 Pro Pro Val Ala
 20

40
 <210> 9
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45
 <220>
 <223> Secuencia artificial

<400> 9
 Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val
 1 5 10 15
 Ala

ES 2 687 866 T3

<210> 10
 <211> 104
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 10

```

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

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln
          20           25           30

Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
          35           40           45

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr
          50           55           60

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
65           70           75           80

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile
          85           90           95

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
          100
    
```

10 <210> 11
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 11

```

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
1           5           10           15
    
```

ES 2 687 866 T3

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 20 25 30
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 35 40 45
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 50 55 60
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 65 70 75 80
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 85 90 95
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 100 105

<210> 12
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 12

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
 1 5 10 15
 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 20 25 30
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 35 40 45
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 50 55 60
 Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
 65 70 75 80
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 85 90 95
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

10

100

105

<210> 13

ES 2 687 866 T3

<211> 330
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 13

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

ES 2 687 866 T3

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 14
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 14

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

10

ES 2 687 866 T3

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

 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

 Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

 Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 115 120 125

 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140

 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160

 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 165 170 175

 Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 180 185 190

 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 195 200 205

 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220

 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240

 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255

 Ser Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270

 Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285

 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys

ES 2 687 866 T3

290

295

300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 15
<211> 327
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 15

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

10

ES 2 687 866 T3

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

5 <210> 16
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 16
 ttcgcgagc ttaggttat gccagggggg acgggtggca cgggtcgtgg tggacaccgt 60

15 <210> 17
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>

ES 2 687 866 T3

<223> Sintético
 <400> 17
 aagcttatac togagctcta gattgggaac cgggtctct 40
 5
 <210> 18
 <211> 58
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Sintético
 <400> 18
 15
 cccaccgtgc ccagcaccac ctgtggcagg accatcagtc ttctgttcc ccccaaaa 58
 <210> 19
 <211> 44
 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintético
 25
 <400> 19
 tgtgtctca gggagagggga cagagacca ttactcgcc ggcg 44
 <210> 20
 <211> 60
 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintético
 35
 <400> 20
 ctcggttta gaacactgtt ttgagtgtg acgggtggca cgggtcgtgg tggacaccgt 60
 40
 <210> 21
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Sintético
 <400> 21
 aaatctgtg acaaaactca cacatgccca cgtgcccag caccacctgt g 51
 50
 <210> 22
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Sintético
 <400> 22
 60
 gagaaaacca tctcaaagc caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta cacc 54
 <210> 23
 <211> 54

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Sintético

 <400> 23
 ctctttggt agaggtttcg gttcccgtc ggggctcttg gtgtccacat gtgg 54

 10 <210> 24
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Artificial

 <400> 24
 cttcaggag agggacagag gccatttac tcgccggcg 39
 20
 <210> 25
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Sintético

 <400> 25
 30 gctgacagac taacagactg 20

 <210> 26
 <211> 24
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sintético

 <400> 26
 40 gacctcaggg gtccgggaga tcat 24

 <210> 27
 <211> 26
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sintético

 <400> 27
 50 atacattata cgaagttata ccgcta 26

 <210> 28
 55
 <211> 990
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 60 <220>
 <223> Sintético

 <400> 28

ES 2 687 866 T3

gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60
 ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgctg 120
 tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtgtctct acagtctctca 180
 ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 240
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 300
 aaatcttgtg acaaaaactca cacatgcccc ccgtgccag caccacctgt ggcaggacca 360
 tcagtcttcc tgttcccccc aaaacccaag gacactctca tgatctcccg gaccctgag 420
 gtcacgtgcg tgggtgtgga cgtgagccag gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 480
 gtggatggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc 540
 acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 600
 tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccgtctcca tcgagaaaac catctccaaa 660
 gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg 720
 accaagaacc aggtcagcct gacctgctg gtcaaaggct tctatoccag cgacatcgcc 780
 gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 840
 gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 900
 caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 960
 aagtcctctt ccctgtctcc gggtaaatga 990

<210> 29
 <211> 981
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintético

10

<400> 29

ES 2 687 866 T3

gccagcacia aaggtcctag cgtttttcca ctgccccat gttcaaggtc aacctccgaa 60
 agtaccgccc ctcttggtg tctcgtaaaa gattattttc ccgaacctgt aactgtctcc 120
 tggaactccg gcgcactcac ttccggcgta cataccttcc ccgctgtcct ccaatcttcc 180
 ggtctctact ccctgtcttc tgttgtaact gttccatcat cctcaactcg cacaaaaaca 240
 tatacctgca acgttgatca caagccaagt aataccaaag ttgataagcg cgtcgaatcc 300
 aaatacggtc cccctgccc accgtgcca gcaccactg tggcaggacc atcagtcttc 360
 ctgttcccc caaaaccaa ggacactctc atgatctccc ggaccctga ggtcacgtgc 420
 gtgggtggg acgtgagcca ggaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggatggc 480
 gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg cgggaggagc agttcaacag cacgtaccgt 540
 gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc 600
 aaggtctcca acaaaggcct cccgtcctcc atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg 660
 cagccccgag agccacaggt gtacacctg ccccatccc aggaggagat gaccaagaac 720
 caggtcagcc tgacctgct ggtcaaaggc ttctaccca gcgacatcgc cgtggagtgg 780
 gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccagc ctcccgtgct ggactccgac 840
 ggctccttct tcctctacag caggctcacc gtggacaaga gcagggtggca ggaggggaat 900
 gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacaca gaagtccctc 960
 tccctgtctc tgggtaaag a 981

<210> 30
 <211> 329
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

<400> 30

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

ES 2 687 866 T3

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 130 135 140

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
 145 150 155 160

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 165 170 175

Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 180 185 190

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 195 200 205

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 210 215 220

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 225 230 235 240

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 245 250 255

ES 2 687 866 T3

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 260 265 270

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 275 280 285

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 290 295 300

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 305 310 315 320

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

<210> 31
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

<400> 31

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

5

10

ES 2 687 866 T3

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140

Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 165 170 175

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 195 200 205

Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg
 275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320

Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 32
 <211> 708
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 687 866 T3

<220>
<223> Sintético

<400> 32

5
gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca 60
ccacctgtgg caggaccatc agtcttctctg ttccccccaa aaccaagga cactctcatg 120
atctcccgga cccctgaggt cacgtgcgtg gtggtggacg tgagccagga agaccccag 180
gtccagttca actggtacgt ggatggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg 240
gaggagcagt tcaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac 300
tggctgaacg gcaaggagta caagtgcaag gtctccaaca aaggcctccc gtctccatc 360
gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgcc 420
ccatcccggg atgagctgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggg caaaggcttc 480
tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag 540
accagcctc ccgtgctgga ctccgacggc tccttcttcc tctacagcaa gtcaccgtg 600
gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg 660
cacaaccact acacgcagaa gtccctctcc ctgtctccgg gtaaata 708

<210> 33
<211> 699
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Sintético

<400> 33

15

gataagcgcg tcgaatccaa atacggtccc cctgcccac cgtgcccagc accacctgtg 60
gcaggaccat cagtcttctt gttccccca aaaccaagc acactctcat gatctcccgg 120
accctgagg tcacgtgcgt ggtggtggac gtgagccagg aagaccccga ggtccagttc 180
aactggtacg tggatggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 240
ttcaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctaccgtcc tgcaccagga ctggctgaac 300
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaaggcctcc cgtcctccat cgagaaaacc 360
atctccaaag ccaaaggga gccccgagag ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccag 420
gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctaccccagc 480

ES 2 687 866 T3

gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 540
 cccgtgctgg actccgacgg ctctctcttc ctctacagca ggctcacctg ggacaagagc 600
 aggtggcagg aggggaatgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggetct gcacaaccac 660
 tacacacaga agtccctctc cctgtctctg ggtaaata 699

5 <210> 34
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético
 <400> 34

gacgtccaac tgggtgcagtc aggggctgaa gtgaaaaaac ctggggcctc agtgaagggtg 60
 tcctgcaagg cttctggcta cacctttact aggtacacga tgcactgggt aaggcaggca 120
 cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaatccta gccgtgggta tactaattac 180
 gcagacagcg tcaagggccg cttcacaatc actacagaca aatccaccag cacagcctac 240
 atggaactga gcagcctgcg ttctgaggac actgcaacct attactgtgc aagatattat 300
 gatgatcatt actgccttga ctactggggc caaggcacca cggtcaccgt ctctca 357

15 <210> 35
 <211> 990
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético
 <400> 35

gcctccacca agggcccacg ggtcttcccc ctggcacctc cctccaagag cacctctggg 60
 ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 120
 tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180
 ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 240
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 300
 aaatcttgtg acaaaaactca cacatgcca ccgtgcccag caccacctgt ggcaggacca 360
 tcagtcttcc tgttcccccc aaaaccaag gacactctca tgatctcccg gaccctgag 420
 gtcacgtgcg tgggtgggga cgtgagccag gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 480
 gtggatggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc 540

25

ES 2 687 866 T3

acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 600
 tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccgtcctcca tcgagaaaac catctccaaa 660
 gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg 720
 accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 780
 gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 840
 gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 900
 caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacag attcacgcag 960
 aagtcctctt ccctgtctcc gggtaaataga 990

5 <210> 36
 <211> 981
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 36

gccagcacia aaggtcctag cgtttttcca ctgccccat gttcaaggct aacctccgaa 60
 agtaccgccg ctcttggctg tctcgtaaaa gattattttc ccgaacctgt aactgtctcc 120
 tggaaactccg gcgcactcac ttccggcgta cataccttcc ccgctgtcct ccaatcttcc 180
 ggtctctact ccctgtcttc tgttgtcact gttccatcat cctcactcgg cacaaaaaca 240
 tatacctgca acgttgatca caagccaagt aataccaaag ttgataagcg cgtcgaatcc 300
 aaatacggct ccccctgccc accgtgcca gcaccacctg tggcaggacc atcagtcttc 360
 ctgttcccc caaaacccaa ggacactctc atgatctccc ggaccctga ggtcacgtgc 420
 gtggtggtgg acgtgagcca ggaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggatggc 480
 gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg cgggaggagc agttcaacag cacgtaccgt 540
 gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc 600
 aaggtctcca acaaaggcct ccctcctcc atcgagaaaa ccctctccaa agccaaaggg 660
 cagccccgag agccacaggt gtacaccctg ccccatccc aggaggagat gaccaagaac 720
 caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctacccca gcgacatcgc cgtggagtgg 780
 gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 840
 ggctccttct tcctctacag caggctcacc gtggacaaga gcaggtggca ggaggggaat 900
 gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaaca gattcacaca gaagtcctc 960
 tcctgtctc tgggtaaatag a 981

15 <210> 37
 <211> 329

ES 2 687 866 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Sintético

<400> 37

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
130 135 140

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
145 150 155 160

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
165 170 175

ES 2 687 866 T3

Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 180 185 190

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 195 200 205

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 210 215 220

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 225 230 235 240

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 245 250 255

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 260 265 270

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 275 280 285

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 290 295 300

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
 305 310 315 320

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

<210> 38
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

<400> 38

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

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

5

10

ES 2 687 866 T3

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140

Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 165 170 175

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 195 200 205

Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270

ES 2 687 866 T3

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg
 275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320

Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

5 <210> 39
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 39
 gtgagcgc ttcggcagac gtccaactgg tgcagtcagg g 41

15 <210> 40
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 40
 cagctagctc ttccggctga ggagacggtg accgtggtgc cttggcc 47

25 <210> 41
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintética

<400> 41

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 1 5 10 15

35 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 20 25 30

ES 2 687 866 T3

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe
 85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 100 105

5 <210> 42
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintética
 <400> 42

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
 1 5 10 15

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 20 25 30

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
 65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe
 85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 100 105

15 <210> 43
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 687 866 T3

<400> 43

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val

5 <210> 44
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 44

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que comprende una región constante de la cadena pesada (CH) que comprende, del extremo N al extremo C, un dominio CH1, una bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3 en el que:

- 5 (a) el dominio CH1 comprende un dominio CH1 de IgG1 humana o un dominio CH1 de IgG4 humana que tiene la secuencia de aminoácidos DKKV o DKRV de las posiciones 212 a 215 (numeración EU),
 (b) la bisagra comprende una secuencia de aminoácidos de bisagra superior de IgG1 humana o IgG4 humana de las posiciones 216 a 227 (numeración EU) y una secuencia de aminoácidos de bisagra inferior de IgG2 humana PCPAPPVA (SEQ ID NO: 3) de las posiciones 228 a 236 (numeración EU),
 10 (c) el dominio CH2 comprende una secuencia de aminoácidos del dominio CH2 de IgG4 humana de las posiciones 237 a 340 (numeración EU) y
 (d) el dominio CH3 comprende una secuencia del dominio CH3 de IgG1 humana o IgG4 humana de las posiciones 341 a 447 (numeración EU), y

15 en el que el anticuerpo es capaz de unirse a un FcγR con menor afinidad que un anticuerpo correspondiente que comprende una región constante de cadena pesada de IgG1 de tipo silvestre o IgG4 de tipo silvestre, el anticuerpo es capaz de unirse a FcγRIIA y opcionalmente a FcγRIIB, y el anticuerpo es capaz de unirse a FcγRIIA con mayor afinidad en comparación con su afinidad de unión a FcγRIIB.

20 2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que: (a) el dominio CH1 comprende la secuencia de aminoácidos DKKV (SEQ ID NO: 4) y la bisagra comprende la secuencia de aminoácidos EPKSCDKTHTCPPCPAPPVA (SEQ ID NO: 8), o (b) el dominio CH1 comprende la secuencia de aminoácidos DKRV (SEQ ID NO: 5), y la bisagra comprende la secuencia de aminoácidos ESKYGPPCPPCPAPPVA (SEQ ID NO: 9).

25 3. El anticuerpo de la reivindicación 1 o 2, en el que el dominio CH2 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 10.

30 4. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el dominio CH3 comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42.

35 5. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que la región CH tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2.

6. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que la región CH tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a la SEQ ID NO: 30.

40 7. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que la región CH tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a la SEQ ID NO: 31.

8. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que la región CH tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a la SEQ ID NO: 37.

45 9. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que la región CH tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a la SEQ ID NO: 38.

50 10. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el anticuerpo presenta menos del 20 % de citotoxicidad CDC y/o citotoxicidad CCDA, o inferior al 10 %, o al 5 %, al 4 %, al 3 %, al 2 %, o incluso al 0 %, o una citotoxicidad CDC y/o CCDA indetectable, a una concentración de anticuerpo de al menos 10 nM.

55 11. El anticuerpo de la reivindicación 10, en el que la actividad citotóxica de CDC y/o CCDA es al menos 5 veces inferior, o al menos 10 veces inferior a la actividad citotóxica de CDC y/o CCDA de un anticuerpo correspondiente que comprende una región CH de IgG1 de tipo silvestre o IgG4 de tipo silvestre.

12. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 que es un anticuerpo monoespecífico.

13. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 que es un anticuerpo biespecífico.

60 14. Moléculas de ácido nucleico que codifican un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

15. Un vector que comprende las moléculas de ácido nucleico de la reivindicación 14.

65 16. El vector de la reivindicación 15, en el que:

- (a) las moléculas de ácido nucleico están operativamente unidas a una secuencia de control de la expresión

- 5 adecuada para la expresión en una célula hospedadora, opcionalmente en las que la secuencia de control de la expresión comprende (i) un promotor seleccionado entre el grupo que consiste en SV40, CMV, CMV-IE, CMV-MIE, UbC, RSV, SL3-3, MMTV, Ubi y LTR de HIV, (ii) un casete de expresión seleccionado entre el grupo que consiste en un gen de fusión TetR-ER_{LBD}T2 impulsado por el promotor CMV-MIE, gen de resistencia a blasticidina impulsado por el promotor SV40, y un gen de fusión Arc-ER_{LBD}T2 impulsado por el promotor CMV-MIE; o (iii) un promotor híbrido CMV-MIE/TetO o CMV-MIE/Arc; y/o
- (b) el vector comprende uno o más genes marcadores seleccionables seleccionados entre el grupo que consiste en bla, bis, BSD, bsr, Sh ble, hpt, tetR, tetM, npt, kanR y pac.
- 10 17. Una célula que comprende las moléculas de ácido nucleico de la reivindicación 14.
18. La célula de la reivindicación 17, en la que:
- 15 (a) la célula comprende un vector de la reivindicación 15 o 16; y/o
- (b) las moléculas de ácido nucleico se integran en el genoma de la célula; y/o
- (c) la célula comprende un ácido nucleico que codifica un potenciador de la expresión de proteínas y/o
- (d) la célula comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido XBP; y/o
- (e) la célula es una célula eucariótica, una célula animal, una célula de mamífero, una célula CHO o una célula CHO-K1.
- 20

Convenios de numeración de aminoácidos correspondientes para regiones bisagra: hlgG1, hlgG2 y hlgG4

Bisagra												Bisagra codificada por el exón CH2											
hlgG1 wt	E	P	K	S	C	D	K	T	H	I	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G		
hlgG1 EU	215	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236		
hlgG1 Kabat	225	227	228	232 ^a	233 ^a	234 ^a	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249		
				229 ^a	230 ^a	232 ^a																	
hlgG1 IMGCT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	1.5	1.4	1.3	1.2	1.1		
hlgG2 wt	E	R	K	C	C	--	Y	--	E	--	C	P	P	C	P	A	P	P	Y	A	--		
hlgG2 EU	215	217	218	219 ^a	220 ^a		222		224		226	227	228	229	230	231 ^a	232 ^a	233 ^a	234 ^a	235 ^a	236 ^a		
				221 ^a	-- ^a																		
hlgG2 Kabat	225	227	228	232	233		235		237		239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249		
hlgG2 IMGCT	1	2	3	4	5		6		7		8	9	10	11	12	-	-	-	-	-	-		
hlgG4 wt	E	S	K	Y	G	--	--	--	P	P	C	P	S	C	P	A	P	E	F	L	G		
hlgG4 EU	216	217	218	-- ^a	-- ^a				224	225	226	227	228	229	230	231 ^a	232 ^a	233 ^a	234 ^a	235 ^a	236 ^a		
				219 ^a	220 ^a																		
hlgG4 Kabat	225	227	228	229	230				237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249		
hlgG4 IMGCT	1	2	3	4	5				6	7	8	9	10	11	12	-	-	-	-	-	-		

wt = tipo silvestre

- significa ningún número correspondiente publicado

-- significa ningún aminoácido correspondiente

^a numeración de acuerdo con la última Tabla Científica IMGCT actualizada (IMGCT®, international ImmunGeneTics information system®, http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html, creada: 17 de mayo de 2001, última actualización: 10 de enero de 2013)

^b numeración de acuerdo con el índice EU publicado en Kabat, EA, et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. 5ª ed. Departamento de Salud y Servicios Sociales de los EE.UU., Publicación de NIH N.º 91-3242 (1991)

FIG. 1

ES 2 687 866 T3

```

      10          20          30          40          50          60
ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPVQLQSS

                                     ← CH1 Bisagra →      CH2 →
      70          80          90          100          110          120
GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG

      130          140          150          160          170          180
PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN

                                     CH3 →
      190          200          210          220          230          240
STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE

      250          260          270          280          290          300
LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW

      310          320          330
QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

```

Región constante de la cadena pesada de IGHG1 humana
 N.º de acceso de UniProtKB/Swiss-Prot N.º P01857
 (SEQ ID NO: 13)

FIG. 3

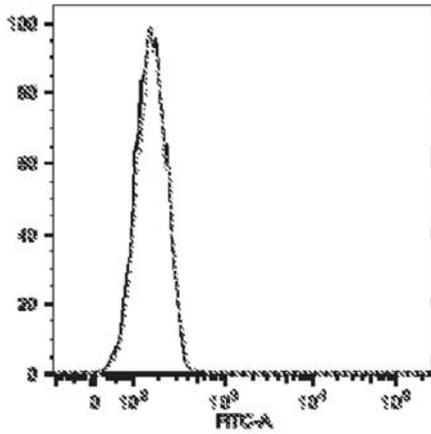
ES 2 687 866 T3

10	20	30	40	50	60
<u>ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSKV HTFPAVLOSS</u>					
			← CH1 Hinge →		CH2 →
70	80	90	100	110	120
<u>GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCPSCP APEFLGGPSV</u>					
130	140	150	160	170	180
<u>FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY</u>					
				CH3 →	
190	200	210	220	230	240
<u>RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK</u>					
250	260	270	280	290	300
NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG					
310	320				
NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSLGK					

Región constante de la cadena pesada de IGHG4 humana
 N.º de acceso de UniProtKB/Swiss-Prot N.º P01861
 SEQ ID NO: 15)

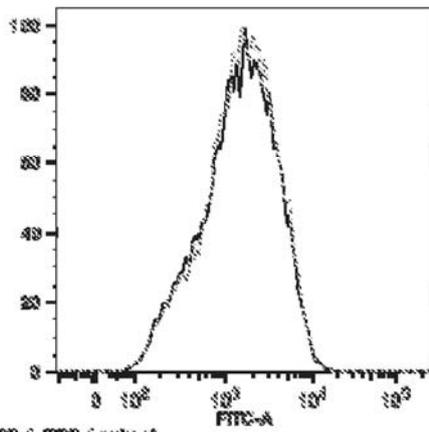
FIG. 5

Comparación de unión de Ab en células Jurkat
(Ab de bisagra quimérica frente a Ab de control)



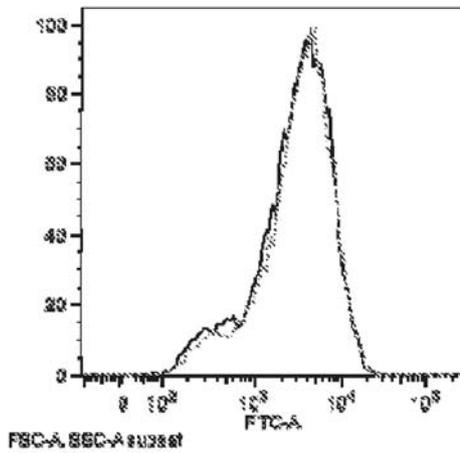
Tipo de IgG	Nombre de célula	Media geom.: FITC-A
Sec	Jurkats	164
Sin teñir	Jurkats	155

FIG. 6A



Tipo de IgG	Nombre de célula	Media geom.: FITC-A
Ab 1	Jurkats	1387
Ab de control 2	Jurkats	1331

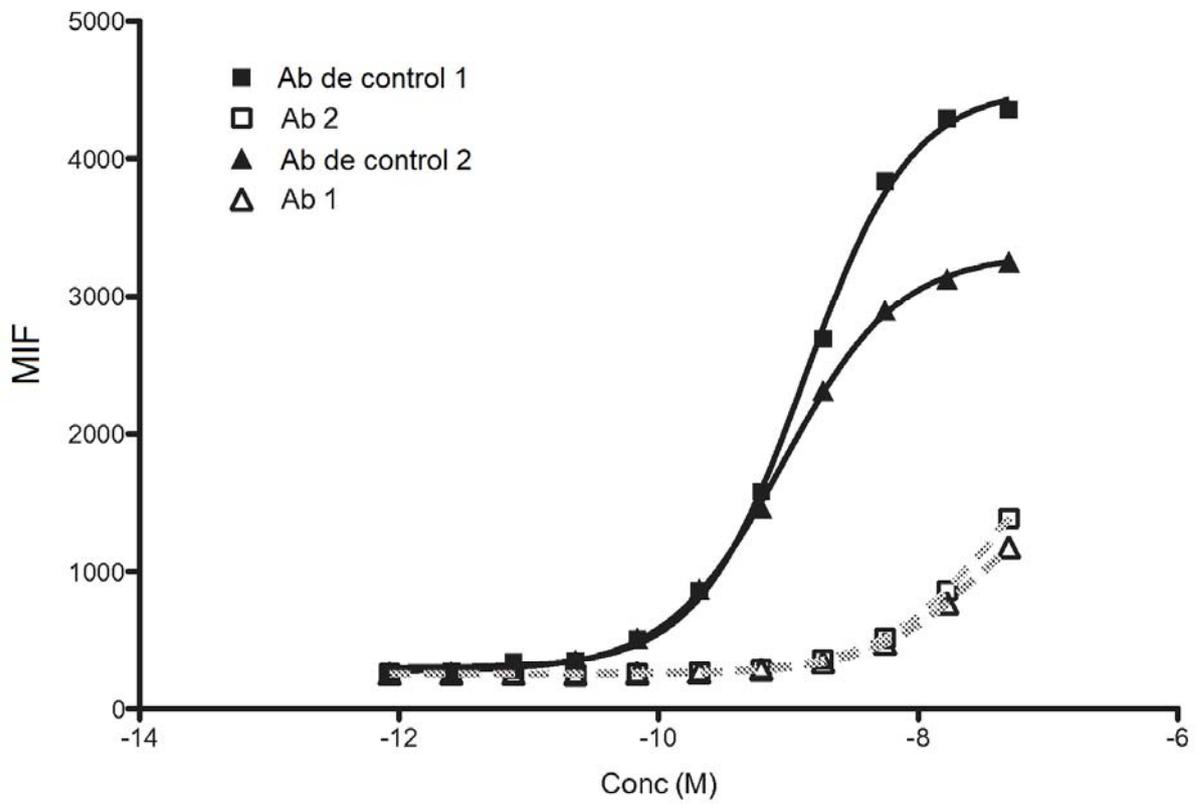
FIG. 6B



Tipo de IgG	Nombre de célula	Media geom.: FITC-A
Ab 2	Jurkats	2585
Ab de control 3	Jurkats	2598

FIG. 6C

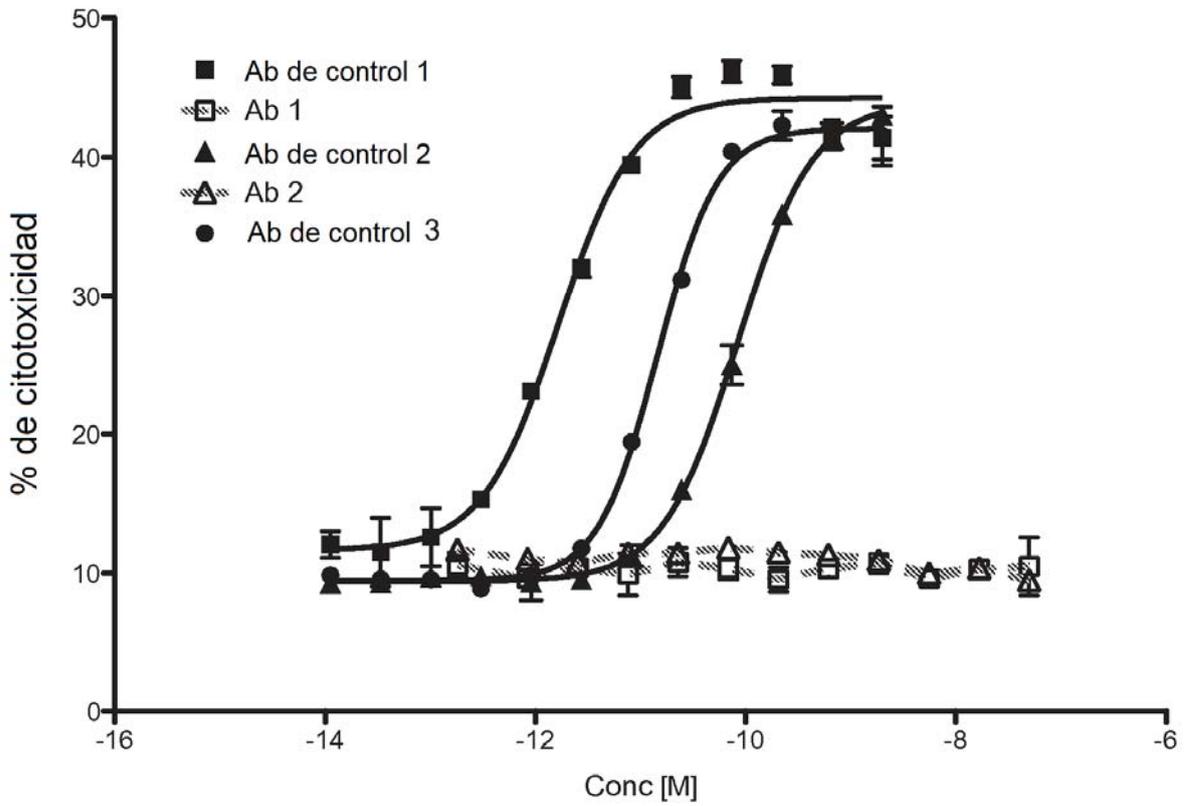
Unión de construcciones de bisagra quimérica a células U937



	CE50
Ab de control 1	1,338e-009
Ab 2	4,542e-008
Ab de control 2	9,138e-010
Ab 1	3,351e-008

FIG. 7

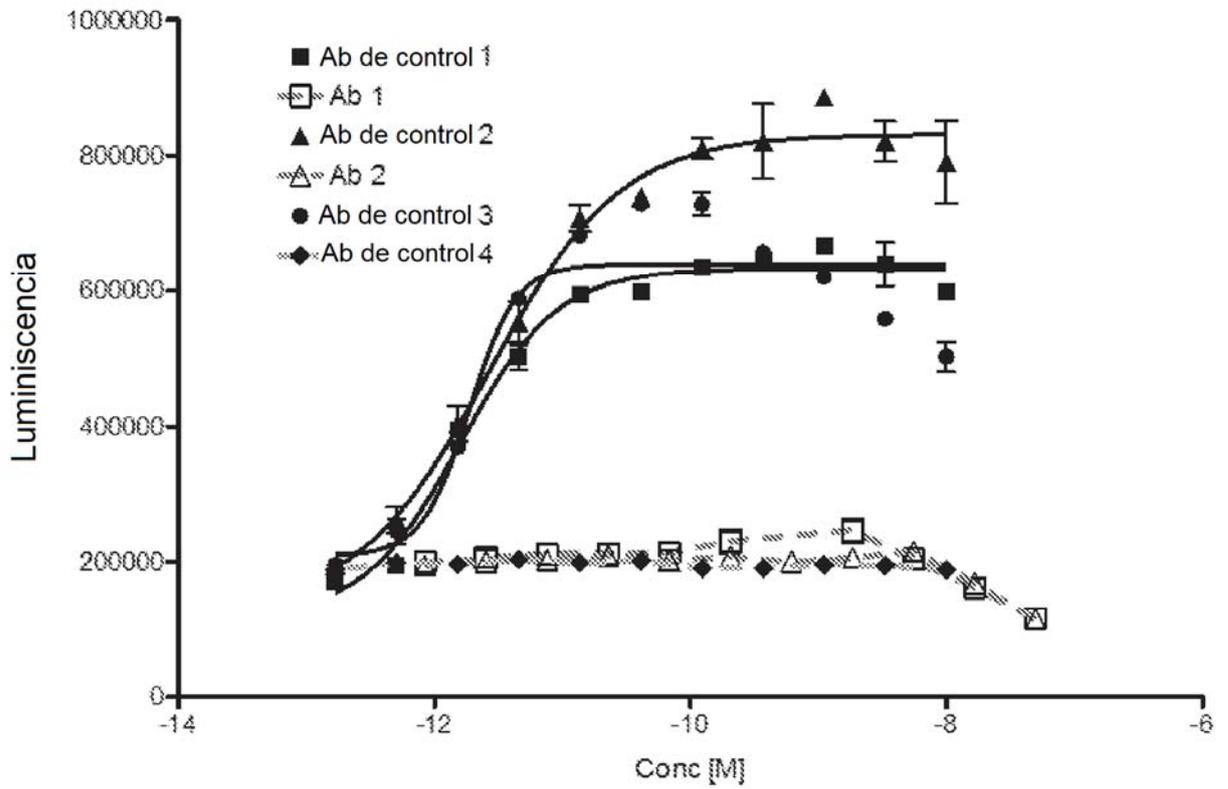
Actividad de Ab quiméricos en ensayo citotóxico en U937



	CE50
Ab de control 1	1,656e-012
Ab de control 2	8,448e-011
Ab de control 3	1,465e-011

FIG. 8

CMSPH - Ensayo de proliferación



	CE50
Ab de control 1	1,613e-012
Ab de control 2	2,691e-012
Ab de control 3	1,881e-012

FIG. 9

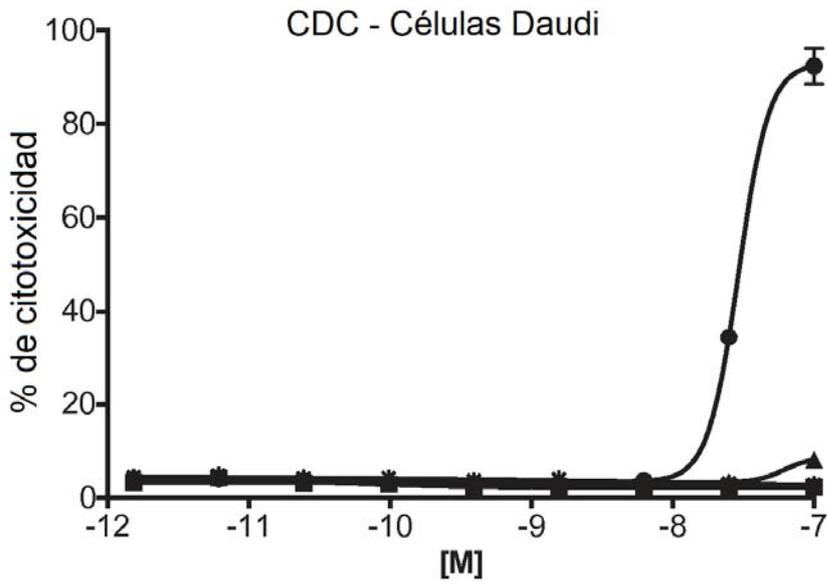


FIG. 10A

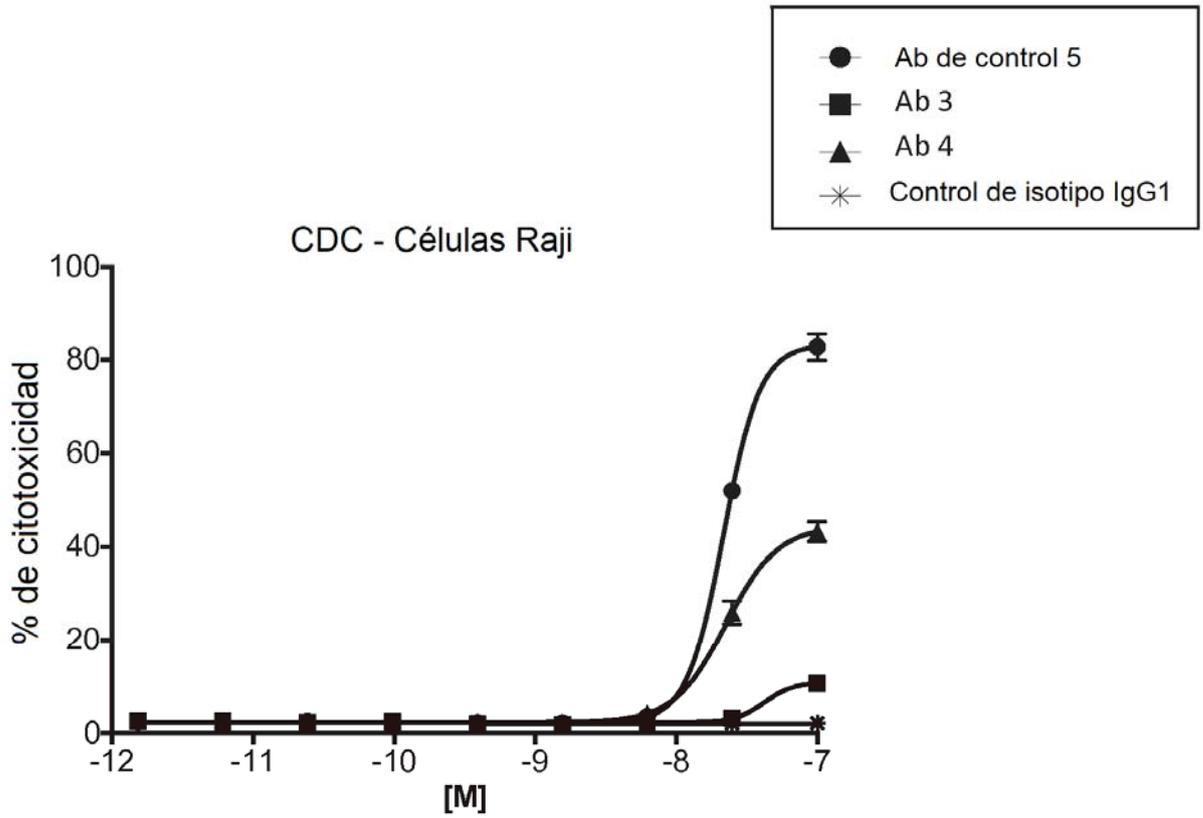


FIG. 10B

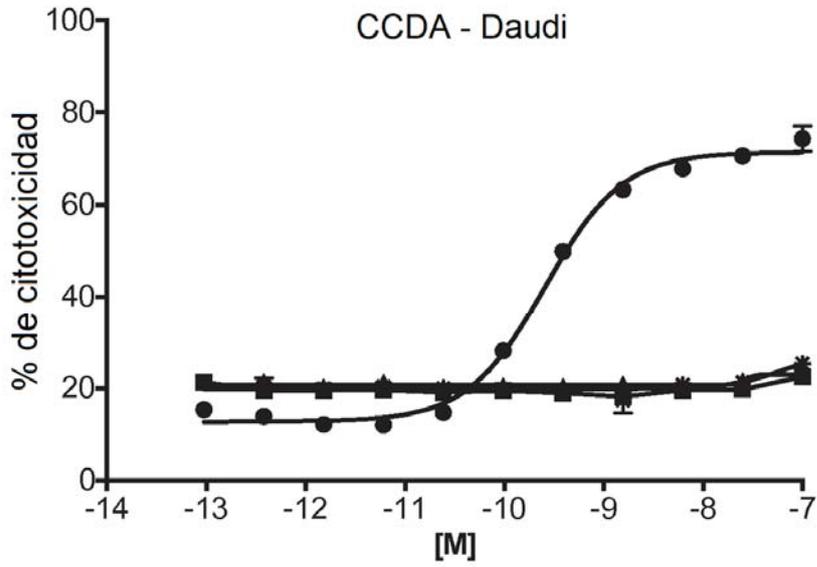


FIG. 11A

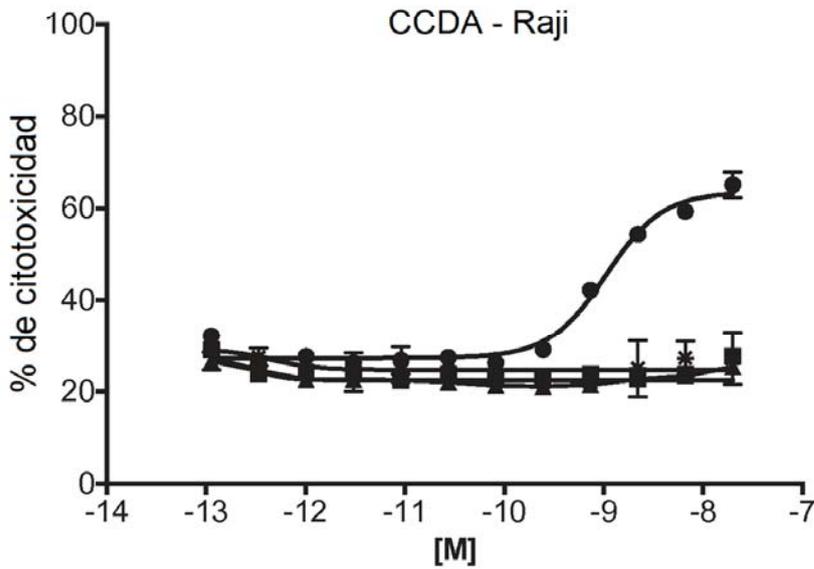
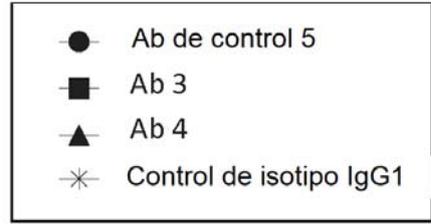


FIG. 11B