

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 751 022**

51 Int. Cl.:

C07K 1/00 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.07.2008** **E 17196350 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2019** **EP 3327026**

54 Título: **Prevención de la reducción de enlaces disulfuro durante la producción recombinante de polipéptidos**

30 Prioridad:

09.07.2007 US 948677 P

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

30.03.2020

73 Titular/es:

GENENTECH, INC. (100.0%)
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080, US

72 Inventor/es:

KAO, YUNG-HSIANG;
SCHMIDT, MELODY TREXHER;
LAIRD, MICHAEL W.;
WONG, RITA L. y
HEWITT, DANIEL P.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 751 022 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

Prevención de la reducción de enlaces disulfuro durante la producción recombinante de polipéptidos

5 Campo de la invención

La invención se refiere a métodos y medios para prevenir la reducción de enlaces disulfuro durante la producción recombinante de polipéptidos que contienen disulfuro. En particular, la invención se refiere a la prevención de la reducción de enlaces disulfuro durante la recogida de anticuerpos que contienen disulfuro, procedentes de cultivos de células hospedadoras recombinantes.

Antecedentes de la invención

En la industria de la biotecnología, las aplicaciones farmacéuticas requieren varias proteínas producidas utilizando técnicas de ADN recombinante. Generalmente, las proteínas recombinantes se producen mediante cultivo celular, utilizando células eucariotas, tales como células de mamífero, o células procariotas, tales como células bacterianas, diseñadas para producir la proteína de interés por inserción de un plásmido recombinante que contiene el ácido nucleico que codifica la proteína deseada. Para que una proteína permanezca biológicamente activa, la conformación de la proteína, incluida su estructura terciaria, debe conservarse durante su purificación y aislamiento, y los múltiples grupos funcionales de la proteína deben estar protegidos de la degradación.

Las células de mamífero se han convertido en el sistema dominante para la producción de proteínas de mamífero para aplicaciones clínicas, principalmente debido a su capacidad para producir proteínas heterólogas plegadas y ensambladas adecuadamente, y a su capacidad de realizar modificaciones postraduccionales. Para la producción de productos biofarmacéuticos, las agencias reguladoras han aprobado las células de ovario de hámster chino (CHO), y las líneas celulares obtenidas de varias otras fuentes de mamífero, tales como, por ejemplo, células mieloma de ratón (NS0), de riñón de cría de hámster (BHK), de riñón embrionario humano (HEK-293) y células retinianas humanas, tales como la línea celular PER.C6® aislada de una célula retiniana humana, que proporciona características de glicosilación humana, y que puede producir anticuerpos naturales compatibles con la fisiología humana.

Habitualmente, para comenzar el ciclo de producción, se deja que un pequeño número de células hospedadoras recombinantes transformadas en cultivo crezca durante varios días (véase, por ejemplo, la figura 23). Una vez que las células se han sometido a varias rondas de multiplicación, se transfieren a un recipiente más grande donde se preparan para someterse a fermentación. Los medios en los que crecen las células y los niveles de oxígeno, nitrógeno y dióxido de carbono que existen durante el ciclo de producción, pueden tener un impacto significativo en el proceso de producción. Los parámetros de crecimiento se determinan específicamente para cada línea celular y estos parámetros se miden con frecuencia para garantizar el crecimiento y las condiciones de producción óptimos.

Cuando las células alcanzan un número suficiente, se transfieren a tanques de producción a gran escala y se cultivan durante un período de tiempo más largo. En este punto del proceso, la proteína recombinante puede recogerse. Generalmente, las células se diseñan para secretar el polipéptido en los medios de cultivo celular, por lo que la primera etapa en el proceso de purificación es separar las células de los medios. Generalmente, la recogida incluye centrifugación y filtración para producir un líquido de cultivo celular recogido (LCCR). El medio se somete después a varias etapas de purificación adicionales que eliminan cualquier residuo celular, proteínas no deseadas, sales, minerales u otros elementos no deseables. Al final del proceso de purificación, la proteína recombinante es muy pura y es adecuada para su uso terapéutico en seres humanos.

Aunque este proceso ha sido objeto de muchos estudios y mejoras en las últimas décadas, la producción de proteínas recombinantes todavía no está exenta de dificultades. Por tanto, por ejemplo, durante la producción recombinante de polipéptidos que comprenden enlaces disulfuro, especialmente polipéptidos multicadena que comprenden enlaces disulfuro intercatenarios, tales como anticuerpos, es esencial proteger y conservar los enlaces disulfuro durante todo el proceso de fabricación, recuperación y purificación, para producir polipéptidos plegados apropiadamente con la actividad biológica requerida.

Chaderjian et al. (2005) Biotech. Prog. 21, 550 - 553 describen la adición de sulfato de cobre al medio de cultivo celular inmediatamente después de la inoculación, facilitando la formación del enlace disulfuro y dando como resultado un nivel reducido de tiol libre en el anticuerpo expresado. Kerblat et al. (1999) Immunology 97, 62-68 describen el papel de la tioredoxina en la reducción de la IgG expresada de forma recombinante por escisión de enlaces disulfuro H-L y L-L. Zhang et al. (2002) Biotechnol. Prog. 18, 509-513 describen que una pequeña parte de anticuerpos monoclonales expresados de forma recombinante carecen de enlaces disulfuro intermoleculares, pero permanecen asociados de forma no covalente en condiciones naturales, como resultado de la formación incompleta de enlaces disulfuro en el retículo endoplásmico.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere en general a un método para prevenir la reducción de un enlace disulfuro en un polipéptido expresado en una célula hospedadora recombinante, tal como se define en las reivindicaciones.

La invención incluye, por ejemplo, rociar con aire el líquido de cultivo recogido de la célula hospedadora recombinante.

El anticuerpo terapéutico es un anticuerpo que se une a CD20. El anticuerpo dirigido contra CD20 puede comprender, por ejemplo, una secuencia de dominio variable de cadena pesada y/o ligera seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1 a 15.

En todas las realizaciones, la célula hospedadora recombinante es una célula de ovario de hámster chino (CHO).

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Experimento de diálisis: imágenes digitales de tipo gel, obtenidas del análisis de Bioanalizador (cada carril representa un punto temporal) que demuestra que el ocrelizumab (rhuMab 2H7-Variante A) dentro de la bolsa de diálisis permaneció intacto durante el período de incubación.

Figura 2. Experimento de diálisis: imágenes digitales de tipo gel, obtenidas del análisis de Bioanalizador (cada carril representa un punto temporal) que muestran que el ocrelizumab fuera de la bolsa de diálisis se redujo durante el período de incubación. Esto se pone de manifiesto por la pérdida de anticuerpo intacto (~150 kDa) y la formación de fragmentos de anticuerpos representados en la Figura. En el punto temporal de 48 horas (Carril 7), el anticuerpo reducido pareció reoxidarse, presumiblemente como resultado de la pérdida de actividad reductora en el líquido de cultivo celular recogido (LCCR). La banda que aparece justo por encima del marcador de 28 kDa proviene de la cadena ligera del anticuerpo. Había una cantidad significativa de luz libre ya presente en el LCCR antes de que comenzara la incubación. La presencia de cadena ligera libre en exceso y dímeros de cadena ligera en el LCCR es típica de la línea celular productora de ocrelizumab.

Figura 3. Niveles de tiol libre del experimento de diálisis: el ocrelizumab purificado en solución salina tamponada con fosfato (PBS) estaba dentro de la bolsa de diálisis y el LCCR que contenía ocrelizumab estaba fuera de la bolsa. Los niveles de tiol libre dentro (cuadrados) y fuera (rombos) de la bolsa de diálisis alcanzaron niveles comparables en pocas horas, lo que indica un buen intercambio de componentes de moléculas pequeñas en el LCCR entre el interior y el exterior de la bolsa de diálisis.

Figura 4. Sistema de tioredoxina y otras reacciones implicadas en la reducción de anticuerpos: el sistema de tioredoxina, que comprende tioredoxina (Trx), tioredoxina reductasa (TrxR) y NADPH, funciona como un sistema donador de hidrógeno para la reducción de enlaces disulfuro en proteínas. La Trx es una proteína monomérica pequeña con un motivo de sitio activo CXXC que cataliza muchas reacciones redox a través del intercambio de tiol-disulfuro. La Trx oxidada se puede reducir mediante NADPH a través de TrxR. La Trx reducida es capaz de catalizar después la reducción de disulfuros en proteínas. El NADPH requerido para el sistema de tioredoxina se proporciona mediante reacciones en la ruta de la pentosa fosfato y la glucólisis.

Figura 5. Actividad *in vitro* del sistema de tioredoxina: imagen digital de tipo gel del análisis de Bioanalizador (cada carril representa un punto temporal) que demuestra que la incubación de ocrelizumab intacto (1 mg / ml) con TrxR 0,1 mM (hígado de rata), Trx 5 mM (humana) y NADPH 1 mM en PBS produjo la reducción completa de ocrelizumab; el ocrelizumab se redujo completamente en menos de 21 horas.

Figura 6. Actividad *in vitro* del sistema de tioredoxina inhibida por aurotioglucosa: la adición de aurotioglucosa (ATG) a la misma mezcla de reacción como se describe anteriormente en la leyenda de la figura 5, inhibió de manera eficaz la reducción de ocrelizumab. Esto se observa en la imagen digital de tipo gel del análisis de Bioanalizador (cada carril representa un punto temporal).

Figura 7. Actividad *in vitro* del sistema de tioredoxina inhibida por aurotiomalato: la adición de aurotiomalato (ATM) a una concentración de 1 mM a la misma mezcla de reacción como se describe anteriormente en la leyenda de la figura 5, inhibió de manera eficaz la reducción de ocrelizumab. Esto se observa en la imagen digital de tipo gel del análisis de Bioanalizador (cada carril representa un punto temporal).

Figura 8. Actividad *in vitro* del sistema de tioredoxina: imagen digital de tipo gel del análisis de Bioanalizador (cada carril representa un punto temporal) que muestra que la incubación de ocrelizumab intacto (1 mg/ml) con TrxR 0,1 mM (hígado de rata), Trx 5 mM (humana) y NADPH 1 mM en tampón de sulfato de histidina 10 mM produjo la reducción de ocrelizumab en menos de 1 hora.

Figura 9. Actividad *in vitro* del sistema de tioredoxina inhibida por CuSO_4 : la adición de CuSO_4 a una concentración de 50 μM a la misma mezcla de reacción como se describe en la leyenda de la figura 8 inhibió de manera eficaz la reducción de ocrelizumab como se muestra en la imagen digital de tipo gel del análisis de Bioanalizador (cada carril representa un punto temporal).

Figura 10. Reducción de Ocrelizumab: imagen digital de tipo gel del análisis de Bioanalizador (cada carril representa un punto temporal) que muestra que el ocrelizumab se redujo en un experimento de incubación utilizando LCCR a partir de un LCC homogeneizado generado a partir de un fermentador de 3 l.

Figura 11. Inhibición de la reducción de Ocrelizumab en LCCR por aurotioglucosa: imagen digital de tipo gel del análisis de Bioanalizador (cada carril representa un punto temporal) que muestra que la adición de aurotioglucosa 1 mM al mismo LCCR que se utilizó para el experimento de incubación mostrado en la figura 10 inhibió la reducción de ocrelizumab.

Figura 12. Inhibición de la reducción de Ocrelizumab en LCCR por aurotiomalato: imagen digital de tipo gel

del análisis de Bioanalizador (cada carril representa un punto temporal) que indica que la adición de aurotiomalato 1 mM al mismo LCCR que se utilizó para el experimento de incubación mostrado en la figura 10 inhibió la reducción de orelizumab.

Figura 13. Pérdida de actividad reductora en LCCR: El LCCR de uno de los procesos de fabricación a gran escala para orelizumab (el proceso "beta") que estuvo sujeto a varios ciclos de congelación/descongelación no demostró reducción de orelizumab cuando se utilizó en un experimento de incubación. Esto se mostró mediante análisis de Bioanalizador (cada carril representa un punto temporal), y puede contrastarse con la reducción de anticuerpos observada previamente en el LCCR recién descongelado del mismo lote de fermentación.

Figura 14. La pérdida de actividad reductora en LCCR se restableció con la adición de NADPH: la reducción de orelizumab se observó nuevamente en el ensayo de Bioanalizador (cada carril representa un punto temporal) después de la adición de NADPH a una concentración de 5 mM en el LCCR donde la actividad reductora se había eliminado en las condiciones descritas anteriormente en la figura 13.

Figura 15. La pérdida de actividad reductora en LCCR se restableció con la adición de glucosa-6-fosfato: la reducción de orelizumab se observó nuevamente en el ensayo de Bioanalizador (cada carril representa un punto temporal) después de la adición de G6P a una concentración de 10 mM en el LCCR, donde la actividad reductora ha sido eliminada debido al tratamiento descrito anteriormente en la figura 13.

Figura 16. Reducción de Orelizumab: imagen digital de tipo gel del análisis de Bioanalizador que muestra que el orelizumab se redujo en un experimento de incubación utilizando un LCCR de un proceso de fabricación a gran escala (el proceso "alfa").

Figura 17. El EDTA inhibe la reducción de Orelizumab: imagen digital de tipo gel del análisis de Bioanalizador (cada carril representa un punto temporal) que muestra que la reducción de orelizumab se inhibió en un experimento de incubación utilizando un LCCR del proceso alfa con EDTA añadido a una concentración de 20 mM al LCCR cuya actividad reductora se demuestra en la figura 16.

Figura 18. La pérdida de actividad reductora en LCCR, "proceso beta", se restableció con la adición de glucosa-6-fosfato pero No la inhibición de la reducción con EDTA: la reducción de orelizumab se observó en el ensayo de Bioanalizador (cada carril representa un punto temporal) después de la adición de G6P a una concentración de 5 mM y 20 mM de EDTA en el LCCR cuya actividad reductora se había perdido (véase la figura 13). A diferencia de los resultados que se muestran en la figura 17, la presencia de EDTA no bloqueó la reducción de orelizumab.

Figura 19. Inhibición de la reducción de Orelizumab: por (i) adición de EDTA, (ii) adición de CuSO_4 , o (iii) ajuste del pH a 5,5. Los tres métodos diferentes, (1) la adición de EDTA, (2) la adición de CuSO_4 y (3) el ajuste del pH a 5,5, utilizados de manera independiente, fueron efectivos para inhibir la reducción de orelizumab. Esto se demostró mediante los resultados cuantitativos del Bioanalizador que muestran que casi el 100 % del anticuerpo intacto (150 kDa) permanecía en los conjuntos de elución de proteína A. En cambio, el orelizumab se redujo completamente en el LCCR de control después de 20 horas de tiempo de mantenimiento de LCCR.

Figura 20. Inhibición de la reducción de Orelizumab por inyección de aire: La inyección de aire en el LCCR fue eficaz para inhibir la reducción del enlace disulfuro de orelizumab. Esto se demostró con los resultados cuantitativos del Bioanalizador que muestran que casi el 100 % del anticuerpo intacto (150 kDa) permanecía en los conjuntos de elución de proteína A. En cambio, el orelizumab se redujo casi por completo en el LCCR de control después de 5 horas de inyección de nitrógeno.

La figura 21 muestra la secuencia de aminoácidos de V_L (SEQ ID NO. 24) de un anticuerpo dirigido contra HER2 (trastuzumab).

La figura 22 muestra la secuencia de aminoácidos de V_H (SEQ ID NO. 24) de un anticuerpo dirigido contra HER2 (trastuzumab).

La figura 23 es un esquema que muestra algunas etapas de un proceso de fabricación típico a gran escala.

La figura 24 es una imagen digital de tipo gel del análisis de Bioanalizador: 2H7 (variante A) + NADPH 1 mM + tioredoxina 5 μM + tioredoxina reductasa (recombinante) 0,1 μM en sulfato de histidina 10 mM.

La figura 25 es una imagen digital de tipo gel del análisis de Bioanalizador: 2H7 (variante A) + NADPH 1 mM + tioredoxina 5 μM + tioredoxina reductasa (recombinante) 0,1 μM en sulfato de histidina 1 mM + ATG 1 mM.

La figura 26 es una imagen digital de tipo gel del análisis de Bioanalizador: 2H7 (variante A) + NADPH 1 mM + tioredoxina 5 μM + tioredoxina reductasa (recombinante) 0,1 μM en sulfato de histidina 10 mM + ATG 0,6 μM (6: 1 ATG: TrxR).

La figura 27 es una imagen digital de tipo gel del análisis de Bioanalizador: 2H7 (variante A) + NADPH 1 mM + tioredoxina 5 μM + tioredoxina reductasa (recombinante) 0,1 μM en sulfato de histidina 10 mM + ATG 0,4 μM (4: 1 ATG: TrxR).

La figura 28 es una imagen digital de tipo gel del análisis de Bioanalizador: 2H7 (variante A) + NADPH 1 mM + tioredoxina 5 μM + tioredoxina reductasa (recombinante) 0,1 μM en sulfato de histidina 10 mM + ATG 0,2 μM (2: 1 ATG: TrxR).

La figura 29 es una imagen digital de tipo gel del análisis de Bioanalizador: 2H7 (variante A) + NADPH 1 mM + tioredoxina 5 μM + tioredoxina reductasa (recombinante) 0,1 μM en sulfato de histidina 10 mM + autotiomalato (ATM) 0,1 mM.

La figura 30 es una imagen digital de tipo gel del análisis de Bioanalizador: 2H7 (variante A) + NADPH 1 mM + tioredoxina 5 μM + tioredoxina reductasa (recombinante) 0,1 μM en sulfato de histidina 10 mM + autotiomalato (ATM) 0,01 mM.

La figura 31 es una imagen digital de tipo gel del análisis de Bioanalizador: 2H7 (variante A) + NADPH 1 mM +

tiorredoxina 5 μM + tiorredoxina reductasa (recombinante) 0,1 μM en sulfato de histidina 10 mM + CuSO_4 20 μM (4: 1 Cu^{2+} : Trx).

La figura 32 es una imagen digital de tipo gel del análisis de Bioanalizador: 2H7 (variante A) + NADPH 1 mM + tiorredoxina 5 μM + tiorredoxina reductasa (recombinante) 0,1 μM en sulfato de histidina 10 mM + CuSO_4 10 μM (2: 1 Cu^{2+} : Trx).

La figura 33 es una imagen digital de tipo gel del análisis de Bioanalizador: 2H7 (variante A) + NADPH 1 mM + tiorredoxina 5 μM + tiorredoxina reductasa (recombinante) 0,1 μM en sulfato de histidina 10 mM + CuSO_4 5 μM (1: 1 Cu^{2+} : Trx).

La figura 34 es una imagen digital de tipo gel del análisis de Bioanalizador: 2H7 (variante A) + NADPH 1 mM + tiorredoxina 5 μM + tiorredoxina reductasa (recombinante) 0,1 μM en sulfato de histidina 10 mM + cistamina 532 μM (20: 1 cistamina: 2H7 disulfuro).

La figura 35 es una imagen digital de tipo gel del análisis de Bioanalizador: 2H7 (variante A) + NADPH 1 mM + tiorredoxina 5 μM + tiorredoxina reductasa (recombinante) 0,1 μM en sulfato de histidina 10 mM + cistamina 266 μM (10: 1 cistamina: 2H7 disulfuro).

La figura 36 es una imagen digital de tipo gel del análisis de Bioanalizador: 2H7 (variante A) + NADPH 1 mM + tiorredoxina 5 μM + tiorredoxina reductasa (recombinante) 0,1 μM en sulfato de histidina 10 mM + cistamina 133 μM (5: 1 cistamina: 2H7 disulfuro).

La figura 37 es una imagen digital de tipo gel del análisis de Bioanalizador: 2H7 (variante A) + NADPH 1 mM + tiorredoxina 5 μM + tiorredoxina reductasa (recombinante) 0,1 μM en sulfato de histidina 10 mM + cistamina 26,6 μM (1: 1 cistamina: 2H7 disulfuro).

La figura 38 es una imagen digital de tipo gel del análisis de Bioanalizador: 2H7 (variante A) + NADPH 1 mM + tiorredoxina 5 μM + tiorredoxina reductasa (recombinante) 0,1 μM en sulfato de histidina 10 mM (pH = 7,6) + cistina 2,6 mM.

La figura 39 es una imagen digital de tipo gel del análisis de Bioanalizador: 2H7 (variante A) + NADPH 1 mM + tiorredoxina 5 μM + tiorredoxina reductasa (recombinante) 0,1 μM en sulfato de histidina 10 mM + GSSG (glutación oxidado) 2,6 mM.

Figura 40 Sistema de reducción enzimática reconstruido. 2H7 (variante A) 1 mg / ml + hexocinasa 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, tiorredoxina 5 μM , tiorredoxina reductasa 0,1 μM , glucosa 2 mM, ATP 0,6 mM, Mg^{2+} 2 mM Chaderjian y NADP 2 mM en tampón de sulfato de histidina 50 mM a pH = 7,38.

Figura 41 El sistema de tiorredoxina requiere NADPH, 2H7 (variante A) 1 mg/ml + tiorredoxina 5 μM , tiorredoxina reductasa 0,1 μM y NADP 2 mM de en tampón de sulfato de histidina 50 mM a pH = 7,38.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

I. Definiciones

En la presente invención, en el contexto de proteínas, que incluyen anticuerpos, en general, o con respecto a cualquier proteína o anticuerpo específico, el término "reducción" se utiliza para referirse a la reducción de uno o más enlaces disulfuro de la proteína o anticuerpo. Así, por ejemplo, la expresión "reducción de ocrelizumab" se utiliza indistintamente con la expresión "reducción de enlaces disulfuro de ocrelizumab" y la expresión "reducción de anticuerpos (Ab)" se utiliza indistintamente con la expresión "reducción de enlaces disulfuro de anticuerpos (Ab)".

El término "reducción" o la expresión "reducción de enlace disulfuro" se utilizan en el sentido más amplio, e incluyen la reducción completa y parcial de algunos o de todos los enlaces disulfuro, intercatenarios o intracatenarios, presentes en una proteína tal como un anticuerpo.

Por "proteína" se entiende una secuencia de aminoácidos para la cual la longitud de la cadena es suficiente para producir los niveles más altos de estructura terciaria y/o cuaternaria. Esto es para distinguir de los "péptidos" u otros fármacos de bajo peso molecular que no tienen dicha estructura. Generalmente, la proteína de la presente invención tendrá un peso molecular de al menos aproximadamente 15-20 kD, preferiblemente de al menos aproximadamente 20 kD. Los ejemplos de proteínas incluidos dentro de la definición incluyen todas las proteínas de mamífero, en particular, proteínas terapéuticas y de diagnóstico, tales como anticuerpos terapéuticos y de diagnóstico, y, en general, proteínas que contienen uno o más enlaces disulfuro, incluyendo polipéptidos multicadena que comprenden uno o más enlaces disulfuro intercatenarios o intracatenarios.

La expresión "proteína terapéutica" o "polipéptido terapéutico" se refiere a una proteína que se utiliza en el tratamiento de una enfermedad, independientemente de su indicación o mecanismo de acción. Para que las proteínas terapéuticas sean útiles en la clínica, deben fabricarse en grandes cantidades. La producción a "escala de fabricación" de proteínas terapéuticas, u otras proteínas, utiliza cultivos celulares cuyo tamaño varía de aproximadamente 400 l a aproximadamente 80.000 l, dependiendo de la proteína que vaya a producirse y de la necesidad. Generalmente, dicha producción a escala de fabricación utiliza tamaños de cultivo celular de aproximadamente 400 l a aproximadamente 25.000 l. Dentro de este intervalo, se utilizan tamaños de cultivo celular específicos tales como de 4.000 l, de aproximadamente 6.000 l, de aproximadamente 8.000 l, de aproximadamente 10.000 l, de aproximadamente 12.000 l, de aproximadamente 14.000 l o de aproximadamente 16.000 l.

La expresión "anticuerpo terapéutico" se refiere a un anticuerpo que se utiliza en el tratamiento de una enfermedad. Un anticuerpo terapéutico puede tener diversos mecanismos de acción. Un anticuerpo terapéutico

puede unirse y neutralizar la función normal de una diana asociada a un antígeno. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal que bloquea la actividad de la proteína necesaria para la supervivencia de una célula cancerosa causa la muerte de la célula. Otro anticuerpo monoclonal terapéutico puede unirse y activar la función normal de una diana asociada a un antígeno. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal puede unirse a una proteína en una célula y desencadenar una señal de apoptosis. Incluso, otro anticuerpo monoclonal puede unirse a un antígeno diana expresado solo en tejido enfermo; la conjugación de una carga tóxica (agente efectivo), tal como un agente quimioterapéutico o radiactivo, al anticuerpo monoclonal puede crear un agente para el suministro específico de la carga tóxica al tejido enfermo, reduciendo el daño al tejido sano. Un "fragmento biológicamente funcional" de un anticuerpo terapéutico exhibirá al menos una, si no todas o algunas de las funciones biológicas atribuidas al anticuerpo intacto, comprendiendo la función al menos la unión específica al antígeno diana.

La expresión "proteína de diagnóstico" se refiere a una proteína que se utiliza en el diagnóstico de una enfermedad.

La expresión "anticuerpo de diagnóstico" se refiere a un anticuerpo que se utiliza como reactivo de diagnóstico para una enfermedad. El anticuerpo de diagnóstico puede unirse a un antígeno diana que está específicamente asociado a una enfermedad particular, o muestra una expresión aumentada en la misma. El anticuerpo de diagnóstico puede utilizarse, por ejemplo, para detectar una diana en una muestra biológica de un paciente, o en imágenes de diagnóstico de sitios de enfermedad, tales como tumores, en un paciente. Un "fragmento biológicamente funcional" de un anticuerpo de diagnóstico exhibirá al menos una, si no todas o algunas de las funciones biológicas atribuidas al anticuerpo intacto, comprendiendo la función al menos la unión específica al antígeno diana.

"Purificada" significa que una molécula está presente en una muestra a una concentración de al menos 80-90 % en peso de la muestra en la que está contenida.

Preferiblemente, la proteína, incluidos los anticuerpos, que se purifica es esencialmente pura y de manera deseable esencialmente homogénea (es decir, carece de proteínas contaminantes, etc.).

Una proteína "esencialmente pura" significa una composición de proteína que comprende al menos aproximadamente 90 % en peso de la proteína, basado en el peso total de la composición, preferiblemente al menos aproximadamente 95 % en peso.

Una proteína "esencialmente homogénea" significa una composición de proteína que comprende al menos aproximadamente 99 % en peso de proteína, basado en el peso total de la composición.

Como se indicó anteriormente, en determinadas realizaciones, la proteína es un anticuerpo. Los "anticuerpos" (Ab) y las "inmunoglobulinas" (Ig) son glucoproteínas que tienen las mismas características estructurales. Aunque los anticuerpos exhiben especificidad de unión a un antígeno específico, las inmunoglobulinas incluyen tanto anticuerpos como otras moléculas similares a anticuerpos que generalmente carecen de especificidad antigénica. Los polipéptidos del último tipo se producen, por ejemplo, a niveles bajos por el sistema linfático y a niveles aumentados por mielomas.

El término "anticuerpo" se utiliza en el sentido más amplio y abarca específicamente anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos de longitud completa que tienen una región Fc de inmunoglobulina), composiciones de anticuerpos con especificidad poliepitópica, anticuerpos biespecíficos, diacuerpos y moléculas monocatenarias tales como moléculas scFv, así como fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab, F(ab')₂ y Fv).

La expresión "anticuerpo monoclonal", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones, por ejemplo, mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades minoritarias. Por lo tanto, el modificador "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo no es una mezcla de anticuerpos distintos. En determinadas realizaciones, dicho anticuerpo monoclonal generalmente incluye un anticuerpo que comprende una secuencia polipeptídica que se une a una diana, donde la secuencia polipeptídica que se une a la diana se obtuvo mediante un proceso que incluye la selección de una única secuencia polipeptídica de unión a diana de una pluralidad de secuencias polipeptídicas. Por ejemplo, el proceso de selección puede ser la selección de un clon único de una pluralidad de clones, tal como un grupo de clones de hibridoma, clones de fago, o clones de ADN recombinante. Debe entenderse que una secuencia de unión a diana seleccionada puede alterarse adicionalmente, por ejemplo, para mejorar la afinidad por la diana, humanizar la secuencia de unión a la diana, mejorar su producción en cultivo celular, reducir su inmunogenicidad *in vivo*, crear un anticuerpo multiespecífico, etc., y que un anticuerpo que comprende la secuencia de unión a diana alterada también es un anticuerpo monoclonal de esta invención. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que generalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en un antígeno. Además de su especificidad, las preparaciones de anticuerpos monoclonales tienen ventajas ya que no están generalmente contaminadas con otras inmunoglobulinas.

El modificador "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo se obtiene a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se debe interpretar que requiere la producción del anticuerpo por

ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a utilizar de acuerdo con la presente invención pueden prepararse por varias técnicas, que incluyen, por ejemplo, el método de hibridoma (por ejemplo, Kohler et al., *Nature*, 256: 495 (1975); Harlow et al., *Antibodies: a Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed 1988); Hammerling et al., en: *Monoclonal Antibodies and T - Cell hibridomas* 563-681 (Elsevier, NY, 1981)), métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4.816.567), tecnologías de presentación en fagos (véase, por ejemplo, Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991).), Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338 (2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340 (5): 1073 - 1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (34): 12467 - 12472 (2004); y Lee et al., *J. Immunol. Métodos* 284 (1-2): 119-132 (2004), y tecnologías para producir anticuerpos humanos o similares en animales que tienen partes o todos los locus de inmunoglobulina humana o genes que codifican secuencias de inmunoglobulina humana (véanse, por ejemplo, los documentos WO98/24893; WO96/34096; WO96/33735; WO91/10741; Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immunol.*, 7:33 (1993); las patentes de Estados Unidos N° 5.545.807, 5.545.806, 5.569.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.661.016, Marks et al., *BioTechnology* 10: 779 - 783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368: 856 - 859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812 - 813 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnol.* 14: 845 - 851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996) y Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65 - 93 (1995).

Los anticuerpos monoclonales en este documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y / o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos procedentes de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena (o cadenas) es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos procedentes de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como a fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (patente de Estados Unidos No. 4.816.567 y Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851-6855 (1984)).

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima procedente de inmunoglobulina no humana. En una realización, un anticuerpo humanizado es una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) en la que los restos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donador) tales como un ratón, rata, conejo, o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y/o capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de la región marco conservada (FR, por *framework*) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por restos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donador. Estas modificaciones pueden realizarse para refinar aún más el rendimiento del anticuerpo. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y generalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana, y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), generalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones et al *Nature* 321: 522 - 525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332: 323 - 329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593 - 596 (1992). Véanse también los siguientes artículos de revisión y referencias citadas en los mismos: Vaswani y Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma e Immunol.* 1: 105 - 115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23: 1035 - 1038 (1995); Hurlé y Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5: 428 - 433 (1994). El anticuerpo humanizado incluye un anticuerpo Primatized™ en el que la región de unión al antígeno del anticuerpo se obtiene de un anticuerpo producido mediante la inmunización de monos macacos con el antígeno de interés.

Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano y / o que ha sido fabricado utilizando cualquiera de las técnicas para producir anticuerpos humanos como se desvela en la presente memoria. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende restos de unión a antígeno no humanos.

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

La "región variable" o el "dominio variable" de un anticuerpo se refiere a los dominios aminoterminales de la cadena pesada o ligera del anticuerpo. El dominio variable de la cadena pesada se puede denominar "V_H". El dominio variable de la cadena ligera se puede denominar "V_L". Estos dominios generalmente son las partes más variables de un anticuerpo y contienen los sitios de unión con el antígeno.

El término "variable" se refiere al hecho de que determinadas partes de los dominios variables difieren ampliamente en la secuencia entre los anticuerpos y se utilizan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente en todos los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados regiones determinantes de la complementariedad (CDR) o regiones hipervariables (HVR) tanto en los dominios variables de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se denominan regiones marco conservadas (FR). Cada uno de los dominios variables de las cadenas pesada y ligera naturales, comprende cuatro regiones FR, que adoptan en gran parte una configuración de lámina beta, conectadas por tres CDR, que forman bucles que conectan la estructura de lámina beta, y en algunos casos forman parte de la misma. Las CDR de cada cadena se sujetan entre sí en estrecha proximidad a través de las regiones FR, contribuyendo las CDR de la otra cadena a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat et al., *Sequences of Protein of Immunological Interest*, quinta edición, Instituto Nacional de Salud, Bethesda, Md. (1991)). Los dominios constantes no intervienen directamente en la unión de un anticuerpo con un antígeno, pero exhiben diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpos.

Las "cadenas ligeras" de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), en función de las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

Dependiendo de las secuencias de aminoácidos de los dominios constantes de sus cadenas pesadas, los anticuerpos (inmunoglobulinas) pueden asignarse a diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de ellas pueden dividirse además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan a, d, e, g y m, respectivamente. Las estructuras de subunidades y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son muy conocidas y se describen generalmente, por ejemplo, en Abbas et al. *Cellular y Mol. Inmunología*, 4ª ed. (2000). Un anticuerpo puede ser parte de una molécula de fusión más grande, formada por asociación covalente o no covalente del anticuerpo con una o más proteínas o péptidos.

Las expresiones "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se utilizan en este documento indistintamente para referirse a un anticuerpo en su forma sustancialmente intacta, no a fragmentos de anticuerpo como se define más adelante. Las expresiones se refieren particularmente a un anticuerpo con cadenas pesadas que contienen la región Fc.

Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden solo una parte de un anticuerpo intacto, en donde la parte conserva al menos una, y tantas como la mayoría o todas, de las funciones normalmente asociadas a esa parte cuando están presentes en un anticuerpo intacto. En una realización, un fragmento de anticuerpo comprende un sitio de unión a antígeno del anticuerpo intacto y, por lo tanto, conserva la capacidad de unirse al antígeno. En otra realización, un fragmento de anticuerpo, por ejemplo uno que comprende la región Fc, conserva al menos una de las funciones biológicas normalmente asociadas a la región Fc cuando está presente en un anticuerpo intacto, tal como unión a FcRn, modulación de la semivida del anticuerpo, función CCDA y unión al complemento. En una realización, un fragmento de anticuerpo es un anticuerpo monovalente que tiene una semivida *in vivo* sustancialmente similar a la de un anticuerpo intacto. Por ejemplo, dicho fragmento de anticuerpo puede comprender un brazo de unión a antígeno unido a una secuencia Fc capaz de conferir al fragmento estabilidad *in vivo*.

La digestión de los anticuerpos con papaína produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab", cada uno con un solo sitio de unión a antígeno, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación con el antígeno y que aún tiene la capacidad de entrecruzarse con el antígeno.

El fragmento Fab contiene los dominios variables de cadena pesada y ligera y también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' se diferencian de los fragmentos Fab por la adición de algunos restos en el extremo carboxi del dominio CH1 de la cadena pesada que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. En la presente memoria, Fab'-SH indica un Fab' en el que el resto, o restos, de cisteína de los dominios constantes llevan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ originalmente se produjeron como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

El fragmento "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de unión a antígeno. En una realización, una especie Fv bicatenaria consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en estrecha asociación, no covalente. En una especie Fv monocatenaria (scFv), un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera pueden unirse de manera covalente a través de un enlazador peptídico flexible de modo que las cadenas ligera y pesada pueden asociarse en una estructura "dimérica" análoga a la de una especie Fv bicatenaria. Es en esta configuración en la que las tres CDR de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero V_H-V_L. En su conjunto, las seis CDR confieren al anticuerpo especificidad de unión con el antígeno. Sin embargo, incluso un solo dominio variable (o la mitad de un

Fv que comprende solo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completo.

Los fragmentos de anticuerpo "Fv monocatenario" o "scFv" comprenden los dominios V_H y V_L de un anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una sola cadena polipeptídica. Generalmente, el polipéptido scFv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L , que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión con el antígeno. Para una revisión de scFv, véase Pluckthun, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994).

El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica (V_H - V_L). Al utilizar un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios se ven obligados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crean dos sitios de unión al antígeno. Los diacuerpos pueden ser bivalentes o biespecíficos. Los diacuerpos se describen más completamente, por ejemplo, en los documentos EP 404.097; WO93/1161; en Hudson et al., (2003) *Nat. Med.* 9: 129-134; y en Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444 - 6448 (1993). Los triacuerpos y los tetracuerpos también se describen en Hudson et al., (2003) *Nat. Med.* 9: 129-134.

El anticuerpo puede unirse a cualquier proteína, incluyendo, sin limitación, un miembro de la familia de receptores HER, tal como HER1 (EGFR), HER2, HER3 y HER4; proteínas CD tales como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD21, CD22 y CD34; moléculas de adhesión celular tales como LFA-1, Mol, p150,95, VLA-4, ICAM-1, VCAM e integrina $\alpha_4\beta_7$, incluyendo las subunidades α o β de las mismas (por ejemplo, anticuerpos dirigidos contra CD11a, contra CD18 o contra CD11b); factores de crecimiento, tales como factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); IgE; antígenos del grupo sanguíneo; receptor de flk2 / flt3; receptor de obesidad (OB); y proteína C. Otras proteínas a modo de ejemplo incluyen hormona de crecimiento, incluyendo la hormona de crecimiento humana y la hormona de crecimiento bovina; factor liberador de la hormona de crecimiento; hormona paratiroidea; hormona estimulante del tiroides; lipoproteínas; alfa-1 antitripsina; cadena A de insulina; cadena B de insulina; proinsulina; hormona estimulante del folículo; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación, tales como factor VIIIc, factor IX, factor tisular y factor de von Willebrand; factores de anticoagulación, tales como Proteína C; factor natriurético auricular; tensioactivo pulmonar; un activador de plasminógeno, tal como urocinasa u orina humana o activador de plasminógeno de tipo tisular (t-PA); bombesina; trombina; factor α y β de necrosis tumoral; encefalina; RANTES (citocina expresada y secretada por el linfocito T normal en función de su grado de activación); proteína inflamatoria de macrófagos humana (MIP-1- α); albúmina de suero, tal como albúmina de suero humano (HSA); sustancia inhibidora mulleriana; cadena A de relaxina; cadena B de relaxina; prorelaxina; péptido asociado a gonadotropina de ratón; DNasa; inhibina; receptores para hormonas o factores de crecimiento; una integrina; proteína A o D; factores reumatoideos; un factor neurotrófico, tal como factor neurotrófico derivado de hueso (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5 o -6 (NT-3, NT-4, NT-5 o NT-6), o un factor de crecimiento nervioso, tal como NGF- β ; factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblastos, tal como aFGF y bFGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento transformante (TGF), tal como TGF-alfa y TGF-beta, incluidos TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 o TGF- β 5; factor de crecimiento insulínico I y II (IGF-I e IGF-II); des(1-3) -IGF-I (IGF-I cerebral), proteínas que se unen al factor de crecimiento insulínico (IDFBP); eritropoyetina (EPO); factores osteoinductores; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón, tal como interferón- α , - β y - γ ; factores estimulantes de colonias (CSF), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleucinas (IL), por ejemplo, IL-1 a IL-10; superóxido dismutasa; receptores de linfocitos T; proteínas de membrana superficial; factor acelerador de la descomposición (FAD); un antígeno vírico, tal como, por ejemplo, una parte de la envoltura del virus del SIDA; proteínas transportadoras; receptores de asentamiento; adresinas; proteínas reguladoras; inmunoadhesinas; anticuerpos; y fragmentos biológicamente activos o variantes de cualquiera de los polipéptidos enumerados anteriormente. Se pueden utilizar muchos otros anticuerpos y/u otras proteínas de acuerdo con la presente invención, y las listas anteriores no pretenden ser limitantes.

Un "fragmento biológicamente funcional" de un anticuerpo comprende solo una parte de un anticuerpo intacto, en donde la parte conserva al menos una, y tantas como la mayoría o todas, de las funciones normalmente asociadas a esa parte cuando están presentes en un anticuerpo intacto. En una realización, un fragmento biológicamente funcional de un anticuerpo comprende un sitio de unión a antígeno del anticuerpo intacto y, por lo tanto, conserva la capacidad de unirse al antígeno. En otra realización, un fragmento biológicamente funcional de un anticuerpo, por ejemplo uno que comprende la región Fc, conserva al menos una de las funciones biológicas normalmente asociadas a la región Fc cuando está presente en un anticuerpo intacto, tal como la unión a FcRn, la modulación de la semivida del anticuerpo, la función CCDA y unión al complemento. En una realización, un fragmento biológicamente funcional de un anticuerpo es un anticuerpo monovalente que tiene una semivida *in vivo* sustancialmente similar a la de un anticuerpo intacto. Por ejemplo, dicho fragmento biológicamente funcional de un anticuerpo puede comprender un brazo de unión a antígeno unido a una secuencia de Fc capaz de conferir estabilidad *in vivo* al fragmento.

Las expresiones "inhibidor de tioredoxina" e "inhibidor de Trx" se utilizan indistintamente, e incluyen todos los agentes y medidas efectivos para inhibir la actividad de la tioredoxina. Por lo tanto, los inhibidores de tioredoxina (Trx) incluyen todos los agentes y medidas que bloquean cualquier componente de los sistemas de enzimas Trx, G6PD y / o hexocinasa. En este contexto, la "inhibición" incluye la eliminación completa (bloqueo) y la reducción de la actividad de la tioredoxina y, en consecuencia, la eliminación completa o parcial de la reducción del enlace disulfuro en una proteína, tal como un anticuerpo.

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y / o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con la investigación, el diagnóstico o los usos terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En algunas realizaciones, un anticuerpo se purifica (1) a más de 95 % en peso de anticuerpo como se determina mediante, por ejemplo, el método Lowry, y en algunas realizaciones, hasta más de 99 % en peso; (2) a un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de la secuencia de aminoácidos N-terminal o interna utilizando, por ejemplo, un secuenciador de copa giratoria, o (3) a homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras utilizando, por ejemplo, tinción con azul de Coomassie o plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Sin embargo, habitualmente, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

Las expresiones "Proteína A" y "ProA" se utilizan indistintamente en la presente memoria y abarcan Proteína A recuperada de una fuente nativa de la misma, Proteína A producida sintéticamente (p. ej. mediante síntesis peptídica o mediante técnicas recombinantes) y variantes de la misma que conservan la capacidad de unir proteínas que tienen una región CH2/CH3, tal como una región Fc. La proteína A se puede adquirir en el comercio en Repligen, GE Healthcare y Fermatech. La proteína A generalmente se inmoviliza sobre un material de soporte en fase sólida. El término "ProA" también se refiere a una resina o columna de cromatografía de afinidad que contiene una matriz de soporte sólida cromatográfica a la que está unida de manera covalente la Proteína A.

El término "cromatografía" se refiere al proceso mediante el cual un soluto de interés en una mezcla se separa de otros solutos en una mezcla como resultado de las diferencias en las velocidades a las que los solutos individuales de la mezcla migran a través de un medio estacionario bajo la influencia de una fase de movimiento, o en procesos de unión y elución.

Las expresiones "cromatografía de afinidad" y "cromatografía de afinidad de proteínas" se utilizan indistintamente en la presente memoria y se refieren a una técnica de separación de proteínas en la que una proteína o un anticuerpo de interés se une de forma reversible y específica a un ligando bioespecífico. Preferiblemente, el ligando bioespecífico se une de manera covalente a un material cromatográfico en fase sólida y es accesible a la proteína de interés en la solución cuando la solución entra en contacto con el material cromatográfico en fase sólida. La proteína de interés (por ejemplo, anticuerpo, enzima o proteína receptora) conserva su afinidad de unión específica por el ligando bioespecífico (antígeno, sustrato, cofactor u hormona, por ejemplo) durante las etapas cromatográficas, mientras que otros solutos y / o proteínas en la mezcla no se unen apreciable o específicamente al ligando. La unión de la proteína de interés al ligando inmovilizado permite que las proteínas contaminantes o las impurezas de proteínas pasen a través del medio cromatográfico mientras que la proteína de interés permanece específicamente unida al ligando inmovilizado en el material de fase sólida. La proteína de interés específicamente unida se elimina después en forma activa del ligando inmovilizado con ligando competidor de bajo pH, alto pH, alto contenido de sal y similares, y se hace pasar a través de la columna cromatográfica con el tampón de elución, carente de las proteínas contaminantes o impurezas de proteínas que antes se les permitía pasar a través de la columna. Como ligando puede utilizarse cualquier componente para purificar su respectiva proteína de unión específica, por ejemplo, anticuerpo.

Las expresiones "cromatografía de no afinidad" y "purificación de no afinidad" se refieren a un proceso de purificación en el que no se utiliza la cromatografía de afinidad. La cromatografía de no afinidad incluye técnicas cromatográficas que se basan en interacciones inespecíficas entre una molécula de interés (tal como una proteína, por ejemplo, un anticuerpo) y una matriz de fase sólida.

Una "resina de intercambio catiónico" se refiere a una fase sólida que está cargada negativamente, y que por tanto tiene cationes libres para el intercambio con cationes en una solución acuosa que pasa sobre o a través de la fase sólida. Un ligando cargado negativamente unido a la fase sólida para formar la resina de intercambio catiónico puede ser, por ejemplo, un carboxilato o sulfonato. Las resinas de intercambio catiónico disponibles en el comercio incluyen carboximetilcelulosa, sulfopropilo (SP) inmovilizado en agarosa (por ejemplo SP-SEPHAROSE FAST FLOW™ o SP-SEPHAROSE HIGH PERFORMANCE™, de GE Healthcare) y sulfonilo inmovilizado en agarosa (por ejemplo, S-SEPHAROSE FAST FLOW™ de GE Healthcare). Una "resina de intercambio iónico de modo mixto" se refiere a una fase sólida que se modifica de manera covalente con residuos catiónicos, aniónicos e hidrófobos. Una resina de intercambio iónico de modo mixto disponible en el comercio es BAKERBOND ABX™ (JT Baker, Phillipsburg, NJ) que contiene grupos de intercambio catiónico débiles, una baja concentración de grupos de intercambio aniónico y ligandos hidrófobos a una matriz de soporte en fase sólida de gel de sílice.

La expresión "resina de intercambio aniónico" se utiliza en la presente memoria para referirse a una fase sólida que está cargada positivamente, por ejemplo, que tiene uno o más ligandos cargados positivamente, tales como grupos amino cuaternario, unidos a los mismos. Las resinas de intercambio aniónico disponibles en el comercio incluyen DEAE celulosa, QAE SEPHADEX™ y FAST Q SEPHAROSE™ (GE Healthcare).

5 Un "tampón" es una solución que resiste los cambios en el pH por la acción de sus componentes conjugados ácido-base. En *Buffers. Guide for the Preparation and Use of Buffers in Biological Systems*, Gueffroy, D., ed. Calbiochem Corporation (1975) se describen diversos tampones que pueden emplearse dependiendo, por ejemplo, del pH deseado del tampón. En una realización, el tampón tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 2 a
10 aproximadamente 9, como alternativa de aproximadamente 3 a aproximadamente 8, como alternativa de aproximadamente 4 a aproximadamente 7, como alternativa de aproximadamente 5 a aproximadamente 7. Como ejemplos no limitantes de tampones que controlan el pH en este rango se incluyen los tampones de MES, MOPS, MOPSO, Tris, HEPES, fosfato, acetato, citrato, succinato y amonio, así como combinaciones de estos.

15 El "tampón de carga" es el que se utiliza para cargar la composición que comprende la molécula polipeptídica de interés y una o más impurezas sobre la resina de intercambio iónico. El tampón de carga tiene una conductividad y/o un pH tal que la molécula polipeptídica de interés (y generalmente una o más impurezas) está unida a la resina de intercambio iónico o tal que la proteína de interés fluye a través de la columna mientras las impurezas se unen a la resina.

20 El "tampón intermedio" se utiliza para eluir una o más impurezas de la resina de intercambio iónico, antes de eluir la molécula polipeptídica de interés. La conductividad y / o pH del tampón intermedio es / son tales que una o más impurezas se eluyen de la resina de intercambio iónico, pero no cantidades significativas del polipéptido de interés.

25 Cuando en la presente memoria se utiliza la expresión "tampón de lavado", se refiere a un tampón utilizado para lavar o reequilibrar la resina de intercambio iónico, antes de eluir la molécula polipeptídica de interés. Convenientemente, el tampón de lavado y el tampón de carga pueden ser iguales, pero esto no es necesario.

30 El "tampón de elución" se utiliza para eluir el polipéptido de interés de la fase sólida. La conductividad y / o el pH del tampón de elución es / son tales que el polipéptido de interés se eluye de la resina de intercambio iónico.

Para regenerar la resina de intercambio iónico de manera que pueda reutilizarse puede utilizarse un "tampón de regeneración". El tampón de regeneración tiene una conductividad y/o un pH según se requiera para eliminar
35 sustancialmente todas las impurezas y el polipéptido de interés de la resina de intercambio iónico.

La expresión "sustancialmente similar" o "sustancialmente igual", como se utiliza en la presente memoria, significa un grado de similitud suficientemente alto entre dos valores numéricos (por ejemplo, uno asociado a un anticuerpo de la invención y el otro asociado a un anticuerpo de referencia/comparador), de modo que un experto en la técnica consideraría que la diferencia entre los dos valores es de poca o ninguna importancia biológica y/o estadística dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores de K_d). La diferencia entre dichos dos valores es, por ejemplo, menor que aproximadamente 50 %, menor que aproximadamente 40 %, menor que aproximadamente 30 %, menor que aproximadamente 20 %, y / o menor que aproximadamente 10 % en función del valor de referencia/comparador.

45 La expresión "sustancialmente reducida" o "sustancialmente diferente", como se utiliza en la presente memoria con respecto a cantidades o valores numéricos (y no como referencia al proceso químico de reducción), significa un grado de diferencia suficientemente alto entre dos valores numéricos (generalmente uno asociado a una molécula y el otro asociado a una molécula de referencia / comparador) de modo que un experto en la técnica consideraría que la diferencia entre los dos valores es de importancia estadística dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores de K_d). La diferencia entre dichos dos valores es, por ejemplo, mayor que aproximadamente 10 %, mayor que aproximadamente 20 %, mayor que aproximadamente 30 %, mayor que aproximadamente 40 % y/o mayor que aproximadamente 50 % en función del valor de la molécula de referencia/comparador.

55 El término "vector", como se utiliza en la presente memoria, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un ADN circular bicatenario en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector de fago. Otro tipo de vector es un vector de virus, en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales en el
60 genoma del virus. Ciertos vectores pueden replicarse de manera autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episomales de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamíferos no episomales) pueden integrarse en el genoma de una célula hospedadora tras la introducción en la célula hospedadora, y de ese modo se replican junto con el genoma del huésped. Además, determinados vectores pueden dirigir la expresión de genes con los que están
65 unidos operativamente. En la presente memoria dichos vectores se denominan "vectores de expresión recombinante" o, simplemente, "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión de utilidad en

técnicas de ADN recombinante a menudo están en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" pueden utilizarse indistintamente ya que el plásmido es la forma de vector más comúnmente utilizada

- 5 El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia polipeptídica de referencia se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos en la secuencia polipeptídica de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para obtener el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. Con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos el alineamiento puede realizarse de varias maneras que están dentro de la experiencia en la técnica, por ejemplo, utilizando un programa informático disponible al público, tal como el programa BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar parámetros apropiados para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para obtener un alineamiento máximo en toda la longitud de las secuencias que se comparan. Sin embargo, para los fines de la presente memoria, utilizando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 se generan % de valores de identidad de secuencia de aminoácidos. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue creado por Genentech, Inc., y el código fuente ha sido archivado con la documentación del usuario en la U.S. Copyright Office, Washington DC, 20559, donde está registrado con el Registro N°. TXU510087 de la U.S. Copyright. El programa ALIGN-2 está disponible al público en Genentech, Inc., South San Francisco, California, o puede compilarse a partir del código fuente. El programa ALIGN-2 debe compilarse para su uso en un sistema operativo UNIX, preferiblemente digital UNIX V4.0D. Todos los parámetros de comparación de secuencia son establecidos por el programa ALIGN-2 y no varían.

En situaciones donde ALIGN-2 se emplea para establecer comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A determinada, con, o en contra de una secuencia de aminoácidos B determinada (que como alternativa se puede expresar como una secuencia de aminoácidos A determinada que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos, con, o en contra de una secuencia de aminoácidos B determinada) se calcula de la siguiente manera:

- 30 100 veces la fracción X / Y
donde X es el número de restos de aminoácidos puntuados como coincidencias idénticas por el programa de alineamiento de secuencias ALIGN-2 en ese alineamiento de programa de A y B, y
donde Y es el número total de restos de aminoácidos en B.

35 Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A a B no será es igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B a A. A menos que se especifique lo contrario, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos utilizados en este documento se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente anterior utilizando el programa informático ALIGN-2.

40 El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de ácidos nucleicos" se define como el porcentaje de nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos a los nucleótidos en una secuencia codificante del Factor D de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para obtener el porcentaje máximo de identidad de secuencia. Con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de ácidos nucleicos el alineamiento puede realizarse de varias maneras que están dentro de la experiencia en la técnica, por ejemplo, utilizando un programa informático disponible al público, tal como el programa BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo cualquier algoritmo necesario para obtener un alineamiento máximo en toda la longitud de las secuencias que se comparan. La identidad de secuencia se calcula después en relación con la secuencia más larga, es decir, incluso si una secuencia más corta muestra una identidad de secuencia del 100 % con una parte de una secuencia más larga, la identidad de secuencia global será menor que 100 %.

"Tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas. Los individuos que necesitan tratamiento incluyen los que ya padecen el trastorno, así como aquellos en los que se debe prevenir el trastorno. En la presente memoria, "tratamiento" incluye el alivio de la enfermedad y de los signos y síntomas de la enfermedad particular.

Un "trastorno" es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento con la proteína. Esto incluye trastornos crónicos agudos o enfermedades crónicas y agudas que incluyen aquellas afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Como ejemplos no limitantes de trastornos a tratar en este documento se incluyen carcinomas y alergias.

Un "mamífero" para los fines de tratamiento, se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluidos seres humanos, primates superiores no humanos, otros vertebrados, animales domésticos, de granja y de zoológico, animales para el deporte o animales de compañía, tales como perros, caballos, gatos, vacas, etc. Preferiblemente, el mamífero es un ser humano.

Un "ARN interferente" o "ARN interferente pequeño (ARNip)" es una molécula de ARN bicatenaria con una longitud menor de aproximadamente 30 nucleótidos, que reduce la expresión de un gen diana. Los ARN interferentes se pueden identificar y sintetizar utilizando métodos conocidos (Shi Y., Trends in Genetics 19 (1): 9-12 (2003), WO/2003056012 y WO2003064621), y en el comercio se dispone de bibliotecas de ARNip, por ejemplo, de Dharmacon, Lafayette, Colorado. Con frecuencia, los ARNip pueden diseñarse satisfactoriamente para dirigirse al extremo 5' de un gen.

II. Composiciones y métodos de la invención

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular y similares, que están dentro de los conocimientos de la técnica. Dichas técnicas se explican con detalle en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989); Current Protocols in Molecular Biology (F. Ausubel et al., eds., 1987 updated); Essential Molecular Biology (T. Brown ed., IRL Press 1991); Gene Expression Technology (Goeddel ed., Academic Press 1991); Methods for Cloning and Analysis of Eukaryotic Genes (A. Bothwell et al., eds., Bartlett Publ. 1990); Gene Transfer and Expression (M. Kriegler, Stockton Press 1990); Recombinant DNA Methodology II (R. Wu et al., eds., Academic Press 1995); PCR: A Practical Approach (M. McPherson et al., IRL Press at Oxford University Press 1991); Oligonucleotide Synthesis (M. Gait ed., 1984); Cell Culture for Biochemists (R. Adams ed., Elsevier Science Publishers 1990); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. Miller & M. Calos eds., 1987); Mammalian Cell Biotechnology (M. Butler ed., 1991); Animal Cell Culture (J. Pollard et al., eds., Humana Press 1990); Culture of Animal Cells, 2^{da} Ed. (R. Freshney et al., eds., Alan R. Liss 1987); Flow Cytometry and Sorting (M. Melamed et al., eds., Wiley-Liss 1990); the series Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Wirth M. and Hauser H. (1993); Immunocytochemistry in Practice, 3^a edición, A. Johnstone & R. Thorpe, Blackwell Science, Cambridge, MA, 1996; Techniques in Immunocytochemistry, (G. Bullock & P. Petrusz eds., Academic Press 1982, 1983, 1985, 1989); Handbook of Experimental Immunology, (D. Weir & C. Blackwell, eds.); Current Protocols in Immunology (J. Coligan et al., eds. 1991); Immunoassay (E. P. Diamandis & T.K. Christopoulos, eds., Academic Press, Inc., 1996); Goding (1986) Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (2d ed) Academic Press, New York; Ed Harlow and David Lane, Antibodies A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1988; Antibody Engineering, 2^a edición (C. Borrebaeck, ed., Oxford University Press, 1995); y la serie Annual Review of Immunology; la serie Advances in Immunology.

1. Prevención de la reducción de enlaces disulfuro

La presente invención se refiere a métodos para la prevención de la reducción de enlaces disulfuro de proteínas durante la producción recombinante. En particular, la invención se refiere a métodos para prevenir la reducción de enlaces disulfuro de proteínas recombinantes durante el procesamiento después de la fermentación. Los métodos de la invención son particularmente valiosos para la producción a gran escala, tal como a escala de fabricación, de proteínas que contienen enlaces disulfuro. En una realización, los métodos de la invención son útiles para la producción de proteínas a gran escala, a una escala mayor de 5.000 l.

Se ha descubierto experimentalmente que la reducción del enlace disulfuro tiene lugar durante el procesamiento del líquido de cultivo celular recogido (LCCR) producido durante la fabricación de proteínas recombinantes que contienen enlaces disulfuro. Generalmente, esta reducción se observa después de la lisis celular, especialmente la lisis celular mecánica durante las operaciones de recogida, cuando alcanza un determinado umbral, tal como, por ejemplo, de aproximadamente 30 % a aproximadamente 70 %, o de aproximadamente 40 % a aproximadamente 60 %, o de aproximadamente 50 % a aproximadamente 60 % de lisis celular total. Este umbral variará, dependiendo de la naturaleza de la proteína (por ejemplo, anticuerpo) producida, del huésped recombinante, del sistema de producción, de los parámetros de producción utilizados, y similares, y puede determinarse fácilmente de manera experimental.

Teóricamente, dicha reducción podría resultar de varios factores y condiciones durante el proceso de fabricación, y podría estar causada por varios agentes reductores. La presente invención se basa, al menos en parte, en el reconocimiento de que la causa fundamental de esta reducción es un sistema activo de tiorredoxina (Trx) o de tipo tiorredoxina en el LCCR.

El sistema enzimático de Trx, constituido por Trx, tiorredoxina reductasa (TrxR) y NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato), es un sistema donador de hidrógeno para la reducción de enlaces disulfuro en proteínas. La Trx es una proteína monomérica pequeña con un motivo de sitio activo CXXC que cataliza muchas reacciones redox a través del intercambio de tiol-disulfuro. La Trx oxidada puede reducirse mediante NADPH a través de TrxR. La Trx reducida es capaz de catalizar la reducción de disulfuros en proteínas. El NADPH requerido para el sistema de tiorredoxina se proporciona mediante reacciones en la ruta de la pentosa fosfato y la glucólisis. Los resultados presentados en este documento demuestran que el NADPH, que se requiere para la actividad del sistema Trx, es proporcionado por la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), que genera NADPH a partir de glucosa y ATP por hexocinasa (véase la Figura 4). Estas enzimas celulares (sistema Trx, G6PD y hexocinasa) junto con sus sustratos se liberan en el LCC después de la lisis celular, permitiendo que se produzca la reducción. De acuerdo con esto, la reducción de disulfuro se puede prevenir mediante inhibidores del sistema enzimático de Trx o sistemas enzimáticos aguas arriba que proporcionan componentes para un sistema de Trx activo, tal como actividad

G6PD y hexocinasa.

Para más detalles de estos sistemas enzimáticos, o con respecto a otros detalles de producción de proteínas, véase, por ejemplo: Babson, AL y Babson, SR (1973) Kinetic Colorimétrico Measurement of Serum Lactate Dehydrogenase Activity. Clin. Chem. 19: 766 - 769; Michael W. Laird et al., "Optimization of BLYS Production and Purification from *Escherichia coli*," Protein Expression and Purification 39:237-246 (2005); John C. Joly et al., "Overexpression of *Escherichia coli* Oxidoreductases Increases Recombinant Insulin-like Growth Factor-I Accumulation," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:2773-2777 (marzo 1998); Dana C. Andersen et al., "Production Technologies for Monoclonal Antibodies and Their Fragments," Current Opinion in Biotechnology 15:456-462 (2004); Yariv Mazar et al., "Isolation of Engineered, Fulllength Antibodies from Libraries Expressed in *Escherichia coli*," Nature Biotech. 25, 563 - 565 (01 Jun 2007); Laura C. Simmons et al., "Expression of Full-length Immunoglobulins in *Escherichia coli*: Rapid and Efficient Production of Aglycosylated Antibodies," Journal of Immunological Methods 263:133-147 (2002); Paul H. Bessette et al., "Efficient Folding of Proteins with Multiple Disulfide Bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm," Proc. Natl. Acad. Sci. 96(24):13703-08 (1999); Chaderjian, W.B., Chin, E.T., Harris, R.J., and Etcheverry, T.M., (2005) "Effect of copper sulfate on performance of a serum-free CHO cell culture process and the level of free thiol in the recombinant antibody expressed," Biotechnol. Prog. 21: 550-553; Gordon G., Mackow M.C., and Levy H.R., (1995) "On the mechanism of interaction of steroids with human glucose 6-phosphate dehydrogenase," Arch. Biochem. Biophys. 318: 25-29; Gromer S., Urig S., and Becker K., (2004) "The Trx System - From Science to Clinic," Medicinal Research Reviews, 24: 40-89; Hammes G.G. and Kochavi D., (1962a) "Studies of the Enzyme Hexokinase. I. Steady State Kinetics at pH 8," J. Am. Chem. Soc. 84:2069-2073; Hammes G.G. and Kochavi D., (1962b) "Studies of the Enzyme Hexokinase. III. The Role of the Metal Ion," J. Am. Chem. Soc. 84:2076-2079; Johansson C., Lillig C.H., and Holmgren A., (2004) "Human Mitochondrial Glutaredoxin Reduces S-Glutathionylated Proteins with High Affinity Accepting Electrons from Either Glutathione or Thioredoxin Reductase," J. Biol. Chem. 279:7537-7543; Legrand, C., Bour, J.M., Jacob, C., Capiaumont J., Martial, A., Marc, A., Wudtke, M., Kretzmer, G., Demangel, C., Duval, D., and Hache J., (1992) "Lactate Dehydrogenase (LDH) Activity of the Number of Dead Cells in the Medium of Cultured Eukaryotic Cells as Marker," J. Biotechnol., 25: 231-243; McDonald, M.R., (1955) "Yeast Hexokinase : ATP + Hexose $\rightarrow$ Hexose-6-phosphate + ADP," Methods in Enzymology, 1: 269-276, Academic Press, NY; Sols, A., DelaFuente, G., Villar-Palasi, C., and Asensio, C., (1958) "Substrate Specificity and Some Other Properties of Bakers' Yeast Hexokinase," Biochim Biophys Acta 30: 92-101; Kirkpatrick D.L., Kuperus M., Dowdeswell M., Potier N., Donald L.J., Kunkel M., Berggren M., Angulo M., and Powis G., (1998) "Mechanisms of inhibition of the Trx growth factor system by antitumor 2-imidazolyl disulfides," Biochem. Pharmacol. 55: 987-994; Kirkpatrick D.L., Watson S., Kunkel M., Fletcher S., Ulhaq S., and Powis G., (1999) "Parallel syntheses of disulfide inhibitors of the Trx redox system as potential antitumor agents," Anticancer Drug Des. 14: 421-432; Milhausen, M., and Levy, H.R., (1975) "Evidence for an Essential Lysine in G6PD from *Leuconostoc mesenteroides*," Eur. J. Biochem. 50: 453-461; Pleasants, J.C., Guo, W., and Rabenstein, D.L., (1989) "A comparative study of the kinetics of selenol/diselenide and thiol/disulfide exchange reactions," J. Am. Chem. Soc. 111: 6553-6558; Whitesides, G.M., Lilburn, J.E., and Szajewski, R.P., (1977) "Rates of thiol/disulfide interchange reactions between mono- and dithiols and Ellman's reagent," J. Org. Chem. 42: 332-338; and Wipf P., Hopkins T.D., Jung J.K., Rodriguez S., Birmingham A., Southwick E.C., Lazo J.S., and Powis G., (2001) "New inhibitors of the Trx-TrxR system based on a naphthoquinone spiroketal natural product lead," Bioorg. Med. Chem. Lett. 11: 2637-2641.

Según un aspecto de la presente divulgación, la reducción del enlace disulfuro se puede impedir bloqueando cualquier componente de los sistemas enzimáticos de Trx, G6PD y hexocinasa. En la presente memoria, los inhibidores de estos sistemas enzimáticos reciben, en su conjunto, el nombre de "inhibidores de tioredoxina" o "inhibidores de Trx". Los inhibidores de Trx se añaden generalmente al líquido de cultivo celular (LCC), que contiene las células hospedadoras recombinantes y los medios de cultivo, y/o al líquido de cultivo celular recogido (LCCR), que se obtiene después de su recogida por centrifugación, filtración o métodos de separación similares. El LCCR carece de células hospedadoras intactas, pero generalmente contiene proteínas de células hospedadoras y otros contaminantes, incluido el ADN, que se eliminan en etapas de purificación posteriores. Por lo tanto, pueden añadirse inhibidores de Trx antes de la recogida y/o durante la recogida, preferiblemente antes de la recogida.

Como alternativa o adicionalmente, también pueden utilizarse otros métodos inespecíficos para impedir la reducción del enlace disulfuro después de la fermentación durante la producción recombinante de proteínas recombinantes, tal como la inyección de aire o el ajuste del pH. En la siguiente Tabla 1, se enumeran determinados métodos de inhibición de la reducción contemplados en este documento.

Tabla 1: Métodos de inhibición de la reducción

Método ¹	Propósito
Adición de EDTA, EGTA o citrato	Para inhibir hexocinasa
Adición de sorbosa-1-fosfato, polifosfatos, 6-desoxi-6-fluoroglucosa, 2-C-hidroxi- metilglucosa, xilosa o lixosa	Para inhibir hexocinasa
Adición de epiandrosterona o deshidropiandrosterona (DHEA)	Para inhibir G6PD

(continuación)

Método1	Propósito
Adición de piridoxal 5'-fosfato o 1-fluor-2,4-dinitrobenzenceno	Para inhibir G6PD
Adición de iones metálicos, tales como, Cu^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Co^{2+} o Mn^{2+}	Para inhibir el sistema Trx
Adición de disulfuros de alquil-2-imidazolilo y compuestos relacionados (por ejemplo, disulfuro de 1 metilpropil-2-imidazolilo) ² o derivados de naftoquinona espirocetales (p. ej. palmarumicina CP ₁) ²	Para inhibir Trx
Adición de aurotioglucosa (ATG) o aurotiomalato (ATM)	Para inhibir TrxR
Inyección de aire	Para reducir G6P y NADPH; agente oxidante
Cistina	Agente oxidante
Glutatión oxidada	Agentes oxidantes
Ajuste de pH por debajo de 6,0	Para reducir la tasa de intercambio de tiol-disulfuro y la actividad del sistema Trx
¹ Aplicado al LCC antes de la recogida o en el LCCR inmediatamente después de la recogida.	
² Actualmente no disponible en el comercio.	

Como "inhibidores de Trx" para uso en los métodos de la presente divulgación, se incluyen, sin limitación, (1) inhibidores directos de Trx, tales como disulfuros de alquil-2-imidazolilo y compuestos relacionados (por ejemplo, disulfuro de 1 metilpropil-2-imidazolilo) (Kirkpatrick et al., 1998 y 1999, citados anteriormente) y derivados de naftoquinona espirocetales (por ejemplo, palmarumicina CP₁) (Wipf et al., 2001, citados anteriormente); (2) inhibidores específicos de TrxR, que incluyen complejos de oro, tales como aurotioglucosa (ATG) y aurotiomalato (ATM) (véase, por ejemplo, la revisión de Gromer et al., 2004), que son ejemplos de inhibidores irreversibles de TrxR; (3) iones metálicos, tales como Hg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} y Mn^{2+} , que pueden formar fácilmente complejos con tioles y selenoles, y de este modo se puede utilizar como inhibidores de TrxR o Trx; (4) inhibidores de G6PD, tales como, por ejemplo, piridoxal 5'-fosfato y 1 fluor-2,4-dinitrobenzenceno (Milhausen y Levy 1975, citados anteriormente), ciertos esteroides, tales como deshidroepiandrosterona (DHEA) y epiandrosterona (EA) (Gordon et al., 1995, citados anteriormente); y (4) inhibidores de la actividad de hexocinasa (y por lo tanto de la producción de G6P para la G6PD), incluidos los quelantes de iones metálicos, por ejemplo, Mg^{2+} , tales como EDTA, y compuestos que reaccionan con grupos SH, sorbosa-1-fosfato, polifosfatos, 6-desoxi-6-fluoroglucosa, 2-C-hidroxi-metilglucosa, xilosa y lixosa (Sols et al., 1958, citados anteriormente; McDonald, 1955, citado anteriormente); en la patente de estados unidos N° 5.854.067 titulada "Inhibidores de hexocinasa", se desvelan otros inhibidores de hexocinasa. Se entenderá que estos inhibidores se enumeran solo con fines ilustrativos. Existen otros inhibidores de Trx y pueden utilizarse, solos o en diversas combinaciones.

Los "inhibidores de Trx" para utilizar en los métodos de la presente divulgación también incluyen reactivos por los cuales la reducción de anticuerpos o proteínas producidos por medios recombinantes, puede disminuirse o impedirse disminuyendo los niveles de enzimas del sistema Trx, la ruta de la pentosa fosfato o hexocinasa, en varios puntos durante la campaña de producción. Esta reducción de los niveles de enzima se puede lograr utilizando ARNip, nucleótidos antisentido o anticuerpos. Para diseñar RNAip o nucleótidos antisentido dirigidos a los genes que se encuentran en células CHO, estas secuencias génicas están disponibles en bases de datos públicas para seleccionar secuencias para dirigir enzimas en diferentes organismos. Para ejemplos de genes del sistema Trx de *E. coli* y de ratón véase más adelante el Ejemplo 9.

En determinadas realizaciones de la presente invención también es posible, impedir que la reducción de una proteína recombinante se purifique inyectando aire en el LCCR para mantener un potencial de oxidación redox en el LCCR. Esta es una medida no dirigida que puede reducir la glucosa, G6P y NADPH al oxidar continuamente las formas reducidas de Trx y TrxR. La inyección de aire del tanque con LCCR puede realizarse, por ejemplo, con un flujo de aire de aproximadamente 100 litros a aproximadamente 200 litros, tal como, por ejemplo, 150 litros por minuto. La inyección de aire se puede realizar hasta alcanzar un porcentaje de saturación de punto final; por ejemplo, la inyección de aire puede continuar hasta que el LCCR esté saturado aproximadamente al 100 % con aire, o puede continuar hasta que el LCCR esté saturado aproximadamente al 30 % con aire, o hasta que esté entre aproximadamente 100 % a aproximadamente 30 % saturado con aire. La cantidad mínima de oxígeno disuelto (dO_2) necesaria para obtener el efecto inhibidor deseado también depende del anticuerpo u otra proteína recombinante producida. De este modo, por ejemplo, aproximadamente el 10 % de dO_2 (o aproximadamente 10 sccm de corriente

continua) tendrá el efecto deseado durante la producción de anticuerpo 2H7 (Variante A), mientras que Apomab podría requerir un mayor porcentaje (aproximadamente 30 %) de dO_2 .

En el presente documento se desvela otro método no dirigido que puede utilizarse para bloquear la reducción de la proteína recombinante, es la reducción de pH del LCCR. Se aprovecha el intercambio de disulfuro-tiol particularmente lento a valores de pH más bajos (Whitesides et al., 1977, citados anteriormente, Pleasants et al., 1989, citados anteriormente). Por lo tanto, la actividad del sistema Trx es significativamente menor a valores de pH por debajo de 6 y, por lo tanto, se puede inhibir la reducción de la proteína recombinante, tal como ocelizumab.

Los enfoques no dirigidos también pueden combinarse entre sí y/o con el uso de uno o más inhibidores de Trx.

La reducción del enlace disulfuro puede inhibirse (es decir, bloquearse parcial o totalmente) utilizando uno o más inhibidores de Trx y/o aplicando enfoques no dirigidos después de finalizar el proceso de cultivo celular, preferiblemente en el LCC antes de la recogida o en el LCCR inmediatamente después de la recogida. El tiempo y el modo de aplicación óptimos, y las cantidades efectivas, dependen de la naturaleza de la proteína a purificar, de las células hospedadoras recombinantes y del método de producción específico utilizado. La determinación de los parámetros óptimos forma parte de la experiencia de los expertos en la técnica.

Por ejemplo, en un proceso de cultivo celular de mamífero, tal como el proceso de producción de anticuerpos CHO descrito en los Ejemplos del presente documento, si el sulfato cúprico (CuSO_4 en forma de pentahidrato o en forma anhidra) se utiliza como un inhibidor de Trx, se puede añadir para complementar el LCC o LCCR en el intervalo de concentración de aproximadamente 5 μM a aproximadamente 100 μM , tal como de aproximadamente 10 μM a aproximadamente 80 μM , preferiblemente de aproximadamente 15 μM a aproximadamente 50 μM . Dado que algunos cultivos celulares ya contienen cobre (por ejemplo, aproximadamente 0,04 μM de CuSO_4 para los cultivos de células CHO utilizados en los ejemplos del presente documento), esta cantidad es además del cobre, si lo hay, ya presente en el cultivo celular. Se puede utilizar cualquier sal de cobre (II) en lugar de CuSO_4 siempre que la solubilidad no sea un problema. Por ejemplo, en lugar de CuSO_4 , puede utilizarse acetato de cobre y cloruro de cobre, ambos solubles en agua. La concentración mínima eficaz también puede depender del anticuerpo producido y de la fase en la que se utiliza el inhibidor. De este modo, por ejemplo, cuando se añade sulfato cúprico antes de la lisis, para el anticuerpo 2H7 (Variante A) la concentración mínima eficaz es de aproximadamente 30 μM , para Apomab es de aproximadamente 75 μM , y para el anticuerpo Variante C (véase la Tabla 2) es de aproximadamente 50 μM . Cuando se añade sulfato cúprico en medio de CC, para el anticuerpo 2H7 (variante A) la concentración mínima eficaz es de aproximadamente 15 μM , para Apomab es de aproximadamente 25 μM , y para el anticuerpo Variante C es de aproximadamente 20 μM . Una concentración mínima típica de inhibidor CuSO_4 es 2 veces la concentración de Trx (o equivalencia con Trx).

El EDTA se puede utilizar en un amplio intervalo de concentración, dependiendo del grado de lisis celular de la célula hospedadora recombinante utilizada y de otros parámetros del proceso de producción. Por ejemplo, cuando se utiliza CHO u otras células hospedadoras de mamífero, generalmente se puede añadir EDTA a una concentración de entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 60 mM, tal como de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM, o de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 40 mM, dependiendo del grado de lisis celular. Para un grado más bajo de lisis celular, serán suficientes concentraciones más bajas de EDTA, mientras que para una lisis celular de aproximadamente 75 % -100 %, la concentración requerida de EDTA es mayor, tal como, por ejemplo, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 40 mM. La concentración mínima eficaz también puede depender del anticuerpo producido. Por lo tanto, por ejemplo, para el anticuerpo 2H7 (Variante A), la concentración mínima eficaz de EDTA es de aproximadamente 10 mM.

La DHEA, como inhibidor de Trx, es generalmente efectiva a una concentración más baja, tal como, por ejemplo, en el intervalo de concentración de aproximadamente 0,05 mM a aproximadamente 5 mM, preferiblemente de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 2,5 mM.

Otros inhibidores de Trx, tales como la aurotioglucosa (ATG) y el aurotiomalato (ATM), inhiben la reducción de enlaces disulfuro en el intervalo de concentración μM . Por lo tanto, se puede añadir ATG o ATM, por ejemplo, a una concentración que varía entre aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 1 mM. Si bien la concentración inhibidora mínima varía según las condiciones reales, para la ATG y el ATM generalmente es de aproximadamente 4 veces la concentración de TrxR.

Se observa que todos los inhibidores pueden utilizarse en una cantidad excesiva, por lo tanto, no siempre es necesario conocer la cantidad de Trx o TrxR en el sistema.

En una realización preferida, la célula hospedadora de mamífero utilizada en el proceso de fabricación es una célula de ovario de hámster chino (CHO) (Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)). Otras células hospedadoras de mamífero incluyen, sin limitación, la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión), Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); células de riñón de cría de hámster BHK, ATCC CCL 10); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243 - 251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma de

cuello uterino humano (HELA, ATCC CCL 2); células renales caninas (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al., Annals NY Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; una línea de hepatoma humano (Hep G2); y células de mieloma o linfoma (por ejemplo, células Y0, J558L, P3 y NS0) (véase la Patente de Estados Unidos N° 5.807.715).

Una célula hospedadora preferida para la producción de los polipéptidos de la presente invención es la línea celular CHO DP12 (CHO K1 dhfr⁻). Esta es una de las líneas celulares CHO más conocidas, muy utilizada en la práctica de laboratorio (véase, por ejemplo, el documento EP 0.307.247, publicado el 15 de marzo de 1989). Además, otras líneas celulares CHO-K1 (dhfr⁻) son conocidas y pueden utilizarse en los métodos de la presente invención.

Las células hospedadoras de mamífero utilizadas para producir péptidos, polipéptidos y proteínas pueden cultivarse en diversos medios. Los medios disponibles en el comercio, tales como medio de Ham F10 (Sigma), Medio Mínimo Esencial ((MEM), Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y Medio de Eagle Modificado por Dulbecco ((DMEM, Sigma) son adecuados para el cultivo de células hospedadoras. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham y Wallace (1979), Meth. en Enz. 58:44, Barnes y Sato (1980), Anal. Biochem. 102: 255, en las Patentes de Estados Unidos N° 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762 o 4.560.655, WO 90/03430, WO 87/00195, Patente de Estados Unidos N° Re. 30.985, o Patente de Estados Unidos N° 5.122.469, pueden utilizarse como medios de cultivo para las células hospedadoras. Cualquiera de estos medios puede completarse según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tal como HEPES), nucleósidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tal como el fármaco GentamycinTM), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos habitualmente presentes a concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También se pueden incluir otros complementos necesarios a concentraciones apropiadas que conocerían los expertos en la técnica. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, el pH y similares, son las utilizadas previamente con la célula hospedadora seleccionada para la expresión, y serán obvias para el experto habitual en la materia.

Un protocolo para la producción, recuperación y purificación de anticuerpos recombinantes en células de mamífero, tales como CHO, puede incluir las siguientes etapas:

Las células se pueden cultivar en un sistema de biorreactor de tanque agitado y se emplea un procedimiento de cultivo semidiscontinuo. En un cultivo semidiscontinuo preferido, las células hospedadoras de mamífero y el medio de cultivo se suministran inicialmente a un recipiente de cultivo y se suministran nutrientes de cultivo adicionales, continuamente o en distintos incrementos, al cultivo durante el cultivo, con o sin recogida periódica de células y/o productos antes de finalizar el cultivo. El cultivo semidiscontinuo puede incluir, por ejemplo, un cultivo discontinuo semicontinuo, en el que periódicamente se elimina el cultivo completo (que incluye células y medio) y se reemplaza por medio nuevo. El cultivo semidiscontinuo se diferencia del cultivo discontinuo simple en que todos los componentes del cultivo celular (que incluyen las células y todos los nutrientes del cultivo) se suministran al recipiente de cultivo al comienzo del proceso de cultivo. El cultivo semidiscontinuo puede diferenciarse además del cultivo de perfusión en la medida en que el sobrenadante no se elimina del recipiente de cultivo durante el proceso (en el cultivo de perfusión, las células se retienen en el cultivo, por ejemplo, por filtración, encapsulación, anclaje a microvehículos, etc. y el medio de cultivo se introduce o se elimina de forma continua o intermitente del recipiente de cultivo).

Además, las células del cultivo pueden propagarse según cualquier esquema o rutina que pueda ser adecuado para la célula hospedadora particular y para el plan de producción particular contemplado. Por lo tanto, se puede emplear un procedimiento de cultivo de una sola etapa o de múltiples etapas. En un cultivo de una sola etapa, las células huésped se inoculan en un entorno de cultivo y los procesos se emplean durante una sola fase de producción del cultivo celular. Como alternativa, se puede utilizar un cultivo de múltiples estadios. En el cultivo de múltiples estadios, las células se pueden cultivar en varias etapas o fases. Por ejemplo, las células pueden crecer en una primera etapa o cultivo en fase de crecimiento en el que las células, posiblemente extraídas del almacenamiento, se inoculan en un medio adecuado para promover el crecimiento y la alta viabilidad. Las células se pueden mantener en la fase de crecimiento durante un período de tiempo adecuado añadiendo medio reciente al cultivo de la célula hospedadora.

En determinadas realizaciones, se pueden contemplar condiciones de cultivo celular semidiscontinuo o continuo para potenciar el crecimiento de las células de mamífero en la fase de crecimiento del cultivo celular. En la fase de crecimiento, las células se cultivan en condiciones y durante un período de tiempo que se maximiza para el crecimiento. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH, oxígeno disuelto (dO₂) y similares, son las utilizadas con el hospedador particular y serán obvias para el experto habitual en la materia. Generalmente, el pH se ajusta a un nivel entre aproximadamente 6,5 y 7,5 utilizando un ácido (por ejemplo, CO₂) o una base (por ejemplo, Na₂CO₃ o NaOH). Un intervalo de temperatura adecuado para cultivar células de mamífero, tales como células CHO, está entre aproximadamente 30 °C y 38 °C, y un dO₂ adecuado está entre el 5-90 % de saturación de aire.

En un estadio particular, las células pueden utilizarse para inocular una fase o etapa de producción del cultivo

celular. Como alternativa, como se describió anteriormente, la fase o etapa de producción puede ser continua con la fase o etapa de inoculación o crecimiento.

Generalmente, el entorno de cultivo celular durante la fase de producción del cultivo celular se controla. De este modo, si se produce una glucoproteína, los factores que influyen en la productividad específica de la célula hospedadora de mamífero pueden manipularse de modo que se consiga el contenido de ácido siálico deseado en la glucoproteína resultante. En un aspecto preferido, la fase de producción del proceso de cultivo celular está precedida por una fase de transición del cultivo celular en la que se emplean parámetros para la fase de producción del cultivo celular. Detalles adicionales de este proceso se encuentran en la patente de Estados Unidos No. 5.721.121, y en Chaderjian et al., *Biotechnol. Prog.* 21 (2): 550-3 (2005).

Después de la fermentación, las proteínas se purifican. Los procedimientos para la purificación de proteínas de restos celulares dependen inicialmente del lugar de expresión de la proteína. Algunas proteínas pueden secretarse directamente desde la célula al interior los medios de crecimiento circundantes; otras se preparan intracelularmente. Para estas últimas proteínas, la primera etapa de un proceso de purificación implica la lisis de la célula, lo que puede realizarse mediante varios de métodos, incluyendo cizalla mecánica, choque osmótico o tratamientos enzimáticos. Dicha alteración libera todo el contenido de la célula en el homogeneizado, y además produce fragmentos subcelulares que son difíciles de eliminar debido a su pequeño tamaño. Estos generalmente se eliminan por centrifugación diferencial o por filtración. El mismo problema surge, aunque a menor escala, con proteínas secretadas directamente debido a la muerte natural de las células y a la liberación de proteínas y componentes de células hospedadoras intracelulares en el transcurso de la producción de proteínas.

Una vez que se ha obtenido una solución clarificada que contiene la proteína de interés, habitualmente se intenta su separación de las otras proteínas producidas por la célula utilizando una combinación de diferentes técnicas de cromatografía. Estas técnicas separan las mezclas de proteínas en función de su carga, grado de hidrofobicidad o tamaño. Varias resinas de cromatografía diferentes están disponibles para cada una de estas técnicas, lo que permite una adaptación exacta del esquema de purificación para la proteína particular implicada. La esencia de cada uno de estos métodos de separación es que las proteínas pueden moverse a diferentes velocidades a lo largo de una columna, logrando una separación física que aumenta a medida que pasan más abajo en la columna, o se adhieren selectivamente al medio de separación, siendo entonces eluidas diferencialmente por diferentes disolventes. En algunos casos, la proteína deseada se separa de las impurezas cuando estas últimas se adhieren específicamente a la columna, y la proteína de interés no lo hace, es decir, la proteína de interés está presente en el "flujo continuo". De este modo, la purificación de proteínas recombinantes del cultivo celular de células hospedadoras de mamífero, puede incluir una o más etapas cromatográficas de afinidad (por ejemplo, proteína A) y/o de intercambio iónico.

La cromatografía de intercambio iónico es una técnica cromatográfica que se utiliza habitualmente para la purificación de proteínas. En la cromatografía de intercambio iónico, los parches cargados en la superficie del soluto son atraídos por cargas opuestas unidas a una matriz de cromatografía, siempre que la fuerza iónica del tampón circundante sea baja. La elución generalmente se logra aumentando la fuerza iónica (es decir, la conductividad) del tampón para competir con el soluto por los sitios cargados de la matriz de intercambio iónico. Cambiar el pH y por lo tanto alterar la carga del soluto es otra forma de lograr la elución del soluto. El cambio en la conductividad o pH puede ser gradual (elución en gradiente) o escalonado (elución en etapas). En el pasado, estos cambios han sido progresivos; es decir, el pH o la conductividad aumentan o disminuyen en una sola dirección.

Para más detalles sobre la purificación industrial de anticuerpos terapéuticos, véase, por ejemplo, Fahrner et al., *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 18: 301 - 27 (2001).

Además de células hospedadoras de mamífero, como células huésped para la expresión de la proteína recombinante, pueden utilizarse otros organismos eucariotas. Para la expresión en células hospedadoras de levadura, tales como la levadura de panadería común o *Saccharomyces cerevisiae*, como vectores adecuados se incluyen vectores de replicación episómica basados en el plásmido de 2 micras, vectores de integración y vectores cromosómicos artificiales de levadura (YAC, *yeast artificial chromosome*). Otras levaduras adecuadas para la producción recombinante de proteínas heterólogas incluyen *Schizosaccharomyces pombe* (Beach y Nurse, *Nature*, 290: 140 (1981), documento EP 139 383 publicado el 2 de mayo de 1985); hospedadores de *Kluyveromyces* (Patente de los Estados Unidos N.º 4.943.529, Fleer et al., *Bio/Technology*, 2: 968.975 (1991)) tales como, por ejemplo, *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Lourencourt et al., *J. Bacteriol.*, 737 (1983)), *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. Waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilum* (ATCC 36.906; Van den Berg et al., *Bio/Technology*, 8: 135 (1990)), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *Yarrowia* (documento EP 402.226); *Pichia pastoris* (documento EP 183.070; Sreekrishna et al., *J. Basic Microbiol.*, 28: 265 278 (1988)); *Candida*; *Trichoderma reesia* (documento EP 244.234); *Neurospora crassa* (Case et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 5259 5263 (1979)); *Schwanniomyces* tal como *Schwanniomyces occidentalis* (documento EP 394.538 publicado el 31 de octubre de 1990); y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (documento WO 91/00357 publicado el 10 de enero de 1991), y hospedadores de *Aspergillus* tales como *A. nidulans* (Ballance et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112: 284 289 (1983); Tilburn et al., *Gene*, 26: 205 221 (1983); Yelton et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 1470 1474 (1984)) y *A. niger* (Kelly and Hynes, *EMBO J.*, 4: 475 479 (1985)). Las levaduras metilotróficas son adecuadas en este

documento e incluyen, pero sin limitación, una levadura capaz de crecer en metanol seleccionada de los géneros que consisten en *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* y *Rhodotorula*. Una lista de especies específicas que son a modo de ejemplo de esta clase de levaduras se puede encontrar en C. Anthony, The Biochemistry of Methylophilic, 269 (1982). En la técnica se conocen bien y/o están disponibles en el comercio, sistemas de expresión para las levaduras enumeradas y otras.

Para la expresión en células hospedadoras de insectos, tales como células Sf9, los vectores adecuados incluyen vectores de baculovirus. Para la expresión en células hospedadoras vegetales, particularmente hospedadoras de plantas dicotiledóneas, tales como tabaco, como vectores de expresión adecuados se incluyen vectores derivados del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*.

Los métodos de la presente divulgación también se amplían a cultivos de células hospedadoras procariotas. Las células hospedadoras procariotas adecuadas para expresar anticuerpos y otras proteínas incluyen *Archaeobacteria* y *Eubacteria*, tales como organismos gram-negativos o gram-positivos. Como ejemplos de bacterias útiles se incluyen especies de *Escherichia* (por ejemplo, *E. coli*), *Bacilli* (por ejemplo, *B. subtilis*), *Enterobacteria*, *Pseudomonas* (por ejemplo, *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescans*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla* o *Paracoccus*. En una realización, se utilizan células gram-negativas. Como ejemplos de cepas de *E. coli* se incluyen la cepa W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, volumen 2 (Washington, DC: American Society for Microbiology, 1987), páginas 1190-1219, Depósito de la ATCC No. 27.325) y sus derivados, incluyendo la cepa 33D3 que tiene el genotipo W3110 Δ fhua (Δ tonA) ptr3 lac lq lacL8 Δ ompT Δ (nmpc-fepE) degP41 kanR (Patente de Estados Unidos N.º 5.639.635). También son adecuadas otras cepas y sus derivados, tales como *E. coli* 294 (ATCC 31.446), *E. coli* B, *E. coli* 1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* RV308 (ATCC 31.608). Estos ejemplos son ilustrativos en lugar de limitantes. En la técnica se conocen métodos para construir derivados de cualquiera de las bacterias mencionadas anteriormente que tienen genotipos definidos y se describen, por ejemplo, en Bass et al., Proteins, 8: 309-314 (1990). En general, es necesario seleccionar las bacterias apropiadas teniendo en cuenta la replicabilidad del replicón en las células de una bacteria. Por ejemplo, para suministrar el replicón, la especie *E. coli*, o especies de *Serratia* o *Salmonella* pueden utilizarse adecuadamente como hospedador cuando se utilizan plásmidos bien conocidos tales como pBR322, pBR325, pACYC177 o pKN410. Generalmente, la célula hospedadora debe secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas, y en el cultivo celular pueden incorporarse, si se desea, inhibidores de proteasa adicionales.

En la técnica se conocen bien métodos para la producción, recuperación y purificación de proteínas recombinantes a partir de cultivos de células hospedadoras que no son de mamífero. Si el polipéptido se produce en una célula que no es de mamífero, por ejemplo, un microorganismo, tal como un hongo o *E. coli*, el polipéptido se recuperará dentro de la célula o en el espacio periplasmático (Kipriyanov y Little, *Molecular Biotechnology*, 12: 173 201 (1999); Skerra y Pluckthun, *Science*, 240: 1038 1040 (1988)). Por lo tanto, es necesario liberar la proteína de las células al medio extracelular mediante extracción tal como lisis celular. Dicha alteración libera todo el contenido de la célula en el homogeneizado, y además produce fragmentos subcelulares que son difíciles de eliminar debido a su pequeño tamaño. Estos generalmente se eliminan por centrifugación diferencial o por filtración.

La lisis celular se realiza generalmente utilizando técnicas de alteración mecánica, tales como homogeneización o molienda con cabezal. Si bien la proteína de interés generalmente se libera de manera eficaz, dichas técnicas tienen varias desventajas (Engler, Protein Purification Process Engineering, Harrison eds., 37 55 (1994)). Los aumentos de temperatura, que a menudo ocurren durante el procesamiento, pueden provocar la inactivación de la proteína. Además, la suspensión resultante contiene un amplio espectro de proteínas contaminantes, ácidos nucleicos y polisacáridos. Los ácidos nucleicos y los polisacáridos aumentan la viscosidad de la solución, lo que puede complicar el procesamiento posterior por centrifugación, filtración de flujo cruzado o cromatografía. Las asociaciones complejas de estos contaminantes con la proteína de interés pueden complicar el proceso de purificación y dar como resultado rendimientos inaceptablemente bajos. Se describen métodos mejorados para la purificación de polipéptidos heterólogos a partir de caldo de fermentación microbiana u homogeneizado, como se describe, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos N.º 7.169.908.

Se hace énfasis en que los métodos de fermentación, recuperación y purificación descritos en este documento solo tienen fines ilustrativos. Los métodos de la presente invención pueden combinarse con cualquier proceso de fabricación desarrollado para la producción, recuperación y purificación de proteínas recombinantes.

2. Anticuerpos

Los métodos de la presente invención se usan para evitar la reducción de enlaces disulfuro intercatenarios y/o intracatenarios de anticuerpos anti-CD20 terapéuticos tales como anti-CD20 quiméricos "C2B8" como en la Patente de EE.UU. N.º 5.736.137 (RITUXAN®), una variante quimérica o humanizada del anticuerpo 2H7 como en la Patente de EE.UU. N.º 5.721.108B1, o Tositumomab (BEXXAR®).

Muchos de estos anticuerpos son muy utilizados en la práctica clínica para tratar diversas enfermedades, incluido el cáncer.

En determinadas realizaciones específicas, los métodos de la presente invención se utilizan para la producción de los siguientes anticuerpos.

Anticuerpos dirigidos contra CD20

- 5 Rituximab (RITUXAN®) es un anticuerpo monoclonal murino/humano quimérico modificado por ingeniería genética, dirigido contra el antígeno CD20. Rituximab es el anticuerpo denominado "C2B8" en la patente de Estados Unidos No. 5.736.137 expedida el 7 de abril de 1998 (Anderson et al.). Rituximab está indicado para el tratamiento de
- 10 pacientes con linfoma no hodgkiniano de células B, positivo a CD20, recurrente o resistente de grado bajo o folicular. Los estudios del mecanismo de acción *in vitro* han demostrado que rituximab se une al complemento humano y produce la lisis de líneas de células B linfoides a través de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) (Reff et al., *Blood* 83 (2): 435 - 445 (1994)). Además, tiene una actividad significativa en los ensayos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA). Más recientemente, se ha demostrado que rituximab tiene efectos antiproliferativos en ensayos de incorporación de timidina marcada con tritio e induce la apoptosis directamente, mientras que otros anticuerpos dirigidos contra CD19 y CD20 no (Maloney et al., *Blood* 88 (10): 637a
- 15 (1996). También se ha observado sinergia entre rituximab y quimioterapias y toxinas experimentalmente. En particular, rituximab sensibiliza las líneas celulares de linfoma de células B humanas resistentes a fármacos contra los efectos citotóxicos de doxorrubicina, CDDP, VP-16, toxina diftérica y ricina (Demidem et al., *Cancer Chemotherapy & Radiopharmaceuticals* 12 (3): 177 - 186 (1997)). Estudios preclínicos *in vivo* han demostrado que rituximab disminuye las células B de la sangre periférica, los ganglios linfáticos y la médula ósea de monos cinomolgos, presumiblemente a través de procesos mediados por el complemento y por células (Reff et al., *Blood* 83 (2): 435-445 (1994)).

- Las patentes y publicaciones de patente que se refieren a anticuerpos CD20 incluyen las patentes de Estados Unidos Nos. 5.776.456, 5.736.137, 6.399.061 y 5.843.439, así como las solicitudes de patente de Estados Unidos
- 25 Nos. US 2002 / 0197255A1, US 2003 / 0021781A1, US 2003/0082172 A1, US 2003/0095963 A1, US 2003/0147885 A1 (Anderson et al.); Patente de Estados Unidos No. 6.455.043B1 y documentos WO00/09160 (Grillo-Lopez, A.); WO00/27428 (Grillo-Lopez y White); WO00/27433 (Grillo-Lopez y Leonard); WO00/44788 (Braslawsky et al.); WO01/10462 (Rastetter, W.); WO01/10461 (Rastetter y White); WO01/10460 (White y Grillo-Lopez); las solicitudes de Estados Unidos Nos. US2002/0006404 y WO02/04021 (Hanna y Hariharan); Solicitud de Estados Unidos N° US2002/0012665 A1 y WO01 / 74388 (Hanna, N.); Solicitud de Estados Unidos N° US 2002/0058029 A1 (Hanna, N.); Solicitud de Estados Unidos N°. US 2003/0103971 A1 (Hariharan y Hanna); Solicitud de Estados Unidos No. US2002/0009444A1 y documentos WO01/80884 (Grillo-Lopez, A.); WO01/97858 (White, C.); Solicitud de Estados Unidos N° US2002/0128488A1 y WO02 / 34790 (Reff, M.); WO02/060955 (Braslawsky et al.); WO2/096948 (Braslawsky et al.); WO02/079255 (Reff y Davies); Patente de Estados Unidos No. 6.171.586B1 y documentos WO98/56418 (Lam et al.); WO98/58964 (Raju, S.); WO99/22764 (Raju, S.); WO99/51642, patentes de Estados Unidos N° 6.194.551B1, 6.242.195B1, 6.528.624B1 y 6.538.124 (Idusogie et al.); WO00 / 42072 (Presta, L.); WO00 / 67796 (Curd et al.); WO01 / 03734 (Grillo-Lopez y otros); la solicitud de Estados Unidos N° US 2002 / 0004587A1 y el documento WO01/77342 (Miller y Presta); Solicitud de Estados Unidos N° US2002 / 0197256 (Grewal, I.); Solicitud de Estados Unidos N° US 2003/0157108 A1 (Presta, L.); Patentes de Estados Unidos Nos. 6.090.365B1, 6.287.537B1, 6.015.542, 5.843.398 y 5.595.721, (Kaminski et al.); Patentes de Estados Unidos Nos. 5.500.362, 5.677.180, 5.721.108 y 6.120.767 (Robinson et al.); Patente de Estados Unidos No. 6.410.391B1 (Raubitschek et al.); Patente de Estados Unidos N° 6.224.866B1 y documentos WO00/20864 (Barbera-Guillem, E.); WO01/13945 (Barbera-Guillem, E.); WO00/67795 (Goldenberg); la solicitud de Estados Unidos No. US 2003/01339301 A1 y documentos WO00/74718 (Goldenberg y Hansen); WO00/76542 (Golay et al.); WO01/72333 (Wolin y Rosenblatt); la Patente de Estados Unidos N° 6.368.596B1 (Ghetie et al.); la Solicitud de Estados Unidos N° US2002 / 0041847 A1, (Goldenberg, D.); Solicitud de Estados Unidos N° US2003 / 0026801A1 (Weiner y Hartmann); WO02 / 102312 (Engleman, E.); la solicitud de patente de Estados Unidos N° 2003/0068664 (Albitar et al.); WO03/002607 (Leung, S.); documentos WO 03/049694 y US 2003/0185796 A1 (Wolin et al.); WO03/061694 (Sing y Siegall); US 2003/0219818 A1 (Bohen et al.); documentos US 2003/0219433 A1 y WO 03/068821 (Hansen et al.). Véase también, la patente de Estados Unidos No. 5.849.898 y la solicitud EP no. 330,191 (Seed et al.); la Patente de Estados Unidos No. 4.861.579 y el documento EP332.865A2 (Meyer y Weiss); la Patente de Estados Unidos No. 4.861.579 (Meyer et al.) y el documento WO95/03770 (Bhat et al.).

- Las publicaciones sobre la terapia con Rituximab incluyen: Perotta and Abuel "Response of chronic relapsing ITP of 10
- 55 years duration to Rituximab" Resumen n° 3360 *Blood* 10(1)(parte 1-2): p. 88B (1998); Stashi et al., "Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody treatment for adults with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura" *Blood* 98(4):952-957 (2001); Matthews, R. "Medical Heretics" *New Scientist* (7 Apr., 2001); Leandro et al., "Clinical outcome in 22 patients with rheumatoid arthritis treated with B lymphocyte depletion" *Ann Rheum Dis* 61:833-888 (2002); Leandro et al., "Lymphocyte depletion in rheumatoid arthritis: early evidence for safety, efficacy and dose response. *Arthritis & Rheumatism* 44(9): S370 (2001); Leandro et al., "An open study of B lymphocyte depletion in systemic lupus erythematosus", *Arthritis & Rheumatism* 46(1):2673-2677 (2002); Edwards and Cambridge "Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete B lymphocytes" *Rheumatology* 40:205-211 (2001); Edwards et al., "B lymphocyte depletion therapy in rheumatoid arthritis and other autoimmune disorders" *Biochem. Soc. Trans.* 30(4):824-828 (2002); Edwards et al., "Efficacy and safety of Rituximab, a B-cell targeted chimeric monoclonal antibody: A randomized, placebo controlled trial in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 46(9): S197 (2002); Levine and Pestronk "IgM antibody-related polyneuropathies: B-cell depletion chemotherapy using Rituximab" *Neurology* 52: 1701-1704 (1999); DeVita et al., "Efficacy of selective B cell blockade in the

treatment of rheumatoid arthritis" Arthritis & Rheumatism 46:2029-2033 (2002); Hidashida et al., "Treatment of DMARD-Refractory rheumatoid arthritis with rituximab." Presented at the Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology; October 24-29; Nueva Orleans, La. 2002; Tusciano, J. "Successful treatment of Infliximab-refractory rheumatoid arthritis with rituximab" Presented at the Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology; October 24-29; Nueva Orleans, La. 2002. Sarwal et al., N. Eng. J. Med. 349(2):125-138 (10 de julio de 2003) informa acerca de la heterogeneidad molecular en el rechazo de aloinjerto renal agudo identificado por perfil de micromatrices de ADN.

La divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos humanizados 2H7 dirigidos contra CD20. En realizaciones específicas, el anticuerpo 2H7 humanizado es un anticuerpo enumerado en la Tabla 2.

Tabla 2- Anticuerpo humanizado dirigido contra CD20 y sus variantes				
2H7	V _L	V _H	Cadena L completa	Cadena H completa
	SEQ ID NO.	SEQ ID NO.	SEQ ID NO.	SEQ ID NO.
A	1	2	6	7
B	1	2	6	8
C	3	4	9	10
D	3	4	9	11
F	3	4	9	12
G	3	4	9	13
H	3	5	9	14
I	1	2	6	15

Cada una de las variantes de anticuerpo A, B e I de la Tabla 2 comprende la secuencia variable de cadena ligera (V_L):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNL
ASGVPSRFSGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQGTKVEIKR (SEQ
ID NO:1); y

la secuencia variable de cadena pesada (V_H):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGA
IYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSY
WYFDVWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:2).

Cada una de las variantes de anticuerpo C, D, F y G de la Tabla 2 comprende la secuencia variable de cadena ligera (V_L):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNL
ASGVPSRFSGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGTKVEIKR (SEQ
ID NO:3), y

la secuencia variable de cadena pesada (V_H):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGA
IYPGNGATSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYASYSY
WYFDVWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:4).

La variante de anticuerpo H de la Tabla 2 comprende la secuencia variable de cadena ligera (V_L) de SEQ ID NO: 3 (anterior) y la secuencia variable de cadena pesada (V_H):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGA
IYPGNGATSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSYRY
WYFDVWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:5)

Cada una de las variantes de anticuerpo A, B e I de la Tabla 2 comprende la secuencia de cadena ligera de longitud completa:

5 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNL
ASGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQGTKVEIKRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:6).

La variante A de la Tabla 2 comprende la secuencia de cadena pesada de longitud completa:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGA
IYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSY
WYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
10 SLSLSPGK (SEQ ID NO:7).

La variante B de la Tabla 2 comprende la secuencia de cadena pesada de longitud completa:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGA
IYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSY
WYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
15 KSLSLSPGK (SEQ ID NO:8).

La variante I de la Tabla 2 comprende la secuencia de cadena pesada de longitud completa:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGA
IYPGNGDTSYNQKFGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYNSY
WYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
AALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK (SEQ ID NO:15).

- 5 Cada una de las variantes de anticuerpo C, D, F, G y H de la Tabla 2 comprende la secuencia de cadena ligera de longitud completa:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNL
ASGVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGTKVEIKRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:9).

- 10 La variante C de la Tabla 2 comprende la secuencia de cadena pesada de longitud completa:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGA
IYPGNGATSYNQKFGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYASAY
WYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK (SEQ ID NO:10).

La variante D de la Tabla 2 comprende la secuencia de cadena pesada de longitud completa:

15

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGA
IYPGNGATSYNQKFGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYASAY
WYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSN
KALPAPIEATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK (SEQ ID NO:11).

La variante F de la Tabla 2 comprende la secuencia de cadena pesada de longitud completa:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGA
IYPGNGATSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYYSASY
WYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
AALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK (SEQ ID NO:12).

La variante G de la Tabla 2 comprende la secuencia de cadena pesada de longitud completa:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGA
IYPGNGATSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYYSASY
WYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
AALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHWHYTQ
KSLSLSPGK (SEQ ID NO:13).

La variante H de la Tabla 2 comprende la secuencia de cadena pesada de longitud completa:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGA
IYPGNGATSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYYSRY
WYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
AALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK (SEQ ID NO:14).

En determinadas realizaciones, el anticuerpo 2H7 humanizado de la invención comprende adicionalmente alteraciones de aminoácidos en la región Fc de IgG y muestra afinidad de unión aumentada por el FcRn humano sobre un anticuerpo que tiene la región Fc de IgG de tipo silvestre, al menos 60 veces, al menos 70 veces, al menos

80 veces, más preferiblemente al menos 100 veces, preferiblemente al menos 125 veces, incluso más preferiblemente al menos de 150 veces a aproximadamente 170 veces.

El sitio de N-glicosilación en IgG está en Asn297 en el dominio C_H2. Las composiciones de anticuerpo 2H7 humanizado de la presente invención incluyen composiciones de cualquiera de los anticuerpos 2H7 humanizados precedentes que tienen una región Fc, donde aproximadamente 80-100 % (y preferiblemente aproximadamente 90-99 %) del anticuerpo en la composición comprende una estructura de hidrato de carbono núcleo madura que carece de fucosa, unida a la región Fc de la glucoproteína. En la presente memoria, se demostró que dichas composiciones mostraban una mejora sorprendente en la unión a Fc(RIIIA (F158), que no era tan eficaz como Fc(RIIIA (V158) en la interacción con la IgG humana. Fc(RIIIA (F158) es más común que Fc(RIIIA (V158) en afroamericanos y caucásicos normales y saludables. Véase Lehrnbecher et al., *Blood* 94: 4220 (1999). Históricamente, los anticuerpos producidos en las células de ovario de hámster chino (CHO), una de las células hospedadoras industriales más habitualmente utilizadas, contienen aproximadamente de 2 a 6 % en la población que no está fucosilada. Sin embargo, YB2/0 y Lec13, pueden producir anticuerpos con 78 a 98 % de especies no fucosiladas. Shinkawa et al., *J. Bio. Chem.* 278 (5), 3466-347 (2003), comunicaron que los anticuerpos producidos en células YB2/0 y Lec13, que tenían menos actividad FUT8, mostraban una actividad de CCDA significativamente incrementada *in vitro*. La producción de anticuerpos con contenido de fucosa reducido también se describe, por ejemplo, en Li et al., (GlycoFi) "Optimization of humanized IgGs in glycoengineered *Pichia pastoris*" in Nature Biology publication en línea del 22 de enero de 2006; Niwa R. et al., *Cancer Res.* 64(6):2127-2133 (2004); en los documentos US 2003/0157108 (Presta); US 6.602.684 y US 2003/0175884 (Glycart Biotechnology); US 2004/0093621, US 2004/0110704, US 2004/0132140 (todos de Kyowa Hakko Kogyo).

Un anticuerpo 2H7 humanizado biespecífico incluye un anticuerpo en el que un brazo del anticuerpo tiene al menos la región de unión a antígeno de la cadena H y/o L de un anticuerpo 2H7 humanizado de la invención, y el otro brazo tiene especificidad de unión en la región V por un segundo antígeno. En realizaciones específicas, el segundo antígeno se selecciona del grupo que consiste en CD3, CD64, CD32A, CD16, NKG2D u otros ligandos activadores de NK.

Anticuerpos dirigidos contra HER2

Una versión humanizada recombinante del anticuerpo 4D5 de HER2 murino (huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, trastuzumab o HERCEPTIN®, patente de los Estados Unidos N° 5.821.337) es clínicamente activa en pacientes con cánceres de mama metastásicos que sobreexpresan HER2 y que han recibido terapia previa prolongada contra el cáncer (Baselga et al., *J. Clin. Oncol.*, 14: 737 - 744 (1996)). Trastuzumab recibió la aprobación de comercialización de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) el 25 de septiembre de 1998 para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico cuyos tumores sobreexpresan la proteína HER2. En noviembre de 2006, la FDA aprobó Herceptin como parte de un régimen de tratamiento que contiene doxorubicina, ciclofosfamida y paclitaxel, para el tratamiento complementario de pacientes que padecen cáncer de mama con afectación ganglionar, positivos a HER2.

En una realización, el anticuerpo dirigido contra HER2 comprende las siguientes secuencias de dominio V_L y V_H:

anticuerpo humanizado 2C4 versión 574 V_L

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSAS

YRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGGGTKVEIK.

y anticuerpo humanizado 2C4 versión 574 V_H

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMWDWRQAPGKGLEWVA

DVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSF

YFDYWGGGTLVTVSS.

En otra realización, el anticuerpo dirigido contra HER2 comprende las secuencias de dominio V_L (SEQ ID NO: 18) y V_H (SEQ ID NO: 19) de trastuzumab como se muestra en las Figuras 21 y 22, respectivamente.

En Tagliabue et al., *Int. J. Cancer* 47: 933 - 937 (1991); McKenzie et al., *Oncogene* 4: 543 - 548 (1989); Maier y otros, *Cancer Res.* 51: 5361 - 5369 (1991); Bacus et al., *Molecular Carcinogenesis* 3: 350 - 362 (1990); Stancovski et al., *PNAS (USA)* 88: 8691 - 8695 (1991); Bacus et al., *Cancer Research* 52: 2580 - 2589 (1992); Xu et al., *Int. J. Cancer* 53: 401 - 408 (1993); documento WO94/00136; Kasprzyk et al., *Cancer Research* 52: 2771 - 2776 (1992); Hancock et al., *Cancer Res.* 51: 4575 - 4580 (1991); Shawver et al., *Cancer Res.* 54: 1367 - 1373 (1994); Arteaga et al., *Cancer Res.* 54: 3758 - 3765 (1994); Harwerth et al., *J. Biol. Chem.* 267: 15160 - 15167

(1992); en la patente de Estados Unidos No. 5.783.186; y Klapper et al., *Oncogene* 14: 2099 - 2109 (1997), se han descrito otros anticuerpos dirigidos contra HER2 con diversas propiedades.

Anticuerpos dirigidos contra VEGF

5

Los anticuerpos dirigidos contra VEGF pueden comprender, por ejemplo, las siguientes secuencias:

En una realización, el anticuerpo dirigido contra VEGF comprende la siguiente secuencia V_L (SEQ ID NO:20):

DIQMTQTTSS LSASLGDRVI ISCSASQDIS NYLNWYQQKP DGTVKVLIYF
TSSLHSGVPS RFSGSGSGTD YSLTISNLEP EDIATYYCQQ YSTVPWTFGG

10

GTKLEIKR; y
la siguiente secuencia V_H (SEQ ID NO: 21):

EIQLVQSGPE LKQPGETVRI SCKASGYTFT NYGMNWVKQA
PGKGLKWMGW INTYTGEPTY AADFKRRFTF SLETSASTAY
LQISNLKNDD TATYFCAKYP HYYGSSHWFY DVWGAGTTVT VSS.

15

En otra realización, el anticuerpo dirigido contra VEGF comprende la siguiente secuencia V_L (SEQ ID NO: 22):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASQDIS NYLNWYQQKP
GKAPKVLIIYF TSSLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ
YSTVPWTFGQ GTKVEIKR;y

20

la siguiente secuencia V_H (SEQ ID NO:23):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFT NYGMNWVRQA
PGKGLEWVGW INTYTGEPTY AADFKRRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAED
TAVYYCAKYP HYYGSSHWFY DVWGQGTLVT VSS.

25

En una tercera realización, el anticuerpo dirigido contra VEGF comprende la siguiente secuencia V_L (SEQ ID NO:24)

DIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKVLIIYF
TSSLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQ
GTKVEIKR;y

la siguiente secuencia V_H (SEQ ID NO:25):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYDFT HYGMNWVRQA
PGKGLEWVGW INTYTGEPTY AADFKRRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAED
TAVYYCAKYP YYYGTSHWFY DVWGQGTLVT VSS.

30

Anticuerpos contra CD11a

El anticuerpo humanizado dirigido contra CD11a efalizumab o Raptiva® (Patente de Estados Unidos N° 6.037.454) recibió la aprobación de comercialización de la Administración de Alimentos y Medicamentos el 27 de octubre de 2003 para el tratamiento del tratamiento de la psoriasis. Una realización proporciona un anticuerpo dirigido contra CD11a humano que comprende las siguientes secuencias V_L y V_H de HuMHM24:

35

V_L (SEQ ID NO: 26):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKTISKYLA WYQQKPGKAPKLLIYSGST
LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHNEYPLTFGQGTKVEIKR;

^y
V_H (SEQ ID NO: 27):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGHWMNWVRQAPGKGLEWVG
MIHPDSETRYNQKFKDRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGIYFYGTT
5 YFDYWGQGTLVTVSS.

El anticuerpo dirigido contra CD11a humano puede comprender la V_H de SEQ ID NO: 27 y la cadena L de longitud completa de HuMHM24 que tiene la secuencia de:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKTISKYLA WYQQKPGKAPKLLIYS
GSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHNEYPLTFGQ
GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG
LSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:28),

10 o

la cadena L anterior teniendo la cadena H la secuencia de:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGHWMNWVRQAPGKGLEWVG
M
IHPSDSETRYNQKFKDRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGI
YFYGTTYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP
VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K (SEQ ID NO:29).

15

De acuerdo con la presente divulgación, también pueden producirse anticuerpos dirigidos contra el receptor DR5 (contra DR5). Dichos anticuerpos dirigidos contra DR5 incluyen específicamente todas las variantes de anticuerpos desveladas en la Publicación PCT N° WO 2006/083971, tales como los anticuerpos dirigidos contra DR5 denominados Apomab 1.1, 2.1, 3.1, 4.1, 5.1, 5.2, 5.3, 6.1, 6.2, 6.3, 7.1, 7.2, 7.3, 8.1, 8.3, 9.1, 1.2, 2.2, 3.2, 5.2, 5.2, 6.2, 7.2, 8.2, 9.2, 1.3, 2.2, 3.3, 4.3, 5.3, 6.3, 7.3, 8.3, 9.3 y 25.3, especialmente Apomab 8.3 y Apomab 7.3, preferiblemente Apomab 7.3.

20

3. Otras proteínas que contienen disulfuro

25

Además de los anticuerpos, los métodos de la presente divulgación encuentran utilidad en la fabricación de otros polipéptidos que incluyen enlaces disulfuro. Los ejemplos representativos de dichos polipéptidos incluyen, sin limitación, las siguientes proteínas terapéuticas: activadores de plasminógeno tisular (t-PA), tales como activador de

plasminógeno tisular humano (htPA, alteplasa, ACTUVASE®), un agente trombolítico para el tratamiento de infarto de miocardio; una TNKase™, una variante de ht-PA con semivida prolongada y especificidad por fibrina para administración de bolo único; hormona de crecimiento humano recombinante (rhGH, somatropina, NUTROPIN®, PROTROPIN®) para el tratamiento de la deficiencia de la hormona del crecimiento en niños y adultos; y desoxirribonucleasa I (DNasa I) humana recombinante para el tratamiento de la fibrosis quística (FQ).

Como ejemplos de proteínas que contienen disulfuro, importantes desde el punto de vista biológico, se incluyen la hormona de crecimiento, incluyendo la hormona de crecimiento humana y la hormona de crecimiento bovina; factor liberador de la hormona de crecimiento; hormona paratiroidea; hormona estimulante del tiroides; lipoproteínas; alfa-1 antitripsina; cadena A de insulina; cadena B de insulina; proinsulina; hormona estimulante del folículo; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación, tales como factor VIIIC, factor IX, factor tisular y factor de von Willebrand; factores de anticoagulación, tales como Proteína C; factor natriurético auricular; tensioactivo pulmonar; un activador de plasminógeno, tal como urocinasa u orina humana o activador de plasminógeno de tipo tisular (t-PA); bombesina; trombina; factor de crecimiento hematopoyético; factor alfa y beta de necrosis tumoral; encefalinasa; RANTES (citocina expresada y secretada por el linfocito T normal en función de su grado de activación); proteína inflamatoria de macrófagos humana (MIP-1-alfa); una albúmina de suero, tal como albúmina de suero humano; sustancia inhibidora mulleriana; cadena A de relaxina; cadena B de relaxina; prorelaxina; péptido asociado a gonadotropina de ratón; una proteína microbiana, tal como beta-lactamasa; DNasa; IgE; un antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA), tal como CTLA-4; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores de hormonas o de factores de crecimiento; Proteína A o D; factores reumatoideos; un factor neurotrófico, tal como factor neurotrófico derivado de hueso (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5 o -6 (NT-3, NT-4, NT-5 o NT-6), o un factor de crecimiento nervioso, tal como NGF-β; factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblastos, tal como aFGF y bFGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento transformante (TGF), tal como TGF-alfa y TGF-beta, incluidos TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, TGF-β4 o TGF-β5; factor de crecimiento insulínico I y II (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral), proteínas que se unen al factor de crecimiento insulínico; proteínas CD, tales como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD34 y CD40; eritropoyetina; factores osteoinductores; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón, tal como interferón-alfa, -beta y -gamma; factores estimulantes de colonias (CSF), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleucinas (IL), por ejemplo, IL-1 a IL-10; superóxido dismutasa; receptores de linfocitos T; proteínas de membrana superficial; factor acelerador de la descomposición; antígeno vírico, tal como, por ejemplo, un parte de la envoltura del virus del SIDA; proteínas transportadoras; receptores de asentamiento (*homing*); adesinas; proteínas reguladoras; integrinas, tales como CD11a, CD11b, CD11c, CD18, un ICAM, VLA-4 y VCAM; un antígeno asociado a tumor, tal como receptor HER2, HER3 o HER4; y fragmentos de cualquiera de los polipéptidos enumerados anteriormente;

4. Métodos generales para la producción recombinante de anticuerpos

Los anticuerpos y otras proteínas recombinantes de la presente memoria pueden producirse mediante técnicas de tecnología de ADN recombinante bien conocidas. Por lo tanto, aparte de los anticuerpos identificados específicamente en líneas anteriores, el experto en la técnica podría generar anticuerpos dirigidos contra un antígeno de interés, por ejemplo, utilizando las técnicas descritas a continuación.

Selección y preparación de antígenos

El anticuerpo de la presente memoria está dirigido contra un antígeno de interés. Preferiblemente, el antígeno es un polipéptido importante desde el punto de vista biológico y su administración a un mamífero que padece una enfermedad o trastorno puede dar como resultado un beneficio terapéutico en ese mamífero. Sin embargo, también se contemplan anticuerpos dirigidos contra antígenos no polipeptídicos (tales como antígenos glucolipídicos asociados a tumores, véase la Patente de Estados Unidos N° 5.091.178). Cuando el antígeno es un polipéptido, este puede ser una molécula transmembrana (por ejemplo, un receptor) o un ligando, tal como un factor de crecimiento. Como ejemplos de antígenos se incluyen las proteínas descritas en la sección (3) más adelante. Como ejemplos de dianas moleculares para anticuerpos comprendidas en la presente invención se incluyen proteínas CD tales como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD22, CD34, CD40; miembros de la familia de receptores de ErbB tales como el receptor de EGF, el receptor HER2, HER3 o HER4; moléculas de adhesión celular tales como LFA-1, Mac1, p150,95, VLA-4, ICAM-1, VCAM e integrina α₄β₇, incluyendo cualquiera de sus subunidades α o β (por ejemplo, anticuerpos dirigidos contra CD11a, contra CD18 o contra CD11b); factores de crecimiento tales como VEGF; IgE; antígenos de grupo sanguíneo; receptor de flk2/flt3; receptor de obesidad (OB); receptor de *mpt*; CTLA-4; proteína C, o cualquiera de los otros antígenos mencionados en la presente memoria. Los antígenos a los que se unen los anticuerpos enumerados anteriormente se incluyen específicamente dentro del alcance de esta memoria.

Los antígenos solubles o fragmentos de los mismos, opcionalmente conjugados con otras moléculas, pueden utilizarse como inmunógenos para generar anticuerpos. Para moléculas transmembrana, tales como receptores, pueden utilizarse fragmentos de estos (por ejemplo, el dominio extracelular de un receptor) como inmunógeno. Como alternativa, las células que expresan la molécula transmembrana pueden utilizarse como inmunógeno. Dichas células pueden proceder de una fuente natural (por ejemplo, de líneas de células de cáncer) o pueden ser células que se han transformado por técnicas recombinantes para expresar la molécula transmembrana.

Para los expertos en la técnica, serán obvios otros antígenos y formas de los mismos, útiles para preparar anticuerpos.

5 *Anticuerpos policlonales*

Los anticuerpos policlonales se generan preferiblemente en animales mediante inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) múltiples del antígeno relevante y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno con una proteína que sea inmunogénica en la especie a inmunizar, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja, utilizando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzil sulfosuccinimida (conjugación a través de restos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de restos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 , o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, siendo R y R^1 grupos alquilo diferentes.

Los animales se inmunizan contra el antígeno, conjugados inmunogénicos o derivados, combinando, por ejemplo, 100 μg o 5 μg de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la solución por vía intradérmica en múltiples sitios. Un mes después, los animales reciben un refuerzo de 1/5 a 1/10 de la cantidad original de antígeno o conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en sitios múltiples. De siete a catorce días después, se extrae sangre de los animales y el suero se analiza para determinar el título de anticuerpos. Los animales reciben un refuerzo hasta obtener un título estable. Preferiblemente, el animal recibe un refuerzo del conjugado del mismo antígeno, pero se conjuga con una proteína diferente y/o a través de un reactivo de entrecruzamiento diferente. Los conjugados también pueden prepararse en cultivos de células recombinantes como fusiones de proteínas. Para potenciar la respuesta inmunitaria, también se utilizan adecuadamente agentes agregantes, tales como alumbre.

25 *Anticuerpos monoclonales*

Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse utilizando el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., *Nature*, 256: 495 (1975), o pueden prepararse por métodos de ADN recombinante (Patente de Estados Unidos N° 4.816.567).

En el método de hibridoma, se inmuniza un ratón u otro animal hospedador apropiado, tal como un hámster o un macaco, como se describió anteriormente para suscitar linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína utilizada para la inmunización. Como alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Después, los linfocitos se fusionan con células de mieloma utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Coding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, págs. 59 - 103 (Academic Press, 1986)).

Las células de hibridoma preparadas de esta manera, se siembran y se dejan crecer en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá generalmente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), sustancias que impiden el crecimiento de células con déficit de HGPRT.

Las células de mieloma preferidas son aquellas que se fusionan de manera eficaz, soportan una producción estable a alto nivel de anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Entre estas, las líneas celulares de mieloma preferidas son líneas de mieloma murino, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, Estados Unidos y células SP-2 o X63-Ag8 -653 disponibles en la American Type Culture Collection, Rockville, Md. Estados Unidos. También se han descrito líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-ser humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

El medio de cultivo en el que crecen las células de hibridoma se somete a ensayo para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferiblemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina por inmunoprecipitación o a través de un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones pueden subclonarse mediante procedimientos de dilución limitante y hacer que crezcan a través de métodos convencionales (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, págs. 59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para esta finalidad incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden crecer *in vivo* en un animal como tumores de ascitis.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo,

líquido de ascitis o suero por procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales, tales como, por ejemplo, cromatografía con Proteína A-Sefarosa, cromatografía de hidroxipatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad. Preferiblemente, se utiliza el procedimiento de cromatografía con Proteína A descrito en este documento.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y secuencia fácilmente utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos monoclonales). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que después se transfectan en células hospedadoras, tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otro modo no producen proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes.

El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante de los dominios constantes de cadena pesada y ligera humana en lugar de las secuencias murinas homólogas (Patente de Estados Unidos N° 4.816.567, Morrison, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851 (1984)), o a través de unión covalente de la secuencia codificante de inmunoglobulina con toda o parte de la secuencia codificante de un polipéptido no inmunoglobulínico.

Generalmente, dichos polipéptidos no inmunoglobulínicos se sustituyen por los dominios constantes de un anticuerpo, o se sustituyen por los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad por un antígeno diferente.

En una realización adicional, se pueden aislar anticuerpos monoclonales de fagotecas de anticuerpos generadas utilizando las técnicas descritas en McCafferty et al., *Nature*, 348: 552-554 (1990). Clackson et al., *Nature*, 352: 624 - 628 (1991) y Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, utilizando fagotecas. Publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo nM) por combinación de cadenas (Marks et al., *Bio / Technology*, 10: 779-783 (1992)), así como infección combinatoria y recombinación *in vivo* como estrategia para construir fagotecas muy grandes (Waterhouse et al., *Nuc. Acids. Res.*, 21: 2265 - 2226 (1993)). Por lo tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas tradicionales de hibridoma para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

Anticuerpos humanizados y humanos

Un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en él a partir de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos a menudo se denominan restos de "importación", que generalmente se toman de un dominio variable de "importación". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al., *Nature*, 321: 522 - 525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332: 323 - 327 (1988); Verhoeyen et al., *Science* 239: 1534-1536 (1988)), sustituyendo secuencias de CDR de roedor o secuencias de CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos N° 4.816.567) en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son generalmente anticuerpos humanos en los que algunos restos de CDR y posiblemente algunos restos de FR están sustituidos por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

La elección de dominios variables humanos, de cadena tanto ligera como pesada, que se utilizarán para producir los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el método denominado de "mejor ajuste", la selección de la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se explora frente a toda la biblioteca de secuencias conocidas de dominio variable humano. La secuencia humana que está más cerca de la del roedor se acepta entonces como la FR humana para el anticuerpo humanizado (Sims et al., *J. Immunol.*, 151: 2296 (1993)). Otro método utiliza una región marco conservada particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. Puede utilizarse la misma región marco conservada para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.*, 151: 2623 (1993)).

Es importante además, que los anticuerpos se humanicen conservando la alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, de acuerdo con un método preferido, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están comúnmente disponibles y son familiares para los expertos en la técnica. Se dispone de programas informáticos que ilustran y presentan probables estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite analizar el posible papel de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina

candidata para unirse a su antígeno. De esta forma, pueden seleccionarse y combinarse restos de la región marco conservada (FR, *framework*) desde el receptor e importar secuencias de manera que se obtenga la característica de anticuerpo deseada, tal como una mayor afinidad por el (los) antígeno (s) diana. En general, los restos de CDR están directa y más sustancialmente implicados en ejercer influencia en la unión con el antígeno.

Como alternativa, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que sean capaces, después de la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos sin la producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigota del gen de la región de unión de la cadena pesada del anticuerpo (J_H) en ratones mutantes quiméricos y de línea germinal, da como resultado la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia del conjunto de genes de inmunoglobulina de línea germinal humana en dichos ratones mutantes de línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362: 255 - 258 (1993); Bruggermann et al., *Year in Immuno*, 7:33 (1993); y Duchosal et al., *Nature* 355: 258 (1992). Los anticuerpos humanos también pueden proceder de bibliotecas de presentación en fagos (Hoogenboom et al., *J. Mol. Biol.*, 227: 381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), Vaughan et al., *Nature Biotech* 14: 309 (1996)).

Fragmentos de anticuerpo

Para la producción de fragmentos de anticuerpo se han desarrollado diversas técnicas. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtuvieron a través de digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24: 107-117 (1992) y Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985)). Sin embargo, ahora estos fragmentos pueden producirse directamente a través de células hospedadoras recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo pueden aislarse de las bibliotecas de fagos de anticuerpos mencionadas anteriormente. Como alternativa, fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos $F(ab')_2$ (Carter et al., *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992)). Según otro enfoque, los fragmentos $F(ab')_2$ pueden aislarse directamente del cultivo de células hospedadoras recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán obvias para el experto en la técnica. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv monocatenario (scFv) (véase el documento WO 93/16185).

Anticuerpos multiespecíficos

Los anticuerpos multiespecíficos tienen especificidades de unión por al menos dos antígenos diferentes. Si bien dichas moléculas normalmente se unirán solo a dos antígenos (es decir, anticuerpos biespecíficos, BsAbs), los anticuerpos con especificidades adicionales, tales como anticuerpos triespecíficos, están incluidos en esta expresión cuando se utilizan en este documento.

En la técnica se conocen métodos para producir anticuerpos biespecíficos. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena ligera-cadena pesada de inmunoglobulina, teniendo las dos cadenas especificidades diferentes (Millstein et al., *Nature*, 305: 537-539 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una posible mezcla de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que generalmente se realiza por cromatografía de afinidad, es bastante laboriosa y los rendimientos del producto son bajos. En el documento WO 93/08829 y en Traunecker et al., *EMBO J.*, 10: 3655 - 3659 (1991), se describen procedimientos similares.

De acuerdo con otro enfoque descrito en el documento WO96 / 27011, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo puede diseñarse para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La interfaz preferida comprende al menos una parte del dominio C_H3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias del mismo tamaño o de tamaño similar a la (s) cadena (s) lateral (es) grande (s) en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando cadenas laterales de aminoácidos grandes por cadenas más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero frente a otros productos finales no deseados tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos entrecruzados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse a avidina y el otro a biotina. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmunitario a células no deseadas (Patente de Estados Unidos N° 4.676.980), y para el tratamiento de la infección por VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden prepararse utilizando cualquier método de entrecruzamiento conveniente. Los agentes de entrecruzamiento adecuados son muy conocidos en la técnica, y se describen en la patente de Estados Unidos N° 4.676.980, junto con varias técnicas de entrecruzamiento.

En la bibliografía también, se han descrito técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de

anticuerpo. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos biespecíficos utilizando un enlace químico. Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos $F(ab')_2$. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditiol, arsenito sódico, para estabilizar ditioles próximos e impedir la formación de disulfuros intermoleculares. Los fragmentos Fab' generados se convierten a continuación en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab' -TNB se reconvierte a continuación en Fab' -tiol por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab' -TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden utilizarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

El progreso reciente ha facilitado la recuperación directa de los fragmentos Fab' -SH de *E. coli*, que pueden acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby et al., *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de anticuerpo $F(ab')_2$ biespecífico completamente humanizado. Cada fragmento Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico así formado fue capaz de unirse a células que sobreexpresaban el receptor de ErbB2 y linfocitos T humanos normales, así como de desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumor mamario humano.

También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpo biespecíficos directamente del cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos utilizando cremalleras de leucina. Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148 (5): 1547 - 1553 (1992). Los péptidos de cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las partes Fab' de dos anticuerpos diferentes por fusión génica. Los homodímeros de anticuerpos se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y después volvieron a oxidarse para formar los heterodímeros de anticuerpos. Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpos. La tecnología de "diacuerpo", descrita por Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos*, 90: 6444-6448 (1993), ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) por un enlazador que es suficientemente corto como para permitir que se efectúe el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios V_H y V_L de un fragmento se ven obligados a emparejarse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando así dos sitios de unión con el antígeno. También se ha descrito otra estrategia para fabricar fragmentos de anticuerpo biespecíficos utilizando dímeros de Fv monocatenario (sFv). Véase Gruber et al., *J. Immunol.*, 152: 5368 (1994). Como alternativa, los anticuerpos pueden ser "anticuerpos lineales" como se describe en Zapata et al., *Protein Eng.* 8 (10): 1057 - 1062 (1995). Brevemente, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos Fd en tándem (V_H - C_H 1- V_H - C_H 1) que forman un par de regiones de unión a antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

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

Inmunoadhesinas

El diseño más sencillo y directo de inmunoadhesinas combina el (los) dominio (s) de unión de la adhesina (por ejemplo, el dominio extracelular (DEC) de un receptor) con las regiones bisagra y Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina. Normalmente, cuando se preparan las inmunoadhesinas de la presente invención, el ácido nucleico que codifica el dominio de unión de la adhesina se fusionará en el extremo C terminal con el ácido nucleico que codifica el extremo N de una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina, sin embargo, también son posibles las fusiones en el extremo N terminal.

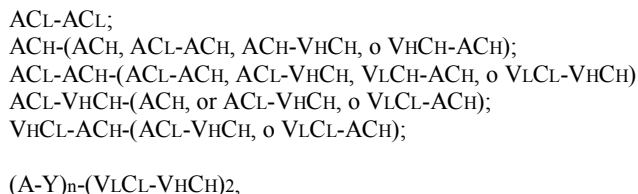
Generalmente, en dichas fusiones, el polipéptido quimérico codificado conservará al menos los dominios bisagra, C_H2 y C_H3 de la región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina, funcionalmente activos. Las fusiones también se realizan en el extremo C de la parte Fc de un dominio constante, o inmediatamente en el extremo N terminal del dominio C_H1 de la cadena pesada o de la región correspondiente de la cadena ligera. El sitio exacto en el que se realiza la fusión no es crítico; se conocen bien sitios particulares y pueden seleccionarse para optimizar la actividad biológica, la secreción o las características de unión de la inmunoadhesina.

En una realización preferida, la secuencia de adhesina se fusiona con el extremo N terminal del dominio Fc de la inmunoglobulina G_1 (IgG₁). Es posible fusionar toda la región constante de la cadena pesada con la secuencia de adhesina. Sin embargo, más preferiblemente, en la fusión se utiliza una secuencia que comienza en la región bisagra, justo aguas arriba del sitio de escisión de papaína que define la IgG Fc químicamente (es decir, el resto 216, tomando el primer resto de la región constante de cadena pesada como 114), o sitios análogos de otras inmunoglobulinas. En una realización particularmente preferida, la secuencia de aminoácidos de adhesina se fusiona con (a) la región de bisagra y los dominios C_H2 y C_H3 o (b) el dominio C_H1 , la bisagra, los dominios C_H2 y C_H3 , de una cadena pesada de IgG.

Para inmunoadhesinas biespecíficas, las inmunoadhesinas se ensamblan como multímeros, y particularmente como heterodímeros o heterotetrámeros. En general, estas inmunoglobulinas ensambladas tendrán estructuras unitarias

conocidas. Una unidad estructural básica de cuatro cadenas es la forma en la que existen la IgG, IgD e IgE. En las inmunoglobulinas de mayor peso molecular se repite una unidad de cuatro cadenas; la IgM generalmente existe como un pentámero de cuatro unidades básicas sujetas entre sí por enlaces disulfuro. La globulina IgA, y ocasionalmente la globulina IgG, también pueden existir en forma multimérica en el suero. En el caso del multímero, cada una de las cuatro unidades puede ser igual o diferente.

A continuación se presenta un diagrama esquemático de diversos ejemplos de inmunoadhesinas ensambladas incluidas en esta memoria:



donde cada A representa secuencias de aminoácidos de adhesina idénticas o diferentes;

V_L es un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina;

V_H es un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina;

C_L es un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina;

C_H es un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina;

n es un número entero mayor que 1;

Y indica el resto de un agente de entrecruzamiento covalente.

Para resumir, las estructuras anteriores solo muestran características clave; no indican la unión (*J, joining*) u otros dominios de las inmunoglobulinas, ni se muestran los enlaces disulfuro. Sin embargo, cuando dichos dominios se requieren para la actividad de unión, se construirán para estar presentes en las ubicaciones normales que ocupan en las moléculas de inmunoglobulina.

Como alternativa, las secuencias de adhesina pueden insertarse entre secuencias de cadena pesada y cadena ligera de inmunoglobulina, de manera que se obtiene una inmunoglobulina que comprende una cadena pesada quimérica. En esta realización, las secuencias de adhesina se fusionan con el extremo 3' de una cadena pesada de inmunoglobulina en cada brazo de una inmunoglobulina, bien entre la bisagra y el dominio C_{H2} , o entre los dominios C_{H2} y C_{H3} . Hoogenboom, et al., Mol. Immunol. 28: 1027 - 1037 (1991) han descrito construcciones similares.

Aunque en las inmunoadhesinas de la presente invención no se requiere la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina, una cadena ligera de inmunoglobulina podría estar asociada covalentemente a un polipéptido de fusión de cadena pesada de adhesina-inmunoglobulina, o estar fusionada directamente a la adhesina. En el primer caso, el ADN que codifica una cadena ligera de inmunoglobulina generalmente se coexpresa con el ADN que codifica la proteína de fusión de cadena pesada de adhesina-inmunoglobulina. Tras la secreción, la cadena pesada y la cadena ligera híbrida se asociarán covalentemente para proporcionar una estructura de tipo inmunoglobulina que comprende dos pares de cadena ligera-cadena pesada de inmunoglobulina unida a disulfuro. Por ejemplo, en la patente de Estados Unidos No. 4.816.567, expedida el 28 de marzo de 1989, se describen métodos de preparación adecuados de dichas estructuras.

Las inmunoadhesinas se construyen más convenientemente fusionando la secuencia de ADNc que codifica la parte de adhesina en fase con una secuencia de ADNc de inmunoglobulina. Sin embargo, también puede utilizarse la fusión con fragmentos de inmunoglobulina genómica (véase, por ejemplo, Aruffo et al., Cell 61: 1303 - 1313 (1990); y Stamenkovic et al., Cell 66: 1133 - 1144 (1991)). El último tipo de fusión requiere la presencia de secuencias reguladoras de Ig para la expresión. Los ADNc que codifican regiones constantes de cadena pesada de IgG pueden aislarse basándose en secuencias publicadas de bibliotecas de ADNc procedentes de linfocitos de bazo o de sangre periférica, por hibridación o por técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los ADNc que codifican la "adhesina" y las partes de inmunoglobulina de la inmunoadhesina se insertan en tándem en un vector plasmídico que dirige la expresión eficiente en las células hospedadoras elegidas.

Los siguientes ejemplos se ofrecen solo con fines ilustrativos, y de ninguna manera pretenden limitar el alcance de la presente invención.

Ejemplos

Salvo que se indique lo contrario, los reactivos disponibles en el comercio a los que se hace referencia en los ejemplos, se utilizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La procedencia de esas células identificadas en los siguientes ejemplos, y a lo largo de la memoria descriptiva, se corresponde con los números de referencia de la ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, Virginia.

Ejemplo 1Descripción de materiales y métodos

5

En los ejemplos 2-8 indicados a continuación se utilizaron los siguientes materiales y métodos.

Materiales

Los materiales y dispositivos utilizados en los experimentos descritos en los ejemplos experimentales incluyen:

10 viales de acero inoxidable (minitanques, Flow Components, Dublin, Calif., pequeños (50 cc) y grandes (55 cc)); tubos de diálisis (Spectra/Por, MWCO 6-8000, cat. n° 132645), filtro de 0,22 µm (Millipore Millipak Gamma Gold cat. n° MPGL04 GH2); solución salina tamponada con fosfato (PBS, EMD, cat. n° 6506); ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, Sigma, cat. n° E4884); α-nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH, Calbiochem, cat. n° 481973); deshidroepiandrosterona (DHEA, TCI, cat. n° D0044); sulfato cúprico (Sigma, cat. n° C8027), glucosa-6-fosfato (G6P, Calbiochem, cat. n° 346764); aurotioglucosa (ATG, USP, cat. n° 1045508); aurotiomalato (ATM, Alfa Aesar, cat. n° 39740); glutatión reducido (GSH, JT Baker, cat. n° M770-01); monobromobimano (mBB, Fluka, cat. n° 69898); histidina (JT Baker, cat. n° 2080-05); sulfato de sodio (JT Baker, cat. n° 3897-05); Trx (Sigma, cat. n° T8690); TrxR (Sigma, cat. n° T9698). Todos los productos químicos y reactivos se utilizaron tal como se recibieron sin purificación adicional. Se prepararon soluciones madre de EDTA (250 mM, pH 7,5), CuSO₄ (10 mM), ATG (30 mM), ATM (30 mM), NADPH (75 mM), G6P (300 mM) para su uso en los estudios de evolución temporal en un minitanque.

20

Generación de líquido de cultivo celular (LCC)

25 Con el fin de generar LCC con ocrelizumab para los diversos estudios de reducción, se utilizó un proceso de fermentación representativo a pequeña escala similar a los métodos descritos anteriormente (Chaderjian et al., 2005). Brevemente, se utilizaron biorreactores Applikon® de tanque de agitación de vidrio de 3 litros, equipados con impulsores de álabes inclinados para la cadena de inóculo y cultivos de producción con los componentes de medios de ocrelizumab. A los biorreactores se suministró oxígeno disuelto (OD) calibrado, sondas de pH y temperatura. La

30 tasa de OD, el pH, la temperatura y la velocidad de agitación se controlaron utilizando unidades de control digitales para los parámetros definidos del proceso de fabricación de ocrelizumab. El volumen de trabajo para la cadena de inóculo y cultivos producción fue de 1,5 l. Las muestras se analizaron diariamente en un analizador de gases sanguíneos NOVA Bioprofile para garantizar la precisión del valor en línea del pH y oxígeno disuelto, así como para controlar las concentraciones de glucosa, lactato, amonio, glutamina, glutamato y sodio en los cultivos. También se

35 tomaron muestras diarias para controlar el crecimiento y la viabilidad celular y el título. El crecimiento celular se midió tanto mediante recuentos de células viables utilizando un instrumento ViCell como en un volumen de células empaquetadas (VCE). La viabilidad del cultivo se determinó por exclusión con azul de tripano en un instrumento ViCell. Las muestras de sobrenadante se analizaron mediante un método basado en HPLC para medir los valores del título de ocrelizumab.

40

Preparación del líquido de cultivo celular recogido (LCCR)

La lisis completa del LCC se realizó por homogeneización a alta presión utilizando un homogeneizador Microfluidics HC-8000. El regulador de presión del instrumento se ajustó a 4.000-8.000 psi, y el LCC se introdujo a través del

45 homogeneizador para obtener la lisis celular completa (rotura de las membranas) después de una sola pasada. El LCC homogeneizado se recogió una vez que el agua se purgó a través del sistema. El homogeneizado se transfirió a frascos de centrifuga y se centrifugó en una centrifuga rotatoria Sorval RC-3B a 4500 rpm durante 30 minutos a 20 °C. El centrifugado se decantó y después se filtró en profundidad seguido de filtración estéril en un filtro de 0,22 µm utilizando una bomba peristáltica con tubo de silicona, para generar el LCCR final a partir del LCC homogeneizado

50 (100 % de lisis celular). Como alternativa, el LCC se centrifugó directamente del fermentador sin ninguna homogeneización y después el centrifugado se filtró con un filtro estéril de 0,22 µm para generar el LCCR.

Manipulación del minitanque

55 Para manipular todos los minitanques se utilizó una campana de flujo laminar y todos los materiales utilizados en los experimentos de incubación de LCCR se esterilizaron en autoclave o se aclararon utilizando isopropanol al 70 % para minimizar la contaminación bacteriana.

Ensayo de lactato deshidrogenasa

60

Para el ensayo con lactato deshidrogenasa, véase Babson y Babson (1973) y Legrand et al., (1992).

Experimento de diálisis

65 Para determinar si los componentes que causaban la reducción de ocrelizumab eran moléculas pequeñas o macromoléculas (es decir, enzimas) se llevó a cabo un experimento de diálisis. Durante 24 horas, se dializó una

muestra de 3 ml de ocrelizumab purificado y formulado (30,2 mg / ml) frente a 1 l de solución salina tamponada con fosfato (PBS, 10 mM pH 7,2) y después de 8 horas se cambió la solución salina tamponada con fosfato. La concentración de la muestra de ocrelizumab se ajustó después a 1 mg/ml utilizando la absorbancia a 280 nm. Se conservaron alícuotas a -70 °C antes del uso. Los tubos de diálisis se hidrataron durante una noche en una solución de azida al 0,05 % y se aclararon con agua estéril antes de su uso. El LCCR obtenido de la homogeneización del LCC a partir de un fermentador de 3 l, se descongeló y se filtró a través de un filtro Millipak de 0,22 µm utilizando una bomba peristáltica. Seis pequeños minitanques se llenaron con 30 ml de LCCR cada uno. A cada minitanque se añadieron 500 µl de muestra de ocrelizumab en tubos de diálisis sellados. Los minitanques se sellaron y se cargaron en un mezclador de sobremesa (Barnstead Lab-Line MAX Q 4000) que funcionaba a 35 rpm y a temperatura ambiente. Para cada punto temporal, se extrajo un minitanque del mezclador, y se tomaron alícuotas del LCCR (en el minitanque) y la muestra de ocrelizumab (en la bolsa de diálisis) y se conservaron a -70 °C hasta que se analizaron con el ensayo de tiol libre y con el ensayo de Bioanalizador (descrito a continuación).

Inhibidores de ensayo para la reducción en un sistema in vitro a pequeña escala

Un minitanque alto se llenó con 27 ml de LCCR. Dependiendo del diseño del experimento, se añadieron varios reactivos (NADPH, G6P, inhibidores de G6PD o TrxR) a la concentración deseada, y el volumen final en el minitanque se llevó a 30 ml con PBS (10 mM, pH 7,2). Los minitanques se sellaron y se cargaron en un mezclador de sobremesa que funcionaba a 35 rpm y a temperatura ambiente. Para el muestreo, en cada punto temporal, la parte externa de los minitanques se esterilizó con IPA al 70 % y para la extracción de una alícuota se abrieron en una campana de flujo laminar. Los minitanques se volvieron a sellar y se volvieron a cargar en el mezclador de sobremesa. Todas las alícuotas se conservaron a -70 °C hasta que se analizaron con el ensayo de tiol libre y el ensayo de Bioanalizador (descrito a continuación).

Estudios in vitro de Trx/TrxR reductasa

Una solución comercial de TrxR (hígado de rata) (4 µM) se diluyó con agua para producir una solución de 2,86 µM. La Trx liofilizada (humana) se reconstituyó con PBS (10 mM, pH 7,2) produciendo una solución de 500 µM. Se preparó una solución de NADPH 20 mM y soluciones de ATG y ATM 10 mM en agua.

En un tubo de microcentrífuga de polipropileno negro de 1,5 ml, se mezclaron suavemente 437 µl de PBS, 25 µl de NADPH, 16 µl de solución de ocrelizumab formulada (30,2 mg/ml) y 5 µl de Trx. La reacción comenzó mediante la adición de 17,5 µl de TrxR. La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 24 horas. Se tomaron alícuotas de 20 µl en cada punto temporal de muestreo y se conservaron a -70 °C hasta que se analizaron mediante el ensayo de Bioanalizador (véase más adelante). Se realizaron controles para determinar si la ruta enzimática estaba activa cuando se omitió una enzima por sustitución de un mismo volumen de PBS por Trx y/o TrxR en la mezcla de reacción.

La inhibición del sistema de Trx se demostró utilizando las mismas condiciones de reacción descritas anteriormente con la adición de 5 µl de ATG o ATM. Para demostrar la inhibición de sistema de Trx por Cu²⁺, a la mezcla de reacción se añadieron 2,5 l de CuSO₄ (10 mM) utilizando las mismas enzimas aunque un tampón diferente (histidina 10 mM, Na₂SO₄ 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,5 mM, pH 7,0) para impedir la formación de Cu₃(PO₄)₂ insoluble.

Ensayo de tiol libre

Utilizando GSH en PBS (10 mM, pH 6,0 ± 0,05) se generó una curva patrón. A partir de una solución de GSH 110 mM, se prepararon patrones a concentraciones de 0, 5,5, 11, 22, 44, 55, 110 y 550 µM mediante dilución en serie. A partir de una solución madre de acetonitrilo de mBB (10 mM conservado a -20 °C), se preparó una solución de mBB 100 µM en PBS (10 mM, pH 10,0 ± 0,05) y se conservó protegido de la luz.

En una placa negra de 96 pocillos de fondo plano, se dispensaron 100 µl de mBB en cada pocillo. Para la curva patrón, se añadieron 10 µl de solución patrón de GSH, produciendo un pH de trabajo de 8,0 ± 0,2. Para las muestras, se añadieron 10 µl de muestra a los pocillos. Todos los pocillos se prepararon por triplicado. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora en la oscuridad y después se efectuó la lectura utilizando un lector de placas de fluorescencia (Molecular Devices SpectraMax® Gemini XS) con una longitud de onda de excitación de 390 nm y una longitud de onda de emisión de 490 nm. Se generó una curva patrón lineal utilizando el resultado promedio de los tres pocillos patrón representados frente a la concentración de GSH. Los niveles de tiol libre en las muestras se calcularon a partir de la ecuación lineal de la curva patrón utilizando el valor promedio de los tres pocillos de muestra.

Ensayo de Bioanalizador

Utilizando el Bioanalizador Agilent 2100 se adquirieron mediciones de electroforesis capilar. La preparación de la muestra se llevó a cabo como se describe en el protocolo de ensayo de Agilent Protein 230 (parte del manual número G2938-90052) con cambios minoritarios. Las muestras de LCCR se diluyeron a 1:4 y las muestras de Proteína A se diluyeron con agua a 1,0 g/l antes de su preparación. Para las muestras de LCCR en la etapa de

desnaturalización, además de los 2 µl de la solución desnaturalizante proporcionada, se añadieron 24 µl de una solución de yodoacetamida (IAM) 50 mM y SDS al 0,5 %. Para las muestras de Proteína A, se utilizó SDS al 0,5 % sin IAM y 2 µl de solución desnaturalizante. Utilizando el programa informático Agilent 2100 Expert se generaron imágenes digitales de tipo gel.

5

Soluciones madre para estudios de tiempo mantenimiento de LCCR

En los estudios de tiempo de mantenimiento de LCCR a escala de laboratorio se utilizaron tres soluciones madre distintas: (1) solución madre de EDTA 250 mM (pH 7,4) preparada utilizando EDTA, dihidrato disódico (Mallinckrodt, cat. nº 7727-06 o Sigma, cat. nº E-5134) y EDTA, dihidrato tetrasódico (Sigma, cat. nº E-6511), (2) solución madre de sulfato cúprico pentahidratado 50 mM (CuSO₄, Sigma, cat. nº C-8027) y (3) solución de ácido acético 1 M (Mallinckrodt, cat. nº V193).

10

Adiciones de inhibidores y mezclado de líquido de cultivo celular (LCC)

15

Para evaluar un intervalo de concentraciones finales para impedir la reducción de disulfuro del anticuerpo se añadió una solución madre de EDTA 250 mM o de CuSO₄ 50 mM al LCC antes de la homogeneización. Una vez que el LCCR final se generó a partir del LLC homogeneizado, estas soluciones se mezclaron después con el LCCR generado a partir del LCC no homogeneizado (que también contenía EDTA o CuSO₄) con el fin de diluir y disminuir el nivel de lisis celular total por debajo del 100 % máximo. Como alternativa, se añadió una solución madre de ácido acético 1 M a una solución de LCCR mezclada final (LLC homogeneizado y LCC no homogeneizado) para disminuir el pH de la solución para impedir la reducción de disulfuro del anticuerpo.

20

Aproximadamente 30-50 ml de cada solución de LCCR (que contenía EDTA, CuSO₄, ácido acético o ninguna adición para el control) se mantuvieron en un vial de acero inoxidable de 316 l de 50 ml. El vial se selló con una pinza, y la solución no se aireó ni se agitó. El vial se conservó a temperatura ambiente (18-22 °C). En puntos temporales predeterminados, la solución se retiró y se purificó sobre una resina de afinidad de proteína A a escala de laboratorio.

25

Se pueden obtener resultados similares con otros agentes oxidantes, tales como, por ejemplo, cistina y glutatión oxidado.

30

Inyección de aire

Para evaluar la inyección de aire del LCCR generado a partir del LCC homogeneizado para impedir la reducción de disulfuro del anticuerpo, se utilizaron recipientes de acero inoxidable de 3 litros o de 15 litros. Aproximadamente, en cada recipiente esterilizado, se filtraron 1-5 l de LCCR con un filtro estéril de 0,22 µm. Las condiciones experimentales se mantuvieron a 18-22 °C y con una agitación de 50 (fermentador de 15 l) o 275 rpm (fermentador de 3 l) con o sin control de pH mediante la adición de dióxido de carbono. Las soluciones se inyectaron con aire para aumentar el nivel de oxígeno disuelto a la saturación del aire o con nitrógeno (control) para eliminar cualquier oxígeno disuelto en la solución. El flujo de gas en cada recipiente era variable dependiendo de si se utilizaba una tasa de aireación constante o si se mantenía un nivel mínimo de oxígeno disuelto. En puntos temporales predeterminados, se extrajeron muestras de 25-50 ml de ambos recipientes y se purificaron sobre una resina de afinidad de proteína A a escala de laboratorio antes del análisis.

40

45

Procesamiento de Proteína A

El anticuerpo en muestras de líquido de cultivo celular recogido se puede capturar y purificar utilizando una resina de cromatografía de afinidad específica. La resina de proteína A (Millipore, Prosep-VA High Capacity) se seleccionó como la resina de afinidad para la purificación de anticuerpos. La resina se rellenó en una columna de vidrio de 0,66 cm de diámetro interno (Omnifit®) con una altura de lecho de 14 cm, dando como resultado un volumen de columna final de 4,8 ml. La cromatografía se realizó utilizando un sistema de cromatografía AKTA Explorer 100 (GE Healthcare).

50

La resina se expuso a tampones y el LCCR a un caudal lineal entre 350-560 cm / h. La resina se equilibró con Tris 25 mM, NaCl 25 mM, EDTA 5 mM, pH 7,1. Para cada purificación, la resina se cargó entre 5-15 mg de anticuerpo por ml de resina. La concentración de anticuerpo en el LCCR se determinó utilizando una columna de HPLC de proteína A inmovilizada (Applied Biosystems, POROS A). Después de la carga, la resina se lavó con Tris 25 mM, NaCl 25 mM, EDTA 5 mM, TMAC 0,5 M, pH 7,1, y después se eluyó el anticuerpo utilizando ácido acético 0,1 M, pH 2,9. El grupo de elución se basó en la absorbancia UV a 280 nm medida en línea después de la columna. El pH de los grupos de elución purificados se ajustó utilizando HEPES sódico 1 M a pH 5,0-5,5. Después de la regeneración de la resina con ácido fosfórico 0,1 M, se utilizaron las mismas resinas rellenas o resinas similares para purificación posterior de las otras soluciones de LCCR.

60

La concentración de anticuerpo en el grupo de proteína A purificada se midió utilizando espectrometría UV a 280 nm. Los grupos de elución de proteína A purificada se analizaron mediante el ensayo de Bioanizador para

65

cuantificar el porcentaje de anticuerpo intacto a un peso molecular de 150 kDa.

Ejemplo 2

5 Experimento de diálisis

Para determinar si la reducción de ocrelizumab estaba causada por pequeñas moléculas reductoras o macromoléculas (p. ej., enzimas), se diseñó y realizó un experimento de diálisis. En este experimento de diálisis, se colocó ocrelizumab intacto purificado en una bolsa de diálisis con un límite de peso molecular (MWCO, *molecular weight cut off*) de 7000 y la bolsa de diálisis se incubó en LCCR que contenía ocrelizumab en un minitanque de acero inoxidable. Como se muestra en las Figuras 1 y 2, el ocrelizumab dentro de la bolsa no se redujo después del período de incubación (Figura 1), mientras que el ocrelizumab fuera de la bolsa en el LCCR se redujo significativamente poco después de que comenzara la incubación. Esto se puso de manifiesto por la pérdida de ocrelizumab intacto (~150 kDa) y la formación de fragmentos de ocrelizumab (varias combinaciones de cadenas pesada y ligera) (Figura 2). El análisis de espectrometría de masas del ocrelizumab en los grupos de elución de proteína A de las series de fabricación reducidas indicó que los fragmentos observados se formaron por reducción solamente de los enlaces disulfuro intercatenarios.

La medición de tiol libre mostró que no había tioles libres dentro de la bolsa de diálisis al comienzo de la incubación; sin embargo, los niveles de tioles libres dentro y fuera de la bolsa de diálisis se vuelven comparables en menos de cinco horas después del inicio de la incubación, lo que indica que los componentes de molécula pequeña en el LCCR están completamente equilibrados dentro y fuera de la bolsa de diálisis (Figura 3) Dado que la reducción se observó solo fuera pero no dentro de la bolsa de diálisis con un MWCO de 7000 Da, el peso molecular de la (s) molécula (s) reductora (s) debe ser mayor que 7000 Da. Por lo tanto, una reacción enzimática es responsable de la reducción de ocrelizumab.

Ejemplo 3

Reducción *in vitro* de Ocrelizumab (rhuMAb 2H7, Variante A) por Trx / TrxR

Se ensayó la capacidad del sistema de Trx para reducir ocrelizumab *in vitro* mediante la incubación de ocrelizumab intacto con Trx, TrxR y NADPH. Los resultados del ensayo de Bioanalizador indican que el sistema de Trx (Figura 5) reduce el ocrelizumab *in vitro*. La tasa de reducción en este sistema *in vitro* parece ser más lenta que en el LCCR (por ejemplo, en comparación con la reducción que se muestra en la Figura 2). Esto se debe probablemente a concentraciones más bajas de las enzimas (Trx y Trx-R) y/o al sistema de tampón utilizado en la reacción *in vitro* porque la velocidad de reacción del sistema de Trx depende tanto de las concentraciones de la enzima como de los sistemas de tampón.

Ejemplo 4

Inhibidores del sistema de Trx

(i) Inhibición de la reducción del anticuerpo recombinante por sulfato cúprico

El sulfato cúprico es conocido por su capacidad de proporcionar un potencial de oxidación redox y se ha utilizado en los procesos de cultivo celular para minimizar los niveles de tiol libre (es decir, reducir al mínimo la cisteína no emparejada) en moléculas de anticuerpos recombinantes (Chaderjian et al., 2005, citados anteriormente). Se evaluó la eficacia del sulfato cúprico para inhibir el sistema de Trx *in vitro* y la posterior reducción de ocrelizumab. En este experimento de reducción *in vitro*, el sistema de tampón se cambió de PBS a sulfato de histidina para impedir la formación de $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ insoluble. La Figura 8 muestra que el sistema Trx en el tampón de sulfato histidina redujo fácilmente el ocrelizumab (incluso más rápidamente que en tampón de PBS). La adición de CuSO_4 a esta reacción inhibe claramente la reducción de ocrelizumab (Figura 9).

(ii) Inhibición de la reducción de anticuerpo recombinante en LCCR por ATG y ATM

Dos inhibidores específicos de TrxR disponibles en el comercio, la aurotioglucosa (ATG) y el aurotiomalato (ATM), se sometieron a ensayo para determinar su capacidad de inhibir el sistema de Trx *in vitro* y la reducción de ocrelizumab. Tanto la ATG como el ATM pueden inhibir de manera eficaz la reducción de ocrelizumab en el ensayo descrito anteriormente (véanse la Figuras 6 y 7). La adición de aurotioglucosa o aurotiomalato, a una concentración de 1 mM, a la misma mezcla de reacción como se describe en la leyenda de la Figura 5, inhibió de manera eficaz la reducción de ocrelizumab como se muestra en la imagen digital de tipo gel del análisis de Bioanalizador.

Si el sistema de Trx estaba activo en el LCCR y reducía el ocrelizumab, como se observa en los procesos de fabricación que producen moléculas de anticuerpo reducidas o en los experimentos a escala de laboratorio, ambos compuestos de oro (ATG y ATM) deberían poder inhibir la reducción de ocrelizumab en el LCCR. La Figura 10 muestra que el ocrelizumab se redujo fácilmente en un LCCR de LCC homogeneizado generado a partir de un

fermentador de 3 l después de un período de incubación. Sin embargo, el acontecimiento de la reducción de ocrelizumab se inhibió completamente cuando se añadió ATG o ATM 1 mM al LCCR (Figuras 11 y 12). Estos resultados demostraron que el sistema de Trx está activo en el LCCR y es directamente responsable de la reducción de ocrelizumab.

Ejemplo 5.

La fuente de NADPH para la actividad del sistema de Trx y las funciones de la G6P y de la glucosa en el mecanismo de reducción

La reducción de disulfuros por el sistema de Trx requiere los equivalentes reductores de NADPH (Figura 4). La ruta metabólica celular principal que proporciona NADPH a todas las reacciones de biosíntesis reductora es la ruta de la pentosa fosfato. Para que se produzca el acontecimiento de reducción de anticuerpos, las enzimas de esta ruta deben estar todavía activas en el LCCR para mantener activo el sistema de Trx. Como mínimo, la primera etapa en la ruta de la pentosa fosfato (catalizada por G6PD) debe ser activa para reducir el NADP^+ a NADPH convirtiendo al mismo tiempo la G6P en 6-fosfogluconolactona. Además, es muy probable que la G6P se produzca a partir de glucosa y adenosina 5'-trifosfato (ATP) por la actividad hexocinasa en el LCCR. En la Figura 4 se resume el mecanismo general de la reducción de ocrelizumab.

La actividad reductora en el LCCR pareció ser transitoria en algunos casos y con el tiempo puede inhibirse en determinadas condiciones de conservación o después de múltiples ciclos de congelación / descongelación. El LCCR que ha perdido completamente la actividad reductora brindó la oportunidad de explorar el papel de NADPH y G6P en la reducción de ocrelizumab mediante el sistema de Trx.

Un LCCR de un proceso de fabricación a gran escala (el proceso "beta") se sometió a varios ciclos de congelación / descongelación y se utilizó en un experimento diseñado para medir la reducción; no se observó reducción de ocrelizumab (Figura 13) a pesar de su capacidad para producir la reducción de anticuerpos observada previamente en el LCCR recientemente descongelado de esta misma fermentación. Se añadió NADPH a este LCCR no reductor a una concentración de 5 mM e incluso retornó la reducción (Figura 14). Por lo tanto, el sistema de Trx todavía está intacto y activo en el LCCR donde ya no se produce la reducción, y es capaz de reducir las proteínas y / o los anticuerpos si se suministran cofactores. Además, la actividad reductora se perdió con el tiempo a medida que se agotaba la fuente de NADPH (presumiblemente debido a la oxidación de NADPH por todas las reacciones reductoras que compiten por NADPH), y no porque el sistema de Trx se degradase o inactivase.

Esto se verificó con otro experimento. Se añadió G6P 10 mM a un LCCR que se había congelado y descongelado varias veces a partir del proceso beta. Esta adición de G6P reactivó el sistema de Trx que posteriormente redujo el ocrelizumab en el experimento de incubación de LCCR (Figura 15). Esto demostró que la reducción de ocrelizumab en el LCCR fue causada por las actividades tanto del sistema de Trx como de la G6PD. Además, la G6PD todavía está activa en un LCCR que se había congelado y descongelado varias veces a partir de un proceso beta; la pérdida de actividad de reducción en este proceso beta de LCCR congelado / descongelado varias veces parece deberse a un empobrecimiento de G6P, que eliminó así la conversión de NADP^+ en NADPH.

En nuestros estudios, hemos observado que el EDTA puede inhibir de manera eficaz la reducción de ocrelizumab en el experimento de incubación de LCCR. Como se muestra en la Figura 16, el ocrelizumab se redujo después de incubar el LCCR a partir de un proceso de fabricación de ocrelizumab a escala de 12,000 l (no congelado/descongelado varias veces y sin pérdida de actividad reductora) a temperatura ambiente durante más de 19 horas. Sin embargo, la reducción se inhibió por completo cuando se añadió EDTA 20 mM al LCCR de 12 kl y se mantuvo en un minitanque de acero inoxidable distinto (Figura 17). En la primera etapa de la glucólisis, la hexocinasa cataliza la transferencia del grupo fosfato de Mg^{2+} -ATP a glucosa, una reacción que requiere la complejación de Mg^{2+} con ATP (Hammes y Kochavi, 1962a y 1962b, citados anteriormente). Dado que el EDTA es un quelante de iones metálicos, especialmente para Mg^{2+} , puede ser un inhibidor efectivo de la hexocinasa. La observación de que una cantidad en exceso de EDTA puede bloquear de manera eficaz la reducción indica la participación de la hexocinasa (es decir, que proporciona G6P) en el mecanismo de reducción de ocrelizumab. Sin estar sujetos a esta o a ninguna otra teoría, el EDTA bloquea la reducción de ocrelizumab eliminando la actividad de hexocinasa y reduciendo así el nivel de G6P disponible para G6PD, y posteriormente el nivel de NADPH disponible para el sistema de Trx.

Aunque el EDTA es muy eficaz para bloquear la reducción de ocrelizumab en LCCR reciente, no pudo impedir la reducción de ocrelizumab en el proceso beta de LCCR en el que la actividad del sistema de Trx se perdió después de reactivarse con la adición de G6P. Por ejemplo, la reducción de ocrelizumab se observó en un experimento de incubación de LCCR en el que se añadieron G6P 5 mM y EDTA 20 mM (concentraciones finales) al proceso beta de LCCR que había perdido por completo la actividad reductora (Figura 18). Sin embargo, no se observó reducción en el experimento de incubación de control, en el que no se añadieron G6P ni EDTA. Sin estar sujetos a esta o a ninguna otra teoría, el EDTA utilizado de esta manera no puede inhibir por tanto ni el sistema de Trx ni la G6PD, y puede funcionar como un inhibidor de hexocinasa, que produce la G6P para la G6PD. Sin G6P, el sistema de Trx no recibiría el NADPH necesario para su actividad.

Ejemplo 6Inhibición de la reducción de anticuerpo recombinante por DHEA

La deshidroepiandrosterona (DHEA), así como otros inhibidores de G6PD similares, bloquea de manera eficaz la actividad de la G6PD (Gordon et al., 1995, citados anteriormente). Los inhibidores de G6PD también impiden la reducción de un anticuerpo en LCCR, por ejemplo, orelizumab, bloqueando la generación de NADPH. La capacidad de la DHEA para inhibir la reducción de orelizumab se demuestra en un experimento de incubación de LCCR. La adición de DHEA a un LCCR impide la reducción de anticuerpos.

La DHEA se utiliza generalmente en el intervalo de concentración de aproximadamente 0,05 mM a aproximadamente 5 mM. La DHEA también se utiliza generalmente en el intervalo de concentración de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 2,5 mM.

Ejemplo 7Inhibición de la reducción de anticuerpo recombinante por adición de (i) EDTA, (ii) sulfato cúprico y (iii) ácido acético

Se conservaron cuatro LCCR diferentes y se mantuvieron en los viales de acero inoxidable. Las soluciones fueron similares en cuanto a la cantidad de lisis celular, que se generaron diluyendo el LCCR del LCC homogeneizado con LCCR de LCC no homogeneizado. Por ejemplo, 150 ml de la primera solución sometida a lisis se mezclaron con 50 ml de la segunda solución, respectivamente. Las cuatro mezclas de LCCR evaluadas en este estudio contenían: (1) EDTA 20 mM, (2) CuSO₄ 30 µM, (3) ácido acético 15 mM (pH 5,5), y (4) no se añadió ningún inhibidor químico a la solución de control. El anticuerpo orelizumab de las cuatro mezclas se purificó inmediatamente (t = 0 h) utilizando cromatografía de proteína A y nuevamente después de 20 horas y 40 horas de conservación en los viales de acero inoxidable. Los grupos de elución de proteína A purificada se analizaron mediante el ensayo de Bioanalizador para cuantificar el porcentaje de anticuerpo intacto (150 kDa). Los resultados mostraron que había más del 90 % de anticuerpos intactos en las cuatro mezclas en el punto temporal inicial (LA FIGURA. 19) Sin embargo, en el punto temporal de 20 h, no se detectó anticuerpo intacto en la mezcla de control (sin ninguna adición), lo que indica una reducción de los enlaces disulfuro del anticuerpo. En las otras tres mezclas, todavía se detectó más del 90 % de anticuerpo intacto en los puntos temporales de 20 horas y 40 horas, lo que demuestra la prevención de la reducción del enlace disulfuro por los tres inhibidores ensayados.

Ejemplo 8Inhibición de la reducción de anticuerpo recombinante por inyección de aire en LCCR

Una mezcla de LCCR generada a partir de LCC homogeneizado se conservó y se mantuvo en dos fermentadores de acero inoxidable de 10 l distintos. Un recipiente se inyectó con aire mientras que el otro se inyectó con nitrógeno gaseoso. El anticuerpo orelizumab se purificó inmediatamente (t = 0 h) de la mezcla inicial utilizando cromatografía de proteína A. En puntos temporales seleccionados, se extrajeron muestras de 50 ml de cada recipiente y el anticuerpo se purificó utilizando cromatografía de proteína A. A continuación, se analizaron los conjuntos de elución purificados con proteína A mediante el ensayo de Bioanalizador para cuantificar el porcentaje de anticuerpo intacto a 150 kDa. Los resultados mostraron que aproximadamente el 85 % de los anticuerpos intactos estaba presente en la solución inicial (Figura 20), lo que indica alguna reducción temprana de los enlaces disulfuro de los anticuerpos antes de la exposición al oxígeno (es decir, aire inyectado en el fermentador). Una vez que la mezcla se inyectó con aire durante dos horas, se midió más del 90 % de anticuerpo intacto durante el resto del estudio de 36 horas. Por el contrario, cuando la mezcla se inyectó con nitrógeno gaseoso, la reducción del anticuerpo continuó según se midió a las 2 h (pico de 150 kDa al 28 %,) y 6 h (pico de 150 kDa al 5 %). Estos resultados demostraron que la reducción del enlace disulfuro en el anticuerpo se impedía cuando la mezcla de LCCR, generada a partir de CCF homogeneizado, se exponía a oxígeno.

Ejemplo 9Diseño de ARNip dirigido o de inhibidores de Trx nucleotídicos antisentido

El diseño de ARNip dirigidos o de nucleótidos antisentido en los genes que se encuentran en las células CHO se puede realizar utilizando secuencias disponibles al público, tales como las de tiorredoxina TrxA de *E. coli* (SEQ ID NO: 30), tiorredoxina reductasa TrxA de *E. coli* (SEQ ID NO: 31); tiorredoxina 1 de ratón (SEQ ID NO: 32), tiorredoxina 2 de ratón (SEQ ID NO: 33), tiorredoxina reductasa 1 de ratón (SEQ ID NO: 34) y tiorredoxina reductasa 2 de ratón (SEQ ID NO: 35). Un experto habitual en la técnica puede utilizar estas secuencias para seleccionar secuencias para diseñar inhibidores de Trx para dirigir enzimas en diferentes organismos y/o células, tales como células CHO.

La secuencia de la tiorredoxina TrxA de *E. coli* es:

ATG TTA CAC CAA CAA CGA AAC CAA CAC GCC AGG CTT ATT CCT GTG GAG
TTA TAT ATG AGC GAT AAA ATT ATT CAC CTG ACT GAC GAC AGT TTT GAC
ACG GAT GTA CTC AAA GCG GAC GGG GCG ATC CTC GTC GAT TTC TGG GCA
GAG TGG TGC GGT CCG TGC AAA ATG ATC GCC CCG ATT CTG GAT GAA ATC
GCT GAC GAA TAT CAG GGC AAA CTG ACC GTT GCA AAA CTG AAC ATC GAT
CAA AAC CCT GGC ACT GCG CCG AAA TAT GGC ATC CGT GGT ATC CCG ACT
CTG CTG CTG TTC AAA AAC GGT GAA GTG GCG GCA ACC AAA GTG GGT GCA
CTG TCT AAA GGT CAG TTG AAA GAG TTC CTC GAC GCT AAC CTG GCG TAA
(SEQ ID NO:30).

La secuencia de la tiorredoxina TrxB de *E. coli* es:

ATG GGC ACG ACC AAA CAC AGT AAA CTG CTT ATC CTG GGT TCA GGC CCG
GCG GGA TAC ACC GCT GCT GTC TAC GCG GCG CGC GCC AAC CTG CAA CCT
GTG CTG ATT ACC GGC ATG GAA AAA GGC GGC CAA CTG ACC ACC ACC ACG
GAA GTG GAA AAC TGG CCT GGC GAT CCA AAC GAT CTG ACC GGT CCG TTA
TTA ATG GAG CGC ATG CAC GAA CAT GCC ACC AAG TTT GAA ACT GAG ATC
ATT TTT GAT CAT ATC AAC AAG GTG GAT CTG CAA AAC CGT CCG TTC CGT
CTG AAT GGC GAT AAC GGC GAA TAC ACT TGC GAC GCG CTG ATT ATT GCC
ACC GGA GCT TCT GCA CGC TAT CTC GGC CTG CCC TCT GAA GAA GCC TTT
AAA GGC CGT GGG GTT TCT GCT TGT GCA ACC TGC GAC GGT TTC TTC TAT
CGC AAC CAG AAA GTT GCG GTC ATC GGC GGC GGC AAT ACC GCG GTT GAA
GAG GCG TTG TAT CTG TCT AAC ATC GCT TCG GAA GTG CAT CTG ATT CAC
CGC CGT GAC GGT TTC CGC GCG GAA AAA ATC CTC ATT AAG CGC CTG ATG
GAT AAA GTG GAG AAC GGC AAC ATC ATT CTG CAC ACC AAC CGT ACG CTG
GAA GAA GTG ACC GGC GAT CAA ATG GGT GTC ACT GGC GTT CGT CTG CGC
GAT ACG CAA AAC AGC GAT AAC ATC GAG TCA CTC GAC GTT GCC GGT CTG
TTT GTT GCT ATC GGT CAC AGC CCG AAT ACT GCG ATT TTC GAA GGG CAG
CTG GAA CTG GAA AAC GGC TAC ATC AAA GTA CAG TCG GGT ATT CAT GGT
AAT GCC ACC CAG ACC AGC ATT CCT GGC GTC TTT GCC GCA GGC GAC GTG
ATG GAT CAC ATT TAT CGC CAG GCC ATT ACT TCG GCC GGT ACA GGC TGC
ATG GCA GCA CTT GAT GCG GAA CGC TAC CTC GAT GGT TTA GCT GAC GCA
AAA TAA (SEQ ID NO:31).

La secuencia de la tiorredoxina 1 de ratón es:

ATGGTGAAGCTGATCGAGAGCAAGGAAGCTTTTCAGGAGGCCCTGGCCGCCGCGG
GAGACAAGCTTGTCGTGGTGGACTTCTCTGCTACGTGGTGTGGACCTTGCAAAATG
ATCAAGCCCTTCTTCCATTCCCTCTGTGACAAGTATTCCAATGTGGTGTTCCTTGAA
GTGGATGTGGATGACTGCCAGGATGTTGCTGCAGACTGTGAAGTCAAATGCATGC
CGACCTTCCAGTTTTATAAAAAGGGTCAAAAGGTGGGGGAGTTCTCCGGTGCTAA
CAAGGAAAAGCTTGAAGCCTCTATTACTGAATATGCCTAA (SEQ ID NO:32).

La secuencia de la tiorredoxina 2 de ratón es:

ATGGCTCAGCGGCTCCTCCTGGGGAGGTTCTGACCTCAGTCATCTCCAGGAAGCC
TCCTCAGGGTGTGTGGGCTTCCCTCACCTCTAAGACCCTGCAGACCCCTCAGTACA
ATGCTGGTGGTCTAACAGTAATGCCCAGCCCAGCCCGGACAGTACACACCACCAG
AGTCTGTTTGACGACCTTTAACGTCCAGGATGGACCTGACTTTCAAGACAGAGTTG
TCAACAGTGAGACACCAGTTGTTGTGGACTTTCATGCACAGTGGTGTGGCCCCCTGC
AAGATCCTAGGACCGCGGCTAGAGAAGATGGTCGCCAAGCAGCACGGGAAGGTG
GTCATGGCCAAAGTGGACATTGACGATCACACAGACCTTGCCATTGAATATGAGG
TGTCAGCTGTGCCTACCGTGCTAGCCATCAAGAACGGGGACGTGGTGGACAAGTT
TGTGGGGATCAAGGACGAGGACCAGCTAGAAGCCTTCCTGAAGAAGCTGATTGGC
TGA (SEQ ID NO:33).

La secuencia de la tiorredoxina reductasa 1 de ratón es:

ATGAATGGCTCCAAAGATCCCCCTGGGTCCTATGACTTCGACCTGATCATCATTGG
AGGAGGCTCAGGAGGACTGGCAGCAGCTAAGGAGGCAGCCAAATTTGACAAGAA
AGTGCTGGTCTTGGATTTTGTACACACCGACTCCTCTTGGGACCAGATGGGGTCTCG

GAGGAACGTGTGTGAATGTGGGTTGCATACCTAAGAAGCTGATGCACCAGGCAGC
 TTTGCTCGGACAAGCTCTGAAAGACTCGCGCAACTATGGCTGGAAAGTCGAAGAC
 ACAGTGAAGCATGACTGGGAGAAAAATGACGGAATCTGTGCAGAGTCACATCGGCT
 CGCTGAACTGGGGCTACCGCGTAGCTCTCCGGGAGAAAAAGGTCGTCTATGAGAA
 TGCTTACGGGAGGTTTCATTGGTCCTCACAGGATTGTGGCGACAAATAACAAAGGT
 AAAGAAAAAATCTATTCAGCAGAGCGGTTCCCTCATCGCCACAGGTGAGAGGCCCC
 GCTACCTGGGCATCCCTGGAGACAAAGAGTACTGCATCAGCAGTGATGATCTTTT
 CTCCTTGCCTTACTGCCCCGGGGAAGACCCTAGTAGTTGGTGCATCCTATGTCGCCT
 TGGAATGTGCAGGATTTCCTGGCTGGTATCGGCTTAGACGTCACTGTAATGGTGC GG
 TCCATTCTCCTTAGAGGATTTGACCAAGACATGGCCAACAAAATCGGTGAACACA
 TGGAAGAACATGGTATCAAGTTTATAAGGCAGTTCGTCCCAACGAAAATTGAACA
 GATCGAAGCAGGAACACCAGGCCGACTCAGGGTGACTGCTCAATCCACAAACAG
 CGAGGAGACCATAGAGGGCGAATTTAACACAGTGTTGCTGGCGGTAGGAAGAGA
 TTCTTGTACGAGAACTATTGGCTTAGAGACCGTGGGCGTGAAGATAAACGAAAAA
 ACCGGAAAGATACCCGTCACGGATGAAGAGCAGACCAATGTGCCTTACATCTACG
 CCATCGGTGACATCCTGGAGGGGGAAGCTAGAGCTGACTCCCGTAGCCATCCAGGC
 GGGGAGATTGCTGGCTCAGAGGCTGTATGGAGGCTCCAATGTCAAATGTGACTAT
 GACAATGTCCCAACGACTGTATTTACTCCTTTGGAATATGGCTGTTGTGGCCTCTC
 TGAAGAAAAAGCCGTAGAGAAATTTGGGGAAGAAAATATTGAAGTTTACCATAGT
 TTCTTTTGGCCATTGGAATGGACAGTCCCATCCCGGGATAACAACAAATGTTATGC
 AAAAATAATCTGCAACCTTAAAGACGATGAACGTGTCTGCTGGGCTTCCACGTGCTG
 GGTCCAAACGCTGGAGAGGTGACGCAGGGCTTTGCGGCTGCGCTCAAGTGTGGGC
 TGACTAAGCAGCAGCTGGACAGCACCATCGGCATCCACCCGGTCTGTGCAGAGAT
 ATTCACAACGTTGTCAGTGACGAAGCGCTCTGGGGGAGACATCCTCCAGTCTGGC
 TGCTGA (SEQ ID NO:34)

La secuencia de la tiorredoxina reductasa 2 de ratón es:

ATGGCGGCGATGGTGGCGGCGATGGTGGCGGCGCTGCGTGGACCCAGCAGGCGCT
TCCGGCCGCGGACACGGGCTCTGACACGCGGGACAAGGGGCGCGGCGAGTGCAG
CGGGAGGGCAGCAGAGCTTTGATCTCTTGGTGATCGGTGGGGGATCCGGTGGCCT
AGCTTGTGCCAAGGAAGCTGCTCAGCTGGGAAAGAAGGTGGCTGTGGCTGACTAT
GTGGAACCTTCTCCCCGAGGCACCAAGTGGGGCCTTGGTGGCACCTGTGTCAACG
TGGGTTGCATACCCAAGAAGCTGATGCATCAGGCTGCACTGCTGGGGGGCATGAT
CAGAGATGCTCACCCTATGGCTGGGAGGTGGCCCAGCCTGTCCAACACAACCTGG
AAGACAATGGCAGAAGCCGTGCAAAACCATGTGAAATCCTTGAACCTGGGGTCATC
GCGTCCAACCTGCAGGACAGGAAAGTCAAGTACTTTAACATCAAAGCCAGCTTTGT
GGATGAGCACACAGTTTCGCGGTGTGGACAAAGGCGGGAAGGCGACTCTGCTTTCA
GCTGAGCACATTGTCATTGCTACAGGAGGACGGCCAAGGTACCCACACAAGTCA
AAGGAGCCCTGGAATATGGAATCACAAGTGACGACATCTTCTGGCTGAAGGAGTC
CCCTGGGAAAACGTTGGTGGTTGGAGCCAGCTATGTGGCCCTAGAGTGTGCTGGC
TTCTCACTGGAATTGGACTGGATACCACTGTCATGATGCGCAGCATCCCTCTCCG
AGGCTTTGACCAGCAAATGTCATCTTTGGTCACAGAGCACATGGAGTCTCATGGC
ACCCAGTTCTGAAAGGCTGTGTCCCCCTCCCACATCAAAAAACTCCCAACTAACC
AGCTGCAGGTCACCTGGGAGGATCATGCTTCTGGCAAGGAAGACACAGGCACCTT
TGACACTGTCCTGTGGGCCATAGGGCGAGTTCCAGAAACCAGGACTTTGAATCTG
GAGAAGGCTGGCATCAGTACCAACCCTAAGAATCAGAAGATTATTGTGGATGCCC
AGGAGGCTACCTCTGTTCCCCACATCTATGCCATTGGAGATGTTGCTGAGGGGCG
GCCTGAGCTGACGCCCACAGCTATCAAGGCAGGAAAGCTTCTGGCTCAGCGGCTC
TTTGGGAAATCCTCAACCTTAATGGATTACAGCAATGTTCCCACAACCTGTCTTTAC
ACCACTGGAGTATGGCTGTGTGGGGCTGTCTGAGGAGGAGGCTGTGGCTCTCCAT
GGCCAGGAGCATGTAGAGGTTTACCATGCATATTATAAGCCCCTAGAGTTACGG
TGCGCGATAGGGATGCATCACAGTGCTACATAAAGATGGTATGCATGAGGGAGCC
CCCACAACCTGGTGCTGGGCCTGCACTTCCTTGGCCCCAACGCTGGAGAAGTCACC
CAAGGATTTGCTCTTGGGATCAAGTGTGGGGCTTCATATGCACAGGTGATGCAGA
CAGTAGGGATCCATCCCACCTGCTCTGAGGAGGTGGTCAAGCTGCACATCTCCAA
GCGCTCCGGCCTGGAGCCTACTGTGACTGGTTGCTGA (SEQ ID NO:35).

5 Ejemplo 10

Estudios *In Vitro* con Trx / Trx Reductasa

Materiales y métodos

Una solución comercial de TrxR (hígado de rata) (4 μ M) se diluyó con agua para producir una solución de 2,86 μ M. Se reconstituyó Trx liofilizada (humana) con PBS (10 mM, pH 7,2) produciendo una solución de 500 μ M. Se preparó una solución de NADPH 20 mM y soluciones de ATG y ATM 10 mM en agua.

En un tubo de microcentrífuga de polipropileno negro de 1,5 ml, se mezclaron cuidadosamente 437 μ l de tampón de reacción (histidina 10 mM, Na_2SO_4 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,5 mM, pH 7,0), 25 μ l de NADPH, 16 μ l de solución de ocrelizumab formulada (30,2 mg/ml) y 5 μ l de Trx. La reacción se inició mediante la adición de 17,5 μ l de TrxR. La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 24 horas. En cada punto temporal del muestreo se tomaron alícuotas de 20 μ l y se conservaron a -70 °C hasta que se analizaron mediante el ensayo de Bioanalizador.

La inhibición del sistema de Trx se demostró utilizando las mismas condiciones de reacción descritas anteriormente con la adición de diversos inhibidores.

1. Actividad *in vitro* del sistema de tiorredoxina

La Figura 24 muestra una imagen digital de tipo gel del análisis de Bioanalizador (cada carril representa un punto temporal) que muestra que la incubación de ocrelizumab intacto ("2H7", un anticuerpo humanizado dirigido contra CD20, denominado "Variante A" anteriormente) (1 mg/ml) con TrxR 0,1 μ M (hígado de rata), Trx 5 μ M (humano) y NADPH 1 mM en tampón de sulfato de histidina 10 mM da como resultado la reducción de ocrelizumab en menos de una hora.

2. Actividad *in vitro* del sistema de tiorredoxina inhibida por aurotioglucosa

A la mezcla de ocrelizumab descrita anteriormente se añadió aurotioglucosa (ATG), a las siguientes concentraciones: 1 mM; 0,6 μ M (6: 1 ATG: TrxR); 0,4 μ M (4: 1 ATG: TrxR); y 0,2 μ M (2: 1 ATG: TrxR).

Como lo atestiguan las imágenes digitales de tipo gel del análisis de Bioanalizador mostradas en las Figuras 25-27, la aurotioglucosa añadida a concentraciones de 1 mM, 0,6 μ M y 0,4 μ M, inhibe de manera eficaz la reducción de ocrelizumab por el sistema de tiorredoxina. Sin embargo, como se muestra en la Figura 28, en estas condiciones experimentales, la aurotioglucosa añadida a una concentración de 0,2 μ M no pudo inhibir la reducción de ocrelizumab después de 24 horas.

3. Actividad *in vitro* del sistema de tiorredoxina inhibida por aurotiomalato

A la mezcla de ocrelizumab descrita anteriormente se añadió aurotiomalato (ATM) a concentraciones de 0,1 mM y 0,01 mM. Como lo atestiguan las imágenes digitales de tipo gel del análisis de Bioanalizador mostradas en las Figuras 29 y 30, el ATM inhibe de manera eficaz la reducción de ocrelizumab por el sistema de tiorredoxina a ambas concentraciones ensayadas.

4. Actividad *in vitro* del sistema de tiorredoxina inhibida por CuSO_4

[0354] A la mezcla de ocrelizumab descrita anteriormente se añadió CuSO_4 a concentraciones de 20 μ M (4:1 Cu^{2+} :Trx); 10 μ M (2:1 Cu^{2+} :Trx); y 5 μ M (1:1 Cu^{2+} :Trx). Como se muestra en las Figuras 31-33, CuSO_4 inhibe de manera eficaz la reducción de ocrelizumab inducida por tiorredoxina a concentraciones de 20 μ M y 10 μ M (Figuras 31 y 32), pero la concentración 5 μ M no es suficiente para producir la inhibición completa de la reducción (Figura 33).

5. Actividad *in vitro* del sistema de tiorredoxina inhibida por cistamina

A la mezcla de ocrelizumab descrita anteriormente se añadió cistamina a las siguientes concentraciones: 532 μ M (20:1 cistamina: disulfuro 2H7 (Variante A)); 266 μ M (10:1 cistamina: disulfuro 2H7 (Variante A)); 133 μ M (5:1 cistamina: disulfuro 2H7) y 26,6 μ M (1:1: cistamina: disulfuro 2H7 (Variante A)). Como se muestra en las Figuras 34-37, la cistamina inhibe de manera eficaz la reducción de ocrelizumab inducida por tiorredoxina a concentraciones de 532 μ M (20:1 cistamina: disulfuro 2H7 (variante A)) y 266 μ M (10: 1 cistamina: 2H7 (variante A)) (Figuras 34 y 35) pero las concentraciones de 133 μ M (5: 1 cistamina: disulfuro 2H7 (variante A)) y 26,6 μ M (1:1 cistamina: disulfuro 2H7 (variante A)) no son suficientes para inhibir la reducción de ocrelizumab después de 24 horas (Figuras 36 y 37)

6. Actividad *in vitro* del sistema de tiorredoxina inhibida por cistina

A la mezcla de ocrelizumab descrita anteriormente se añadió cistina a una concentración de 2,6 mM. Como se muestra en la Figura 38, a esta concentración, la cistina inhibe de manera eficaz la reducción de ocrelizumab por el sistema de tiorredoxina. Se observa que la concentración mínima eficaz de cistina (al igual que la concentración mínima eficaz de otros inhibidores) depende de las circunstancias reales, y puede ser diferente para proteínas diferentes, tales como anticuerpos, y puede variar dependiendo del momento de la adición. Por lo tanto, por ejemplo, si se añade cistina antes de la lisis, la concentración mínima eficaz para el anticuerpo 2H7 (Variante A) es de aproximadamente 1,3 mM, para Apomab es de aproximadamente 1 mM y para el anticuerpo Variante C es de

aproximadamente 4,5 mM. Cuando se añade cistina al medio de cultivo celular, la concentración mínima eficaz es normalmente algo mayor, y es de aproximadamente 5,2 mM para 2H7 (variante A), de 6 mM para Apomab y de 9 mM para el anticuerpo Variante C. Normalmente, para la cistina, la cistamina y el glutatión oxidado (véase más adelante) la concentración mínima eficaz es aproximadamente 40x de la concentración del anticuerpo (en μM).

7. Actividad *in vitro* del sistema de tiorredoxina inhibida por glutatión oxidado (GSSG)

A la mezcla de ocrelizumab descrita anteriormente se añadió GSSG a una concentración de 2,6 mM. Como se muestra en la Figura 39, a esta concentración el GSSG inhibe de manera eficaz la reducción de ocrelizumab por el sistema de tiorredoxina. Sin embargo, se observa que la concentración mínima eficaz del glutatión oxidado (al igual que la de los otros inhibidores) depende de las circunstancias reales, tales como, por ejemplo, de la naturaleza de la proteína (por ejemplo, anticuerpo) producida y del momento de la adición. Por ejemplo, la concentración mínima eficaz para el anticuerpo 2H7 (Variante A), es de aproximadamente 1,3 mM para una adición antes de la lisis.

8. Actividad *in vitro* del sistema de reducción enzimática

La Figura 40 muestra una imagen digital de tipo gel del análisis de Bioanalizador (cada carril representa un punto de tiempo) que muestra que la incubación de ocrelizumab intacto ("2H7", un anticuerpo humanizado dirigido contra CD20, Variante A) (1 mg/ml) con hexocinasa 10 $\mu\text{g/ml}$, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, 50 $\mu\text{g/ml}$, tiorredoxina 5 μM , tiorredoxina reductasa 0,1 μM , glucosa 2 mM, ATP 0,6 mM, Mg^{2+} 2 mM y NADP 2 mM en sulfato de histidina 50 mM tamponado a pH 7,38, produce la reducción de ocrelizumab en aproximadamente una hora. La adición HDEA 0,1 mM, un inhibidor conocido de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, no inhibe la reducción.

9. La actividad *in vitro* del sistema de reducción enzimática requiere NADPH

Como se muestra en la imagen digital de tipo gel del análisis de Bioanalizador de la Figura 41, la incubación de ocrelizumab intacto (1 mg / ml) con tiorredoxina 5 μM , tiorredoxina reductasa 0,1 μM y NADP 2 mM en tampón de sulfato de histidina 50 mM a pH 7,38, no produce la reducción del anticuerpo ocrelizumab. La reducción de ocrelizumab no puede producirse sin hexocinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y sus sustratos para generar NADPH.

La invención descrita a modo ilustrativo en la presente memoria, se puede llevar a práctica adecuadamente en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones que no se describan específicamente en la misma. Por tanto, las expresiones, por ejemplo, "que comprende", "que incluye", "que contiene", etc., se leerán de forma amplia y sin limitación. En la presente memoria se han descrito las invenciones de manera amplia y genérica. Cada una de las especies y agrupaciones subgenéricas más relacionadas que se incluyen en la divulgación genérica, también forman parte de estas invenciones. Esto incluye dentro de la descripción genérica de cada una de las invenciones, una salvedad o limitación negativa que permitirá eliminar cualquier materia objeto del género, independientemente de si el material que debe eliminarse se comentó o no específicamente. Además, cuando las características o aspectos de una invención se describen en términos del grupo de Markush, las personas con formación en la materia reconocerán que la invención también se describe en términos de cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo de Markush. Además, cuando una referencia a un aspecto de la invención enumera una serie de miembros individuales, tal como por ejemplo, 'de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 100, inclusive', se pretende que sea equivalente a enumerar cada miembro de la lista individualmente, y adicionalmente debe entenderse que cada miembro individual puede ser excluido o incluido en la reivindicación individualmente.

Las etapas representadas y/o utilizadas en los métodos de la presente memoria, pueden efectuarse en un orden diferente al que se representa y/o se indica. Las etapas representan meramente un ejemplo del orden en el que pueden realizarse las mismas. Las etapas pueden efectuarse en cualquier orden que se desee de tal manera que puedan seguir alcanzándose los objetivos de la invención reivindicada.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Genentech, Inc.

<120> PREVENCIÓN DE LA REDUCCIÓN DE ENLACES DISULFURO DURANTE LA PRODUCCIÓN RECOMBINANTE DE POLIPÉPTIDOS

<130> SJK/FP7319130

<140> Aún no asignada

<141> Presentada con el presente documento

<150> 12178200.7

<151> 08-07-2008

<150> 08781481.0
<151> 08-07-2008

5 <150> PCT/US2008/069395
<151> 08-07-2008

<150> US 60/948,677
<151> 09-07-2007

10 <160> 35

<170> Patentin versión 3.5

15 <210> 1
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> región variable de cadena ligera

<400> 1

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr
85 90 95

25 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100

105

30 <210> 2
<211> 122
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> región variable de cadena pesada

<400> 2

ES 2 751 022 T3

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 3

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> región variable de cadena ligera

10

<400> 3

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

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

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

Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ala Phe Asn Pro Pro Thr
85 90 95

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

<210> 4

<211> 122

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> región variable de cadena pesada

10

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

15 <210> 5

<211> 122

<212> PRT
<213> Artificial

<220>

5 <223> región variable de cadena pesada

<400> 5

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

10

<210> 6
<211> 213
<212> PRT
<213> Artificial

15

<220>
<223> cadena ligera de longitud completa

<400> 6

20

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

ES 2 751 022 T3

Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr
85 90 95

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

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 7

<211> 452

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> secuencia de longitud completa de cadena pesada

10

<400> 7

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

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

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

ES 2 751 022 T3

35	40	45															
Gly	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Gly	Asp	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe		
50						55					60						
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Lys	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr		
65					70					75					80		
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys		
				85					90					95			
Ala	Arg	Val	Val	Tyr	Tyr	Ser	Asn	Ser	Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp		
			100					105					110				
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro		
		115					120					125					
Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr		
130						135					140						
Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr		
145					150					155					160		
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro		
				165					170					175			
Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr		
			180					185					190				
Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn		
		195					200					205					
His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser		
210						215					220						
Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu		
225					230					235				240			
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu		
				245					250					255			
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser		
			260					265					270				
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu		
275							280					285					

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

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

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

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

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

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

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

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

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 8

5 <211> 452

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> cadena pesada de longitud completa

<400> 8

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

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

Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35	40	45														
Gly	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Gly	Asp	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	
50						55					60					
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Lys	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	
65					70					75					80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
Ala	Arg	Val	Val	Tyr	Tyr	Ser	Asn	Ser	Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	
			100					105					110			
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	
		115					120					125				
Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	
	130					135					140					
Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	
145					150					155					160	
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	
				165					170					175		
Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	
			180					185					190			
Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	
		195					200					205				
His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	
	210					215					220					
Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	
225					230					235					240	
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	
				245					250					255		
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	
			260					265					270			
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	
	275						280					285				

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

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

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

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

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

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

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

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

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 9

<211> 213

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena ligera de longitud completa

10

<400> 9

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

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

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr

ES 2 751 022 T3

35	40	45
Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser		
50	55	60
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu		
65	70	75
Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ala Phe Asn Pro Pro Thr		
	85	90
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro		
	100	105
Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr		
	115	120
Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys		
	130	135
Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu		
145	150	155
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser		
	165	170
Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala		
	180	185
Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe		
	195	200
Asn Arg Gly Glu Cys		
210		

5 <210> 10
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> cadena pesada de longitud completa

<400> 10

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Asn	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
35						40						45			
Gly	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Gly	Ala	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
50						55				60					
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Lys	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65				70						75				80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85				90						95	
Ala	Arg	Val	Val	Tyr	Tyr	Ser	Ala	Ser	Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp
		100						105				110			
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro
		115				120						125			
Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr
130						135				140					
Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr
145				150						155				160	
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro
				165				170						175	
Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr
		180						185				190			
Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn
		195				200						205			
His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser
210						215				220					
Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu
225				230						235				240	
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu
				245				250						255	
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser
		260						265				270			
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu

ES 2 751 022 T3

275

280

285

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

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

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

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

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

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

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

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

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 11

<211> 452

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> secuencia de longitud completa de cadena pesada

10

<400> 11

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

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

Asn	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
	35						40					45			
Gly	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Gly	Ala	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Lys	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75					80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Val	Val	Tyr	Tyr	Ser	Ala	Ser	Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp
			100					105					110		
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro
		115					120					125			
Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr
	130					135					140				
Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr
145					150					155					160
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro
				165					170					175	
Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr
			180					185					190		
Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn
		195					200					205			
His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser
	210					215					220				
Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu
225					230					235					240
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu
				245					250					255	
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser
			260					265					270		
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu

275	280	285
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ala Thr		
290	295	300
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn		
305	310	315
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Ala Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro		
325	330	335
Ile Glu Ala Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln		
340	345	350
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val		
355	360	365
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val		
370	375	380
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro		
385	390	395
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr		
405	410	415
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val		
420	425	430
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu		
435	440	445
Ser Pro Gly Lys		
450		

<210> 12
 <211> 452
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> secuencia de longitud completa de cadena pesada

10 <400> 12

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Asn	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
35						40						45			
Gly	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Gly	Ala	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
50						55				60					
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Lys	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65				70						75				80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85				90						95	
Ala	Arg	Val	Val	Tyr	Tyr	Ser	Ala	Ser	Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp
		100						105				110			
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro
		115				120						125			
Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr
130						135				140					
Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr
145				150						155				160	
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro
				165				170						175	
Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr
		180						185				190			
Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn
		195				200						205			
His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser
210						215				220					
Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu
225				230						235				240	
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu
				245				250						255	
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser
		260						265				270			
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu

ES 2 751 022 T3

275	280	285
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ala Thr		
290	295	300
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn		
305	310	315
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Ala Ala Leu Pro Ala Pro		
	325	330
Ile Ala Ala Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln		
	340	345
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val		
	355	360
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val		
	370	375
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro		
385	390	395
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr		
	405	410
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val		
	420	425
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu		
	435	440
Ser Pro Gly Lys		
450		

<210> 13
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> secuencia de longitud completa de cadena pesada

<400> 13

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

ES 2 751 022 T3

Asn	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val			
		35					40					45						
Gly	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Gly	Ala	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe			
50						55					60							
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Lys	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr			
65					70					75					80			
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys			
				85					90					95				
Ala	Arg	Val	Val	Tyr	Tyr	Ser	Ala	Ser	Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp			
			100					105					110					
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro			
		115					120					125						
Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr			
	130					135					140							
Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr			
145					150					155					160			
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro			
			165						170					175				
Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr			
		180					185						190					
Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn			
	195					200						205						
His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser			
210						215					220							
Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu			
225					230					235					240			
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu			
				245					250					255				
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser			
			260					265					270					
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu			

[illegible]

<210> 14
<211> 452
<212> PRT
<213> Artificial

```
<220>  
<223> cadena pesada de longitud completa  
<400> 14
```

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

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

Asn	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
	35						40					45			
Gly	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Gly	Ala	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Lys	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75					80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Val	Val	Tyr	Tyr	Ser	Tyr	Arg	Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp
			100					105					110		
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro
		115					120					125			
Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr
	130					135					140				
Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr
145					150					155					160
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro
				165					170					175	
Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr
			180					185					190		
Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn
		195					200					205			
His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser
	210					215					220				
Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu
225					230					235					240
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu
				245					250					255	
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser
			260					265					270		
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu

ES 2 751 022 T3

275

280

285

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

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

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

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

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

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

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

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

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 15

5 <211> 452

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> cadena pesada de longitud completa

<400> 15

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

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

Asn	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
	35						40					45			
Gly	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Gly	Asp	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Lys	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75					80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Val	Val	Tyr	Tyr	Ser	Asn	Ser	Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp
			100					105					110		
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro
		115					120					125			
Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr
	130					135					140				
Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr
145					150					155					160
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro
				165					170					175	
Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr
			180					185					190		
Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn
		195					200					205			
His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser
	210					215					220				
Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu
225					230					235					240
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu
				245					250					255	
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser
			260					265					270		
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu

ES 2 751 022 T3

275

280

285

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

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

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

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

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

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

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

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

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 16

5 <211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> anticuerpo

<400> 16

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

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

ES 2 751 022 T3

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

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

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

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

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

<210> 17

5 <211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> anticuerpo

<400> 17

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

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

Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Arg Phe
50 55 60

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

15

<210> 18

<211> 107

<212> PRT
<213> Artificial

<220>

5 <223> cadena ligera

<400> 18

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

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

10

<210> 19
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

15

<220>
<223> cadena pesada

<400> 19

20

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

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

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

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

ES 2 751 022 T3

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 20

<211> 108

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> anticuerpo

10

<400> 20

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

Asp Arg Val Ile Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Val Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
85 90 95

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

15 <210> 21

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> anticuerpo

<400> 21

ES 2 751 022 T3

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

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

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
100 105 110

Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 22

<211> 108

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> anticuerpo

10

<400> 22

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
85 90 95

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

<210> 23
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> anticuerpo

<400> 23

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
50 55 60

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

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

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 24
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> anticuerpo

<400> 24

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

ES 2 751 022 T3

1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr	20	25	30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile	35	40	45
Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	65	70	75
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp	85	90	95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg	100	105	

<210> 25
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> anticuerpo

<400> 25

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr His Tyr	20	25	30	
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	35	40	45	
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe	50	55	60	
Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr	65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	85	90	95	
Ala Lys Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val	100	105	110	

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 26
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> anticuerpo

<400> 26

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

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

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

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

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

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

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

<210> 27
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> anticuerpo

<400> 27

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

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

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

ES 2 751 022 T3

35

40

45

Gly Met Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ile Tyr Phe Tyr Gly Thr Thr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 28

<211> 214

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> anticuerpo

10

<400> 28

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 29

<211> 451

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> anticuerpo

10

<400> 29

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

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

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

Gly Met Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ile Tyr Phe Tyr Gly Thr Thr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

ES 2 751 022 T3

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

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

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 751 022 T3

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

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

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

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

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

Pro Gly Lys
450

<210> 30
<211> 384
<212> ADN
<213> Tiorredoxina TrxA de E. coli

<400> 30

atgttacacc aacaacgaaa ccaacacgcc aggcattattc ctgtggagtt atatatgagc 60
gataaaatta ttcacctgac tgacgacagt ttgacacgg atgtactcaa agcggacggg 120
gcgatcctcg tcgatttctg ggcagagtgg tgcggtccgt gcaaaatgat cgcgccgatt 180
ctggatgaaa tcgctgacga atatcagggc aaactgaccg ttgcaaaact gaacatcgat 240
caaaaccctg gcactgcgcc gaaatatggc atccgtggta tcccgaactct gctgctgttc 300
aaaaacggtg aagtggcggc aaccaaagtg ggtgcactgt ctaaaggtca gttgaaagag 360
ttcctcgacg ctaacctggc gtaa 384

<210> 31
<211> 966
<212> ADN
<213> Tiorredoxina reductase TrxB de E. coli

<400> 31

atgggcacga ccaaacacag taaactgctt atcctgggtt caggcccggc gggatacacc 60
gctgctgtct acgcggcgcg cgccaacctg caacctgtgc tgattaccgg catggaaaaa 120
ggcggccaac tgaccaccac cacggaagtg gaaaactggc ctggcgatcc aaacgatctg 180
accggtccgt tattaatgga gcgcatgcac gaacatgcc ccaagtttga aactgagatc 240
atTTTTgatc atatcaaaa ggtggatctg caaaaccgtc cgttccgtct gaatggcgat 300

aacggcgaat acacttgcca cgcgctgatt attgocacog gagcttctgc acgctatctc 360
 ggccctgcct ctgaagaagc ctttaaaggc cgtgggggtt ctgcttctgc aacctgcgac 420
 ggtttcttct atcgcaacca gaaagttgcg gtcacggcg gggcaatac cgcggttgaa 480
 gaggcgttgt atctgtctaa catcgcttcg gaagtgcac tgattcacog ccgtgacggt 540
 ttccgcgcgg aaaaaatcct cattaagcgc ctgatggata aagtggagaa cggcaacac 600
 attctgcaca ccaaccgtac gctggaagaa gtgaccggcg atcaaatggg tgtcactggc 660
 gttcgtctgc gcgatacgca aaacagcgat aacatcgagt cactcgacgt tgccggtctg 720
 tttgttgcta tcggtcacag ccgaataact gcgattttcg aagggcagct ggaactggaa 780
 aacggctaca tcaaagtaca gtcgggtatt catggtaatg ccaccagac cagcattcct 840
 ggcgctcttg ccgcaggcga cgtgatggat cacatttata gccaggccat tacttcggcc 900
 ggtacaggct gcacggcagc acttgatgog gaacgctacc tcgatgggtt agctgacgca 960
 aaataa 966

<210> 32
 <211> 318
 5 <212> ADN
 <213> *mus musculus*

<400> 32

atggtgaagc tgatogagag caaggaagct ttccaggagg ccctggccgc cgcgggagac 60
 aagcttctgc tgggtggaact ctctgctacg tgggtgtggac cttgcaaaat gatcaagccc 120
 ttcttccatt ccctctgtga caagtattcc aatgtggtgt tccttgaagt ggatgtggat 180
 gactgccagg atgttctctc agactgtgaa gtcaaagca tgccgacctt ccagttttat 240
 aaaaagggc aaaaggtggg ggagttctcc ggtgctaaca aggaaaagct tgaagcctct 300
 10 attactgaat atgcctaa 318

<210> 33
 <211> 501
 <212> ADN
 15 <213> *mus musculus*

<400> 33

atggctcagc ggctcctcct ggggaggttc ctgacctcag tcctctccag gaagcctcct 60
 cagggtgtgt gggcttccct cacctctaag accctgcaga cccctcagta caatgctggt 120
 ggtctaacag taatgcccag ccagccccg acagtacaca ccaccagagt ctgtttgacg 180
 acctttaacg tccaggatgg acctgacttt caagacagag ttgtcaacag tgagacacca 240
 gttgttctgg actttcatgc acagtgggtg ggccctgca agatcctagg accgcggcta 300
 gagaagatgg tcgccaagca gcacgggaag gtggtcatgg ccaaagtgga cattgacgat 360
 cacacagacc ttgccattga atatgaggtg tcagctgtgc ctaccgtgct agccatcaag 420

aacggggacg tgggtggacaa gtttgtgggg atcaaggacg aggaccagct agaagccttc 480
ctgaagaagc tgattggctg a 501

<210> 34
<211> 1494
<212> ADN
<213> *mus musculus*

<400> 34

10 atgaatggct ccaaagatcc ccctgggtcc tatgacttcg acctgatcat cattggagga 60
ggctcaggag gactggcagc agctaaggag gcagccaaat ttgacaagaa agtgctggtc 120
ttggattttg tcacaccgac tcctcttggg accagatggg gtctcggagg aacgtgtgtg 180
aatgtgggtt gcatacctaa gaagctgatg caccaggcag ctttgctcgg acaagctctg 240
aaagactcgc gcaactatgg ctggaaagtc gaagacacag tgaagcatga ctgggagaaa 300
atgacggaat ctgtgcagag tcacatcggc tcgctgaact ggggctaccg cgtagctctc 360
cgggagaaaa aggtcgtcta tgagaatgct tacgggaggt tcatttgtcc tcacaggatt 420
gtggcgacaa ataacaaagg taaagaaaa atctattcag cagagcgggt cctcatcgcc 480
acaggtgaga ggccccgcta cctgggcatc cctggagaca aagagtactg catcagcagt 540
gatgatcttt tctccttgcc ttactgcccg gggaagacc tagtagttgg tgcacctat 600
gtcgcccttg aatgtgcagg atttctggct ggtatcggct tagacgtcac tgtaatggtg 660
cgggtocatc tccttagagg atttgaccaa gacatggcca acaaaatcgg tgaacacatg 720
gaagaacatg gtatcaagtt tataaggcag ttctgtccca cgaaaattga acagatcgaa 780
gcaggaacac caggccgact cagggtgact gctcaatcca caaacagcga ggagaccata 840
gagggcgaat ttaacacagt gttgctggcg gtaggaagag attcttgtac gagaactatt 900
ggcttagaga ccgtgggcgt gaagataaac gaaaaaaccg gaaagatacc cgtcacggat 960
gaagagcaga ccaatgtgcc ttacatctac gccatcgggtg acatcctgga ggggaagcta 1020
gagctgactc ccgtagccat ccaggcgggg agattgctgg ctgagaggct gtatggaggc 1080
tocaatgtca aatgtgacta tgacaatgtc ccaacgactg tatttactcc tttggaatat 1140
ggctgttgtg gcctctctga agaaaaagcc gtagagaaat ttggggaaga aaatattgaa 1200
gtttaaccata gtttcttttg gccattggaa tggacagtcc catcccggga taacaacaaa 1260
tgttatgcaa aaataatctg caaccctaaa gacgatgaac gtgtcgtggg cttccacgtg 1320
ctgggtocaa acgctggaga ggtgacgcag ggctttgcgg ctgcgctcaa gtgtgggctg 1380
actaagcagc agctggacag caccatcggc atccaccggg tctgtgcaga gatattcaca 1440
acgttgtcag tgacgaagcg ctctggggga gacatcctcc agtctggctg ctga 1494

<210> 35
 <211> 1578
 <212> ADN
 <213> *mus musculus*

5

<400> 35

atggcggcga tgggtggcggc gatggtggcg gcgctgcgtg gacccagcag gcgcttccg	60
ccgcggacac gggctctgac acgcgggaca aggggcgcgg cgagtgcagc gggagggcag	120
cagagctttg atctcttggg gatcgggtggg ggatccggtg gcctagcttg tgccaaggaa	180
gctgctcagc tgggaaagaa ggtggctgtg gctgactatg tggaaccttc tccccgaggc	240
accaagtggg gccttgggtg cacctgtgtc aacgtgggtt gcatacccaa gaagctgatg	300
catcaggctg cactgctggg gggcatgac agagatgctc accactatgg ctgggaggtg	360
gccagcctg tccaacacaa ctggaagaca atggcagaag ccgtgcaaaa ccatgtgaaa	420
tccttgaact ggggtcatcg cgtccaactg caggacagga aagtcaagta ctttaacatc	480
aaagccagct ttgtggatga gcacacagtt cgcggtgtgg acaaaggcgg gaaggcgact	540
ctgctttcag ctgagcacat tgtcattgct acaggaggac ggccaaggta cccacacaa	600
gtcaaaggag ccctggaata tggaatcaca agtgacgaca tcttctggct gaaggagtcc	660
cctgggaaaa cgttgggtgg tggagccagc tatgtggccc tagagtgtgc tggttcctc	720
actggaattg gactggatac cactgtcatg atgcgcagca tccctctccg aggctttgac	780
cagcaaatgt catctttggt cacagagcac atggagtctc atggcaccca gttcctgaaa	840
ggctgtgtcc cctccacat caaaaaactc ccaactaacc agctgcaggt cacttgggag	900
gatcatgctt ctggcaagga agacacaggc acctttgaca ctgtcctgtg ggccataggg	960
cgagttccag aaaccaggac tttgaatctg gagaaggctg gcatcagtac caaccctaag	1020
aatcagaaga ttattgtgga tgcccaggag gctacctctg tccccacat ctatgccatt	1080
ggagatgttg ctgaggggcg gcctgagctg acgcccacag ctatcaaggc aggaaagctt	1140
ctggctcagc ggctctttgg gaaatcctca acottaatgg attacagcaa tgttcccaca	1200
actgtcttta caccactgga gtatggctgt gtggggctgt ctgaggagga ggctgtggct	1260
ctccatggcc aggagcatgt agaggtttac catgcatatt ataagcccct agagttcacg	1320
gtggcggata gggatgcac acagtgtac ataaagatgg tatgcatgag ggagccccca	1380
caactgggtg tgggcctgca cttccttggc cccaacgctg gagaagtcac ccaaggattt	1440
gctcttggga tcaagtgtgg ggcttcatat gcacaggtga tgcagacagt agggatccat	1500
cccacctgct ctgaggaggt ggtcaagctg cacatctcca agcgctccgg cctggagcct	1560
actgtgactg gttgctga	1578

REIVINDICACIONES

1. Un método para la prevención de la reducción de un enlace disulfuro en un anticuerpo expresado en una célula hospedadora recombinante durante el procesamiento posterior a la fermentación, que comprende, después de la fermentación:
 - 5 inyectar con aire el líquido de cultivo celular pre-recogido o recogido de la célula hospedadora recombinante, en donde la célula hospedadora recombinante es una célula hospedadora recombinante de ovario de hámster chino (CHO) y en donde el anticuerpo expresado en la célula hospedadora es un anticuerpo terapéutico monoclonal que se une a CD20.
2. El método de la reivindicación 1, en donde el método comprende inyectar aire al líquido de cultivo celular pre-recogido.
3. El método de la reivindicación 1, en donde el método comprende inyectar aire al líquido de cultivo celular recogido.
4. El método de la reivindicación 3, en donde la inyección de aire es continua hasta que el líquido de cultivo celular recogido está saturado de aire al menos al 30 %.
5. El método de la reivindicación 3 o de la reivindicación 4, en donde la inyección de aire es continua hasta que el líquido de cultivo celular recogido está saturado de aire entre el 100 % y el 30 %.
6. El método de la reivindicación 3, en donde la inyección de aire es continua hasta que la cantidad de oxígeno disuelto (dO_2) en el líquido de cultivo celular recogido es al menos del 10 %.
7. El método de la reivindicación 3, en donde la inyección de aire es continua hasta que la cantidad de oxígeno disuelto (dO_2) en el líquido de cultivo celular recogido es al menos del 30 %.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el anticuerpo que se une a CD20 es rituximab.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el anticuerpo que se une a CD20 es ocrelizumab.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 en donde el anticuerpo expresado en la célula hospedadora recombinante se produce a una escala de más de 5.000 litros.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que adicionalmente comprende la etapa de recuperar el anticuerpo del líquido de cultivo celular recogido.
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que adicionalmente comprende la etapa de purificar el anticuerpo del líquido de cultivo celular recogido.

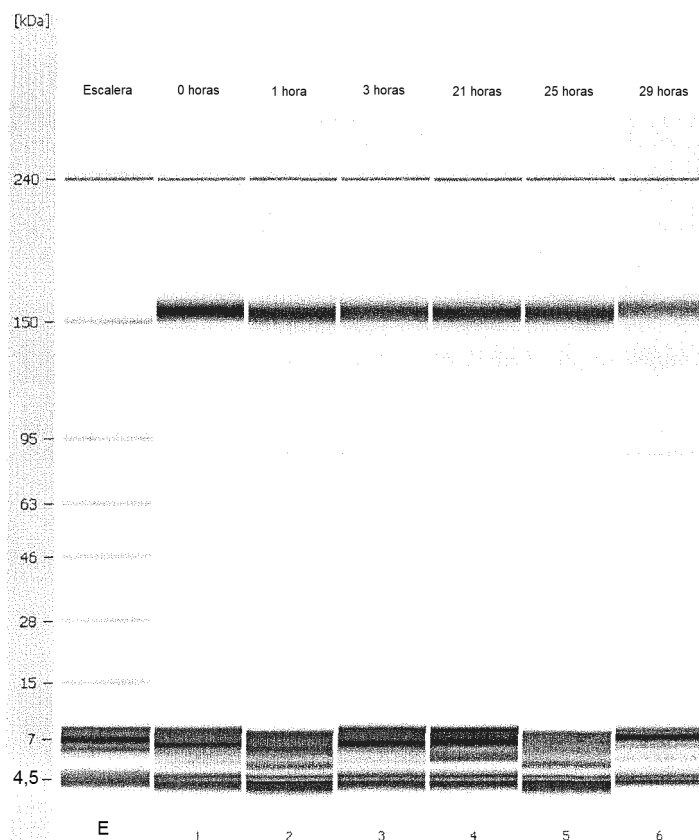


Figura 1. **Experimento de diálisis:** imágenes digitales de tipo gel, obtenidas del análisis de Bioanalizador, que demuestran que dentro de la bolsa de diálisis el ocrelizumab permaneció intacto durante el período de incubación.

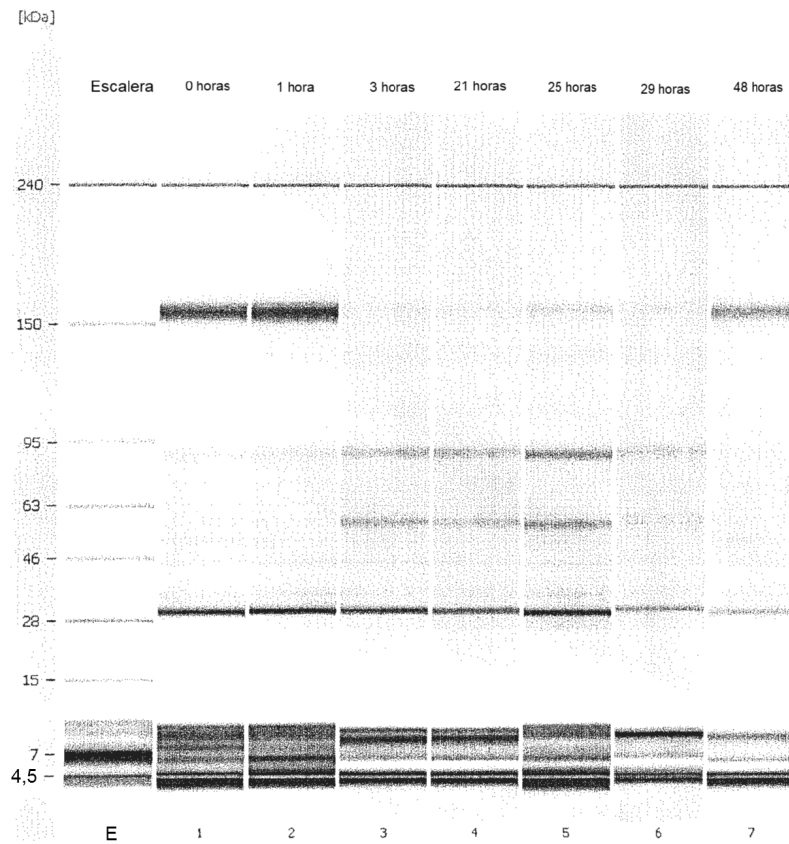


Figura 2. **Experimento de diálisis:** imágenes digitales de tipo gel, obtenidas del análisis de Bioanalizador que muestran que fuera de la bolsa de diálisis el ocrelizumab se redujo durante el período de incubación, como se pone de manifiesto por la pérdida de anticuerpo intacto (~150 kDa) y la formación de fragmentos de anticuerpo. En el punto temporal de 48 horas (Carril 7), el anticuerpo reducido pareció reoxidarse, presumiblemente como resultado de la pérdida de actividad reductora en el líquido de cultivo celular recogido (LCCR). La banda que aparece justo por encima del marcador de 28 kDa proviene de la cadena ligera del anticuerpo. Había una cantidad significativa de luz libre ya presente en el LCCR antes de que comenzara la incubación. La presencia de un exceso de cadena ligera libre y dímeros de cadena ligera en el LCCR es típica de la línea celular productora de ocrelizumab.

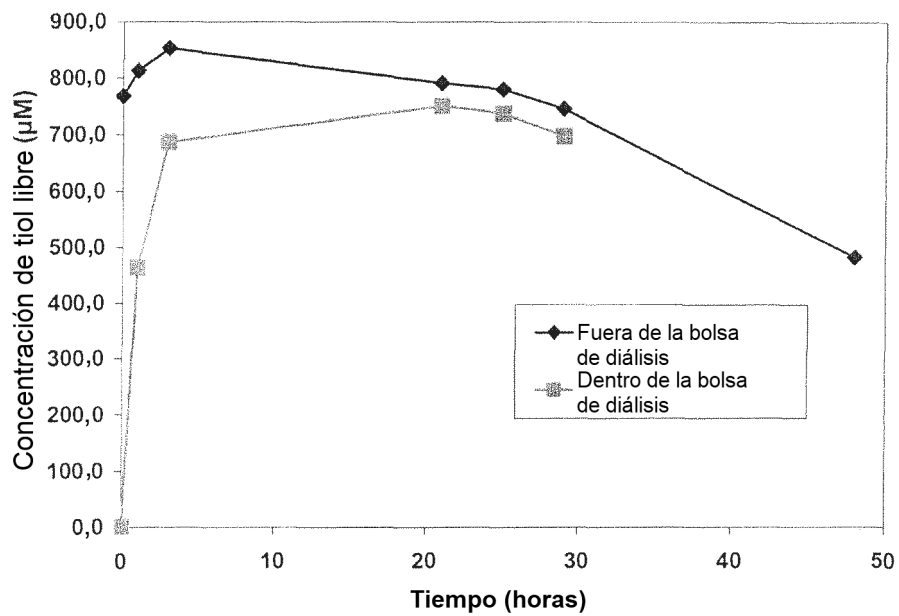


Figura 3. **Niveles de tiol libre del experimento de diálisis:** Los niveles de tiol libre dentro (cuadrados) y fuera (rombos) de la bolsa de diálisis alcanzaron niveles comparables en pocas horas, lo que indica un buen intercambio de componentes de moléculas pequeñas en el LCCR entre el interior y el exterior de la bolsa de diálisis.

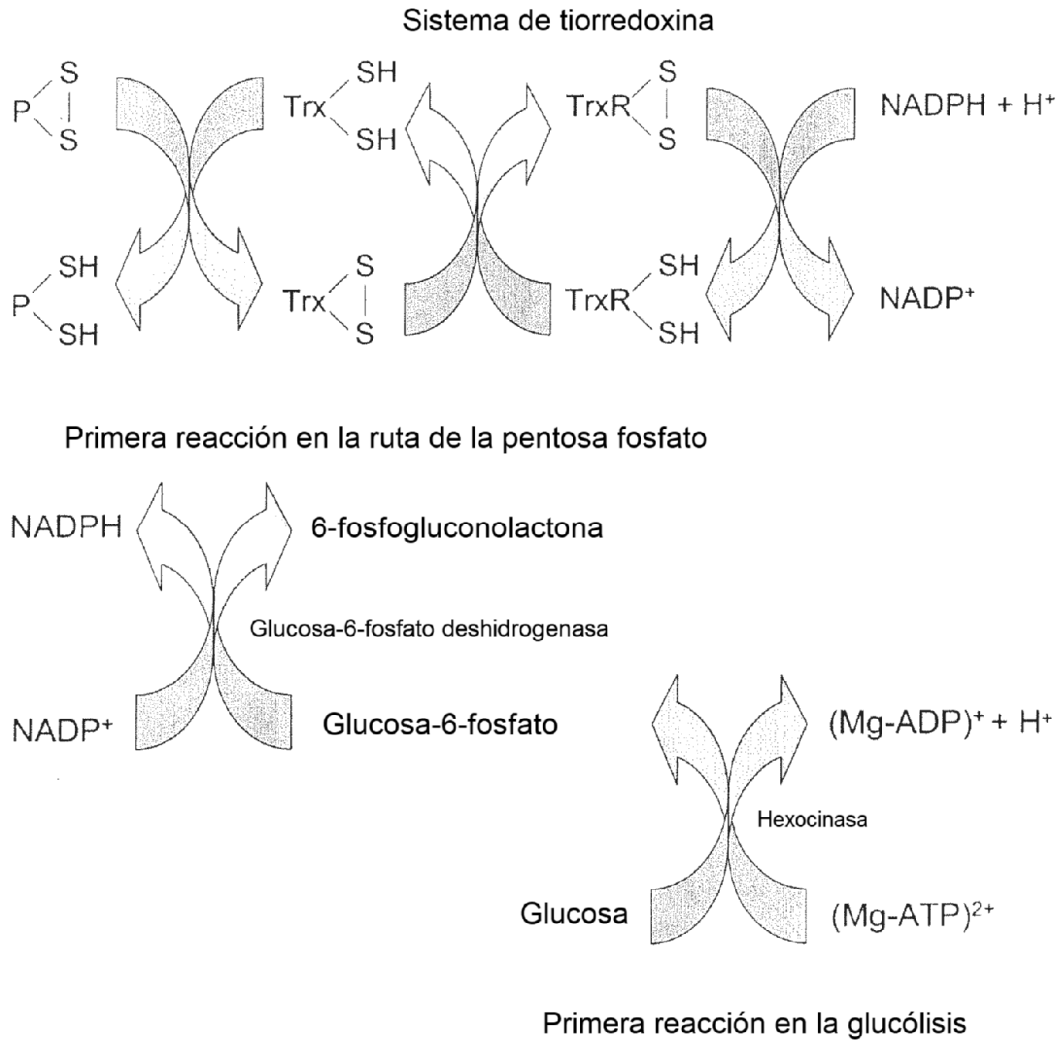


Figura 4. **Sistema de tiorredoxina y otras reacciones implicadas en la reducción de anticuerpos:** el sistema de tiorredoxina, que comprende tiorredoxina (Trx), tiorredoxina reductasa (TrxR) y NADPH, es un sistema donador de hidrógeno para la reducción de enlaces disulfuro en proteínas. La Trx es una proteína monomérica pequeña con un motivo de sitio activo CXXC que cataliza muchas reacciones redox a través del intercambio de tiol-disulfuro. La Trx oxidada se puede reducir mediante NADPH a través de TrxR. La Trx reducida es después capaz de catalizar la reducción de disulfuros en proteínas. El NADPH requerido para el sistema de tiorredoxina se proporciona mediante reacciones en la ruta de la pentosa fosfato y la glucólisis.

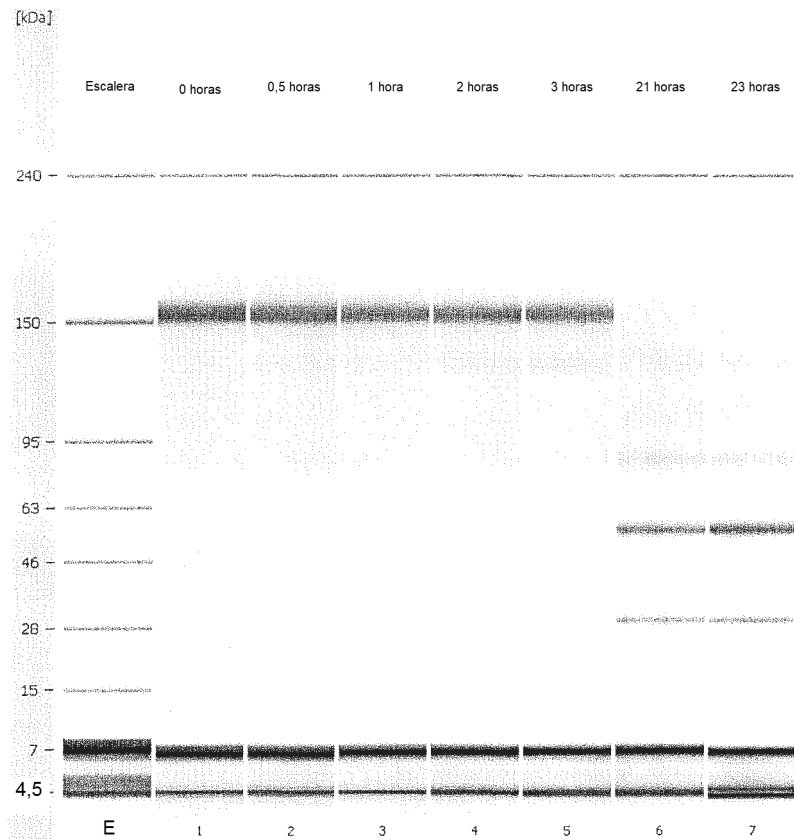


Figura 5. **Actividad *in vitro* del sistema de tioredoxina:** imagen digital de tipo gel del análisis de Bioanalizador que muestra que la incubación del ocrelizumab intacto (1 mg/ml) con TrxR 0,1 μ M (hígado de rata), Trx 5 μ M (humana) y NADPH 1 mM en PBS, dio como resultado la reducción de ocrelizumab (que se redujo por completo en menos de 21 horas).

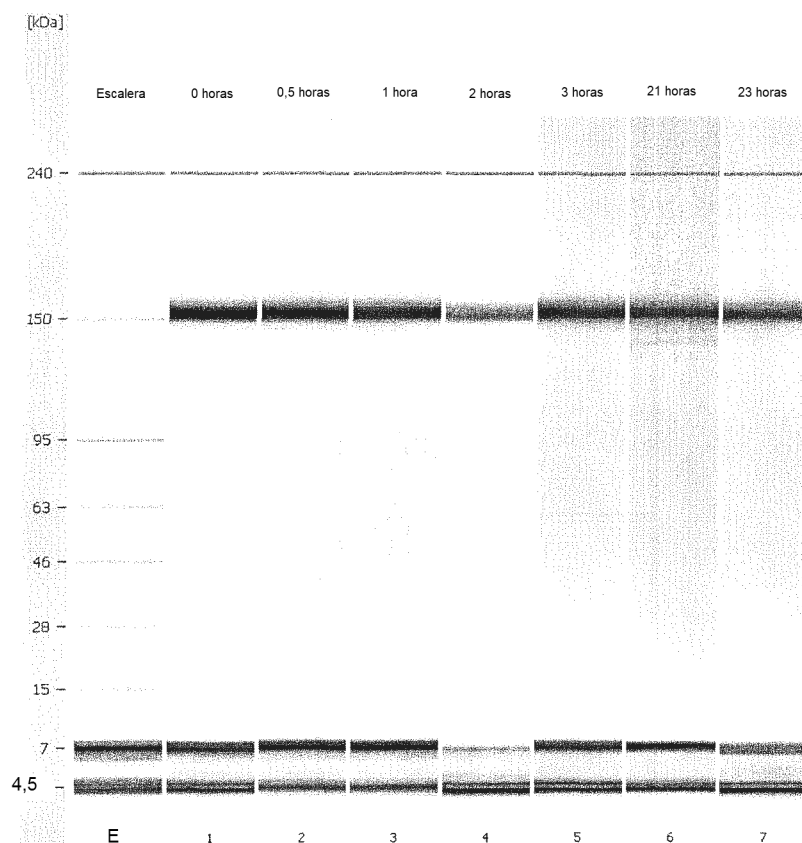


Figura 6. **Actividad *in vitro* del sistema de tioredoxina inhibida por aurotioglucosa:** la adición de aurotioglucosa, a una concentración de 1 mM, a la misma mezcla de reacción que se describe en la leyenda de la figura 5, inhibió eficazmente la reducción de orelizumab, como se observa en la imagen digital de tipo gel del análisis de Bioanalizador.

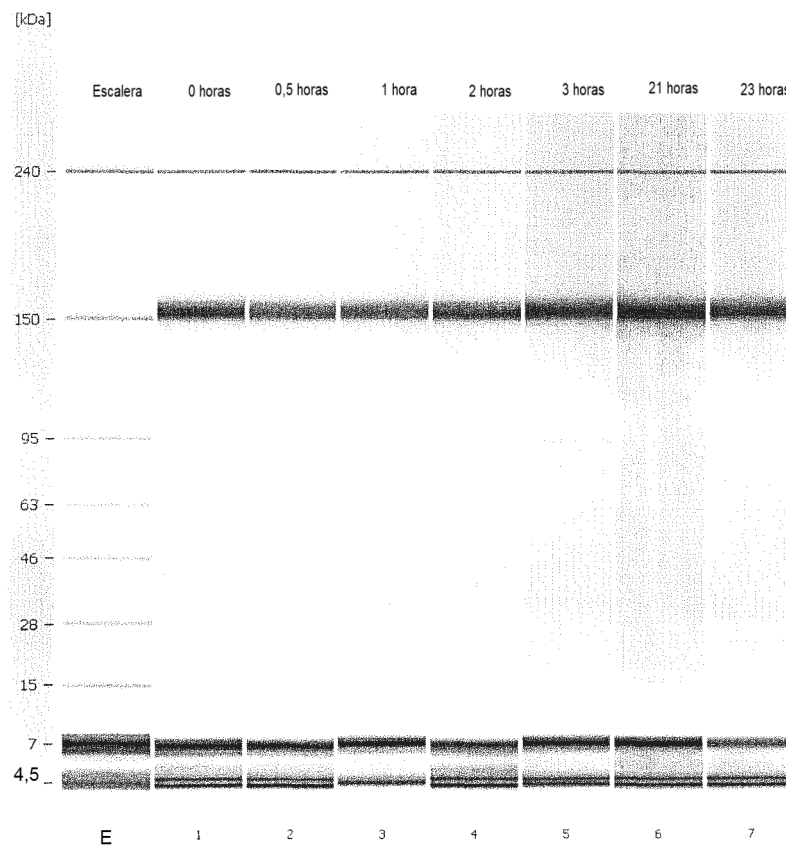


Figura 7. **Actividad *in vitro* del sistema de tioredoxina inhibida por aurotiomalato:** la adición de aurotiomalato a, a una concentración de 1 mM, la misma mezcla de reacción que se describe en la leyenda de la figura 5, inhibió eficazmente la reducción de ocrelizumab, como se observa en la imagen digital de tipo gel del análisis de Bioanalizador.

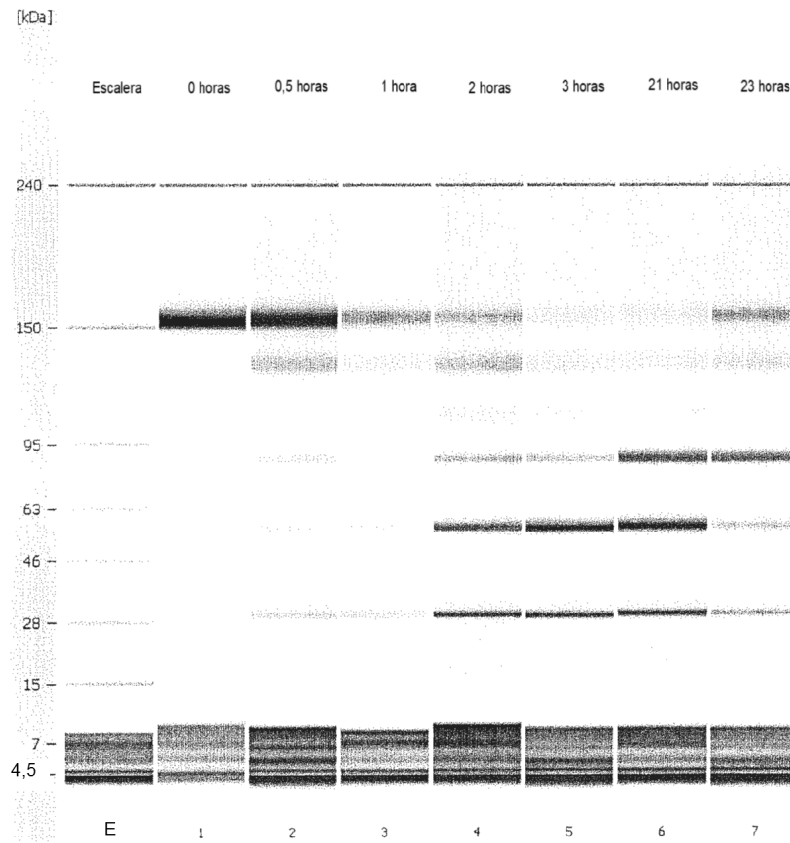


Figura 8. **Actividad *in vitro* del sistema de tioredoxina:** imagen digital de tipo gel del análisis de Bioanalizador que muestra que la incubación de ocrelizumab intacto (1 mg/ml) con TrxR 0,1 μ M (hígado de rata), Trx 5 μ M (humana) y NADPH 1 mM en tampón de sulfato de histidina 10 mM produjo la reducción de ocrelizumab en menos de 1 hora.

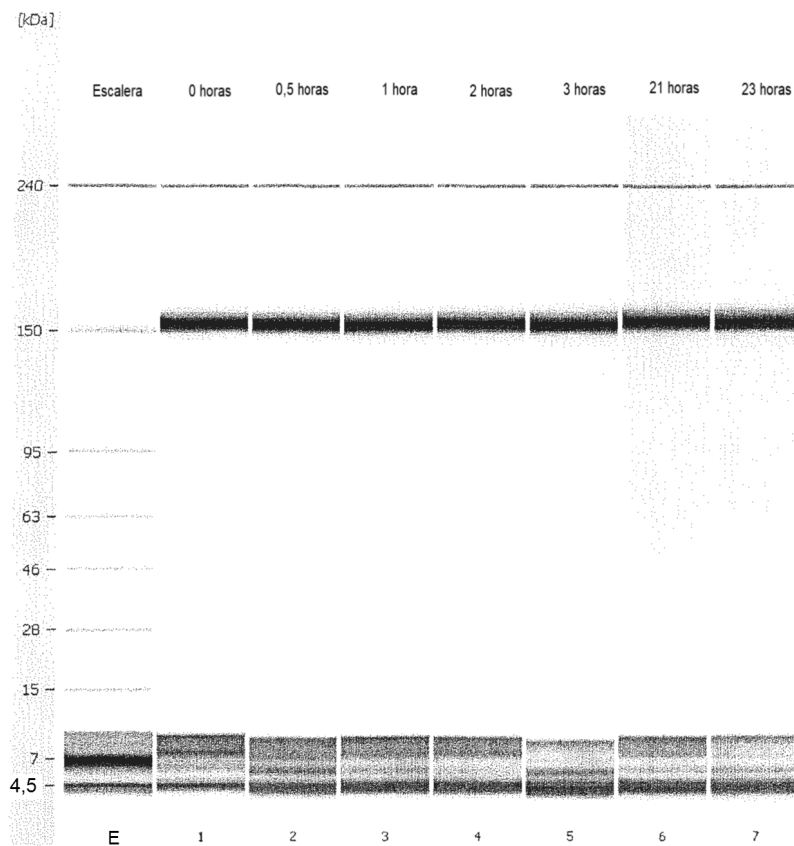


Figura 9. **Actividad *in vitro* del sistema de tioredoxina inhibida por CuSO_4 :** la adición de CuSO_4 , a una concentración de $50 \mu\text{M}$, a la misma mezcla de reacción que se describe en la leyenda de la Figura 8, inhibió eficazmente la reducción de ocrelizumab como se muestra en la imagen digital de tipo gel del análisis de Bioanalizador.

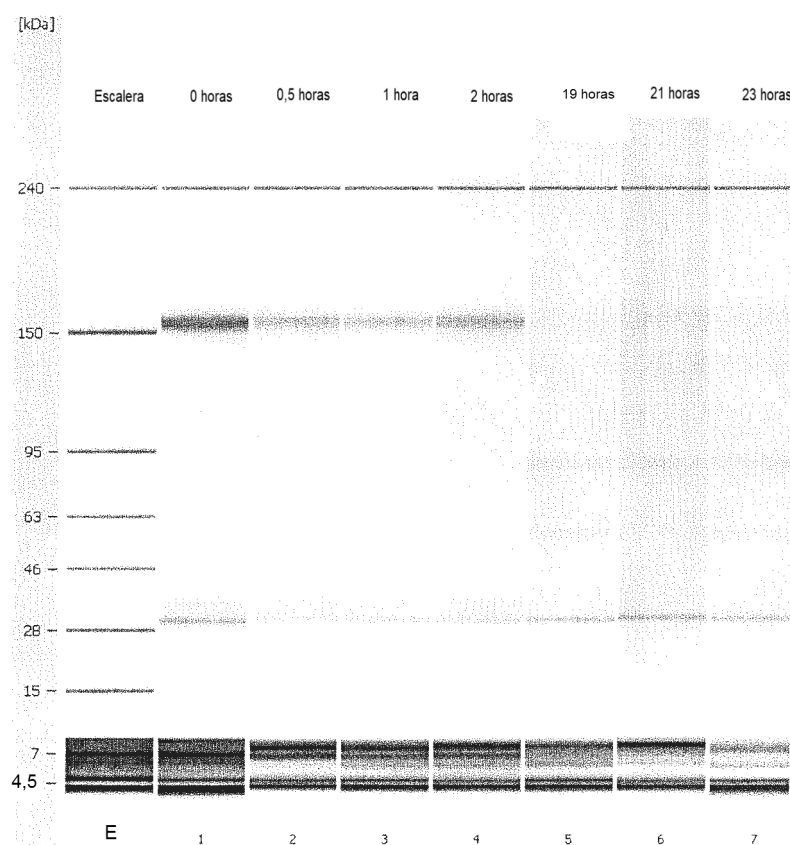


Figura 10. **Reducción de Ocrelizumab:** imagen digital de tipo gel del análisis de Bioanalizador que muestra que el anticuerpo ocrelizumab se redujo en un experimento de incubación utilizando un LCCR homogeneizado generado de un fermentador de 3 l.

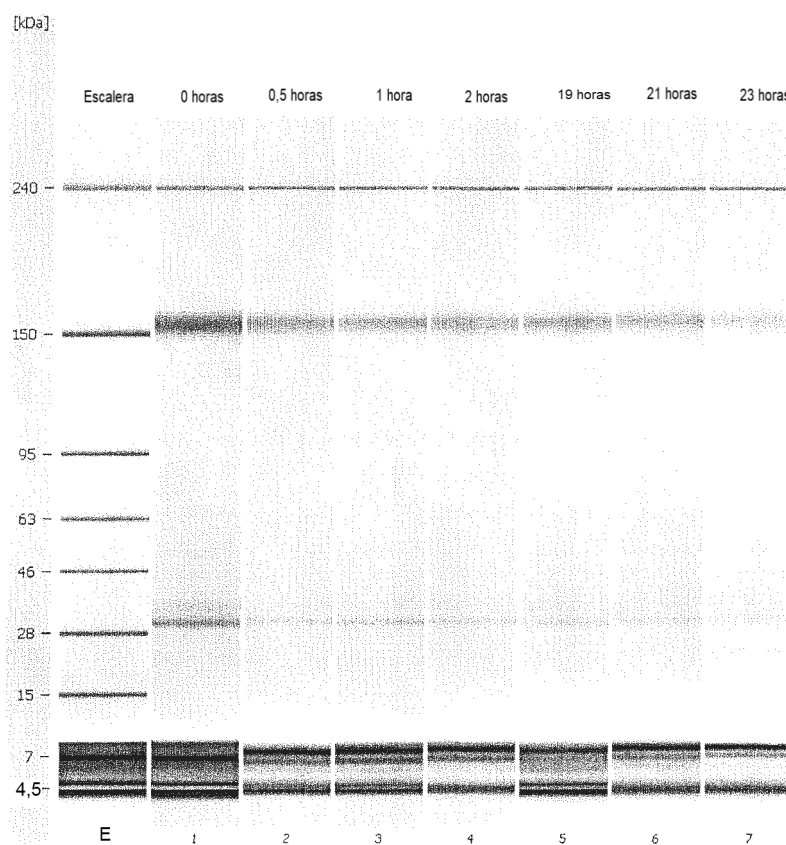


Figura 11. **Inhibición de la reducción de Ocrelizumab en LCCR por aurotioglucosa:** imagen digital de tipo gel del análisis de Bioanalizador que muestra que la adición de aurotioglucosa 1 mM al mismo LCCR que se utilizó para el experimento de incubación mostrado en la figura 10, inhibió eficazmente la reducción de ocrelizumab.

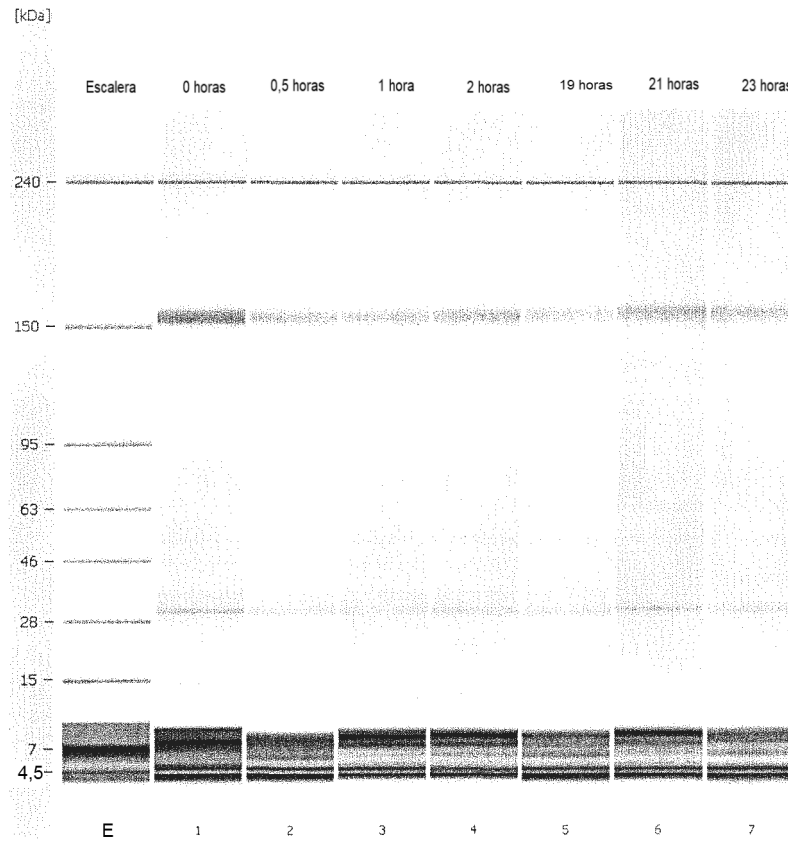


Figura 12. **Inhibición de la reducción de Ocrelizumab en LCCR por aurothiomalato:** imagen digital de tipo gel del análisis de Bioanalizador que indica que la adición de aurothiomalato 1 mM al mismo LCCR que se utilizó para el experimento de incubación mostrado en la figura 10 inhibió eficazmente la reducción de ocrelizumab.

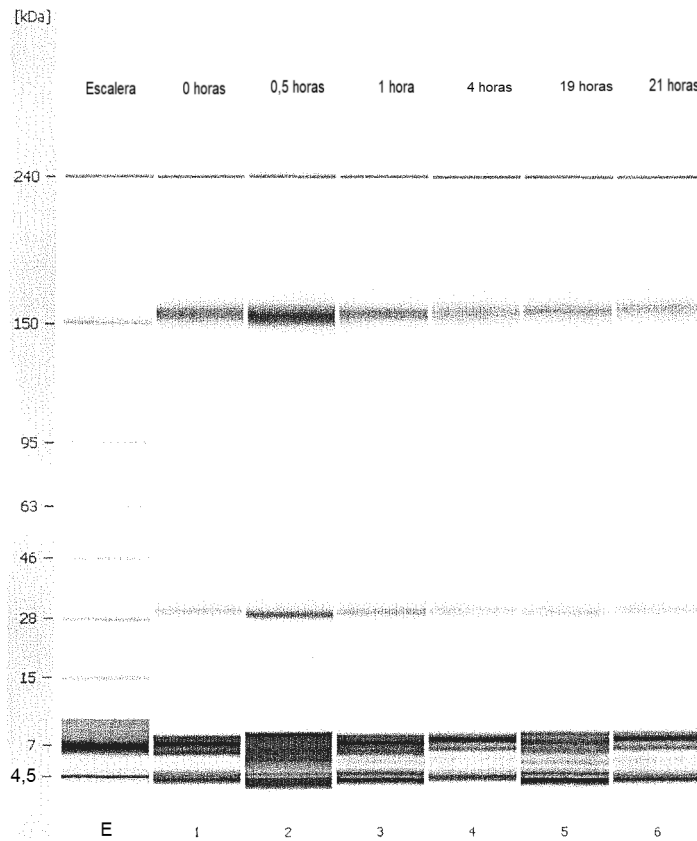


Figura 13. **Perdida de actividad reductora en LCCR:** El LCCR de uno de los procesos de fabricación de 12 kl para ocrelizumab (proceso 8) que estuvo sujeto a varios ciclos de congelación/descongelación se utilizó en un experimento de incubación. Sorprendentemente, no se observó reducción de ocrelizumab en el análisis de Bioanalizador, a pesar de la reducción de anticuerpos observada previamente en el LCCR recién descongelado del mismo lote de fermentación.

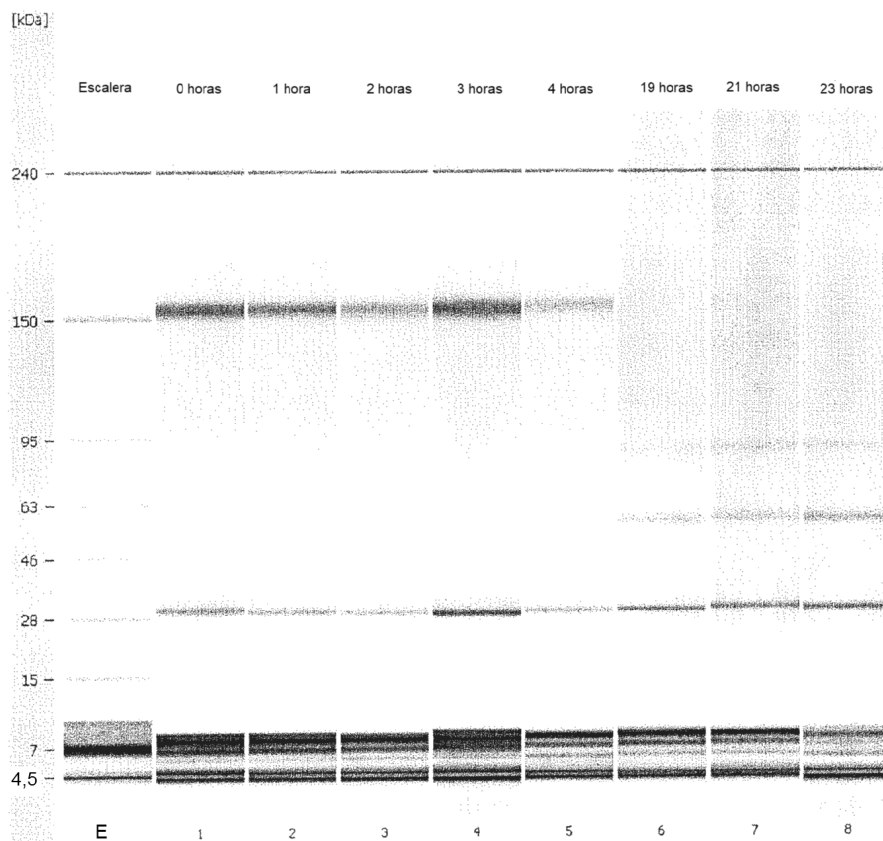


Figura 14. **La pérdida de actividad reductora en LCCR se restableció con la adición de NADPH:** la reducción de ocrelizumab se observó nuevamente en el ensayo de Bioanalizador después de la adición de NADPH a una concentración de 5 mM en el LCCR cuya actividad reductora se había perdido (véase la Figura 13).

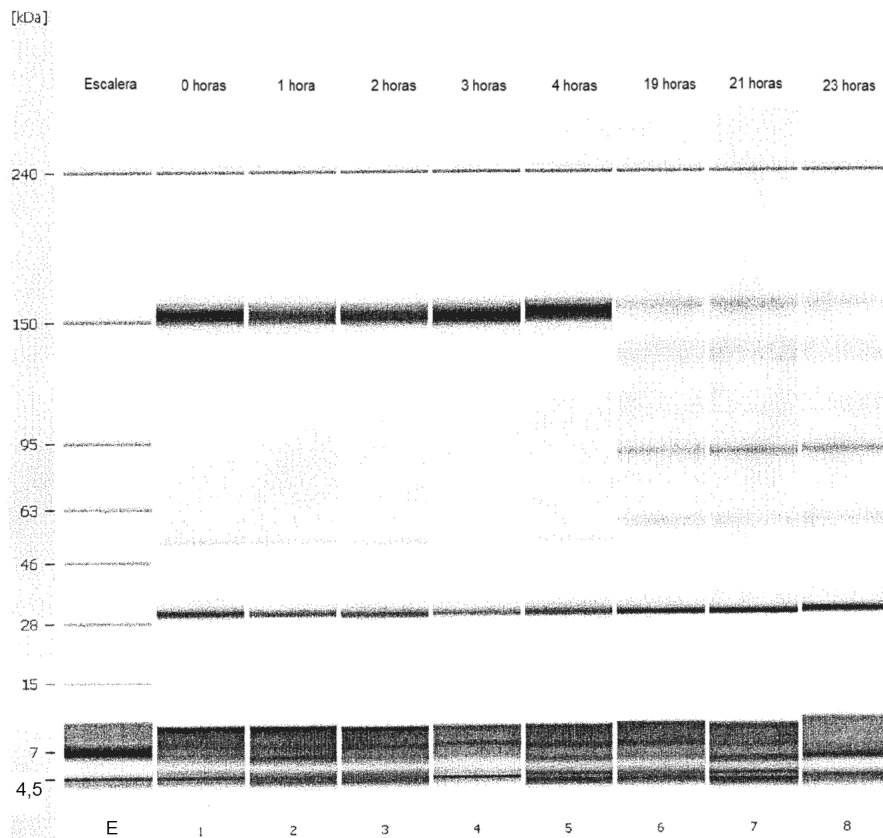


Figura 15. La pérdida de actividad reductora en LCCR se restableció con la adición de glucosa-6-fosfato: la reducción de ocrelizumab se observó nuevamente en el ensayo de Bioanalizador después de la adición de G6P a una concentración de 10 mM en el LCCR cuya actividad reductora se había perdido (véase la Figura 13).

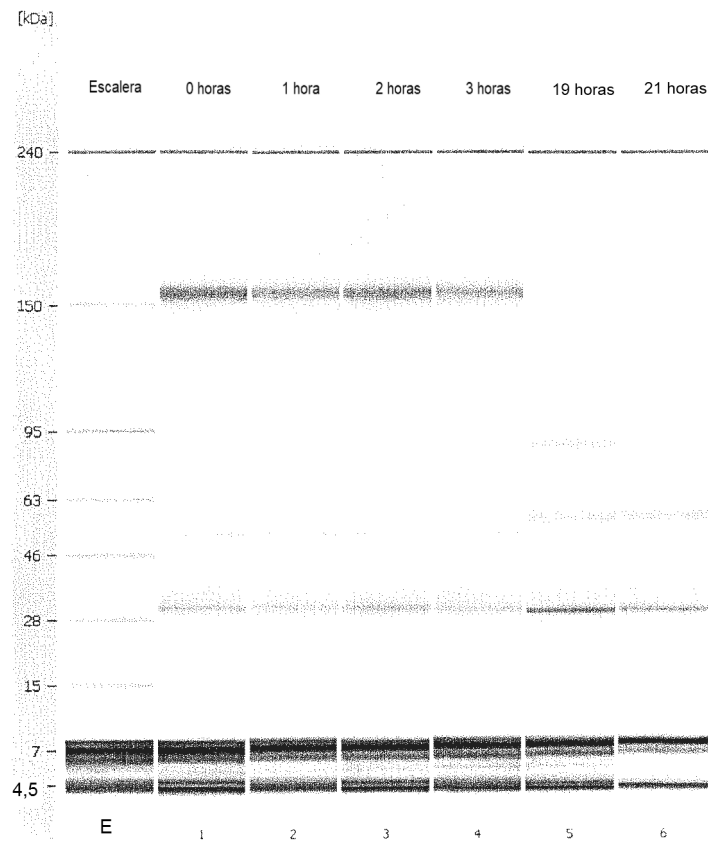


Figura 16. **Reducción de ocrelizumab:** imagen digital de tipo gel del análisis de Bioanalizador que muestra que el ocrelizumab se redujo en un experimento de incubación utilizando un LCCR del proceso 9 de 12 kl.

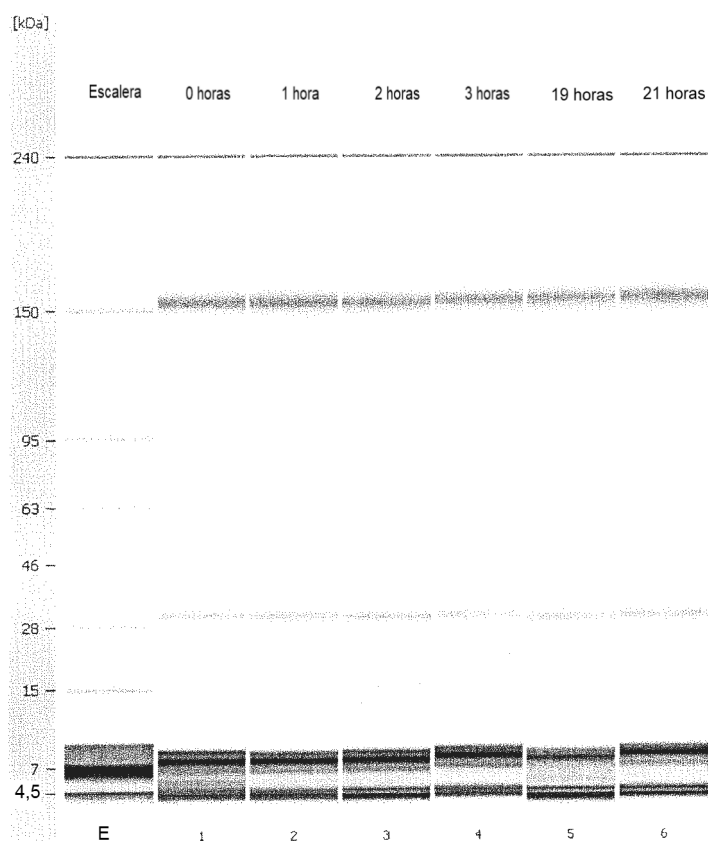


Figura 17. **El EDTA inhibe la reducción de ocrelizumab:** imagen digital de tipo gel del análisis de Bioanalizador que muestra que la reducción de ocrelizumab se inhibió en un experimento de incubación utilizando un LCCR del proceso 9 de 12 kl con EDTA añadido a una concentración de 20 mM.

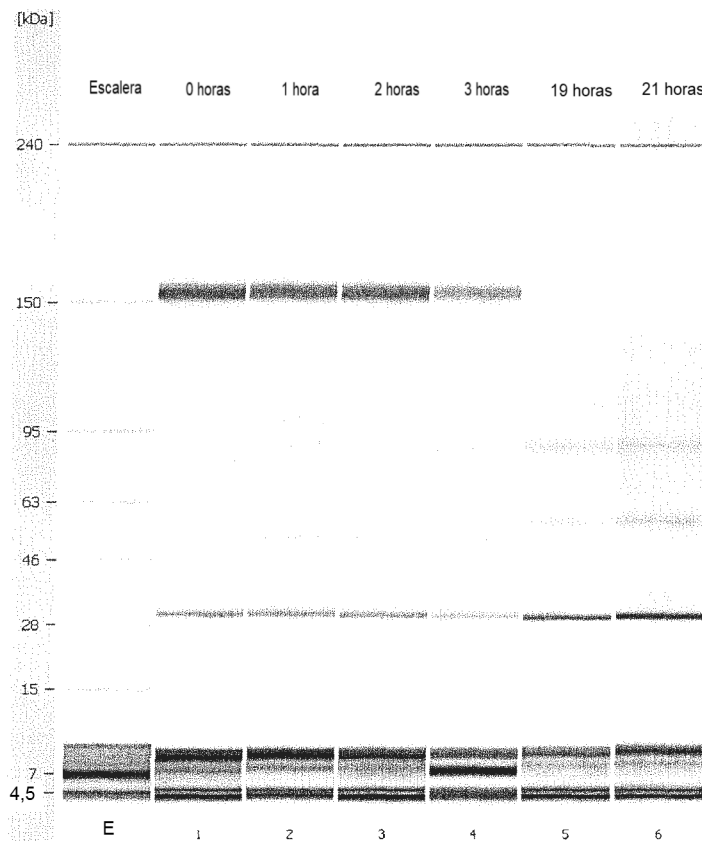


Figura 18. La pérdida de actividad reductora en el proceso 8 de LCCR, se restableció con la adición de glucosa-6-fosfato pero No la inhibición de la reducción con EDTA: la reducción de ocrelizumab se observó en el ensayo de Bioanalizador después de la adición de G6P a una concentración de 5 mM y 20 mM de EDTA en el LCCR cuya actividad reductora se había perdido (véase la Figura 13). A diferencia de los resultados que se muestran en la figura 17, la presencia de EDTA no bloqueó la reducción de ocrelizumab.

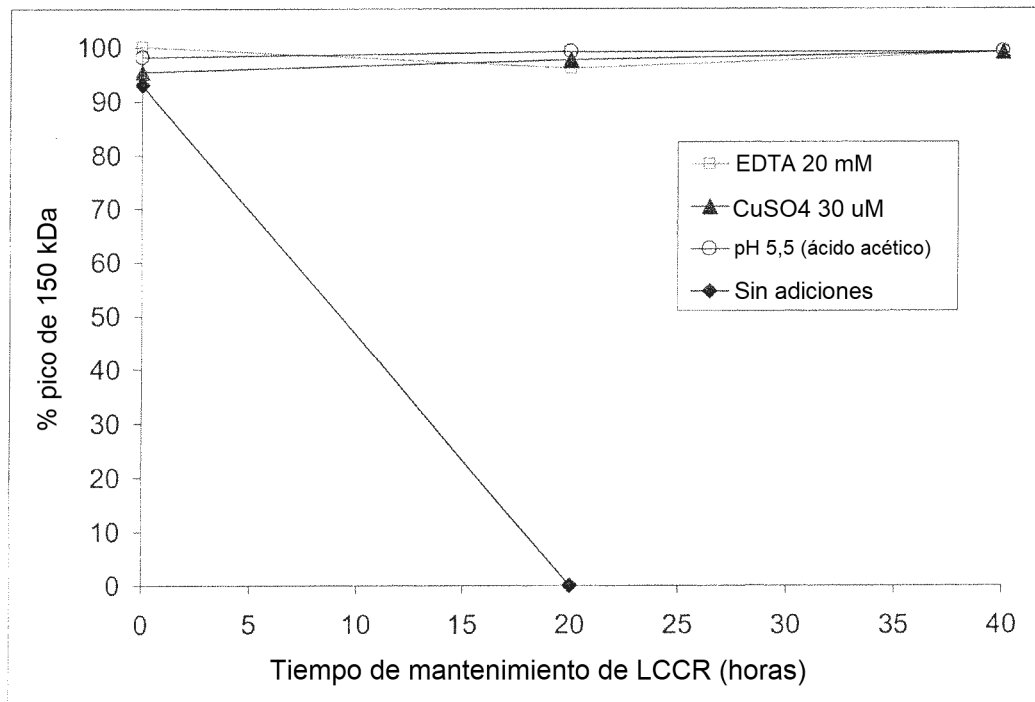


Figura 19. **Inhibición de la reducción de ocrelizumab:** Los tres métodos diferentes (adición de EDTA, adición de CuSO₄ y ajuste del pH a 5,5) son eficaces para inhibir la reducción de ocrelizumab como se demostró mediante los resultados cuantitativos del Bioanalizador que muestran que casi el 100 % del anticuerpo intacto (150 kDa) permanecía en los conjuntos de elución de proteína A. En cambio, ocrelizumab se redujo completamente en el LCCR de control después de 20 horas de tiempo de mantenimiento de LCCR.

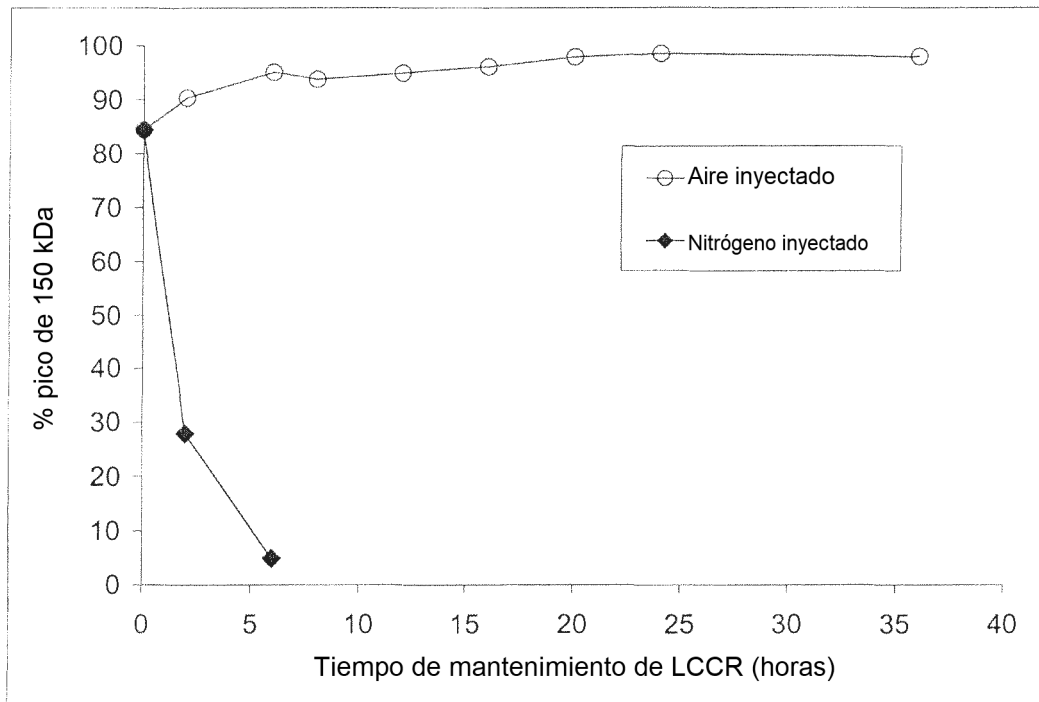


Figura 20. **Inhibición de la reducción de ocrelizumab:** la inyección de aire en el LCCR fue también eficaz para inhibir la reducción de ocrelizumab, como se demostró con los resultados cuantitativos del Bioanalizador que muestran que casi el 100 % del anticuerpo intacto (150 kDa) permanecía en los conjuntos de elución de proteína A. En cambio, el ocrelizumab se redujo casi por completo en el LCCR de control después de 5 horas de inyección con nitrógeno.

Cadena ligera

1 15 30 45
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPK
46 60 75 90
LLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ
91 105
HYTTPPTFGQGTKVEIK

Figura 21

Cadena pesada

1 15 30 45
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGL
46 60 75 90
EWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAED
91 105 120
TAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT LVT VSS

Figura 22

Proceso de cultivo típico discontinuo o semicontinuo

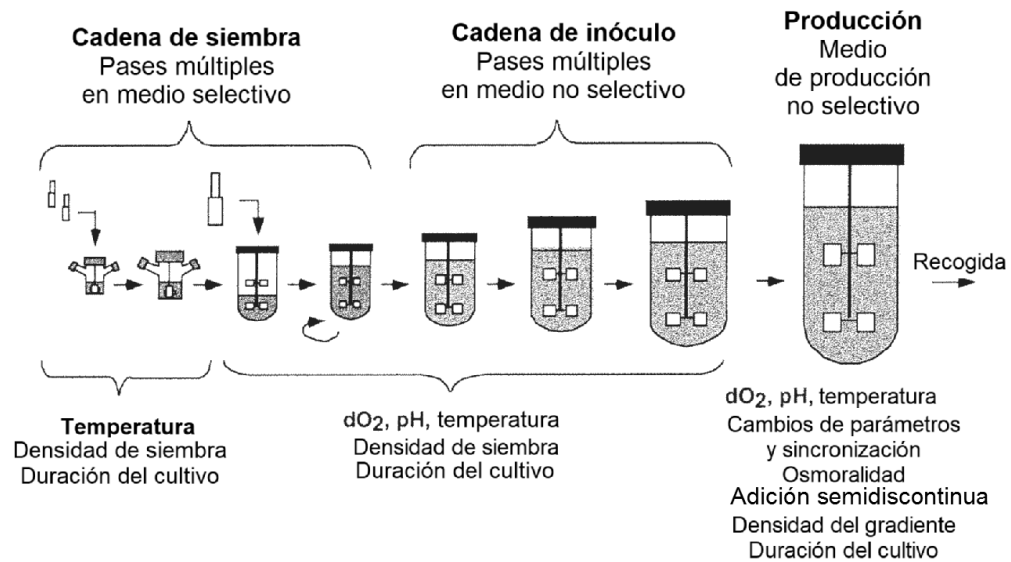


Figura 23

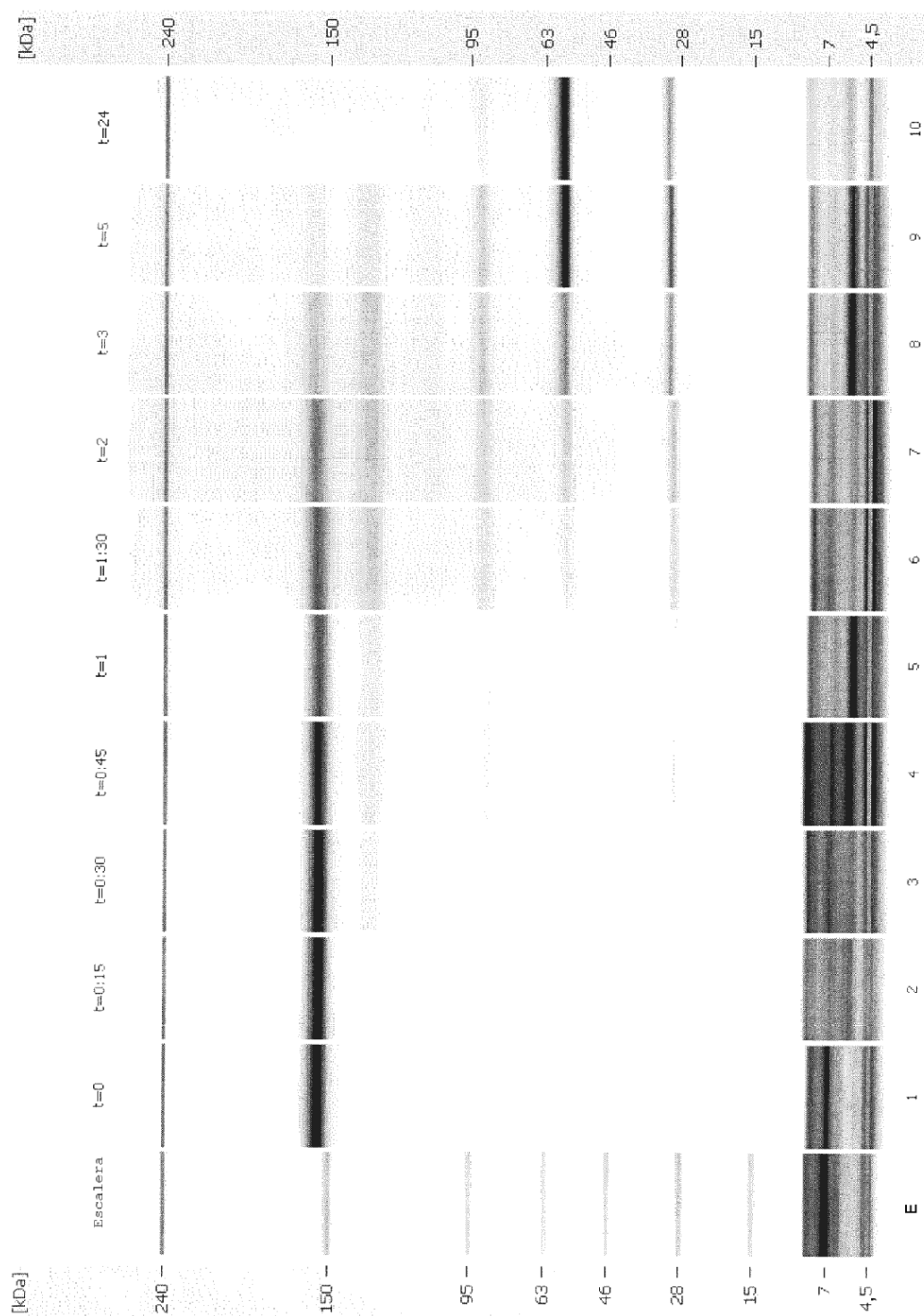


FIG. 24

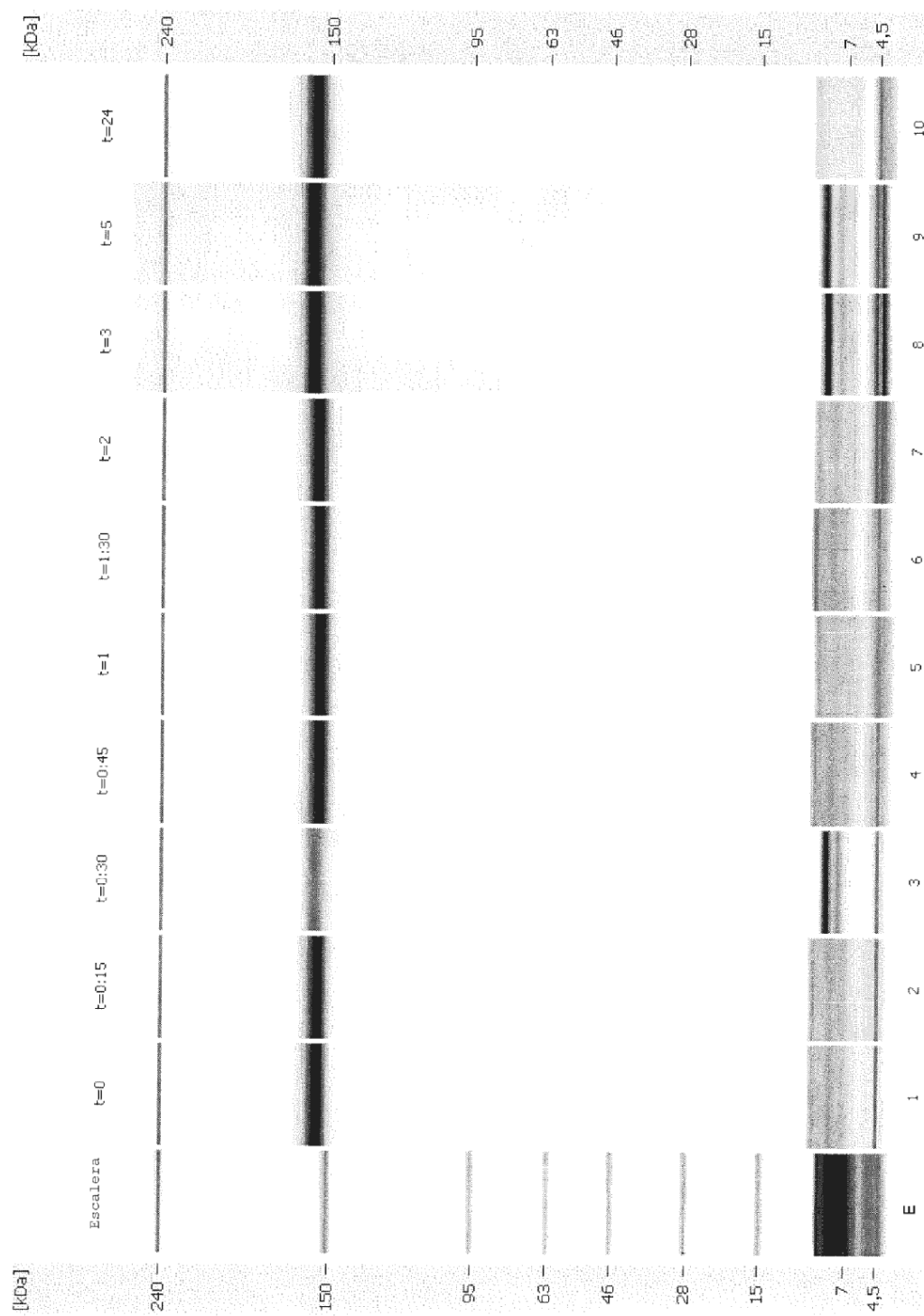


FIG. 25

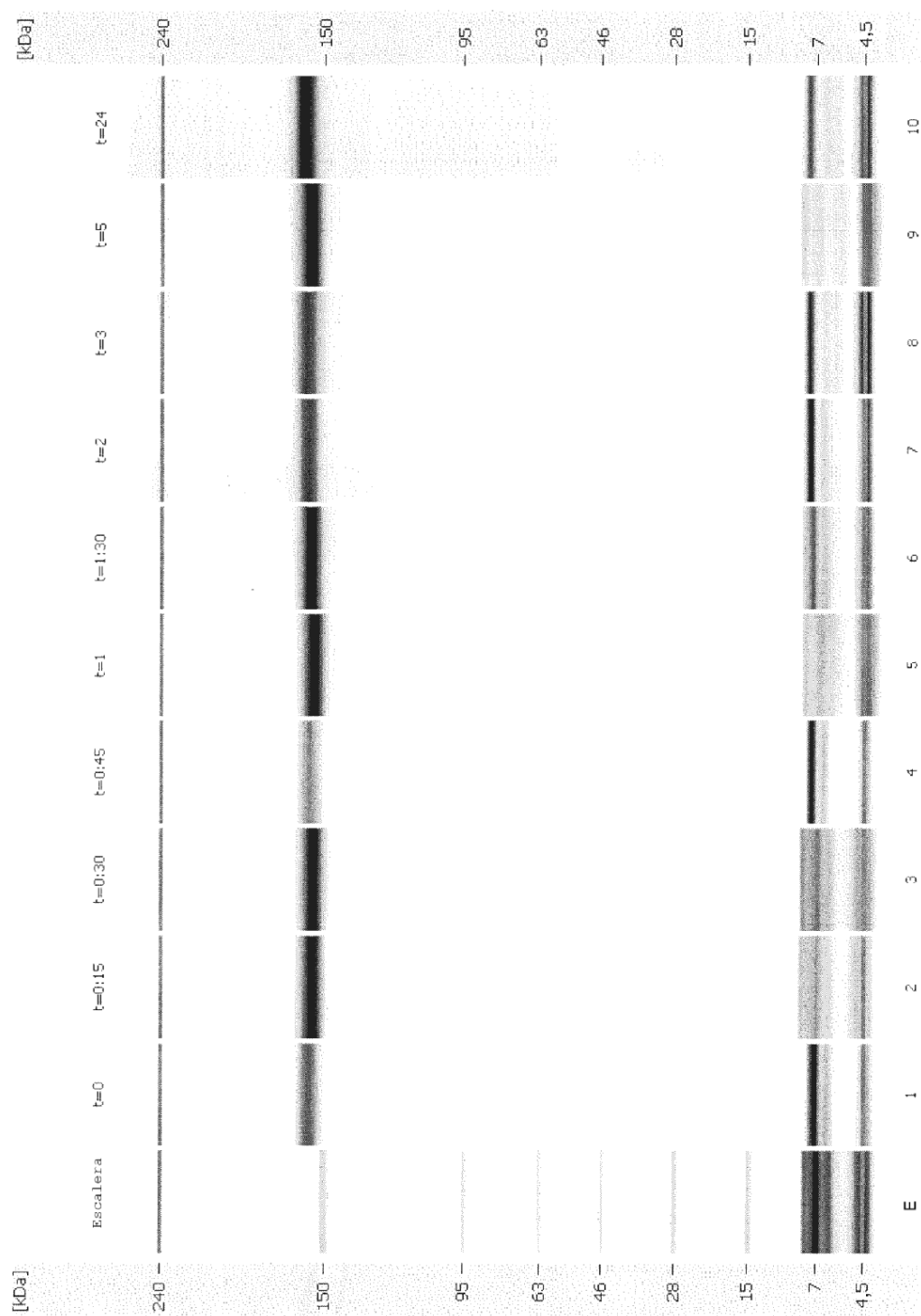


FIG. 26

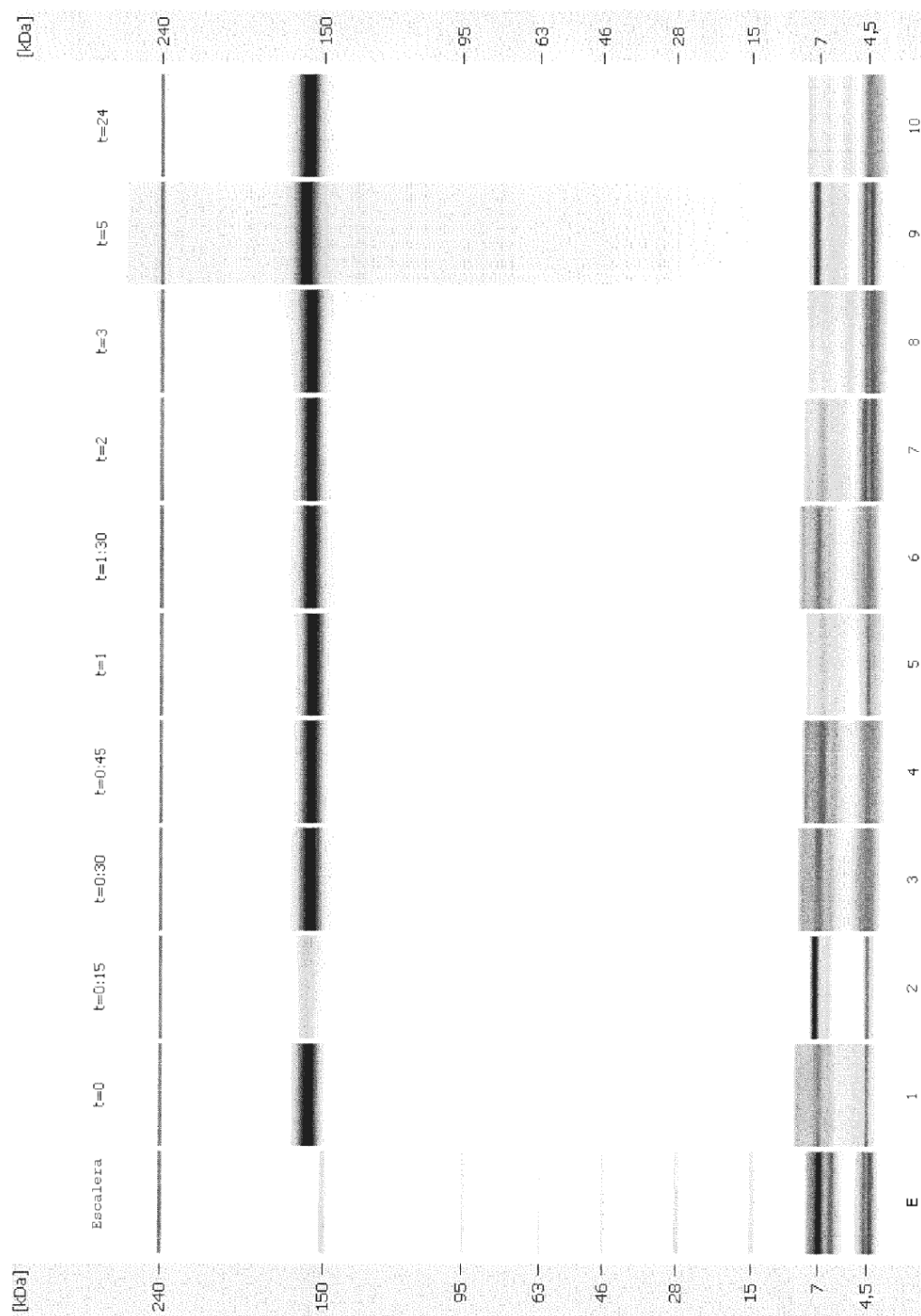


FIG. 27

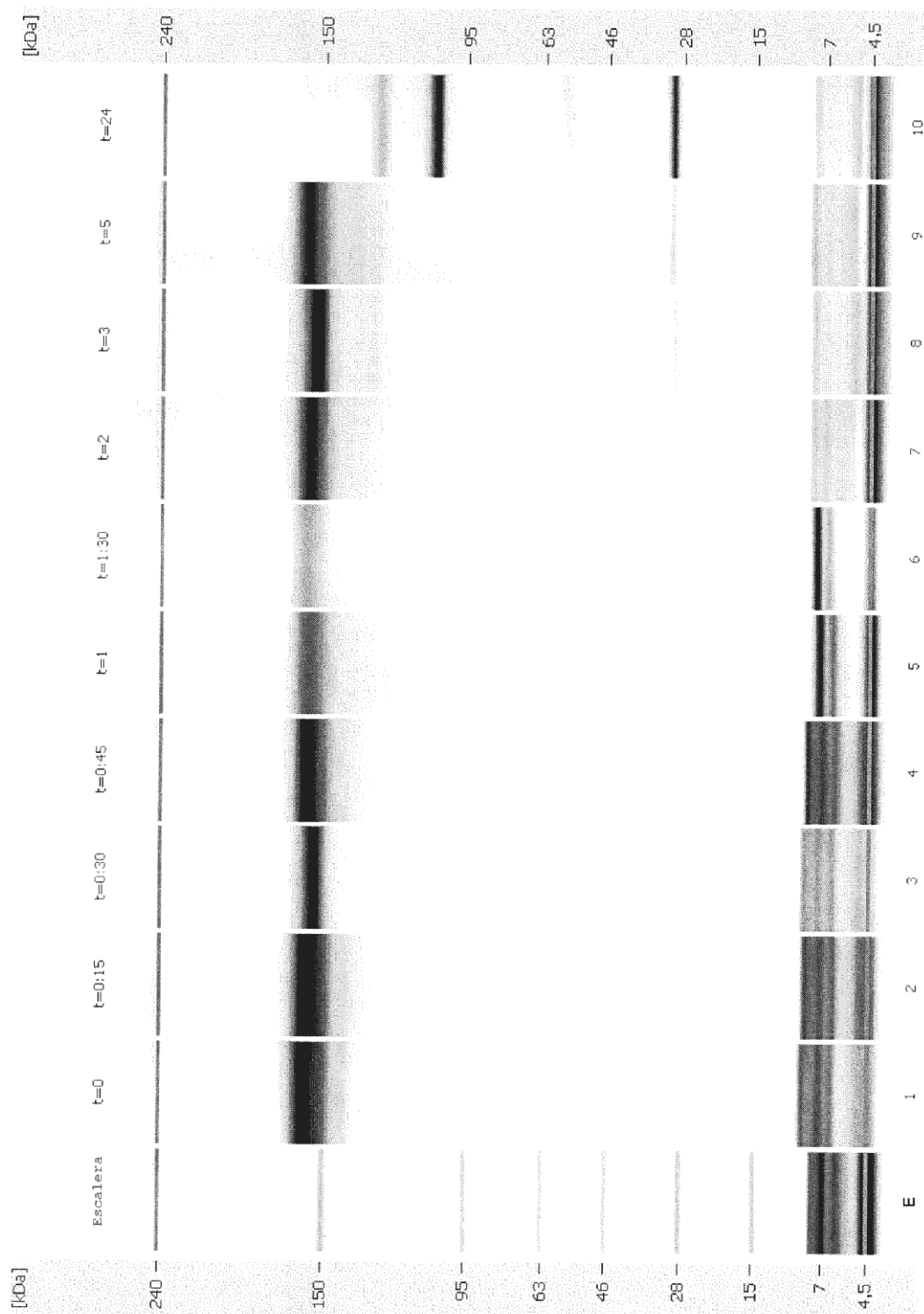


FIG. 28

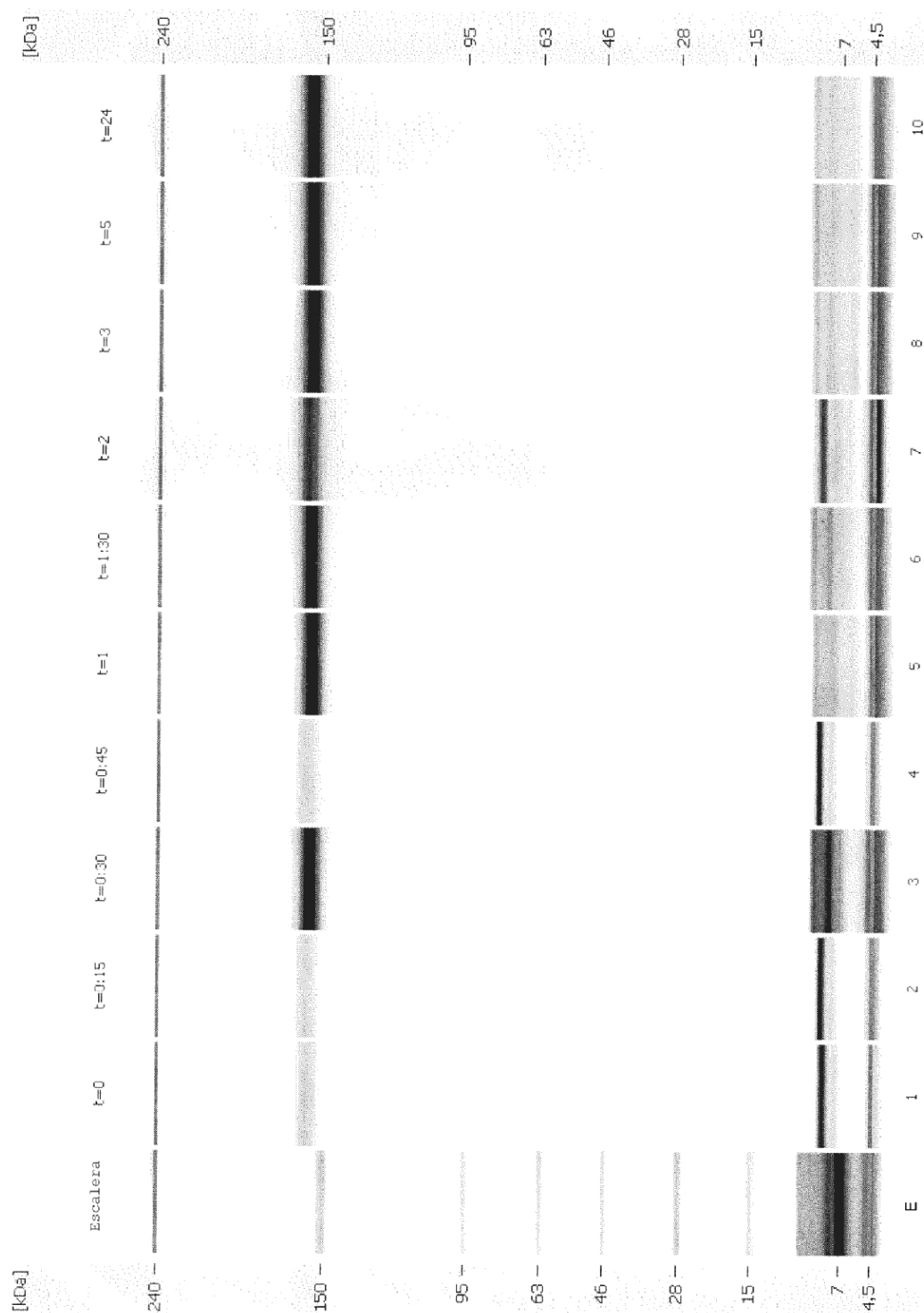


FIG. 29

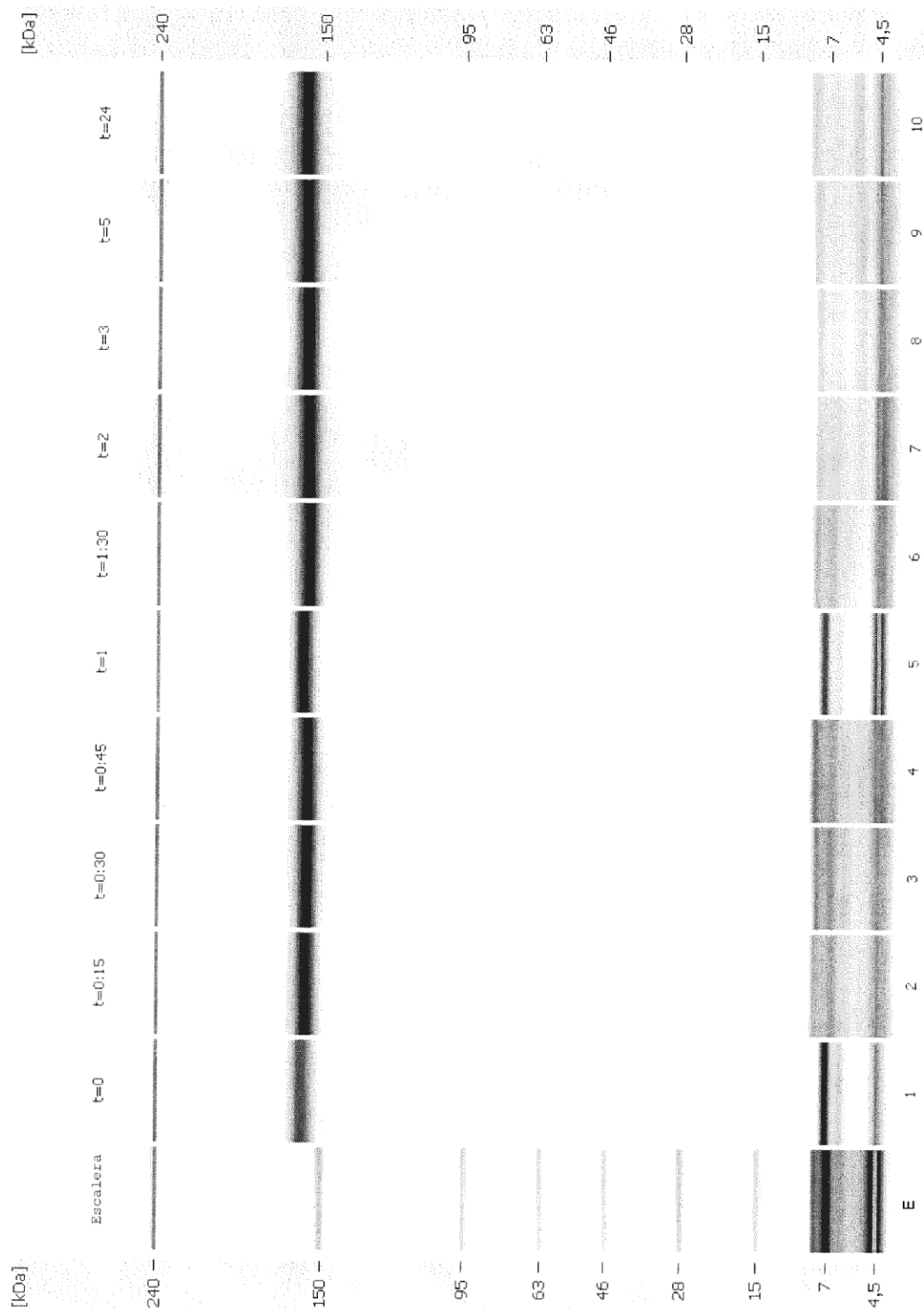


FIG. 30

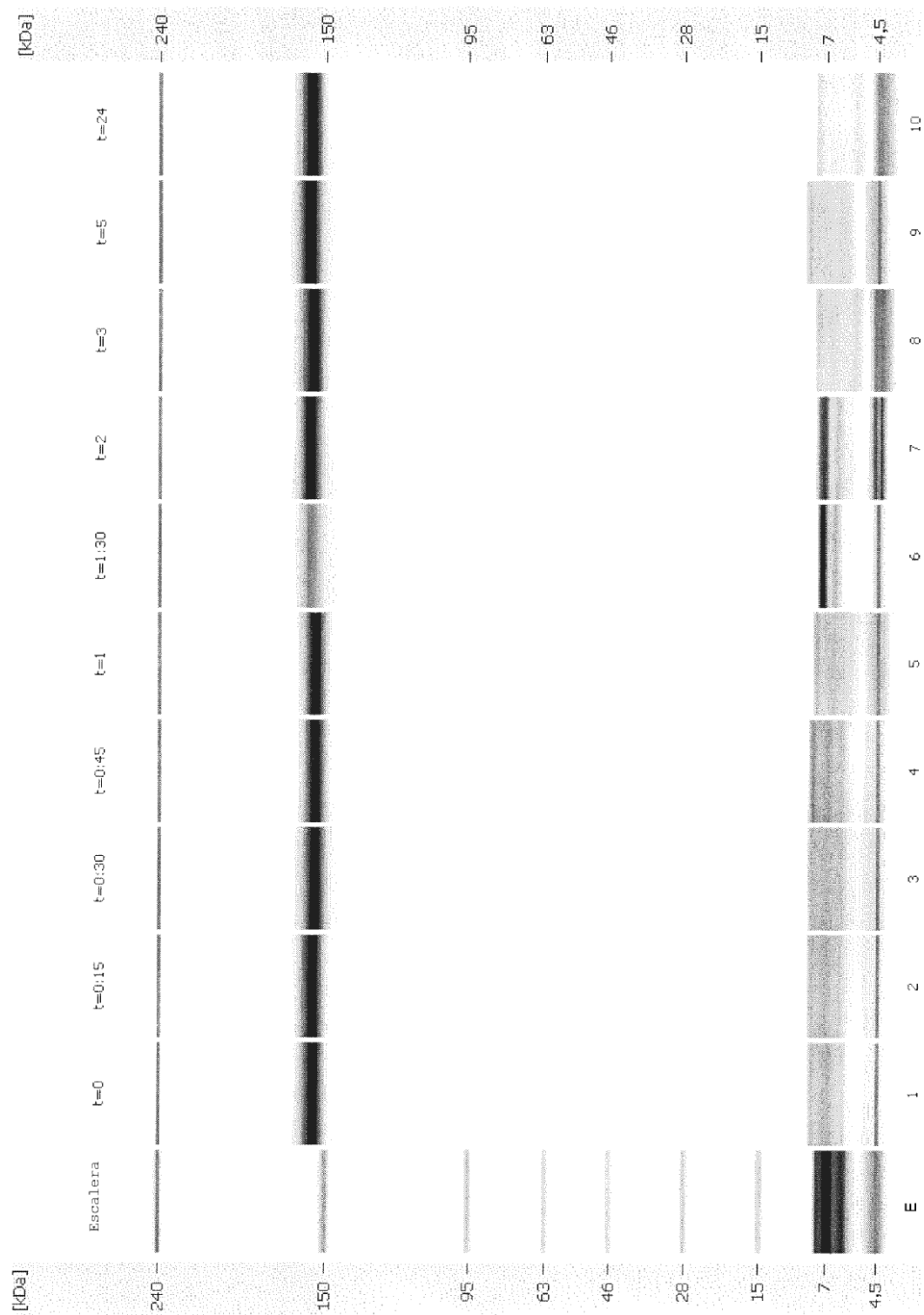


FIG. 31

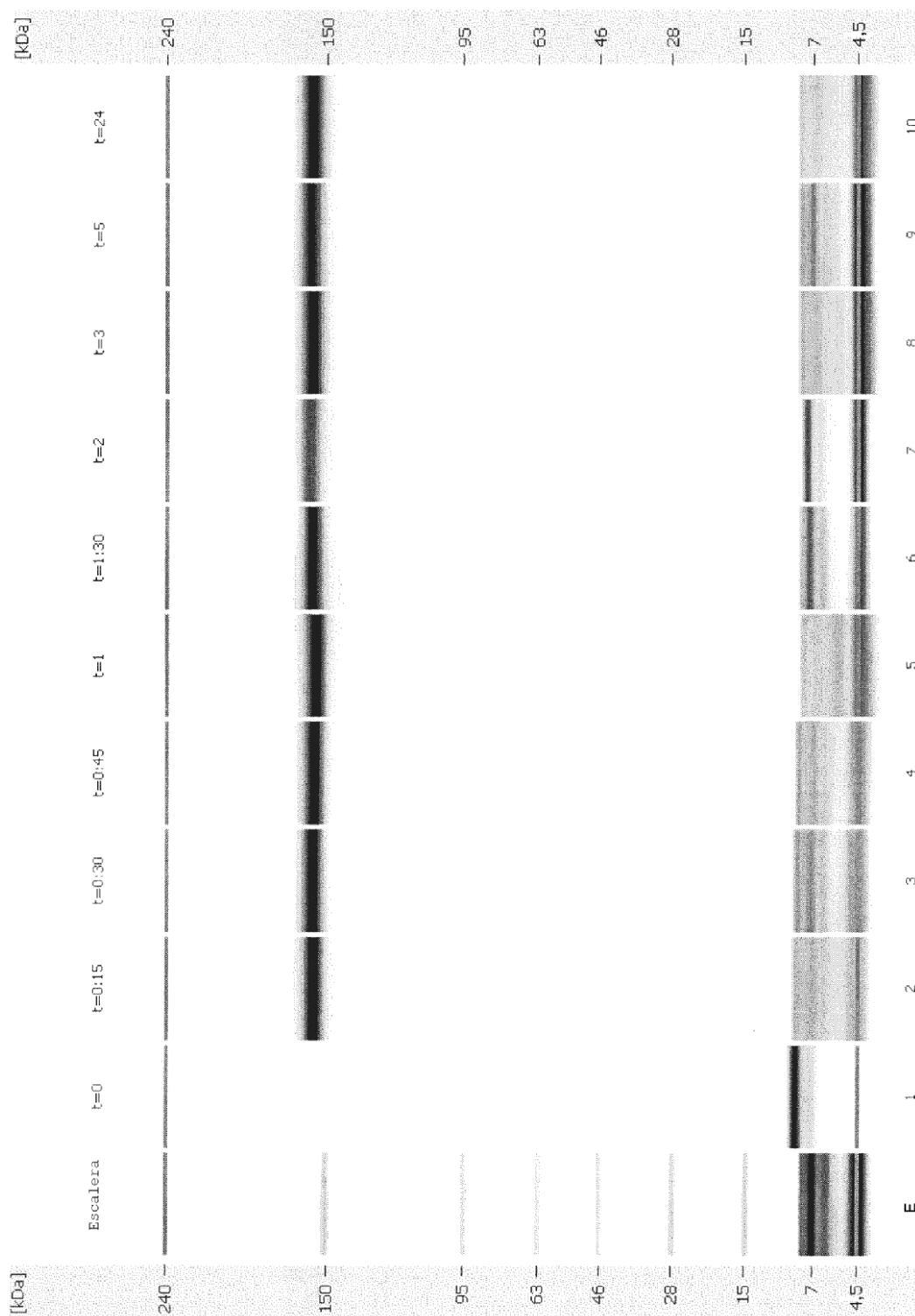


FIG. 32

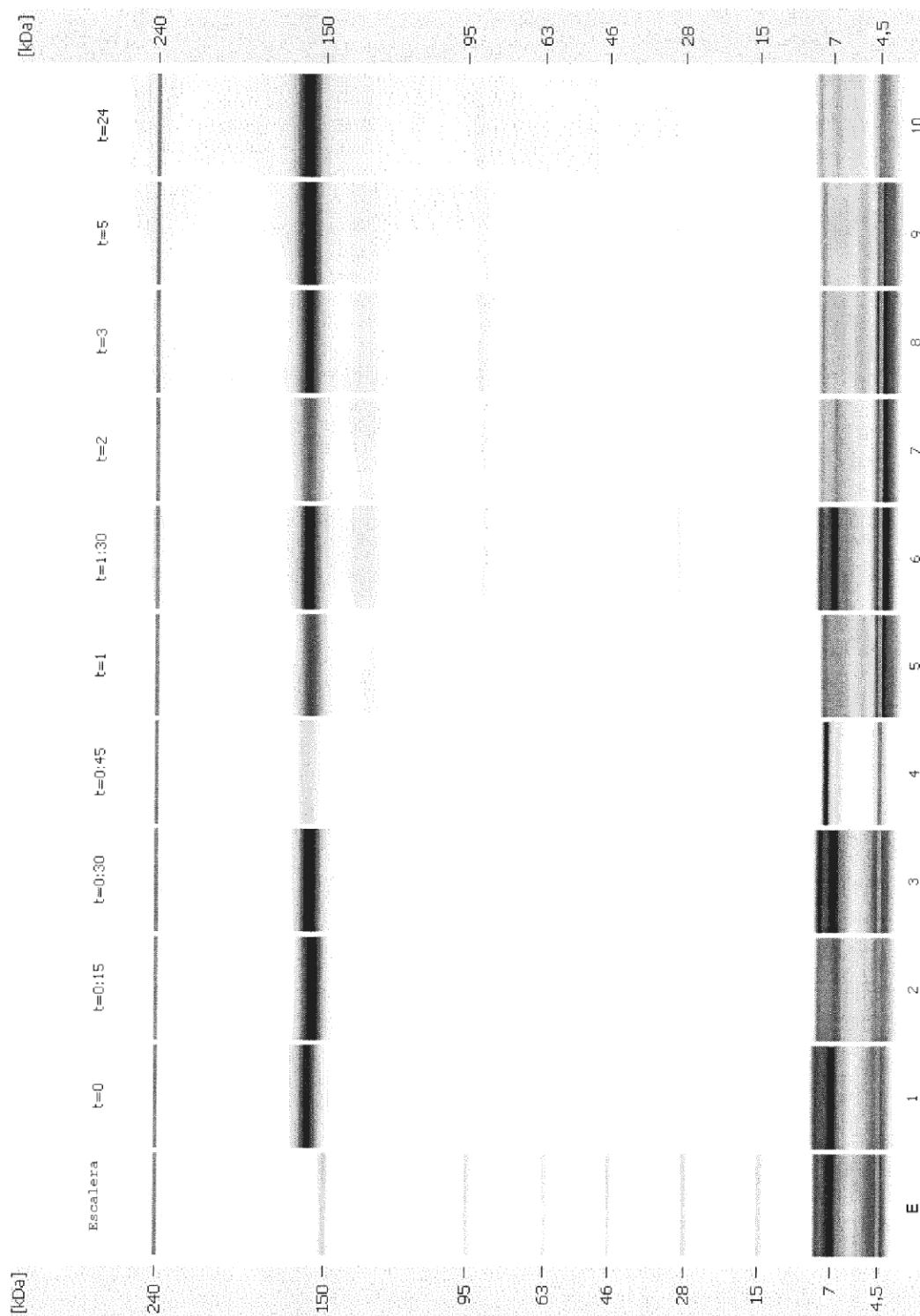


FIG. 33

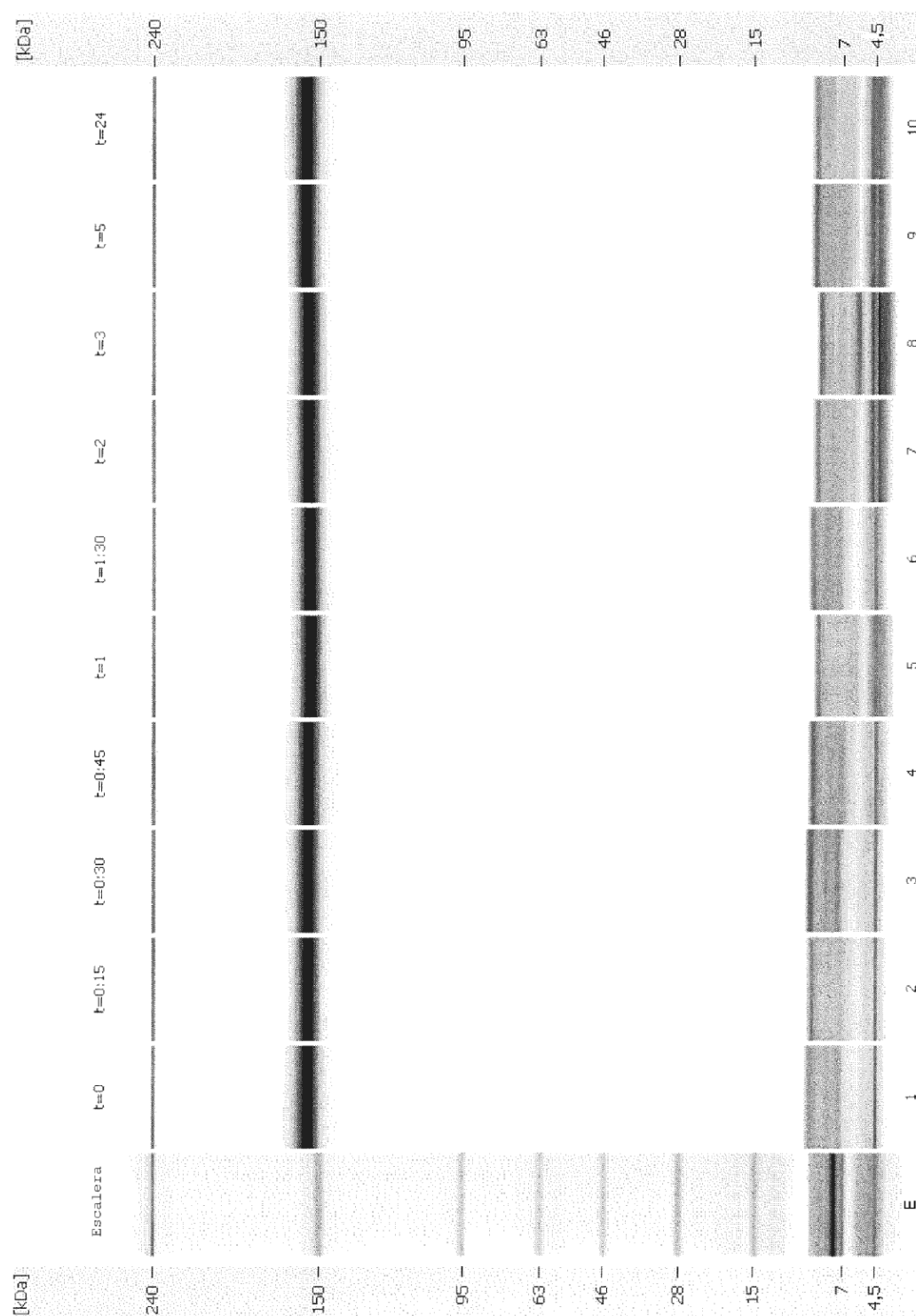


FIG. 34

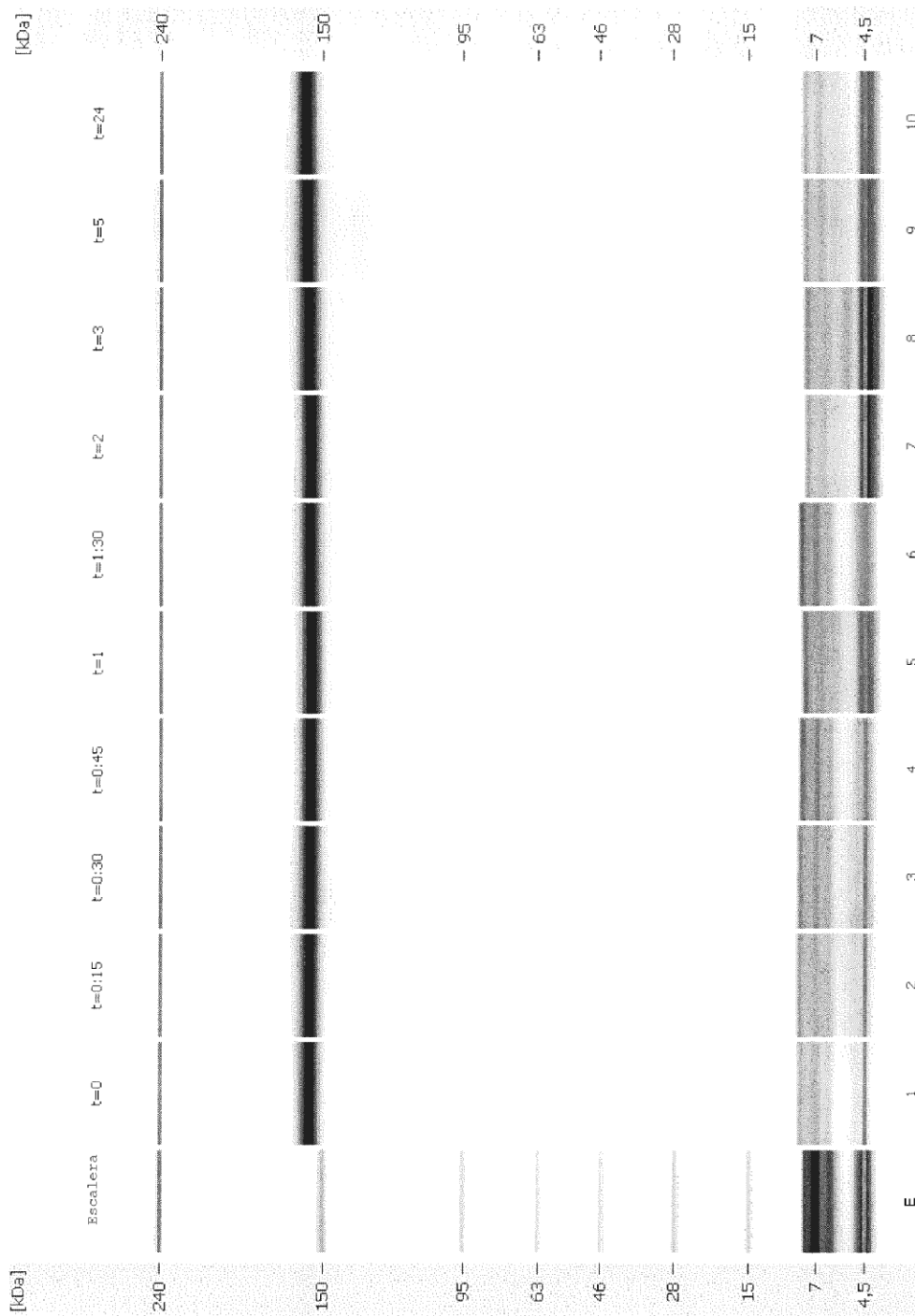


FIG. 35

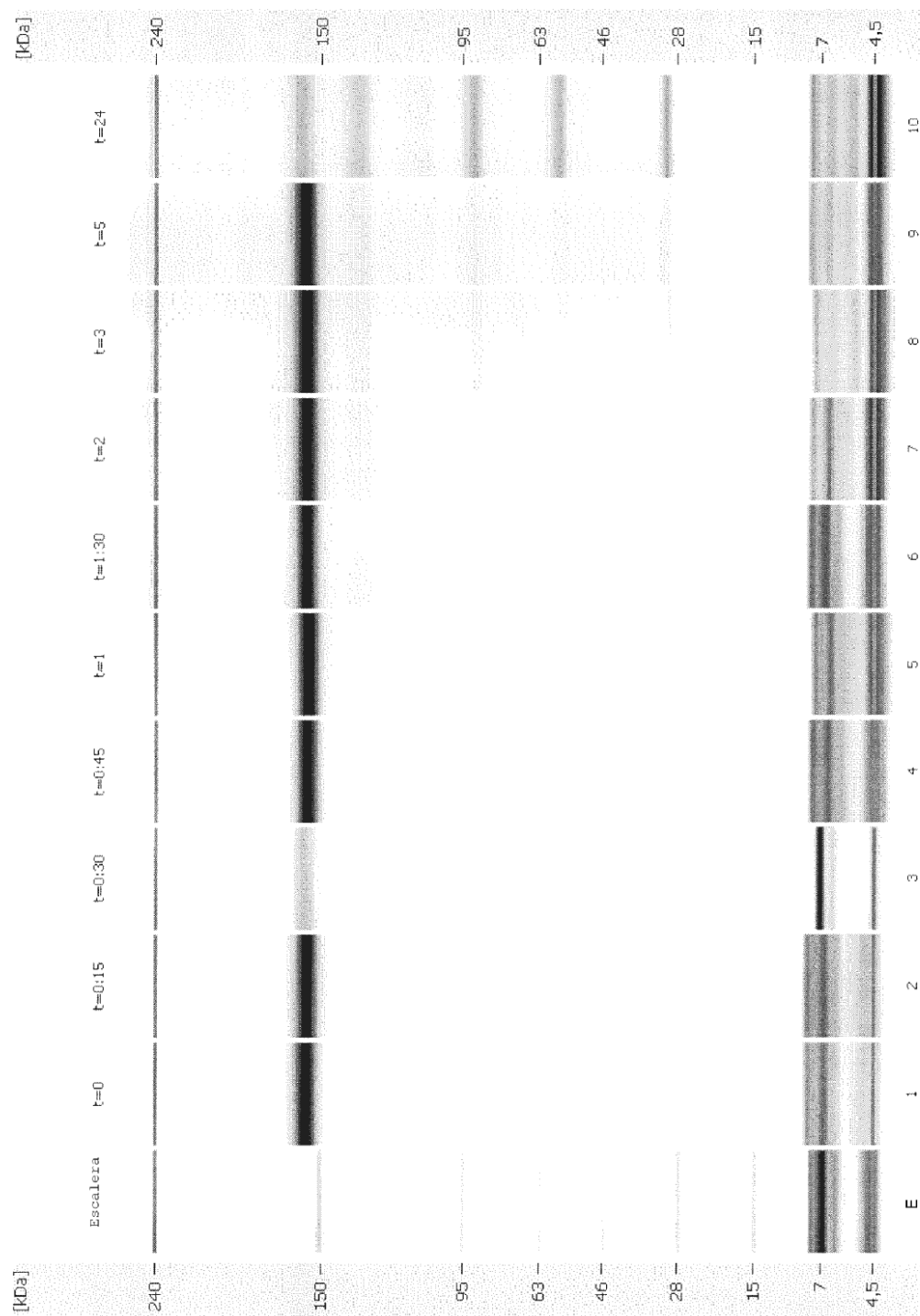


FIG. 36

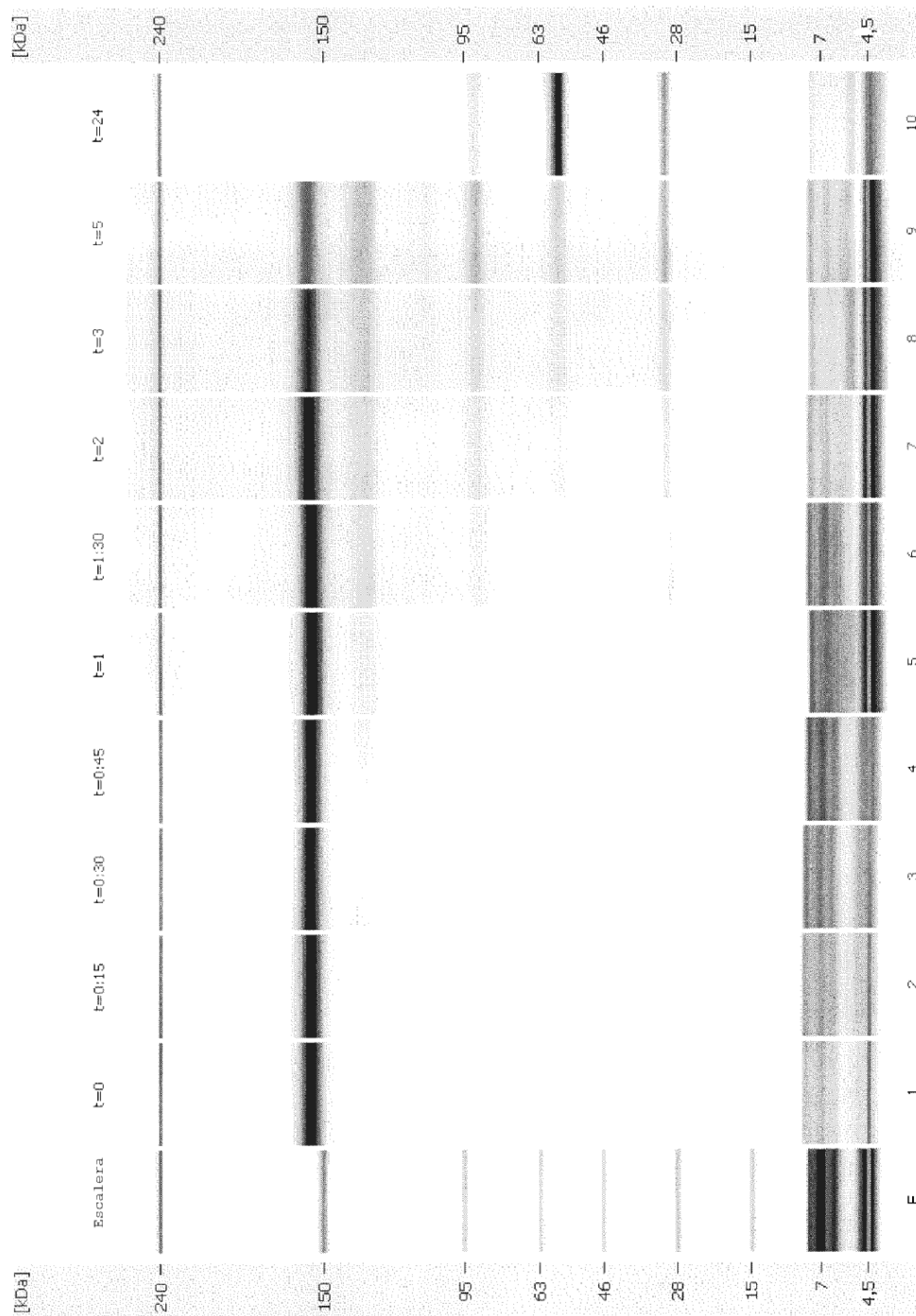


FIG. 37

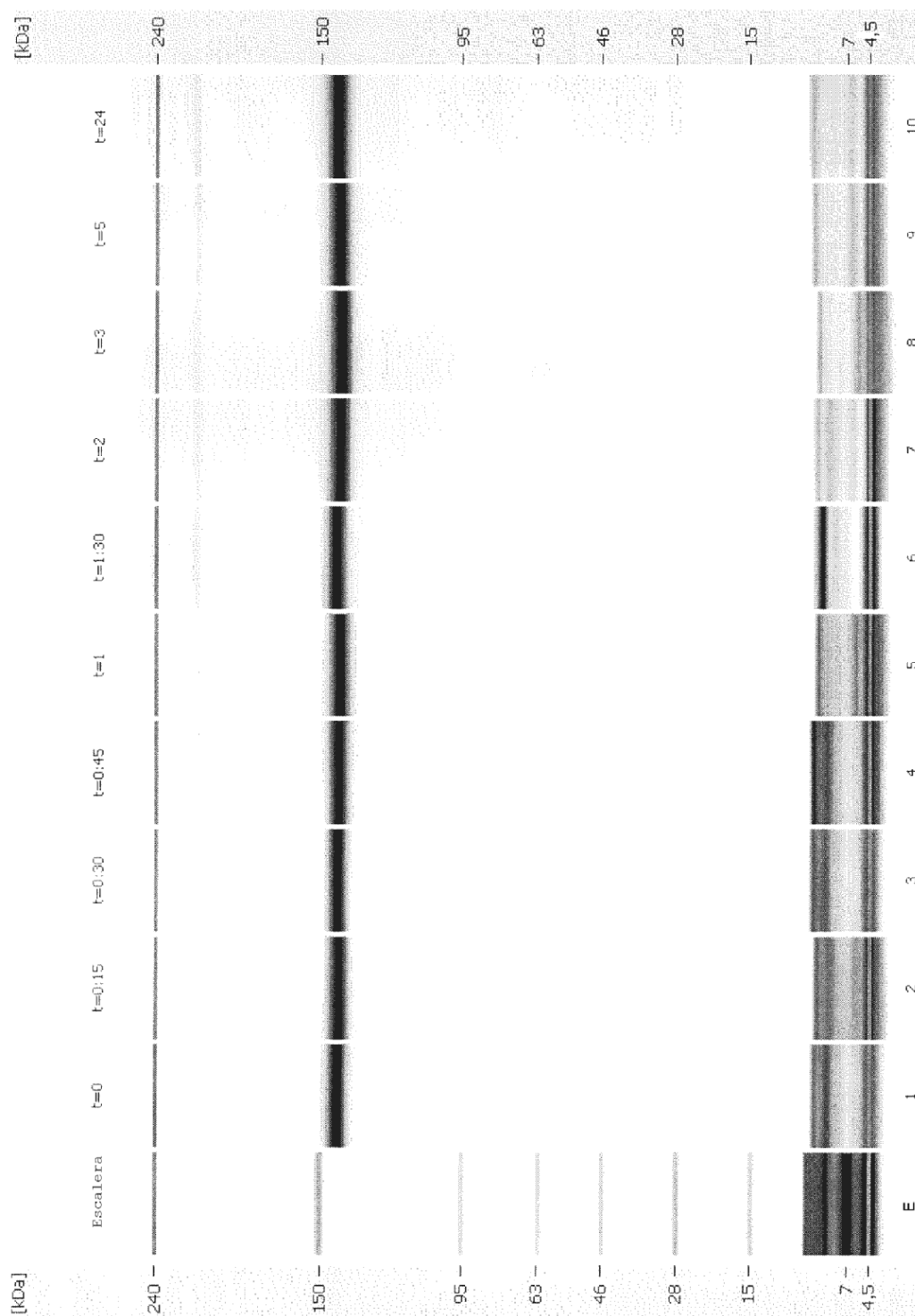


FIG. 38

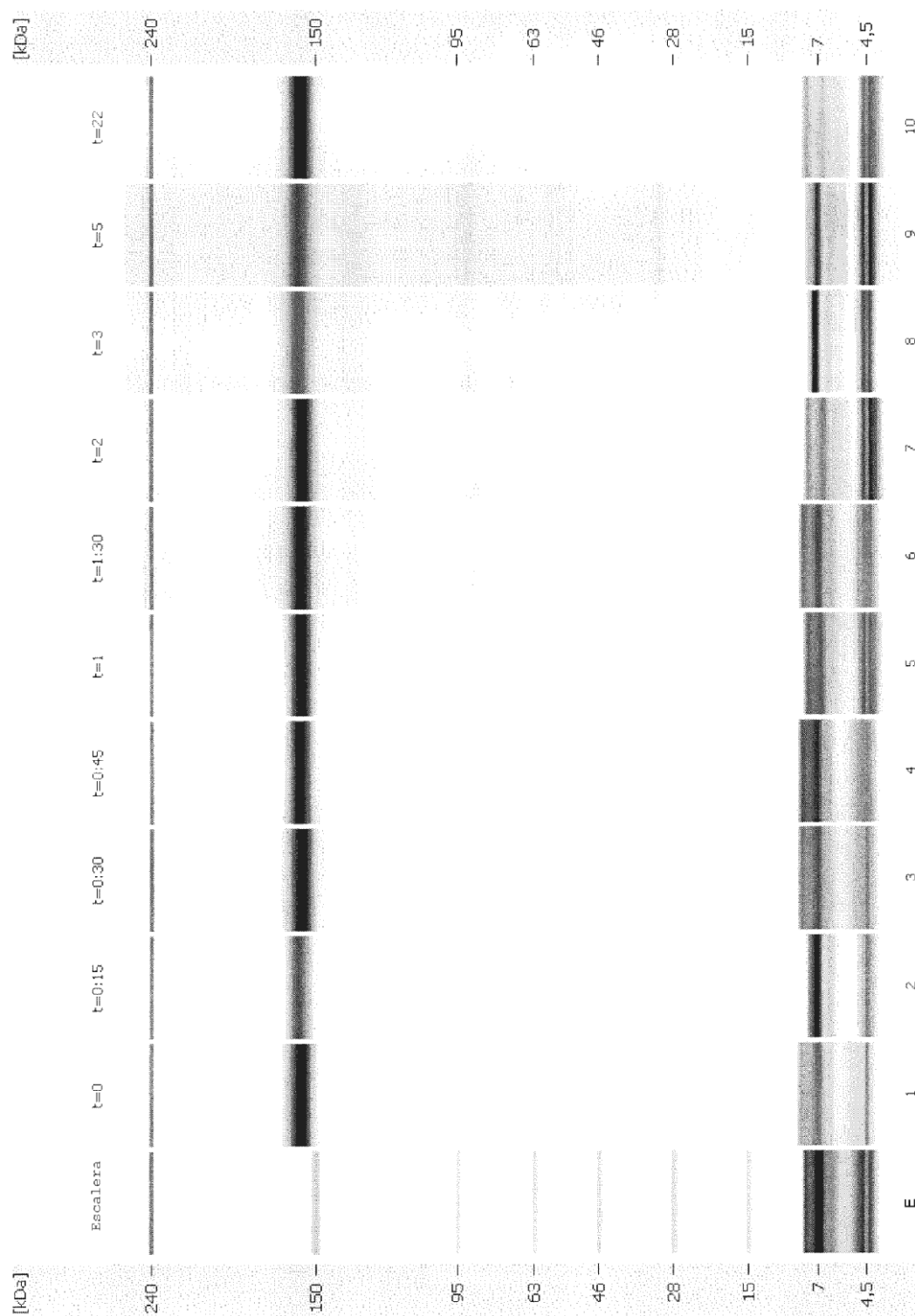


FIG. 39

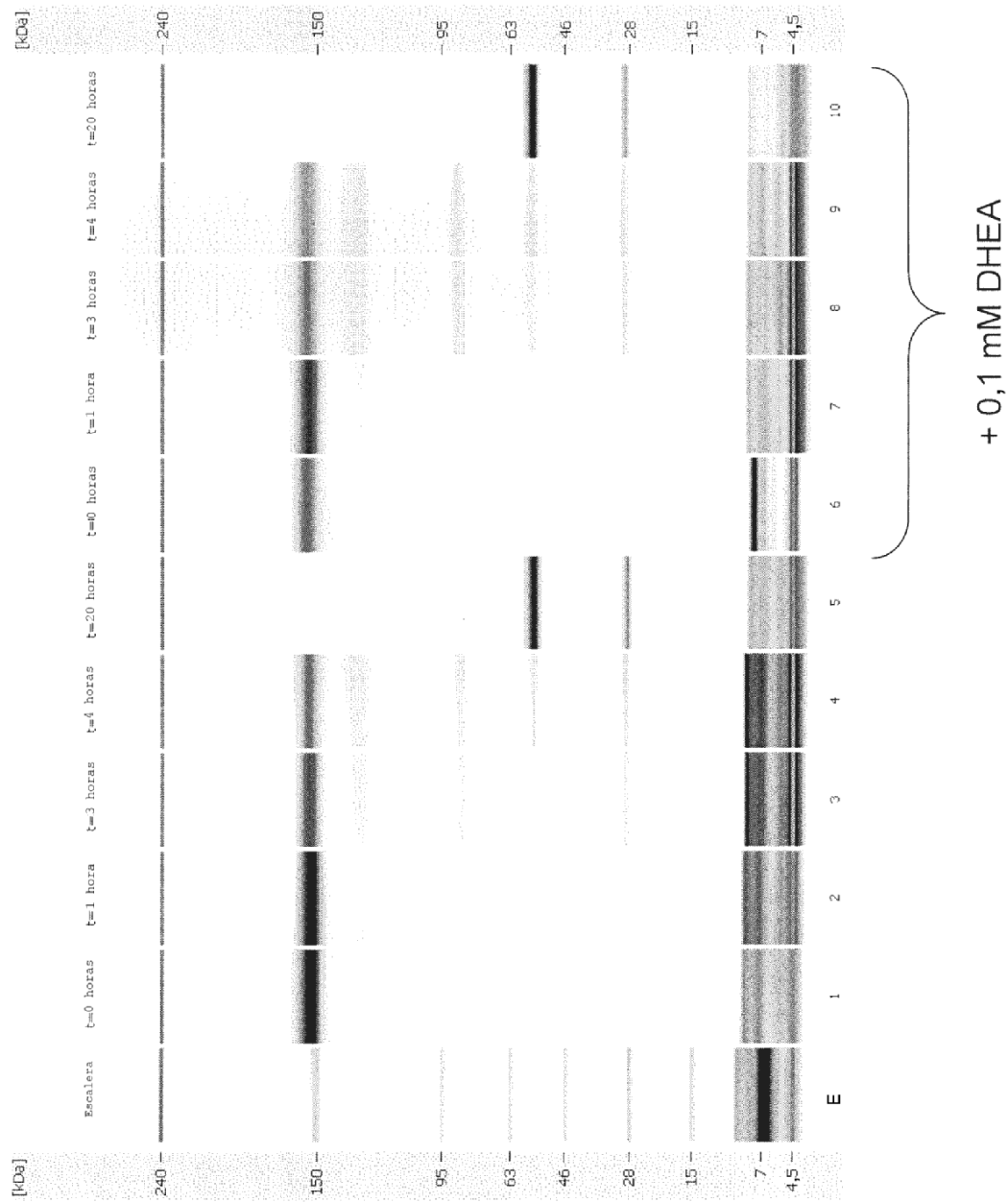


FIG. 40

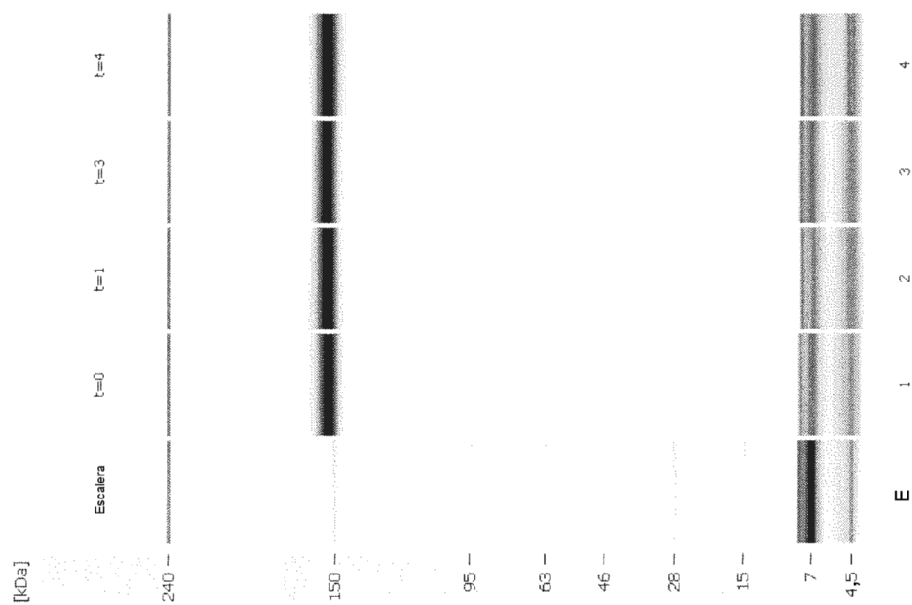


FIG. 41