

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 997 332**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

A61K 47/68 (2007.01)

C07K 14/605 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.08.2018** **PCT/US2018/045212**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.02.2019** **WO19028382**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.08.2018** **E 18759787 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2024** **EP 3661562**

54 Título: **Método de conjugación de cys-mAb**

30 Prioridad:

04.08.2017 US 201762541522 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.02.2025

73 Titular/es:

AMGEN INC. (100.00%)
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, California 91320-1799, US

72 Inventor/es:

ACHMATOWICZ, MICHAL;
ROMANINI, DANTE;
FALSEY, JAMES R.;
HERBERICH, BRADLEY J. y
THIEL, OLIVER R.

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

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

ES 2 997 332 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

Método de conjugación de cys-mAb

5 Campo de la invención

La presente divulgación se refiere a un método de adición de capuchón, reducción y oxidación de cys-mAb para proporcionar material homogéneo para posteriores reacciones de conjugación.

10 Antecedentes de la invención

Las biomoléculas conjugadas son una serie diversa de sustancias que comprenden múltiples moléculas precursoras, de las que al menos una se obtiene de un sistema biológico. Muy a menudo, el o los componentes derivados biológicamente se producen usando técnicas de ADN recombinante. En la industria farmacéutica, se han investigado las biomoléculas conjugadas como tratamientos para una diversidad de afecciones médicas. En estos casos, el conjugado puede proporcionar varios beneficios terapéuticos al combinar propiedades útiles de dos o más moléculas precursoras en una sola entidad.

Una clase particularmente satisfactoria de bioconjugados farmacéuticos son los conjugados de anticuerpo, también denominados conjugados de anticuerpo-fármaco. Estas moléculas consisten en un anticuerpo, típicamente derivado de cultivo celular de mamífero, y una molécula sintética con actividad biológica o farmacológica. Se han aprobado varios conjugados de anticuerpo-fármaco como tratamientos contra el cáncer, y muchos más están en desarrollo clínico y preclínico. Todos los conjugados de anticuerpo-fármaco que se han aprobado hasta la fecha se fabrican usando química no específica que produce una mezcla de moléculas conjugadas.

Los productos farmacéuticos basados en conjugados de anticuerpo específicos de sitio, donde una molécula sintética está fijada en sitios definidos en la molécula de anticuerpo, pueden proporcionar beneficios terapéuticos, así como control de calidad y/o vida útil mejorados. Por lo tanto, se han emprendido numerosos esfuerzos por desarrollar métodos para producir conjugados de anticuerpos específicos de sitio. Una estrategia común para la conjugación específica de sitio es el uso de un anticuerpo mutante de cisteína (Cys-mAb o Tiomab), en que se introduce un nuevo aminoácido de cisteína en la estructura primaria del anticuerpo. Esta cisteína manipulada puede usarse como sitio para conjugar una molécula sintética.

Jagath R Junutula *et al.*, "Site-specific conjugation of a cytotoxic drug to an antibody improves the therapeutic index", *Nature Biotechnology*, vol. 26, n.º 8 (2008) se refiere a la manipulación de sustituciones con cisteína en posiciones en la cadena ligera y pesada de los anticuerpos que proporcionan grupos tiol reactivos y no alteran el plegamiento y el ensamblaje de la inmunoglobulina, o alteran la unión al antígeno.

Christopher R Behrens *et al.*, "Methods for site-specific drug conjugation to antibodies", *MABS*, vol. 6, n.º 1 (2014) se refiere a métodos para la conjugación de fármacos específica de sitio a anticuerpos, y compara los resultados *in vivo* con sus equivalentes conjugados no específicamente.

El documento WO 2016/067013 A1 se refiere a un método en fase sólida de síntesis de conjugados de biomolécula-fármaco.

El documento WO 2009/012256 A1 se refiere a anticuerpos humanizados y conjugados contra Cd79b, útiles para el tratamiento de tumores hematopoyéticos en mamíferos.

El documento WO 2005/084390 A2 se refiere a conjugados de proteína-fármaco y a métodos para preparar conjugados de proteína-fármaco y marcados con proteína, así como proteínas que tienen puntos de conjugación para recibir un fármaco o marcador.

El documento WO 2018/136440 A1 se refiere a métodos de tratamiento de enfermedades y trastornos metabólicos usando una composición que comprende una proteína de unión a antígeno específica para el polipéptido GIPR conjugado con un agonista del receptor de GLP-1.

El documento WO 2017/137628 A1 se refiere a un proceso para la reducción selectiva de anticuerpos manipulados con cisteína. El documento WO 2015/086853 A1 se refiere a métodos para obtener un conjugado de proteína en donde un residuo de cisteína de la proteína sirve como punto de fijación para el resto químico conjugado a la proteína.

El documento WO 2017/055582 A1 se refiere a conjugados de proteína y, en particular, conjugados de más de dos proteínas o polipéptidos.

La conjugación específica de sitio con una proteína Cys-mAb requiere la cadena lateral de cisteína manipulada en la forma tiol reducida. Sin embargo, cuando los anticuerpos se aíslan de cultivo celular de mamífero, a la cisteína

manipulada en general "se le añade un capuchón" como un disulfuro mixto con un tiol citoplasmático tal como glutatión. Por tanto, añadir directamente la molécula sintética reactiva no producirá el conjugado, ya que la cadena lateral de la cisteína manipulada no está disponible para reaccionar.

Una reducción selectiva de una sola etapa para retirar el capuchón sería muy deseable, pero actualmente no es factible debido a la similitud química entre el disulfuro mixto y los disulfuros estructurales en el anticuerpo. Cuando se añade un agente reductor al Cys-mAb para retirar los capuchones, alguna parte de los otros disulfuros en el anticuerpo también se reducirá, y los tioles resultantes pueden reaccionar para formar conjugados en ubicaciones indeseadas.

Por consiguiente, sigue habiendo necesidad de maneras eficaces, robustas de fabricar conjugados de anticuerpos manipulados con cisteína que ofrecen alto rendimiento y calidad del producto constante.

Sumario de la invención

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para preparar un conjugado de anticuerpo o conjugado de fragmento de anticuerpo, comprendiendo el método las etapas de: a) obtener una composición que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; b) exponer el anticuerpo o fragmento de anticuerpo a un agente de bloqueo de cisteína, en donde el agente de bloqueo de cisteína es cisteamina y el agente de bloqueo de cisteína forma un disulfuro mixto estable con al menos un residuo de cisteína del anticuerpo o fragmento de anticuerpo; c) añadir un agente reductor a la composición para formar una mezcla de reducción y permitir que se produzca una reacción de reducción de modo que la mezcla de reducción comprenda un anticuerpo reducido o fragmento de anticuerpo reducido, en donde el agente reductor es trifenilfosfina-3,3',3"-trisulfonato

("TPPTS"); d) añadir un agente oxidante a la mezcla de reducción para formar una mezcla oxidada y permitir que se produzca una reacción oxidante de modo que la mezcla oxidante comprenda un anticuerpo oxidado o fragmento de anticuerpo oxidado; y e) añadir un resto químico activado a la mezcla oxidada para formar una mezcla de conjugación y permitir que se produzca una reacción de conjugación de modo que se forme un conjugado de anticuerpo o conjugado de fragmento de anticuerpo.

En un aspecto, después de la etapa b) y antes de la etapa c), se realiza cromatografía de intercambio catiónico para retirar el exceso de agente de bloqueo de cisteína. En un aspecto, después de la etapa c) y antes de la etapa d), se realiza una etapa de intercambio de tampón para retirar el agente reductor. En una realización, la etapa de intercambio de tampón es ultrafiltración/diafiltración. En un aspecto, después de la etapa e), se realiza una etapa de purificación para retirar el resto químico activado. En una realización, la etapa de purificación incluye cromatografía de interacción hidrófoba ("HIC"), ultrafiltración/diafiltración o cromatografía de interacción hidrófoba ("HIC") seguida de ultrafiltración/diafiltración.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para preparar un conjugado de anticuerpo o conjugado de fragmento de anticuerpo, comprendiendo el método las etapas de: a) obtener una composición que comprende un disulfuro mixto que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo con una cisteína libre con capuchón que comprende un capuchón de cisteamina; b) añadir un agente reductor a la composición para formar una mezcla de reducción y permitir que se produzca una reacción de reducción de modo que la mezcla de reducción comprenda un anticuerpo reducido o fragmento de anticuerpo reducido, en donde el agente reductor es trifenilfosfina-3,3',3"-trisulfonato ("TPPTS"); c) añadir un agente oxidante a la mezcla de reducción para formar una mezcla oxidada y permitir que se produzca una reacción oxidante de modo que la mezcla oxidante comprenda un anticuerpo oxidado o fragmento de anticuerpo oxidado; y d) añadir un resto químico activado a la mezcla oxidada para formar una mezcla de conjugación y permitir que se produzca una reacción de conjugación de modo que se forme un conjugado de anticuerpo o conjugado de fragmento de anticuerpo.

En un aspecto, después de la etapa a) y antes de la etapa b), se realiza cromatografía de intercambio catiónico para retirar el exceso de agente de bloqueo de cisteína. En un aspecto, después de la etapa b) y antes de la etapa c), se realiza una etapa de intercambio de tampón para retirar el agente reductor. En una realización, la etapa de intercambio de tampón es ultrafiltración/diafiltración. En un aspecto, después de la etapa d), se realiza una etapa de purificación para retirar el resto químico activado. En una realización, la etapa de purificación incluye cromatografía de interacción hidrófoba ("HIC"), ultrafiltración/diafiltración o cromatografía de interacción hidrófoba ("HIC") seguida de ultrafiltración/diafiltración.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para preparar un conjugado de anticuerpo o conjugado de fragmento de anticuerpo, comprendiendo el método las etapas de: a) obtener una composición que comprende un disulfuro mixto que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo con una cisteína libre con capuchón que comprende un capuchón de cisteamina; b) añadir un agente reductor a la composición para formar una mezcla de reducción y permitir que se produzca una reacción de reducción de modo que la mezcla de reducción comprenda un anticuerpo reducido o fragmento de anticuerpo reducido, en donde el agente reductor es

trifenilfosfina-3,3',3"-trisulfonato ("TPPTS"); c) añadir un agente oxidante a la mezcla de reducción para formar una mezcla oxidada y permitir que se produzca una reacción oxidante de modo que la mezcla oxidada comprenda un anticuerpo oxidado o fragmento de anticuerpo oxidado; y d) añadir un resto químico activado a la mezcla oxidada para formar una mezcla de conjugación y permitir que se produzca una reacción de conjugación de modo que se forme un conjugado de anticuerpo o conjugado de fragmento de anticuerpo.

En un aspecto, después de la etapa a) y antes de la etapa b), se realiza una etapa de intercambio de tampón para retirar el agente reductor. En un aspecto, después de la etapa c), se realiza una etapa de purificación para retirar el resto químico activado. En una realización, la etapa de intercambio de tampón es ultrafiltración/diafiltración. En una realización, la etapa de purificación incluye cromatografía de interacción hidrófoba ("HIC"), ultrafiltración/diafiltración o cromatografía de interacción hidrófoba ("HIC") seguida de ultrafiltración/diafiltración.

En una realización, el disulfuro mixto es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo con una cisteína libre con capuchón. En el método de la invención, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo con una cisteína libre con capuchón comprende un capuchón, en donde el capuchón es cisteamina. En el método de la invención, el agente reductor es trifenilfosfina-3,3',3"-trisulfonato ("TPPTS"). En una realización, la relación de agente reductor a anticuerpo o fragmento de anticuerpo es de 2 a 4:1 (mol/mol). En una realización, el agente oxidante es ácido deshidroascórbico ("DHAA"). En una realización, la relación de agente oxidante a anticuerpo o fragmento de anticuerpo es de 3 a 6: 1 (mol/mol). En una realización, el resto químico activado es un péptido que comprende un halógeno, en donde el halógeno se selecciona del grupo que consiste en Br, I, y Cl). En una realización, la relación de resto químico activado a anticuerpo o fragmento de anticuerpo es de 2 a 3:1 (mol/mol).

En una realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende un residuo de cisteína en una posición seleccionada del grupo que consiste en D70 de la cadena ligera del anticuerpo con respecto a la secuencia de referencia SEQ ID NO: 7; E276 de la cadena pesada del anticuerpo con respecto a la secuencia de referencia SEQ ID NO: 8; y T363 de la cadena pesada del anticuerpo con respecto a la secuencia de referencia SEQ ID NO: 8.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Los cys mAb (IgG1) típicos que consisten en cuatro cadenas polipeptídicas (dos cadenas ligeras, dos cadenas pesadas) se mantienen juntos mediante 16 enlaces disulfuro naturales (mostrados en verde). Cisteínas adicionales manipuladas en el anticuerpo portan dos disulfuros adicionales (mostrados en naranja). La reducción selectiva de los disulfuros manipulados en presencia de otros 16 disulfuros naturales sería muy deseable, pero no es factible (en una sola etapa).

Figura 2. La reducción no selectiva puede realizarse en dos etapas. (1) La etapa de reducción garantiza la completa "separación del capuchón" de los disulfuros manipulados, también se escinden algunos enlaces disulfuro naturales. (2) La etapa de oxidación restablece la estructura natural de IgG1. La eliminación por UF/DF del tiol liberado en la etapa de reducción (R-SH) es necesaria antes de la oxidación para evitar la "readición de capuchón".

Figura 3. El cys mAb "sin capuchón" experimenta fácilmente conjugación específica de sitio con agentes alquilantes (por ejemplo, derivados peptídicos de bromoacetamida).

Figura 4. Comparación paralela del rendimiento de reducción de una pareja coincidente (CA + TCEP) y una pareja no coincidente (MES + TCEP).

Figura 5. Formación de cys mAb "sin capuchón" a lo largo del tiempo. Condiciones de reacción: 10 g/l de cys mAb con capuchón de cisteamina en el tampón especificado a pH 5,0, 3,5 equiv. de fosfina (TPPTS, TPPDS o TCEP), TA. La mezcla de reacción se supervisó por cromatografía de intercambio catiónico y se cuantificó a 280 nm. Solamente el cys mAb "sin capuchón" se representa en esta figura.

Figura 6. El proceso de conjugación basado en cisteamina permite cantidades casi estequiométricas de reactivos para la reducción, la oxidación y la alquilación para producir conjugado de mAb-péptido con contenido uniforme de PAR2 (por ejemplo, $\geq 95\%$).

Descripción detallada de la invención

La presente divulgación proporciona un método de adición de capuchón, reducción y oxidación de cys-mAb para proporcionar material homogéneo para posteriores reacciones de conjugación. El presente método demuestra maneras robustas de fabricar conjugados de anticuerpos manipulados con cisteína que ofrecen alto rendimiento y calidad del producto constante.

Se ha descubierto que "cisteínas libres" son puntos de fijación adecuados para conjugaciones de diversos grupos modificadores de atributos. Una cisteína libre en este documento se refiere a un residuo de cisteína que no se acopla en un enlace disulfuro normal entre dos cisteínas de uno o dos polipéptidos. Habitualmente una cisteína

libre será una cisteína que se ha introducido en una secuencia polipeptídica de interés por mutagénesis selectiva de sitio, pero algunas proteínas, como alternativa, pueden incluir una cisteína en una posición adecuada. Como se describe en los antecedentes, una cisteína añadida puede ser un punto de fijación adecuado para un grupo modificador de atributos en una proteína. Al introducir un residuo de cisteína habitualmente se obtiene una cisteína libre, ya que no hay compañero presente para formar un enlace disulfuro en la proteína.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para preparar un conjugado de anticuerpo o conjugado de fragmento de anticuerpo, comprendiendo el método las etapas de: a) obtener una composición que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; b) exponer el anticuerpo o fragmento de anticuerpo a un agente de bloqueo de cisteína, en donde el agente de bloqueo de cisteína es cisteamina y el agente de bloqueo de cisteína forma un disulfuro mixto estable con al menos un residuo de cisteína del anticuerpo o fragmento de anticuerpo; c) añadir un agente reductor a la composición para formar una mezcla de reducción y permitir que se produzca una reacción de reducción de modo que la mezcla de reducción comprenda un anticuerpo reducido o fragmento de anticuerpo reducido, en donde el agente reductor es trifenilfosfina-3,3',3"-trisulfonato ("TPPTS"); d) añadir un agente oxidante a la mezcla de reducción para formar una mezcla oxidada y permitir que se produzca una reacción oxidante de modo que la mezcla oxidante comprenda un anticuerpo oxidado o fragmento de anticuerpo oxidado; y e) añadir un resto químico activado a la mezcla oxidada para formar una mezcla de conjugación y permitir que se produzca una reacción de conjugación de modo que se forme un conjugado de anticuerpo o conjugado de fragmento de anticuerpo.

En un aspecto, después de la b) y antes de la etapa c), se realiza cromatografía de intercambio catiónico para mejorar la homogeneidad del anticuerpo y para retirar el exceso de agente de bloqueo de cisteína. En un aspecto, después de la etapa c) y antes de la etapa d), se realiza una etapa de intercambio de tampón para retirar los capuchones liberados (tíoles) y para retirar el agente reductor. En una realización, la etapa de intercambio de tampón es ultrafiltración/diafiltración. En un aspecto, después de la etapa e), se realiza una etapa de purificación para retirar cualquier exceso del resto químico activado y mejorar la pureza del conjugado de anticuerpo o fragmento de anticuerpo. En una realización, la etapa de purificación incluye cromatografía de interacción hidrófoba ("HIC"), ultrafiltración/diafiltración o cromatografía de interacción hidrófoba ("HIC") seguida de ultrafiltración/diafiltración.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para preparar un conjugado de anticuerpo o conjugado de fragmento de anticuerpo, comprendiendo el método las etapas de: a) obtener una composición que comprende un disulfuro mixto que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo con una cisteína libre con capuchón que comprende un capuchón de cisteamina; b) añadir un agente reductor a la composición para formar una mezcla de reducción y permitir que se produzca una reacción de reducción de modo que la mezcla de reducción comprenda un anticuerpo reducido o fragmento de anticuerpo reducido, en donde el agente reductor es trifenilfosfina-3,3',3"-trisulfonato ("TPPTS"); c) añadir un agente oxidante a la mezcla de reducción para formar una mezcla oxidada y permitir que se produzca una reacción oxidante de modo que la mezcla oxidante comprenda un anticuerpo oxidado o fragmento de anticuerpo oxidado; y d) añadir un resto químico activado a la mezcla oxidada para formar una mezcla de conjugación y permitir que se produzca una reacción de conjugación de modo que se forme un conjugado de anticuerpo o conjugado de fragmento de anticuerpo.

En un aspecto, después de la etapa a) y antes de la etapa b), se realiza cromatografía de intercambio catiónico para retirar el exceso de agente de bloqueo de cisteína. En un aspecto, después de la etapa b) y antes de la etapa c), se realiza una etapa de intercambio de tampón para retirar los capuchones y para retirar el exceso de agente reductor. En una realización, la etapa de intercambio de tampón es ultrafiltración/diafiltración. En un aspecto, después de la etapa d), se realiza una etapa de purificación para retirar el resto químico activado. En una realización, la etapa de purificación incluye cromatografía de interacción hidrófoba ("HIC"), ultrafiltración/diafiltración o cromatografía de interacción hidrófoba ("HIC") seguida de ultrafiltración/diafiltración.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para preparar un conjugado de anticuerpo o conjugado de fragmento de anticuerpo, comprendiendo el método las etapas de: a) obtener una composición que comprende un disulfuro mixto que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo con una cisteína libre con capuchón que comprende un capuchón de cisteamina; b) añadir un agente reductor a la composición para formar una mezcla de reducción y permitir que se produzca una reacción de reducción de modo que la mezcla de reducción comprenda un anticuerpo reducido o fragmento de anticuerpo reducido, en donde el agente reductor es trifenilfosfina-3,3',3"-trisulfonato ("TPPTS"); c) añadir un agente oxidante a la mezcla de reducción para formar una mezcla oxidada y permitir que se produzca una reacción oxidante de modo que la mezcla oxidante comprenda un anticuerpo oxidado o fragmento de anticuerpo oxidado; y d) añadir un resto químico activado a la mezcla oxidada para formar una mezcla de conjugación y permitir que se produzca una reacción de conjugación de modo que se forme un conjugado de anticuerpo o conjugado de fragmento de anticuerpo.

En un aspecto, después de la etapa a) y antes de la etapa b), se realiza una etapa de intercambio de tampón para retirar el agente reductor. En un aspecto, después de la etapa c), se realiza una etapa de purificación para retirar el resto químico activado. En una realización, la etapa de intercambio de tampón es ultrafiltración/diafiltración. En

una realización, la etapa de purificación incluye cromatografía de interacción hidrófoba ("HIC"), ultrafiltración/diafiltración o cromatografía de interacción hidrófoba ("HIC") seguida de ultrafiltración/diafiltración.

5 En una realización, el disulfuro mixto es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo con una cisteína libre con capuchón. En el método de la invención, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo con una cisteína libre con capuchón comprende un capuchón, en donde el capuchón es cisteamina. En el método de la invención, el agente reductor es trifenilfosfina-3,3',3"-trisulfonato ("TPPTS"). En una realización, la relación de agente reductor a anticuerpo o fragmento de anticuerpo es de 2 a 4:1 (mol/mol)). En una realización, el agente oxidante es ácido deshidroascórbico ("DHAA"). En una realización, la relación de agente oxidante a anticuerpo o fragmento de anticuerpo es de 3 a 6:1 (mol/mol)). En una realización, el resto químico activado es un péptido que comprende un halógeno, en donde el halógeno se selecciona del grupo que consiste en Br, I, y Cl). En una realización, la relación de resto químico activado a anticuerpo o fragmento de anticuerpo es de 2 a 3:1 (mol/mol)).

15 En una realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende un residuo de cisteína en una posición seleccionada del grupo que consiste en D70 de la cadena ligera del anticuerpo con respecto a la secuencia de referencia SEQ ID NO: 7; E276 de la cadena pesada del anticuerpo con respecto a la secuencia de referencia SEQ ID NO: 8; y T363 de la cadena pesada del anticuerpo con respecto a la secuencia de referencia SEQ ID NO: 8.

20 Un sitio de conjugación que es "susceptible de conjugación" significa que la cadena lateral del residuo aminoacídico en el sitio de conjugación seleccionado reaccionará con el resto funcional adicional de interés (o con un conector fijado covalentemente al resto funcional adicional), en las condiciones químicas definidas, provocando la unión covalente del resto funcional adicional (directamente o mediante el conector) a la cadena lateral como un producto de reacción principal.

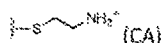
25 Los disulfuros son uniones covalentes de dos átomos de azufre que pueden estar presentes en diferentes (o las mismas) moléculas. En proteínas, los residuos de cisteína pueden ligarse mediante un enlace disulfuro también denominado cistina.

30 Para que sea una diana eficaz de una reacción de conjugación, la cisteína libre debe estar en forma reducida. Una proteína con una cisteína libre, por la misma razón, puede ser difícil de producir y, por tanto, se obtiene frecuentemente como un disulfuro mixto que incluye un resto orgánico pequeño. Los disulfuros mixtos son moléculas que incluyen un enlace disulfuro, similar al enlace disulfuro entre dos residuos aminoacídicos de cisteína, cada uno incluido en una secuencia polipeptídica (que puede ser igual o no). El resto orgánico pequeño se denomina en este documento Cap y el disulfuro mixto, por tanto, es una molécula de proteína-S-S-Cap. En la presente solicitud la expresión "disulfuros mixtos" se usa para moléculas que comprenden un enlace disulfuro que liga dos entidades diferentes que no son ambas polipéptidos, aunque las moléculas pueden incluir adicionalmente enlaces disulfuro "normales" además del disulfuro mixto.

40 En una realización, el método de la invención incluye una etapa de reducción de una molécula de proteína-S-S-Cap, ya que la proteína sujeta a conjugación se obtiene en forma de una composición de molécula de proteína-S-S-Cap.

45 Como se describe anteriormente, el Cap se obtiene habitualmente de un resto orgánico pequeño, incluyendo al menos un átomo de azufre que forma parte del enlace disulfuro del disulfuro mixto. Dichos restos orgánicos pueden existir como monómeros en forma reducida o como dímeros en forma oxidada. En el disulfuro mixto, -S-Cap es, por tanto, la forma oxidada del monómero o mitad de un dímero. El -S-Cap se obtiene de cisteamina/cistamina (que es una cistina descarboxilada), y el disulfuro mixto, por tanto, es proteína-S-S-cyst, donde cyst se refiere a la mitad de cistamina. El Cap de proteína-S-S-Cap se obtiene de cisteamina.

50 El capuchón es



55 Como se describe anteriormente, el objetivo de la reducción es obtener una molécula con una cisteína reducida libre (-SH) que es reactiva en una reacción de conjugación.

En una realización, el disulfuro mixto es una molécula de proteína-S-S-Cap, en donde la proteína-S se obtiene de una proteína que comprende una cisteína libre.

Para obtener una proteína con un átomo de azufre reactivo se añade un agente reductor a la composición de disulfuro mixto, y la mezcla se incuba para permitir que se produzca la reducción para obtener una proteína con un átomo de azufre reactivo, por ejemplo, una proteína reducida del formato: proteína-S-H. Las etapas descritas son a) obtener una composición de un disulfuro mixto que comprende la proteína, a) añadir un agente reductor a dicha composición de proteína, c) permitir que se produzca la reducción y obtener una solución que comprende una proteína reducida (P-SH).

En una realización, el agente reductor es trifenilfosfina-3,3',3"-trisulfonato de trisodio (TPPTS).

Una vez se ha reducido el disulfuro mixto, se obtiene una solución que comprende una proteína reducida (P-SH). Antes de la conjugación posterior, puede ser beneficioso retirar el agente reductor y/o la molécula de Cap liberada. En una realización, puede incluirse una etapa opcional de retirar moléculas pequeñas, tales como moléculas con un peso molecular por debajo de 10 kDa de la solución que comprende la proteína reducida (P-SH). En una realización, se retiran moléculas con un peso molecular por debajo de 10 kDa de la solución que comprende la proteína reducida por diafiltración.

En una reacción de conjugación, un resto químico se une covalentemente al átomo de azufre de la cisteína libre de la proteína reducida (proteína-SH). El resto químico puede ser cualquier resto adecuado para conjugación con una proteína, tal como un resto modificador de atributos. El resto modificador de atributos puede ser un resto químico que puede alterar uno o más rasgos característicos de la proteína de interés. En una realización, el resto químico es un grupo modificador de atributos, tal como un resto químico que puede estabilizar la proteína, aumentando la semivida en circulación o aumentando la potencia. En una realización, el resto químico es un agente prolongador. Para que la conjugación se produzca de forma eficaz, el resto químico puede usarse en una forma activada. En el método de acuerdo con la invención como se describe en este documento anteriormente, se añade un resto químico activado a la solución que comprende la proteína reducida y la conjugación del resto químico con la proteína reducida provoca la preparación de una proteína conjugada. Por tanto, el método de acuerdo con la invención incluye las etapas adicionales de: añadir un resto químico activado a la solución que comprende la proteína reducida, permitir que se produzca la reacción de conjugación y obtener una preparación de dicha proteína conjugada.

El resto químico puede ser cualquier resto adecuado para conjugación con una proteína, tal como un resto modificador de atributos. El resto modificador de atributos puede ser un resto químico que puede alterar uno o más rasgos característicos de la proteína de interés. En una realización, el resto químico es un péptido y/o ligando con o sin una secuencia conectora. En una realización, el resto químico es un grupo modificador de atributos, tal como un resto químico que puede estabilizar la proteína, aumentando la semivida en circulación o aumentando la potencia. En una realización, el resto químico es un aglutinante de albúmina. Para que la conjugación se produzca de forma eficaz, el resto químico puede usarse en una forma activada. En el método de acuerdo con la invención como se describe en este documento anteriormente, un resto químico activado se combina con la proteína reducida y la conjugación del resto químico con la proteína reducida provoca la preparación de una proteína conjugada mediante un átomo de azufre.

El resto químico es preferiblemente un resto químico activado, que significa un resto que puede reaccionar con la proteína-SH formando una molécula de proteína-S-resto químico. Dichos restos químicos activados pueden incluir reactivos de alquilación electrófila suave, que incluyen una maleimida o grupos haloacetilo, que son conocidos en la técnica.

En una realización, el resto químico activado es un resto químico halogenado, tal como un ligando peptídico halogenado. El resto químico halogenado puede incluir Br, I o Cl.

En una realización, el resto químico activado es un aglutinante de albúmina halogenado (AB-halo).

Para tener una reducción eficaz del disulfuro mixto habitualmente se aplica un exceso del agente reductor en concentraciones molares. Mediante la adición del agente reductor a la composición del disulfuro mixto se obtiene una mezcla de reducción. La cantidad de agente reductor puede expresarse en equivalentes de la cantidad del disulfuro mixto, de modo que, en el caso donde la cantidad de agente reductor es 1 equivalente de la cantidad de disulfuro mixto, las concentraciones molares del disulfuro mixto y el agente reductor en la mezcla son iguales.

En una realización, la cantidad del agente reductor añadida es de aproximadamente 2 equivalentes molares a aproximadamente 4 equivalentes molares de la cantidad molar del disulfuro mixto.

Para reducir la cantidad de hiperreducción del anticuerpos o fragmento de anticuerpo, es ventajoso reducir la cantidad requerida que, como se describe en este documento, es posible si se optimizan las etapas del proceso. Una reacción de reducción eficaz usando cantidades menores del agente reductor requiere que las condiciones de reacción restantes se seleccionen cuidadosamente como se proporciona por la presente invención.

La reducción del disulfuro mixto puede tardar, dependiendo de las condiciones, minutos u horas. Los expertos en la materia conocerán que diferentes condiciones producirán diferente eficacia y, por tanto, el tiempo y las condiciones necesarias para obtener reducción completa o casi completa del disulfuro mixto se describen en más detalle en los ejemplos a continuación.

5 El agente reductor puede añadirse como un concentrado o simplemente añadiendo el agente como un polvo sólido a la composición de disulfuro mixto. El agente reductor se mezcla con la composición de disulfuro mixto para iniciar la reducción. La mezcla puede denominarse mezcla de reducción.

10 Para tener un proceso suficientemente eficaz, la reducción debe provocar al menos un 80 % de reducción, tal como al menos un 90 % de reducción de la cantidad total de disulfuro mixto. En dichos casos, la reducción se considera satisfactoria cuando la cantidad del disulfuro mixto es como mucho un 20 %, tal como, como mucho, un 10 % de la cantidad del disulfuro mixto en la mezcla de reducción. En realizaciones preferidas, puede obtenerse una reducción de aproximadamente un 95 % del disulfuro mixto dejando aproximadamente un 5 % de disulfuro mixto no reducido en la solución que comprende la proteína reducida. En una realización adicional, un proceso eficaz deja como mucho un 2 % de disulfuro mixto en un tiempo adecuado.

15 La reducción puede producirse durante un periodo de al menos 15 minutos, tal como al menos 30 minutos o tal como al menos 1 hora. En una realización, la mezcla de reducción se deja durante 2-10 horas, tal como 3-6 horas o aproximadamente 3-4 horas después de la adición del agente reductor.

20 En una realización, la reducción se realiza durante hasta 24 horas, tal como durante hasta 12 horas, tal como durante hasta 8 horas, tal como durante hasta 6 horas, tal como durante hasta 4 horas.

25 La reducción puede tener lugar, en una realización, a 1-50 °C, tal como a temperatura ambiente, tal como a 18-25 °C. En realizaciones alternativas, la reducción puede realizarse a temperatura más fría, tal como por debajo de 10 °C, tal como aproximadamente 4-6 °C.

30 Antes de continuar con la etapa de conjugación, la proteína reducida puede separarse de la mezcla de reducción, tal como del exceso de agente reductor y/o la molécula orgánica pequeña del disulfuro mixto, por ejemplo, el H-S-Cap de la proteína con una cisteína libre con capuchón. Esta etapa opcional puede ser una etapa de retirar moléculas con un peso molecular bajo, tal como moléculas con un peso molecular por debajo de 10 kDa.

35 Los expertos en la materia conocerán diversos métodos para retirar compuestos de pequeño peso molecular, tal como por filtración usando una membrana adecuada. En una realización, el método comprende una etapa de intercambio de tampón (ultrafiltración/diafiltración).

40 La eficacia de una etapa de diafiltración, por ejemplo, la cantidad de moléculas pequeñas y excipientes que se retiran, está relacionada con el volumen de filtrado generado, con respecto al volumen de retenido. También se aprecia que la palabra "retirar" en este contexto debe leerse como "reducir la concentración de", ya que cantidades residuales de moléculas de bajo peso molecular y excipientes habitualmente estarán presentes después de una etapa de diafiltración (o etapas de proceso alternativas) "que retira" las moléculas con un bajo peso molecular.

45 Antes de continuar con la etapa de conjugación, la proteína reducida se oxida para disminuir la cantidad de anticuerpo o fragmento de anticuerpo hiperreducido.

50 Para tener una oxidación eficaz del anticuerpo o fragmento de anticuerpo hiperreducido, se aplica habitualmente un exceso del agente oxidante en concentraciones molares. Mediante la adición del agente oxidante a la composición del anticuerpo o fragmento de anticuerpo hiperreducido, se obtiene una mezcla oxidada. La cantidad de agente oxidante puede expresarse en equivalentes de la cantidad del anticuerpo o fragmento de anticuerpo hiperreducido, de modo que, en el caso donde la cantidad de agente oxidante es 1 equivalente de la cantidad del disulfuro mixto, las concentraciones molares del disulfuro mixto y el agente reductor en la mezcla son iguales.

55 En una realización, la cantidad del agente oxidante añadida es de aproximadamente 3 equivalentes molares a aproximadamente 6 equivalentes molares de la cantidad molar del anticuerpo o fragmento de anticuerpo hiperreducido.

60 La oxidación del anticuerpo o fragmento de anticuerpo hiperreducido puede tardar, dependiendo de las condiciones, minutos u horas. Los expertos en la materia conocerán que diferentes condiciones provocarán diferente eficacia y, por tanto, el tiempo y las condiciones necesarias para obtener oxidación completa o casi completa del anticuerpo o fragmento de anticuerpo hiperreducido se describen en más detalle en los ejemplos a continuación.

65 El agente oxidante puede añadirse como un concentrado o simplemente añadiendo el agente como un polvo sólido a la composición de anticuerpo o fragmento de anticuerpo hiperreducido. El agente oxidante se mezcla con la

composición de anticuerpo o fragmento de anticuerpo hiperreducido para iniciar la oxidación. La mezcla puede denominarse mezcla de oxidación.

Para tener un proceso suficientemente eficaz, la oxidación debe provocar al menos un 80 % de oxidación, tal como al menos un 90 % de oxidación de la cantidad total de anticuerpo o fragmento de anticuerpo hiperreducido. En dichos casos, la oxidación se considera satisfactoria cuando la cantidad del anticuerpo o fragmento de anticuerpo hiperreducido es como mucho un 20 %, tal como, como mucho, un 10 % de la cantidad del anticuerpo o fragmento de anticuerpo hiperreducido en la mezcla de oxidación. En realizaciones preferidas, puede obtenerse una oxidación de aproximadamente un 95 % del anticuerpo o fragmento de anticuerpo hiperreducido dejando aproximadamente un 5 % de anticuerpo o fragmento de anticuerpo hiperreducido en la solución que comprende la proteína oxidada. En una realización adicional, un proceso eficaz deja como mucho un 2 % de anticuerpo o fragmento de anticuerpo hiperreducido en un tiempo adecuado.

La oxidación puede producirse durante un periodo de al menos 15 minutos, tal como al menos 30 minutos o tal como al menos 1 hora. En una realización, la mezcla de oxidación se deja durante 2-10 horas, tal como 3-6 horas o aproximadamente 3-4 horas después de la adición del agente oxidación.

En una realización, la oxidación se realiza durante hasta 24 horas, tal como durante hasta 12 horas, tal como durante hasta 8 horas, tal como durante hasta 6 horas, tal como durante hasta 4 horas.

La oxidación puede tener lugar, en una realización, a 1-50 °C, tal como a temperatura ambiente, tal como a 18-25 °C. En realizaciones alternativas, la reducción puede realizarse a temperatura más fría, tal como por debajo de 10 °C, tal como aproximadamente 2-8 °C. En una realización, el agente oxidante es ácido deshidroascórbico.

Como se describe anteriormente, la conjugación es de acuerdo con el método realizado añadiendo un resto químico activado a la solución que comprende la proteína reducida.

Si la reducción previa no está completa, la relación de proteína reducida a disulfuro mixto puede evitar una reacción de conjugación de alto rendimiento. Además, la presencia de exceso de agente de reducción y moléculas de Cap liberadas puede interferir con la reacción de conjugación.

De nuevo, la relación relativa de los reactantes, por ejemplo, la proteína reducida y el resto químico activado influye en la eficacia de la reacción.

En una realización, la concentración molar del resto químico activado es al menos igual o puede ser dos veces la concentración molar de la proteína a conjugar. Esto también puede expresarse en equivalentes, por ejemplo, pueden usarse al menos 10, tal como 8, tal como 6, tal como 4, tal como 2 o tal como al menos un (1) equivalente del resto químico activado con respecto a la proteína a conjugar. Como el resto químico activado puede ser un recurso costoso, es ventajoso reducir la cantidad requerida que, como se describe en este documento, es posible si se optimizan las etapas previas. Una reacción de conjugación eficaz usando cantidades reducidas del resto químico activado requiere que las condiciones de reacción restantes se seleccionen cuidadosamente como se proporciona por la presente invención. En una realización, la cantidad de resto químico activado es como mucho 8 equivalentes de la proteína, tal como, como mucho, 6, tal como, como mucho, 4, tal como, como mucho 3, tal como, como mucho 2,5, tal como, como mucho, 2, tal como, como mucho, 1,5 equivalentes de la proteína a conjugar.

La conjugación de la proteína oxidada con el resto químico puede tardar, dependiendo de las condiciones, minutos u horas. Los expertos en la materia conocerán que diferentes condiciones provocarán diferente eficacia y, por tanto, el tiempo necesario para obtener conjugación completa o casi completa variará en función de las condiciones como se describirán más detalladamente en este documento a continuación. De acuerdo con el presente método, la reacción de conjugación se considera satisfactoria cuando la cantidad del material de partida, por ejemplo, la proteína reducida, alcanzó un 10 %, tal como un 5 % o preferiblemente un 2 % o menos.

El resto químico activado puede añadirse como un concentrado o simplemente añadiendo el agente como un polvo sólido a la solución que comprende la proteína oxidada. En una realización, el resto químico activado se disuelve en una solución adecuada antes de añadir el resto químico activado a la solución que comprende la proteína oxidada. También puede ser que el resto químico se active en una solución antes de la reacción de conjugación.

La expresión "resto que prolonga la semivida" se refiere a un resto, dominio o "vehículo" farmacéuticamente aceptable ligado covalentemente o conjugado con el dominio Fc y/o un resto farmacéuticamente aceptable, que evita o mitiga la degradación proteolítica *in vivo* u otra modificación química que disminuya la actividad del resto farmacéuticamente activo, aumente la semivida u otras propiedades farmacocinéticas, tales como, aunque sin limitación, aumente la tasa de absorción, reduzca la toxicidad, mejore la solubilidad, aumente la actividad biológica y/o la selectividad de diana del resto farmacéuticamente activo con respecto a una diana de interés, aumente la capacidad de fabricación, y/o reduzca la inmunogenia del resto farmacéuticamente activo (por ejemplo, un resto peptídico o no peptídico), en comparación con una forma no conjugada del resto farmacéuticamente activo. El

polietilenglicol (PEG) es un ejemplo de un resto prolongador de la semivida útil. Otros ejemplos del resto prolongador de la semivida, de acuerdo con la invención, incluyen un copolímero de etilenglicol, un copolímero de propilenglicol, una carboximetilcelulosa, una polivinilpirrolidona, un poli-1,3-dioxolano, un poli-1,3,6-trioxano, un copolímero de etileno y anhídrido maleico, un poliaminoácido (por ejemplo, polilisina), una dextrano n-vinil pirrolidona, una poli n-vinil pirrolidona, un homopolímero de propilenglicol, un polímero de óxido de propileno, un polímero de óxido de etileno, un poliol polioxiethylado, un poli(alcohol vinílico), una cadena glucosilada lineal o ramificada, un poliactal, un ácido graso de cadena larga, un grupo alifático hidrófobo de cadena larga, un dominio F_c de inmunoglobulina (véase, por ejemplo, Feige *et al.*, Modified peptides as therapeutic agents, patente de Estados Unidos n.º 6 660 843), una albúmina (por ejemplo, seroalbúmina humana; véase, por ejemplo, Rosen *et al.*, Albumin fusion proteins, patente de Estados Unidos n.º 6 926 898 y documento US 2005/0054051; Bridon *et al.*, Protection of endogenous therapeutic peptides from peptidase activity through conjugation to blood components, documento US 6 887 470), una transtiretina (TTR; véase, por ejemplo, Walker *et al.*, Use of transthyretin peptide/protein fusions to increase the serum half-life of pharmacologically active peptides/proteins, documentos US 2003/0195154 A1; 2003/0191056 A1), o una globulina de unión a tiroxina (TBG).

Otras realizaciones del resto prolongador de la semivida útil, de acuerdo con la invención, incluyen ligandos peptídicos o ligandos moleculares pequeños (orgánicos no peptídicos) que tiene afinidad de unión por una proteína sérica de semivida larga en condiciones fisiológicas de temperatura, pH y fuerza iónica. Ejemplos incluyen un péptido o ligando molecular pequeño de unión a albúmina, un péptido o ligando molecular pequeño de unión a transtiretina, un péptido o ligando molecular pequeño de unión a globulina de unión a tiroxina, un péptido ligando molecular pequeño de unión a anticuerpo o, u otro péptido o ligando molecular pequeño que tenga afinidad por una proteína sérica de semivida larga. (Véase, por ejemplo, Blaney *et al.*, Method and compositions for increasing the serum half-life of pharmacologically active agents by binding to transthyretin-selective ligands, patente de Estados Unidos n.º 5 714 142; Sato *et al.*, Serum albumin binding moieties, documento US 2003/0069395 A1; Jones *et al.*, Pharmaceutical active conjugates, patente de Estados Unidos n.º 6 342 225). Una "proteína sérica de semivida larga" es una de los cientos de proteínas diferentes disueltas en el plasma sanguíneo de los mamíferos, incluyendo las denominadas "proteínas transportadoras" (tales como albúmina, transferrina y haptoglobina), fibrinógeno y otros factores de coagulación sanguínea, componentes del complemento, inmunoglobulinas, inhibidores de enzimas, precursores de sustancias, tales como angiotensina y bradisinina y muchos otros tipos de proteínas. La invención abarca el uso de cualquier especie individual de resto prolongador de la semivida farmacéuticamente aceptable, tal como, aunque sin limitación, los descritos en este documento, o el uso de una combinación de dos o más restos prolongadores de la semivida diferentes.

Los métodos recombinantes de polipéptidos y ácidos nucleicos usados en este documento, incluyendo en los ejemplos, son en general lo expuestos en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) o Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al.*, eds., Green Publishers Inc. y Wiley and Sons 1994).

Los títulos de las secciones usados en este documento son solo con propósitos organizativos y no deben interpretarse como limitantes de la materia objeto descrita.

Salvo que se definan de otro modo en este documento, los términos científicos y técnicos usados en relación con la presente solicitud tendrán los significados que entienden normalmente los expertos en la materia. Además, salvo que el contexto lo requiera de otro modo, los términos singulares incluirán pluralidades y los términos en plural incluirán el singular.

En general, las nomenclaturas usadas en relación con, y las técnicas de, cultivo celular e histocultivo, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química de proteínas y ácidos nucleicos e hibridación descritas en este documento son bien conocidas y comúnmente usadas en la técnica. Los métodos y técnicas de la presente solicitud en general se realizan de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y analizan durante toda la presente memoria descriptiva salvo que se indique otra cosa. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3.^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001), Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992), y Harlow and Lane Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990). Se realizan reacciones enzimáticas y técnicas de purificación de acuerdo con las especificaciones del fabricante, como se consigue normalmente en la técnica o como se describe en este documento. La terminología usada a propósito de, y los procedimientos de laboratorio y técnicas de, química analítica, química orgánica sintética y química medicinal y farmacéutica descrita en este documento son los bien conocidos y comúnmente usados en la técnica. Pueden usarse técnicas convencionales para síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación y administración y tratamiento de pacientes.

A diferencia de los ejemplos de trabajo, o cuando se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de ingredientes o condiciones de reacción usadas en este documento, deben entenderse modificadas en todos los casos por el término "aproximadamente". El término "aproximadamente", cuando se usa en relación a porcentajes puede significar ± 1 %.

Seguendo las convenciones, como se usa en este documento, "un/o" y "una" significan "uno/a o más" salvo que se indique específicamente otra cosa.

5 Como se usa en este documento, los términos "aminoácido" y "residuo" son intercambiables y, cuando se usan en el contexto de un péptido o polipéptido, se refieren tanto a aminoácidos de origen natural como sintéticos, así como análogos aminoacídicos, imitadores aminoacídicos y aminoácidos de origen no natural que son químicamente similares a los aminoácidos de origen natural.

10 Un "aminoácido de origen natural" es un aminoácido que está codificado por el código genético, así como aquellos aminoácidos que están codificados por el código genético que se modifican después de la síntesis, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. Un análogo aminoacídico es un compuesto que tiene la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural, es decir, un carbono α que se une a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metilsulfonio de metionina. Dichos análogos pueden tener grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o cadenas principales peptídicas modificadas, pero conservarán la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural.

20 Un "imitador aminoacídico" es un compuesto químico que tiene una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funciona de una manera similar a un aminoácido de origen natural. Ejemplos incluyen un derivado de metacrilóilo o acrilóilo de una amida, β -, γ -, δ -iminoácidos (tal como ácido piperidina-4-carboxílico) y similares.

25 Un "aminoácido de origen no natural" es un compuesto que tiene la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural, pero no se incorpora en una cadena polipeptídica creciente mediante el complejo de traducción. Un "aminoácido de origen no natural" también incluye, aunque sin limitación, aminoácidos que se producen por modificación (por ejemplo, modificaciones postraduccionales) de un aminoácido codificado de forma natural (incluyendo, aunque sin limitación, los 20 aminoácidos comunes), pero no se incorporan por sí mismos de forma natural en una cadena polipeptídica creciente mediante el complejo de traducción. Una lista no limitante de ejemplos de aminoácidos de origen no natural que pueden insertarse en una secuencia polipeptídica o sustituirse en el lugar de un residuo natural en la secuencia polipeptídica incluyen β -aminoácidos, homoaminoácidos, aminoácidos cíclicos y aminoácidos con cadenas laterales derivatizadas. Ejemplos incluyen (en forma L o forma D; abreviado en paréntesis): citrulina (Cit), homocitrulina (hCit), $N\alpha$ -metilcitrulina (NMeCit), $N\alpha$ -metilhomocitrulina ($N\alpha$ -MeHoCit), ornitina (Orn), $N\alpha$ -metilornitina ($N\alpha$ -MeOrn o NMeOrn), sarcosina (Sar), homolisina (hLys o hK), homoarginina (hArg o hR), homoglutamina (hQ), $N\alpha$ -metilarginina (NMeR), $N\alpha$ -metil-leucina ($N\alpha$ -MeL o NMeL), N -metilhomolisina (NMeHoK), $N\alpha$ -metilglutamina (NMeQ), norleucina (Nle), norvalina (Nva), 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina (Tic), ácido octahidroindolo-2-carboxílico (Oic), 3-(1-naftil)alanina (1-Nal), 3-(2-naftil)alanina (2-Nal), 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina (Tic), 2-indanilglicina (Igl), para-yodofenilalanina (pl-Phe), para-aminofenilalanina (4AmP o 4-amino-Phe), 4-guanidino fenilalanina (Guf), glicil-lisina (abreviada "K(Ne-glicilo)" o "K(glicilo)" o "K(gly)"), nitrofenilalanina (nitrophe), aminofenilalanina (aminophe o amino-Phe), bencilfenilalanina (bencilphe), ácido γ -carboxiglutámico (γ -carboxiglu), hidroxiprolina (hidroxipro), p-carboxil-fenilalanina (Cpa), ácido α -aminoadípico (Aad), $N\alpha$ -metil valina (NMeVal), $N\alpha$ -metil leucina (NMeLeu), $N\alpha$ -metilnorleucina (NMeNle), ciclopentilglicina (Cpg), ciclohexilglicina (Chg), acetilarginina (acetilarg), ácido α,β -diaminopropiónico (Dpr), ácido α,γ -diaminobutírico (Dab), ácido diaminopropiónico (Dap), ciclohexilalanina (Cha), 4-metilfenilalanina (MePhe), β,β -difenil-alanina (BiPhA), ácido aminobutírico (Abu), 4-fenil-fenilalanina (o bifenilalanina; 4Bip), ácido α -amino-isobutírico (Aib), beta-alanina, ácido beta-aminopropiónico, ácido piperidínico, ácido aminocaproico, ácido aminoheptanoico, ácido aminopimélico, desmosina, ácido diaminopimélico, N-etilglicina, N-etilaspargina, hidroxilisina, alo-hidroxilisina, isodesmosina, alo-isoleucina, N-metilglicina, N-metilisoleucina, N-metilvalina, 4-hidroxiprolina (Hyp), γ -carboxiglutamato, ϵ -N,N,N-trimetil-lisina, ϵ -N-acetil-lisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmietionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, ω -metilarginina, ácido 4-amino-O-ftálico (4APA) y otros aminoácidos similares, y formas derivatizadas de cualquiera de los enumerados específicamente.

La expresión "molécula de ácido nucleico aislada" se refiere a un polímero mono- o bicatenario de bases desoxirribonucleotídicas o ribonucleotídicas leídas desde el extremo 5' hasta el 3', o un análogo del mismo, que se ha separado de al menos aproximadamente un 50 por ciento de los polipéptidos, péptidos, lípidos, glúcidos, polinucleótidos u otros materiales con que el ácido nucleico se encuentra de forma natural cuando el ácido nucleico total se aísla de las células fuente. Preferiblemente, una molécula de ácido nucleico aislada está sustancialmente libre de cualquier otra molécula de ácido nucleico contaminante u otras moléculas que se encuentran en el entorno natural del ácido nucleico, que interferirían con su uso en la producción del polipéptido o su uso terapéutico, de diagnóstico, profiláctico o de investigación.

La expresión "polipéptido aislado" se refiere a un polipéptido que se ha separado de al menos aproximadamente un 50 por ciento de los polipéptidos, péptidos, lípidos, glúcidos, polinucleótidos u otros materiales con que el polipéptido se encuentra de forma natural cuando se aísla de una célula fuente. Preferiblemente, el polipéptido aislado está sustancialmente libre de cualquier otro polipéptido contaminante u otros contaminantes que se

encuentran en su entorno natural que interferirían con su uso terapéutico, de diagnóstico, profiláctico o de investigación.

Una composición de la presente invención que incluye un fármaco o péptido ligado, fijado o unido, directa o indirectamente a través de un resto conector, a otro anticuerpo o fragmento de anticuerpo es un "conjugado" o molécula "conjugada".

El término "codificar" se refiere a una secuencia polinucleotídica que codifica uno o más aminoácidos. El término no requiere un codón de inicio o parada.

Los términos "idéntico" y porcentaje de "identidad", en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales. "Porcentaje de identidad" significa el porcentaje de residuos idénticos entre los aminoácidos o nucleótidos en las moléculas comparadas y se calcula en función del tamaño de la más pequeña de las moléculas que se están comparando. Para estos cálculos, pueden abordarse los huecos en las alineaciones (si las hay) mediante un modelo matemático particular o programa informático (es decir, un "algoritmo"). Los métodos que pueden usarse para calcular la identidad de los ácidos nucleicos o polipéptidos alineados incluyen los descritos en Computational Molecular Biology (Lesk, A. M., ed.), (1988) Nueva York: Oxford University Press; Biocomputing Informatics and Genome Projects, (Smith, D. W., ed.), 1993, Nueva York: Academic Press; Computer Analysis of Sequence Data, parte I (Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds.), 1994, Nueva Jersey: Humana Press; von Heinje, G., (1987) Sequence Analysis in Molecular Biology, Nueva York: Academic Press; Sequence Analysis Primer (Gribskov, M. y Devereux, J., eds.), 1991, Nueva York: M. Stockton Press; y Carillo *et al.*, (1988) SIAM J. Applied Math. 48:1073.

Al calcular el porcentaje de identidad, las secuencias que se están comparando se alinean de una manera que da la máxima coincidencia entre las secuencias. El programa informático usado para determinar el porcentaje de identidad es el paquete de programas GCG, que incluye GAP (Devereux *et al.*, (1984) Nucl. Acid Res. 12:387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI). El algoritmo informático GAP se usa para alinear los dos polipéptidos o polinucleótidos para los que se determina el porcentaje de identidad de secuencia. Las secuencias se alinean para una coincidencia óptima de su aminoácido o nucleótido respectivo (el "tramo coincidente", como se determina por el algoritmo). Una penalización por abertura de hueco (que se calcula como 3x la diagonal promedio, en donde la "diagonal promedio" es el promedio de la diagonal de la matriz de comparación que se esté usando; la "diagonal" es la puntuación o número asignado a cada coincidencia perfecta de aminoácido por la matriz de comparación particular) y una penalización por extensión de hueco (que es habitualmente 1/10 veces la penalización por abertura de hueco), así como una matriz de comparación tal como PAM 250 o BLOSUM 62 se usan junto con el algoritmo. En determinadas realizaciones, una matriz de comparación convencional (véase, Dayhoff *et al.*, (1978) Atlas of Protein Sequence and Structure 5:345-352 para la matriz de comparación PAM 250; Henikoff *et al.*, (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:10915-10919 para la matriz de comparación BLOSUM 62) se usa también por el algoritmo.

Los parámetros recomendados para determinar el porcentaje de identidad para polipéptidos o secuencias de nucleótidos usando el programa GAP son los siguientes:

Algoritmo: Needleman *et al.*, 1970, J. Mol. Biol. 48:443-453;

Matriz de comparación: BLOSUM 62 de Henikoff *et al.*, 1992, *supra*;

Penalización por hueco: 12 (pero sin penalización por huecos en los extremos)

Penalización por longitud de hueco: 4

Umbral de similitud: 0

Determinados esquemas de alineación para alinear dos secuencias de aminoácidos pueden provocar la coincidencia de solo una corta región de las dos secuencias, y esta pequeña región alineada puede tener una identidad de secuencia muy alta aunque no haya relación significativa entre las dos secuencias de longitud completa. Por consiguiente, el método de alineación seleccionado (por ejemplo, el programa GAP) puede ajustarse si así se desea para provocar una alineación que abarque al menos 50 aminoácidos contiguos del polipéptido diana.

Una "proteína de unión a antígeno", como se usa en este documento, significa cualquier proteína que se una específicamente a un antígeno diana especificado. La expresión abarca anticuerpos intactos que comprenden al menos dos cadenas pesadas de longitud completa y dos cadenas ligeras de longitud completa, así como derivados, variantes, fragmentos y mutaciones de los mismos. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv. Una proteína de unión a antígeno también incluye anticuerpos de dominio tales como nanocuerpos y scFv como se describe adicionalmente a continuación.

En general, se dice que una proteína de unión a antígeno "se une específicamente" a su antígeno diana cuando la proteína de unión a antígeno presenta unión esencialmente de fondo a moléculas inespecíficas. Una proteína de unión a antígeno que se une específicamente a una diana, sin embargo, puede reaccionar de forma cruzada con antígenos diana de diferentes especies. Típicamente, una proteína de unión a antígeno se une específicamente a la diana cuando la constante de disociación (KD) es $\leq 10^{-7}$ M medida mediante una técnica de resonancia de plasmones superficiales (por ejemplo, BIAcore, GE-Healthcare Uppsala, Suecia) o ensayo de exclusión cinética (KinExA, Sapidyn, Boise, Idaho). Una proteína de unión a antígeno se une específicamente a la diana con "alta afinidad" cuando la KD es $\leq 5 \times 10^{-9}$ M, y con "afinidad muy alta" cuando la KD es $\leq 5 \times 10^{-10}$ M, medida usando métodos descritos.

"Región de unión a antígeno" significa una proteína, o una parte de una proteína, que se une específicamente a un antígeno especificado. Por ejemplo, esa parte de una proteína de unión a antígeno que contiene los residuos aminoácidos que interactúan con un antígeno y confieren a la proteína de unión a antígeno su especificidad y afinidad por el antígeno se denomina "región de unión a antígeno". Una región de unión a antígeno típicamente incluye una o más "regiones de unión complementarias" ("CDR") de una inmunoglobulina, inmunoglobulina monocatenaria o anticuerpo de camélido. Determinadas regiones de unión a antígeno también incluyen una o más regiones "flanqueantes". Una "CDR" es una secuencia de aminoácidos que contribuye a la especificidad y afinidad de unión a antígeno. Las regiones "flanqueantes" pueden ayudar a mantener la conformación apropiada de las CDR para promover la unión entre la región de unión a antígeno y un antígeno.

Una "proteína recombinante" es una proteína preparada usando técnicas recombinantes, es decir, a través de la expresión de un ácido nucleico recombinante como se describe en este documento. Los métodos y técnicas para la producción de proteínas recombinantes son bien conocidas en la técnica.

El término "anticuerpo" se refiere a una inmunoglobulina intacta de cualquier tipo, o un fragmento del mismo, que puede competir con el anticuerpo intacto por la unión específica al antígeno diana, e incluye, por ejemplo, anticuerpos quiméricos, humanizados, completamente humanos y biespecíficos. Un "anticuerpo" tal cual es una especie de una proteína de unión a antígeno. Un anticuerpo intacto en general comprenderá al menos dos cadenas pesadas de longitud completa y dos cadenas ligeras de longitud completa. Los anticuerpos pueden derivar únicamente de una sola fuente, o pueden ser "quiméricos", es decir, diferentes partes del anticuerpo pueden derivarse de dos anticuerpos diferentes como se describe adicionalmente a continuación. Las proteínas de unión a antígeno, anticuerpos o fragmentos de unión pueden producirse en hibridomas, por técnicas de ADN recombinante, o por escisión enzimática o química de anticuerpos intactos.

La expresión "cadena ligera", como se usa en este documento con respecto a un anticuerpo o fragmentos del mismo incluye una cadena ligera de longitud completa y fragmentos de la misma que tienen suficiente secuencia de región variable para conferir especificidad de unión. Una cadena ligera de longitud completa incluye un dominio de región variable, VL, y un dominio de región constante, CL. El dominio de región variable de la cadena ligera está en el extremo amínico del polipéptido. Las cadenas ligeras incluyen cadenas kappa y cadenas lambda.

La expresión "cadena pesada", como se usa en este documento con respecto a un anticuerpo o fragmento del mismo incluye una cadena pesada de longitud completa y fragmentos de la misma que tienen suficiente secuencia de región variable para conferir especificidad de unión. Una cadena pesada de longitud completa incluye un dominio de región variable, VH, y tres dominios de región constante, CH1, CH2 y CH3. El dominio VH está en el extremo amínico del polipéptido, y los dominios CH están en el extremo carboxílico, siendo CH3 el más cercano al extremo carboxílico del polipéptido. Las cadenas pesadas pueden ser de cualquier isotipo, incluyendo IgG (incluyendo los subtipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), IgA (incluyendo los subtipos IgA1 e IgA2), IgM e IgE.

La expresión "fragmento inmunológicamente funcional" (o simplemente "fragmento") de un anticuerpo o cadena de inmunoglobulina (cadena pesada o ligera), como se usa en este documento, es una proteína de unión a antígeno que comprende una parte (independientemente de la manera en que se obtenga o sintetice esa parte) de un anticuerpo que carece de al menos algunos de los aminoácidos presentes en una cadena de longitud completa, pero que puede unirse específicamente a un antígeno. Dichos fragmentos son biológicamente activos puesto que se unen específicamente al antígeno diana y pueden competir con otras proteínas de unión a antígeno, incluyendo anticuerpos intactos, por la unión específica a un epítipo dado.

Estos fragmentos biológicamente activos pueden producirse por técnicas de ADN recombinante, o pueden producirse por escisión enzimática o química de proteínas de unión a antígeno, incluyendo anticuerpos intactos. Los fragmentos de inmunoglobulina inmunológicamente funcionales incluyen, aunque sin limitación, fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂.

En otra realización, pueden obtenerse Fv, anticuerpos de dominio y scFv de un anticuerpo de la presente invención.

Se contempla además que una parte funcional de las proteínas de unión a antígeno divulgadas en este documento, por ejemplo, una o más CDR, podrían unirse covalentemente a una segunda proteína o a una molécula pequeña

para crear un agente terapéutico dirigido a una diana particular en el organismo, que posea propiedades terapéuticas bifuncionales, o que tenga una semivida en suero prolongada.

5 Un "fragmento Fab" está compuesto por una cadena ligera y las regiones CH1 y variables de una cadena pesada. La cadena pesada de una molécula Fab no puede formar un enlace disulfuro con otra molécula de cadena pesada.

10 Una región "Fc" contiene dos fragmentos de cadena pesada que comprenden los dominios CH2 y CH3 de un anticuerpo. Los dos fragmentos de cadena pesada se mantienen juntos por dos o más enlaces disulfuro y por interacciones hidrófobas de los dominios CH3.

Un "fragmento Fab'" contiene una cadena ligera y una parte de una cadena pesada que contiene el dominio VH y el dominio CH1 y también la región entre los dominios CH1 y CH2, de modo que puede formarse un enlace disulfuro intercatenario entre las dos cadenas pesadas de dos fragmentos Fab' para formar una molécula F(ab')₂.

15 Un "fragmento F(ab')₂" contiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que contienen una parte de la región constante entre los dominios CH1 y CH2, de modo que se forma un enlace disulfuro intercatenario entre las dos cadenas pesadas. Un fragmento F(ab')₂, por tanto, está compuesto por dos fragmentos Fab' que se mantienen juntos por un enlace disulfuro entre las dos cadenas pesadas.

20 La "región Fv" comprende las regiones variables tanto de las cadenas pesadas como de las ligeras, pero carece de las regiones constantes.

25 "Los anticuerpos monocatenarios" o "scFv" son moléculas Fv en que las regiones variables de la cadena pesada y ligera se han conectado mediante un conector flexible para formar una sola cadena polipeptídica, que forma una región de unión a antígeno. Los scFv se analizan en detalle en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 88/01649 y las patentes de Estados Unidos n.º 4 946 778 y n.º 5 260 203.

30 Un "anticuerpo de dominio" o "inmunoglobulina monocatenaria" es un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional que contiene solo la región variable de una cadena pesada o la región variable de una cadena ligera. Ejemplos de anticuerpos de dominio incluyen Nanobodies®. En algunos casos, dos o más regiones VH se juntan covalentemente con un conector peptídico para crear un anticuerpo de dominio bivalente. Las dos regiones VH de un anticuerpo de dominio bivalente pueden dirigirse al mismo antígeno o a diferentes.

35 Una "proteína bivalente de unión a antígeno" o "anticuerpo bivalente" comprende dos regiones de unión a antígeno. En algunos casos, las dos regiones de unión tienen las mismas especificidades de antígeno. Las proteínas bivalentes de unión a antígeno y los anticuerpos bivalentes pueden ser biespecíficos, véase, *infra*.

40 Una proteína multiespecífica de unión a antígeno" o "anticuerpo multiespecífico" es uno que se dirige a más de un antígeno o epítipo.

45 Una proteína de unión a antígeno o anticuerpo "biespecífico", "específico doble" o "bifuncional" es una proteína de unión a antígeno o anticuerpo híbrido, respectivamente, que tiene dos sitios diferentes de unión a antígeno. Las proteínas biespecíficas de unión a antígeno y anticuerpos son una especie de proteína multiespecífica de unión a antígeno o anticuerpo multiespecífico y pueden producirse por una diversidad de métodos incluyendo, aunque sin limitación, fusión de hibridomas o ligamiento de fragmentos Fab'. Véase, por ejemplo, Songsivilai y Lachmann, 1990, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321; Kostelny *et al.*, 1992, J. Immunol. 148:1547-1553. Los dos sitios de unión de una proteína de unión a antígeno o anticuerpo biespecífico se unirán a dos epítopos diferentes, que pueden residir en la misma diana proteínica o en diferentes.

50 El término "competir", cuando se usa en el contexto de proteínas de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos) significa que la competición entre proteínas de unión a antígeno se determina por un ensayo en que la proteína de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpo o fragmento inmunológicamente funcional del mismo) en ensayo evita o inhibe la unión específica de una proteína de referencia de unión a antígeno a un antígeno común. Pueden usarse numerosos tipos de ensayos de unión competitiva, por ejemplo: radioinmunoensayo (RIA) directo o indirecto en fase sólida, inmunoensayo enzimático (EIA) directo o indirecto en fase sólida, ensayo de competición de tipo sándwich (véase, por ejemplo, Stahl *et al.*, 1983, Methods in Enzymology 9:242-253); EIA de biotina-avidina directo en fase sólida (véase, por ejemplo, Kirkland *et al.*, 1986, J. Immunol. 137:3614-3619), ensayo marcado directo en fase sólida, ensayo de tipo sándwich marcado directo en fase sólida (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, 1988, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press); RIA con marcaje directo en fase sólida usando marcador I-125 (véase, por ejemplo, Morel *et al.*, 1988, Molec. Immunol. 25:7-15); EIA de biotina-avidina directo en fase sólida (véase, por ejemplo, Cheung, *et al.*, 1990, Virology 176:546-552); y RIA marcado directo (Moldenhauer *et al.*, 1990, Scand. J. Immunol. 32:77-82). Típicamente, dicho ensayo implica el uso de antígeno purificado unido a una superficie sólida o células que albergan estas, una proteína de unión a antígeno de ensayo sin marcar y una proteína de unión a antígeno de referencia marcada. La inhibición competitiva se mide determinando la cantidad de marcador unido a la superficie sólida o las células en presencia de la proteína de unión a antígeno de ensayo. Habitualmente la proteína de unión a antígeno de ensayo está presente en exceso.

Se proporcionan en los ejemplos en este documento detalles adicionales con respecto a los métodos para determinar la unión competitiva. Habitualmente, cuando una proteína de unión a antígeno competidora está presente en exceso, inhibirá la unión específica de una proteína de unión a antígeno de referencia a un antígeno común en al menos un 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 % o 75 %. En algunos casos, la unión se inhibe en al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 97 % o más.

El término "antígeno" se refiere a una molécula o una parte de una molécula que puede unirse por un agente de unión selectivo, tal como una proteína de unión a antígeno (incluyendo, por ejemplo, un anticuerpo), y adicionalmente que puede usarse en un animal para producir anticuerpos que pueden unirse a ese antígeno. Un antígeno puede poseer uno o más epítomos que pueden interactuar con diferentes proteínas de unión a antígeno, por ejemplo, anticuerpos.

El término "epítomo" es la parte de una molécula que se une por una proteína de unión a antígeno (por ejemplo, un anticuerpo). El término incluye cualquier determinante que puede unirse específicamente a una proteína de unión a antígeno, tal como un anticuerpo. Un epítomo puede ser contiguo o no contiguo (discontinuo) (por ejemplo, en un polipéptido, residuos aminoácidos que no son contiguos a otro en la secuencia polipeptídica, pero que dentro del contexto de la molécula se unen por la proteína de unión a antígeno). Un epítomo conformacional es un epítomo que existe dentro de la conformación de una proteína activa, pero no está presente en una proteína desnaturalizada. En determinadas realizaciones, los epítomos pueden ser imitadores, puesto que comprenden una estructura tridimensional que es similar a un epítomo usado para generar la proteína de unión a antígeno, aunque comprenden ninguno o solo algunos de los residuos aminoácidos encontrados en este epítomo usado para generar la proteína de unión a antígeno. Muy a menudo, los epítomos residen en proteínas, pero, en algunos casos, pueden residir en otros tipos de moléculas, tales como ácidos nucleicos. Los determinantes epitópicos pueden incluir agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales glucídicas, grupos fosforilo o sulfonilo y pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas. En general, las proteínas de unión a antígeno específicas para un antígeno diana particular reconocerán preferentemente un epítomo en el antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas.

Como se usa en este documento, "sustancialmente pura" significa que la especie descrita de molécula es la especie predominante presente, es decir, en una base molar, es más abundante que cualquier otra especie individual en la misma mezcla. En determinadas realizaciones, una molécula sustancialmente pura es una composición en donde la especie en cuestión comprende al menos un 50 % (en una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. En otras realizaciones, una composición sustancialmente pura comprenderá al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de todas las especies macromoleculares presentes en la composición. En otras realizaciones, la especie en cuestión se purifica a homogeneidad esencial, en donde no pueden detectarse especies contaminantes en la composición mediante métodos de detección convencionales y, por tanto, la composición consiste en una sola especie macromolecular detectable.

El término "polinucleótido" o "ácido nucleico" incluye polímeros de nucleótidos monocatenarios y bicatenarios. Los nucleótidos que comprenden el polinucleótido puede ser ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. Las modificaciones incluyen modificaciones de bases, tales como derivados de bromouridina e inosina, modificaciones de ribosa, tales como 2',3'-didesoxirribosa, y modificaciones de enlaces internucleotídicos, tales como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilitioato, fosforanilato y fosforoamidato.

El término "oligonucleótido" significa un polinucleótido que comprende 200 o menos nucleótidos. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos son de 10 a 60 bases de longitud. En otras realizaciones, los oligonucleótidos son de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 a 40 nucleótidos de longitud. Los oligonucleótidos pueden ser monocatenarios o bicatenarios, por ejemplo, para su uso en la construcción de un gen mutante. Los oligonucleótidos pueden ser oligonucleótidos de sentido o de antisentido. Un oligonucleótido puede incluir un marcador, incluyendo un radiomarcador, un marcador fluorescente, un hapteno o un marcador antigénico, para ensayos de detección. Pueden usarse oligonucleótidos, por ejemplo, como cebadores de PCR, cebadores de clonación o sondas de hibridación.

Una "molécula de ácido nucleico aislada" significa a ADN o ARN de origen genómico, ARNm, ADNc o sintético o alguna combinación de los mismos que no está asociado con la totalidad o una parte de un polinucleótido en que el polinucleótido aislado se encuentra en la naturaleza, o está ligado a un polinucleótido al que no está ligado en la naturaleza. Para los propósitos de esta divulgación, debe entenderse que "una molécula de ácido nucleico que comprende" una secuencia de nucleótidos particular no abarca cromosomas intactos. Las moléculas de ácido nucleico aisladas "que comprenden" secuencias de ácido nucleico especificadas pueden incluir, además de las secuencias especificadas, secuencias codificantes de hasta diez o incluso hasta veinte proteínas distintas o partes de las mismas, o pueden incluir secuencias reguladoras unidas de forma funcional que controlan la expresión de la secuencia codificante de las secuencias de ácido nucleico indicadas, y/o pueden incluir secuencias de vector.

Salvo que se especifique de otro modo, el extremo a mano izquierda de cualquier secuencia polinucleotídica monocatenaria analizada en este documento es el extremo 5'; la dirección a mano izquierda de secuencias polinucleotídicas bicatenarias se menciona como dirección 5'. La dirección de adición de 5' a 3' de transcritos de ARN nacientes se menciona como la dirección de transcripción; las regiones de secuencia en la hebra de ADN que tienen la misma secuencia que el transcrito de ARN que están 5' al extremo 5' del transcrito de ARN se mencionan como "secuencias anteriores"; regiones de secuencia en la hebra de ADN que tienen la misma secuencia que el transcrito de ARN que están 3' al extremo 3' del transcrito de ARN se mencionan como "secuencias posteriores".

La expresión "secuencia de control" se refiere a una secuencia polinucleotídica que puede lograr la expresión y procesamiento de secuencias codificantes a las que está ligada. La naturaleza de dichas secuencias de control puede depender del organismo hospedador. En realizaciones particulares, las secuencias de control para procariotas pueden incluir un promotor, un sitio de unión ribosómica y una secuencia de terminación de la transcripción. Por ejemplo, las secuencias de control para eucariotas pueden incluir promotores que comprenden uno o una pluralidad de sitios de reconocimiento para factores de transcripción, secuencias potenciadoras de la transcripción y secuencias de terminación de la transcripción. Las "secuencias de control" pueden incluir secuencias líder y/o secuencias compañeras de fusión.

El término "vector" significa cualquier molécula o entidad (por ejemplo, ácido nucleico, plásmido, bacteriófago o virus) usada para transferir información codificante de proteína a una célula hospedadora.

La expresión "vector de expresión" o "construcción de expresión" se refiere a un vector que es adecuado para la transformación de una célula hospedadora y contiene secuencias de ácido nucleico que dirigen y/o controlan (junto con la célula hospedadora) la expresión de una o más regiones codificantes heterólogas unidas de forma funcional a la misma. Una construcción de expresión puede incluir, aunque sin limitación, secuencias que afectan o controlan la transcripción, la traducción y, si hay intrones presentes, afectan al empalme del ARN de una región codificante unidad de forma funcional a las mismas.

Como se usa en este documento, "unido de forma funcional" significa que los componentes a los que se aplica la expresión están en una relación que les permite realizar sus funciones inherentes en condiciones adecuadas. Por ejemplo, una secuencia de control en un vector que está "unida de forma funcional" a una secuencia codificante de proteína está ligada a la misma de modo que la expresión de la secuencia codificante de proteína se consiga en condiciones compatibles con la actividad transcripcional de las secuencias de control.

La expresión "célula hospedadora" significa una célula que se ha transformado con una secuencia de ácido nucleico y de ese modo expresa un gen de interés. La expresión incluye la descendencia de la célula progenitora, sea o no idéntica la descendencia en morfología o en composición genética a la célula progenitora original, siempre que esté presente el gen de interés.

Los términos "polipéptido" o "proteína" se usan indistintamente en este documento para hacer referencia a un polímero de residuos aminoacídicos. Los términos también se aplican a polímeros de aminoácidos en que uno o más residuos aminoacídicos son análogos o imitadores de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural. Los términos también pueden abarcar polímeros de aminoácidos que se han modificado, por ejemplo, mediante la adición de residuos glucídicos para formar glucoproteínas, o se han fosforilado. Los polipéptidos y proteínas pueden producirse por una célula de origen natural y no recombinante; o se producen por una célula genomanipulada o recombinante, y comprenden moléculas que tienen la secuencia de aminoácidos de la proteína natural, o moléculas que tienen eliminaciones de, adiciones a y/o sustituciones de uno o más aminoácidos de la secuencia natural. Los términos "polipéptido" y "proteína" abarcan específicamente proteínas de unión a antígeno, anticuerpos o secuencias que tienen eliminaciones de, adiciones a y/o sustituciones de uno o más aminoácidos de una proteína de unión a antígeno. La expresión "fragmento polipeptídico" se refiere a un polipéptido que tiene una eliminación aminoterminal, una eliminación carboxiterminal y/o una eliminación interna en comparación con la proteína de longitud completa. Dichos fragmentos también pueden contener aminoácidos modificados en comparación con la proteína de longitud completa. En determinadas realizaciones, los fragmentos son de aproximadamente cinco a 500 aminoácidos de longitud. Por ejemplo, los fragmentos pueden ser de al menos 5, 6, 8, 10, 14, 20, 50, 70, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400 o 450 aminoácidos de longitud. Los fragmentos polipeptídicos útiles incluyen fragmentos inmunológicamente funcionales de anticuerpos, incluyendo dominios de unión.

La expresión "proteína aislada" significa que una proteína en cuestión (1) está libre de al menos algunas otras proteínas con las que se encontraría normalmente, (2) está esencialmente libre de otras proteínas de la misma fuente, por ejemplo, de la misma especie, (3) se expresa por una célula de una especie diferente, (4) se ha separado de al menos aproximadamente un 50 por ciento de polinucleótidos, lípidos, glucídicos u otros materiales con los que está asociada en la naturaleza, (5) está asociada de forma funcional (por interacción covalente o no covalente) con un polipéptido con el que no está asociada en la naturaleza, o (6) no se produce en la naturaleza. Típicamente, una "proteína aislada" constituye al menos aproximadamente un 5 %, al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 25 % o al menos aproximadamente un 50 % de una muestra dada. El

ADN genómico, ADNc, ARNm u otro ARN, de origen sintético, o cualquier combinación de los mismos puede codificar dicha proteína aislada. Preferiblemente, la proteína aislada está sustancialmente libre de proteínas o polipéptidos u otros contaminantes que se encuentran en su entorno natural que interferirían con su uso terapéutico, de diagnóstico, profiláctico, de investigación u otro.

Una "variante" de un polipéptido (por ejemplo, una proteína de unión a antígeno tal como un anticuerpo) comprende una secuencia de aminoácidos en donde uno o más residuos aminoácidos están insertados en, eliminados de y/o sustituidos en la secuencia de aminoácidos con respecto a otra secuencia polipeptídica. Las variantes incluyen proteínas de fusión.

Un "derivado" de un polipéptido es un polipéptido (por ejemplo, una proteína de unión a antígeno tal como un anticuerpo) que se ha modificado químicamente de alguna manera distinta de variantes de inserción, eliminación o sustitución, por ejemplo, mediante conjugación con otro resto químico.

La expresión "de origen natural", como se usa en toda la memoria descriptiva en relación con materiales biológicos tales como polipéptidos, ácidos nucleicos, células hospedadoras y similares, se refiere a materiales que se encuentran en la naturaleza.

Un "sujeto" o "paciente", como se usa en este documento, puede ser cualquier mamífero. En una realización típica, el sujeto o paciente es un ser humano.

Una "sustitución aminoacídica conservadora" puede implicar una sustitución de un residuo aminoacídico natural (es decir, un residuo encontrado en una posición dada de la secuencia polipeptídica natural) con un residuo no natural (es decir, un residuo que no se encuentra en una posición dada de la secuencia polipeptídica natural), de modo que hay poco o ningún efecto sobre la polaridad o carga del residuo aminoacídico en esa posición. Las sustituciones aminoacídicas conservadoras también abarcan residuos aminoácidos de origen no natural que se incorporan típicamente por síntesis peptídica química en lugar de por síntesis en sistemas biológicos. Estos incluyen peptidomiméticos, y otras formas reversas o invertidas de restos aminoácidos.

Los residuos de origen natural pueden dividirse en clases basadas en propiedades comunes de la cadena lateral:

(1) hidrófobos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

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

(3) ácidos: Asp, Glu;

(4) básicos: Asn, Gln, His, Lys, Arg;

(5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro; y

(6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

También pueden formularse grupos adicionales de aminoácidos usando los principios descritos en, por ejemplo, Creighton (1984) PROTEINS: STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES (2.^a Ed. 1993), W.H. Freeman and Company. En algunos casos, puede ser útil caracterizar más las sustituciones en función de dos o más de dichos rasgos característicos (por ejemplo, la sustitución con un residuo "polar pequeño", tal como un residuo de Thr, puede representar una sustitución muy conservadora en un contexto apropiado).

Las sustituciones conservadoras pueden implicar el intercambio de un miembro de una de estas clases por otro miembro de la misma clase. Sustituciones no conservadoras pueden implicar el intercambio de un miembro de una de estas clases con un miembro de otra clase.

Pueden usarse residuos aminoácidos sintéticos, infrecuentes o modificados que tienen propiedades fisicoquímicas similares conocidas a las de los agrupamientos descritos anteriormente como sustituto "conservador" para un residuo aminoacídico particular en una secuencia. Por ejemplo, un residuo de D-Arg puede servir como sustituto para un residuo de L-Arg típico. También puede ser el caso de que una sustitución particular pueda describirse en términos de dos o más de las clases descritas anteriormente (por ejemplo, una sustitución con un residuo pequeño e hidrófobo significa sustituir un aminoácido con uno más residuos que se encuentran en ambas clases descritas anteriormente u otros residuos sintéticos, infrecuentes o modificados que son conocidos en la técnica por tener propiedades fisicoquímicas similares a dichos residuos que cumplen ambas definiciones).

Un "vector" se refiere a un vehículo de administración que (a) promueve la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica polipéptido; (b) promueve la producción del polipéptido a partir del mismo; (c) promueve la transfección/transformación de células diana con el mismo; (d) promueve la replicación de la secuencia de ácido nucleico; (e) promueve la estabilidad del ácido nucleico; (f) promueve la detección del ácido nucleico y/o células

transformadas/transfectadas; y/o (g) confiere de otro modo una función biológica y/o fisicoquímica ventajosa al ácido nucleico que codifica polipéptido. Un vector puede ser cualquier vector adecuado, incluyendo vectores de ácido nucleico cromosómico, no cromosómico y sintético (una secuencia de ácido nucleico que comprende un conjunto adecuado de elementos de control de la expresión). Ejemplos de dichos vectores incluyen derivados de SV40, plásmidos bacterianos, ADN fágico, baculovirus, plásmidos de levadura, vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN fágico, y vectores de ácido nucleico (ARN o ADN) vírico.

Un vector de expresión recombinante puede diseñarse para la expresión de una proteína en células procariotas (por ejemplo, *E. coli*) o eucariotas (por ejemplo, células de insecto, usando vectores de expresión de baculovirus, células de levadura o células de mamífero). En una realización, la célula hospedadora es una célula hospedadora de mamífero no humana. Células hospedadoras representativas incluyen los hospedadores típicamente usados para clonación y expresión, incluyendo *Escherichia coli* cepas TOP10F', TOP10, DH10B, DH5a, HB101, W3110, BL21(DE3) y BL21 (DE3)pLysS, BLUESCRIPT (Stratagene), líneas celulares de mamífero CHO, CHO-K1, HEK293, vectores 293-EBNA pIN (Van Heeke y Schuster, J. Biol. Chem. 264: 5503-5509 (1989); vectores pET (Novagen, Madison Wis.). Como alternativa, el vector de expresión recombinante puede transcribirse y traducirse *in vitro*, por ejemplo, usando secuencias reguladoras del promotor T7 y la polimerasa T7 y un sistema de traducción *in vitro*. Preferiblemente, el vector contiene un promotor anterior al sitio de clonación que contiene la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido. Ejemplos de promotores, que pueden activarse y desactivarse, incluyen el promotor lac, el promotor T7, el promotor trc, el promotor tac y el promotor trp.

En diversas realizaciones, los vectores comprenden una secuencia de nucleótidos unida de forma funcional que regula la expresión de un polipéptido diana. Un vector puede comprender o estar asociado con cualquier promotor adecuado, potenciador y otros elementos que facilitan la expresión. Ejemplos de dichos elementos incluyen promotores fuertes de la expresión (por ejemplo, un promotor/potenciador de IE de CMV humano, un promotor de RSV, promotor de SV40, promotor de SL3-3, promotor de MMTV o promotor de LTR de VIH, promotor de EF1 alfa, promotor de CAG), secuencias de terminación de poli (A) eficaces, un origen de replicación para el producto plasmídico en *E. coli*, un gen de resistencia a antibiótico como marcador de selección y/o un sitio de clonación conveniente (por ejemplo, un policonector). Los vectores también pueden comprender un promotor inducible en oposición a un promotor constitutivo tal como IE de CMV. En un aspecto, se proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un polipéptido diana que está unido de forma funcional a un promotor específico de tejido que promueve la expresión de la secuencia en un tejido metabólicamente pertinente, tal como hígado o tejido pancreático.

En otro aspecto de la presente divulgación, se proporcionan células hospedadoras que comprenden los ácidos nucleicos y vectores divulgados en este documento. En diversas realizaciones, el vector o ácido nucleico se integra en el genoma de la célula hospedadora, en otras realizaciones, el vector o ácido nucleico es extracromosómico.

Se proporcionan células recombinantes, tales como células de levadura, bacterianas (por ejemplo, *E. coli*) y de mamífero (por ejemplo, células de mamífero inmortalizadas) que comprenden dicho ácido nucleico, vector o combinaciones de cualquiera de los mismos o ambos. En diversas realizaciones, se proporcionan células que comprenden ácido nucleico no integrado, tal como un plásmido, cósmido, fagómico o elementos de expresión lineal, que comprende una secuencia que codifica la expresión de un polipéptido diana.

Un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido diana proporcionado en este documento puede introducirse en una célula hospedadora por transformación o por transfección. Los métodos de transformación de una célula con un vector de expresión son bien conocidos.

Un ácido nucleico que codifica una diana puede colocarse en y/o administrarse a la célula hospedadora o animal hospedador mediante un vector vírico. Cualquier vector vírico adecuado puede usarse en esta condición. Un vector vírico puede comprender múltiples polinucleótidos víricos, solos o en combinación con una o más proteínas víricas, que facilitan la administración, replicación y/o expresión del ácido nucleico de la invención en una célula hospedadora deseada. El vector vírico puede ser un polinucleótido que comprende todo o parte de un genoma vírico, un conjugado de proteína/ácido nucleico vírico, una partícula similitvírica (VLP) o una partícula vírica intacta que comprende ácidos nucleicos víricos y un ácido nucleico que codifica polipéptido. Un vector vírico de partícula vírica puede comprender una partícula vírica natural o una partícula vírica modificada. El vector vírico puede ser un vector que requiere la presencia de otro vector o virus natural para la replicación y/o expresión (por ejemplo, un vector vírico puede ser un virus dependiente de auxiliar), tal como un amplicón de vector adenovírico. Típicamente, dichos vectores víricos consisten en una partícula vírica natural, o una partícula vírica modificada en su contenido de proteína y/o ácido nucleico para aumentar la capacidad transgénica o ayudar en la transfección y/o expresión del ácido nucleico (ejemplos de dichos vectores incluyen los amplicones de herpesvirus/AAV). Típicamente, un vector vírico es similar a y/o derivado de un virus que normalmente infecta seres humanos. Partículas de vector vírico adecuadas a este respecto, incluyen, por ejemplo, partículas de vector adenovírico (incluyendo cualquier virus de o derivado de un virus de adenoviridae), partículas de vector vírico adenoasociado (partículas de vector AAV) u otros parvovirus y partículas de vector parvovírico, partículas de papilomavírico, vectores flavivíricos, vectores alfavíricos, vectores herpesvíricos, vectores poxvíricos, vectores retrovíricos, incluyendo vectores lentivíricos.

Un polipéptido diana expresado como se describe en este documento puede aislarse usando métodos convencionales de purificación de proteínas. Un polipéptido diana puede aislarse de una célula en que se expresa de forma natural o puede aislarse de una célula que se ha manipulado para que exprese el polipéptido diana, por ejemplo, una célula que no expresa de forma natural el polipéptido diana.

Los métodos de purificación de proteínas que pueden emplearse para aislar un polipéptido diana, así como materiales y reactivos asociados, son conocidos en la técnica. Pueden encontrarse métodos adicionales de purificación que pueden ser útiles para aislar un polipéptido diana en referencias tales como Bootcov MR, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:11514-9, Fairlie WD, 2000, Gene 254: 67-76.

Las proteínas de unión a antígeno proporcionadas son polipéptidos en que una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR), como se describe en este documento, están integradas y/o unidas. En algunas proteínas de unión a antígeno, las CDR están integradas en una región "flanqueante", que orienta la o las CDR de modo que se consigan las propiedades de unión a antígeno apropiadas de la o las CDR. Determinadas proteínas de unión a antígeno descritas en este documento son anticuerpos o derivan de anticuerpos. En otras proteínas de unión a antígeno, las secuencias de CDR se integran en un tipo diferente de estructura proteínica.

En general, las proteínas de unión a antígeno que se proporcionan típicamente comprenden una o más CDR como se describe en este documento (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6). En algunos casos, la proteína de unión a antígeno comprende (a) una estructura polipeptídica y (b) una o más CDR que se insertan en y/o se unen a la estructura polipeptídica. La estructura polipeptídica puede adoptar una diversidad de formas diferentes. Por ejemplo, puede ser, o comprender, la región flanqueante de un anticuerpo de origen natural, o fragmento o variante del mismo, o puede ser de naturaleza completamente sintética. Ejemplos de diversas estructuras polipeptídicas se describen adicionalmente a continuación.

En determinadas realizaciones, la estructura polipeptídica de las proteínas de unión a antígeno es un anticuerpo o deriva de un anticuerpo. Por consiguiente, ejemplos de determinadas proteínas de unión a antígeno que se proporcionan incluyen, aunque sin limitación, anticuerpos monoclonales, anticuerpos biespecíficos, minicuerpos, anticuerpos de dominio tales como Nanobodies®, anticuerpos sintéticos (a veces denominados "imitadores de anticuerpo"), anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, fusiones de anticuerpo y partes o fragmentos de cada uno, respectivamente. En algunos casos, la proteína de unión a antígeno es un fragmento inmunológico de un anticuerpo completo (por ejemplo, un Fab, un Fab', un F(ab')₂). En otros casos, la proteína de unión a antígeno es un scFv que usa CDR de un anticuerpo de la presente invención.

En otro aspecto, se proporciona una proteína de unión a antígeno que tiene una semivida de al menos un día *in vitro* o *in vivo* (por ejemplo, cuando se administra a un sujeto humano). En una realización, la proteína de unión a antígeno tiene una semivida de al menos tres días. En otras diversas realizaciones, la proteína de unión a antígeno tiene una semivida de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 o 60 días o más. En otra realización, la proteína de unión a antígeno se derivatiza o modifica de modo que tenga una semivida más larga en comparación con el anticuerpo no derivatizado o no modificado. En otra realización, la proteína de unión a antígeno contiene mutaciones puntuales para aumentar la semivida en suero. A continuación se proporcionan detalles adicionales con respecto a dichas formas mutantes y derivatizadas.

Algunas de las proteínas de unión a antígeno que se proporcionan tienen la estructura típicamente asociada con anticuerpos de origen natural. Las unidades estructurales de estos anticuerpos típicamente comprenden uno o más tetrámeros, cada uno compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, aunque algunas especies de mamíferos también producen anticuerpos que tiene solamente una sola cadena pesada. En un anticuerpo típico, cada par o pareado incluye una cadena "ligera" de longitud completa (en determinadas realizaciones, aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" de longitud completa (en determinadas realizaciones, aproximadamente 50-70 kDa). Cada cadena de inmunoglobulina individual está compuesta por varios "dominios de inmunoglobulina", de los que cada uno consiste en casi 90 a 110 aminoácidos y que expresa un patrón de plegamiento característico. Estos dominios son las unidades básicas de las que están compuestos los polipéptidos de anticuerpo. La parte aminoterminal de cada cadena típicamente incluye un dominio variable que es responsable del reconocimiento del antígeno. La parte carboxiterminal está más conservada evolutivamente que el otro extremo de la cadena y se denomina "región constante" o "región C". Las cadenas ligeras humanas generalmente se clasifican como cadenas ligeras kappa y lambda, y cada una de estas contiene un dominio variable y un dominio constante. Las cadenas pesadas típicamente se clasifican como cadenas mu, delta, gamma, alfa o épsilon, y estas definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. IgG tiene varios subtipos, incluyendo, aunque sin limitación, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Los subtipos de IgM incluyen IgM e IgM2. Los subtipos de IgA incluyen IgA1 e IgA2. En seres humanos, los isotipos IgA e IgD contienen cuatro cadenas pesadas y cuatro cadenas ligeras; los isotipos IgG e IgE contienen dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras; y el isotipo IgM contiene cinco cadenas pesadas y cinco cadenas ligeras. La región C de la cadena pesada típicamente comprende uno o más dominios que pueden ser responsables de la función efectora. El número de dominios de la región constante de la cadena pesada dependerá del isotipo. Las cadenas pesadas de IgG, por ejemplo, cada una contiene tres dominios de la región C conocidos como CH1, CH2 y CH3. Los anticuerpos que se proporcionan

pueden tener cualquiera de estos isotipos y subtipos. En determinadas realizaciones, el anticuerpo es del subtipo IgG1, IgG2 o IgG4.

En cadenas ligeras y pesadas de longitud completa, las regiones variables y constantes se unen normalmente por una región "J" de aproximadamente doce o más aminoácidos, incluyendo también la cadena pesada una región "D" de aproximadamente diez o más aminoácidos. Véase, por ejemplo, *Fundamental Immunology*, 2.^a ed., cap. 7 (Paul, W., ed.) 1989, Nueva York: Raven Press. Las regiones variables de cada par de cadena ligera/pesada forman típicamente el sitio de unión a antígeno.

Para los anticuerpos proporcionados en este documento, las regiones variables de las cadenas de inmunoglobulina generalmente presentan la misma estructura global, que comprende regiones flanqueantes (FR) relativamente conservadas unidas por tres regiones hipervariables, más a menudo denominadas "regiones determinantes de la complementariedad" o CDR. Las CDR de las dos cadenas de cada par de cadena pesada/cadena ligera mencionadas anteriormente típicamente se alinean mediante las regiones flanqueantes para formar una estructura que se une específicamente con un epítipo específico en el antígeno. Desde el extremo N hasta el extremo C, las regiones variables de la cadena ligera y pesada de origen natural típicamente ambas se ajustan al siguiente orden de estos elementos: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Se ha ideado un sistema de numeración para asignar números a aminoácidos que ocupan las posiciones en cada uno de estos dominios. Este sistema de numeración se define en *Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest* (1987 y 1991, NIH, Bethesda, Md.), o Chotia y Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196:901-917; Chotia *et al.*, 1989, *Nature* 342:878-883.

La presente invención se refiere a una composición que comprende una proteína de unión a antígeno que tiene al menos un sitio de conjugación interno. El sitio de conjugación debe ser susceptible de conjugación de un resto funcional adicional (por ejemplo, un fármaco, ligando o péptido) por una química de conjugación definida a través de la cadena lateral de un residuo aminoacídico en el sitio de conjugación. Conseguir conjugación específica de sitio, altamente selectiva con la proteína de unión a antígeno, de acuerdo con la presente invención, requiere la consideración de una variedad diversa de criterios de diseño. En primer lugar, debe definirse o predeterminarse una química de conjugación o acoplamiento preferida. Los restos funcionales pueden conjugarse o acoplarse al sitio de conjugación seleccionado de la proteína de unión a antígeno a través de un surtido de diferentes químicas de conjugación conocidas en la técnica. Por ejemplo, un compañero de conjugación activado con maleimida dirigido a un tiol de cisteína accesible en la proteína de unión a antígeno es una realización, pero pueden emplearse numerosas químicas de conjugación o acoplamiento dirigidas a las cadenas laterales de aminoácidos canónicos o no canónicos, por ejemplo, no naturales en la secuencia de la proteína de unión a antígeno, de acuerdo con la presente invención.

Las químicas para la conjugación quimioselectiva incluyen: cicloadiciones dipolares de azida-alquino [3+2] catalizadas con cobre(I), ligamiento de Staudinger, otros procesos de transferencia de acilo ($S \rightarrow N$; $X \rightarrow N$), oximaciones, formación de enlaces hidrazona y otras reacciones de química orgánica adecuadas tales como acoplamientos cruzados usando catalizadores de paladio solubles en agua. (E.g., Bong *et al.*, *Chemoselective Pd(0)-catalyzed peptide coupling in water*, *Organic Letters* 3(16):2509-11 (2001); Dibowski *et al.*, *Bioconjugation of peptides by palladium-catalyzed C-C cross-coupling in water*, *Angew. Chem. Int. Ed.* 37(4):476-78 (1998); DeVasher *et al.*, *Aqueous-phase, palladium-catalyzed cross-coupling of aryl bromides under mild conditions, using water-soluble, sterically demanding alkylphosphines*, *J. Org. Chem.* 69:7919-27 (2004); Shaughnessy *et al.*, *J. Org. Chem.*, 2003, 68, 6767-6774; Prescher, JA y Bertozzi CR, *Chemistry in living system*, *Nature Chemical Biology* 1(1); 13-21 (2005)).

Como se menciona anteriormente, la conjugación (o unión covalente) a la proteína de unión a antígeno es a través de la cadena lateral de un residuo aminoacídico en el sitio de conjugación, por ejemplo, aunque sin limitación, un residuo cisteinilo. El residuo aminoacídico, por ejemplo, un residuo cisteinilo, en el sitio de conjugación interno que se selecciona puede ser uno que ocupa la misma posición de residuo aminoacídico en una secuencia de dominio Fc natural, o el residuo aminoacídico puede manipularse en la secuencia del dominio Fc por sustitución o inserción.

La selección de la colocación del sitio de conjugación en la proteína de unión a antígeno global es otra faceta importante de la selección de un sitio de conjugación interno de acuerdo con la presente invención. Cualquiera de los residuos aminoacídicos expuestos en la proteína de unión a antígeno pueden ser sitios de conjugación potencialmente útiles y pueden mutarse en cisteína o algún otro aminoácido reactivo para acoplamiento selectivo de sitio, si no está ya presente en el sitio de conjugación seleccionado de la secuencia de la proteína de unión a antígeno. Sin embargo, esta estrategia no tiene en cuenta las posibles restricciones estéricas que pueden perturbar la actividad del compañero conjugado o limitar la reactividad de la mutación manipulada.

En una realización, la proteína de unión a antígeno es un anticuerpo o fragmento funcional del mismo. En una realización, el anticuerpo o fragmento funcional del mismo comprende una cisteína o sustitución aminoacídica de aminoácido no canónico en uno o más sitios de conjugación seleccionados del grupo que consiste en D70 de la cadena ligera de anticuerpo con respecto a la secuencia de referencia SEQ ID NO: 7; E276 de la cadena pesada del anticuerpo con respecto a la secuencia de referencia SEQ ID NO: 8; y T363 de la cadena pesada del anticuerpo con respecto a la secuencia de referencia SEQ ID NO: 8. Por motivos de claridad, "D70 de la cadena ligera de

anticuerpo con respecto a la secuencia de referencia SEQ ID NO: 7" es el mismo sitio de sustitución que la posición de Aho D88 de la cadena ligera del anticuerpo 5G12.006 y la posición de Kabat D70 de la cadena ligera del anticuerpo 5G12.006; "E276 de la cadena pesada de anticuerpo con respecto a la secuencia de referencia SEQ ID NO:

8" es el mismo sitio de sustitución que la posición de Aho E384 de la cadena pesada del anticuerpo 5G12.006 y la posición de Kabat E285 de la cadena pesada del anticuerpo 5G12.006; "T363 de la cadena pesada de anticuerpo con respecto a la secuencia de referencia SEQ ID NO: 8" es el mismo sitio de sustitución que la posición de Aho T487 de la cadena pesada del anticuerpo 5G12.006 y la posición de Kabat T382 de la cadena pesada del anticuerpo 5G12.006.

Tabla 1. SEQ ID NO de aminoácidos

Identificador	Construcción	VL	VH	LC	HC	CDR L1	CDR L2	CDR L3	CDR H1	CDR H2	CDR H3
iPS:336067	5G12.006	3	4	7	8	12	13	14	18	19	20

Tabla 2. SEQ ID NO de ácidos nucleicos

Identificador	Construcción	VL	VH	LC	HC	CDR L1	CDR L2	CDR L3	CDR H1	CDR H2	CDR H3
iPS:336067	5G12.006	1	2	5	6	9	10	11	15	16	17

Tabla 3. Regiones ligeras variables y pesadas variables: Secuencias de ácido nucleico ("NA") y de aminoácidos ("AA")

iPS n°	Ab	Tipo	VL	VH
iPS:336067	5G12.006	NA	GACATCCAGCTGACCCAGTCTCC ATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGG AGACAGAGTCACTATCACTTGCC GGGCAAGTCAGACCATTAGCAGG TTTTTAAATTGGTATCAGCAGAA ACCTGGGAAAGCCCCTGAGCTCC TGATCTATGTTGCATCCAGTTTGC AAAGTGGGGTCCCATCAAGATTC AGTGGCAGTGGTTCTGGGACAGA TTTCACTCTCACCATCAGCAGTCT GCAACCTGAAGATTTTGCAACTT ACTACTGTCAACAGAGTTACAGT ACCCTGATCAGTTTGGCCAGGG GACCAAGCTGGAGATCACACGA	CAGGTGCAGTTGGTGGAGTCTGG GGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGA GGTCCCTGAGACTCTCCTGTACAG CGTCTGGATTACCTTCAGTAGCT ATGGCATACTGGGTCCGCCAG GCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTG GGTGGCAGTTATATGGTATGATG GAAGTAATAAGTTCCATGCAGAC TCCGTGAAGGGCCGATTACCAT CTCCAGAGACAATTCCAAGAACA CGCTGTATCTGCAAATGAACAGC CTGAGAGCCGAGGACTCGGCTAT GTACTTCTGTGCGAGAGGAAAAG TGGCTGGTATGCCTGAAGCTTTTG AAATCTGGGGCCAAGGGACAAAG GTCACCGTCTCTTCA
			SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2
		AA	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS QTISRFLNWFYQKPGKAPELLIYV ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTIS SLQPEDFATYYCQSYSTLISFGQG TKLEITR	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCTA SGFTFSSYGIHWVRQAPGKGLEWV AVIWDGSKNFHADS VKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDSAMYF CARGKVAGMPEAFEIWGQGTKVT VSS
			SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4

5

Tabla 4A. Secuencias de ácido nucleico ("NA") y aminoácidos ("AA") de CDRL1, CDRL2 y CDRL3

iPSn°	Ab	Tipo	CDRL1	CDRL2	CDRL3
iPS:336067	5G12.006	NA	CGGGCAAGTCAGAC CATTAGCAGGTTTTT AAAT	GTTGCATCCAGTTTG CAAAGT	CAACAGAGTTACAG TACCCTGATCAGT
			SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 11
		AA	RASQTISRFLN	VASSLQS	QQSYSTLIS
			SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 14

Tabla 4B. Secuencias de nucleótidos y aminoácidos de CDRH1, CDRH2 y CDRH3

iPSn ^o	Ab	Tipo	CDRH1	CDRH2	CDRH3
iPS:336067	SG12.006	NA	AGCTATGGCATACA C	GTTATATGGTATGAT GGAAGTAATAAGTTC CATGCAGACTCCGTG AAGGGC	GGAAAAGTGGCTGG TATGCCTGAAGCTTT TGAAATC
			SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 17
		AA	SYGIH	VIWYDGSNKFHADSV KG	GKVAGMPEAFEI
			SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20

Tabla 5. Secuencias de ácido nucleico ("NA") y aminoácidos ("AA") de la cadena ligera y pesada

iPSn ^a	Ab	Tipo	LC	HC
iPS:336067	5G12.006	NA	GACATCCAGCTGACCCAGTCTCC ATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAG GAGACAGAGTCACTATCACTTGC CGGGCAAGTCAGACCATTAGCA GGTFTTTAAATTGGTATCAGCAG AAACCTGGGAAAGCCCCTGAGCT CCTGATCTATGTTGCATCCAGTTT GCAAAGTGGGGTCCCATCAAGAT TCAGTGGCAGTGGTTCTGGGACA GATTTCACTCTCACCATCAGCAG TCTGCAACCTGAAGATTTTGCAA CTTACTACTGTCAACAGAGTTAC AGTACCCTGATCAGTTTGGCCA GGGGACCAAGCTGGAGATCACA CGAACGGTGGCTGCACCATCTGT CTTTCATCTTCCCGCCATCTGATG AGCAGTTGAAATCTGGAAGTACC TCTGTGTGTGCTGCTGAATAA CTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAG TACAGTGGAAGGTGGATAACGC CCTCCAATCGGGTAACTCCCAGG AGAGTGTACAGAGCAGGACAG CAAGGACAGCACCTACAGCCTCA GCAGCACCTGACGCTGAGCAA AGCAGACTACGAGAAACACAAA GTCTACGCCGTGCGAAGTCACCCA TCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCA CAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA GTGT	CAGGTGCAGTTGGTGGAGTCTGG GGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGG AGGTCCCTGAGACTCTCCTGTAC AGCGTCTGGATTACCTTCAGTA GCTATGGCATACACTGGGTCCGC CAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGG AGTGGGTGGCAGTTATATGGTAT GATGGAAGTAATAAGTTCCATGC AGACTCCGTGAAGGGCCGATTC ACCATCTCCAGAGACAATTCCAA GAACACGCTGTATCTGCAAAATGA ACAGCCTGAGAGCCGAGGACTC GGCTATGTACTTCTGTGCGAGAG GAAAAGTGGCTGGTATGCCTGA AGCTTTTGAAATCTGGGGCCAAG GGACAAAGGTCACCGTCTCTTCA GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGT CTCCCCCTGGCACCTCCTCCA AGAGCACCTCTGGGGGCACAGC GGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGG ACTACTTCCCCGAACCGGTGACG GTGTCGTGGAAGTCAAGGCGCCCT GACCAGCGGCGTGACACCTTCC CGGCTGTCTACAGTCCTCAGGA CTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGT GACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGG GCACCCAGACCTACATCTGCAAC GTGAATCACAAGCCCAGCAACA CCAAGGTGGACAAGAAAGTTGA GCCCAAATCTTGTGACAAAACCTC ACACATGCCCACCGTGCCCAGCA CCTGAACTCCTGGGGGGACCGTC

			AGTC TTCCTCTTCCCCCAAAC CCAAGGACACCTCATGATCTCC CGGACCCCTGAGGTCACATGCGT GGTGGTGGACGTGAGCCACGAA GACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTG GTACGTGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAGCCGT GTGAGGAGCAGTACGGCAGCAC GTACCGTTGTGTCAGCGTCTCA CCGTCTTGACACCAGGACTGGCTG AATGGCAAGGAGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCA GCCCCATCGAGAAAACCATCTC CAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA GAACCACAGGTGTACACCTGCC CCCATCCCGGGAGGAGATGACC AAGAACCAGGTCAGCCTGACCT GCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCC AGCGACATCGCCGTGGAGTGGG AGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA CAACTACAAGACCACGCCTCCCG TGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC TTCTCTATAGCAAGCTCACCGT GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGT GATGCATGAGGCTCTGCACAACC ACTACACGCAGAAGAGCCTCTCC CTGTCTCCGGGTAAA
			SEQ ID NO: 5
			SEQ ID NO: 6
	AA	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTHICRA SQTISRFLNWYQQKPGKAPELLIY VASSLQSGVPSRFSQSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQSYSTLISFG QGTKLEITRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCT ASGPTFESSYGIHWVRQAPGKGLE WVAIVIWDGSNKHADSVKGRF TISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDSA MYFCARGKVAGMPEAFEIWGQG TKVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPTVSW

	STYSLSSLTLTLKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APELGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYR CVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMEALHNHYTQKSLS LSPGK
	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8

Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) y las regiones flanqueantes (FR) de un anticuerpo dado pueden identificarse usando el sistema descrito por Kabat *et al.* en Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a Ed., US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, publicación NIH n.º 91-3242, 1991. Determinados anticuerpos que se divulgan en este documento comprenden una o más secuencias de aminoácidos que son idénticas o tienen identidad de secuencia sustancial con las secuencias de aminoácidos de una o más de las CDR presentadas en las tablas 4A y 4B. Estas CDR usan el sistema descrito por Kabat *et al.* como se indica anteriormente.

La estructura y propiedades de las CDR dentro de un anticuerpo de origen natural se han descrito *supra*. En resumen, en un anticuerpo tradicional, las CDR están incorporadas dentro de una región flanqueante en la región variable de la cadena pesada y ligera donde constituyen las regiones responsables de la unión al antígeno y su reconocimiento. Una región variable comprende al menos tres CDR de la cadena pesada y de la ligera, véase *supra* (Kabat *et al.*, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Public Health Service N.I.H., Bethesda, MD; véase también Chotia y Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia *et al.*, 1989, Nature 342: 877-883), dentro de una región flanqueante (regiones flanqueantes designadas 1-4, FR1, FR2, FR3 y FR4, por Kabat *et al.*, 1991, *supra*; véase también Chotia y Lesk, 1987, *supra*). Las CDR proporcionadas en este documento, sin embargo, no solamente pueden usarse para definir el dominio de unión a antígeno de una estructura de anticuerpo tradicional, sino que pueden incorporarse en una diversidad de otras estructuras polipeptídicas, como se describe en este documento.

Las proteínas de unión a antígeno que se proporcionan incluyen anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales pueden producirse usando cualquier técnica conocida en la técnica, por ejemplo, inmortalizando esplenocitos recogidos del animal transgénico después de completarse la pauta de inmunización. Los esplenocitos pueden inmortalizarse usando cualquier técnica conocida en la técnica, por ejemplo, fusionándolos con células de mieloma para producir hibridomas. Las células de mieloma para su uso en procedimientos de fusión productores de hibridoma preferiblemente son no productores de anticuerpos, tienen alta eficacia de fusión y deficiencias enzimáticas que los hacen incapaces de crecer en determinados medios selectivo que mantienen el crecimiento de solamente las células fusionadas (hibridomas) deseadas. Ejemplos de líneas celulares adecuadas para su uso en fusiones en ratón incluyen Sp-20, P3-X63/Ag8, P3-X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 4 1, Sp210-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 y S194/5XXO Bul; ejemplos de líneas celulares usadas en fusión en rata incluyen R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F y 4B210. Otras líneas celulares útiles para fusiones celulares son U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 y UC729-6.

En algunos casos, una línea celular de hibridoma se produce inmunizando un animal (por ejemplo, un animal transgénico que tiene secuencias de inmunoglobulina humana) con un inmunógeno; recogiendo los esplenocitos del animal inmunizado; fusionando los esplenocitos recogidos con una línea celular de mieloma, generando de ese modo células de hibridoma; estableciendo líneas celulares de hibridoma a partir de las células de hibridoma e identificando una línea celular de hibridoma que produzca un anticuerpo que se una a un polipéptido diana. Dichas líneas celulares de hibridoma, y los anticuerpos monoclonales producidos por las mismas, son aspectos de la presente solicitud.

Los anticuerpos monoclonales secretados por una línea celular de hibridoma pueden purificarse usando cualquier técnica conocida en la técnica. Los hibridomas o mAb puede cribarse además para identificar mAb con propiedades particulares.

5 También se proporcionan anticuerpos quiméricos y humanizados en función de las secuencias anteriores. Los anticuerpos monoclonales para su uso como agentes terapéuticos pueden modificarse de diversas maneras antes de su uso. Un ejemplo es un anticuerpo quimérico, que es un anticuerpo compuesto por segmentos proteínicos de diferentes anticuerpos que se unen covalentemente para producir cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulina funcionales o partes inmunológicamente funcionales de las mismas. En general, una parte de la cadena pesada y/o la cadena ligera es idéntica a u homóloga a una secuencia correspondiente en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase particular de anticuerpo, mientras el resto de la o las cadenas es idéntico a u homólogo a una secuencia correspondiente en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo. Para métodos referidos a anticuerpos quiméricos, véase, por ejemplo, patente de Estados Unidos n.º 4 816 567; y Morrison *et al.*, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855. El injerto de CDR se describe, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 6 180 370, n.º 5 693 762, n.º 5 693 761, n.º 5 585 089 y n.º 5 530 101.

En general, el objetivo de generar un anticuerpo quimérico es crear una quimera en que se maximice el número de aminoácidos de la especie del paciente pretendido. Un ejemplo es el anticuerpo "de CDR injertada", en que el anticuerpo comprende una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase particular de anticuerpo, mientras el resto de la o las cadenas de anticuerpo es idéntico a u homólogo a una secuencia correspondiente en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo. Para su uso en seres humanos, la región variable o las CDR seleccionadas de un anticuerpo de roedor a menudo se injertan en un anticuerpo humano, remplazando las regiones variables o CDR de origen natural del anticuerpo humano.

un tipo útil de anticuerpo quimérico es un anticuerpo "humanizado". En general, un anticuerpo humanizado se produce a partir de un anticuerpo monoclonal generado inicialmente en un animal no humano. Determinados residuos aminoácidos en este anticuerpo monoclonal, típicamente de las partes del anticuerpo que no reconocen el antígeno, se modifican para que sean homólogas a residuos correspondientes en un anticuerpo humano de isotipo correspondiente. La humanización puede realizarse, por ejemplo, usando diversos métodos por sustitución de al menos una parte de una región variable de roedor por las regiones correspondientes de un anticuerpo humano (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5 585 089 y n.º 5 693 762; Jones *et al.*, 1986, Nature 321:522-525; Riechmann *et al.*, 1988, Nature 332:323-27; Verhoeven *et al.*, 1988, Science 239:1534-1536).

En un aspecto, las CDR de las regiones variables de la cadena ligera y pesada de los anticuerpos proporcionados en este documento se injertan en regiones flanqueantes (FR) de anticuerpos de la misma especie filogénica, o una diferente. Por ejemplo, las CDR de las regiones variables de la cadena pesada y ligera V_H1, V_H2, V_H3, V_H4, V_H5, V_H6, V_H7, V_H8, V_H9, V_H10, V_H11, V_H12 y/o V_L1 y V_L2 pueden injertarse en FR humanas consenso. Para crear FR humanas consenso, las FR de varias secuencias de aminoácidos de la cadena pesada o la cadena ligera humana pueden alinearse para identificar una secuencia de aminoácidos consenso. En otras realizaciones, las FR de una cadena pesada o cadena ligera divulgada en este documento se remplazan con las FR de una cadena pesada o cadena ligera diferente. En un aspecto, los aminoácidos infrecuentes en las FR de las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos no se remplazan, mientras que el resto de los aminoácidos de FR se remplazan. Un "aminoácido infrecuente" es un aminoácido específico que está en una posición en que este aminoácido particular no se encuentra habitualmente en una FR. Como alternativa, las regiones variables injertadas de la una cadena pesada o ligera pueden usarse con una región constante que es diferente de la región constante de esa cadena pesada o ligera particular como se divulga en este documento. En otras realizaciones, las regiones variables injertadas forman parte de un anticuerpo de Fv monocatenario.

En determinadas realizaciones, las regiones constantes de especies distintas del ser humano pueden usarse junto con la o las regiones variables humanas para producir anticuerpos híbridos.

También se proporcionan anticuerpos completamente humanos. Están disponibles métodos para generar anticuerpos completamente humanos específicos para un antígeno dado sin exponer a seres humanos al antígeno ("anticuerpos completamente humanos"). Un medio específico proporcionado para implementar la producción de anticuerpos completamente humanos es la "humanización" del sistema inmunitario humoral de ratón. La introducción de locus de inmunoglobulina (Ig) humana en ratones en que los genes de Ig endógenos se han inactivado, es un medio de producción de anticuerpos monoclonales (mAb) completamente humanos en ratón, un animal que puede inmunizarse con cualquier antígeno deseable. Usar anticuerpos completamente humanos puede minimizar las respuestas inmunógenas y alérgicas que a veces pueden provocarse al administrar mAb de ratón o derivados de ratón a seres humanos como agentes terapéuticos.

Los anticuerpos completamente humanos pueden producirse inmunizando animales transgénicos (habitualmente ratones) que pueden producir un repertorio de anticuerpos humanos en ausencia de producción endógena de inmunoglobulina. Los antígenos para este propósito típicamente tienen seis o más aminoácidos contiguos, y

opcionalmente se conjugan con un vehículo, tal como un hapteno. Véase, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551-2555; Jakobovits *et al.*, 1993, Nature 362:255-258; y Bruggermann *et al.*, 1993, Year in Immunol. 7:33. En un ejemplo de dicho método, se producen animales transgénicos al incapacitar los locus endógenos de inmunoglobulina de ratón que codifican las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina de ratón en los mismos, y al insertar en el genoma de ratón fragmentos grandes de ADN de genoma humano que contienen locus que codifican proteínas de cadena pesada y ligera humana. Los animales parcialmente modificados, que tienen menos que el complemento completo de los locus de inmunoglobulina humana, entonces se cruzan para obtener un animal que tenga todas las modificaciones deseadas del sistema inmunitario. Cuando se administra un inmunógeno, estos animales transgénicos producen anticuerpos que son inmunoespecíficos para el inmunógeno, pero tienen secuencias de aminoácidos humanas en lugar de murinas, incluyendo las regiones variables. Para detalles adicionales de dichos métodos, véanse, por ejemplo, los documentos WO96/33735 y WO94/02602. Se describen métodos adicionales referidos a ratones transgénicos para generar anticuerpos humanos en la patente de Estados Unidos n.º 5 545 807; n.º 6 713 610; n.º 6 673 986; n.º 6 162 963; n.º 5 545 807; n.º 6 300 129; n.º 6 255 458; n.º 5 877 397; n.º 5 874 299 y n.º 5 545 806; en las publicaciones PCT WO91/10741, WO90/04036, y en los documentos EP 546073B1 y EP 546073A1.

Los ratones transgénicos descritos anteriormente, mencionados en este documento como ratones "HuMab", contienen un minilocus de gen de inmunoglobulina humana que codifica secuencias no reordenadas de inmunoglobulina de cadena pesada ([mu] y [gamma]) y ligera [kappa] humana, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los locus endógenos de la cadena [mu] y [kappa] (Lonberg *et al.*, 1994, Nature 368:856-859). Por consiguiente, los ratones presentan expresión reducida de IgM o [kappa] de ratón y, en respuesta a inmunización, los transgenes de cadena pesada y ligera humana introducidos experimentan cambio de clase y mutación somática para generar anticuerpos monoclonales IgG [kappa] humanos de alta afinidad (Lonberg *et al.*, *supra.*; Lonberg y Huszar, 1995, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93; Harding y Lonberg, 1995, Ann. N.Y Acad. Sci. 764:536-546). La preparación de ratones HuMab se describe con detalle en Taylor *et al.*, 1992, Nucleic Acids Research 20:6287-6295; Chen *et al.*, 1993, International Immunology 5:647-656; Tuailon *et al.*, 1994, J. Immunol. 152:2912-2920; Lonberg *et al.*, 1994, Nature 368:856-859; Lonberg, 1994, Handbook of Exp. Pharmacology 113:49-101; Taylor *et al.*, 1994, International Immunology 6:579-591; Lonberg y Huszar, 1995, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93; Harding y Lonberg, 1995, Ann. N.Y Acad. Sci. 764:536-546; Fishwild *et al.*, 1996, Nature Biotechnology 14:845-851. Véase además la patente de Estados Unidos n.º 5 545 806; n.º 5 569 825; n.º 5 625 126; n.º 5 633 425; n.º 5 789 650; n.º 5 877 397; n.º 5 661 016; n.º 5 814 318; n.º 5 874 299; y n.º 5 770 429; así como la patente de Estados Unidos n.º 5 545 807; las publicaciones internacionales n.º WO 93/1227; WO 92/22646; y WO 92/03918. Las tecnologías utilizadas para producir anticuerpos humanos en estos ratones transgénicos se divulgan también en el documento WO 98/24893, y Mendez *et al.*, 1997, Nature Genetics 15: 146-156. Por ejemplo, las cepas de ratones transgénicos HCo7 y HCo12 pueden usarse para generar anticuerpos monoclonales humanos contra un antígeno diana. A continuación se proporcionan detalles adicionales con respecto a la producción de anticuerpos humanos usando ratones transgénicos.

Usando la tecnología de hibridoma, pueden producirse mAb humanos específicos de antígeno con la especificidad deseada y seleccionarse de los ratones transgénicos tal como los descritos anteriormente. Dichos anticuerpos pueden clonarse y expresarse usando un vector y célula hospedadora adecuados, o los anticuerpos pueden recogerse de células de hibridoma cultivadas.

También pueden obtener anticuerpos completamente humanos de colecciones de presentación en fagos (como se divulga en Hoogenboom *et al.*, 1991, J. Mol. Biol. 227:381; y Marks *et al.*, 1991, J. Mol. Biol. 222:581). Las técnicas de presentación en fagos imitan la selección inmunitaria a través de la presentación de repertorios de anticuerpos en la superficie de bacteriófagos filamentosos, y la posterior selección de los fagos por su unión a un antígeno de elección. Una de dichas técnicas se describe en la publicación PCT n.º WO 99/10494.

También se proporcionan derivados de las proteínas de unión a antígeno que se describen en este documento. Las proteínas de unión a antígeno derivatizadas pueden comprender cualquier molécula o sustancia que confiera un atributo deseado al anticuerpo o fragmento, tal como semivida aumentada en un uso particular. La proteína de unión a antígeno derivatizada puede comprender, por ejemplo, un resto detectable (o marcaje) (por ejemplo, una molécula radiactiva, colorimétrica, antigénica o enzimática, un marcador detectable (tal como una microesfera magnética o electrodensa (por ejemplo, oro)), o una molécula que se une a otra molécula (por ejemplo, biotina o estreptavidina)), un resto terapéutico o de diagnóstico (por ejemplo, un resto radiactivo, citotóxico o farmacéuticamente activo), o una molécula que aumenta la idoneidad de la proteína de unión a antígeno para un uso particular (por ejemplo, administración a un sujeto, tal como un sujeto humano, u otros usos *in vivo* o *in vitro*). Ejemplos de moléculas que pueden usarse para derivatizar una proteína de unión a antígeno incluyen albúmina (por ejemplo, seroalbúmina humana) y polietilenglicol (PEG). Los derivados ligados a albúmina y PEGilados de proteínas de unión a antígeno pueden prepararse usando técnicas bien conocidas en la técnica. Determinadas proteínas de unión a antígeno incluyen un polipéptido monocatenario pegilado como se describe en este documento. En una realización, la proteína de unión a antígeno se conjuga o liga de otro modo a transtiretina (TTR) o una variante de TTR. La TTR o variante de TTR puede modificarse químicamente con, por ejemplo, un compuesto químico seleccionado del grupo que consiste en dextrano, poli(n-vinilpirrolidona), polietilenglicoles, homopolímero

de propopilenglicol, copolímero de poli(óxido de propileno/óxido de etileno), polioles polioxietilados y poli(alcoholes vinílicos).

Otros derivados incluyen conjugados covalentes o agregantes de proteínas de unión a antígeno con otras proteínas o polipéptidos, tal como por expresión de proteínas de fusión recombinantes que comprenden polipéptidos heterólogos fusionados al extremo N o extremo C de una proteína de unión a antígeno. Por ejemplo, el péptido conjugado puede ser un polipéptido de señal (o líder) heterólogo, por ejemplo, el líder de factor alfa de levadura, o un péptido tal como una marca epitópica. Las proteínas de fusión que contienen proteína de unión a antígeno pueden comprender péptidos añadidos para facilitar la purificación o identificación de la proteína de unión a antígeno (por ejemplo, poli-His). Una proteína de unión a antígeno también puede ligarse al péptido FLAG como se describe en Hopp *et al.*, 1988, Bio/Technology 6: 1204; y patente de Estados Unidos n.º 5 011 912. El péptido FLAG es muy antigénico y proporciona un epítipo unido reversiblemente por un anticuerpo monoclonal (mAb) específico, lo que posibilita un ensayo rápido y fácil purificación de la proteína recombinante expresada. Los reactivos útiles para preparar proteínas de fusión en que el péptido FLAG está fusionado a un polipéptido dado están disponibles en el mercado (Sigma, St. Louis, MO).

En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígeno comprende uno o más marcadores. La expresión "grupo de marcaje" o "marcador" significa cualquier marcador detectable. Ejemplos de grupos de marcaje adecuados incluyen, aunque sin limitación, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (por ejemplo, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), grupos fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, lantánidos fosforescentes), grupos enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, β -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), grupos quimioluminiscentes, grupos biotinilo o epítipos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias de pares de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, marcas epitópicas). En algunas realizaciones, el grupo de marcaje se acopla a la proteína de unión a antígeno mediante brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir el posible impedimento estérico. Diversos métodos para marcar proteínas son conocidos en la técnica y pueden usarse se vea que se adaptan.

La expresión "grupo efector" significa cualquier grupo acoplado a una proteína de unión a antígeno que actúa como agente citotóxico. Ejemplos de grupos efectores adecuados son radioisótopos o radionúclidos (por ejemplo, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I). Otros grupos adecuados incluyen toxinas, grupos terapéuticos, o grupos quimioterapéuticos. Ejemplos de grupos adecuados incluyen caliqueamicina, auristatinas, geldanamicina y maitansina. En algunas realizaciones, el grupo efector se acopla a la proteína de unión a antígeno mediante brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir el posible impedimento estérico.

En general, los marcadores pertenecen a una diversidad de clases, dependiendo del ensayo en que tienen que detectarse: a) marcadores isotópicos, que pueden ser radiactivos o isótopos pesados; b) microesferas magnéticas (por ejemplo, partículas magnéticas); c) restos activos en oxidorreducción; d) tintes ópticos; grupos enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, β -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina); e) grupos biotinilados; y f) epítipos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias de pares de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, marcas epitópicas, etc.). En algunas realizaciones, el grupo de marcaje se acopla a la proteína de unión a antígeno mediante brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir el posible impedimento estérico. Diversos métodos para marcar proteínas son conocidos en la técnica.

Marcadores específicos incluyen tintes ópticos incluyendo, aunque sin limitación, cromóforos, productos fosforescentes y fluoróforos, siendo los últimos específicos en muchos casos. Los fluoróforos pueden ser "moléculas pequeñas" fluorescentes, o proteínas fluorescentes.

Por "marcador fluorescente" se entiende cualquier molécula que puede detectarse mediante sus propiedades fluorescentes inherentes. Marcadores fluorescentes adecuados incluyen, aunque sin limitación, fluoresceína, rodamina, tetrametilrodamina, eosina, eritrosina, cumarina, metil-cumarinas, pireno, verde malaquita, estilbeno, Lucifer Yellow, Cascade BlueJ, Texas Red, IAEDANS, EDANS, BODIPY FL, LC Red 640, Cy 5, Cy 5.5, LC Red 705, Oregon Green, los tintes Alexa-Fluor (Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680), Cascade Blue, Cascade Yellow y R-ficoeritrina (PE) (Molecular Probes, Eugene, OR), FITC, rodamina y Texas Red (Pierce, Rockford, IL), Cy5, Cy5.5, Cy7 (Amersham Life Science, Pittsburgh, PA). Se describen tintes ópticos adecuados, incluyendo fluoróforos, en Molecular Probes Handbook por Richard P. Haugland.

Marcadores fluorescentes proteínicos adecuados también incluyen, aunque sin limitación, proteína fluorescente verde, incluyendo una especie de *Renilla*, *Ptilosarcus* o *Aequorea* de GFP (Chalfie *et al.*, 1994, Science 263:802-805), EGFP (Clontech Labs., Inc., número de acceso de Genbank U55762), proteína fluorescente azul (BFP, Quantum Biotechnologies, Inc., Quebec, Canadá; Stauber, 1998, Biotechniques 24: 462-471; Heim *et al.*, 1996, Curr. Biol. 6: 178-182), proteína fluorescente amarilla potenciada (EYFP, Clontech Labs., Inc.), luciferasa (Ichiki *et al.*, 1993, J. Immunol. 150: 5408-5417), β galactosidasa (Nolan *et al.*, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:2603-2607) y de *Renilla* (documentos WO92/15673, WO95/07463, WO98/14605, WO98/26277, WO99/49019, patentes

de Estados Unidos n.º 5292658, n.º 5418155, n.º 5683888, n.º 5741668, n.º 5777079, n.º 5804387, n.º 5874304, n.º 5876995, n.º 5925558).

También se proporcionan ácidos nucleicos que codifican las proteínas de unión a antígeno descritas en este documento, o partes de las mismas, incluyendo ácidos nucleicos que codifican una o ambas cadenas de un anticuerpo, o un fragmento, derivado, muteína, o variante de las mismas, polinucleótidos que codifican regiones variables de la cadena pesada o solamente las CDR, polinucleótidos suficientes para su uso como sondas de hibridación, cebadores de PCR o cebadores de secuenciación para identificar, analizar, mutar o amplificar un polinucleótido que codifica un polipéptido, ácidos nucleicos de antisentido para inhibir la expresión de un polinucleótido, y secuencias complementarias de los anteriores. Los ácidos nucleicos pueden ser de cualquier longitud. Puede ser, por ejemplo, de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 750, 1000, 1500, 3000, 5000 o más nucleótidos de longitud, y/o pueden comprender una o más secuencias adicionales, por ejemplo, secuencias reguladoras, y/o formar parte de un ácido nucleico más grande, por ejemplo, un vector. Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios y pueden comprender nucleótidos de ARN y/o ADN, y variantes artificiales de los mismos (por ejemplo, ácidos peptidonucleicos). Cualquier región variable proporcionada en este documento puede fijarse a estas regiones constantes para formar secuencias completas de la cadena pesada y ligera. Sin embargo, debe entenderse que estas secuencias de las regiones constantes se proporcionan como ejemplos específicos únicamente. En algunas realizaciones, las secuencias de la región variable se unen a otras secuencias de la región constante que son conocidas en la técnica.

Los ácidos nucleicos que codifican determinadas proteínas de unión a antígeno, o partes de las mismas (por ejemplo, anticuerpo de longitud completa, cadena pesada o ligera, dominio variable, o CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 o CDRL3) pueden aislarse de linfocitos B de ratones que se han inmunizado con el antígeno. El ácido nucleico puede aislarse por procedimientos convencionales tales como reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La presentación en fagos es otro ejemplo de una técnica conocida por la que pueden prepararse derivados de anticuerpos y otras proteínas de unión a antígeno. En una estrategia, los polipéptidos que son componentes de una proteína de unión a antígeno de interés se expresan en cualquier sistema de expresión recombinante adecuado, y se deja que los polipéptidos expresados se ensamblen para formar proteínas de unión a antígeno.

Un aspecto adicional proporciona ácidos nucleicos que hibridan con otros ácidos nucleicos en condiciones de hibridación particulares. Los métodos para hibridar ácidos nucleicos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Como se define en este documento, una condición de hibridación moderadamente rigurosa usa una solución de prelavado que contiene cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) 5x, SDS al 0,5 %, EDTA 1,0 mM (pH 8,0), tampón de hibridación de aproximadamente formamida al 50 %, SSC 6x y una temperatura de hibridación de 55 °C (u otras soluciones de hibridación similares, tal como una que contiene aproximadamente formamida al 50 %, con una temperatura de hibridación de 42 °C), y condiciones de lavado de 60 °C, en SSC 0,5x, SDS al 0,1 %. Una condición de hibridación rigurosa hibrida en SSC 6x a 45 °C, seguido de uno o más lavados en SSC 0,1x, SDS al 0,2 % a 68 °C. Además, un experto en la materia puede manipular las condiciones de hibridación y/o lavado para aumentar o disminuir la rigurosidad, de modo que los ácidos nucleicos que comprenden secuencias de nucleótidos que son al menos un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idénticos entre sí típicamente permanezcan hibridados entre sí.

Los parámetros básicos que afectan a la selección de las condiciones de hibridación y las directrices para idear las condiciones adecuadas se exponen por, por ejemplo, Sambrook, Fritsch, y Maniatis (2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., *supra*; y *Current Protocols in Molecular Biology*, 1995, Ausubel *et al.*, eds., John Wiley & Sons, Inc., secciones 2.10 y 6.3-6.4), y puede determinarse fácilmente por los expertos en la materia en función de, por ejemplo, la longitud y/o la composición de bases del ácido nucleico.

Pueden introducirse cambios por mutación en un ácido nucleico, dando lugar de ese modo a cambios en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo o derivado de anticuerpo) que codifica. Las mutaciones pueden introducirse usando cualquier técnica conocida en la técnica. En una realización, uno o más residuos aminoacídicos particulares se cambian usando, por ejemplo, un protocolo de mutagénesis dirigida al sitio. En otra realización, uno o más residuos seleccionados aleatoriamente se cambian usando, por ejemplo, un protocolo de mutagénesis aleatoria. Como se haga, un polipéptido mutante puede expresarse y cribarse por un atributo deseado.

Pueden introducirse mutaciones en un ácido nucleico sin alterar significativamente la actividad biológica de un polipéptido que codifica. Por ejemplo, pueden hacerse sustituciones nucleotídicas que den lugar a sustituciones aminoacídicas en residuos aminoacídicos no esenciales. Como alternativa, puede introducirse una o más mutaciones en un ácido nucleico que cambie selectivamente la actividad biológica de un polipéptido que codifica. Por ejemplo, la mutación puede cambiar cuantitativa o cualitativamente la actividad biológica. Ejemplos de cambios cuantitativos incluyen aumentar, reducir o eliminar la actividad. Ejemplos de cambios cualitativos incluyen cambiar la especificidad de antígeno de un anticuerpo. En una realización, un ácido nucleico que codifica cualquier proteína

de unión a antígeno descrita en este documento puede mutarse para alterar la secuencia de aminoácidos usando técnicas de biología molecular que están bien establecidas en la técnica.

Otro aspecto proporciona moléculas de ácido nucleico que son adecuadas como cebadores o sondas de hibridación para la detección de secuencias de ácido nucleico. Una molécula de ácido nucleico puede comprender solamente una parte de una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de longitud completa, por ejemplo, un fragmento que puede usarse como sonda o cebador o un fragmento que codifica una parte activa de un polipéptido.

Las sondas basadas en la secuencia de un ácido nucleico pueden usarse para detectar el ácido nucleico o ácidos nucleicos similares, por ejemplo, transcritos que codifican un polipéptido. La sonda puede comprender un grupo marcador, por ejemplo, un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor enzimático. Dichas sondas pueden usarse para identificar una célula que exprese el polipéptido.

Otro aspecto proporciona vectores que comprenden un ácido nucleico que codifica un polipéptido o una parte del mismo (por ejemplo, un fragmento que contiene una o más CDR o uno o más dominios de la región variable). Ejemplos de vectores incluyen, aunque sin limitación, plásmidos, vectores víricos, vectores de mamífero no episómicos y vectores de expresión, por ejemplo, vectores de expresión recombinantes. Los vectores de expresión recombinantes pueden comprender un ácido nucleico en una forma adecuada para la expresión del ácido nucleico en una célula hospedadora. Los vectores de expresión recombinantes incluyen una o más secuencias reguladoras, seleccionadas en función de las células hospedadoras a usar para la expresión, que se unen de forma funcional a la secuencia de ácido nucleico a expresar. Las secuencias reguladoras incluyen las que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de células hospedadoras (por ejemplo, potenciador génico temprano de SV40, promotor del virus del sarcoma de Rous y promotor de citomegalovirus), las que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos solamente en determinadas células hospedadoras (por ejemplo, secuencias reguladoras específicas de tejido, véase, Voss *et al.*, 1986, Trends Biochem. Sci. 11:287, Maniatis *et al.*, 1987, Science 236: 1237), y las que dirigen la expresión inducible de una secuencia de nucleótidos en respuesta a un tratamiento o condición particular (por ejemplo, el promotor de metalotionina en células de mamífero y el promotor sensible a tet y/o sensible a estreptomycin tanto en sistemas procariotas como en los eucariotas (véase, *id.*). Los expertos en la materia apreciarán que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora a transformar, el nivel de expresión de proteína deseada, etc. Los vectores de expresión se pueden introducir en células hospedadoras para producir de este modo proteínas o péptidos, incluyendo proteínas o péptidos de fusión, codificados por ácidos nucleicos como se describe en este documento.

Otro aspecto proporciona células hospedadoras en que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Una célula hospedadora puede ser cualquier célula procariota (por ejemplo, *E. coli*) o célula eucariota (por ejemplo, células de levadura, insecto o mamífero (por ejemplo, células CHO)). El ADN del vector puede introducirse en células procariotas o eucariotas mediante técnicas convencionales de transformación o transfección. Para la transfección estable de células de mamífero, se sabe que, dependiendo del vector de expresión y la técnica de transfección usada, solamente una pequeña fracción de células puede integrar el ADN exógeno en su genoma. Para identificar y seleccionar estos integrantes, en general se introduce un gen que codifica un marcador de selección (por ejemplo, resistencia a antibióticos) en las células hospedadoras junto con el gen de interés. Marcadores de selección preferidos incluyen los que confieren resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina y metotrexato. Las células transfectadas de forma estable con el ácido nucleico introducido pueden identificarse por selección con fármaco (por ejemplo, las células que han incorporado el gen marcador de selección sobrevivirán, mientras que las otras morirán), entre otros métodos.

También se proporcionan en este documento sistemas de expresión y construcciones en forma de plásmidos, vectores de expresión, casetes de transcripción o expresión que comprenden al menos un polinucleótido como se describe anteriormente, así como células hospedadoras que comprenden dichos sistemas de expresión o construcciones.

Las proteínas de unión a antígeno proporcionadas en este documento pueden prepararse por cualquier de varias técnicas convencionales. Por ejemplo, las proteínas de unión a antígeno pueden producirse por sistemas de expresión recombinantes, usando cualquier técnica conocida en la técnica. Véase, por ejemplo, Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Kennet *et al.* (eds.) Plenum Press, Nueva York (1980); y Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow y Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988).

Las proteínas de unión a antígeno pueden expresarse en líneas celulares de hibridoma (por ejemplo, en particular los anticuerpos pueden expresarse en hibridomas) o en líneas celulares distintas de hibridomas. Pueden usarse construcciones de expresión que codifican los anticuerpos para transformar una célula hospedadora de mamífero, insecto o microbiana. La transformación puede realizarse usando cualquier método conocido para introducir polinucleótidos en una célula hospedadora, incluyendo, por ejemplo, empaquetamiento del polinucleótido en un virus o bacteriófago y transducción de una célula hospedadora con la construcción por procedimientos de

transfección conocidos en la técnica, como se ejemplifica por la patente de Estados Unidos n.º 4 399 216; n.º 4 912 040; n.º 4 740 461; n.º 4 959 455. El procedimiento de transformación óptimo usado dependerá del tipo de célula hospedadora que se esté transformando. Los métodos para la introducción de polinucleótidos heterólogos en células de mamífero son bien conocidos en la técnica e incluyen, aunque sin limitación, transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación del o de los polinucleótidos en liposomas, mezcla de ácido nucleico con lípidos cargados positivamente, y microinyección directa del ADN en los núcleos.

Las construcciones de expresión recombinantes típicamente comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una o más de las siguientes: una o más CDR proporcionadas en este documento; una región constante de la cadena ligera; una región variable de la cadena ligera; una región constante de la cadena pesada (por ejemplo, C_H1, C_H2 y/o C_H3); y/u otra parte estructural de una proteína de unión a antígeno. Estas secuencias de ácido nucleico se insertan en un vector de expresión apropiado usando técnicas de ligamiento convencionales. En una realización, la región constante de la cadena pesada o ligera se adjunta al extremo C de la región variable de la cadena pesada o ligera y se liga en un vector de expresión. El vector se selecciona típicamente para que sea funcional en la célula hospedadora particular empleada (es decir, el vector es compatible con la maquinaria de la célula hospedadora, permitiendo que se pueda producir la amplificación y/o expresión del gen). En algunas realizaciones, se usan vectores que emplean ensayos de complementación de fragmentos proteínicos usando indicadores proteínicos, tales como dihidrofolato reductasa (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6 270 964). Los vectores de expresión adecuados pueden adquirirse, por ejemplo, de Invitrogen Life Technologies o BD Biosciences (antiguamente "Clontech"). Otros vectores útiles para clonar y expresar los anticuerpos y fragmentos incluyen los descritos en Bianchi y McGrew, 2003, Biotech. Biotechnol. Bioeng. 84:439-44. Se analizan vectores de expresión adecuados adicionales, por ejemplo, en Methods Enzymol., vol. 185 (D. V. Goeddel, ed.), 1990, Nueva York: Academic Press.

Típicamente, los vectores de expresión usados en cualquiera de las células hospedadoras contendrán secuencias para el mantenimiento del plásmido y para la clonación y expresión de secuencias exógenas de nucleótidos. Dichas secuencias, colectivamente denominadas "secuencias de apoyo" en determinadas realizaciones, típicamente incluirán una o más de las secuencias de nucleótidos: un promotor, una o más secuencias potenciadoras, un origen de replicación, una secuencia de terminación transcripcional, una secuencia intrónica completa que contiene un sitio donador y aceptador de empalme, una secuencia codificante de una secuencia líder para la secreción del polipéptido, un sitio de unión al ribosoma, una secuencia de poliadenilación, una región policonectora para insertar el ácido nucleico que codifica el polipéptido a expresar, y un elemento marcador de selección. Cada una de estas secuencias se analiza a continuación.

Opcionalmente, el vector puede contener una secuencia codificante de "marca", es decir, una molécula oligonucleotídica ubicada en el extremo 5' o 3' de la secuencia codificante de la proteína de unión a antígeno; la secuencia oligonucleotídica codifica poliHis (tal como hexaHis), u otra "marca" tal como FLAG[®], HA (hemaglutinina del virus de la gripe), o myc, para la que existen anticuerpos disponibles en el mercado. Esta marca típicamente se fusiona al polipéptido tras la expresión del polipéptido, y puede servir como un medio para purificación por afinidad y detección de la proteína de unión a antígeno a partir de la célula hospedadora. Puede conseguir purificación por afinidad, por ejemplo, por cromatografía en columna usando anticuerpos contra la marca como una matriz de afinidad. Opcionalmente, la marca puede retirarse posteriormente de la proteína de unión a antígeno purificada por diversos medios, tal como usando determinadas peptidasas para la escisión.

Las secuencias de apoyo pueden ser homólogas (es decir, de la misma especie y/o cepa que la célula hospedadora), heterólogas (es decir, de una especie diferente de la especie o cepa de la célula hospedadora), híbridas (es decir, una combinación de secuencias de apoyo de más de una fuente), sintéticas o naturales. Por tanto, la fuente de una secuencia de apoyo puede ser cualquier organismo procariota o eucariota, cualquier organismo vertebrado o invertebrado, o cualquier planta, siempre que la secuencia de apoyo sea funcional en, y pueda activarse por, la maquinaria de la célula hospedadora.

Las secuencias de apoyo útiles en los vectores pueden obtenerse por cualquiera de varios métodos bien conocidos en la técnica. Típicamente, las secuencias de apoyo útiles en este documento se habrán identificado previamente por cartografiado y/o digestión con endonucleasa de restricción y, por tanto, pueden aislarse de la fuente de tejido apropiada usando las endonucleasas de restricción apropiadas. En algunos casos, la secuencia de nucleótidos completa de una secuencia de apoyo puede ser conocida. Aquí, la secuencia de apoyo puede sintetizarse usando los métodos descritos en este documento para la síntesis o clonación de ácido nucleico.

Sea conocida toda o solo una parte de la secuencia de apoyo, puede obtenerse usando reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y/o por cribado de una colección genómica con una sonda adecuada tal como un oligonucleótido y/o fragmento de secuencia de apoyo de la misma especie u otra. Cuando la secuencia de apoyo no es conocida, puede aislarse un fragmento de ADN que contiene una secuencia de apoyo de un trozo más grande de ADN que puede contener, por ejemplo, una secuencia codificante o incluso otro gen o genes. El aislamiento puede conseguirse por digestión con endonucleasa de restricción para producir el fragmento de ADN apropiado seguida de aislamiento usando purificación en gel de agarosa, cromatografía en columna Qiagen[®] (Chatsworth, CA), u

otros métodos conocidos por los expertos en la materia. La selección de enzimas adecuadas para conseguir este propósito será fácilmente evidente para un experto en la materia.

Un origen de replicación típicamente forma parte de esos vectores de expresión procariotas adquiridos comercialmente, y el origen ayuda en la amplificación del vector en una célula hospedadora. Si el vector de elección no contiene un sitio de origen de replicación, se puede sintetizar químicamente en función de una secuencia conocida, y ligarse en el vector. Por ejemplo, el origen de replicación del plásmido pBR322 (New England Biolabs, Beverly, MA) es adecuado para la mayoría de bacterias gramnegativas, y diversos orígenes víricos (por ejemplo, SV40, polioma, adenovirus, virus de la estomatitis vesicular (VSV), o papilomavirus tales como HPV o BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamífero. En general, el componente de origen de replicación no es necesario para vectores de expresión de mamífero (por ejemplo, el origen de SV40 a menudo se usa solamente porque también contiene el promotor temprano del virus).

Una secuencia de terminación de la transcripción típicamente está ubicada 3' al extremo de una región codificante de polipéptido y sirve para terminar la transcripción. Habitualmente, una secuencia de terminación de la transcripción en células procariotas es un fragmento rico en G-C seguido de una secuencia de poli-T. Aunque la secuencia se clona fácilmente de una colección o incluso se adquiere comercialmente como parte de un vector, también puede sintetizarse fácilmente usando métodos para la síntesis de ácido nucleico tales como los descritos en este documento.

Un gen marcador de selección codifica una proteína necesaria para la supervivencia y crecimiento de una célula hospedadora que ha crecido en un medio de cultivo selectivo. Los genes marcadores de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, tetraciclina o kanamicina para células hospedadoras procariotas; (b) complementan deficiencias auxotróficas de la célula; o (c) suministran nutrientes cruciales no disponibles del medio complejo o definido. Los marcadores de selección específicos son el gen de resistencia a kanamicina, el gen de resistencia a ampicilina y el gen de resistencia a tetraciclina. Ventajosamente, también puede usarse un gen de resistencia a neomicina para la selección tanto en células hospedadoras procariotas como en eucariotas.

Pueden usarse otros genes de selección para amplificar el gen que se expresará. La amplificación es el proceso en donde los genes que se requieren para la producción de una proteína crucial para el crecimiento o la supervivencia celular se reiteran en tándem dentro de los cromosomas de generaciones sucesivas de células recombinantes. Ejemplos de marcadores de selección adecuados para células de mamífero incluyen los genes de la dihidrofolato reductasa (DHFR) y de la timidina cinasa sin promotor. Los transformantes de células de mamífero se ponen en presión selectiva, en donde solo los transformantes que están adaptados de forma única sobreviven debido al gen de selección presente en el vector. La presión selectiva se impone cultivando las células transformadas en condiciones en que la concentración de agente de selección en el medio se aumenta sucesivamente, dando lugar de ese modo a la amplificación tanto del gen de selección como del ADN que codifica otro gen, tal como una proteína de unión a antígeno que se une al polipéptido diana. Como resultado, se sintetizan cantidades aumentadas de un polipéptido tal como una proteína de unión a antígeno a partir del ADN amplificado.

Habitualmente es necesario un sitio de unión al ribosoma para el inicio de la traducción del ARNm y se caracteriza por una secuencia de Shine-Dalgarno (procariotas) o una secuencia de Kozak (eucariotas). El elemento típicamente está ubicado 3' al promotor y 5' a la secuencia codificante del polipéptido a expresar.

En algunos casos, tal como, cuando se desea glucosilación en un sistema de expresión en células hospedadoras eucariotas, se pueden manipular las diversas pre- o prosecuencias para mejorar la glucosilación o el rendimiento. Por ejemplo, se puede alterar el sitio de escisión de peptidasa de un péptido señal particular, o añadir prosecuencias, que también pueden afectar a la glucosilación. El producto proteínico final puede tener, en la posición -1 (con respecto al primer aminoácido de la proteína madura), uno o más aminoácidos adicionales inherentes a la expresión, que pueden no haberse retirado totalmente. Por ejemplo, el producto proteínico final puede tener uno o dos residuos aminoácidos encontrados en el sitio de escisión por peptidasa, fijados al extremo amínico. Como alternativa, el uso de algunos sitios de escisión enzimática puede provocar una forma ligeramente truncada del polipéptido deseado, si la enzima corta en dicha zona dentro de la polipéptido maduro.

La expresión y clonación típicamente contendrá un promotor que se reconoce por el organismo hospedador y unido de forma funcional a la molécula que codifica la proteína de unión a antígeno. Los promotores son secuencias no transcritas ubicadas anteriores (es decir, 5') al codón de inicio de un gen estructural (en general en aproximadamente 100 a 1000 pb) que controlan la transcripción del gen estructural. Los promotores se agrupan convencionalmente en una de dos clases: promotores inducibles y promotores constitutivos. Los promotores inducibles inician niveles aumentados de transcripción a partir del ADN bajo su control en respuesta a algún cambio en las condiciones de cultivo, tal como la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura. Los promotores constitutivos, por otro lado, transcriben uniformemente un gen al que están unidos de forma funcional, es decir, con poco o ningún control sobre la expresión génica. Son bien conocidos una gran cantidad de promotores, reconocidos por una diversidad de posibles células hospedadoras. Un promotor adecuado se une de forma funcional al ADN que codifica la cadena pesada o la cadena ligera que comprende una proteína de unión a

antígeno al retirar el promotor del ADN fuente por digestión con enzima de restricción e insertar la secuencia promotora deseada en el vector.

También son bien conocidos en la técnica promotores adecuados para su uso con hospedadores de levadura. Los potenciadores de levadura se usan ventajosamente con promotores de levadura. Los promotores adecuados para su uso con células hospedadoras de mamífero son bien conocidos e incluyen, aunque sin limitación, los obtenidos de los genomas de virus tales como virus del polio, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, retrovirus, virus de la hepatitis-B y virus de simio 40 (SV40). Otros promotores de mamífero adecuados incluyen promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, promotores de choque térmico y el promotor de actina.

Puede insertarse una secuencia potenciadora en el vector para aumentar la transcripción del ADN que codifica la cadena ligera o la cadena pesada que comprende una proteína de unión a antígeno por eucariotas superiores. Los potenciadores son elementos de acción en *cis* de ADN, habitualmente de aproximadamente 10-300 pb de longitud, que actúan sobre el promotor para aumentar la transcripción. Los potenciadores son relativamente independientes de la orientación y la posición, habiéndose encontrado en posiciones tanto 5' como 3' a la unidad de transcripción. Varias secuencias potenciadoras disponibles de genes de mamífero son conocidas (por ejemplo, globina, elastasa, albúmina, alfa-feto-proteína e insulina). Típicamente, sin embargo, se usa un potenciador de un virus. El potenciador de SV40, el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de poliomavirus y los potenciadores de adenovirus conocidos en la técnica son elementos potenciadores ejemplares para la activación de promotores eucariotas. Aunque un potenciador puede estar colocado en el vector 5' o 3' a una secuencia codificante, típicamente está ubicado en un sitio 5' del promotor. Una secuencia que codifica una secuencia señal natural o heteróloga apropiada (secuencia líder o péptido señal) puede incorporarse en un vector de expresión, para promover la secreción extracelular del anticuerpo. La elección del péptido señal o el líder depende del tipo de células hospedadoras en que tiene que producirse el anticuerpo, y una secuencia señal heteróloga puede remplazar la secuencia señal natural. Ejemplos de péptidos señal que son funcionales en células hospedadoras de mamífero incluyen los siguientes: la secuencia señal para interleucina-7 (IL-7) descrita en la patente de Estados Unidos n.º 4 965 195; la secuencia señal para el receptor de interleucina-2 descrita en Cosman *et al.*, 1984, Nature 312:768; el péptido señal del receptor de interleucina-4 descrito en la patente EP n.º 0 367 566; el péptido señal del receptor de interleucina-1 de tipo I descrito en la patente de Estados Unidos n.º 4 968 607; el péptido señal del receptor de interleucina-1 de tipo II descrito en la patente EP n.º 0 460 846.

En una realización, la secuencia líder comprende SEQ ID NO: 21 (MDMRVPAQLL GLLLLWLRLGA RC) que está codificada por SEQ ID NO: 22 (atggacatga gaggctctgc acagctgctg ggctgctgc tgctgtggct gagaggcgcc agatgc). En otra realización, la secuencia líder comprende SEQ ID NO: 23 (MAWALLLT LTQGTGWSWA) que está codificada por SEQ ID NO: 24 (atggcctggg ctctgctgct cctcaccctc ctactcagg gcacagggtc ctgggccc).

Los vectores de expresión que se proporcionan pueden construirse a partir de un vector de partida tal como un vector disponible en el mercado. Dichos vectores pueden contener o no todas las secuencias de apoyo deseadas. Cuando ya no está presente una o más de las secuencias de apoyo descritas en este documento en el vector, pueden obtenerse individualmente y ligarse en el vector. Los métodos usados para obtener cada una de las secuencias de apoyo son bien conocidos para los expertos en la materia.

Después de haber construido el vector y haber insertado una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena ligera, una cadena pesada, o una cadena ligera y una cadena pesada que comprenden una secuencia de unión a antígeno en el sitio apropiado del vector, el vector completado puede insertarse en una célula hospedadora adecuada para la amplificación y/o la expresión del polipéptido. La transformación de un vector de expresión para una proteína de unión a antígeno en una célula hospedadora seleccionada puede conseguirse por métodos bien conocidos, incluyendo transfección, infección, coprecipitación con fosfato de calcio, electroporación, microinyección, lipofección, transfección mediada por DEAE-dextrano u otras técnicas conocidas. El método seleccionado será, en parte, en función del tipo de célula hospedadora a usar. Estos métodos y otros métodos adecuados son bien conocidos por los expertos en la materia, y se exponen, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, 2001, *supra*.

Una célula hospedadora, cuando se cultiva en condiciones apropiadas, sintetiza una proteína de unión a antígeno que posteriormente puede recogerse del medio de cultivo (si la célula hospedadora la secreta en el medio) o directamente de la célula hospedadora que la produce (si no se secreta). La selección de una célula hospedadora apropiada dependerá de diversos factores, tal como los niveles de expresión deseados, las modificaciones al polipéptido que son deseables o necesarias para la actividad (tal como glucosilación o fosforilación) y facilidad de plegamiento en una molécula biológicamente activa.

Las líneas celulares de mamífero disponibles como hospedadoras para la expresión son bien conocidas en la técnica e incluyen, aunque sin limitación, líneas celulares inmortalizadas disponibles de la American Type Culture Collection (ATCC), incluyendo, aunque sin limitación, células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), y otras varias líneas celulares. En otra realización, puede seleccionarse una línea

celular del linaje de linfocitos B que no genera su propio anticuerpo, pero tiene la capacidad de generar y secretar un anticuerpo heterólogo.

Un "resto conector", como se usa en este documento, se refiere a un grupo orgánico peptídico o no peptídico biológicamente aceptable que se une covalentemente a un residuo aminoacídico de un análogo peptídico de toxina u otra cadena polipeptídica (por ejemplo, una HC o LC de inmunoglobulina o dominio Fc de inmunoglobulina) contenida en la composición innovadora, que es un resto conector que une covalentemente o conjuga el análogo peptídico de toxina u otra cadena polipeptídica con otra cadena peptídica o polipeptídica en la composición, o con un resto prolongador de la semivida. En algunas realizaciones de la composición, un resto prolongador de la semivida, como se describe en este documento, se conjuga, es decir, se une covalentemente de forma directa a un residuo aminoacídico del propio análogo peptídico de toxina, u opcionalmente, a un resto conector peptídico o no peptídico (incluyendo, aunque sin limitación, conector aromático o de arilo) que se une covalentemente a un residuo aminoacídico del análogo peptídico de toxina. La presencia de cualquier resto conector es opcional. Cuando está presente, su estructura química no es crucial, ya que sirve principalmente como espaciador para colocar, unir, conectar u optimizar la presentación o posición de un resto funcional con respecto a uno o más restos funcionales distintos de una molécula de la composición innovadora. La presencia de un resto conector puede ser útil en optimizar la actividad farmacológica de algunas realizaciones de la composición innovadora. El conector, si está presente, puede estar compuesto de aminoácidos ligados juntos por enlaces peptídicos. El resto conector, si está presente, puede ser independientemente igual o diferente de cualquier otro conector, o conectores, que puedan estar presentes en la composición innovadora. En algunas realizaciones, el conector puede ser un conector multivalente que facilita la presentación multivalente de análogos peptídicos de toxina de la presente invención; la presentación multivalente de dichos compuestos biológicamente activos puede aumentar la afinidad de unión y/o la potencia a través de la avidéz. Las propiedades *in vivo* de un producto terapéutico pueden alterarse (es decir, dirección específica, prolongación de la semivida, perfil de distribución, etc.) a través de conjugación con un polímero o proteína.

Conectores peptídicos. Como se indica anteriormente, el resto conector, si está presente (sea dentro de la secuencia de aminoácidos primaria del análogo peptídico de toxina, o como un conector para fijar un resto prolongador de la semivida al análogo peptídico de toxina), puede ser de naturaleza "peptídica" (es decir, compuesto de aminoácidos ligados juntos por enlaces peptídicos) y compuesto, en su longitud, preferiblemente, de 1 hasta aproximadamente 40 residuos aminoacídicos, más preferiblemente, de 1 hasta aproximadamente 20 residuos aminoacídicos, y muy preferiblemente de 1 a aproximadamente 10 residuos aminoacídicos. Preferiblemente, pero no necesariamente, los residuos aminoacídicos en el conector son de los veinte aminoácidos canónicos, más preferiblemente, cisteína, glicina, alanina, prolina, asparagina, glutamina y/o serina. Incluso más preferiblemente, un conector peptídico está compuesto por una mayoría de aminoácidos que están estéricamente no impedidos, tales como glicina, serina y alanina ligados por un enlace peptídico. También es deseable que, si está presente, se seleccione un conector peptídico que evita el recambio proteolítico rápido en la circulación *in vivo*. Algunos de estos aminoácidos pueden estar glucosilados, como bien entienden los expertos en la materia. Por ejemplo, una secuencia de conector útil que constituye un sitio de sialilación es X₁X₂NX₄X₅G (SEQ ID NO: 25), en donde X₁, X₂, X₄ y X₅ cada uno es independientemente cualquier residuo aminoacídico.

En otras realizaciones, los 1 a 40 aminoácidos del resto conector peptídico se seleccionan de glicina, alanina, prolina, asparagina, glutamina y lisina. Preferiblemente, un conector está compuesto por una mayoría de aminoácidos que están estéricamente no impedidos, tales como glicina y alanina. Por tanto, conectores preferidos incluyen poliglicinas, poliserinas y polialaninas, o combinaciones de cualquiera de estos. Algunos conectores peptídicos ejemplares son poli(Gly)₁₋₈, particularmente (Gly)₃, (Gly)₄ (SEQ ID NO: 26), (Gly)₅ (SEQ ID NO: 27) y (Gly)₇ (SEQ ID NO: 28), así como, GlySer y poli(Gly)₄Ser, tal como "L15" (GGGGSGGGSGGGGS; SEQ ID NO: 29), poli(Gly-Ala)₂₋₄ y poli(Ala)₁₋₈. Otros ejemplos específicos de conectores peptídicos incluyen (Gly)_sLys (SEQ ID NO: 30) y (Gly)_sLysArg (SEQ ID NO: 31). Otros ejemplos de conectores peptídicos útiles son: Otros ejemplos de conectores peptídicos útiles son:

(Gly)₃Lys(Gly)₄ (SEQ ID NO: 32);

(Gly)₃AsnGlySer(Gly)₂ (SEQ ID NO: 33);

(Gly)₃Cys(Gly)₄ (SEQ ID NO: 34); y

GlyProAsnGlyGly (SEQ ID NO: 35).

Para explicar la nomenclatura anterior, por ejemplo, (Gly)₃Lys(Gly)₄ significa Gly-Gly-Gly-Lys-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 36). También son útiles otras combinaciones de Gly y Ala.

Otros conectores preferidos son los identificados en este documento como "L5" (GGGGS; o "G₄S"; SEQ ID NO: 37), "L10" (GGGGSGGGGS; SEQ ID NO: 38); "L20" (GGGGSGGGSGGGSGGGGS; SEQ ID NO: 39); "L25" (GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS; SEQ ID NO: 40) y cualquier conector usado en los ejemplos de trabajo a continuación en este documento.

En algunas realizaciones de las composiciones de esta invención, que comprenden un resto conector peptídico, se colocan residuos ácidos, por ejemplo, residuos de glutamato o aspartato, en la secuencia de aminoácidos del resto conector. Ejemplos incluyen las siguientes secuencias de conector peptídico:

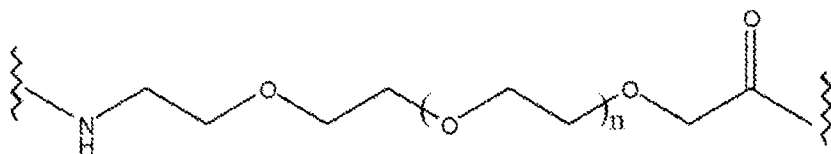
5 GGEGGG (SEQ ID NO:41);
 GEEEEGGG (SEQ ID NO:42);
 10 GEEEE (SEQ ID NO:43);
 GEEE (SEQ ID NO:44);
 GGDGGG (SEQ ID NO:45);
 15 GGDDGG (SEQ ID NO:46);
 GDDDG (SEQ ID NO:47);
 20 GDDD (SEQ ID NO:48);
 GGGGSDDSDGSDGEDGGGGS (SEQ ID NO:49);
 WEWEW (SEQ ID NO:50);
 25 FEFEF (SEQ ID NO:51);
 EEEWWW (SEQ ID NO:52);
 30 EEEFFF (SEQ ID NO:53);
 WWEEWW (SEQ ID NO:54); or
 FFEFFF (SEQ ID NO:55).

En otras realizaciones, el conector constituye un sitio de fosforilación, por ejemplo, $X_1X_2YX_4X_5G$ (SEQ ID NO: 56), en donde X_1 , X_2 , X_4 y X_5 cada uno es independientemente cualquier residuo aminoácido; $X_1X_2SX_4X_5G$ (SEQ ID NO: 57), en donde X_1 , X_2 , X_4 y X_5 es cada uno independientemente cualquier residuo aminoácido; o $X_1X_2TX_4X_5G$ (SEQ ID NO: 58), en donde X_1 , X_2 , X_4 y X_5 es cada uno independientemente cualquier residuo aminoácido.

Los conectores mostrados aquí son ejemplares; los conectores peptídicos dentro del alcance de esta invención pueden ser mucho más largos y pueden incluir otros residuos. Un conector peptídico puede contener, por ejemplo, una cisteína, otro tiol o nucleófilo para su conjugación con un resto prolongador de la semivida. En otra realización, el conector contiene un residuo de cisteína u homocisteína, u otro resto de 2-amino-etanol o 3-amino-propanol para la conjugación con resto prolongador de la semivida funcionalizado con maleimida, yodoacetamida o tioéster.

Otro conector peptídico útil es un conector flexible grande que comprende una secuencia de Gly/Ser/Thr aleatoria, por ejemplo: GSGSATGGSGSTASSGSGSATH (SEQ ID NO: 59) o HGSGSATGGSGSTASSGSGSAT (SEQ ID NO: 60), que se estima que es de aproximadamente el tamaño de una molécula de PEG de 1 kDa. Como alternativa, un conector peptídico útil puede estar compuesto por secuencias de aminoácidos conocidas en la técnica para formar estructuras helicoides rígidas (por ejemplo, conector rígido: -AEAAAKEAAAKEAAKAGG-// SEQ ID NO: 61). Además, un conector peptídico también puede comprender un segmento no peptídico tal como una molécula alifática de 6 carbonos de fórmula $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-$. Los conectores peptídicos puede alterarse para formar derivados como se describe en este documento.

Conectores no peptídicos. Opcionalmente, un resto conector no peptídico también es útil para conjugar el resto prolongador de la semivida con la parte peptídica del análogo peptídico de toxina conjugado con el resto prolongador de la semivida. Por ejemplo, pueden usarse conectores de alquilo, tales como $-NH-(CH_2)_s-C(O)-$, en donde $s = 2-20$. Estos conectores de alquilo pueden estar sustituidos, además, con cualquier grupo sin impedimento estérico tal como alquilo inferior (por ejemplo, C_1-C_6), acilo inferior, halógeno (por ejemplo, Cl, Br), CN, NH_2 , fenilo, etc. Conectores no peptídicos ejemplares son conectores de PEG (por ejemplo, mostrados a continuación):



en donde n es de modo que el conector tiene un peso molecular de aproximadamente 100 a aproximadamente 5000 dalton (Da), preferiblemente de aproximadamente 100 a aproximadamente 500 Da.

En una realización, el conector no peptídico es arilo. Los conectores pueden alterarse para formar derivados de la misma manera como se describe en este documento. "Arilo" es fenilo o fenilo condensado vecinalmente con un puente de carbono de 3, 4 o 5 miembros saturado, parcialmente saturado o insaturado, estando el fenilo o el puente sustituido con 0, 1, 2 o 3 sustituyentes seleccionados de alquilo C₁₋₈, haloalquilo C₁₋₄ o halo. "Heteroarilo" es un anillo monocíclico, insaturado, de 5, 6 o 7 miembros o bicíclico parcialmente saturado o insaturado de 6, 7, 8, 9, 10 u 11 miembros, en donde al menos un anillo está insaturado, conteniendo el anillo monocíclico y bicíclico 1, 2, 3 o 4 átomos seleccionados de N, O y S, en donde el anillo está sustituido con 0, 1, 2 o 3 sustituyentes seleccionados de alquilo C₁₋₈, haloalquilo C₁₋₄ y halo.

Las partes no peptídicas de la composición innovadora en cuestión, tal como conectores no peptídicos o restos prolongadores de la semivida no peptídicos, pueden sintetizarse por reacciones de química orgánica convencionales.

Otras realizaciones del conector multivalente comprenden un núcleo poliheterocíclico rígido de longitud controlada. Los conectores están químicamente diferenciados en cualquier extremo para acomodar químicas de acoplamiento ortogonal (es decir, "Click" con azida, acoplamiento de amida, formación de tioéter por alquilación con maleimida o haloacetamida, formación de oxima, aminación reductora, etc.).

Lo anterior es meramente ilustrativo y no un tratamiento exhaustivo de los tipos de conectores que pueden emplearse opcionalmente de acuerdo con la presente invención.

Ejemplo 1

Generación de conjugados de anti-GIPR/péptido GLP-1

Se manipuló anticuerpo anti-GIPR 2G10_LC1.003 para que tuviera una mutación E70C en SEQ ID NO: 151 (cadena ligera) o para que tuviera una mutación E275C en SEQ ID NO: 152 (cadena pesada). Cys mAb anti-GIPR con capuchón de bis-cisteamina (3-12 mg/ml de IgG1 en acetato de sodio 20 mM, pH 5,0) se redujo parcialmente usando 2-4 equivalentes de trifenilfosfina-3,3',3''-trisulfonato a TA. Se usó cromatografía de intercambio catiónico (CEX) para supervisar la progresión de la reacción (típicamente completa en 1-2 horas). La cisteamina liberada se purgó de la IgG1 parcialmente hiperreducida por intercambio de tampón en acetato de sodio 20 mM, pH 5,0. El Cys mAb sin cisteamina y parcialmente hiperreducido resultante (3-12 mg/ml) se reoxidó mediante la adición de 4-7 equiv. de ácido deshidroascórbico 4 mM, Na₂HPO₄ ac. 0,5 M a pH 7,0-7,5 seguido de incubación a 2-8 °C. El progreso de la reoxidación se supervisó mediante HPLC en fase inversa. Tan pronto como IgG1 se reformó completamente (típicamente 1-3 horas) 2-3 equivalentes de bromoacetil-péptido GLP-1 (SEQ ID NO: 129) con conector C terminal (SEQ ID NO: 29) se añadió y la mezcla de reacción se incubó adicionalmente a 2-8 °C. El progreso de la reacción de alquilación se supervisó por LC/MS y/o CEX hasta que se obtuvo el perfil diana de relación de péptido a anticuerpo (PAR) (por ejemplo, ≥95 % PART, <5 % PAR0+PAR1). La mezcla de reacción se inactivó ajustando el pH hasta 5,0 usando ácido acético. El conjugado de anti-GIPR/GLP-1 PART deseado se purificó usando cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) seguida de UF/DF de la formulación en acetato de sodio al 10 %, sacarosa al 9 %, pH 5,2.

Tabla 6. SEQ ID NO de aminoácidos

Identificador	Construcción	VL	VH	LC	HC	CDR L1	CDR L2	CDR L3	CDR H1	CDR H2	CDR H3
iPS:361172	2G10_LC1.003	147	148	151	152	156	157	158	162	163	164

Tabla 7. SEQ ID NO de ácidos nucleicos

Identificador	Construcción	VL	VH	LC	HC	CDR L1	CDR L2	CDR L3	CDR H1	CDR H2	CDR H3
IPS:361172	2G10_LC1.003	145	146	149	150	153	154	155	159	160	161

Tabla 8. Regiones ligeras variables y pesadas variables: Secuencias de ácido nucleico ("NA") y de aminoácidos ("AA")

IPS n.º	Ab	Tipo	VL	VH
IPS:361172	2G10_LC1.003	NA	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCC AGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAG GGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAG CAACTTAGCCTGGTACCAGCAGA AACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTC CTCATCTATGGTGCAGCCACCAG GGCCACTGGTATCCCAGCCAGGT TCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACA GAGTCACTCTCACCATCAGCAG CCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAG TTTATTACTGTCAGCAGTATAATA ACTGGCCTCTCACTTTCGGCGGA GGGACCAAGGTGGAGATCAAAC GA	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG GGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGA GGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA GCATCTGGATTCACCTTCAGTAAC TATGGCATGCACTGGGTCCGCCA GGCTCCAGGCGAGGGGCTGGAGT GGGTGGCAGCTATATGGTTTGAT GCAAGTGATAAATACTATGCAGA CGCCGTGAAGGGCCGATTCACCA TCTCCAGAGACAACTCCAAGAAC ACGCTGTATCTGCAAATGAACAG CCTGAGAGCCGAGGACACGGCTG TGTATTACTGTGCGAGAGATCAG GCGATTTTGGAGTGGTCCCCGA CTACTGGGGCCAGGGAACCCTGG TCACCGTCTCCTCA
			SEQ ID NO: 145	SEQ ID NO: 146
		AA	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRA SQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIY GAATRATGIPARFSGSGSGTEFTLTI SSLQSEDFAVYYCQQYNNWPLTFG GGTKVEIKR	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAA SGFTFSNYGMHWVRQAPGEGLEW VAAIWFDASDKYYADAVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARDQAIFGVVPDYWGQGTTLVT VSS
			SEQ ID NO: 147	SEQ ID NO: 148

Tabla 9A. Secuencias de ácido nucleico ("NA") y aminoácidos ("AA") de CDRL1, CDRL2 y CDRL3

iPS n.º	Ab	Tipo	CDRL1	CDRL2	CDRL3
iPS:361172	2G10_LC1.003	NA	AGGGCCAGTCAGAGT GTTAGCAGCAACTTA GCC	GGTGCAGCCACCA GGGCCACT	CAGCAGTATAATAAC TGGCCTCTCACT
			SEQ ID NO: 153	SEQ ID NO: 154	SEQ ID NO: 155
		AA	RASQSVSSNLA	GAATRAT	QQYNNWPLT
			SEQ ID NO: 156	SEQ ID NO: 157	SEQ ID NO: 158

Tabla 9B. Secuencias de nucleótidos y aminoácidos de CDRH1, CDRH2 y CDRH3

iPSn.º	Ab	Tipo	CDRH1	CDRH2	CDRH3
iPS:361172	2G10_LC1.003	NA	AACTATGGCATGCAC	GCTATATGGTTTG ATGCAAGTGATAA ATACTATGCAGAC GCCGTGAAGGGC	GATCAGGCGATTTT GGAGTGGTCCCCGAC TAC
			SEQ ID NO: 159	SEQ ID NO: 160	SEQ ID NO: 161
		AA	NYGMH	AIWFDASDKYYAD AVKG	DQAIFGVVPDY
			SEQ ID NO: 162	SEQ ID NO: 163	SEQ ID NO: 164

5

Tabla 10. Secuencias de ácido nucleico ("NA") y aminoácidos ("AA") de la cadena ligera y pesada

iPS n.º	Ab	Tipo	LC	HC
iPS:361172	2G10_LC1.003	NA	GAAATAGTGATGACGCAGTCTC CAGCCACCCTGTCTGTGTCTCC AGGGGAAAGAGCCACCCTCTCC TGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTA GCAGCAACTTAGCCTGGTACCA GCAGAAACCTGGCCAGGCTCCC AGGCTCCTCATCTATGGTGCAG CCACCAGGGCCACTGGTATCCC AGCCAGGTTCACTGGCAGTGGG	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGG GGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAG GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGC ATCTGGATTACCTTCAGTAACTA TGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGC TCCAGGCGAGGGGCTGGAGTGGG TGGCAGCTATATGGTTTGATGCAA GTGATAAATACTATGCAGACGCCG TGAAGGGCCGATTCACCATCTCCA

10

TCTGGGACAGAGTTCACTCTCA	GAGACAACTCCAAGAACACGCTG
CCATCAGCAGCCTGCAGTCTGA	TATCTGCAAATGAACAGCCTGAGA
AGATTTTGCAGTTTATTACTGTC	GCCGAGGACACGGCTGTGTATTAC
AGCAGTATAATAACTGGCCTCT	TGTGCGAGAGATCAGGCGATTTT
CACTTTCGGCGGAGGGACCAAG	GGAGTGGTCCCCGACTACTGGGGC
GTGGAGATCAAACGAACGGTG	CAGGGAACCTTGGTCAACCGTCTCC
GCTGCACCATCTGTCTTCATCTT	TCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCG
CCCCGCCATCTGATGAGCAGTTG	GTCTTCCCCCTGGCACCTCTCTCC
AAATCTGGAACTGCCTCTGTTG	AAGAGCACCTCTGGGGGCACAGC
TGTGCTTGCTGAATAACTTCTAT	GGCCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA
CCCAGAGAGGCCAAAAGTACAGT	CTACTTCCCCGAACCGGTGACGGT
GGAAGGTGGATAACGCCCTCCA	GTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGAC
ATCGGGTAACTCCCAGGAGAGT	CAGCGGCGTGACACCTTCCCCGC
GTACACAGAGCAGGACAGCAAG	TGTCTACAGTCCTCAGGACTCTA
GACAGCACTACAGCCTCAGCA	CTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGT
GCACCCTGACGCTGAGCAAAGC	GCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCA
AGACTACGAGAAACACAAAGT	GACCTACATCTGCAACGTGAATCA
CTACGCCTGCGAAGTCACCCAT	CAAGCCCAGCAACACCAAGGTGG
CAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCA	ACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTT
CAAAGAGCTTCAACAGGGGAG	GTGACAAAACCTCACACATGCCAC
AGTGT	CGTGCCAGCACCTGAACTCCTGG
	GGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCC
	CCCCAAAACCCAAGGACACCCTCA
	TGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCA
	CATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC
	ACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCA
	ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG
	GTGCATAATGCCAAGACAAAGCC
	GTGTGAGGAGCAGTACGGCAGCA
	CGTACCGTTGTGTCAGCGTCTCA
	CCGTCTGCACCAGGACTGGCTGA
	ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG
	GTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC
	CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA
	GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC
	ACAGGTGTACACCCTGCCCCATC

			CCGGGAGGAGATGACCAAGAACC AGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCG CCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG CAGCCGGAGAACAACACTACAAGAC CACGCCCTCCCGTGCTGGACTCCGA CGGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAA GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGT GGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGC ACAACCACTACACGCAGAAGAGC CTCTCCCTGTCTCCGGGTAAG
		SEQ ID NO: 149	SEQ ID NO: 150
	AA	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCR ASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRL LIYGAATRATGIPARFSGSGSGTE FTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNN WPLTFGGGTKEIKRTVAAPSVEFI FPPSDEQLKSGTASVVCILNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSSTYSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FINRGEK	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAA SGFTFSNYGMHWVRQAPGEGLEW VAAIWFDASDKYYADAVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CARDQAIFGVVPDYWGQGLTVTS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHITPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLP PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPC EEQYGSSTYRCVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
		SEQ ID NO: 151	SEQ ID NO: 152

5 Un "agonista del receptor de GLP-1" o "péptido GLP-1" se refiere a compuestos que tienen actividad de receptor de GLP-1. Dichos compuestos ejemplares incluyen exendinas, análogos de exendina, agonistas de exendina, GLP-1(7-37), análogos de GLP-1(7-37), agonistas de GLP-1(7-37) y similares. Los compuestos agonistas del receptor de GLP-1 opcionalmente pueden estar amidados. Las expresiones "agonista del receptor de GLP-1" y "compuesto agonista del receptor de GLP-1" tienen el mismo significado.

Tabla 1. Ejemplos de secuencias de agonistas del receptor de GLP-1

SEQ ID NO:	Secuencia
62	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS

SEQ ID NO:	Secuencia
63	HSDGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS
64	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS
65	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEFLKNGGPSSGAPPPS
66	HGEGTFTSDLSKQLEEEAARLFIEFLKNGGPSSGAPPPS
67	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGG
68	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKNGG
69	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEFLKNGG
70	HGEGTFTSDLSKQLEEEAARLFIEFLKNGG
71	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKN
72	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKN
73	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEFLKN
74	HGEGTFTSDLSKQLEEEAARLFIEFLKN
75	HGEGTFTSDLSKQLEEKAAKEFIEFLKQGGPSSGAPPPS
76	HGEGTFTSDLSKQLEEKAAKEFIEWLKQGGPSSGAPPPS
77	HGEGTFTSDLSKQ(octylG)EEEAVRLFIEWLKQGGPSSGAPPPS
78	HGEGTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSS(octylG)APPPS
79	HGEFTFTSDLSKQLEEEAVRLFIEWLKQGGPSKEIIS
80	HGEFTFTSDLSKQLEEKAAKEFIEWLKQGGPSSGAPPPS
81	HGEGTFTSDLVKILEAEAVRKFIEFLKNGGPSSGAPPPS
82	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSK
83	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG
84	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR
85	H(Aib)EGTFTSDVSSYLEGQAAREFIAFLVR(Aib)R
86	HXaa ₈ EGTFTSDVSSYLEXaa ₂₂ Xaa ₂₃ AAKEFI
	Xaa ₃₀ WLXaa ₃₃ Xaa ₃₄ GXaa ₃₆ Xaa ₃₇
	en donde Xaa ₈ es A, V o G
	Xaa ₂₂ es G, K o E
	Xaa ₂₃ es Q o K
	Xaa ₃₀ es A o E
	Xaa ₃₃ es V o K
	Xaa ₃₄ es K, N o R
	Xaa ₃₆ es R o G
	y Xaa ₃₇ es G, H, P o está ausente
87	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVRGRG
88	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIEWLVKGRG
89	HAEGTFTSDVSSYLEKQAAKEFIAWLVKGRG
90	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGG
91	HVEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGG
92	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKNGGG
93	HVEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKNGGG
94	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGP
95	HVEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGP
96	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKNGGP

SEQ ID NO:	Secuencia
97	HVEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKNGGP
98	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKGG
99	HVEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKGG
100	HVEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVNNG
101	HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVNNG
102	HXaa ₈ EGTFTSDVS
	SYLEXaa ₂₂ QAAKEFIAWLXaa ₃₃ KGGPSSGAPPPC ₄₅ C ₄₆ -Z, en donde
	Xaa ₈ es: D-Ala, G, V, L, I, S o T
	Xaa ₂₂ es G, E, D o K
	Xaa ₃₃ es: V o I
	y Z es OH o NH ₂ y, opcionalmente, en donde (i) un resto de polietilenglicol está fijado covalentemente a C ₄₅ , (ii) un resto de polietilenglicol está fijado covalentemente a C ₄₆ , o (iii) un resto de polietilenglicol está fijado a C ₄₅ y un resto de polietilenglicol está fijado a C ₄₆ .
103	HVEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKGGPSSGAPPPC ₄₅ C ₄₆ -NH ₂ y, opcionalmente, en donde (i) un resto de polietilenglicol está fijado covalentemente a C ₄ , (ii) un resto de polietilenglicol está fijado covalentemente a C ₄₆ , o (iii) un resto de polietilenglicol está fijado a C ₄₅ y un resto de polietilenglicol está fijado a C ₄₆
104	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVKLFIEWLKNGGPSSGAPPPS
105	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPKSGAPPPS
106	GEGTFTSDLSKQMEEEAVKLFIEWLKNGGPSSGAPPPS
107	HGEGTFTSDLSRQNorLeEEEA VRLFIEWLRNGGPKSGAPPPS
108	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVKLFIEWLKNGGPSSGAPPPS
109	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVKLFIEWLKNGGPSSGAPPPS
110	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVKLFIEWLKNGGPSSGAPPPS
111	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVKLFIEWLKNGGPSSGAPPPS
112	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSK
113	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSK
114	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSK
115	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSK
116	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSK
117	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSK
118	AEGTFTSDVSSYLEGQAAREFIAWLKGRG
119	AEGTFTSDVSSYLEGQAAREFIAWLKGRG
120	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAREFIAWLVRGRGK
121	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAREFIAWLVRGRGK
122	{H ₂ }H[Aib]EGTFTSDVSSYLE[Aib]QAAKEFIAWLKNGG[Aeea][Aee a]K(CONH ₂)
123	{H ₂ }H[Aib]EGTFTSDVSSYLE[Aib]QAAKEFIAWLKGGG
124	{H ₂ }H[Aib]EGTFTSDVSSYLEGEAAKKFIAWLKGGG
125	{H ₂ }H[Aib]EGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKGGK(CONH ₂)
126	{H ₂ }H[Aib]EGTFTSDVSSYLE[Aib]EAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS
127	{H ₂ }HGEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKGGG

SEQ ID NO:	Secuencia
128	{H2}H[Aib]EGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGG
129	{H2}H[Aib]EGTFTSDYSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGG
130	{H2}H[Aib]EGTFTSDVSKYLEEEEAVRLFIEWLKNGGG
131	{H2}H[Aib]EGTFTSDVSKYLEEEAAKLFIEWLKNGGG
132	{H2}H[Aib]EGTFTSDVSKYLEEEAAKLFIEWLVKGGG
133	{H2}H[Aib]IGTFTSDVSSYLE[Aib]QAAKEFIAWLVKGG
134	{H2}H[Aib]EGTFTSEVSSYLE[Aib]QAAKEFIAWLVKGG
135	{H2}H[Aib]AGTFTSDVSSYLE[Aib]QAAKEFIAWLVKGG
136	{H2}H[Aib]EGTFTSDVSSYLE[Aib]QAAKEFAAWLVKGG
137	{H2}H[Aib]EGTFTSDVSSYLE[Aib]QAAKEFIAALVKGG
138	{H2}H[Aib]TGTFTSDVSSYLE[Aib]QAAKEFIAWLVKGGG
139	{H2}H[Aib]EGTFTSEVSSYLE[Aib]QAAKEFIAALVKGGG
140	{H2}H[Aib]EGTFTSDVSSYLE[Aib]QAAKEFIAALVKGGG
141	{H2}H[Aib]EGTFTSDVSSYLEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS
142	{H2}H[Aib]EGTFTSDYSSYLE[Aib]QAAKEFIAWLVKGGG
143	{H2}H[Aib]EGTFTSDVSSYLE[Aib]QAAKEFIAWLVKGGG(CONH2)
144	{Dmia}SQGTFTSDYSKYLDERRAKDFVQWLMNT
165	{H2}HGEFTFTSDLKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS
AEEA se refiere a ácido [2-(2-amino)etoxi]acético	
EDA se refiere a etilendiamina.	
MPA se refiere a ácido maleimidopropiónico.	

Resultados y debate

- 5 Una conjugación específica de sitio satisfactoria con proteína Cys mAb (IgG1) es crucialmente dependiente de la capacidad de reducir selectivamente ("quitar el capuchón") los residuos de cisteína que se manipularon en la estructura de IgG1 con puente disulfuro. Este proceso problemático desde un punto de vista práctico tiene como objetivo reducir solamente los enlaces disulfuro de
- 10 las **dos** cisteínas manipuladas en presencia de **al menos dieciséis** enlaces disulfuro naturales que mantienen junto el tetrámero de IgG1. Una **reducción selectiva** en una sola etapa sería muy deseable, pero actualmente no es factible (figura 1). En su lugar se desarrolló una **reducción selectiva neta** en dos etapas (figura 2):
- 15 *Etapas de reducción:* Se permitió que el Cys mAb reaccionara con un agente reductor (típicamente una fosfina) para lograr la reducción completa ("quitar el capuchón") de los residuos de cisteína manipulados. También se reducen algunos enlaces disulfuro naturales. El grado de esta reacción secundaria indeseable es muy dependiente de los parámetros de reacción, incluyendo las modificaciones postraduccionales (por ejemplo, identidad de los "capuchones") y las condiciones de reacción (por ejemplo, temperatura, tipo y cantidad de agente reductor, tampón de reacción). El resultado es Cys mAb "sin capuchón" e hiperreducido.
- 20 *Etapas de oxidación:* Los "capuchones" de tiol liberados en la etapa de reducción deben eliminarse antes de continuar para evitar la "readición de capuchón" indeseable del Cys mAb. Los enlaces disulfuro naturales entonces se restablecen en presencia de un oxidante (típicamente ácido deshidroascórbico).
- 25 Este protocolo de dos etapas genera proteína Cys mAb "sin capuchón" lista para la conjugación específica de sitio mediante reacción de S-alkilación (figura 3).
- 30 Para conseguir un conjugado de Cys mAb prácticamente homogéneo (PART; relación de péptido a anticuerpo de 2), es imperativo mantener la hiperreducción al mínimo, ya que el restablecimiento de los enlaces disulfuro naturales mediante oxidación no es perfecto. Por otro lado, la hiporreducción es igual de indeseable, ya que da lugar a impurezas hipoalquiladas (PAR1, PAR0). El perfil óptimo de reducción que consiste en eliminación completa del capuchón con hiperreducción mínima requiere una combinación apropiada de varios parámetros:

- 5 El "capuchón" de cisteína cargado positivamente (por ejemplo, cisteamina, CA) debe emparejarse con un agente reductor cargado negativamente. Se descubrió que el trifenilfosfina-3,3',3"-trisulfonato (TPPTS) era particularmente eficaz. Otras fosfinas aniónicas, por ejemplo, TCEP, TPPDS fueron funcionales, pero su rendimiento fue inferior a TPPTS (figura). Los pares desemparejados, por ejemplo, mercaptoetanosulfonato (MES, "capuchón" cargado negativamente) y tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP, agente reductor cargado negativamente) dieron lugar a reacciones lentas, no selectivas y/o incompletas (figura 4).
- 10 Los tampones de reacción deben ser de baja fuerza iónica (por ejemplo, acetato de sodio 20 mM) para maximizar las interacciones coulombicas atrayentes entre compañeros de reacción con cargas opuestas (por ejemplo, IgG1 con capuchón de cisteamina cargada positivamente y TPPTS negativamente). Aumentar la fuerza iónica del medio de reacción hace que la reducción sea lenta y no selectiva (figura).
- 15 El pH de la reacción debe ser suficientemente bajo (por ejemplo, pH 5) para evitar que los tioles liberados ("capuchones") experimenten reacciones secundarias derivadas, por ejemplo, intercambio de disulfuro con los disulfuros naturales de IgG1.
- 20 La combinación apropiada de las variables anteriores permite la eliminación completa del capuchón usando solamente un pequeño exceso del agente reductor (por ejemplo, exceso de 1,5 equiv., 3,5 equiv. por Cys mAb total) dando lugar, en consecuencia, a hiperreducción mínima. Dicho grado mínimo de hiperreducción se corrige fácilmente en la siguiente etapa de oxidación usando ácido deshidroascórbico (DHAA, por ejemplo 4-6 equiv.) como oxidante suave. El Cys-mAb "sin capuchón" prácticamente homogéneo resultante puede alquilarse limpiamente usando solamente un pequeño exceso (por ejemplo, exceso de 0,2 equiv., 2,2 equiv. por Cys mAb total) de bromoacetamidas (por ejemplo, derivados de bromoacetamida de péptidos sintéticos) para producir ≥ 95 %
- 25 de conjugado PAR2 (figura).

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar un conjugado de anticuerpo o conjugado de fragmento de anticuerpo, comprendiendo el método las etapas de:
 - a) obtener una composición que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo;
 - b) exponer el anticuerpo o fragmento de anticuerpo a un agente de bloqueo de cisteína, en donde el agente de bloqueo de cisteína es cisteamina y el agente de bloqueo de cisteína forma un disulfuro mixto estable con al menos un residuo de cisteína del anticuerpo o fragmento de anticuerpo;
 - c) añadir un agente reductor a la composición para formar una mezcla de reducción y permitir que se produzca una reacción de reducción, de modo que la mezcla de reducción comprende un anticuerpo reducido o fragmento de anticuerpo reducido, en donde el agente reductor es trifenilfosfina-3,3',3"-trisulfonato ("TPPTS");
 - d) añadir un agente oxidante a la mezcla de reducción para formar una mezcla oxidada y permitir que se produzca una reacción oxidante, de modo que la mezcla oxidada comprenda un anticuerpo oxidado o fragmento de anticuerpo oxidado; y
 - e) añadir un resto químico activado a la mezcla oxidada para formar una mezcla de conjugación y permitir que se produzca una reacción de conjugación, de modo que se forme un conjugado de anticuerpo o conjugado de fragmento de anticuerpo.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el disulfuro mixto es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo con una cisteína libre con capuchón.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde, después de la etapa b) y antes de la etapa c), se realiza cromatografía de intercambio catiónico para retirar el exceso de agente de bloqueo de cisteína.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la relación de agente reductor a anticuerpo o fragmento de anticuerpo es de 2 a 4:1 (mol/mol).
5. El método de acuerdo con cualquier reivindicación previa, en donde, después de la etapa c) y antes de la etapa d), se realiza una etapa de intercambio de tampón para retirar el agente reductor.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la etapa de intercambio de tampón es ultrafiltración/diafiltración.
7. El método de acuerdo con cualquier reivindicación previa, en donde el agente oxidante es ácido deshidroascórbico ("DHAA").
8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la relación de agente oxidante a anticuerpo o fragmento de anticuerpo es de 3 a 6:1 (mol/mol).
9. El método de acuerdo con cualquier reivindicación previa, en donde el resto químico activado es un péptido que comprende un halógeno, en donde el halógeno se selecciona del grupo que consiste en Br, I, y Cl.
10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la relación de resto químico activado a anticuerpo o fragmento de anticuerpo es de 2 a 3:1 (mol/mol).
11. El método de acuerdo con cualquier reivindicación previa, en donde, después de la etapa e), se realiza una etapa de purificación para retirar el resto químico activado.
12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la etapa de purificación incluye cromatografía de interacción hidrófoba ("HIC"), ultrafiltración/diafiltración o cromatografía de interacción hidrófoba ("HIC") seguida de ultrafiltración/diafiltración.
13. Un método para preparar un conjugado de anticuerpo o conjugado de fragmento de anticuerpo, comprendiendo el método las etapas de:
 - a) obtener una composición que comprende un disulfuro mixto que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo con una cisteína libre con capuchón que comprende un capuchón de cisteamina;
 - b) añadir un agente reductor a la composición para formar una mezcla de reducción y permitir que se produzca una reacción de reducción, de modo que la mezcla de reducción comprende un anticuerpo reducido o fragmento de anticuerpo reducido, en donde el agente reductor es trifenilfosfina-3,3',3"-trisulfonato ("TPPTS");
 - c) añadir un agente oxidante a la mezcla de reducción para formar una mezcla oxidada y permitir que se produzca una reacción oxidante, de modo que la mezcla oxidada comprenda un anticuerpo oxidado o fragmento de anticuerpo oxidado; y
 - d) añadir un resto químico activado a la mezcla oxidada para formar una mezcla de conjugación y permitir que se produzca una reacción de conjugación, de modo que se forme un conjugado de anticuerpo o conjugado de fragmento de anticuerpo.

14. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en donde, después de la etapa a) y antes de la etapa b), se realiza cromatografía de intercambio catiónico para retirar el exceso de agente de bloqueo de cisteína.
- 5 15. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la relación de agente reductor a anticuerpo o fragmento de anticuerpo es de 2 a 4:1 (mol/mol).
16. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13-15, en donde, después de la etapa b) y antes de la etapa c) se realiza una etapa de intercambio de tampón para retirar el agente reductor.
- 10 17. El método de acuerdo con la reivindicación 16, en donde la etapa de intercambio de tampón es ultrafiltración/diafiltración.
18. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13-17, en donde el agente oxidante es ácido deshidroascórbico ("DHAA").
- 15 19. El método de acuerdo con la reivindicación 18, en donde la relación de agente oxidante a anticuerpo o fragmento de anticuerpo es de 3 a 6:1 (mol/mol).
- 20 20. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13-19, en donde el resto químico activado es un péptido que comprende un halógeno, en donde el halógeno se selecciona del grupo que consiste en Br, I, y Cl.
21. El método de acuerdo con la reivindicación 20, en donde la relación de resto químico activado a anticuerpo o fragmento de anticuerpo es de 2 a 3:1 (mol/mol).
- 25 22. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13-21, en donde, después de la etapa d), se realiza una etapa de purificación para retirar el resto químico activado.
23. El método de acuerdo con la reivindicación 22, en donde la etapa de purificación incluye cromatografía de interacción hidrófoba ("HIC"), ultrafiltración/diafiltración o cromatografía de interacción hidrófoba ("HIC") seguida de ultrafiltración/diafiltración.
- 30 24. El método de acuerdo con cualquier reivindicación previa, en donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende un residuo de cisteína en una posición seleccionada del grupo que consiste en D70 de la cadena ligera del anticuerpo con respecto a la secuencia de referencia SEQ ID NO: 7; E276 de la cadena pesada del anticuerpo con respecto a la secuencia de referencia SEQ ID NO: 8; y T363 de la cadena pesada del anticuerpo con respecto a la secuencia de referencia SEQ ID NO: 8.
- 35

FIG. 1

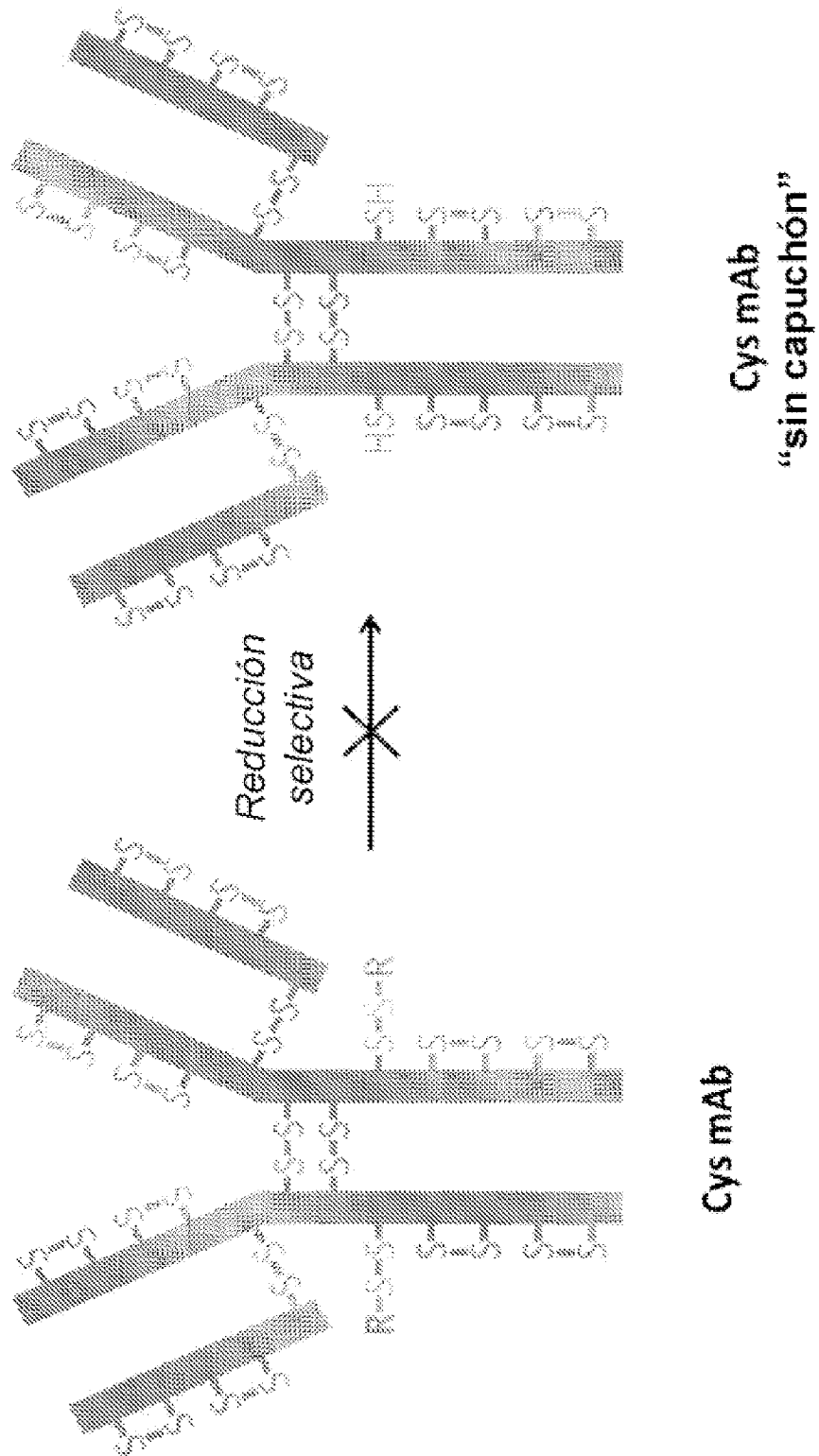


FIG. 2

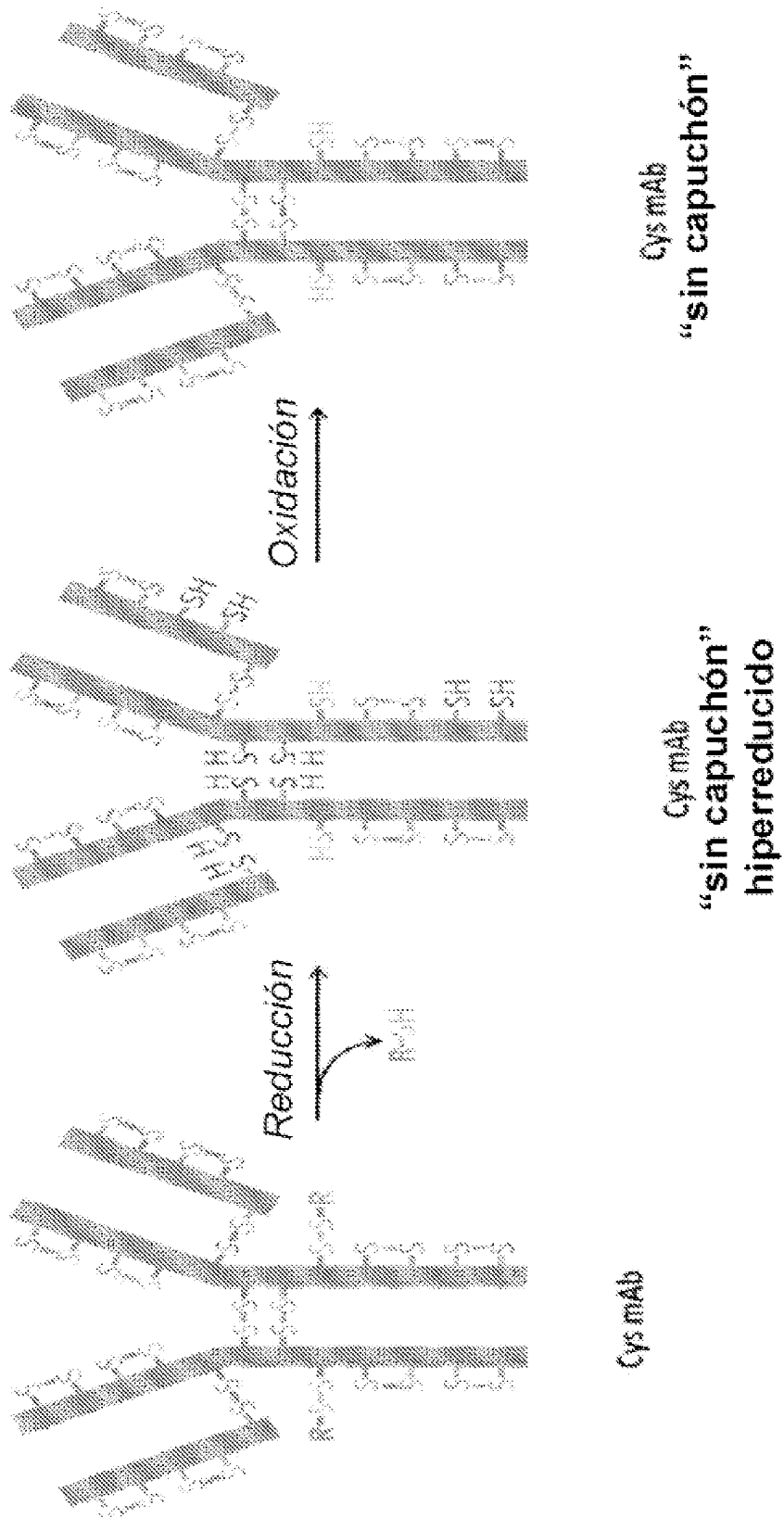


FIG. 3

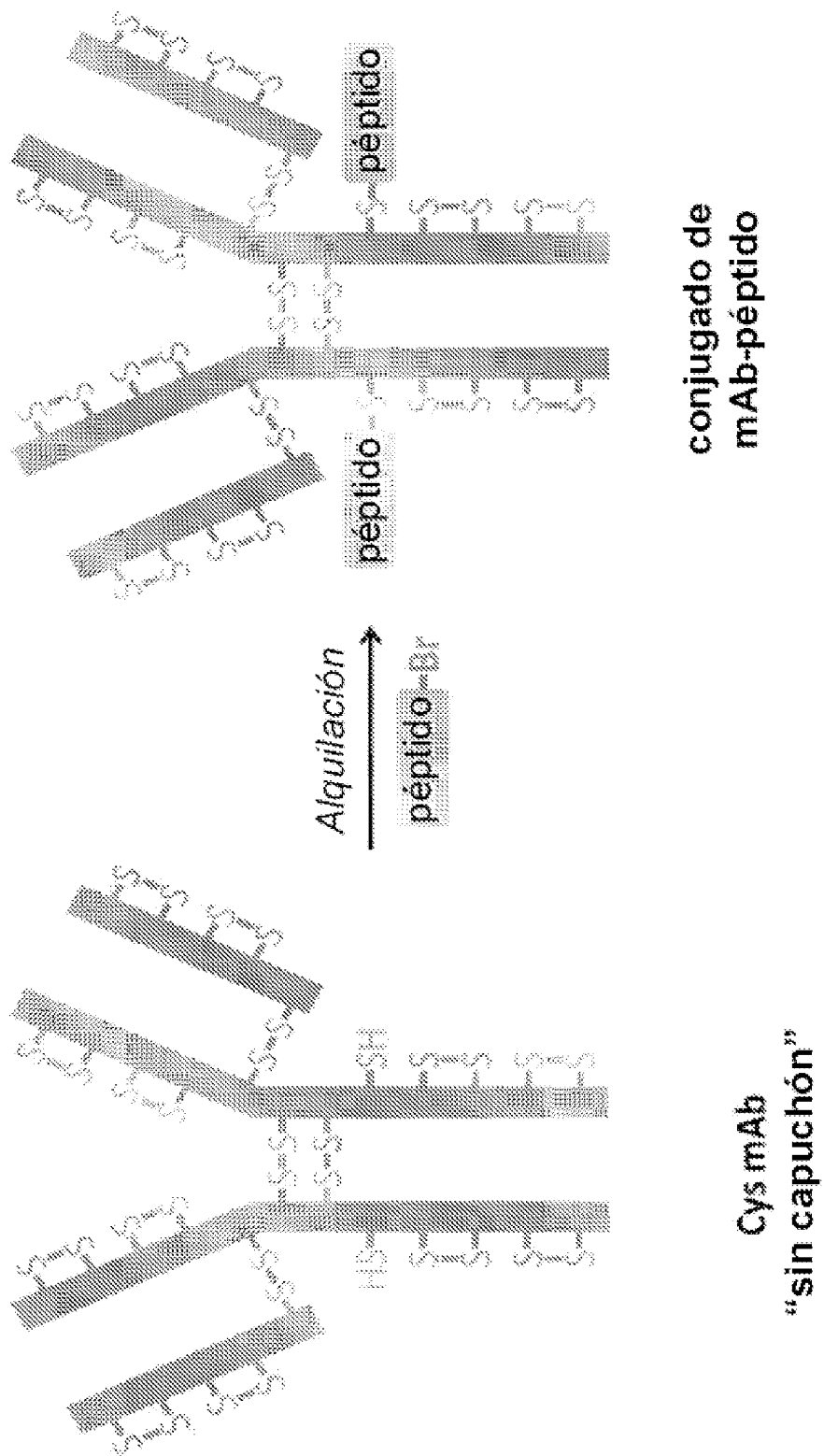


FIG. 4

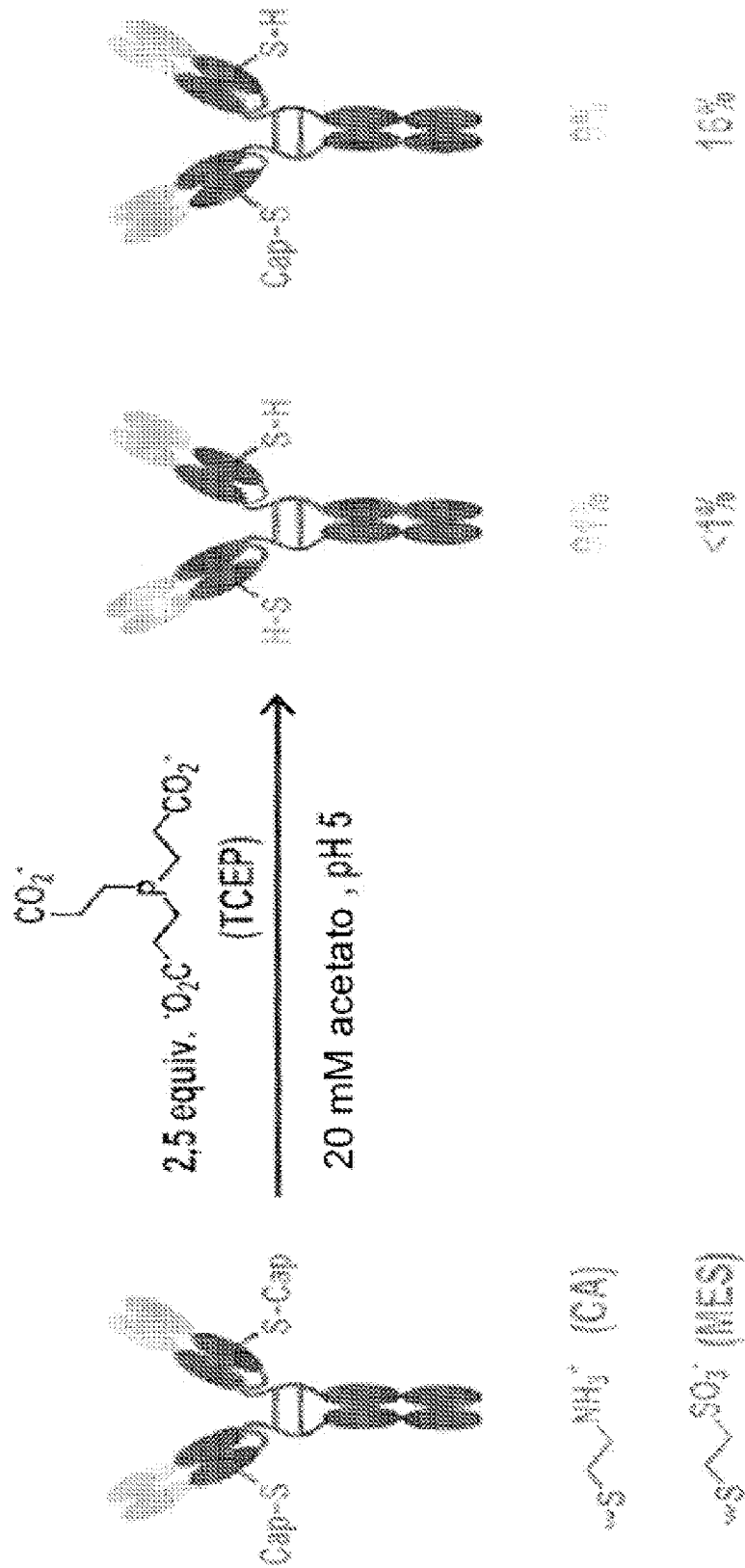


FIG. 5

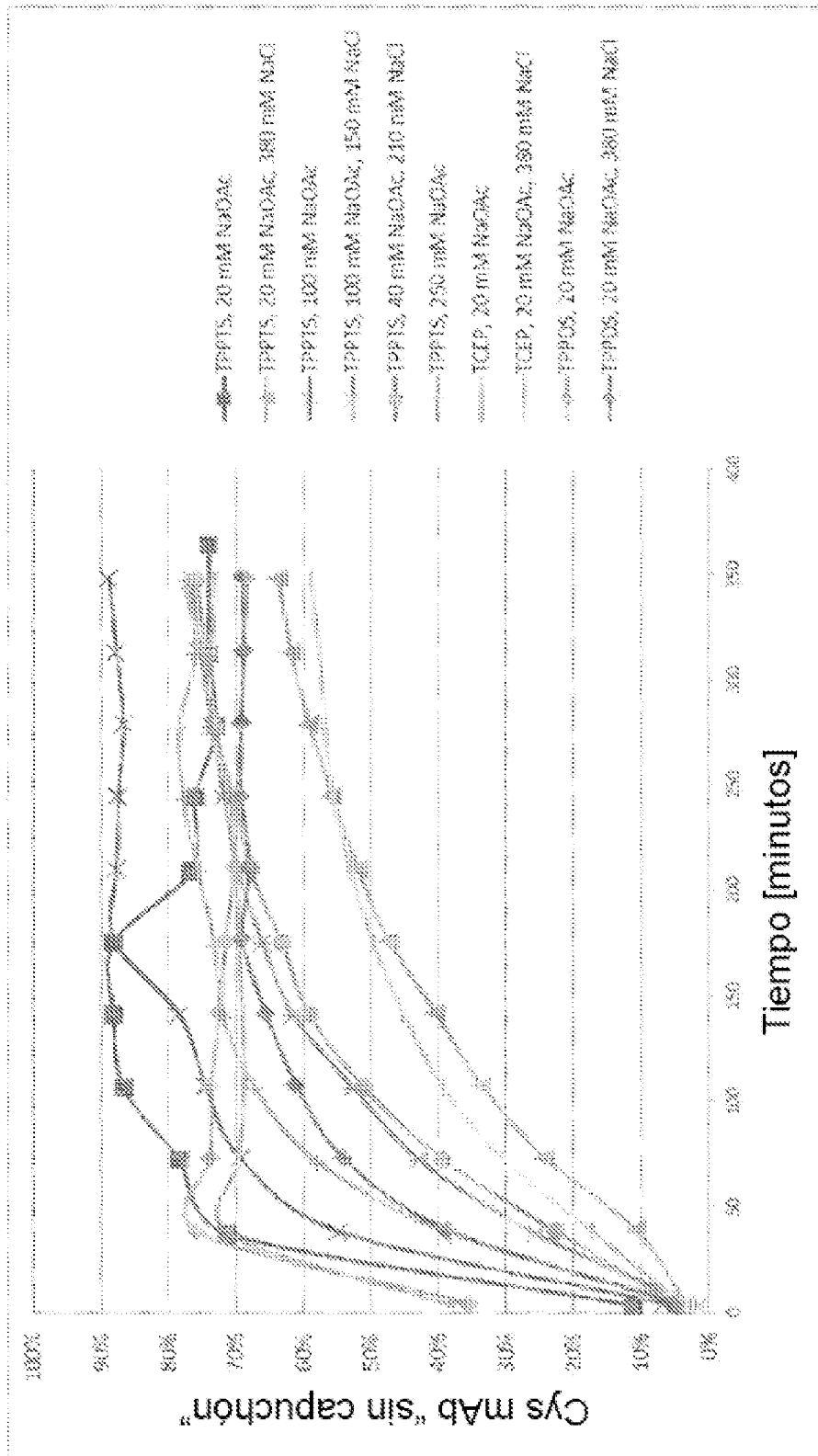


FIG. 6

