

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 200**

51 Int. Cl.:

C07K 16/46	(2006.01)
C07K 16/18	(2006.01)
G01N 33/53	(2006.01)
C12N 15/13	(2006.01)
C12N 15/10	(2006.01)
G01N 33/68	(2006.01)
C07K 16/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.05.2013 PCT/US2013/040575**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **14.11.2013 WO13170168**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.05.2013 E 13788439 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2019 EP 2847231**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales multiespecíficos**

30 Prioridad:

10.05.2012 US 201261645302 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.03.2020

73 Titular/es:

**BIOATLA LLC (100.0%)
11085 Torreyana Road, Suite 100
San Diego, CA 92121, US**

72 Inventor/es:

**FREY, GERHARD;
CHANG, HWAI, WEN y
SHORT, JAY, M.**

74 Agente/Representante:

GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio

ES 2 749 200 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos monoclonales multiespecíficos

5 **Campo de la invención**

La presente invención es relevante para la generación de anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos que se distinguen por su capacidad de unirse a múltiples antígenos con especificidad y con afinidad. En particular, la presente invención se refiere a anticuerpos biespecíficos. La invención también es relevante para otras proteínas multiespecíficas que se unen a más de una diana.

Antecedentes y Descripción de la Invención

Si bien es bien sabido que los anticuerpos de baja afinidad (aproximadamente $> 1 \mu\text{M}$) con frecuencia se unen a múltiples antígenos, los procedimientos naturales y artificiales de maduración y optimización de la afinidad (evolución dirigida o evolución molecular) generalmente están diseñados para aumentar tanto la afinidad como la especificidad únicamente a un solo epítipo de una molécula de alta afinidad. En general, para la mayoría de aplicaciones, la especificidad es un atributo importante; por ejemplo, en la terapéutica, la especificidad puede prevenir efectos inespecíficos que probablemente disminuyan la seguridad de una molécula. No obstante, existe una utilidad sustancial en la capacidad de unir un número limitado (por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, pero preferentemente 2 o 3) de antígenos diana seleccionados, particularmente por ejemplo para tratar enfermedades donde hay múltiples vías de activación, tales como enfermedades relacionadas con el cáncer. La inmunoterapia para el cáncer con anticuerpos monoclonales regulares no activa los linfocitos T, ya que no expresan los receptores Fc. Los anticuerpos biespecíficos (un brazo se une al identificador tumoral, un brazo se une al antígeno de superficie específico de los linfocitos T, por ejemplo, CD3) pueden superar este problema y unir las células tumorales y los linfocitos T. Además, los anticuerpos trifuncionales (IgG con 2 especificidades de unión diferentes y un dominio Fc intacto) también pueden unirse a las células que expresan el receptor Fc como los macrófagos y las células dendríticas. La célula tumoral se conecta así a una o dos células del sistema inmunitario, que posteriormente la destruyen.

Varios grupos han tratado de diseñar anticuerpos biespecíficos, por ejemplo, haciendo anticuerpos heterólogos a través del desacoplamiento de las cadenas pesadas de anticuerpos de dos anticuerpos independientes a través de la reducción de enlaces disulfuro y reasociando después los anticuerpos en un entorno oxidante para que los Fab de la molécula de IgG bivalente sean diferentes y se unan para separar los antígenos. Este enfoque tiene la desventaja de no tener afección por la molécula diana idéntica y produce un costoso procedimiento de generación y purificación de productos. También se han desarrollado otros esquemas que incluyen la expansión de la secuencia dentro del Fab, duplicando de manera eficaz el compartimento de unión al antígeno sobre el anticuerpo para que cada compartimento de unión pueda tener una especificidad de antígeno diferente sobre una sola molécula de anticuerpo. Si bien esto simplifica la fabricación y la purificación, la estructura es extraña al cuerpo humano y corre el riesgo de estimular una reacción inmunitaria negativa en un paciente. Aún otros han empleado enlaces covalentes novedosos para lograr la unión a múltiples epítopos, creando moléculas "tipo anticuerpo".

El documento US 2002/062010 divulga un procedimiento de preparación de polipéptidos heteromultiméricos tales como anticuerpos biespecíficos que tienen una cadena ligera común asociada con cada cadena pesada heteromérica que tiene un dominio de unión a anticuerpo. El procedimiento implica introducir en el anticuerpo una interacción específica y complementaria en las interfaces de una primera cadena pesada y una segunda cadena pesada, a fin de promover la formación de heteromultímeros e impedir la formación de homomultímeros; o introducir restos libres que contienen tiol en las interfaces de las dos cadenas pesadas, de modo que se forma un enlace disulfuro de origen no natural.

El documento US 2007/184523 divulga un procedimiento de preparación de un anticuerpo multiespecífico que comprende etapas de cultivo de una célula huésped que comprende ácido nucleico que codifica dos cadenas pesadas, y la cadena ligera variable, en donde el cultivo es tal que el ácido nucleico se expresa y se recupera el anticuerpo multiespecífico del cultivo de células huésped.

El documento WO 2011/133886 divulga un procedimiento para la producción eficaz de anticuerpos multiméricos capaces de unirse específicamente a más de una diana. El procedimiento comprende las etapas de: (a) proporcionar un primer polipéptido purificado que contiene bisagra que tiene un primer dominio de heterodimerización, (b) proporcionar un segundo polipéptido purificado que contiene bisagra que tiene un segundo dominio de heterodimerización, (c) combinar el primer y segundo polipéptido que contienen bisagra, (d) replegar el primer polipéptido que contiene bisagra con el segundo polipéptido que contiene bisagra, y (e) recuperar la proteína heteromultimérica completa.

El documento WO 2012/023053 divulga un procedimiento para el aislamiento de anticuerpos de diferentes especificidades que comparten una cadena pesada común. El procedimiento comprende las etapas de a) aislar un anticuerpo o región de fragmento de anticuerpo que tiene una especificidad determinada por un dominio variable de cadena pesada combinado con un primer dominio variable de cadena ligera, b) aislar un anticuerpo o región de

fragmento de anticuerpo que tiene una especificidad diferente determinada por el mismo dominio variable de la cadena pesada como el anticuerpo de la etapa a) combinado con un segundo dominio variable de cadena ligera y c) coexpresar lo anterior en una célula para producir los anticuerpos.

- 5 El documento AU 2013/200009 divulga un procedimiento de producción de anticuerpos a partir de un solo clon de células huésped, donde los anticuerpos comprenden cadenas ligeras idénticas emparejadas con diferentes cadenas pesadas capaces de emparejarse con las cadenas ligeras, formando así dominios funcionales de unión a antígeno. El procedimiento comprende una etapa de expresar en una célula huésped recombinante una secuencia de ácido nucleico o secuencias de ácido nucleico que codifican al menos una cadena ligera y al menos tres cadenas pesadas diferentes que son capaces de emparejarse con al menos una cadena ligera.

15 Los anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos tradicionales pueden ser difíciles de fabricar. Por ejemplo, estos anticuerpos pueden construirse expresando dos cadenas pesadas separadas y dos cadenas ligeras separadas en la misma célula (Quadroma technology, Milstein et al., 1983), sin embargo, este enfoque es problemático porque además del heterodímero deseado cadena ligera 1/cadena pesada 1 - cadena pesada2/cadena ligera2, se formarán las 10 combinaciones posibles de cadena pesada y cadena ligera (Suresh et al., 1986). Se desconoce la afinidad de unión y la especificidad de los emparejamientos de cadena ligera/cadena pesada no deseados. Los esfuerzos para reducir la complejidad de los posibles ensamblajes de cadena ligera/cadena pesada de las poblaciones resultantes incluyen procedimientos tales como el diseño de "botón en ojal" (Ridgeway et al., 1996) donde la parte Fc de las cadenas pesadas se puede modificar para eliminar la formación de algunos de los homodímeros. Sin embargo, las poblaciones siguen siendo muy complejas con las tecnologías tradicionales, incluso con estas modificaciones. El producto biespecífico (o multiespecífico) deseado es solamente una pequeña fracción de la mezcla, lo que dificulta la purificación del anticuerpo biespecífico (multiespecífico) y, en ocasiones, no es factible a escala comercial en muchos casos.

25 Los anticuerpos multiespecíficos de la presente invención se distinguen por su capacidad para unirse a múltiples antígenos con especificidad y con afinidad (por ejemplo, <10 nM). En un aspecto, los anticuerpos multiespecíficos de la presente invención comprenden dos dominios variables de cadena pesada diferentes (que se unen a dos o más antígenos diferentes), un dominio variable de cadena ligera sencilla que se adapta a ambos dominios variables de cadena pesada o se ha optimizado para adaptarse a ambas cadenas pesadas, y un Fc que forma heterodímeros o ha sido optimizado para formar heterodímeros. Se puede lograr la construcción de anticuerpos multiespecíficos de la presente invención a partir de un anticuerpo que se une al antígeno 1 que comprende la cadena ligera LC1 y la cadena pesada HC1 y otro anticuerpo que se une a un antígeno 2 diferente que comprende la cadena ligera LC2 y la cadena pesada HC2 mediante:

35 (a) identificando una única región de anticuerpo variable de cadena ligera de inmunoglobulina que complementa funcionalmente las regiones de anticuerpo variables de cadena pesada de inmunoglobulina de dichas cadenas pesadas HC1 y HC2 mediante

- 40 i) cribando una biblioteca de anticuerpos generada coexpresando la región de anticuerpo variable de cadena pesada de inmunoglobulina de la cadena pesada HC1 y una biblioteca de LC1 humanas generadas evolucionando las cadenas ligeras LC1 para anticuerpos que se unen al antígeno;
- 45 (ii) evaluando otra biblioteca de anticuerpos generada coexpresando la región de anticuerpo variable de cadena pesada de inmunoglobulina de la cadena pesada HC2 y una biblioteca de LC2 humanas generadas evolucionando las cadenas ligeras LC2 para anticuerpos que se unen al antígeno 2, y
- (iii) seleccionando un anticuerpo:

- 50 (1) expresando de forma conjunta las cadenas ligeras de los anticuerpos de la etapa (i) que se unen al antígeno 1 con la región de anticuerpo variable de cadena pesada de inmunoglobulina de la cadena pesada HC2 y seleccionando un anticuerpo que se une al antígeno 2, o
- (2) expresando de forma conjunta las cadenas ligeras de los anticuerpos de la etapa (ii) que se unen al antígeno 2 con la región de anticuerpo variable de cadena pesada de inmunoglobulina de la cadena pesada HC1 y seleccionando un anticuerpo que se une al antígeno 1,

55 en el que la región variable de cadena ligera del anticuerpo seleccionado en la etapa (1) o (2) es la región variable de cadena ligera de inmunoglobulina que complementa funcionalmente las dos regiones de anticuerpo variables de cadena pesada de inmunoglobulina diferentes de las cadenas pesadas HC1 y HC2;

60 (b) clonando las dos regiones de anticuerpo variables de cadena pesada de inmunoglobulina diferentes de las cadenas pesadas HC1 y HC2 en marco con un dominio constante de IgG que tiene su región Fc modificada para dar como resultado que la región Fc forme heterodímeros; y

(c) expresando conjuntamente la región de anticuerpo variable de cadena ligera de inmunoglobulina seleccionada en la etapa (a) con las dos regiones de anticuerpo variables de cadena pesada de inmunoglobulina diferentes de las cadenas pesadas HC1 y HC2 en una célula huésped para producir el anticuerpo multiespecífico.

65 La porción Fc que forma heterodímeros de los anticuerpos multiespecíficos de la presente invención se puede crear

usando un enfoque tipo "botón en ojal", o cualquier otro enfoque que motive al Fc a formar o dé como resultado que el Fc forme heterodímeros.

5 En el presente documento se describen adicionalmente ejemplos de construcción de anticuerpos multiespecíficos de la presente invención.

10 En una realización, tras el aislamiento de anticuerpos multiespecíficos de la presente invención, puede mejorarse adicionalmente la afinidad de un anticuerpo multiespecífico con uno o más antígenos o dianas mediante un procedimiento de evolución, por ejemplo, un procedimiento de evolución completa. En un aspecto del procedimiento de evolución completa, los mutantes positivos se identifican durante el cribado como aquellos mutantes que mejoran la unión a al menos uno o ambos antígenos sin causar una disminución en la unión al antígeno alternativo. Estos mutantes positivos (los cambios pueden estar en las cadenas pesadas y/o ligeras) se pueden mezclar y combinar, de forma combinatoria, por ejemplo.

15 En otros casos determinados, es deseable una menor afinidad por uno de los antígenos diana y una mayor afinidad por el otro antígeno diana. Por ejemplo, Y. Joy Yu, et al publicaron en Science Translational Medicine, 25 de Mayo de 2011, Vol 3, Issue 84 84ra44, "Boosting Brain Uptake of a Therapeutic Antibody by Reducing Its Affinity for a Transcytosis Target" que un anticuerpo biespecífico con un brazo que comprende un anticuerpo receptor de antitransferrina de baja afinidad y el otro brazo que comprende un anticuerpo BACE1 de alta afinidad era capaz de
20 atravesar la barrera hematoencefálica y alcanzar concentraciones terapéuticas en el cerebro de ratones. Este anticuerpo biespecífico fue sustancialmente más eficaz en comparación con un anticuerpo mono-específico precursor.

25 Por lo tanto, en otro aspecto del procedimiento de evolución completa, los mutantes positivos se identifican durante el cribado como aquellos mutantes que mejoran la unión a un antígeno. Aunque los mutantes que provocan una disminución en la afinidad de unión a un segundo antígeno no tienen prioridad, podrían ser útiles en situaciones en las que de forma combinatoria pierden su efecto inhibitorio cuando se combinan con otras mutaciones durante el procedimiento de combinación de mutaciones. El cribado se puede realizar para identificar candidatos principales en función de su afinidad general, así como sus respectivas constantes de asociación y disociación del antígeno: unión
30 de anticuerpos a cada uno de los antígenos elegidos.

Los anticuerpos multiespecíficos de la presente invención también pueden optimizarse para aumentar o disminuir la actividad o la estabilidad en otras condiciones, tales como pH, oxidación, temperatura, presión o diferentes concentraciones de iones.

35

Breve descripción de los dibujos

40 La Figura 1 ilustra una realización de anticuerpos H₂L de la presente invención. Los anticuerpos H₂L tienen dominios variables optimizados que permiten que la misma cadena ligera se ensamble con cada una de las 2 cadenas pesadas de 2 anticuerpos precursores diferentes (Anticuerpo 1 y Anticuerpo 2) sin cambiar la especificidad de unión para el antígeno determinado. La cadena ligera se ensambla con la cadena pesada 1 del Anticuerpo 1 para formar el "brazo-Fab 1 - H₂L" que se une al antígeno 1. La misma cadena ligera también se ensambla con la cadena pesada 2 del Anticuerpo 2 para formar el "brazo-Fab 2 - H₂L" que se une al antígeno 2. La parte Fc de las cadenas pesadas se modifica de una manera que permite solo la formación del dímero HC1-
45 HC2 *in vivo* (por ejemplo, facilitado por un diseño de "botón en ojal" en este ejemplo, y marcado como heterodímero Fc). La expresión de 2 cadenas pesadas que forman solo heterodímeros y una cadena ligera única conduce a la formación de solo un producto único, el anticuerpo "mAb H₂L" de la presente invención. Cada molécula producida tiene un brazo Fab que se une al antígeno 1 y el otro brazo Fab que se une al antígeno 2. Los mAb H₂L pueden fabricarse y purificarse como las IgG normales.

50 La Figura 2 ilustra un ejemplo de cribado de una biblioteca de cadenas ligeras de inmunoglobulina humana agrupadas. El antígeno diana A inmovilizado en placas de microtitulación se incubó con IgG recombinantes que consisten en cadena pesada HC1 y una cadena ligera completamente humana (una cadena ligera diferente en cada pocillo). El anticuerpo unido se detectó después de lavar con conjugado anti-IgG humana-HRP. Cada barra representa un clon único. La línea negra horizontal indicaba la actividad de fondo; la línea punteada horizontal indica 2x de fondo. Los clones con una señal por encima de 2x de fondo se contaron como resultados positivos primarios. El eje x representa la posición del pocillo; el eje y representa los valores de DO₄₅₀.

60 La Figura 2 ilustra los datos de ELISA para la unión del mAb H₂L biespecífico a los dos antígenos diana. Los pocillos de una placa de microtitulación se revistieron con Diana A (barras grises) o Diana B (barras negras). La cadena pesada 1 (HC1) en combinación con la cadena ligera de tipo silvestre LC1ts o la nueva cadena ligera LC-15D10 se une a la diana A, pero no a la diana B, mientras que HC2 en combinación con la cadena ligera de tipo silvestre LC2ts o la nueva cadena ligera LC-15D10 se une a la diana B. El mAb H₂L biespecífico que consiste en HC1, HC 2 y la nueva cadena ligera LC-15D10 se une a ambos, diana A y diana B. El eje x representa los nombres de los clones. El eje y representa los valores de DO₄₅₀.

65

Definición de términos

Para facilitar la comprensión de los ejemplos proporcionados en el presente documento, se describirán ciertos procedimientos y/o términos que aparecen con frecuencia.

5 El término "aminoácido" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier compuesto orgánico que contiene un grupo amino (-NH₂) y un grupo carboxilo (-COOH); preferentemente como grupos libres o de manera alternativa después de la condensación como parte de enlaces peptídicos. Los "veinte aminoácidos alfa formadores de polipéptidos codificados de manera natural" se entienden en la técnica y se refieren a: alanina (ala o A), arginina (arg o R), asparagina (asn o N), ácido aspártico (asp o D), cisteína (cys o C), ácido glutámico (glu o E), glutamina (gin o Q), glicina (gly o G), histidina (his o H), isoleucina (ile o I), leucina (leu o L), lisina (lys o K), metionina (met o M), fenilalanina (phe o F), prolina (pro o P), serina (ser o S), treonina (thr o T), triptófano (trp o W), tirosina (tyr o Y) y valina (val o V).

15 El término "amplificación" significa que aumenta el número de copias de un polinucleótido.

El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere a moléculas de inmunoglobulina intactas (que incluyen isotipos de IgM, IgD, IgG, IgE e IgA), así como fragmentos de moléculas de inmunoglobulina, tales como los fragmentos Fab, Fab', (Fab')₂ y Fv, que son capaces de unirse a un epítipo de un antígeno. Estos fragmentos de anticuerpos, que conservan cierta capacidad para unirse selectivamente a un antígeno (p. ej., un antígeno polipeptídico) del anticuerpo del que derivan, se pueden producir usando procedimientos bien conocidos en la técnica (véase, p. ej., Harlow y Lane, mencionados anteriormente), y se describen adicionalmente, de la siguiente manera.

25 (1) Un fragmento Fab consiste en un fragmento de unión a antígeno monovalente de una molécula de anticuerpo, y puede producirse mediante la digestión de una molécula de anticuerpo completa con la enzima papaína, para producir un fragmento que consiste en una cadena ligera intacta y una porción de una cadena pesada.

30 (2) Se puede obtener un fragmento Fab' de una molécula de anticuerpo tratando una molécula de anticuerpo completa con pepsina, seguido por reducción, para producir una molécula que consiste en una cadena ligera intacta y una porción de una cadena pesada. Se obtienen dos fragmentos Fab' por molécula de anticuerpo tratado de esta manera.

(3) Se puede obtener un fragmento (Fab')₂ de un anticuerpo tratando una molécula de anticuerpo completa con la enzima pepsina, sin la posterior reducción. Un fragmento (Fab')₂ es un dímero de dos fragmentos Fab', unidos por dos enlaces disulfuro.

35 (4) Un fragmento Fv se define como un fragmento genéticamente modificado que contiene la región variable de una cadena ligera y la región variable de una cadena pesada expresadas como dos cadenas.

Una molécula que tiene una propiedad "quimérica" es una molécula que es: 1) en parte homóloga y en parte heteróloga a una primera molécula de referencia; mientras que 2) al mismo tiempo es en parte homóloga y en parte heteróloga a una segunda molécula de referencia; sin 3) excluir la posibilidad de ser al mismo tiempo en parte homóloga y en parte heteróloga a una o más moléculas de referencia adicionales. En una realización no limitante, se puede preparar una molécula quimérica mediante la reorganización de una serie de secuencias moleculares parciales. En un aspecto no limitante, se puede preparar una molécula de polinucleótido quimérico sintetizando el polinucleótido quimérico usando una pluralidad de moldes moleculares, de modo que el polinucleótido quimérico resultante tenga propiedades de una pluralidad de moldes.

Una "ventana de comparación", como se usa en el presente documento, se refiere a un segmento conceptual de posiciones contiguas de nucleótidos, por ejemplo 20 o más posiciones contiguas de nucleótidos, en el que se puede comparar una secuencia de polinucleótidos con una secuencia de referencia de al menos el mismo número de nucleótidos contiguos y en la que la porción de la secuencia de polinucleótidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) del 20 por ciento o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para la alineación óptima de las dos secuencias. La alineación óptima de secuencias para alinear una ventana de comparación puede realizarse mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482 mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wuncsch J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), mediante la búsqueda del procedimiento de similitud de Pearson y Lipman Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.) 85: 2444 (1988), mediante implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), o mediante inspección, y se selecciona la mejor alineación (es decir, que da como resultado en el mayor porcentaje de homología en la ventana de comparación) generada por los diversos procedimientos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "región determinante de la complementariedad" y "CDR" se refieren a la expresión reconocida en la técnica como lo ejemplifican Kabat y Chothia. Las definiciones de CDR también se conocen generalmente como regiones supervariables o bucles hipervariables (Chothia y Leks, 1987; Chothia et al., 1989; Kabat et al., 1987; y Tramontano et al., 1990). Los dominios de región variable comprenden generalmente los aminoácidos amino terminales aproximadamente 105-115 de una cadena de inmunoglobulina de

origen natural (por ejemplo, aminoácidos 1-110), aunque los dominios variables algo más cortos o más largos también son adecuados para formar anticuerpos de cadena sencilla. Las CDR son partes de inmunoglobulinas que determinan la especificidad de dichas moléculas y entran en contacto con un ligando específico. Las CDR son la parte más variable de la molécula y contribuyen a la diversidad de estas moléculas. Hay tres regiones CDR CDR1, CDR2 y CDR3 en cada dominio V. CDR-H representa una región CDR de una cadena pesada variable y CDR-L se refiere a una región CDR de una cadena ligera variable. H significa la cadena pesada variable y L significa la cadena ligera variable. Las regiones CDR de una región derivada de Ig pueden determinarse como se describe en Kabat (1991). Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª edición, publicación NIH n.º 91-3242 Departamento de Salud y Servicios Sociales de los Estados Unidos, Chothia (1987). J. Mol. Biol. 196, 901-917 y Chothia (1989) Nature, 342, 877-883.

Las "sustituciones conservativas de aminoácidos" se refieren a la intercambiabilidad de restos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales de hidroxilo alifático es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen sulfuro es cisteína y metionina. Los grupos de sustitución conservativa de aminoácidos preferidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina y asparagina-glutamina.

El término "desinmunización", como se usa en el presente documento, se refiere a la producción de una variante de la molécula de unión al molde, que se modifica en comparación con una molécula de tipo silvestre original haciendo dicha variante no inmunogénica o menos inmunogénica en seres humanos. Las moléculas desinmunizadas de acuerdo con la invención se refieren a anticuerpos o partes de los mismos (como regiones marco conservadas y/o CDR) de origen no humano. Los ejemplos correspondientes son anticuerpos o fragmentos de los mismos como se describe en el documento US 4.361.549. El término "desinmunizado" también se refiere a moléculas, que muestran una propensión reducida a generar epítopos de linfocitos T. De acuerdo con la presente invención, la expresión "propensión reducida a generar epítopos de linfocitos T" se refiere a la eliminación de epítopos de linfocitos T que conducen a la activación de linfocitos T específicos.

Asimismo, la propensión reducida a generar epítopos de linfocitos T significa la sustitución de aminoácidos que contribuyen a la formación de epítopos de linfocitos T, es decir, sustitución de aminoácidos, que son esenciales para la formación de un epítipo de linfocitos T. En otras palabras, la propensión reducida a generar epítopos de linfocitos T se relaciona con la inmunogenicidad reducida o la capacidad reducida para inducir la proliferación de linfocitos T independiente del antígeno. Además, la propensión reducida a generar epítopos de linfocitos T se relaciona con la desinmunización, lo que significa la pérdida o reducción de posibles epítopos de linfocitos T de secuencias de aminoácidos que inducen la proliferación de linfocitos T independiente del antígeno.

La expresión "epítipo de linfocitos T", como se usa en el presente documento, se refiere a secuencias peptídicas cortas que pueden liberarse durante la degradación de péptidos, polipéptidos o proteínas dentro de las células y posteriormente ser presentadas por moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) para desencadenar la activación de los linfocitos T; véase, entre otros, el documento WO 02/066514. Para los péptidos presentados por el MHC de clase II, dicha activación de los linfocitos T puede inducir así, una respuesta de anticuerpos por estimulación directa de los linfocitos B para producir dichos anticuerpos.

La "digestión" del ADN se refiere a la escisión catalítica del ADN con una enzima de restricción que actúa solo en determinadas secuencias en el ADN. Las diversas enzimas de restricción usadas en el presente documento están disponibles comercialmente y sus condiciones de reacción, cofactores y otros requisitos se usaron como sería conocido por el experto en la materia. Para fines analíticos, generalmente se usa 1 µg de plásmido o fragmento de ADN con aproximadamente 2 unidades de enzima en aproximadamente 20 µl de solución tampón. Con el fin de aislar fragmentos de ADN para la construcción de plásmidos, se digieren generalmente de 5 a 50 µg de ADN con 20 a 250 unidades de enzima en un volumen mayor. El fabricante especifica los tampones apropiados y las cantidades de sustrato para determinadas enzimas de restricción. Normalmente se utilizan tiempos de incubación de aproximadamente 1 hora a 37 °C, pero pueden variar de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Después de la digestión, la reacción se somete a electroforesis directamente sobre un gel para aislar el fragmento deseado.

Como se usa en la presente invención, el término "epítipo" se refiere a un determinante antigénico sobre un antígeno al que se une el parátipo de un anticuerpo. Con frecuencia, los determinantes antigénicos consisten en agrupaciones de moléculas de superficie químicamente activas, tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar, y pueden tener características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Como se usa en el presente documento, "epítipo" se refiere a esa porción de un antígeno u otra macromolécula capaz de formar una interacción de unión que interactúa con el cuerpo de unión de la región variable de un anticuerpo. Por lo general, tal interacción de unión se manifiesta como un contacto intermolecular con uno o más restos de aminoácidos de una CDR.

- Como se usa en el presente documento, el término "evolución" se refiere a un procedimiento de evolución dirigida o evolución molecular, que es un procedimiento de modificación experimental de una molécula biológica hacia una propiedad deseable, y se puede lograr mutagenizando uno o más moldes moleculares precursores e identificando cualquier molécula deseable entre las moléculas de la descendencia; muchos procedimientos de evolución (evolución dirigida) son conocidos y publicados en la técnica, incluyendo mutagénesis dirigida al sitio, PCR propensa a error, procedimientos de saturación de sitio y otros procedimientos aleatorios y no aleatorios. Cualquiera de estos procedimientos puede usarse en los procedimientos de la presente invención.
- Los términos "fragmento", "derivado" y "análogo" cuando se refieren a un polipéptido de referencia comprenden un polipéptido que conserva al menos una función o actividad biológica que es al menos esencialmente igual a la del polipéptido de referencia. Asimismo, los términos "fragmento", "derivado" o "análogo" están ejemplificados por una molécula "proforma", tal como una proproteína de baja actividad que puede modificarse por escisión para producir una enzima madura con una actividad significativamente mayor.
- En el presente documento, se proporciona un procedimiento de producción, a partir de un polipéptido molde, de un conjunto de polipéptidos de descendencia en el que se representa una "gama completa de sustituciones de aminoácidos únicas" en cada posición de aminoácidos. Como se usa en el presente documento, "gama completa de sustituciones de aminoácidos únicas" se refiere a los 20 aminoácidos alfa codificados de forma natural formadores de polipéptidos codificados de forma natural, como se describe en el presente documento.
- El término "gen" significa el segmento de ADN implicado en la producción de una cadena polipeptídica; incluye las regiones anteriores y posteriores a la región de codificación (líder y remolque) así como las secuencias intermedias (intrones) entre los segmentos de codificación individuales (exones).
- El término "heterólogo" significa que una secuencia de ácido nucleico monocatenario no puede hibridar con otra secuencia de ácido nucleico monocatenario o su complemento. Por lo tanto, áreas de heterología significa que las áreas de polinucleótidos o los polinucleótidos tienen áreas o regiones dentro de su secuencia que no pueden hibridar con otro ácido nucleico o polinucleótido. Dichas regiones o áreas son, por ejemplo, áreas de mutaciones.
- El término "homólogo" u "homeólogo" significa que una secuencia de ácido nucleico monocatenario puede hibridar con una secuencia de ácido nucleico monocatenario complementaria. El grado de hibridación puede depender de una serie de factores, incluyendo la cantidad de identidad entre las secuencias y las condiciones de hibridación, tal como la temperatura y las concentraciones de sal, como se analiza más adelante. Preferentemente, la región de identidad es mayor que aproximadamente 5 pb, más preferentemente la región de identidad es mayor que 10 pb.
- Una región variable de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina consiste en una región "marco" interrumpida por tres regiones hipervariables, también denominadas CDR. La extensión de la región marco conservada y las CDR se han definido con precisión (véase *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Kabat et al., 1987). Las secuencias de las regiones marco conservadas de diferentes cadenas ligeras o pesadas están relativamente conservadas dentro de una especie. Como se usa en el presente documento, una "región marco conservada humana" es una región marco conservada que es sustancialmente idéntica (aproximadamente en un 85 % o más, normalmente en un 90-95 % o más) a la región marco conservada de una inmunoglobulina humana de origen natural. La región marco conservada de un anticuerpo, es decir, las regiones marco conservadas combinadas de las cadenas ligeras y pesadas constituyentes, sirve para posicionar y alinear las CDR. Las CDR son los principales responsables de la unión a un epítipo de un antígeno. De acuerdo con la presente invención, una región marco conservada se relaciona con una región en el dominio V (dominio VH o VL) de inmunoglobulinas que proporciona un armazón proteico para las regiones determinantes de la complementariedad hipervariables (CDR) que entran en contacto con el antígeno. En cada dominio V, hay cuatro regiones marco conservadas denominadas FR1, FR2, FR3 y FR4. La región marco conservada 1 abarca la región desde el extremo N del dominio V hasta el comienzo de la CDR1, la región marco conservada 2 se relaciona con la región entre CDR1 y CDR2, la región marco conservada 3 abarca la región entre CDR2 y CDR3 y la región marco conservada 4 significa la región desde el final de CDR3 hasta el extremo C del dominio V; véase, entre otros, Janeway, *Immunobiology*, Garland Publishing, 2001, 5ª ed. Por lo tanto, las regiones marco conservadas abarcan todas las regiones fuera de las regiones CDR en los dominios VH o VL.
- El experto en la materia puede deducir fácilmente de una secuencia dada las regiones marco conservadas y las CDR; véanse Kabat (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª edición, publicación NIH n.º 91-3242 Departamento de Salud y Servicios Sociales de los Estados Unidos, Chothia (1987). *J. Mol. Biol.* 196, 901-917 y Chothia (1989) *Nature*, 342, 877-883.
- El término "idéntico" o "identidad" significa que dos secuencias de ácido nucleico tienen la misma secuencia o una secuencia complementaria. Por lo tanto, "áreas de identidad" significa que las regiones o áreas de un polinucleótido o el polinucleótido global son idénticas o complementarias a las áreas de otro polinucleótido o del polinucleótido.
- El término "aislado" significa que el material se elimina de su entorno original (por ejemplo, el entorno natural si es de origen natural). Por ejemplo, un polinucleótido o enzima de origen natural presente en un animal vivo no está

aislado, pero el mismo polinucleótido o enzima, separado de algunos o de todos los materiales coexistentes en el sistema natural, está aislado. Dichos polinucleótidos podrían ser parte de un vector y/o dichos polinucleótidos o enzimas podrían ser parte de una composición, y aún estar aislados porque dicho vector o composición no es parte de su entorno natural.

5 Por "ácido nucleico aislado" se entiende un ácido nucleico, p. ej., una molécula de ADN o ARN, que no es contigua inmediatamente con las secuencias flanqueantes 5' y 3' con las que normalmente es contigua inmediatamente cuando está presente en el genoma de origen natural del organismo del que procede. La expresión describe así, por ejemplo, un ácido nucleico que se incorpora a un vector, tal como un plásmido o un vector vírico; un ácido nucleico
10 que se incorpora al genoma de una célula heteróloga (o al genoma de una célula homóloga, pero en un sitio diferente al que se produce naturalmente); y un ácido nucleico que existe como una molécula separada, p. ej., un fragmento de ADN producido por amplificación por PCR o digestión con enzimas de restricción, o una molécula de ARN producida por transcripción *in vitro*. La expresión también describe un ácido nucleico recombinante que forma parte de un gen híbrido que codifica secuencias de polipéptidos adicionales que pueden usarse, por ejemplo, en la
15 producción de una proteína de fusión.

Como se usa en el presente documento, "ligando" se refiere a una molécula, tal como un péptido aleatorio o una secuencia de segmento variable, que es reconocida por un receptor particular. Como reconocerá un experto en la materia, una molécula (o complejo macromolecular) puede ser tanto un receptor como un ligando. En general, el
20 compañero de unión que tiene un peso molecular más pequeño se denomina ligando y el compañero de unión que tiene un peso molecular mayor se denomina receptor.

"Unión" se refiere al procedimiento de formación de enlaces fosfodiéster entre dos fragmentos de ácido nucleico bicatenarios (Maniatis et al., 1982, p. 146). A menos que se indique lo contrario, la unión se puede lograr usando
25 tampones y condiciones conocidos con 10 unidades de ADN ligasa de T4 ("ligasa") por 0,5 µg de cantidades aproximadamente equimolares de los fragmentos de ADN a unir.

Como se usa en el presente documento, "enlazador" o "espaciador" se refiere a una molécula o grupo de moléculas que conecta dos moléculas, tal como una proteína de unión al ADN y un péptido aleatorio, y sirve para colocar las
30 dos moléculas en una configuración preferida, p. ej., para que el péptido aleatorio pueda unirse a un receptor con un impedimento estérico mínimo de la proteína de unión al ADN.

Como se usa en el presente documento, una "propiedad a desarrollar" incluye referencias a moléculas compuestas de una secuencia de polinucleótidos, moléculas compuestas de una secuencia de polipéptidos y moléculas compuestas en parte de una secuencia de polinucleótidos y en parte de una secuencia de polipéptidos. Particularmente relevante, pero de ninguna manera los ejemplos limitantes de propiedades a desarrollar incluyen la
35 afinidad de unión, la especificidad y las actividades en condiciones específicas, tal como las relacionadas con la temperatura; salinidad; presión; pH; y concentración de glicerol, DMSO, detergente, y/o cualquier otra especie molecular con la que entra en contacto en un entorno de reacción. Otros ejemplos particularmente relevantes, pero de ninguna manera limitantes, de propiedades a desarrollar incluyen estabilidades, por ejemplo, la cantidad de una
40 propiedad residual que está presente después de un tiempo de exposición específico a un entorno específico.

La expresión "anticuerpo multiespecífico" significa un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a dos o más antígenos con especificidad; los anticuerpos multiespecíficos incluyen anticuerpos biespecíficos, anticuerpos que
45 tienen la capacidad de unirse a dos antígenos.

El término "mutaciones" significa cambios en la secuencia de una secuencia de ácido nucleico de tipo silvestre o cambios en la secuencia de un péptido. Dichas mutaciones pueden ser mutaciones puntuales, como transiciones o transversiones. Las mutaciones pueden ser deleciones, inserciones o duplicaciones.
50

Como se usa en el presente documento, la secuencia de nucleótidos degenerada "N,N,G/T" representa 32 tripletes posibles, donde "N" puede ser A, C, G o T.

Como se usa en el presente documento, la secuencia de nucleótidos degenerada "N,N,N" representa 64 tripletes posibles, donde "N" puede ser A, C, G o T.
55

La expresión "de origen natural" tanto usada en el presente documento como aplicada a un objeto se refiere al hecho de que un objeto se puede hallar en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de polipéptido o de polinucleótido que está presente en un organismo (incluyendo a los virus) que se puede aislar de una fuente en la naturaleza y que no se ha modificado intencionadamente por el ser humano en el laboratorio es de origen natural. En general, la expresión de origen natural se refiere a un objeto presente en un individuo no patológico (no enfermo), tal como sería típico de la especie.
60

Como se usa en el presente documento, una "molécula de ácido nucleico" se compone de al menos una base o un par de bases, dependiendo de si es monocatenaria o bicatenaria, respectivamente. Asimismo, una molécula de ácido nucleico puede pertenecer exclusiva o quiméricamente a cualquier grupo de moléculas que contienen
65

nucleótidos, ta como se ejemplifica, pero sin limitación, mediante los siguientes grupos de moléculas de ácido nucleico: ARN, ADN, ácidos nucleicos genómicos, ácidos nucleicos no genómicos, ácidos nucleicos de origen natural y no de origen natural y ácidos nucleicos sintéticos. Esto incluye, a modo de ejemplo no limitante, ácidos nucleicos asociados con cualquier orgánulo, tal como las mitocondrias, el ARN ribosómico y las moléculas de ácido nucleico compuestas quiméricamente de uno o más componentes que no son de origen natural junto con los componentes de origen natural.

Además, una "molécula de ácido nucleico" puede contener en parte uno o más componentes no basados en nucleótidos como lo ejemplifican, pero sin limitación, aminoácidos y azúcares. Por lo tanto, a modo de ejemplo, pero sin limitación, una ribozima que se basa en parte en nucleótidos y en parte en proteínas se considera una "molécula de ácido nucleico".

Además, a modo de ejemplo, pero sin limitación, una molécula de ácido nucleico que está marcada con un resto detectable, tal como un marcador radiactivo o alternativamente no radiactivo, también se considera una "molécula de ácido nucleico".

Las expresiones "secuencia de ácido nucleico que codifica" o una "secuencia de codificación de ADN de" o una "secuencia de nucleótidos que codifica" una enzima particular, así como otros términos sinónimos, se refieren a una secuencia de ADN que se transcribe y traduce a una enzima cuando se encuentra bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Una "secuencia promotora" es una región reguladora del ADN capaz de unirse a la ARN polimerasa en una célula e iniciar la transcripción de una secuencia codificante cadena abajo (sentido 3'). El promotor es parte de la secuencia de ADN. Esta región de secuencia tiene un codón de inicio en su extremo 3'. La secuencia del promotor incluye el número mínimo de bases con elementos necesarios para iniciar la transcripción a niveles detectables por encima del fondo. Sin embargo, después de que la ARN polimerasa se una a la secuencia y se inicie la transcripción en el codón de inicio (extremo 3' con un promotor), la transcripción continúa en el sentido 3'. Dentro de la secuencia promotora se encontrará un sitio de inicio de la transcripción (definido convenientemente mediante mapeo con la nucleasa S1), así como los dominios de unión a proteínas (secuencias consenso) responsables de la unión de la ARN polimerasa.

Las expresiones "ácido nucleico que codifica una enzima (proteína)" o "ADN que codifica una enzima (proteína)" o "polinucleótido que codifica una enzima (proteína)" y otros términos sinónimos abarcan un polinucleótido que incluye solamente la secuencia codificante para la enzima, así como un polinucleótido que incluye secuencia codificante adicional y/o secuencia codificante no Cq3.

En una realización preferente, una "especie de molécula de ácido nucleico específica" se define por su estructura química, tal como se ejemplifica, pero sin limitación, mediante su secuencia primaria. En otra realización preferente, una "especie de molécula de ácido nucleico" específica se define por una función de la especie de ácido nucleico o por una función de un producto derivado de la especie de ácido nucleico. Por lo tanto, a modo de ejemplo no limitante, una "especie de molécula de ácido nucleico específica" puede definirse por una o más actividades o propiedades atribuibles a ella, incluidas actividades o propiedades atribuibles a su producto expresado.

La presente definición de "ensamblar una muestra de ácido nucleico en funcionamiento en una biblioteca de ácidos nucleicos" incluye el procedimiento de incorporar una muestra de ácido nucleico en una colección basada en vectores, tal como mediante unión en un vector y transformación de un huésped. A continuación se proporciona, en el presente documento, una descripción de vectores relevantes, huésped y otros reactivos, así como ejemplos específicos no limitantes de los mismos. La presente definición de "ensamblar una muestra de ácido nucleico en funcionamiento en una biblioteca de ácidos nucleicos" también incluye el procedimiento de incorporar una muestra de ácido nucleico en una colección no basada en vectores, tal como por unión a adaptadores. Preferentemente, los adaptadores se pueden emparejar a los cebadores de PCR para facilitar la amplificación por PCR.

En consecuencia, en una realización no limitante, una "biblioteca de ácidos nucleicos" se compone de una colección basada en vectores de una o más moléculas de ácido nucleico. En otra realización preferente, una "biblioteca de ácidos nucleicos" se compone de una colección de moléculas de ácido nucleico no basada en vectores. En otra realización preferente más, una "biblioteca de ácidos nucleicos" se compone de una colección combinada de moléculas de ácido nucleico que está en parte basada en vectores y en parte no basada en vectores. Preferentemente, la colección de moléculas que comprende una biblioteca se puede buscar y separar de acuerdo con las especies de moléculas de ácido nucleico individuales.

La presente invención proporciona una "construcción de ácido nucleico" o, alternativamente, una "construcción de nucleótidos" o, alternativamente, una "construcción de ADN". El término "construcción" se usa en el presente documento para describir una molécula, tal como un polinucleótido, que opcionalmente puede estar químicamente unido a uno o más restos moleculares adicionales, tales como un vector o partes de un vector. En un aspecto específico, pero no limitante, una construcción de nucleótidos se ejemplifica mediante una construcción de expresión de ADN adecuada para la transformación de una célula huésped.

Un "oligonucleótido" (o de forma sinónima un "oligo") se refiere a un polidesoxinucleótido monocatenario o a dos

5 cadenas de polidesoxinucleótido complementarias que pueden sintetizarse químicamente. Dichos oligonucleótidos sintéticos pueden tener o no un fosfato 5'. Los que no lo tienen, no se unirán a otro oligonucleótido sin añadir un fosfato con un ATP en presencia de una quinasa. Un oligonucleótido sintético se unirá a un fragmento que no se ha desfosforilado. Para lograr la amplificación basada en polimerasa (tal como con la PCR), se menciona un "oligonucleótido degenerado 32 veces que está compuesto, en serie, de al menos una primera secuencia homóloga, una secuencia degenerada N, N, G/T y una segunda secuencia homóloga". Tal como se usa en este contexto, "homólogo" se refiere a la homología entre el oligo y el polinucleótido precursor que se somete a la amplificación basada en polimerasa.

10 Como se usa en el presente documento, la expresión "operativamente unido" se refiere a un enlace de elementos polinucleotídicos en una relación funcional. Un ácido nucleico está "operativamente unido" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o potenciador está operativamente unido a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia codificante. Operativamente unido significa que las secuencias de ADN que están unidas son generalmente contiguas y cuando es necesario unir dos regiones codificantes de proteínas, contiguas y en el marco de lectura.

15 Una secuencia codificante está "operativamente unida a" otra secuencia codificante cuando la ARN polimerasa transcribirá las dos secuencias codificantes en un solo ARNm, que después se traduce en un polipéptido único que tiene aminoácidos derivados de ambas secuencias codificantes. Las secuencias codificantes no necesitan ser contiguas entre sí siempre que las secuencias expresadas se procesen en última instancia para producir la proteína deseada.

25 Tal como se usa en el presente documento, el término "condiciones fisiológicas" se refiere a temperatura, pH, fuerza iónica, viscosidad y parámetros bioquímicos similares que son compatibles con un organismo viable y/o que generalmente existen intracelularmente en una célula de levadura o célula de mamífero cultivada viable. Por ejemplo, las condiciones intracelulares en una célula de levadura cultivada en condiciones habituales de cultivo de laboratorio son condiciones fisiológicas. Las condiciones de reacción *in vitro* adecuadas para cócteles de transcripción *in vitro* son generalmente condiciones fisiológicas. En general, las condiciones fisiológicas *in vitro* comprenden NaCl o KCl 50-200 mM, pH 6,5-8,5, 20-45 °C y catión divalente 0,001-10 mM (p. ej., Mg ++, Ca ++); preferentemente NaCl o KCl aproximadamente 150 mM, pH 7,2-7,6, catión divalente 5 mM, y a menudo incluyen un 0,01-1,0 por ciento de proteína inespecífica (p. ej., BSA). Con frecuencia puede estar presente un detergente no iónico (Tween, NP-40, Triton X-100), generalmente en aproximadamente 0,001 a 2%, generalmente 0,05-0,2% (v/v). El profesional puede seleccionar condiciones acuosas determinadas de acuerdo con procedimientos convencionales. Para orientación general, pueden ser aplicables las siguientes condiciones acuosas tamponadas: NaCl 10-250 mM, Tris HCl 5-50 mM, pH 5-8, con adición opcional de catión(es) divalente(s) y/o quelantes metálicos y/o detergentes no iónicos y/o fracciones de membrana y/o agentes antiespumantes y/o centelleantes.

35 El término "población" como se usa en el presente documento significa una colección de componentes tales como polinucleótidos, porciones o polinucleótidos o proteínas. Una "población mixta": significa una colección de componentes que pertenecen a la misma familia de ácidos nucleicos o proteínas (es decir, están relacionados) pero que difieren en su secuencia (es decir, no son idénticos) y, por lo tanto, en su actividad biológica.

45 Una molécula que tiene una "proforma" se refiere a una molécula que se somete a cualquier combinación de una o más modificaciones químicas covalentes y no covalentes (por ejemplo, glicosilación, escisión proteolítica, dimerización u oligomerización, cambio conformacional inducido por temperatura o pH, asociación con un cofactor, etc.) en el camino para lograr una forma molecular más madura que tenga una diferencia de propiedad (por ejemplo, un aumento de la actividad) en comparación con la molécula de proforma de referencia. Cuando se pueden distinguir dos o más modificaciones químicas (por ejemplo, dos escisiones proteolíticas, o una escisión proteolítica y una desglicosilación) en el camino hacia la producción de una molécula madura, la molécula precursora de referencia puede denominarse una molécula "preproforma".

50 Como se usa en el presente documento, el término "pseudoaleatorio" se refiere a un conjunto de secuencias que tienen una variabilidad limitada, de modo que, por ejemplo, el grado de variabilidad de los restos en otra posición, aunque a cualquier posición pseudoaleatoria se le permite cierto grado de variación de restos, está circunscrito.

55 Como se usa en el presente documento, "biblioteca de péptidos aleatorios" se refiere a un conjunto de secuencias de polinucleótidos que codifica un conjunto de péptidos aleatorios, y al conjunto de péptidos aleatorios codificados por esas secuencias de polinucleótidos, así como las proteínas de fusión contienen esos péptidos aleatorios.

60 Como se usa en el presente documento, "secuencia peptídica aleatoria" se refiere a una secuencia de aminoácidos compuesta de dos o más monómeros de aminoácidos y construida por un procedimiento estocástico o aleatorio. Un péptido aleatorio puede incluir motivos de región marco conservada o de armazón, que pueden comprender secuencias invariables.

65 Como se usa en el presente documento, "receptor" se refiere a una molécula que tiene afinidad por un ligando dado. Los receptores pueden ser moléculas de origen natural o sintéticas. Los receptores pueden emplearse en un estado

inalterado o como agregados con otras especies. Los receptores se pueden unir, covalentemente o no covalentemente, a un miembro de unión, directamente o mediante una sustancia de unión específica. Ejemplos de receptores incluyen, pero sin limitación, anticuerpos, incluidos anticuerpos monoclonales y antisueros reactivos con determinantes antigénicos específicos (tal como virus, células u otros materiales), receptores de membrana celular, 5
carbohidratos complejos y glucoproteínas, enzimas y receptores hormonales.

Las enzimas "recombinantes" se refieren a enzimas producidas por técnicas de ADN recombinante, es decir, producidas a partir de células transformadas por una construcción de ADN exógeno que codifica la enzima deseada. Las enzimas "sintéticas" son aquellas preparadas por síntesis química.

La expresión "polinucleótidos relacionados" significa que regiones o áreas de los polinucleótidos son idénticas y regiones o áreas de los polinucleótidos son heterólogas.

El "reordenamiento reductor", como se usa en el presente documento, se refiere al aumento de la diversidad molecular que se acumula a través de eventos de delección (y/o inserción) mediados por secuencias repetidas.

Se usan las siguientes expresiones para describir las relaciones de secuencia entre dos o más polinucleótidos: "secuencia de referencia", "ventana de comparación", "identidad de secuencia", "porcentaje de identidad de secuencia" e "identidad sustancial".

Una "secuencia de referencia" es una secuencia definida usada como base para comparación de secuencias; una secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia más larga, por ejemplo, como un segmento de una secuencia de ADNc o gen de longitud completa dado en un listado de secuencias, o puede comprender una secuencia de ADNc o de gen completa. En general, una secuencia de referencia tiene al menos 20 nucleótidos de longitud, frecuentemente al menos 25 nucleótidos de longitud y, con frecuencia, al menos 50 nucleótidos de longitud. Debido a que dos polinucleótidos (1) pueden cada uno comprender una secuencia (es decir, una porción de la secuencia completa de polinucleótidos) que es similar entre los dos polinucleótidos y (2) pueden comprender además una secuencia que es divergente entre los dos polinucleótidos, las comparaciones de secuencias entre dos (o más) los polinucleótidos se realizan generalmente comparando secuencias de los dos polinucleótidos sobre una "ventana de comparación" para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia.

La expresión "identidad de secuencia" significa que dos secuencias de polinucleótidos son idénticas (es decir, en base nucleótido por nucleótido) en la ventana de comparación. La expresión "porcentaje de identidad de secuencia" se calcula comparando dos secuencias óptimamente alineadas sobre la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que se produce la base de ácido nucleico idéntica (por ejemplo, A, T, C, G, U o I) en ambas secuencias para producir el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana), y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia. Esta "identidad sustancial", como se usa en el presente documento, indica una característica de una secuencia de polinucleótidos, en donde el polinucleótido comprende una secuencia que tiene al menos un 80 por ciento de identidad de secuencia, preferentemente al menos un 85 por ciento de identidad, con frecuencia un 90 a 95 por ciento de identidad de secuencia, y más comúnmente al menos un 99 por ciento de identidad de secuencia en comparación con una secuencia de referencia de una ventana de comparación de al menos 25-50 nucleótidos, en donde el porcentaje de identidad de secuencia se calcula comparando la secuencia de referencia con la secuencia de polinucleótidos que puede incluir delecciones o adiciones que son en total el 20 por ciento o menos de la secuencia de referencia sobre la ventana de comparación.

Como se conoce en la técnica, la "similitud" entre dos enzimas se determina comparando la secuencia de aminoácidos y sus sustitutos de aminoácidos conservados de una enzima con la secuencia de una segunda enzima. La similitud puede determinarse mediante procedimientos que son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, un programa BLAST (del inglés Basic Local Alignment Search Tool en el National Center for Biological Information).

Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo de cadena sencilla" se refiere a un polipéptido que comprende un dominio VH y un dominio VL en el enlace polipeptídico, generalmente preferido a través de un péptido espaciador (por ejemplo, [Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]_n), y que puede comprender secuencias de aminoácidos adicionales en los extremos amino y/o carboxi. Por ejemplo, un anticuerpo de cadena sencilla puede comprender un segmento de unión para unirse al polinucleótido codificante. Como ejemplo, un scFv es un anticuerpo de cadena sencilla. Los anticuerpos de cadena sencilla son generalmente proteínas que consisten en uno o más segmentos de polipéptidos de al menos 10 aminoácidos contiguos sustancialmente codificados por genes de la superfamilia de inmunoglobulinas (p. ej., véase Williams y Barclay, 1989, págs. 361-368), codificados con mayor frecuencia por una secuencia de genes de cadena pesada o ligera de roedores, primates no humanos, aves, bovinos porcinos, ovinos, caprinos o seres humanos. Un anticuerpo funcional de cadena sencilla generalmente contiene una porción suficiente de un producto génico de la superfamilia de inmunoglobulinas para conservar la propiedad de unirse a una molécula diana específica, generalmente a un receptor o antígeno (epítipo).

Se dice que los miembros de un par de moléculas (por ejemplo, un par anticuerpo-antígeno o un par de ácidos

nucleicos) se "unen específicamente" entre sí si se unen entre sí con mayor afinidad que con otras moléculas no específicas. Por ejemplo, un anticuerpo generado contra un antígeno al que se une de manera más eficaz que a una proteína no específica puede describirse como específicamente unido al antígeno. (De manera similar, una sonda de ácido nucleico puede describirse como unida específicamente a una diana de ácido nucleico si forma un dúplex específico con la diana mediante interacciones de emparejamiento de bases (véase arriba)).

La "hibridación específica" se define en el presente documento como la formación de híbridos entre un primer polinucleótido y un segundo polinucleótido (por ejemplo, un polinucleótido que tiene una secuencia distinta pero sustancialmente idéntica al primer polinucleótido), en donde las secuencias polinucleotídicas sustancialmente no relacionadas no forman híbridos en la mezcla.

La expresión "polinucleótido específico" significa un polinucleótido que tiene determinados puntos finales y que tiene una determinada secuencia de ácido nucleico. Dos polinucleótidos en los que un polinucleótido tiene la secuencia idéntica como una porción del segundo polinucleótido pero extremos diferentes comprenden dos polinucleótidos específicos diferentes.

"Condiciones de hibridación rigurosas" significa que la hibridación se producirá solo si hay al menos un 90% de identidad, preferentemente al menos un 95% de identidad y lo más preferentemente al menos un 97% de identidad entre las secuencias. Véase Sambrook et al., 1989.

Una secuencia de aminoácidos "sustancialmente idéntica" es una secuencia que difiere de una secuencia de referencia solo por sustituciones conservativas de aminoácidos, por ejemplo, sustituciones de un aminoácido por otro de la misma clase (por ejemplo, sustitución de un aminoácido hidrófobo, tal como isoleucina, valina, leucina o metionina, por otro, o la sustitución de un aminoácido polar por otro, tal como la sustitución de arginina por lisina, ácido glutámico por ácido aspártico o glutamina por asparagina).

Además, una secuencia de aminoácidos "sustancialmente idéntica" es una secuencia que difiere de una secuencia de referencia o por una o más sustituciones, deleciones o inserciones no conservativas, particularmente cuando dicha sustitución se produce en un sitio que no es el sitio activo de la molécula y siempre que el polipéptido conserve esencialmente sus propiedades de comportamiento. Por ejemplo, se pueden eliminar uno o más aminoácidos de un polipéptido, lo que da como resultado la modificación de la estructura del polipéptido, sin alterar significativamente su actividad biológica. Por ejemplo, pueden eliminarse los aminoácidos amino o carboxilo terminales que no son necesarios para la actividad biológica. Dichas modificaciones pueden dar como resultado el desarrollo de polipéptidos activos más pequeños.

Como se usa en el presente documento, "sustancialmente puro" significa que una especie objeto es la especie predominante presente (es decir, sobre una base molar es más abundante que cualquier otra especie macromolecular individual en la composición), y preferentemente la fracción sustancialmente purificada es una composición en la que la especie objeto comprende al menos aproximadamente el 50 por ciento (en base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. En general, una composición sustancialmente pura comprenderá más de aproximadamente el 80 al 90 por ciento de todas las especies macromoleculares presentes en la composición. Lo más preferentemente, la especie objeto se purifica hasta homogeneidad esencial (las especies contaminantes no pueden detectarse en la composición mediante procedimientos de detección convencionales), en donde la composición consiste esencialmente en una sola especie macromolecular. Las especies de disolventes, las moléculas pequeñas (<500 Daltons) y las especies de iones elementales no se consideran especies macromoleculares.

Como se usa en el presente documento, "singénico" significa genéticamente idéntico, o suficientemente idéntico e inmunológicamente compatible.

Como se usa en el presente documento, "moldes", "anticuerpos molde" o "anticuerpos precursores" significa proteínas a partir de las cuales se producen los anticuerpos multifuncionales de la presente invención. Como apreciarán los expertos en la materia, cualquier número de moldes encuentra uso en la presente invención. Específicamente incluidos dentro de la definición de "proteínas" u "oligopéptidos" se encuentran fragmentos y dominios de proteínas conocidas, que incluyen dominios funcionales tales como dominios enzimáticos, dominios de unión, etc. y fragmentos más pequeños, tales como vueltas, bucles, etc. Es decir, también se pueden usar porciones de proteínas. Además, "proteína" como se usa en el presente documento incluye proteínas, oligopéptidos y péptidos. Además, se pueden usar variantes de proteínas, es decir, estructuras análogas de proteínas de origen no natural.

Proteínas adecuadas incluyen, pero sin limitación, proteínas farmacéuticas, incluyendo ligandos, receptores de la superficie celular, antígenos, anticuerpos, citocinas, hormonas, factores de transcripción, módulos de señalización, proteínas del citoesqueleto y enzimas. Cadenas principales de proteínas adecuadas incluyen, pero sin limitación, todas las que se encuentran en la base de datos de proteínas compiladas y atendidas por el Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB, anteriormente el Brookhaven National Lab).

Como se usa en el presente documento, la expresión "segmento variable" se refiere a una porción de un péptido

naciente que comprende una secuencia de núcleo aleatoria, pseudoaleatoria o definida. Un "segmento variable" se refiere a una porción de un péptido naciente que comprende una secuencia de núcleo aleatoria, pseudoaleatoria o definida. Un segmento variable puede comprender posiciones de restos tanto variantes como invariantes, y el grado de variación de restos en una posición de resto variante puede ser limitado: ambas opciones se seleccionan a discreción del profesional. Por lo general, los segmentos variables tienen una longitud de aproximadamente 5 a 20 restos de aminoácidos (p. ej., 8 a 10), aunque los segmentos variables pueden ser más largos y pueden comprender porciones de anticuerpos o proteínas receptoras, tal como un fragmento de anticuerpo, una proteína de unión a ácido nucleico, una proteína receptora y similares.

La expresión "tipo silvestre" significa que el polinucleótido no comprende ninguna mutación. Una proteína de "tipo silvestre" significa que la proteína estará activa a un nivel de actividad encontrado en la naturaleza y comprenderá la secuencia de aminoácidos encontrada en la naturaleza.

Descripción de la invención

Generación de anticuerpos multifuncionales de la presente invención

Los anticuerpos con diferentes propiedades (afinidad, avidéz y farmacocinética mejoradas, por ejemplo) y las estructuras, incluidos anticuerpos completamente humanos, anticuerpos quiméricos con elementos tanto humanos como no humanos, anticuerpos Fab y otras estructuras de anticuerpos, se han construido en el laboratorio utilizando técnicas de biología molecular, tales como clonación, presentación en fagos, ratones transgénicos y mutagénesis. Los anticuerpos multifuncionales de la presente invención pueden generarse a partir de anticuerpos que se usan como moléculas de partida o moldes. Los anticuerpos precursores pueden ser anticuerpos completamente humanos, de roedores, de conejos, caninos, bovinos, artiodáctilos, de peces, de condriactos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos parcialmente humanos u otros anticuerpos. Los procedimientos para generar tales anticuerpos son bien conocidos en la técnica. Se ha publicado información considerable y se sabe sobre los anticuerpos monoclonales y su utilidad en la investigación, el diagnóstico y el tratamiento de múltiples enfermedades, incluyendo el cáncer. Por ejemplo, más de una docena de anticuerpos monoclonales tienen aprobación regulatoria del gobierno para su uso terapéutico en pacientes.

El descifrado del genoma humano ha abierto nuevas oportunidades para construir anticuerpos completamente humanos que pueden usarse como agentes terapéuticos. El sistema inmunitario humano puede generar anticuerpos contra todas las moléculas inmunogénicas a partir de un número limitado de genes de anticuerpos de la línea germinal. La diversidad se genera por recombinación desordenada (flexible) de fragmentos V, D y J (cadena pesada), y fragmentos V y J para la cadena ligera. Los dominios de anticuerpos variables resultantes consisten en tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) y cuatro regiones marco conservadas. Las regiones marco conservadas proporcionan el armazón para dar a los bucles de las CDR la orientación espacial adecuada para una unión óptima al antígeno. En un aspecto de la presente invención, se puede generar y explorar una biblioteca de anticuerpos de novo completamente humanos para identificar moldes para la presente invención de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica.

Los anticuerpos monoclonales que pueden usarse como anticuerpos precursores para las moléculas de la presente invención también pueden producirse mediante inmunización de un roedor u otro animal huésped con el antígeno diana, y la generación posterior de una línea celular de hibridoma usando procedimientos bien conocidos en la técnica.

En los procedimientos de la presente invención, también se prevé que cualquier anticuerpo que se una a un epítipo en una o más dianas (conocidas o desconocidas) también se puede desarrollar para unirse a un segundo epítipo sobre una o más dianas. Por lo tanto, los anticuerpos precursores pueden ser uno o más anticuerpos.

Las bibliotecas de anticuerpos también pueden cribarse usando una variedad de procedimientos conocidos, tales como los descritos en el presente documento, para generar uno o más anticuerpos precursores.

La ingeniería de proteínas mediante mutagénesis dirigida al sitio y, más recientemente, la evolución molecular se ha empleado con éxito para mejorar las propiedades terapéuticas en los anticuerpos. Las características tales como la termoestabilidad, especificidad, afinidad de unión y otras características se han modificado para adaptar mejor los anticuerpos para fines específicos.

Desde su inicio, se han descrito y aplicado muchos procedimientos diferentes para la evolución molecular para mejorar las características de la proteína diana. Con mucha frecuencia, se generan conjuntos de mutantes puntuales únicos y se criban para detectar mutantes. Las sustituciones beneficiosas de aminoácidos únicos se pueden recombinar y cribar para optimizar aún más las características deseadas en la molécula diana.

En la presente invención, los procedimientos de evolución se emplean para identificar polipéptidos mutantes formados a partir de, o basados en, un o unos polipéptidos molde de los anticuerpos multiespecíficos de doble unión previamente identificados (o del anticuerpo monofuncional, según el caso).

Por ejemplo, en el presente documento, se hace referencia a un procedimiento para desarrollar estos polipéptidos como Evolución de Posición Completa (CPE por sus siglas en inglés) seguida opcionalmente por Síntesis Combinatoria de Proteínas (CPS, por sus siglas en inglés). Otros procedimientos incluyen la evolución de inserción de posición completa (CPI, por sus siglas en inglés), la evolución de delección de posición completa (CPD, por sus siglas en inglés); la evolución de delección de posición completa (CPD) seguida por síntesis combinatoria de proteínas (CPS); la evolución de delección de posición completa (CPD) seguida de síntesis combinatoria de proteínas (CPS). Dichos procedimientos, se describen en detalle en la publicación de patente WO2012/009026 titulada Novel Methods of Protein Evolution.

La evolución puede emplearse para anticuerpos multiespecíficos de la presente invención para reducir la agregación proteína-proteína, mejorar la solubilidad de las proteínas, optimizar la farmacocinética a través de bibliotecas de glicosilación, optimizar la estructura secundaria y terciaria de las proteínas y para la desinmunización de sitios antigénicos directamente a través de conjuntos de mutación o indirectamente a través de enmascaramiento por glicosilación.

La evolución también puede usarse para la desinmunización para eliminar la inmunogenicidad mientras se mantiene la función. La desinmunización de la evolución se puede realizar enmascarando la inmunogenicidad con glicosilación, identificando las sustituciones de aminoácidos del espectro de mutación hipersomática humana que pueden eliminar la inmunogenicidad mientras se mantiene la función, la reducción de la dosis para evadir el potencial de inmunogenicidad y la minimización de los cambios de restos de aminoácidos no superficiales. Adicionalmente, se pueden usar bases de datos y algoritmos de inmunogenicidad para identificar y reemplazar posibles epítopos de unión a MHC.

La propensión reducida a generar epítopos de linfocitos T y/o desinmunización puede medirse mediante técnicas conocidas en la técnica. Preferentemente, la desinmunización de proteínas se puede analizar *in vitro* mediante un ensayo de proliferación de linfocitos T. En este ensayo, las PBMC de donantes que representan > 80% de los alelos HLA-DR en el mundo se criban para la proliferación en respuesta a péptidos de tipo silvestre o desinmunizados. Idealmente, la proliferación celular únicamente se detecta al cargar las células presentadoras de antígeno con péptidos de tipo silvestre. Los ensayos adicionales para la desinmunización incluyen ensayos de reestimulación de PBMC humanas *in vitro* (por ejemplo, ELISA interferón gamma (TH1) o IL4 (TH2)). Como alternativa, se puede probar la desinmunización expresando tetrámeros HLA-DR que representan todos los haplotipos. Para probar si los péptidos desinmunizados se presentan en haplotipos HLA-DR, se puede medir la unión de p. ej. péptidos marcados con fluorescencia en PBMC. Medición en ratones transgénicos HLA Clase I y Clase II para respuestas al antígeno diana (por ejemplo, interferón gamma o IL4). Como alternativa, el cribado de la biblioteca de epítopos con linfocitos T educados (MHC I 9 meros; MHC II 20 meros) a partir de ensayos con PBMC y/o con ratones transgénicos. Asimismo, la desinmunización puede demostrarse determinando si se han generado anticuerpos contra las moléculas desinmunizadas después de la administración en pacientes.

Las técnicas de evolución también se pueden utilizar para la optimización de la expresión. En un aspecto, la presente invención divulga la utilización de procedimientos de ingeniería de proteínas para desarrollar variantes de Fc optimizadas por codón de mutación silenciosa con expresión mejorada en células de mamífero. Una mutación silenciosa es aquella en la que la variación de la secuencia de ADN no da como resultado un cambio en la secuencia de aminoácidos de la proteína. En un aspecto, la mutagénesis de codones se realiza en la región constante para la optimización de la expresión en células de mamífero. Una variante de Fc optimizada por codón con propiedades de expresión mejoradas, al tiempo que conserva la capacidad de mediar las funciones efectoras mejora la producción de anticuerpos terapéuticos. En este aspecto, por ejemplo, se puede hacer evolucionar una región constante de una molécula de anticuerpo para cribado en diferentes huéspedes de expresión, por ejemplo, cribado de la expresión en líneas celulares de mamífero utilizando CHO, HEK293 y COS-7.

El término molde puede referirse a un polipéptido base o un polinucleótido que codifica dicho polipéptido. Como apreciaría un experto en esta materia, puede usarse cualquier molde en los procedimientos y composiciones de la presente invención. Los moldes que se pueden mutar y hacer evolucionar de este modo, pueden usarse para guiar la síntesis de otro polipéptido o biblioteca de polipéptidos como se describe en la presente invención. Como se describe con más detalle en el presente documento, el molde que se puede evolucionar codifica la síntesis de un polipéptido y puede usarse más tarde para decodificar la historia sintética del polipéptido, para amplificar indirectamente el polipéptido y/o para evolucionar (es decir, diversificar, seleccionar y amplificar) el polipéptido. El molde que se puede evolucionar es, en determinadas realizaciones, un ácido nucleico. En determinada realización de la presente invención, el molde está basado en un ácido nucleico. En otras realizaciones, el molde es un polipéptido.

Los moldes de ácido nucleico usados en la presente invención se producen de ADN, ARN, un híbrido de ADN y ARN, o un derivado de ADN y ARN, y pueden ser monocatenarios o bicatenarios. La secuencia del molde se usa para codificar la síntesis de un polipéptido, preferiblemente un compuesto que no es, o no se parece, a un ácido nucleico o análogo de ácido nucleico (por ejemplo, un polímero no natural o una molécula pequeña). En el caso de determinados polímeros no naturales, el molde de ácido nucleico se usa para alinear las unidades de

monómeros en la secuencia en que aparecerán en el polímero y para acercarlas a las unidades de monómeros adyacentes a lo largo del molde para que reaccionen y se unan mediante un enlace covalente. En determinadas realizaciones diferentes, el molde se puede utilizar para generar polímeros no naturales mediante amplificación por PCR de una biblioteca de moldes de ADN sintético que consiste en una región aleatoria de nucleótidos.

5 Se apreciará que el molde puede variar mucho en el número de bases. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la plantilla puede tener de 10 a 10.000 bases de largo, preferentemente entre 10 y 1.500 bases de largo, más preferentemente entre 10 y 1.000 bases de largo. La longitud del molde dependerá, por supuesto, de la longitud de los codones, la complejidad de la biblioteca, la longitud del polímero no natural a sintetizar, la complejidad de la molécula pequeña a sintetizar, el uso de secuencias espaciales, etc. La secuencia de ácido nucleico puede prepararse usando cualquier procedimiento conocido en la técnica para preparar secuencias de ácidos nucleicos. Estos procedimientos incluyen procedimientos tanto *in vivo* como *in vitro*, incluyendo PCR, preparación de plásmidos, digestión con endonucleasas, síntesis en fase sólida, transcripción *in vitro*, separación de cadenas, etc. El molde de ácido nucleico también se puede sintetizar usando un sintetizador de ADN automatizado.

15 Debido a la alta eficacia con la que se pueden generar las 19 sustituciones de aminoácidos en un solo resto, es posible realizar la mutagénesis de saturación en numerosos restos de interés, independientemente o en combinación con otras mutaciones dentro de la proteína. Como se usa en el presente documento, la mutagénesis por "saturación completa" se define como el reemplazo de un aminoácido dado dentro de una proteína, con los otros 19 aminoácidos de origen natural. Por ejemplo, la mutagénesis por saturación del sitio genético, que explora sistemáticamente mínimamente todas las sustituciones de aminoácidos únicas posibles a lo largo de una secuencia de proteínas, se divulga en Kretz et al., *Methods in Enzymology*, 2004, 388:3-11, Short, Patente de EE. UU. n. ° 6.171.820 y Short, Patente de EE. UU. n. ° 6.562.594.

25 Los cebadores de codones (que contienen una secuencia degenerada N, N, G/T) pueden usarse para introducir mutaciones puntuales en un polinucleótido, a fin de generar un conjunto de polipéptidos de descendencia en los que se representa una gama completa de sustituciones de aminoácidos únicas en cada posición de aminoácidos (véase la Patente de Estados Unidos n.º 6.171.820; véase también, la patente de Estados Unidos n.º 5.677.149). Los oligos utilizados están compuestos contiguamente por una primera secuencia homóloga, una secuencia degenerada N, N, G/T, y preferentemente pero no necesariamente una segunda secuencia homóloga. Los productos traduccionales de la descendencia cadena abajo del uso de tales oligos incluyen todos los posibles cambios de aminoácidos en cada sitio de aminoácidos a lo largo del polipéptido, porque la degeneración de la secuencia N, N, G/T incluye codones para los 20 aminoácidos.

35 El uso de codones es uno de los factores importantes en la expresión génica de mamíferos. Las frecuencias con las que se usan diferentes codones varían significativamente entre diferentes huéspedes y entre proteínas expresadas en niveles altos o bajos dentro del mismo organismo. La razón más probable para esta variación es que los codones preferidos se correlacionan con la abundancia de ARNt afines disponibles dentro de la célula. Es posible que el uso de codones y las concentraciones de aceptor de ARNt hayan coevolucionado, y que la presión de selección para esta coevolución sea más pronunciada para genes altamente expresados que para genes expresados a niveles bajos.

45 Uno de tales oligo degenerados (compuesto por un casete degenerado N, N, G/T) puede usarse para someter cada codón original en un molde de polinucleótido precursor a una gama completa de sustituciones de codones. Adicionalmente, se pueden usar al menos dos casetes degenerados de N, N, G/T, ya sea en el mismo oligo o no, para someter al menos dos codones originales en un molde de polinucleótidos precursores a una gama completa de sustituciones de codones. Por lo tanto, un oligo puede contener más de una secuencia N, N, G/T para introducir mutaciones de aminoácidos en más de un sitio. Esta pluralidad de secuencias N, N, G/T puede ser directamente contigua o estar separada por una o más secuencias de nucleótidos adicionales. Los oligos útiles para introducir adiciones y deleciones también se pueden usar solos o en combinación con los codones que contienen una secuencia N, N, G/T, para introducir cualquier combinación o permutación de adiciones, deleciones y/o sustituciones de aminoácidos.

55 Los moldes se pueden descubrir generando y cribando bibliotecas de anticuerpos. En la técnica se conocen varios procedimientos para la generación y cribado de bibliotecas de anticuerpos, según se indica. Por ejemplo, se pueden utilizar bibliotecas de presentación de anticuerpos completamente humanos. La "biblioteca", en este caso, es una población de anticuerpos presentados sobre la superficie de las células huésped. Preferentemente, la biblioteca de anticuerpos es representativa del repertorio humano de anticuerpos en el sentido de que tienen una amplia capacidad de unirse a una amplia gama de antígenos. También, la biblioteca preferentemente tiene miles de anticuerpos bivalentes presentados. Debido a que los anticuerpos se presentan sobre la superficie de las células, aumenta la afinidad eficaz (debido a la avidéz) de cada anticuerpo en la biblioteca. A diferencia de otros tipos de bibliotecas populares, tal como las bibliotecas de presentación en fagos, donde la avidéz de los anticuerpos para fines de cribado e identificación es menos deseable, es deseable la súper avidéz proporcionada por la presentación sobre la superficie celular en la presente invención. Las bibliotecas de presentación sobre la superficie celular permiten la identificación de anticuerpos de baja, media y alta afinidad de unión, así como la identificación de epítopos no inmunogénicos y débiles en la etapa de cribado o selección. Se puede usar cualquier procedimiento

químico sintético o mutagénico recombinante para generar la población de polipéptidos mutantes. La práctica de la presente invención puede emplear, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro de las habilidades en la técnica. Dichas técnicas se explican por completo en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2ª Ed., ed. por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); DNA Cloning, Volúmenes I y II (D. N. Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed., 1984); Mullis et al. la patente de Estados Unidos n.º 4.683.195; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (B. D. Hames y S. J. Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); el tratado, Methods in Enzymology Vol. (Academic Press, Inc., N.Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller and M. P. Cabs eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods in Enzymology, Vols. 154 y 155 (Wu et al. eds.), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer y Walker, eds., Academic Press, Londres, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volúmenes I-IV (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds., 1986); Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1986).

El polipéptido molde es un anticuerpo. El anticuerpo se somete a los procedimientos descritos en el presente documento para, por ejemplo, mapear y comprender qué posiciones dentro de la CDR afectan a la afinidad de unión. Las técnicas para preparar y usar diversas construcciones basadas en anticuerpos y fragmentos de los mismos son bien conocidas en la técnica. Un aspecto importante de la presente invención es la identificación de restos que desempeñan, o es probable que desempeñen, un papel en la interacción de interés (por ejemplo, interacción antígeno-anticuerpo, quelación de metales, unión al receptor, unión al sustrato, etc.). Se puede usar cualquier anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la presente invención. La especificidad de un anticuerpo está determinada por las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) dentro de las regiones variables de cadena ligera (VL) y las regiones variables de cadena pesada (VH). El fragmento Fab de un anticuerpo, que tiene aproximadamente un tercio del tamaño de un anticuerpo completo contiene las regiones variables de cadena pesada y ligera, la región constante de la cadena ligera completa y una porción de la región constante de la cadena pesada. Las moléculas Fab son estables y se asocian bien debido a la contribución de las secuencias de la región constante. Sin embargo, el rendimiento de Fab funcional expresado en sistemas bacterianos es menor que el del fragmento Fv más pequeño que contiene solo las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras. El fragmento Fv es la porción más pequeña de un anticuerpo que aún conserva un sitio de unión a antígeno funcional. El fragmento Fv tiene las mismas propiedades de unión que el Fab, sin embargo, sin la estabilidad conferida por las regiones constantes, las dos cadenas del Fv pueden disociarse con relativa facilidad en condiciones diluidas.

Para solucionar este problema, las regiones VH y VL pueden fusionarse a través de un enlazador de polipéptido (Huston et al., 1991) para estabilizar el sitio de unión a antígeno. Este fragmento Fv de polipéptido único se conoce como un anticuerpo de cadena sencilla (scFv). El VH y el VL se pueden organizar con cualquiera de los dominios primero. El enlazador une el extremo carboxilo de la primera cadena al extremo amino de la segunda cadena.

Un experto en la materia reconocerá que los fragmentos Fv o Fab de cadena pesada o ligera también pueden usarse con este sistema. Se puede mutagenizar una cadena pesada o ligera seguido de la adición de la cadena complementaria a la solución. A continuación, se permite que las dos cadenas se combinen y formen un fragmento de anticuerpo funcional. La adición de secuencias de cadena ligera o pesada aleatorias no específicas permite la producción de un sistema combinatorio para generar una biblioteca de diversos miembros.

En general, se genera un polinucleótido de expresión de cadena sencilla. Este polinucleótido de expresión contiene: (1) un casete de anticuerpos de cadena sencilla que consiste en un dominio V_H , un péptido espaciador y un dominio V_L unido operativamente para codificar un anticuerpo de cadena sencilla, (2) un promotor adecuado para la transcripción *in vitro* (por ejemplo, promotor T7, promotor SP6 y similares) unidos operativamente para garantizar la transcripción *in vitro* del casete de anticuerpos de cadena sencilla que forma un ARNm que codifica un anticuerpo de cadena sencilla, y (3) una secuencia de terminación de la transcripción adecuada para funcionar en una reacción de transcripción *in vitro*. Opcionalmente, el polinucleótido de expresión también puede comprender un origen de replicación y/o un identificador seleccionable. Un ejemplo de un polinucleótido de expresión adecuado es pLM166.

Las secuencias V_H y V_L pueden obtenerse convenientemente de una biblioteca de secuencias V_H y V_L producidas por amplificación por PCR usando cebadores específicos de familia de genes V o cebadores específicos de genes V (Nicholls et al. (1993) J. Immunol. Meth. 165: 81; documento WO93/12227) o diseñarse de acuerdo con procedimientos convencionales conocidos en la técnica basándose en la información de secuencias disponible. Por lo general, se aíslan secuencias V_H y V_L de ratón o humanas. Las secuencias V_H y V_L se unen entonces, en general, con una secuencia espaciadora intermedia (por ejemplo, que codifica un espaciador peptídico flexible en marco), formando un casete que codifica un anticuerpo de cadena sencilla. Por lo general, se usa una biblioteca que comprende una pluralidad de secuencias V_H y V_L (a veces también con una pluralidad de especies de péptidos espaciadores representadas), en la que la biblioteca está construida con una o más de las secuencias V_H y V_L mutadas para aumentar la diversidad de secuencias, particularmente en los restos de CDR, a veces en los restos de las regiones marco conservadas. Las secuencias de la región V pueden clonarse convenientemente como ADNc o productos de amplificación por PCR para células de expresión de inmunoglobulinas. Por ejemplo, las células de

5 hibridoma humano, o linfoma, u otra línea celular que sintetiza la inmunoglobulina de la superficie celular o secretada pueden usarse para el aislamiento de ARN poliA+. El ARN se usa, a continuación, para la síntesis de ADNc cebado con oligo dT usando la enzima transcriptasa inversa (para procedimientos generales, véase Goodspeed et al. (1989) Gene 76: 1; Dunn et al. (1989) J. Biol. Chem. 264: 13057). Una vez que se aísla el producto ADNc o PCR de la región V, se clona en un vector para formar un casete de anticuerpos de cadena sencilla.

10 Para lograr la construcción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, se aíslan e identifican los genes codificantes. Los genes pueden modificarse para permitir la clonación en un vector de expresión o una transcripción/traducción *in vitro*. Aunque se pueden usar procedimientos como sondear el ADN para VH y VL a partir de ADNc de hibridoma (Maniatis et al., 1982) o construir un gen sintético para VH y VL (Barbas et al., 1992), un modo conveniente es usar procedimientos dirigidos por molde para amplificar las secuencias de anticuerpos. Se puede amplificar una población diversa de genes de anticuerpos a partir de una muestra de molde diseñando cebadores para las secuencias conservadas en los extremos 3' y 5' de la región variable conocidas como regiones marco conservadas o para las regiones constantes del anticuerpo (Iverson et al., 1989). Dentro de los cebadores, se pueden colocar sitios de restricción para facilitar la clonación en un vector de expresión. Al dirigir los cebadores a estas regiones conservadas, se mantiene la diversidad de la población de anticuerpos para permitir la construcción de diversas bibliotecas. La especie y la clase específicas de anticuerpo se pueden definir mediante la selección de las secuencias de cebadores como se ilustra por la gran cantidad de secuencias para todos los tipos de anticuerpos dados en Kabat et al., 1987.

20 El ARN mensajero aislado del bazo o la sangre periférica de un animal también se puede usar como molde para la amplificación de una biblioteca de anticuerpos. En determinadas circunstancias, donde es deseable presentar una población homogénea de fragmentos de anticuerpos sobre la superficie celular, el ARNm puede aislarse de una población de anticuerpos monoclonales. Puede prepararse el ARN mensajero de cualquier fuente mediante procedimientos convencionales y usarse directamente o para la preparación de un molde de ADNc. La generación de ARNm para fines de clonación de anticuerpos se logra fácilmente siguiendo los procedimientos bien conocidos para la preparación y caracterización de anticuerpos (véase, p. ej., *Antibodies: A Laboratory Manual*, 1988).

30 La generación de anticuerpos monoclonales (MAb) sigue generalmente los mismos procedimientos que para la preparación de anticuerpos policlonales. En resumen, se prepara un anticuerpo policlonal inmunizando a un animal con una composición inmunogénica de acuerdo con la invención y recogiendo antisueros de ese animal inmunizado. Se puede utilizar una amplia gama de especies animales para la producción de antisueros. Por lo general, el animal utilizado para la producción de antisueros es un conejo, un ratón, una rata, un hámster, una cobaya o una cabra. Debido al volumen sanguíneo relativamente grande de los conejos, generalmente se prefieren los conejos para la producción de anticuerpos policlonales.

40 Con frecuencia, las composiciones inmunogénicas varían en inmunogenicidad. Por lo tanto, con frecuencia es necesario estimular el sistema inmunitario del huésped, como se puede lograr mediante el acoplamiento de un péptido o polipéptido inmunógeno a un vehículo. Vehículos ejemplares y preferidos son hemocianina de lapa californiana (KLH) y albúmina de suero bovino (BSA). También se pueden usar como vehículos otras albúminas tales como la ovoalbúmina, la albúmina de suero de ratón o la albúmina de suero de conejo. Los medios reconocidos para conjugar un polipéptido con una proteína vehículo son bien conocidos e incluyen glutaraldehído, éster de maleimidobenzil-N-hidroxisuccinimida, carbodiimidias y bencidina bis-diazotada.

45 La inmunogenicidad de una composición de inmunógeno determinada puede potenciarse mediante el uso de estimuladores no específicos de la respuesta inmunitaria, conocidos como adyuvantes. Adyuvantes ejemplares y preferidos incluyen adyuvante completo de Freund (un estimulador no específico de la respuesta inmune que contiene *Mycobacterium tuberculosis* inactivado), adyuvantes incompletos de Freund y adyuvante de hidróxido de aluminio.

50 La cantidad de composición de inmunógeno utilizada en la producción de anticuerpos policlonales varía según la naturaleza del inmunógeno, así como el animal utilizado para la inmunización. Se puede utilizar una variedad de vías para administrar el inmunógeno (subcutánea, intramuscular, intradérmica, intravenosa y peritoneal). La producción de anticuerpos policlonales se puede controlar tomando muestras de sangre del animal inmunizado en varios momentos después de la inmunización. También se puede administrar una segunda inyección de refuerzo. El procedimiento de refuerzo y titulación se repite hasta lograr un título adecuado. Cuando se obtiene un nivel deseado de inmunogenicidad, el animal inmunizado puede sangrarse y el suero aislado, almacenado y el bazo cosechado para el aislamiento del ARNm de la respuesta policlonal o el animal pueden usarse para generar MAb para el aislamiento del ARNm de una población de anticuerpos homogéneos.

60 Los MAb pueden prepararse fácilmente mediante el uso de técnicas bien conocidas, tal como las ejemplificadas en la patente de EE.UU. n.º 4,196,265. Por lo general, esta técnica implica inmunizar un animal adecuado con una composición de inmunógeno seleccionada, por ejemplo, un hapteno de molécula pequeña conjugado con un vehículo, una proteína, polipéptido o péptido purificado o parcialmente purificado. La composición inmunizante se administra de manera eficaz para estimular las células productoras de anticuerpos. Los roedores tales como los ratones y las ratas son animales de uso frecuente; sin embargo, también es posible el uso de células de rana, conejo

u oveja. El uso de ratas puede proporcionar ciertas ventajas (Goding, págs. 60-61, 1986), pero se prefieren los ratones, particularmente el ratón BALB/c, ya que este se usa más habitualmente y generalmente proporciona un mayor porcentaje de fusiones estables.

5 Después de la inmunización, las células somáticas con potencial para producir anticuerpos, específicamente linfocitos B (células B), se seleccionan para su uso en el protocolo de generación de MAb. Estas células pueden obtenerse a partir de biopsias de bazo, amígdalas o ganglios linfáticos o de muestras de sangre. Se prefieren las células de bazo y las células sanguíneas, la primera porque son una fuente rica de células productoras de anticuerpos que se encuentran en la etapa de división de plasmablastos, y la segunda porque la sangre es
10 fácilmente accesible. A menudo, se habrá inmunizado un grupo de animales y se extraerá el bazo del animal con el título de anticuerpos más alto y se obtendrán los linfocitos del bazo homogeneizando el bazo con una jeringa. Por lo general, un bazo de un ratón inmunizado contiene aproximadamente 5×10^7 a 2×10^8 linfocitos.

15 Los linfocitos B productores de anticuerpos del animal inmunizado se fusionan, a continuación, con células de una célula de mieloma inmortal, generalmente una de la misma especie que el animal que se inmunizó. Las líneas celulares de mieloma adecuadas para su uso en procedimientos de fusión que producen hibridoma preferentemente son no productoras de anticuerpos, tienen una alta eficacia de fusión y deficiencias enzimáticas que las hacen, por lo tanto, incapaces de crecer en ciertos medios selectivos que apoyan el crecimiento de solo las células fusionadas deseadas (hibridomas).

20 Puede usarse una cualquiera de varias células de mieloma, como conocen los expertos en la materia (Goding, págs. 65-66, 1986; Campbell, 1984). Por ejemplo, cuando el animal inmunizado es un ratón, se puede usar P3-X63/Ag8, X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 4 1, Sp210-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 y S194/5XX0 Bul; para ratas, se puede usar R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F y 4B210; y U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 y UC729-6
25 son útiles en relación con las fusiones de células humanas.

Una célula de mieloma murino preferida es la línea celular de mieloma NS-1 (también denominada P3-NS-1-Ag4-1), que está fácilmente disponible en el NIGMS Human Genetic Mutant Cell Repository solicitando el número de repositorio de la línea celular GM3573. Otra línea celular de mieloma de ratón que puede usarse es la línea celular
30 no productora de mieloma murino de ratón SP2/0 resistente a 8-azaguanina.

Procedimientos para generar híbridos de células de bazo o ganglios linfáticos que producen anticuerpos y células de mieloma generalmente comprenden mezclar células somáticas con células de mieloma en una proporción de 2:1, aunque la proporción puede variar de aproximadamente 20:1 a aproximadamente 1:1, respectivamente, en
35 presencia de un agente o agentes (químicos o eléctricos) que promueven la fusión de las membranas celulares. Se han descrito los procedimientos de fusión que usan el virus Sendai por Kohler y Milstein (1975; 1976) y aquellos que usan polietilenglicol (PEG), tal como PEG al 37 % (v/v), por Gefter et al., 1977). El uso de procedimientos de fusión inducidos eléctricamente también es apropiado (Goding págs. 71-74, 1986).

40 Los procedimientos de fusión generalmente producen híbridos viables a bajas frecuencias, aproximadamente 1×10^{-6} a 1×10^{-8} . Sin embargo, esto no plantea un problema, ya que los híbridos viables fusionados se diferencian de las células precursoras no fusionadas (particularmente las células de mieloma no fusionadas que normalmente continuarían dividiéndose indefinidamente) mediante el cultivo en un medio selectivo. El medio selectivo es generalmente uno que contiene un agente que bloquea la síntesis de novo de nucleótidos en los medios de cultivo
45 de tejidos. Agentes ejemplares y preferidos son aminopterina, metotrexato y azaserina. La aminopterina y el metotrexato bloquean la síntesis de novo tanto de purinas como de pirimidinas, mientras que la azaserina bloquea solo la síntesis de purinas. Cuando se usa aminopterina o metotrexato, los medios se complementan con hipoxantina y timidina como fuente de nucleótidos (medio HAT). Cuando se usa azaserina, los medios se complementan con hipoxantina.

50 El medio de selección preferido es HAT. Solo las células capaces de operar rutas de recuperación de nucleótidos pueden sobrevivir en medio HAT. Las células de mieloma son defectuosas en enzimas clave de la vía de recuperación, p. ej., hipoxantina fosforribosil transferasa (HPRT) y no pueden sobrevivir. Los linfocitos B pueden operar esta vía, pero tienen una vida útil limitada en cultivo y generalmente mueren en aproximadamente dos
55 semanas. Por lo tanto, las únicas células que pueden sobrevivir en los medios selectivos son los híbridos formados por células de mieloma y linfocitos B.

Este cultivo proporciona una población de hibridomas de los cuales se seleccionan hibridomas específicos. Por lo general, la selección de hibridomas se realiza cultivando las células mediante dilución de un solo clon en placas de microtitulación, seguido de la prueba de reactividad deseada en los sobrenadantes clonales individuales (después de
60 aproximadamente dos o tres semanas). Los ensayos simples y rápidos incluyen radioinmunoensayos, inmunoensayos enzimáticos, ensayo de citotoxicidad, ensayo en placa, ensayos de inmunounión por puntos y similares.

65 Los hibridomas seleccionados se diluyen en serie y se clonan en líneas celulares individuales productoras de anticuerpos a partir de las cuales los clones se pueden propagar indefinidamente para proporcionar MAb. Las líneas

celulares pueden explotarse para la producción de MAb de dos maneras básicas. Se puede inyectar una muestra del hibridoma (a menudo en la cavidad peritoneal) en un animal histocompatible del tipo que se utilizó para proporcionar las células somáticas y de mieloma para la fusión original. El animal inyectado desarrolla tumores que secretan el anticuerpo monoclonal específico producido por el híbrido de células fusionadas. Los fluidos corporales del animal, tales como el suero o el líquido ascítico, se pueden aprovechar para proporcionar MAb en alta concentración. Las líneas celulares individuales también podrían cultivarse *in vitro*, donde los MAb se secretan naturalmente en el medio de cultivo del que pueden obtenerse fácilmente en altas concentraciones. Los MAb producidos por cualquier medio pueden purificarse adicionalmente, si se desea, usando filtración, centrifugación y diversos procedimientos cromatográficos tales como HPLC o cromatografía de afinidad.

Después del aislamiento y caracterización del anticuerpo monoclonal deseado, el ARNm puede aislarse usando técnicas bien conocidas en la técnica y usarse como molde para la amplificación de la secuencia diana.

Hay varios procedimientos dependientes de molde disponibles para amplificar las secuencias diana antes y después de la mutagénesis. Por ejemplo, uno de los procedimientos de amplificación más conocidos es la reacción en cadena de la polimerasa (denominada PCR) que se describe en detalle en las Patentes de EE.UU. n.º 4.683.195, 4.683.202 y 4.800.159, y en Innis et al. (1990). En resumen, en la PCR, se preparan dos secuencias de cebador que son complementarias a las regiones en cadenas complementarias opuestas de la secuencia diana. Se añade un exceso de desoxinucleósidos trifosfato a una mezcla de reacción junto con una ADN polimerasa, p. ej., polimerasa Taq. Si la secuencia diana está presente en una muestra, los cebadores se unirán a la diana y la polimerasa hará que los cebadores se extiendan a lo largo de la secuencia diana agregando nucleótidos. Al subir y bajar la temperatura de la mezcla de reacción, los cebadores extendidos se disociarán de la diana para formar productos de reacción, los cebadores en exceso se unirán a la diana y a los productos de reacción y se repite el procedimiento. Preferentemente, se puede realizar un procedimiento de amplificación por PCR con transcriptasa inversa para cuantificar la cantidad de diana amplificada. Los procedimientos de reacción en cadena de la polimerasa son bien conocidas en la técnica. Usando técnicas de amplificación enzimática tal como la PCR, los elementos de control deseados pueden diseñarse en el cebador y, por lo tanto, se incorporarán al producto de ADN.

Muchos otros procedimientos de amplificación son conocidos en la técnica.

Una ventaja del procedimiento de síntesis de genes en fase sólida es la oportunidad de mutagénesis utilizando técnicas de síntesis combinatoria. Las técnicas de síntesis combinatoria se definen como aquellas técnicas que producen grandes colecciones o bibliotecas de compuestos simultáneamente, uniendo secuencialmente diferentes componentes básicos. Las bibliotecas se pueden construir utilizando compuestos libres en solución, pero preferiblemente un compuesto el compuesto está unido a un soporte sólido, tal como una perla, partícula sólida o incluso se presenta sobre la superficie de un microorganismo.

Existen varios procedimientos para la síntesis combinatoria (Holmes et al., 1995; Burbaum et al., 1995; Martin et al., 1995; Freier et al., 1995; Pei et al., 1991; Bruce et al., 1995; Ohlmeyer et al., 1993), incluyendo síntesis de división o síntesis paralela. Como alternativa, la técnica conocida como síntesis paralela puede realizarse en fase sólida o en solución. Usando procedimientos combinatorios, se puede sintetizar una gran cantidad de moldes de genes mutantes.

Los genes mutantes también pueden generarse mediante procedimientos semisintéticos conocidos en la técnica (Barbas et al., 1992). Usando las regiones conservadas de un fragmento de anticuerpo como región marco conservada, se pueden insertar regiones variables en combinaciones aleatorias una o más a la vez para alterar la especificidad del fragmento de anticuerpo y generar nuevos sitios de unión, especialmente en la generación de anticuerpos contra antígenos no propicios a la inmunización tal como compuestos tóxicos o lábiles. En la misma línea, una secuencia de anticuerpos conocida se puede variar mediante la introducción de mutaciones de forma aleatoria o no aleatoria.

Las técnicas procariotas *in vitro* para la producción de proteínas fueron las primeras en usarse (Zubay et al., 1970). Posteriormente, se desarrollaron sistemas eucariotas utilizando germen de trigo (Roberts, 1973) y reticulocitos de conejo (Pelham, 1976). Varios desarrollos nuevos han aumentado la eficacia de estas técnicas. Los ejemplos incluyen, el desarrollo de cepas de *E. coli* deficientes en nucleasas para mejorar los resultados utilizando moldes de ADN lineales (Yang, 1980) y el tratamiento de lisados de reticulocitos con nucleasa microcócica para disminuir cualquier expresión de fondo del sistema.

Los sistemas más recientes desarrollados para la transcripción/traducción *in vitro* se basan en la transcripción por ARN polimerasas de fago, incluidas SP6 y SP7 (Krieg, 1987, Studier, 1990). El ADN colocado bajo el control de los elementos promotores de T7 puede usarse como molde para la transcripción *in vitro* por la ARN polimerasa de T7 o para la transcripción/traducción *in vitro* completa con la polimerasa añadida a un sistema de síntesis de proteínas procariotas o eucariotas. Si bien los procedimientos de la presente invención se pueden usar con cualquier sistema de transcripción/traducción *in vitro*, se prefiere el sistema T7 para la transcripción y se prefiere el uso de un sistema de traducción procariota ya que no se requiere la protección terminal del ARN.

Usando procedimientos *in vitro* para la traducción, los derivados de aminoácidos se pueden incorporar a la proteína mediante la adición del aminoácido derivado a la mezcla del sistema de síntesis de proteínas. Variando la concentración de los derivados, con respecto al aminoácido normal, permite crear una población mixta y medir los efectos relativos. G. Caracterización

5 Los polipéptidos mutantes generados por la presente invención pueden caracterizarse usando una variedad de técnicas. En general, los productos proteicos pueden analizarse para determinar el peso molecular aparente correcto usando SDS-PAGE. Esto proporciona una indicación inicial de que el polipéptido fue, de hecho, sintetizado. Cuando se compara con la molécula natural, también indica si se está produciendo un plegamiento o procesamiento normal con el mutante. En este sentido, puede resultar útil marcar el polipéptido. Como alternativa, el polipéptido puede identificarse por tinción del gel.

15 Más allá de la mera síntesis, las proteínas pueden caracterizarse según diversas propiedades y una amplia gama de funciones. Las propiedades incluyen punto isoelectrico, estabilidad térmica, velocidad de sedimentación y plegamiento. Una forma de examinar el plegamiento es la capacidad de ser reconocido por un compañero de unión afín. El primer ejemplo de esta función es la interacción anticuerpo-antígeno. Una amplia variedad de diferentes formatos de inmunoensayo están disponibles para este propósito y son bien conocidos en la técnica. Principalmente, los cambios en afinidad o especificidad se pueden determinar cuando la proteína se pone en contacto con un ligando específico o grupos de ligandos relacionados.

20 Los inmunoensayos generalmente se pueden dividir en dos tipos: ensayos heterogéneos que requieren múltiples etapas de separación y ensayos homogéneos que se realizan directamente. Los inmunoensayos heterogéneos en general implican un ligando o anticuerpo inmovilizado en una matriz sólida. Una muestra que contiene un ligando se pone en contacto con el anticuerpo inmovilizado y la cantidad de complejo formado sobre el soporte de la matriz se determina a partir de un marcador unido directa o indirectamente al complejo inmovilizado. Como se usa en el contexto de la presente invención, ligando se define como una especie que interactúa con una molécula no idéntica para formar un complejo estable y fuertemente unido. A efectos prácticos, la afinidad de unión es habitualmente mayor que aproximadamente 10^6 M^{-1} y está preferentemente en el intervalo de $10^9 - 10^{15} \text{ M}^{-1}$. El ligando puede ser cualquiera de varios tipos de moléculas orgánicas, incluidos hidrocarburos alicíclicos, aromáticos polinucleares, compuestos halogenados, benzenoides, hidrocarburos polinucleares, heterociclos de nitrógeno, heterociclos de azufre, heterociclos de oxígeno e hidrocarburos alcanos, alquenos, alquinos, etc. Las moléculas biológicas son de particular interés, incluyendo aminoácidos, péptidos, proteínas, lípidos, sacáridos, ácidos nucleicos y combinaciones de los mismos. Por supuesto, se entenderá que estos son solo a modo de ejemplo y que los procedimientos de inmunoensayo contemplados son aplicables para detectar una gama extraordinariamente amplia de compuestos, siempre que se pueda obtener un anticuerpo que se una con el ligando de interés.

35 Los inmunoensayos heterogéneos pueden realizarse como ensayos sándwich en los que una molécula de interés reacciona con un anticuerpo inmovilizado que se une específicamente a esa molécula con alta afinidad. En una segunda etapa, un conjugado formado a partir del mismo o diferente anticuerpo contra el antígeno y una molécula identificadora reacciona con el complejo antígeno-anticuerpo sobre la matriz de inmovilización. Después de eliminar el exceso de conjugado identificador libre, se mide el conjugado identificador unido, que es proporcional a la cantidad de ligando en la muestra.

45 La detección de la formación de inmunocomplejos es bien conocida en la técnica y puede lograrse mediante la aplicación de numerosos enfoques. Estos enfoques generalmente se basan en la detección de un marcador o identificador, tales como cualquiera de las etiquetas o marcadores radiactivos, fluorescentes, quimioluminiscentes, electroquimioluminiscentes, biológicos o enzimáticos conocidos en la técnica. Las patentes de EE. UU. sobre el uso de tales marcadores incluyen las Patentes de EE. UU. n.º 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149 y 4.366.241. Por supuesto, se pueden encontrar ventajas adicionales mediante el uso de un ligando de unión secundario tal como un segundo anticuerpo o una disposición de unión de ligando de biotina/avidina, como es conocido en la técnica.

50 Los procedimientos preferidos para la detección incluyen radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), siendo ELISA el más preferido debido a una sensibilidad generalmente aumentada. Los ELISA se usan ampliamente en aplicaciones de biotecnología, particularmente como inmunoensayos para una amplia gama de sustancias antigénicas. La sensibilidad de ELISA se basa en la amplificación enzimática de la señal.

60 Como se usa en el presente documento, la expresión "poner en contacto" se define como acercar los componentes de reacción lo suficientemente cerca entre sí como para permitir que se produzca la interacción deseada. El contacto se puede lograr mezclando los componentes en solución, por ejemplo, o por interacción heterogénea, tal como por contacto de flujo a través de una columna o matriz de inmovilización que se une a uno de los componentes.

65 Las construcciones de expresión de ADN incluirán generalmente una secuencia de ADN de control de la expresión unida operativamente a las secuencias codificantes, incluyendo regiones promotoras heterólogas o asociadas naturalmente. Preferentemente, las secuencias de control de la expresión serán sistemas promotores eucariotas en vectores capaces de transformar o transfectar células huésped eucariotas. Una vez que el vector se ha incorporado

al huésped apropiado, el huésped se mantiene en condiciones adecuadas para la expresión de alto nivel de las secuencias de nucleótidos, y la recogida y purificación de los anticuerpos mutantes "diseñados".

5 Las secuencias de ADN se expresarán en los huéspedes después de que las secuencias se hayan unido operativamente a una secuencia de control de la expresión (es decir, posicionadas para garantizar la transcripción y traducción del gen estructural). Estos vectores de expresión generalmente son replicables en los organismos huésped, ya sea como episodios o como parte integral del ADN cromosómico del huésped. De manera habitual, los vectores de expresión contendrán identificadores de selección, p. ej., tetraciclina o neomicina, para permitir la detección de aquellas células transformadas con las secuencias de ADN deseadas (véase, p. ej., la patente de los EE.UU. n.º 4.704.362).

15 Además de los microorganismos eucariotas tales como levaduras, el cultivo de células de tejidos de mamíferos también se puede usar para producir los polipéptidos de la presente invención (véase, Winnacker, "From Genes to Clones", VCH Publishers, N.Y., N.Y. (1987)). Se prefieren las células eucariotas, porque en la técnica se han desarrollado varias líneas celulares huésped adecuadas capaces de secretar inmunoglobulinas intactas, e incluyen las líneas celulares CHO, varias líneas celulares COS, células HeLa, líneas de células de mieloma, etc., pero preferentemente linfocitos B o hibridomas transformados. Los vectores de expresión para estas células pueden incluir secuencias de control de la expresión, tales como un origen de replicación, un promotor, un potenciador (Queen et al. (1986) Immunol. Rev. 89: 49) y los sitios de procesamiento de la información necesarios, tales como sitios de unión a ribosomas, sitios de corte y empalme de ARN, sitios de poliadenilación y secuencias terminadoras transcripcionales. Las secuencias de control de la expresión preferidas son promotores procedentes de genes de inmunoglobulina, citomegalovirus, SV40, Adenovirus, Virus del Papiloma Bovino y similares.

25 La transcripción de ADN eucariota se puede aumentar insertando una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son secuencias de acción cis de entre 10 y 30 pb que aumentan la transcripción por un promotor. Los potenciadores pueden aumentar de manera eficaz la transcripción cuando se encuentran 5' o 3' a la unidad de transcripción. También son eficaces si se encuentran dentro de un intrón o dentro de la secuencia codificante misma. Por lo general, se usan potenciadores víricos, que incluyen potenciadores SV40, potenciadores de citomegalovirus, potenciadores de poliovirus y potenciadores de adenovirus. También se usan comúnmente secuencias potenciadoras de sistemas de mamíferos, tal como el potenciador de la cadena pesada de inmunoglobulina de ratón.

35 Los sistemas de vectores de expresión de mamíferos también incluirán generalmente un gen identificador seleccionable. Ejemplos de identificadores adecuados incluyen, el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR), el gen de timidina quinasa (TK) o genes procariotas que confieren resistencia a fármacos. Los primeros dos genes identificadores prefieren el uso de líneas celulares mutantes que carecen de la capacidad de crecer sin la adición de timidina al medio de crecimiento. Las células transformadas se pueden identificar entonces por su capacidad de crecer sobre potenciadores no complementados, que incluyen potenciadores SV40, potenciadores de citomegalovirus, potenciadores de poliovirus y potenciadores de adenovirus. También se usan comúnmente secuencias potenciadoras de sistemas de mamíferos, tal como el potenciador de la cadena pesada de inmunoglobulina de ratón.

45 Los sistemas de vectores de expresión de mamíferos también incluirán generalmente un gen identificador seleccionable. Ejemplos de identificadores adecuados incluyen, el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR), el gen de timidina quinasa (TK) o genes procariotas que confieren resistencia a fármacos. Los primeros dos genes identificadores prefieren el uso de líneas celulares mutantes que carecen de la capacidad de crecer sin la adición de timidina al medio de crecimiento. Las células transformadas pueden identificarse entonces por su capacidad de crecer sobre medios no complementados. Ejemplos de genes de resistencia a fármacos procariotas útiles como identificadores incluyen genes que confieren resistencia a G418, ácido micofenólico e higromicina.

50 Los vectores que contienen los segmentos de ADN de interés pueden transferirse a la célula huésped por procedimientos bien conocidos, dependiendo del tipo de huésped celular. Por ejemplo, normalmente se usa transfección con cloruro de calcio para células procariotas, mientras que el tratamiento con fosfato de calcio, la lipofección o la electroporación pueden usarse para otros huéspedes celulares. Otros procedimientos usados para transformar células de mamífero incluyen el uso de Polibreno, fusión de protoplastos, liposomas, electroporación y microinyección (véase, en general, Sambrook et al., *citado anteriormente*).

60 Una vez expresados, los anticuerpos, las cadenas de inmunoglobulina mutadas individuales, los fragmentos de anticuerpos mutados y otros polipéptidos de inmunoglobulinas de la invención pueden purificarse de acuerdo con los procedimientos convencionales de la técnica, incluyendo precipitación con sulfato de amonio, cromatografía en columna de fracciones, electroforesis en gel y similares (véase, en general, Scopes, R., Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y. (1982)). Una vez purificados, parcialmente o con la homogeneidad deseada, los polipéptidos se pueden usar entonces terapéuticamente o en el desarrollo y la realización de procedimientos de ensayo, tinciones inmunofluorescentes y similares (véase, en general, Immunological Methods, Vol. I y II, Eds. Lefkovits y Pernis, Academic Press, N.Y. N.Y. (1979 y 1981)).

65 Una vez que se ha mapeado el péptido molde, se pueden usar una variedad de técnicas para diversificar el molde o

los miembros de la biblioteca de péptidos para construir ligandos con propiedades mejoradas. Los oligonucleótidos se pueden sintetizar basándose en estas secuencias de péptidos, empleando todas las bases en cada etapa a concentraciones diseñadas para producir ligeras variaciones de las secuencias de oligonucleótidos primarios. Esta mezcla de oligonucleótidos (ligeramente) degenerados se clona después en el vector de expresión aleatorio de la biblioteca de péptidos como se describe en el presente documento. Este procedimiento produce una secuencia controlada y sistemática que codifica el péptido variable, que opcionalmente puede aislarse cortando con nucleasas de restricción específicas para sitios que flanquean la región variable y después volverlas a clonar en el ADN del vector no dañado. Como alternativa, los vectores mutagenizados se pueden usar sin volver a clonar la secuencia codificante del péptido aleatorio mutagenizado.

En el segundo enfoque general para diversificar un conjunto de ligandos peptídicos, el de agregar aminoácidos adicionales a un péptido o péptidos que se encuentran activos, hay una variedad de procedimientos disponibles. En uno, las secuencias de péptidos seleccionados en la selección temprana se determinan individualmente y se sintetizan oligonucleótidos cercanos, incorporando toda o parte de la secuencia determinada y una secuencia degenerada contigua. Estos se clonan después para producir una biblioteca secundaria.

A menos que se modifiquen durante o después de la síntesis por la maquinaria de traducción, las bibliotecas de péptidos recombinantes consisten en secuencias de los 20 L-aminoácidos normales. Si bien la diversidad estructural disponible para dicha biblioteca es grande, se puede introducir diversidad adicional por una variedad de medios, tales como modificaciones químicas de los aminoácidos. Por ejemplo, como una fuente de diversidad añadida, una biblioteca de péptidos de la invención puede someterse a amidación del carboxilo terminal. La amidación del carboxilo terminal es necesaria para la actividad de muchos péptidos bioactivos de origen natural. Esta modificación se produce *in vivo* a través de la escisión del enlace N-C de un resto de Gly carboxilo terminal en una reacción de dos etapas catalizada por las enzimas peptidilglicina alfa amidamonooxigenasa (PAM) e hidroxiglicina aminotransferasa (HGAT). Véanse Eipper et al., J. Biol. Chem. 266, 7827-7833 (1991); Mizuno et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 137(3), 984-991 (1986); Murthy et al., J. Biol. Chem. 261(4), 1815-1822 (1986); Katopodis et al., Biochemistry 29, 6115-6120 (1990); y Young y Tamburini, J. Am. Chem. Soc. 111, 1933-1934 (1989).

La amidación se puede realizar mediante tratamiento con enzimas, tales como PAM y HGAT, *in vivo* o *in vitro*, y en condiciones propicias para mantener la integridad estructural del complejo proteína de fusión/vector. En una biblioteca de péptidos aleatoria de la presente invención, se producirá la amidación en un subconjunto de la biblioteca, es decir, aquellos péptidos que tienen una Gly carboxilo terminal. Se puede construir una biblioteca de péptidos diseñada para la amidación mediante la introducción de un codón Gly al final del dominio de la región variable de la biblioteca. Después de la amidación, una biblioteca enriquecida sirve como una fuente particularmente eficaz de ligandos para receptores que se unen preferentemente a péptidos amidados.

Se pueden introducir otras modificaciones en péptidos y proteínas de origen natural en las bibliotecas para proporcionar diversidad adicional y contribuir a una actividad biológica deseada. Por ejemplo, la biblioteca de la región variable se puede proporcionar con codones que codifican los restos de aminoácidos implicados en la fosforilación, glicosilación, sulfatación, isoprenilación (o la adición de otros lípidos), etc. Las modificaciones no catalizadas por enzimas de origen natural pueden introducirse por medios químicos (en condiciones relativamente suaves) o mediante la acción de, p. ej., anticuerpos catalíticos y similares. En la mayoría de los casos, una estrategia eficaz para la construcción de la biblioteca implica especificar el sitio de reconocimiento del sustrato enzimático (o químico) dentro o adyacente a la región de nucleótidos variable de la biblioteca, de modo que se modifiquen la mayoría de los miembros de la biblioteca. El sitio de reconocimiento del sustrato agregado puede ser simplemente un resto único (por ejemplo, serina para fosforilación) o una secuencia consenso compleja, según se desee.

Una desventaja de generar, producir o fabricar anticuerpos biespecíficos utilizando tecnologías tradicionales es que, en general, la expresión de 2 anticuerpos en una sola célula conduce a la formación de 10 posibles combinaciones de anticuerpos LC/HC (con 2 cadenas pesadas y 2 cadenas ligeras por anticuerpo), de las cuales solo una es el producto biespecífico deseado; por lo tanto, el producto biespecífico deseado es solo una pequeña fracción de la mezcla y la purificación del anticuerpo biespecífico es muy difícil a escala comercial. Por ejemplo, si el primer anticuerpo (anticuerpo 1) tiene una LC izquierda (1-LC1) y una HC izquierda (1-HC1) y una LC derecha (r-LC1) y una HC derecha (r-HC1), y el segundo anticuerpo (el anticuerpo 2) tiene una LC izquierda (1-LC2) y una HC izquierda (1-HC2) y una LC derecha (r-LC2) y una HC derecha (r-HC2), la expresión del anticuerpo 1 y anticuerpo 2 en una sola célula conduce a la formación de las siguientes combinaciones posibles de LC/HC: (1) 1-LC1/1-HC1 con r-LC1/r-HC1; (2) 1-LC1/1-HC1 con r-LC2/r-HC1; (3) 1-LC1/1-HC1 con r-LC1/r-HC2; (4) 1-LC2/1-HC1 con r-LC2/r-HC1; (5) 1-LC2/1-HC2 con r-LC2/r-HC2; (6) 1-LC2/1-HC2 con r-HC2/r-LC1; (7) 1-LC2/1-HC1 con r-HC2/r-LC2; (8) 1-LC1/1-HC2 con r-HC2/r-LC1; (9) 1-LC2/1-HC1 con r-LC2/r-HC2; (10) 1-LC1/1-HC1 con r-LC2/r-HC2. Solo una de las combinaciones se une a ambos antígenos (1-LC1/1-HC1 con r-LC2/r-HC2). Adicionalmente, se desconoce la afinidad y especificidad de unión de los emparejamientos LC/HC no deseados. Las modificaciones en el dominio CH3 de la cadena pesada (como los diseños de botón en ojal) pueden eliminar la formación de homodímeros de cadena pesada y reducir la cantidad de posibles combinaciones de anticuerpos LC/HC producidas hasta 4 productos diferentes (coexpresión de 2 diferentes cadenas ligeras con el un par de cadenas pesadas). Por ejemplo, en el diseño botón en ojal, los 4 productos diferentes serían: (1) 1-LC1/1-HC1 con r-LC2/r-HC2; (2) 1-LC1/1-HC1 con r-LC1/r-HC2; (3) 1-LC2/1-HC1 con r-LC1/r-HC2; (4) 1-LC2/1-HC1 con r-LC2/r-HC2.

Los anticuerpos multiespecíficos H2L de la presente invención superan estas dificultades de producción/fabricación. Los anticuerpos H2L de la presente invención tienen dominios variables optimizados que permiten que la misma cadena ligera se ensamble con cada una de las 2 cadenas pesadas sin cambiar la especificidad de unión para el antígeno determinado. La cadena ligera se ensambla con la cadena pesada 1 para formar un brazo Fab que se une al antígeno 1. La cadena ligera también puede ensamblarse con la cadena pesada 2 para formar un brazo Fab que se une al antígeno 2. La parte Fc de las cadenas pesadas se modifica de una manera que solo permite la formación del dímero HC1-HC2 *in vivo* (por ejemplo, facilitado por, por ejemplo, un diseño "botón en ojal"). La expresión de 2 cadenas pesadas que forman solo heterodímeros y una cadena ligera única conduce a la formación de solo un producto único, el anticuerpo multiespecífico H2L de la presente invención. Cada molécula producida tiene un brazo Fab que se une al antígeno 1 y el otro brazo Fab que se une al antígeno 2. mAb H2L. La cadena ligera única se ha optimizado de acuerdo con los procedimientos de la presente invención para poder ensamblarse con ambas cadenas pesadas y formar una unión funcional de los brazos Fab al antígeno 1 o al antígeno 2. Los anticuerpos H2L de la presente invención pueden fabricarse y purificarse al igual que las IgG regulares, son bien conocidas en la técnica.

Construcción of mAb H2L

Los anticuerpos precursores iniciales pueden ser aglutinantes conocidos (pares LC1/HC1 que comprenden el anticuerpo 1 y pares LC2/HC2 que comprenden el anticuerpo 2, por ejemplo) para diferentes antígenos (el anticuerpo 1 se une al antígeno 1 y el anticuerpo 2 se une al antígeno 2, por ejemplo), y puede ser anticuerpos no humanos, humanizados o completamente humanos.

En una primera etapa, las 2 cadenas ligeras diferentes de ambos anticuerpos (LC1 y LC2) se reemplazan por una cadena ligera única (nueva-LC). Este procedimiento puede comenzar con una biblioteca de cadenas ligeras. Las bibliotecas de posibles nuevas cadenas ligeras (nueva-LC) de la presente invención pueden generarse de varias maneras. Por ejemplo, todas las regiones variables funcionales de la cadena ligera kappa de la línea germinal humana (Vk) se publican y se pueden obtener de bases de datos disponibles públicamente. Se pueden seleccionar genes variables para la construcción de la biblioteca. Los genes variables de la cadena ligera pueden amplificarse a partir de ADN genómico humano usando cebadores específicos de genes. En el caso de que los genes se amplifiquen en partes, los genes parciales se pueden combinar mediante PCR solapante, tal como se publica. Las cadenas ligeras kappa y lambda reorganizadas también pueden amplificarse a partir de ADNc humano (derivado, por ejemplo, por ejemplo, de PBMC de un grupo de donantes no inmunizados) usando cebadores directos específicos para el extremo 5' de las señales de secreción de la cadena ligera y cebador inverso específico para el extremo 3' del dominio constante kappa o lambda. Las bibliotecas de LC también se pueden generar tomando LC de cada anticuerpo precursor conocido (LC 1 y LC2) y evolucionando uno (o ambos) de acuerdo con los procedimientos de evolución descritos en el presente documento, u otros procedimientos, para generar una población o biblioteca de LC (biblioteca de LC1 y biblioteca de LC2).

En un procedimiento de la presente invención, la HC del anticuerpo 1 (HC1) se expresa conjuntamente con la biblioteca de LC1 humana, por ejemplo, una biblioteca de LC1 generada como se describe en el presente documento, y esta biblioteca de HC1-LC1 después se criba para determinar aglutinantes, o resultados positivos, para el antígeno 1, seguido de aislamiento de las cadenas ligeras de los aglutinantes o resultados positivos. La HC2 del anticuerpo 2 (HC2) se expresa conjuntamente con la biblioteca de LC2 humana, por ejemplo, una biblioteca de LC1 generada como se describe en el presente documento, y esta biblioteca de HC2-LC2 después se criba para determinar aglutinantes, o resultados positivos, para el antígeno 2, seguido de aislamiento de las cadenas ligeras de los aglutinantes o resultados positivos. El cribado puede realizarse mediante FACS (si las combinaciones LC/HC se expresan sobre la superficie celular, por ejemplo) o mediante ELISA (utilizando bibliotecas secretadas o unidas sobre la superficie celular).

Las cadenas ligeras aisladas de los resultados positivos identificados en la biblioteca de HC1-LC1 se expresan conjuntamente con la cadena pesada del anticuerpo 2 (HC2) y esta biblioteca de HC2-LC1 se criba en busca de aglutinantes o resultados positivos, para el antígeno 2. Las cadenas ligeras aisladas de los resultados positivos identificados en la biblioteca de HC2-LC2 también se aíslan, se expresan conjuntamente con la cadena pesada del anticuerpo 1 (HC1) y se criban en busca de aglutinantes o resultados positivos, para el antígeno 1. Este procedimiento identifica una población de clones que contienen cadenas ligeras que pueden complementar funcionalmente tanto a HC1 como a HC2. Estos clones, que contienen cadenas ligeras que pueden complementar funcionalmente tanto a HC1 como a HC2, se caracterizan adicionalmente (por ejemplo, mediante ELISA de competición con el antígeno 1 o con el antígeno 2 de tipo silvestre) para verificar la conservación de la especificidad de unión de cada clon al antígeno 1 y/o al antígeno 2, y el mismo epítipo sobre el antígeno 1 y/o antígeno 2 que las respectivas moléculas precursoras (anticuerpo 1 y/o anticuerpo 2). Las cadenas ligeras de estos clones también se pueden volver a probar con HC1 y HC2 para confirmar que conservan la capacidad de complementar funcionalmente tanto a HC1 como a HC2.

Las nuevas cadenas ligeras identificadas se pueden evolucionar adicionalmente (por ejemplo, mediante los procedimientos de evolución descritos en el presente documento), para mejorar la afinidad para igualar o superar las

afinidades de unión de las moléculas precursoras, o para modificar otras características como la termoestabilidad, especificidad, afinidad de unión y/u otras características.

5 El dominio variable de HC1 se clona en marco con un dominio constante de IgG modificado que se ha modificado, por ejemplo, con la tecnología de botón en ojal como se describe en el presente documento, de modo que ya no puede ensamblarse consigo mismo para formar homodímeros de HC1. En paralelo, el dominio variable de HC2 se clona en marco con un dominio constante de IgG modificado que se ha modificado, por ejemplo, con la tecnología de botón en ojal como se describe en el presente documento, de modo que ya no puede ensamblarse consigo mismo para formar homodímeros de HC2. Las modificaciones en HC1 y HC2 eliminan la formación de homodímeros, pero
10 están diseñados para permitir la formación de heterodímeros HC1-HC2. La tecnología de botón en ojal se describe en detalle en Ridgway JB, Presta LG, Carter P (1996) 'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. *Protein Eng* 9:617-621. En la tecnología botón en ojal, se introducen grandes cadenas laterales de aminoácidos en el dominio CH3 de una cadena pesada que encaja en una cavidad diseñada adecuadamente en el dominio CH3 de la otra cadena pesada.

15 En la presente invención, la expresión de una cadena ligera optimizada (que complementa funcionalmente ambas cadenas pesadas) junto con HC1 y HC2 en la misma célula conduce al ensamblaje directo de un anticuerpo biespecífico.

20 Si el anticuerpo único del anticuerpo precursor marcado, el dominio variable HC del anticuerpo precursor se evoluciona (mediante cualquier procedimiento de evolución, tales como los descritos en el presente documento) para unirse a una segunda (o más) dianas. Una de las nuevas, HC evolucionadas se puede combinar después con una de las HC originales del anticuerpo precursor y una LC original del anticuerpo precursor para formar un anticuerpo H2L de la presente invención.

25 Las IgG de longitud completa también se pueden convertir en fragmentos más pequeños (por ejemplo, omitiendo CH2 o produciendo F(ab')₂) para determinadas aplicaciones donde es importante una alta penetración en el tejido y/o una semivida más corta.

30 En otro aspecto, la invención se refiere a anticuerpos multifuncionales y fragmentos de unión a antígeno, como se describe en el presente documento, que se modifican mediante la unión covalente de un resto orgánico. Dicha modificación puede producir un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno con propiedades farmacocinéticas mejoradas (por ejemplo, aumento de la semivida en suero *in vivo*). El resto orgánico puede ser un grupo polimérico hidrófilo lineal o ramificado, grupo de ácidos grasos o grupo de ésteres de ácidos grasos. En realizaciones
35 particulares, el grupo polimérico hidrófilo puede tener un peso molecular de aproximadamente 800 a aproximadamente 120.000 Daltons y puede ser un polialquilenglicol (por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol (PPG)), polímero de carbohidratos, polímero de aminoácidos o polivinilpirrolidona, y el grupo de ácidos grasos o éster de ácidos grasos puede comprender de aproximadamente ocho a aproximadamente cuarenta átomos de carbono.

40 Los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno multifuncionales modificados de la invención pueden comprender uno o más restos orgánicos que están unidos covalentemente, directa o indirectamente, al anticuerpo. Cada resto orgánico que está unido a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención puede ser independientemente un grupo polimérico hidrófilo, un grupo de ácidos grasos o un grupo de ésteres de ácidos
45 grasos. Como se usa en el presente documento, la expresión "ácido graso" abarca ácidos monocarboxílicos y ácidos dicarboxílicos. Un "grupo polimérico hidrófilo", como se usa el término en el presente documento, se refiere a un polímero orgánico que es más soluble en agua que en octano. Por ejemplo, la polilisina es más soluble en agua que en octano. Por lo tanto, la invención abarca un anticuerpo modificado por la unión covalente de polilisina. Los polímeros hidrófilos adecuados para modificar anticuerpos de la invención pueden ser lineales o ramificados e
50 incluyen, por ejemplo, polialcanoglicoles (p.ej., PEG, monometoxi polietilenglicol (mPEG), PPG y similares), carbohidratos (p.ej., dextrano, celulosa, oligosacáridos, polisacáridos y similares), polímeros de aminoácidos hidrófilos (p.ej., polilisina, poliarginina, poliaspartato y similares), óxidos de polialcanos (p.ej., óxido de polietileno, óxido de polipropileno y similares) y polivinilpirrolidona. Preferentemente, el polímero hidrófilo que modifica el anticuerpo de la invención tiene un peso molecular de aproximadamente 800 a aproximadamente 150.000 Daltons
55 como una entidad molecular separada. Por ejemplo, se pueden usar, PEG_{5.000} and PEG_{20.000}, en donde el subíndice es el peso molecular promedio del polímero en Daltons. El grupo polimérico hidrófilo puede estar sustituido con uno a aproximadamente seis grupos alquilo, grupos de ácidos grasos o de ésteres de ácidos grasos. Los polímeros hidrófilos que están sustituidos con un grupo de ácidos grasos o de ésteres de ácidos grasos se pueden preparar empleando procedimientos adecuados. Por ejemplo, un polímero que comprende un grupo amino puede acoplarse a
60 un carboxilato del ácido graso o éster de ácido graso, y un carboxilato activado (p. ej., activado con N, N-carbonil diimidazol) sobre un ácido graso o éster de ácido graso puede acoplarse a un grupo hidroxilo sobre un polímero.

65 Los ácidos grasos y los ésteres de ácidos grasos adecuados para modificar los anticuerpos multifuncionales de la invención pueden ser saturados o pueden contener una o más unidades de insaturación. Los ácidos grasos que son adecuados para modificar anticuerpos de la invención incluyen, por ejemplo, n-dodecanoato (C₁₂, laurato), n-tetradecanoato (C₁₄, miristato), n-octadecanoato (C₁₈, estearato), n-eicosanoato (C₂₀, araquidato), n-docosanoato

(C₂₂, behenato), n-triacontanoato (C₃₀), n-tetracontanoato (C₄₀), cis- δ 9-octadecanoato (C₁₈, oleato), todos los cis- δ 5,8,11,14-eicosatetranoato (C₂₀, araquidonato), ácido octanodioico, ácido tetradecanodioico, ácido octadecanodioico, ácido docosanodioico y similares. Los ésteres de ácidos grasos adecuados incluyen monoésteres de ácidos dicarboxílicos que comprenden un grupo alquilo inferior lineal o ramificado. El grupo alquilo inferior puede comprender de uno a aproximadamente doce, preferentemente de uno a aproximadamente seis, átomos de carbono.

Los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno multifuncionales modificados pueden prepararse usando procedimientos adecuados, como por reacción con uno o más agentes modificadores. Un "agente modificador" como la expresión se usa en el presente documento, se refiere a un grupo orgánico adecuado (por ejemplo, polímero hidrófilo, un ácido graso, un éster de ácido graso) que comprende un grupo activador. Un "grupo activador" es un resto químico o grupo funcional que puede, en las condiciones adecuadas, reaccionar con un segundo grupo químico formando así un enlace covalente entre el agente modificador y el segundo grupo químico. Por ejemplo, los grupos activadores reactivos con aminas incluyen grupos electrófilos tales como tosilato, mesilato, halo (cloro, bromo, flúor, yodo), ésteres de N-hidroxisuccinimidilo (NHS) y similares. Los grupos activadores que pueden reaccionar con los tioles incluyen, por ejemplo, maleimida, yodoacetilo, acrilolilo, disulfuros de piridilo, tiol del ácido 5-tiol-2-nitrobenzoico (TNB-tiol) y similares. Un grupo funcional aldehído se puede acoplar a moléculas que contienen amina o hidrazida, y un grupo azida puede reaccionar con un grupo fósforo trivalente para formar enlaces fosforamido o fosforimida. Los procedimientos adecuados para introducir grupos activadores en moléculas son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, Calif. (1996)). Un grupo activador puede unirse directamente al grupo orgánico (por ejemplo, polímero hidrófilo, ácido graso, éster de ácido graso), o a través de un resto enlazador, por ejemplo, un grupo divalente C₁-C₁₂ en el que uno o más átomos de carbono pueden reemplazarse por un heteroátomo tal como oxígeno, nitrógeno o azufre. Los restos enlazadores adecuados incluyen, por ejemplo, tetraetilenglicol, --(CH₂)₃-- , --NH--(CH₂)₆--NH--, --(CH₂)₂--NH-- y --CH₂--O-- CH₂--CH₂--O--CH₂--CH₂--O--CH--NH--. Los agentes modificadores que comprenden un resto enlazador pueden producirse, por ejemplo, haciendo reaccionar una mono-Boc-alquildiamina (por ejemplo, mono-Boc-etilendiamina, mono-Boc-diaminohexano) con un ácido graso en presencia de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) para formar un enlace amida entre la amina libre y el carboxilato de ácido graso. El grupo protector Boc puede eliminarse del producto mediante tratamiento con ácido trifluoroacético (TFA) para exponer una amina primaria que puede acoplarse a otro carboxilato como se describe, o puede hacerse reaccionar con anhídrido maleico y el producto resultante ciclado para producir un maleimido activado derivado del ácido graso. (Véase, por ejemplo, Thompson, et al., documento WO 92/16221)

Los anticuerpos multifuncionales modificados de la invención pueden producirse haciendo reaccionar un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno multifuncional con un agente modificador. Por ejemplo, los restos orgánicos se pueden unir al anticuerpo de una manera no específica del sitio empleando un agente modificador reactivo con amina, por ejemplo, un éster NHS de PEG. Los anticuerpos o los fragmentos de unión a antígeno multifuncionales modificados también se pueden preparar reduciendo los enlaces disulfuro (por ejemplo, enlaces disulfuro intracatenarios) de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno reducido puede hacerse reaccionar después con un agente modificador reactivo con tiol para producir el anticuerpo multifuncional modificado de la invención. Los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno multifuncionales modificados que comprenden un resto orgánico que está unido a sitios específicos de un anticuerpo multifuncional de la presente invención se pueden preparar usando procedimientos adecuados, tales como proteólisis inversa (Fisch et al., *Bioconjugate Chem.*, 3:147-153 (1992); Werlen et al., *Bioconjugate Chem.*, 5:411-417 (1994); Kumaran et al., *Protein Sci.* 6(10):2233-2241 (1997); Itoh et al., *Bioorg. Chem.*, 24(1): 59-68 (1996); Capellas et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 56(4):456-463 (1997)), y los procedimientos descritos en Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, Calif. (1996).

Los anticuerpos multifuncionales de la presente invención pueden usarse para diagnóstico y terapia. A modo de ilustración y no de limitación, los anticuerpos multifuncionales se pueden usar para tratar cáncer, enfermedades autoinmunitarias o las infecciones víricas. Para el tratamiento del cáncer, los anticuerpos multifuncionales se unirán generalmente a un antígeno expresado preferentemente en las células cancerosas, tal como erbB-2, CEA, CD33 y muchos otros antígenos bien conocidos por los expertos en la materia. Para el tratamiento de enfermedad autoinmunitaria, los anticuerpos se unirán generalmente a un antígeno expresado sobre linfocitos T, tales como CD4, el receptor de IL-2, los diversos receptores de antígeno de linfocitos T y muchos otros antígenos bien conocidos por los expertos en la materia (p.ej, véase *Fundamental Immunology*, 2ª ed., W. E. Paul, ed., Raven Press: Nueva York, N.Y.). Para el tratamiento de infecciones víricas, los anticuerpos se unirán generalmente a un antígeno expresado en células infectadas por un virus en particular, tal como las diversas glucoproteínas (p. ej., gB, gD, gE) del virus del herpes simple y el citomegalovirus, y muchos otros antígenos bien conocidos por los expertos en la materia (p.ej, véase *Virology*, 2ª ed., B. N. Fields et al., eds., (1990), Raven Press: Nueva York, N.Y.).

Los anticuerpos multifuncionales de la presente invención pueden usarse para tratar enfermedades del sistema nervioso central. Se han descrito anticuerpos biespecíficos que cruzan la barrera hematoencefálica y se unen a las proteínas cerebrales, potencialmente para terapia (Yu YJ, et al, "Boosting brain uptake of a therapeutic antibody by reducing its affinity for a transcytosis target", *Sci Transl Med* 2011 May 25;3(84):84ra44). Los procedimientos de la presente invención son particularmente útiles para fabricar tales anticuerpos.

Los procedimientos de la presente invención pueden usarse para crear proteínas condicionalmente activas como se describe en la solicitud de patente pendiente PCT/US10/26611, titulada "Mirac Proteins". Las proteínas condicionalmente activas son proteínas biológicas, en particular proteínas terapéuticas, y que se inactivan de forma reversible o irreversible en condiciones fisiológicas normales a tipo silvestre. Por ejemplo, las proteínas condicionalmente activas son prácticamente inactivas a temperatura corporal, pero son activas a temperaturas más bajas. Las proteínas condicionalmente activas son potencialmente útiles para tratar una variedad de enfermedades, como se describe. En los procedimientos de la presente invención, se identifican anticuerpos multiespecíficos que son proteínas condicionalmente activas. Estos anticuerpos multiespecíficos que son condicionalmente activos pueden modificarse adicionalmente con restos orgánicos, creando anticuerpos conjugados, condicionalmente activos y multiespecíficos.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos de la presente invención son útiles para administración parenteral, es decir, subcutánea, intramuscular o intravenosa. Las composiciones para administración parenteral comprenderán comúnmente una solución del anticuerpo o un cóctel del mismo disuelto en un vehículo aceptable, preferentemente un vehículo acuoso. Se puede usar una variedad de vehículos acuosos, p. ej., agua, agua tamponada, solución salina al 0,4%, glicina al 0,3% y similares. Estas soluciones son estériles y están generalmente libres de materia particular. Estas composición pueden esterilizarse por técnicas convencionales de esterilización bien conocidas. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables tal como se requiere para aproximar las condiciones fisiológicas tal como el ajuste del pH y los agentes tamponantes, agentes de ajuste de la toxicidad, y similares, por ejemplo, acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, lactato de sodio, etc. La concentración de los anticuerpos mutantes en estas formulaciones puede variar ampliamente, es decir, desde menos de aproximadamente el 0,01%, generalmente al menos aproximadamente el 0,1% hasta tanto como el 5% en peso y se seleccionará principalmente en función de los volúmenes de fluidos, viscosidades, etc., de acuerdo con el modo particular de administración seleccionado.

Por lo tanto, una composición farmacéutica determinada para inyección intramuscular podría estar compuesta para contener 1 ml de agua tamponada estéril y aproximadamente 1 mg de anticuerpo mutante. Una composición determinada para infusión intravenosa puede estar compuesta para contener 250 ml de solución estéril de Ringer y 10 mg de anticuerpo mutante. Los procedimientos reales de preparación de composiciones administrables por vía parenteral serán conocidas o evidentes para los expertos en la materia y se describen en más detalle en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science, 20.^a Ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (2000).

Los beneficios de esta invención se extienden a "aplicaciones industriales" (o procedimientos industriales), término que se usa para incluir aplicaciones en la industria comercial propiamente dicha (o simplemente industria) así como aplicaciones industriales no comerciales (por ejemplo, institución para la investigación biomédica sin ánimo de lucro). Las aplicaciones relevantes incluyen aquellas en áreas de diagnóstico, medicina, agricultura, fabricación y académicas.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción de un anticuerpo multiespecífico a partir de un anticuerpo que se une al antígeno 1 que comprende la cadena ligera LC1 y la cadena pesada HC1 y otro anticuerpo que se une a un antígeno 2 diferente que comprende la cadena ligera LC2 y la cadena pesada HC2, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
- (a) identificar una región de anticuerpo variable de cadena ligera única de inmunoglobulina que complementa funcionalmente las regiones de anticuerpo variables de cadena pesada de inmunoglobulina de dichas cadenas pesadas HC1 y HC2 mediante:
- (i) el cribado de una biblioteca de anticuerpos generada coexpresando la región de anticuerpo variable de cadena pesada de inmunoglobulina de la cadena pesada HC1 y una biblioteca de LC1 humanas generadas evolucionando las cadenas ligeras LC1 para anticuerpos que se unen al antígeno 1;
- (ii) el cribado de otra biblioteca de anticuerpos generada coexpresando la región de anticuerpo variable de cadena pesada de inmunoglobulina de la cadena pesada HC2 y una biblioteca de LC2 humanas generadas evolucionando las cadenas ligeras LC2 para anticuerpos que se unen al antígeno 2;
- (iii) seleccionando un anticuerpo mediante:
- (1) la expresión de forma conjunta las cadenas ligeras de los anticuerpos de la etapa (i) que se unen al antígeno 1 con la región de anticuerpo variable de cadena pesada de inmunoglobulina de la cadena pesada HC2 y seleccionando un anticuerpo que se une al antígeno 2, o
- (2) la expresión de forma conjunta las cadenas ligeras de los anticuerpos de la etapa (ii) que se unen al antígeno 2 con la región de anticuerpo variable de cadena pesada de inmunoglobulina de la cadena pesada HC1 y seleccionando un anticuerpo que se une al antígeno 1,
- en el que la región variable de cadena ligera del anticuerpo seleccionado en la etapa (1) o (2) es la región variable de cadena ligera de inmunoglobulina que complementa funcionalmente las dos regiones de anticuerpo variables de cadena pesada de inmunoglobulina diferentes de las cadenas pesadas HC1 y HC2;
- (b) clonar las dos regiones de anticuerpo variables de cadena pesada de inmunoglobulina diferentes de las cadenas pesadas HC1 y HC2 en marco con un dominio constante de IgG que tiene su región Fc modificada para dar como resultado que la región Fc forme heterodímeros; y
- (c) expresar conjuntamente la región de anticuerpo variable de cadena ligera de inmunoglobulina seleccionada en la etapa (a) con las dos regiones de anticuerpo variables de cadena pesada de inmunoglobulina diferentes de las cadenas pesadas HC1 y HC2 en una célula huésped para producir el anticuerpo multiespecífico.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la modificación en la etapa (b) es la introducción de una cadena lateral de aminoácidos en un dominio CH3 de una de dichas cadenas pesadas de inmunoglobulina que encaja en una cavidad diseñada adecuadamente en el dominio CH3 de la otra cadena pesada de inmunoglobulina.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además una etapa adicional de hacer evolucionar la cadena ligera o cualquier cadena pesada de la etapa (c) para mejorar una o más características del anticuerpo multiespecífico, en el que la una o más características se seleccionan de la constante de equilibrio de disociación K_D , estabilidad, temperatura de fusión T_m , punto isoeléctrico pI, solubilidad, nivel de expresión, inmunogenicidad y función efectora.
4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la etapa de evolución adicional comprende una de evolución de posición completa; evolución de inserción de posición completa; evolución de delección de posición completa; evolución de posición completa seguida por síntesis combinatoria de proteínas; evolución de delección de posición completa seguida de síntesis combinatoria de proteínas; o evolución de delección de posición completa seguida de síntesis combinatoria de proteínas.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además una etapa de conjugar el anticuerpo multiespecífico con un resto orgánico para generar un anticuerpo conjugado multiespecífico.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las cadenas ligeras en la biblioteca de LC1 y en la biblioteca de LC2 se hacen evolucionar usando una técnica de mutagénesis seleccionada de evolución de posición completa, síntesis de proteínas combinatoria, evolución de inserción de composición, evolución de delección de posición completa y combinaciones de las mismas.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la célula huésped es una línea de células huésped eucariotas seleccionada de células de fibroblastos de ratón 3T3; células de fibroblastos de hámster Sirio BHK21; MDCK, células epiteliales de perro; células epiteliales humanas Hela; células epiteliales de rata canguro PtK1; células plasmáticas de ratón SP2/0; y células plasmáticas de ratón NS0; células de riñón embrionario humano HEK 293; células de riñón de mono COS; células de ovario de hámster chino CHO, CHO-S; células embrionarias de ratón R1; células

embrionarias de ratón E14.1; células embrionarias humanas H1; células embrionarias humanas H9; células embrionarias humanas PER C.6; células de levadura *S. cerevisiae*; y células de levadura *picchia*.

- 5 8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la célula huésped es una célula huésped procariota.
9. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además una etapa de fabricación del anticuerpo multiespecífico.
- 10 10. El procedimiento de la reivindicación 6, que comprende además una etapa de hacer evolucionar un anticuerpo monoclonal terapéutico para proporcionar las cadenas ligeras en la biblioteca de LC1 o en la biblioteca de LC2.
- 15 11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que la etapa de hacer evolucionar comprende una técnica de mutagénesis seleccionada de evolución de posición completa, evolución de inserción de posición de composición completa, evolución de delección de posición completa, evolución de posición completa seguida por síntesis combinatoria de proteínas, evolución de inserción de posición de composición completa seguida de síntesis combinatoria de proteínas y evolución de delección de posición completa seguida de síntesis combinatoria de proteínas.

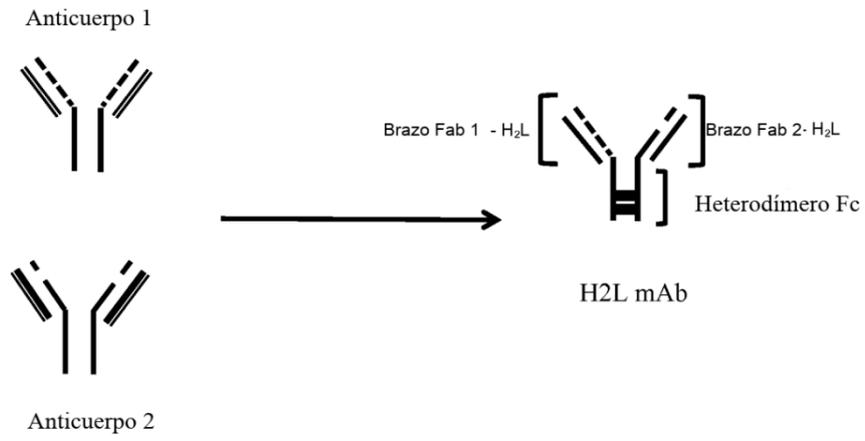


FIGURA 1

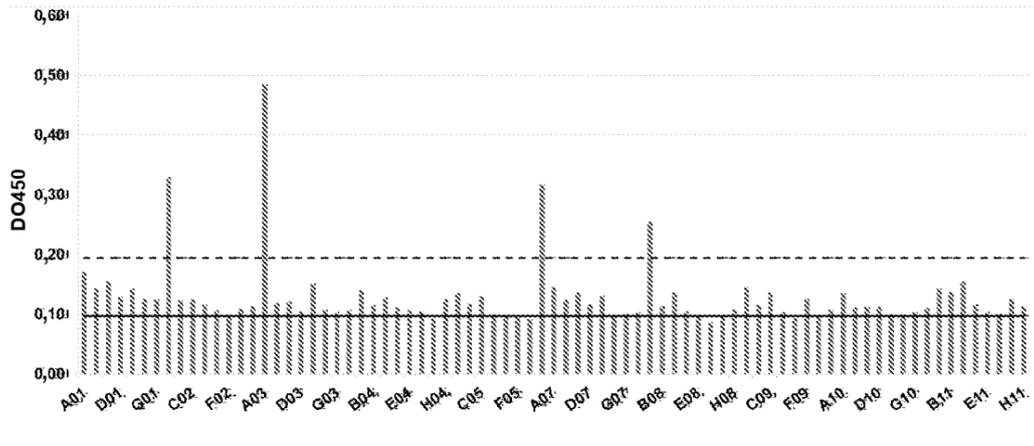


FIGURA 2

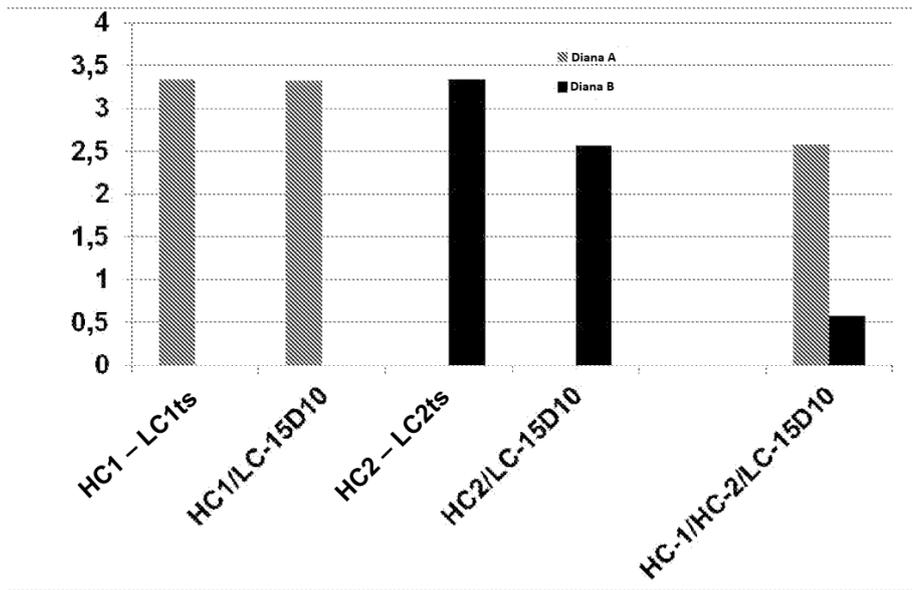


FIGURA 3