(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 793 348**

(51) Int. Cl.:

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 5/07 (2010.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA TRAS OPOSICIÓN T5

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.08.2010 PCT/US2010/044795**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **17.02.2011 WO11019619**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.08.2010 E 10745064 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **15.01.2025 EP 2464725**

(54) Título: **Producción de proteínas en medios de cultivo celular libres de glutamina**

(30) Prioridad:

11.08.2009 US 232889 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente modificada:
11.04.2025

(73) Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.00%)
Grenzacherstraße 124
4070 Basel, CH

(72) Inventor/es:

GAWLITZEK, MARTIN;
PETRAGLIA, CHRISTINA, TERESA y
LUO, SHUN

(74) Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 793 348 T5

DESCRIPCIÓN

Producción de proteínas en medios de cultivo celular libres de glutamina

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere, en general, a medios de cultivo celular libres de glutamina. La invención se refiere además a la producción de proteínas recombinantes, tales como anticuerpos, en un cultivo de células de mamífero libre de glutamina.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Las células de mamífero se han convertido en el sistema dominante para la producción de proteínas de mamífero para aplicaciones clínicas, principalmente debido a su capacidad de producir proteínas heterólogas plegadas y ensambladas apropiadamente, y su capacidad para modificaciones postraduccionales. Es convencional tener glutamina en los medios de cultivo celular durante la producción recombinante de proteínas heterólogas, incluyendo anticuerpos. L-glutamina es un aminoácido esencial que se considera la principal fuente de energía y nitrógeno para las células en cultivo. La mayoría de los medios disponibles comercialmente se formulan con L-glutamina libre, que se incluye en la fórmula basal o bien se añade a formulaciones de medios líquidos en el momento de su uso. Por tanto, todos los medios de cultivo de células de mamífero contienen glutamina, excepto aquellos para las líneas celulares transfectadas con glutamina sintasa, tales como las líneas de células GS-NS0 y GS-CHO, donde las células por sí mismas producen la glutamina necesaria para el crecimiento. Se usa ampliamente glutamina a diversas concentraciones, típicamente de 1 a 20 mM en medios de base, y concentración mucho mayor en las sustancias de alimentación para el procedimiento por lotes alimentados. Por ejemplo, la concentración de L-glutamina es de 0,5 mM en medio de Ames y de 10 mM en medio MCDP 131. A menudo se usa DMEM/mezcla de nutrientes de Ham F-12 (50:50) como una formulación de partida para los medios patentados usados con células de ovario de hámster chino (CHO). L-glutamina en DMEM/mezcla de nutrientes de Ham F-12 es 2,5 mM. La concentración de L-glutamina en medio de hibridoma libre de suero/libre de proteínas es de 2,7 mM. L-glutamina en medio DMEM, GMEM, IMDM y H-Y es 4 mM, usándose a menudo IMDM como una formulación de partida para los medios de cultivo de células de hibridoma patentados. En general, se sostiene que las células de hibridoma crecen mejor en concentraciones de L-glutamina que estén por encima de los niveles promedio hallados en los medios. (Dennis R. Conrad, Glutamine in Cell Culture, Sigma-Aldrich Media Expert)

Se demostró que la glutamina es la principal fuente de amoníaco acumulado en el cultivo celular (véase, la revisión por Markus Schneider, *et. al.*, 1996, Journal of Biotechnology 46:161-185). Por tanto, la disminución de glutamina en los medios de cultivo celular redujo significativamente la acumulación del nivel de NH_4^+, dando como resultado una menor citotoxicidad (véase Markus Schneider, *et al.*, 1996, *supra*). La citotoxicidad de NH_4^+ reducido dio como resultado una mayor viabilidad celular, por tanto, una longevidad del cultivo prolongada. En base a un estudio sobre el consumo estimado de glutamina usando células CHO, se sugirió que las células podían consumir glutamina a una tasa de 0,3-0,4 mM por día (Miller, *et al.*, 1988, Biotechnol. Bioeng. 32:947-965). Altamirano *et al.*, (2001, J. Biotechnol. 110:171-9) estudiaron el efecto del reemplazo de glutamina por glutamato y el equilibrio entre glutamato y el metabolismo de la glucosa sobre la redistribución de las células CHO que producen el activador tisular del plasminógeno humano recombinante (rhut-PA). Cuando se reemplazó glutamina por glutamato y se equilibró con el catabolismo de la glucosa (proporción de carbono y nitrógeno, proporción C/N), se halló que el metabolismo celular se redistribuía y obligaba a que se utilizara la fuente de carbono y de energía más favorablemente para la producción de rhut-PA. También se informó de que las células CHO en cultivos adheridos pueden crecer en ausencia de glutamina añadida debido a la actividad glutamina sintasa endógena que permitió que las células sintetizaran glutamina a partir de ácido glutámico en el medio (Sanfeliu y Stephanopoulos, 1999, Biotechnol. Bioeng. 64:46-53). Sin embargo, en comparación con los cultivos de control en medios que contenían glutamina, la tasa de crecimiento celular en medios libres de glutamina fue más lenta con una fracción incrementada de células distribuidas en la fase G0/G1. La disminución de tanto glutamina como ácido glutámico provocó la muerte celular.

El documento WO2005/083058 divulga un procedimiento para cultivar células en un medio de cultivo celular que comprende de 700 mg/l a 1000 mg/l de asparagina que está libre de componentes derivados de suero animal.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La presente divulgación se basa, al menos en parte, en el hallazgo inesperado de que no solo se pueden producir proteínas recombinantes en una célula huésped de mamífero usando un medio de producción libre de glutamina sin ningún efecto adverso significativo, de hecho, el uso de un medio libre de glutamina en la fase de producción incrementa significativamente la viabilidad celular, la longevidad del cultivo, la productividad específica y/o el valor de proteínas recombinantes final.

La presente divulgación también se basa en el hallazgo inesperado de que la adición de asparagina a un medio de producción libre de glutamina puede potenciar además la viabilidad celular, la longevidad del cultivo, la

productividad específica y/o el valor de proteínas recombinantes final en una célula huésped de mamífero usando un medio de producción libre de glutamina sin ningún efecto adverso significativo.

La materia objeto de la invención se expone en las reivindicaciones adjuntas.

En un aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para producir un polipéptido en una célula de ovario de hámster chino (CHO) que expresa dicho polipéptido, en el que el polipéptido se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos, fragmentos de anticuerpo e inmunoadhesinas, comprendiendo dicho procedimiento cultivar la célula huésped de mamífero durante la fase de producción del cultivo en un medio de cultivo de producción inicialmente libre de glutamina complementado con asparagina 10 mM.

En todos los modos de realización, la célula es una célula de ovario de hámster chino (CHO).

En otro modo de realización, la célula es una célula CHO dhfr$^-$.

Aún en otro modo de realización, el medio de producción está libre de suero.

En otro modo de realización, el medio de cultivo de producción comprende uno o más ingredientes seleccionados del grupo que consiste en

1) una fuente de energía;

2) aminoácidos esenciales;

3) vitaminas;

4) ácidos grasos libres; y

5) oligoelementos.

Todavía en otro modo de realización, en el que el medio de cultivo de producción comprende adicionalmente uno o más ingredientes seleccionados del grupo que consiste en:

1) hormonas y otros factores de crecimiento;

2) sales y tampones; y

3) nucleósidos.

En todos los modos de realización, la fase de producción, por ejemplo, puede ser una fase de cultivo por lotes o por lotes alimentados.

En todos los modos de realización, el procedimiento puede comprender además la etapa de aislar dicho polipéptido.

En otro modo de realización, el aislamiento puede estar seguido de la determinación de uno o más viabilidad celular, longevidad del cultivo, productividad específica y valor de proteínas recombinantes final tras el aislamiento.

Todavía en otro modo de realización, se incrementa al menos uno de la viabilidad celular, longevidad del cultivo, productividad específica y valor de proteínas recombinantes final en relación con el mismo polipéptido producido en un medio de producción que contiene glutamina de la misma composición.

En todos los modos de realización, el polipéptido se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos, fragmentos de anticuerpo e inmunoadhesinas.

En todos los modos de realización, el polipéptido, por ejemplo, puede ser un anticuerpo o un fragmento biológicamente funcional de un anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo representativos incluyen Fab, Fab', $F(ab')_2$, scFv, $(scFv)_2$, dAb, fragmentos de la región determinante de la complementariedad (CDR), anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo monocatenario, minicuerpos, diacuerpos y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

Todavía en otro modo de realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo es quimérico, humanizado o humano.

Los anticuerpos terapéuticos incluyen, sin limitación, anticuerpos anti-HER2; anticuerpos anti-CD20; anticuerpos anti-IL-8; anticuerpos anti-VEGF; anticuerpos anti-CD40, anticuerpos anti-CD11a; anticuerpos anti-CD18; anticuerpos anti-IgE; anticuerpos anti-receptor de Apo-2; anticuerpos anti-factor tisular (TF); anticuerpos anti-

integrina $\alpha_4\beta_7$ humana; anticuerpos anti-EGFR; anticuerpos anti-CD3; anticuerpos anti-CD25; anticuerpos anti-CD4; anticuerpos anti-CD52; anticuerpos anti-receptor de Fc; anticuerpos anti-antígeno carcinoembrionario (CEA); anticuerpos dirigidos frente a células epiteliales de mama; anticuerpos que se unen a células de carcinoma de colon; anticuerpos anti-CD38; anticuerpos anti-CD33; anticuerpos anti-CD22; anticuerpos anti-EpCAM; anticuerpos anti-GpIIb/IIIa; anticuerpos anti-RSV; anticuerpos anti-CMV; anticuerpos anti-VIH; anticuerpos antihepatitis; anticuerpos anti-CA 125; anticuerpos anti-$\alpha v\beta 3$; anticuerpos anti-carcinoma de células renales humano; anticuerpos anti-17-1A humano; anticuerpos anti-tumor colorrectal humano; anticuerpo anti-melanoma humano R24 dirigido frente a ganglíosido GD3; anticuerpos anti-carcinoma de células escamosas humano; y anticuerpos anti-antígeno leucocitario humano (HLA) y anticuerpos anti-HLA DR.

En otros modos de realización, el anticuerpo terapéutico es un anticuerpo que se une a un receptor HER, VEGF, IgE, CD20, CD11a, CD40 o DR5.

En otros modos de realización, el anticuerpo terapéutico es un anticuerpo anti-BR3 o inmunoadhesina BR3-Fc.

En todos los modos de realización, la célula huésped recombinante es una célula de ovario de hámster chino (CHO).

Estos y otros aspectos serán evidentes a partir de la descripción a continuación, incluyendo los ejemplos y las reivindicaciones adjuntas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Análisis según la gráfica de cubos para anticuerpos Apomab de los resultados de los valores de un diseño de experimento (DOE) factorial completo que evalúa el efecto de diferentes concentraciones de glutamina, glutamato, asparagina y aspartato. El modelo predice que se logra el valor más alto en medios libres de glutamina complementados con asparagina 10 mM, ácido aspártico 10 mM y ácido glutámico 1 mM.

Figura 2. Análisis según la gráfica de cubos para inmunoadhesinas BR3-Fc de los resultados de los valores de un DOE factorial completo que evalúa el efecto de diferentes concentraciones de glutamina, glutamato, asparagina y aspartato. El modelo predice que se logra el valor más alto en medios libres de glutamina complementados con asparagina 10 mM, ácido aspártico 10 mM y ácido glutámico 1 mM.

Figura 3. Análisis según la gráfica de cubos para anticuerpos anti-VEGF de los resultados de los valores de un DOE factorial completo que evalúa el efecto de diferentes concentraciones de glutamina, glutamato, asparagina y aspartato. El modelo predice que se logra el valor más alto en medios libres de glutamina complementados con asparagina 10 mM, ácido aspártico 10 mM y ácido glutámico 1 mM.

Figura 4. Efecto de la asparagina en condiciones libres de glutamina, con bajo contenido de glutamato y con alto contenido de aspartato sobre el valor de anticuerpos Apomab. En medio libre de glutamina, se incrementó significativamente el valor de anticuerpos Apomab en presencia de asparagina 2,5-15 mM en comparación con los cultivos libres de glutamina sin asparagina. En estas condiciones, la presencia o ausencia de glutamato no tuvo ningún efecto sobre el valor.

Figura 5. Producción de valores de anticuerpos Apomab en diversas concentraciones de asparagina y aspartato en condiciones libres de glutamina y con bajo contenido de glutamato. Se observó un efecto de valoración positivo cuando se incrementó el aspartato de 0 a 10 mM en estas condiciones.

Figuras 6. A-C. Efecto del medio libre de glutamina complementado con asparagina 10 mM, ácido aspártico 10 mM y ácido glutámico 1 mM sobre el valor. El valor final para el anticuerpo Apomab, el anticuerpo anti-VEGF y la inmunoadhesina BR3-Fc fue significativamente mayor en medio libre de glutamina en comparación con el medio que contenía glutamina.

Figuras 7 A y B. Efecto del medio libre de glutamina DMEM/F12 complementado con asparagina 10 mM, ácido aspártico 10 mM y ácido glutámico 1 mM sobre el valor. El valor final para el anticuerpo Apomab y el anticuerpo anti-VEGF fue significativamente mayor en medio DMEM/F12 libre de glutamina en comparación con el medio DMEM/F12 que contenía glutamina.

Figuras 8 A-C. Efecto del medio libre de glutamina complementado con asparagina 10 mM, ácido aspártico 10 mM y ácido glutámico 1 mM sobre la productividad específica celular (Qp). La productividad específica celular para el anticuerpo Apomab, el anticuerpo anti-VEGF y la inmunoadhesina BR3-Fc fue significativamente mayor en medio libre de glutamina en comparación con el medio que contenía glutamina.

Figuras 9 A y B. Efecto del medio libre de glutamina DMEM/F12 complementado con asparagina 10 mM, ácido aspártico 10 mM y ácido glutámico 1 mM sobre la productividad específica celular (Qp). La productividad específica celular para el anticuerpo Apomab y el anticuerpo anti-VEGF fue significativamente mayor en medio DMEM/F12

libre de glutamina en comparación con el medio DMEM/F12 que contenía glutamina.

Figuras 10 A-C. Efecto del medio libre de glutamina complementado con asparagina 10 mM, ácido aspártico 10 mM y ácido glutámico 1 mM sobre la viabilidad celular. La viabilidad celular para el anticuerpo Apomab, el anticuerpo anti-VEGF y la inmunoadhesina BR3-Fc fue mayor en medio libre de glutamina en comparación con el medio que contenía glutamina.

Figuras 11 A y B. Efecto del medio libre de glutamina DMEM/F12 complementado con asparagina 10 mM, ácido aspártico 10 mM y ácido glutámico 1 mM sobre la viabilidad celular. En medio DMEM/F12, la viabilidad celular no se mejoró de forma consistente en medio libre de glutamina. La viabilidad fue mayor para el anticuerpo Apomab, pero menor para el anticuerpo anti-VEGF en comparación con el medio que contenía glutamina.

Figuras 12 A-C. Efecto del medio libre de glutamina complementado con asparagina 10 mM, ácido aspártico 10 mM y ácido glutámico 1 mM sobre la formación de amoníaco. El amoníaco fue normalmente menor en los cultivos libres de glutamina en comparación con los cultivos que contenían glutamina.

Figuras 13 A y B. Efecto del medio libre de glutamina DMEM/F12 complementado con asparagina 10 mM, ácido aspártico 10 mM y ácido glutámico 1 mM sobre la formación de amoníaco. El amoníaco se redujo significativamente en medio DMEM/F12 libre de glutamina en comparación con el medio DMEM/F12 que contenía glutamina.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

A. Definiciones

Los términos "medio de cultivo celular", "medio de cultivo" y "mezcla de nutrientes" se refieren a una solución de nutrientes usada para cultivar células de mamífero que típicamente proporciona al menos un componente de una o más de las siguientes categorías:

1) una fuente de energía, normalmente en forma de un glúcido tal como glucosa;

2) algunos o todos los aminoácidos esenciales, y normalmente el conjunto básico de veinte aminoácidos más cistina;

3) vitaminas y/u otros compuestos orgánicos típicamente requeridos a bajas concentraciones;

4) ácidos grasos libres; y

5) oligoelementos, donde los oligoelementos se definen como compuestos inorgánicos o elementos naturales que típicamente se requieren a concentraciones muy bajas, normalmente en el intervalo micromolar.

La mezcla de nutrientes se puede complementar opcionalmente con uno o más componentes de cualquiera de las siguientes categorías:

1) hormonas y otros factores de crecimiento como, por ejemplo, insulina, transferrina y factor de crecimiento epidérmico;

2) sales y tampones como, por ejemplo, calcio, magnesio y fosfato; y

3) nucleósidos tales como, por ejemplo, adenosina y timidina.

El medio de cultivo celular está, en general, "libre de suero" cuando el medio está esencialmente libre de suero de cualquier fuente de mamífero (por ejemplo, suero fetal bovino (FBS)). Por "esencialmente libre" se entiende que el medio de cultivo celular comprende entre aproximadamente un 0-5 % de suero, preferentemente entre aproximadamente un 0-1 % de suero, y lo más preferentemente entre aproximadamente un 0-0,1 % de suero. De forma ventajosa, se puede usar medio "definido" libre de suero, en el que se conozca la identidad y concentración de cada uno de los componentes en el medio (es decir, un componente indefinido, tal como extracto hipofisario bovino (BPE), no está presente en el medio de cultivo).

En el contexto de la presente invención, las expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se usan de manera intercambiable, y todas las designaciones de este tipo incluyen la descendencia. Por tanto, las palabras "transformantes" y "células (huésped) transformadas" incluyen la célula objeto primaria y los cultivos derivados de la misma, sin tener en cuenta el número de transferencias. También se entiende que toda la descendencia puede que no sea precisamente idéntica en contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o accidentales. Se incluye la descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la cribada en la célula transformada originalmente. Si se pretenden designaciones distintas, esto quedará claro a partir del contexto.

El término "célula huésped animal", "célula animal", "célula huésped recombinante animal" y similares, engloba células de invertebrado, vertebrado no mamífero (por ejemplo, aves, reptiles y anfibios) y de mamífero. Los ejemplos de células de invertebrado incluyen las siguientes células de insecto: *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y gusano de seda. Véanse, por ejemplo, Luckow *et al.*, Bio/Technology, 6:47-55 (1988); Miller *et al.*, en Genetic Engineering, Setlow, J. K. *et al.*, eds., vol. 8 (Plenum Publishing, 1986), pp. 277-279; y Maeda *et al.*, Nature, 315:592-594 (1985).

Los términos "célula huésped de mamífero", "célula de mamífero", "célula huésped recombinante de mamífero", y similares, se refieren a líneas celulares derivadas de mamíferos que pueden crecer y sobrevivir cuando se disponen en cultivo en monocapa o bien en cultivo en suspensión en un medio que contenga los nutrientes y factores de crecimiento apropiados. Los nutrientes y factores de crecimiento necesarios para una línea celular particular se determinan fácilmente de forma empírica sin experimentación excesiva, como se describe, por ejemplo, en Mammalian Cell Culture (Mather, J. P. ed., Plenum Press, N. Y. (1984)), y por Barnes y Sato (Cell, 22:649 (1980)). Típicamente, las células pueden expresar y secretar grandes cantidades de una proteína de interés particular (típicamente una proteína recombinante) en el medio de cultivo, y se cultivan para este propósito. Sin embargo, las células también se pueden cultivar para una variedad de propósitos diferentes, y el alcance de la presente invención no se limita a cultivar las células solo para la producción de proteínas recombinantes. Los ejemplos de líneas de células de mamífero adecuadas, que pueden crecer en los medios de la presente invención, incluyen la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC® CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano 293S (Graham *et al.*, J. Gen. Virolo., 36:59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC® CCL 10); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243 (1980)); células de riñón de mono (CV1-76, ATCC® CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC® CRL-1587); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA, ATCC® CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC® CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC® CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC® CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); células de tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC® CCL 51); células de hepatoma de rata (HTC, MI.54, Baumann *et al.*, J. Cell Biol., 85:1 (1980)); y células TR-1 (Mather *et al.*, Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44 (1982)) y líneas de células de hibridoma. Las células de ovario de hámster chino (Urlab y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)) son la línea celular para poner en práctica la presente invención. Las células CHO adecuadas para su uso en los procedimientos de la presente invención también se han descrito en los siguientes documentos: documento EP 117.159, publicado el 29 de agosto de 1989; pat. de EE. UU. n.^{os} 4.766.075; 4.853.330; 5.185.259; Lubiniecki *et al.*, en Advances in Animal Cell Biology and Technology for Bioprocesses, Spier *et al.*, eds. (1989), pp. 442-451. Los derivados de CHO conocidos adecuados para su uso en el presente documento incluyen, por ejemplo, células CHO/DHFR$^-$ (Urlaub y Chasin, Proc. Nati. Acad. Sci. USA, 77: 4216 (1980)), CHO-K1 DUX B11 (Simonsen y Levinson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2495-2499 (1983); Urlaub y Chasin, *supra*) y dp 12.CHO (documento EP 307.247 publicado el 15 de marzo de 1989). Las células huésped preferentes incluyen células CHO-K1 DUX B11 y dp 12.CHO.

"Célula CHO dhfr$^-$" se refiere a una célula CHO carente de dihidrofolato reductasa (DHFR).

La producción de proteínas recombinantes en células de mamífero ha permitido la fabricación de una serie de polipéptidos glucosilados complejos y grandes para aplicaciones clínicas. Se usan de forma rutinaria células de ovario de hámster chino (CHO) DHFR$^-$ y el marcador seleccionable amplificable DHFR para establecer líneas celulares que producen cantidades clínicamente útiles de producto. (Urlab, G. y Chasin, L. A. (1980) Proc. Natl Acad. Sci. USA, 77, 4216-4220; Kaufman, R. J. y Sharp, P. (1982) J. Mol. Biol., 159, 601-621; Gasser, C. S., Simonsen, C. S., Schilling, J. W. y Schmike, R. T. (1982) Proc. Natl Sci. USA, 79, 6522-6526)

Por "fase" se entiende una determinada fase de cultivo de las células, como se reconoce bien por el profesional.

"Fase de crecimiento" del cultivo celular se refiere al periodo de crecimiento celular exponencial (la fase logarítmica) donde las células, en general, se dividen rápidamente. Durante esta fase, las células se cultivan durante un periodo de tiempo, normalmente de entre 1-4 días, y en condiciones tales que se maximiza el crecimiento celular. El ciclo de crecimiento para la célula huésped se puede determinar para la célula huésped particular concebida sin experimentación excesiva. Durante la fase de crecimiento, las células se cultivan en medio de nutrientes que contenga los aditivos necesarios, en general, a aproximadamente 30-40 °C, preferentemente a aproximadamente 37 °C, en una atmósfera humidificada y controlada, de modo que se logre un crecimiento óptimo para la línea celular particular. Las células se mantienen en la fase de crecimiento durante un periodo de entre aproximadamente uno y cuatro días, normalmente de entre aproximadamente dos y tres días.

La "fase de transición" del cultivo celular se refiere al periodo de tiempo durante el que se integran las condiciones de cultivo para la fase de producción. Durante la fase de transición, los factores ambientales, tales como la temperatura, varían de las condiciones de crecimiento a las condiciones de producción.

La "fase de producción" del cultivo celular se refiere al periodo de tiempo durante el que el crecimiento celular se ha estabilizado. Durante la fase de producción, el crecimiento celular logarítmico ha finalizado y la producción de proteínas es primaria. Durante este periodo de tiempo, el medio se complementa, en general, para sostener la

producción de proteínas continuada y para lograr el producto de proteína deseado.

La frase "cultivo celular por lotes alimentados" cuando se usa en el presente documento se refiere a un cultivo por lotes en el que las células de animal (por ejemplo, mamífero) y el medio de cultivo se suministran inicialmente al recipiente de cultivo y se alimentan nutrientes de cultivo adicionales, de forma continua o en incrementos discretos, al cultivo durante el cultivo, con o sin recogida periódica de células y/o productos antes de la finalización del cultivo. El cultivo por lotes alimentados incluye un "cultivo por lotes alimentados semicontinuo" en el que se retira periódicamente el cultivo completo (incluyendo las células y el medio) y se reemplaza por medio recién preparado. El cultivo por lotes alimentados se distingue del simple "cultivo por lotes" en que todos los componentes para cultivar células (incluyendo las células de animal y todos los nutrientes de cultivo) se suministran al recipiente de cultivo al comienzo del procedimiento de cultivo. El cultivo por lotes alimentados se puede distinguir además del cultivo por perfusión en la medida en que el sobrenadante no se retira del recipiente de cultivo durante el procedimiento (en el cultivo por perfusión, las células se retienen en el cultivo, por ejemplo, por filtración, encapsulación, sujeción a microportadores, etc., y el medio de cultivo se introduce de forma continua o intermitente y se retira del recipiente de cultivo). Sin embargo, se contempla la retirada de muestras para propósitos de prueba durante el cultivo celular por lotes alimentados.

Cuando se usa en el presente documento, el término "glutamina" se refiere al aminoácido L-glutamina (también conocida como "Gln" y "Q" por designación de tres letras y de una única letra, respectivamente) que se reconoce tanto como un componente básico aminoacídico para la síntesis de proteínas como una fuente de energía en cultivo celular. Por tanto, los términos "glutamina" y "L-glutamina" se usan de manera intercambiable en el presente documento.

La palabra "glucosa" se refiere a α-D-glucosa o bien β-D-glucosa, por separado o en combinación. Cabe señalar que las formas de glucosa α y β son interconvertibles en solución.

La expresión "osmolalidad" es una medida de la presión osmótica de las partículas de soluto disueltas en una solución acuosa. Las partículas de soluto incluyen tanto iones como moléculas no ionizadas. La osmolalidad se expresa como la concentración de partículas osmóticamente activas (es decir, osmoles) disueltas en 1 kg de agua (1 mOsm/kg H_2O a 38 °C. es equivalente a una presión osmótica de 2,5 kPa (19 mmHg)). "Osmolaridad" se refiere al número de partículas de soluto disueltas en 1 litro de solución. Los solutos que se pueden añadir al medio de cultivo para incrementar la osmolalidad del mismo incluyen proteínas, péptidos, aminoácidos, polímeros no metabolizados, vitaminas, iones, sales, azúcares, metabolitos, ácidos orgánicos, lípidos, etc. En el modo de realización preferente, la concentración de aminoácidos y NaCl en el medio de cultivo se incrementa para lograr los intervalos de osmolalidad deseados expuestos en el presente documento. Cuando se usa en el presente documento, la abreviatura "mOsm" quiere decir "miliosmoles/kg H_2O".

El término "densidad celular" como se usa en el presente documento se refiere al número de células presentes en un volumen dado de medio.

El término "viabilidad celular" como se usa en el presente documento se refiere a la capacidad de las células en cultivo de sobrevivir en un conjunto dado de condiciones de cultivo o variaciones experimentales. El término como se usa en el presente documento también se refiere a la porción de células que están vivas en un momento particular en relación con el número total de células, vivas y muertas, en el cultivo en ese momento.

Los términos "aminoácidos" y "aminoácido" se refieren a todos los aminoácidos alfa naturales en sus formas estereoisómeras tanto D como L, y sus análogos y derivados. Un análogo se define como una sustitución de un átomo en el aminoácido con un átomo diferente que normalmente tiene propiedades similares. Un derivado se define como un aminoácido que tiene otra molécula o átomo unido a él. Los derivados incluirían, por ejemplo, acetilación de un grupo amino, aminación de un grupo carboxilo u oxidación de los residuos de azufre de dos moléculas de cisteína para formar cistina.

El término "proteína" pretende hacer referencia a una secuencia de aminoácidos para la que la longitud de la cadena sea suficiente para producir los niveles más altos de la estructura terciaria y/o cuaternaria. Esto es para distinguirse de los "péptidos" u otros fármacos de pequeño peso molecular que no tengan dicha estructura. Típicamente, la proteína en el presente documento tendrá un peso molecular de al menos aproximadamente 15-20 kD, preferentemente de al menos aproximadamente 20 kD. Los ejemplos de proteínas englobadas dentro de la definición en el presente documento incluyen todas las proteínas de mamífero, en particular, proteínas terapéuticas y de diagnóstico, tales como anticuerpos terapéuticos y de diagnóstico, y, en general, proteínas que contienen uno o más enlaces disulfuro, incluyendo polipéptidos de múltiples cadenas que comprenden uno o más enlaces disulfuro inter y/o intracatenarios.

El término "proteína terapéutica" o "polipéptido terapéutico" se refiere a una proteína que se usa en el tratamiento de una enfermedad, independientemente de su indicación o mecanismo de acción. Para que las proteínas terapéuticas sean útiles en la clínica, se deben fabricar en grandes cantidades. La producción a "escala de fabricación" de proteínas terapéuticas, u otras proteínas, utiliza cultivos celulares que varían de aproximadamente

400 l a aproximadamente 80.000 l, dependiendo de la proteína que se produce y la necesidad. Típicamente, dicha producción a escala de fabricación utiliza tamaños de cultivo celular de aproximadamente 400 l a aproximadamente 25.000 l. Dentro de este intervalo, se utilizan tamaños de cultivo celular específicos, tales como de 4000 l, de aproximadamente 6000 l, de aproximadamente 8000, de aproximadamente 10.000, de aproximadamente 12.000 l, de aproximadamente 14.000 l o de aproximadamente 16.000 l.

Como se usa en el presente documento, "polipéptido de interés" se refiere, en general, a péptidos y proteínas que tienen más de aproximadamente diez aminoácidos. Los polipéptidos pueden ser homólogos a la célula huésped, o preferentemente, pueden ser exógenos, lo que significa que son heterólogos, es decir, externos, a la célula huésped que se utiliza, tal como una proteína humana producida por un mamífero no humano, por ejemplo, una célula de ovario de hámster chino (CHO). Preferentemente, se usan polipéptidos de mamífero (polipéptidos que se derivaron originalmente de un organismo de mamífero), más preferentemente los que se secretan directamente en el medio. El término "polipéptido" o "polipéptido de interés" incluye específicamente anticuerpos, en particular, anticuerpos que se unen a polipéptidos de mamífero, tales como cualquiera de los polipéptidos de mamífero enumerados a continuación o fragmentos de los mismos, así como inmunoadhesinas (fusión polipéptido-Ig), tales como las que comprenden cualquiera de los polipéptidos de mamífero enumerados a continuación o fragmentos de los mismos.

Los ejemplos de polipéptidos de mamífero incluyen, sin limitación, moléculas transmembranarias (por ejemplo, receptores) y ligandos, tales como factores de crecimiento. Los polipéptidos ejemplares incluyen moléculas tales como renina; una hormona del crecimiento, incluyendo la hormona del crecimiento humana y la hormona del crecimiento bovina; hormona liberadora de la hormona del crecimiento; hormona paratiroidea; hormona estimulante del tiroides; interferón, tal como interferón-α, -β y -γ; lipoproteínas; α-1-antitripsina; cadena A de insulina; cadena B de insulina; proinsulina; hormona foliculoestimulante; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación, tales como factor VIIIC, factor IX, tromboplastina tisular y factor de Von Willebrand; factores anticoagulación, tales como proteína C; péptido natriurético auricular; tensioactivo pulmonar; un activador del plasminógeno, tal como urocinasa u orina humana, o activador del plasminógeno de tipo tisular (t-PA), incluyendo variantes de t-PA; bombesina; trombina; factor de crecimiento hematopoyético; factor de necrosis tumoral alfa y beta; encefalinasa; RANTES (regulada por activación, expresada y secretada por linfocitos T normales); proteína inflamatoria de macrófagos (MIP-1-α) humana; una seroalbúmina, tal como seroalbúmina humana; hormona antimülleriana; cadena A de relaxina; cadena β de relaxina; prorrelaxina; péptido asociado a gonadotropinas de ratón; una proteína microbiana, tal como β-lactamasa; DNasa; IgE; un antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA), tal como CTLA-4; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores para hormonas o factores de crecimiento; proteína A o D; factores reumatoides; un factor neurótrofo, tal como factor neurótrofo derivado del hueso (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5 o -6 (NT-3, NT4, NT-5 o NT-6) o un factor de crecimiento nervioso, tal como NGF-β; factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblastos, tal como aFGF y bFGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento y transformación (TGF), tal como TGF-α y TGF-β, incluyendo TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, TGF-β4 o TGF-β5; factor de crecimiento similar a la insulina I y II (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral), proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina; proteínas CD, tales como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD34, CD40; eritropoyetina; factores osteoinductores; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón, tal como interferón-α, -β y -γ; factores estimulantes de colonias (CSF), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleucinas (IL), por ejemplo, de IL-1 a IL-10; superóxido dismutasa; receptores de linfocitos T; proteínas de membrana de superficie; factor de aceleración del decaimiento; antígeno vírico, tal como, por ejemplo, una porción de la envoltura del sida; proteínas de transporte; receptores de migración dirigida; adresinas; proteínas reguladoras; integrinas, tales como CD11a, CD11b, CD11c, CD18, una ICAM, VLA-4 y VCAM; un antígeno asociado a tumor, tal como el receptor HER1 (EGFR), HER2, HER3 o HER4; Apo2L/TRAIL, Hedgehog, proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) y fragmentos de cualquiera de los polipéptidos enumerados anteriormente. Apo2L (TRAIL) y sus variantes se divulgan, por ejemplo, en la publicación de la solicitud de EE. UU. n.º 20040186051. Se divulgan anticuerpos anti-VEGF, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.os 8.994.879; 7.060.269; 7.169.901; y 7.297.334. Se divulgan anticuerpos anti-CD20, por ejemplo, en la publicación de la solicitud de EE. UU. n.º 20060246004. El polipéptido BR3, los anticuerpos anti-BR3 y las inmunoadhesinas BR3-Fc se describen, por ejemplo, en la publicación de la solicitud de EE. UU. n.º 20050070689.

Como se usa en el presente documento, el término "inmunoadhesina" designa moléculas similares a anticuerpo que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una "adhesina") con las funciones efectoras de los dominios constantes de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmunoadhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada que es distinta del sitio de reconocimiento de y unión a antígeno de un anticuerpo (es decir, es "heteróloga"), y una secuencia del dominio constante de inmunoglobulina. La parte de adhesina de una molécula de inmunoadhesina típicamente es una secuencia de aminoácidos contiguos que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. Se puede obtener la secuencia del dominio constante de inmunoglobulina en la inmunoadhesina de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3 o IgG-4, IgA (incluyendo IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD o IgM.

Como se señala anteriormente, en determinados modos de realización, la proteína es un anticuerpo. Los "anticuerpos" (Ab) y las "inmunoglobulinas" (Ig) son glucoproteínas que tienen las mismas características

estructurales. Mientras que los anticuerpos presentan especificidad de unión a un antígeno específico, las inmunoglobulinas incluyen tanto anticuerpos como otras moléculas similares a anticuerpos que, en general, están desprovistas de especificidad por el antígeno. Los polipéptidos de esta última clase se producen, por ejemplo, a bajos niveles por el sistema linfático y a niveles incrementados por mielomas.

El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos de longitud completa que tienen una región Fc de inmunoglobulina o anticuerpos monoclonales intactos), composiciones de anticuerpos con especificidad poliepitópica, anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, diacuerpos y moléculas monocatenarias, tales como moléculas scFv, así como fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, Fab, F(ab')2 y Fv).

A menos que se indique de otro modo, la expresión "anticuerpo multivalente" se usa por toda esta memoria descriptiva para indicar un anticuerpo que comprende tres o más sitios de unión a antígeno. El anticuerpo multivalente típicamente se genomanipula para que tenga los tres o más sitios de unión a antígeno y, en general, no es un anticuerpo IgM o IgA de secuencia natural.

Los términos "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se usan en el presente documento de manera intercambiable para hacer referencia a un anticuerpo en su forma sustancialmente intacta, no a fragmentos de anticuerpo como se define a continuación. Los términos se refieren, en particular, a un anticuerpo con cadenas pesadas que contienen la región Fc.

Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden solo una porción de un anticuerpo intacto, que incluye, en general, un sitio de unión a antígeno del anticuerpo intacto y, por tanto, que retiene la capacidad de unirse al antígeno. . En un modo de realización, un fragmento de anticuerpo comprende un sitio de unión a antígeno del anticuerpo intacto y, por tanto, retiene la capacidad de unirse al antígeno. En otro modo de realización, un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, uno que comprende la región Fc, retiene al menos una de las funciones biológicas asociadas normalmente con la región Fc cuando está presente en un anticuerpo intacto, tal como la unión a FcRn, modulación de la semivida del anticuerpo, función ADCC y unión al complemento. En un modo de realización, un fragmento de anticuerpo es un anticuerpo monovalente que tiene una semivida *in vivo* sustancialmente similar a un anticuerpo intacto. Por ejemplo, dicho fragmento de anticuerpo puede comprender un brazo de unión a antígeno enlazado a una secuencia de Fc que puede conferir estabilidad *in vivo* al fragmento.

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

El fragmento Fab contiene los dominios variables de la cadena pesada y ligera y también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxílico del dominio CH1 de la cadena pesada, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra de anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para un Fab' en el que el/los residuo(s) de cisteína de los dominios constantes tienen un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')2 se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También son conocidos otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo englobados por la presente definición incluyen: (i) el fragmento Fab, que tiene los dominios VL, CL, VH y CH1; (ii) el fragmento Fab', que es un fragmento Fab que tiene uno o más residuos de cisteína en el extremo C del dominio CH1; (iii) el fragmento Fd, que tiene los dominios VH y CH1; (iv) el fragmento Fd', que tiene los dominios VH y CH1 y uno o más residuos de cisteína en el extremo C del dominio CH1; (v) el fragmento Fv, que tiene los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo; (vi) el fragmento dAb (Ward *et al.*, *Nature* 341, 544-546 (1989)), que consiste en un dominio VH; (vii) regiones CDR aisladas; (viii) fragmentos F(ab')2, un fragmento bivalente que incluye dos fragmentos Fab' enlazados por un puente disulfuro en la región bisagra; (ix) moléculas de anticuerpo monocatenario (por ejemplo, Fv monocatenario; scFv) (Bird *et al.*, *Science* 242:423-426 (1988); y Huston *et al.*, *PNAS* (*USA*) 85:5879-5883 (1988)); (x) "diacuerpos" con dos sitios de unión a antígeno, que comprenden un dominio variable de la cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (véanse, por ejemplo, los documentos EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)); (xi) "anticuerpos lineales" que comprenden un par de segmentos Fd en tándem (VH-CH1-VH-CH1) que, conjuntamente con polipéptidos de la cadena ligera complementaria, forman un par de regiones de unión a antígeno (Zapata *et al.*, *Protein Eng*. 8(10):1057 1062 (1995); y patente de EE. UU. n.º 5.641.870).

"Fv" es el mínimo fragmento de anticuerpo que contiene un sitio de unión a antígeno completo. En un modo de realización, una especie de Fv bicatenario consiste en un dímero de un dominio variable de la cadena pesada y uno de la ligera en asociación estrecha no covalente. En una especie de Fv monocatenario (scFv) se pueden enlazar de forma covalente un dominio variable de la cadena pesada y uno de la ligera por un conector peptídico flexible, de modo que las cadenas ligera y pesada se puedan asociar en una estructura "dimérica" análoga a la de

una especie de Fv bicatenario. Es en esta configuración en la que las tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Conjuntamente, las seis CDR confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque a una afinidad menor que todo el sitio de unión.

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

El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo los fragmentos un dominio variable de la cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Usando un conector que sea demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se obliga a que los dominios se emparejen con los dominios complementarios de otra cadena y creen dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos pueden ser bivalentes o biespecíficos. Los diacuerpos se describen más completamente, por ejemplo, en los documentos EP 404.097; WO93/1161; Hudson *et al.*, (2003) Nat. Med. 9:129-134; y Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993). También se describen triacuerpos y tetracuerpos en Hudson *et al.*, (2003) Nat. Med. 9:129-134.

El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones, por ejemplo, mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades inferiores. Por tanto, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como que no es una mezcla de anticuerpos discretos. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos frente a un único antígeno. En determinados modos de realización, un anticuerpo monoclonal típicamente incluye un anticuerpo que comprende una secuencia polipeptídica que se une a una diana, en el que la secuencia polipeptídica de unión a diana se obtuvo por un procedimiento que incluye la selección de una única secuencia polipeptídica de unión a diana de una pluralidad de secuencias polipeptídicas. Por ejemplo, el procedimiento de selección puede ser la selección de un clon único de una pluralidad de clones, tal como una agrupación de clones de hibridoma, clones de fago o clones de ADN recombinante. Se debe entender que se puede alterar además una secuencia de unión a diana seleccionada, por ejemplo, para mejorar la afinidad por la diana, para humanizar la secuencia de unión a diana, para mejorar su producción en cultivo celular, para reducir su inmunogenicidad *in vivo*, para crear un anticuerpo multiespecífico, etc., y que un anticuerpo que comprende la secuencia de unión a diana alterada también es un anticuerpo monoclonal de la presente invención. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos frente a diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige frente a un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, las preparaciones de anticuerpos monoclonales son ventajosas en tanto que típicamente no están contaminadas por otras inmunoglobulinas.

El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se debe interpretar como que requiere la producción del anticuerpo por cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la presente invención se pueden preparar por una variedad de técnicas, incluyendo, por ejemplo, el procedimiento del hibridoma (por ejemplo, Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495-97 (1975); Hongo *et al., Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow *et al., Antibodies: A Laboratory Manual,* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2.ª ed. 1988); Hammerling *et al.,* en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.816.567), tecnologías de presentación en fagos (véanse, por ejemplo, Clackson *et al., Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks *et al., J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1991); Sidhu *et al., J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee *et al., J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); y Lee *et al., J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132 (2004), y tecnologías para producir anticuerpos humanos o similares a humanos en animales que tienen partes o todos los locus o genes de inmunoglobulina humana que codifican secuencias de inmunoglobulina humana (véanse, por ejemplo, los documentos WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al., Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggemann *et al., Year in Immunol.* 7:33 (1993); patentes de EE. UU. n.os 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; y 5.661.016; Marks *et al., Bio/Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994); Fishwild *et al., Nature Biotechnol.* 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996); y Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995).

Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga a las secuencias correspondientes

en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico a u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (patente de EE. UU. n.º 4.816.567; y Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)).

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano, que tenga la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región estructural (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se hallen ni en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donante. Se realizan estas modificaciones para refinar además el comportamiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para obtener otros detalles, véanse Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). Véanse también, por ejemplo, Vaswani y Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurle y Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994); y las pat. de EE. UU. n.os 6.982.321 y 7.087.409. Véanse también van Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.,* 5: 368-74 (2001). Se pueden preparar anticuerpos humanos administrando el antígeno a un animal transgénico que se haya modificado para producir dichos anticuerpos en respuesta a la exposición antigénica, pero en los que los locus endógenos se han desactivado, por ejemplo, xenorratones inmunizados (véanse, por ejemplo, las pat. de EE. UU. n.os 6.075.181 y 6.150.584 con respecto a la tecnología XENOMOUSE™). Véase también, por ejemplo, Li *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006) con respecto a los anticuerpos humanos generados por medio de una tecnología de hibridoma de linfocitos B humanos. El anticuerpo humanizado también puede incluir un anticuerpo Primatized™, en el que la región de unión a antígeno del anticuerpo se deriva de un anticuerpo producido inmunizando macacos con el antígeno de interés.

Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o se ha preparado usando cualquiera de las técnicas para preparar anticuerpos humanos como se divulga en el presente documento. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente a un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos. Se pueden producir anticuerpos humanos usando diversas técnicas conocidas en la técnica. En un modo de realización, el anticuerpo humano se selecciona de una colección de fagos, donde esa colección de fagos expresa anticuerpos humanos (Vaughan *et al.*, *Nature Biotechnology* 14:309-314 (1996): Sheets *et al.*, *PNAS (USA)* 95:6157-6162 (1998)); Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)). También se pueden preparar anticuerpos humanos introduciendo locus de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógena se han inactivado parcial o completamente. Tras la exposición, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se asemeja mucho a la que se observa en seres humanos en todos los aspectos, incluyendo el reordenamiento génico, el ensamblaje y el repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.os 5.545.807; 5.545.806, 5.569.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.661.016 y en las siguientes publicaciones científicas: Marks *et al.*, *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368:812-13 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnology* 14: 845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14: 826 (1996); Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995). De forma alternativa, se puede preparar el anticuerpo humano por medio de la inmortalización de linfocitos B humanos que producen un anticuerpo dirigido frente a un antígeno diana (dichos linfocitos B se pueden recuperar de un individuo o se pueden haber inmunizado *in vitro*). Véanse, por ejemplo, Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147 (1):86-95 (1991); y pat. de EE. UU. n.º 5.750.373.

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

La región "región variable" o "dominio variable" de un anticuerpo se refiere a los dominios aminoterminales de la

cadena pesada o ligera del anticuerpo. El dominio variable de la cadena pesada se puede denominar "VH". El dominio variable de la cadena ligera se puede denominar "VL". Estos dominios son, en general, las partes más variables de un anticuerpo y contienen los sitios de unión a antígeno.

El término "variable" se refiere al hecho de que determinadas porciones de los dominios variables difieren extensamente en secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente por todos los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos llamados regiones determinantes de la complementariedad (CDR) o regiones hipervariables (HVR) tanto en los dominios variables de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se llaman regiones estructurales (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera naturales comprenden cada uno cuatro FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina beta, conectadas por tres regiones hipervariables que forman bucles que conectan y, en algunos casos, forman parte de, la estructura de lámina beta. Las regiones hipervariables en cada cadena se unen entre sí en estrecha proximidad por las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, Sequences *of Proteins of Immunological Interest, 5.ª ed.* Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpos.

El término "región hipervariable", "HVR" o "HV", cuando se usa en el presente documento, se refiere a los residuos de aminoácido de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. Por ejemplo, el término región hipervariable se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia y/o forman bucles definidos estructuralmente. En general, los anticuerpos comprenden seis HVR; tres en el VH (H1, H2, H3) y tres en el VL (L1, L2, L3). En los anticuerpos naturales, H3 y L3 presentan la mayor diversidad de las seis HVR, y se cree que H3, en particular, desempeña un papel único al conferir una especificidad excelente a los anticuerpos. Véanse, por ejemplo, Xu *et al.*, *Immunity* 13:37-45 (2000); Johnson y Wu en *Methods in Molecular Biology* 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003). De hecho, los anticuerpos de camélido naturales que consisten en una cadena pesada solo son funcionales y estables en ausencia de cadena ligera. Véanse, por ejemplo, Hamers-Casterman *et al.*, *Nature* 363:446-448 (1993); Sheriff *et al.*, *Nature Struct. Biol.* 3:733-736 (1996).

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

Dependiendo de las secuencias de aminoácidos de los dominios constantes de sus cadenas pesadas, los anticuerpos (inmunoglobulinas) se pueden asignar a diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman α, δ, ε, γ, y μ, respectivamente. Las estructuras de las subunidades y configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas y se describen, en general, por ejemplo, en Abbas *et al.*, Cellular and Mol. Immunology, 4.ª ed. (2000). Un anticuerpo puede ser parte de una molécula de fusión más grande, formada por asociación covalente o no covalente del anticuerpo con una o más de otras proteínas o péptidos.

El término "región Fc" se usa para definir la región C terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que se puede generar por digestión con papaína de un anticuerpo intacto. La región Fc puede ser una región Fc de secuencia natural o una región Fc variante. La región Fc de una inmunoglobulina comprende, en general, dos dominios constantes, un dominio CH2 y un dominio CH3, y opcionalmente comprende un dominio CH4.

Por "cadena de la región Fc" se entiende en el presente documento una de las dos cadenas polipeptídicas de una región Fc.

El "dominio CH2" de una región Fc de IgG humana (también denominado dominio "Cg2") es único en tanto que no está estrechamente emparejado con otro dominio. Más bien, dos cadenas glucídicas ramificadas unidas a N se intercalan entre los dos dominios CH2 de una molécula de IgG natural intacta. Se ha especulado que el glúcido puede proporcionar un sustituto para el emparejamiento dominio-dominio y ayudar a estabilizar el dominio CH2. Burton, *Molec. Immunol.* 22:161-206 (1985). El dominio CH2 en el presente documento puede ser un dominio CH2 de secuencia natural o un dominio CH2 variante.

El "dominio CH3" comprende el tramo de residuos C terminales con respecto a un dominio CH2 en una región Fc. La región CH3 en el presente documento puede ser un dominio CH3 de secuencia natural o un dominio CH3 variante (por ejemplo, un dominio CH3 con una "protuberancia" introducida en una cadena del mismo y una "cavidad" introducida correspondiente en la otra cadena del mismo; véase la patente de EE. UU. n.º 5.821.333, incorporada expresamente en el presente documento por referencia). Se pueden usar dichos dominios CH3 variantes para preparar anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos) como se describe en el presente

documento.

La "región bisagra" en el presente documento puede ser una región bisagra de secuencia natural o una región bisagra variante. Las dos cadenas polipeptídicas de una región bisagra variante retienen, en general, al menos un residuo de cisteína por cadena polipeptídica, de modo que las dos cadenas polipeptídicas de la región bisagra variante puedan formar un enlace disulfuro entre las dos cadenas. La región bisagra preferente en el presente documento es una región bisagra humana de secuencia natural, por ejemplo, una región bisagra de IgG1 humana de secuencia natural.

Una "región Fc funcional" posee al menos una "función efectora" de una región Fc de secuencia natural. Las "funciones efectoras" ejemplares incluyen unión a C1q; citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); unión al receptor Fc; citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación por disminución de receptores de superficie celular (por ejemplo, el receptor de linfocitos B; BCR), etc. Dichas funciones efectoras requieren, en general, que la región Fc se combine con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable de anticuerpo) y se pueden evaluar usando diversos ensayos conocidos en la técnica para evaluar dichas funciones efectoras de anticuerpo.

Una "región Fc de secuencia natural" comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc hallada en la naturaleza. Las regiones Fc humanas de secuencia natural incluyen una región Fc de IgG1 humana de secuencia natural (alotipos A y distinto a A); región Fc de IgG2 humana de secuencia natural; región Fc de IgG3 humana de secuencia natural; y región Fc de IgG4 humana de secuencia natural, así como variantes naturales de las mismas.

Un anticuerpo "intacto" es uno que comprende una región variable de unión a antígeno, así como un dominio constante de la cadena ligera (C_L) y dominios constantes de la cadena pesada, C_H1, C_H2 y C_H3. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia natural (por ejemplo, dominios constantes de secuencia natural humana) o una variante de secuencia de aminoácidos de los mismos. Preferentemente, el anticuerpo intacto tiene una o más funciones efectoras.

Un "anticuerpo original" o un anticuerpo "natural" es un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos que está desprovista de una o más alteraciones en la secuencia de aminoácidos en comparación con una variante de anticuerpo como se divulga en el presente documento. Por tanto, el anticuerpo original tiene, en general, al menos una región hipervariable que difiere en la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la región hipervariable correspondiente de una variante de anticuerpo como se divulga en el presente documento. El polipéptido original puede comprender un anticuerpo de secuencia natural (es decir, natural) (incluyendo una variante alélica natural) o un anticuerpo con modificaciones en la secuencia de aminoácidos preexistentes (tales como inserciones, deleciones y/u otras alteraciones) de una secuencia natural. Por toda la divulgación, se usa de manera intercambiable anticuerpo "natural", "WT", "wt" y "original".

Como se usa en el presente documento, "variante de anticuerpo" o "anticuerpo variante" se refiere a un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo original. Preferentemente, la variante de anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena pesada o un dominio variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que no se halla en la naturaleza. Dichas variantes tienen necesariamente menos de un 100 % de identidad o similitud de secuencia con el anticuerpo original. En un modo de realización preferente, la variante de anticuerpo tendrá una secuencia de aminoácidos de aproximadamente un 75 % a menos de un 100 % de identidad o similitud de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada o bien ligera del anticuerpo original, más preferentemente de aproximadamente un 80 % a menos de un 100 %, más preferentemente de aproximadamente un 85 % a menos de un 100 %, más preferentemente de aproximadamente un 90 % a menos de un 100 % y lo más preferentemente de aproximadamente un 95 % a menos de un 100 %. La variante de anticuerpo es, en general, una que comprende una o más alteraciones aminoacídicas en o adyacentes a una o más regiones hipervariables de la misma.

Una "región Fc variante" comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una región Fc de secuencia natural en virtud de al menos una modificación aminoacídica. En determinados modos de realización, la región Fc variante tiene al menos una sustitución aminoacídica en comparación con una región Fc de secuencia natural o con la región Fc de un polipéptido original, por ejemplo, de aproximadamente una a aproximadamente diez sustituciones aminoacídicas, y preferentemente de aproximadamente una a aproximadamente cinco sustituciones aminoacídicas en una región Fc de secuencia natural o en la región Fc del polipéptido original, por ejemplo, de aproximadamente una a aproximadamente diez sustituciones aminoacídicas, y preferentemente de aproximadamente una a aproximadamente cinco sustituciones aminoacídicas en una región Fc de secuencia natural o en la región Fc del polipéptido original. La región Fc variante en el presente documento típicamente poseerá, por ejemplo, al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia con una región Fc de secuencia natural y/o con una región Fc de un polipéptido original, o al menos aproximadamente un 90 % de identidad de secuencia con la misma, o al menos aproximadamente un 95 % de secuencia o más identidad con la misma.

"Funciones efectoras" de anticuerpo se refieren a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia natural o región Fc variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo, y varían con el isotipo de anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); unión al receptor Fc; citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación por disminución de receptores de superficie celular (por ejemplo, el receptor de linfocitos B); y activación de linfocitos B.

"Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la que la Ig secretada unida a receptores de Fc (FcR) presentes en determinadas células citotóxicas (por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) posibilita que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana que tiene el antígeno y posteriormente destruyan la célula diana con citotoxinas. Las principales células para mediar en la ADCC, los linfocitos NK, solo expresan FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés se puede realizar un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en la patente de EE. UU. n.º 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). De forma alternativa, o adicionalmente, se puede evaluar la actividad ADCC de la molécula de interés *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes *et al.*, *PNAS* (*USA*) 95:652-656 (1998).

Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. En determinados modos de realización, las células expresan al menos FcγRIII y realizan función/funciones efectora(s) ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que median en la ADCC incluyen leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica (PBMC), linfocitos citolíticos naturales (NK), monocitos, linfocitos T citotóxicos y neutrófilos; siendo preferentes, en general, los PBMC y los linfocitos NK. Las células efectoras se pueden aislar de una fuente natural de las mismas, por ejemplo, de sangre o PBMC como se describe en el presente documento.

El "receptor de Fc" o "FcR" describe un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. En algunos modos de realización, un FcR es un FcR humano natural. En algunos modos de realización, un FcR es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y, de forma alternativa, formas empalmadas de dichos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor activador") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplásmicos de los mismos. El receptor activador FcγRIIA contiene un motivo de activación del inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición del inmunorreceptor basado en tirosina (ITIM) en su dominio citoplásmico (véase, por ejemplo, Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). Los FcR se revisan, por ejemplo, en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991); Capel *et al., Immunomethods* 4:25-34 (1994); y de Haas *et al., J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). Otros FcR, incluyendo los que se vayan a identificar en el futuro, están englobados por el término "FcR" del presente documento.

El término "receptor de Fc" o "FcR" también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim *et al., J. Immunol.* 24:249 (1994)) y de la regulación de la homeostasis de las inmunoglobulinas. Son conocidos procedimientos de medición de la unión a FcRn (véanse, por ejemplo, Ghetie y Ward., *Immunol. Today* 18(12):592-598 (1997); Ghetie *et al., Nature Biotechnology,* 15(7):637-640 (1997); Hinton *et al., J. Biol. Chem.* 279(8):6213-6216 (2004); documento WO 2004/92219 (Hinton *et al.*).

Se pueden someter a ensayo la unión a FcRn humano *in vivo* y la semivida en suero de polipéptidos de unión de alta afinidad a FcRn humano, por ejemplo, en ratones transgénicos o líneas de células humanas transfectadas que expresan FcRn humano, o en primates a los que se administran los polipéptidos con una región Fc variante. El documento WO 2000/42072 (Presta) describe variantes de anticuerpo con unión mejorada o reducida a los FcR. Véase también, por ejemplo, Shields *et al., J. Biol. Chem.* 9(2):6591-6604 (2001).

"Citotoxicidad dependiente del complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una célula diana en presencia del complemento. La activación de la vía clásica del complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a los anticuerpos (de la subclase apropiada) que están unidos a su antígeno afín. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro *et al., J. Immunol. Methods* 202:163 (1996). Se describen variantes de polipéptido con secuencias de aminoácidos de la región Fc alteradas (polipéptidos con una región Fc variante) y capacidad de unión a C1q incrementada o disminuida, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 6.194.551 B1 y el documento WO 1999/51642. Véase también, por ejemplo, Idusogie *et al., J. Immunol.* 164:4178-4184 (2000).

Un anticuerpo "madurado en afinidad" es uno con una o más alteraciones en una o más CDR del mismo que dan como resultado una mejora de la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo original que no posea dicha(s) alteración/alteraciones. En un modo de realización, un anticuerpo madurado en afinidad

tiene afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Los anticuerpos madurados en afinidad se producen por procedimientos conocidos en la técnica. Marks *et al.*, *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) describe la maduración en afinidad por barajado de los dominios VH y VL. La mutagénesis aleatoria de los residuos de CDR y/o de la región estructural se describe por: Barbas *et al.*, *Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809-3813 (1994); Schier *et al.*, *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton *et al.*, *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson *et al.*, *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); y Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

El término "anticuerpo terapéutico" se refiere a un anticuerpo que se usa en el tratamiento de una enfermedad. Un anticuerpo terapéutico puede tener diversos mecanismos de acción. Un anticuerpo terapéutico se puede unir y neutralizar la función normal de una diana asociada con un antígeno. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal que bloquea la actividad de la proteína necesaria para la supervivencia de una célula cancerosa provoca la muerte de la célula. Otro anticuerpo monoclonal terapéutico se puede unir y activar la función normal de una diana asociada con un antígeno. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal se puede unir a una proteína en una célula y desencadenar una señal de apoptosis. Aún otro anticuerpo monoclonal se puede unir a un antígeno diana expresado solo en un tejido enfermo; la conjugación de una carga útil tóxica (agente eficaz), tal como un agente quimioterápico o radioactivo, con el anticuerpo monoclonal puede crear un agente para la administración específica de la carga útil tóxica al tejido enfermo, lo que reduce el daño en el tejido sano. Un "fragmento biológicamente funcional" de un anticuerpo terapéutico presentará al menos una, sino algunas o todas las funciones biológicas atribuidas al anticuerpo intacto, comprendiendo la función al menos una unión específica al antígeno diana.

El anticuerpo se puede unir a cualquier proteína, incluyendo, sin limitación, un miembro de la familia de receptores HER, tal como HER1 (EGFR), HER2, HER3 y HER4; proteínas CD, tales como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD21, CD22 y CD34; moléculas de adhesión celular, tales como LFA-1, Mol, p150,95, VLA-4, ICAM-1, VCAM e integrina av/p3, incluyendo las subunidades α o bien β de la misma (por ejemplo, anticuerpos anti-CD11a, anti-CD18 o anti-CD11b); factores de crecimiento, tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); IgE; antígenos de grupos sanguíneos; receptor flk2/flt3; receptor de obesidad (OB); y proteína C. Otras proteínas ejemplares incluyen la hormona del crecimiento (GH), incluyendo la hormona del crecimiento humana (hGH) y la hormona del crecimiento bovina (bGH); hormona liberadora de la hormona del crecimiento; hormona paratiroidea; hormona estimulante del tiroides; lipoproteínas; α-1-antitripsina; cadena A de insulina; cadena B de insulina; proinsulina; hormona foliculoestimulante; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación, tales como factor VIIIC, tromboplastina tisular y factor de Von Willebrand; factores anticoagulación, tales como proteína C; péptido natriurético auricular; tensioactivo pulmonar; un activador del plasminógeno, tal como urocinasa o activador del plasminógeno de tipo tisular (t-PA); bombesina; trombina; factor de necrosis tumoral α y β; encefalinasa; RANTES (regulada por activación, expresada y secretada por linfocitos T normales); proteína inflamatoria de macrófagos (MIP-1-α) humana; seroalbúmina, tal como seroalbúmina humana (HSA); hormona antimülleriana; cadena A de relaxina; cadena B de relaxina; prorrelaxina; péptido asociado a gonadotropinas de ratón; DNasa; inhibina; activina; receptores para hormonas o factores de crecimiento; una integrina; proteína A o D; factores reumatoides; un factor neurótrofo, tal como factor neurótrofo derivado del hueso (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5 o -6 (NT-3, NT-4, NT-5 o NT-6) o un factor de crecimiento nervioso, tal como NGF-β; factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblastos, tal como aFGF y bFGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento y transformación (TGF), tal como TGF-α y TGF-β, incluyendo TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, TGF-β4 o TGF-β5; factor de crecimiento similar a la insulina I y II (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral), proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP); eritropoyetina (EPO); trombopoyetina (TPO); factores osteoinductores; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón, tal como interferón-α, -β y -γ; factores estimulantes de colonias (CSF), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleucinas (IL), por ejemplo, de IL-1 a IL-10; superóxido dismutasa; receptores de linfocitos T; proteínas de membrana de superficie; factor de aceleración del decaimiento (DAF); un antígeno vírico, tal como, por ejemplo, una porción de la envoltura del sida; proteínas de transporte; receptores de migración dirigida; adresinas; proteínas reguladoras; inmunoadhesinas; anticuerpos; y fragmentos o variantes biológicamente activos de cualquiera de los polipéptidos enumerados anteriormente. Se pueden usar muchos otros anticuerpos de acuerdo con la presente invención, y las listas anteriores no pretenden ser limitantes.

Los anticuerpos terapéuticos de interés particular incluyen aquellos en la práctica clínica oncológica o en desarrollo, tales como los disponibles comercialmente AVASTIN® (bevacizumab), HERCEPTIN® (trastuzumab), LUCENTIS® (ranibizumab), RAPTIVA® (efalizumab), RITUXAN® (rituximab) y XOLAIR® (omalizumab), así como, anti-amiloide beta (Abeta), anti-CD4 (MTRX1011A), anti- EGFL7 (dominio similar a EGF 7), anti-IL13, Apomab (agonista del receptor proapoptótico (PARA) dirigido a anti-DR5), anti-BR3 (CD268, receptor de BLyS 3, BAFF-R, receptor de BAFF), anti-subunidad de integrina beta 7, dacetuzumab (anti-CD40), GA101 (anticuerpo monoclonal anti-CD20), MetMAb (anti-tirosina cinasa receptora de MET), anti-neuropilina-1 (NRP1), ocrelizumab (anticuerpo anti-CD20), anti-ligando para OX40, anti-LDL oxidada (oxLDL), pertuzumab (inhibidores de la dimerización de HER (HDI) y rhuMAb IFN alfa.

Un "fragmento biológicamente funcional" de un anticuerpo comprende solo una porción de un anticuerpo intacto, en el que la porción retiene al menos una, y hasta tantas como la mayoría de o todas las funciones asociadas normalmente con esa porción cuando está presente en un anticuerpo intacto. En un modo de realización, un fragmento biológicamente funcional de un anticuerpo comprende un sitio de unión a antígeno del anticuerpo intacto

y, por tanto, retiene la capacidad de unirse al antígeno. En otro modo de realización, un fragmento biológicamente funcional de un anticuerpo, por ejemplo, uno que comprende la región Fc, retiene al menos una de las funciones biológicas asociadas normalmente con la región Fc cuando está presente en un anticuerpo intacto, tal como la unión a FcRn, modulación de la semivida del anticuerpo, función ADCC y unión al complemento. En un modo de realización, un fragmento biológicamente funcional de un anticuerpo es un anticuerpo monovalente que tiene una semivida *in vivo* sustancialmente similar a un anticuerpo intacto. Por ejemplo, dicho fragmento biológicamente funcional de un anticuerpo puede comprender un brazo de unión a antígeno enlazado a una secuencia de Fc que puede conferir estabilidad *in vivo* al fragmento.

El término "proteína de diagnóstico" se refiere a una proteína que se usa en el diagnóstico de una enfermedad.

El término "anticuerpo de diagnóstico" se refiere a un anticuerpo que se usa como reactivo de diagnóstico para una enfermedad. El anticuerpo de diagnóstico se puede unir a un antígeno diana que se asocia específicamente con, o muestra expresión incrementada en, una enfermedad particular. El anticuerpo de diagnóstico se puede usar, por ejemplo, para detectar una diana en una muestra biológica de un paciente, o en imágenes de diagnóstico de sitios de la enfermedad, tales como tumores, en un paciente. Un "fragmento biológicamente funcional" de un anticuerpo de diagnóstico presentará al menos una, sino algunas o todas las funciones biológicas atribuidas al anticuerpo intacto, comprendiendo la función al menos una unión específica al antígeno diana.

"Purificada" quiere decir que una molécula está presente en una muestra a una concentración de al menos un 80-90 % en peso de la muestra en la que está contenida. La proteína, incluyendo los anticuerpos, que se purifica es de forma preferente esencialmente pura y de forma deseable esencialmente homogénea (es decir, libre de proteínas contaminantes, etc.).

Una proteína "esencialmente pura" quiere decir una composición de proteína que comprenda al menos aproximadamente un 90 % en peso de la proteína, en base al peso total de la composición, preferentemente al menos aproximadamente un 95 % en peso.

Una proteína "esencialmente homogénea" quiere decir una composición de proteína que comprenda al menos aproximadamente un 99 % en peso de proteína, en base al peso total de la composición.

Como se usa en el presente documento, "soluble" se refiere a polipéptidos que, cuando están en soluciones acuosas, se disuelven completamente, dando como resultado una solución de transparente a ligeramente opalescente sin partículas visibles, como se evalúa por inspección visual. Se puede realizar otro ensayo de la turbidez de la solución (o solubilidad de la proteína) midiendo las absorbancias UV a de 340 nm a 360 nm con una celda con longitud de trayectoria de 1 cm donde la turbidez a 20 mg/ml sea de menos de 0,05 unidades de absorbancia.

Un anticuerpo o polipéptido "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían en los usos en la investigación, en el diagnóstico o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En algunos modos de realización, un anticuerpo se purifica (1) hasta más de un 95 % en peso de anticuerpo como se determina, por ejemplo, por el procedimiento de Lowry, y en algunos modos de realización, hasta más de un 99 % en peso; (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos N terminal o interna por el uso, por ejemplo, de un secuenciador de vaso giratorio o (3) hasta homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando, por ejemplo, tinción con azul de Coomassie o plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de las células recombinantes, puesto que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Habitualmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará por al menos una etapa de purificación.

Los términos "proteína A" y "ProA" se usan de manera intercambiable en el presente documento y engloban proteína A recuperada de una fuente natural de la misma, proteína A producida sintéticamente (por ejemplo, por síntesis de péptidos o por técnicas recombinantes) y variantes de las mismas que retienen la capacidad de unirse a proteínas que tienen una región C_H2/C_H3, tal como una región Fc. La proteína A se puede adquirir comercialmente de Repligen, Pharmacia y Fermatech. La proteína A se inmoviliza, en general, en un material de soporte en fase sólida. El término "ProA" también se refiere a una resina o columna de cromatografía de afinidad que contiene una matriz de soporte sólido cromatográfico a la que se une de forma covalente la proteína A.

El término "cromatografía" se refiere al procedimiento por el que un soluto de interés en una mezcla se separa de otros solutos en una mezcla como resultado de diferencias en las tasas a las que los solutos individuales de la mezcla migran a través de un medio estacionario bajo la influencia de una fase móvil, o en procedimientos de unión y elución.

El término "cromatografía de afinidad" y "cromatografía de afinidad para proteínas" se usan de manera intercambiable en el presente documento y se refieren a una técnica de separación de proteínas en la que una proteína de interés o anticuerpo de interés se une reversible y específicamente a un ligando bioespecífico.

Preferentemente, el ligando bioespecífico se une de forma covalente a un material cromatográfico en fase sólida y es accesible a la proteína de interés en solución a medida que la solución entra en contacto con el material cromatográfico en fase sólida. La proteína de interés (por ejemplo, anticuerpo, enzima o proteína receptora) retiene su afinidad de unión específica por el ligando bioespecífico (antígeno, sustrato, cofactor u hormona, por ejemplo) durante las etapas cromatográficas, mientras que otros solutos y/o proteínas en la mezcla no se unen apreciable o específicamente al ligando. La unión de la proteína de interés al ligando inmovilizado permite que las proteínas contaminantes o impurezas proteicas se pasen a través del medio cromatográfico, mientras que la proteína de interés permanece específicamente unida al ligando inmovilizado en el material en fase sólida. A continuación, la proteína de interés específicamente unida se retira en forma activa del ligando inmovilizado con pH bajo, pH alto, alto contenido de sal, ligando competidor, y similares, y se pasa a través de la columna cromatográfica con el tampón de elución, libre de proteínas contaminantes o impurezas proteicas que anteriormente se permitió que pasaran a través de la columna. Se puede usar cualquier componente como ligando para purificar su proteína de unión específica respectiva, por ejemplo, el anticuerpo.

Los términos "cromatografía distinta de afinidad" y "purificación distinta de afinidad" se refieren a un procedimiento de purificación en el que no se utiliza cromatografía de afinidad. La cromatografía distinta de afinidad incluye técnicas cromatográficas que se basan en interacciones no específicas entre una molécula de interés (tal como una proteína, por ejemplo, un anticuerpo) y una matriz en fase sólida.

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

El término "resina de intercambio aniónico" se usa en el presente documento para hacer referencia a una fase sólida que está cargada positivamente, por ejemplo, que tiene uno o más ligandos cargados positivamente, tales como grupos amino cuaternarios, unidos a la misma. Las resinas de intercambio aniónico disponibles comercialmente incluyen DEAE-celulosa, QAE SEPHADEX™ y FAST Q SEPHAROSE™ (Pharmacia).

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

El "tampón de carga" es el que se usa para cargar la composición que comprende la molécula de polipéptido de interés y una o más impurezas en la resina de intercambio iónico. El tampón de carga tiene una conductividad y/o pH de modo que la molécula de polipéptido de interés (y, en general, una o más impurezas) se una(n) a la resina de intercambio iónico o de modo que la proteína de interés fluya a través de la columna mientras las impurezas se unen a la resina.

El "tampón intermedio" se usa para eluir una o más impurezas de la resina de intercambio iónico, antes de eluir la molécula de polipéptido de interés. La conductividad y/o pH del tampón intermedio es/son tal(es) que una o más impurezas se eluyan de la resina de intercambio iónico, pero no cantidades significativas del polipéptido de interés.

El término "tampón de lavado" cuando se usa en el presente documento se refiere a un tampón usado para lavar o volver a equilibrar la resina de intercambio iónico, antes de eluir la molécula de polipéptido de interés. Convenientemente, el tampón de lavado y el tampón de carga pueden ser iguales, pero esto no se requiere.

El "tampón de elución" se usa para eluir el polipéptido de interés de la fase sólida. La conductividad y/o pH del tampón de elución es/son tal(es) que el polipéptido de interés se eluya de la resina de intercambio iónico.

Se puede usar un "tampón de regeneración" para regenerar la resina de intercambio iónico de modo que se pueda volver a usar. El tampón de regeneración tiene una conductividad y/o pH según se requiera para retirar

sustancialmente todas las impurezas y el polipéptido de interés de la resina de intercambio iónico.

La expresión "sustancialmente similar" o "sustancialmente igual", como se usa en el presente documento, indica un grado suficientemente alto de similitud entre dos valores numéricos (por ejemplo, uno asociado con un anticuerpo de la invención y el otro asociado con un anticuerpo de referencia/comparación), de modo que un experto en la técnica consideraría que la diferencia entre los dos valores fuera de poca o ninguna significación biológica y/o estadística dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores de Kd). La diferencia entre dichos dos valores, por ejemplo, es de menos de aproximadamente un 50 %, de menos de aproximadamente un 40 %, de menos de aproximadamente un 30 %, de menos de aproximadamente un 20 % y/o de menos de aproximadamente un 10 % como una función del valor de referencia/comparación.

La frase "sustancialmente reducido" o "sustancialmente diferente", como se usa en el presente documento con respecto a cantidades o valores numéricos (y no como referencia al procedimiento químico de reducción), indica un grado suficientemente alto de diferencia entre dos valores numéricos (en general, uno asociado con una molécula y el otro asociado con una molécula de referencia/comparación), de modo que un experto en la técnica consideraría que la diferencia entre los dos valores fuera de significación estadística dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores de Kd). La diferencia entre dichos dos valores, por ejemplo, es mayor que aproximadamente un 10 %, mayor que aproximadamente un 20 %, mayor que aproximadamente un 30 %, mayor que aproximadamente un 40 % y/o mayor que aproximadamente un 50 % como una función del valor para la molécula de referencia/comparación.

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

El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia polipeptídica de referencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácido en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácido en la secuencia polipeptídica de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin tener en consideración ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. Se puede lograr la alineación para los propósitos de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos de diversas formas que están dentro de la habilidad en la técnica, por ejemplo, usando un programa informático disponible públicamente, tal como el programa informático BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr la máxima alineación sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Sin embargo, para los propósitos en el presente documento, se generan valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 se creó por Genentech, Inc., y el código fuente se ha presentado con la documentación de usuario en la Oficina de Derechos de Autor de EE. UU., Washington D.C., 20559, donde se ha registrado con el n.º de registro de derecho de autor de EE. UU. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente de Genentech, Inc., South San Francisco, California, o se puede compilar a partir del código fuente. Se debe compilar el programa ALIGN-2 para su uso en un sistema operativo UNIX, preferentemente UNIX V4.0D digital. Se establecen todos los parámetros de comparación de secuencias por el programa ALIGN-2 y no varían.

En situaciones donde se emplea ALIGN-2 para las comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A dada con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos B dada (que, de forma alternativa, se puede parafrasear como una secuencia de aminoácidos A dada que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos B dada) se calcula como sigue:

100 veces la fracción X/Y

donde X es el número de residuos de aminoácido puntuados como emparejamientos idénticos por

el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en esa alineación del programa de A

y B, y

donde Y es el número total de residuos de aminoácido en B.

Se apreciará que si la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no igualará el % de identidad de secuencia de aminoácidos de B con respecto a A. A menos que se indique específicamente de otro modo, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usados en el presente documento se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente precedente usando el programa informático ALIGN-2.

Se define "porcentaje (%) de identidad de secuencia de ácido nucleico" como el porcentaje de nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos a los nucleótidos en una secuencia que codifica el factor D de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia. Se puede lograr la alineación para los propósitos de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de ácido nucleico de diversas formas que están dentro de la habilidad en la técnica, por ejemplo, usando un programa informático disponible públicamente, tal como el programa informático BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr la máxima alineación sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. A continuación, se calcula la identidad de secuencia en relación con la secuencia más larga, es decir, incluso si una secuencia más corta muestra un 100 % de identidad de secuencia con una porción de una secuencia más larga, la identidad de secuencia global será de menos de un 100 %.

"Tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya presentan el trastorno, así como aquellos en los que se va a evitar el trastorno. El "tratamiento" en el presente documento engloba el alivio de la enfermedad y de los signos y síntomas de la enfermedad particular.

Un "trastorno" es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento con la proteína. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas, incluyendo las afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Los ejemplos no limitantes de trastornos que se van a tratar en el presente documento incluyen carcinomas y alergias.

"Mamífero" para los propósitos de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo seres humanos, primates superiores no humanos, otros vertebrados, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, para la práctica de deportes o mascotas, tales como perros, caballos, gatos, vacas, etc. Preferentemente, el mamífero es un ser humano.

B. Procedimientos y materiales ejemplares para llevar a cabo la invención

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

1. *Producción recombinante de proteínas en células huésped de mamífero usando un medio de cultivo celular libre de glutamina*

La presente invención se refiere a la producción recombinante a gran escala de anticuerpos, fragmentos de anticuerpo e inmunoadhesinas en células CHO usando un medio de cultivo celular libre de glutamina complementado con asparagina. Las células de mamífero se han convertido en el sistema dominante para la producción de proteínas de mamífero para aplicaciones clínicas, principalmente debido a su capacidad de producir proteínas heterólogas plegadas y ensambladas apropiadamente, y su capacidad para modificaciones postraduccionales. Se han autorizado células de ovario de hámster chino (CHO) y líneas celulares obtenidas de diversas fuentes de mamífero adicionales, tales como, por ejemplo, células de mieloma de ratón (NS0), de riñón de cría de hámster (BHK), de riñón embrionario humano (HEK-293) y de la retina humana por agencias reguladoras para la producción de productos biofarmacéuticos, incluyendo anticuerpos terapéuticos. De estas, las células de ovario de hámster chino (CHO) están entre los huéspedes industriales más comúnmente usados, que se emplean ampliamente para la producción de proteínas heterólogas. Por tanto, los procedimientos para la producción a gran escala de anticuerpos en CHO, incluyendo células CHO negativas para dihidrofolato reductasa ($DHFR^-$), son bien conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, Trill *et al.*, Curr. Opin. Biotechnol. 6(5):553-60 (1995) y la patente de EE. UU. n.º 6.610.516).

Como primera etapa, se puede insertar el ácido nucleico (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) que codifica la proteína recombinante deseada en un vector replicable para su clonación (amplificación del ADN) o para su expresión. Diversos vectores están disponibles públicamente. Los componentes del vector incluyen, en general, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de finalización de la transcripción, describiéndose cada uno a continuación. Las secuencias señal, orígenes de replicación, genes marcadores, elementos potenciadores y secuencias de finalización de la transcripción opcionales que se pueden emplear son conocidos en la técnica y se describen con más detalle en las publicaciones PCT WO 97/25428.

Los vectores de expresión y clonación normalmente contienen un promotor que se reconoce por el organismo huésped y se enlaza de forma funcional a la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína. Los promotores son secuencias no traducidas localizadas en dirección 5′ con respecto al codón de iniciación de un gen estructural (en general, dentro de aproximadamente 100 a 1000 pb) que controlan la transcripción y traducción de una secuencia de ácido nucleico particular a la que se enlazan de forma funcional. Dichos promotores típicamente se dividen en dos clases, inducibles y constitutivos. Los promotores inducibles son promotores que inician niveles incrementados de transcripción del ADN bajo su control en respuesta a algún cambio en las condiciones de cultivo, por ejemplo, la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura. En este momento, es bien conocido un gran número de promotores reconocidos por una variedad de células huésped potenciales. Estos promotores se enlazan de forma funcional al ADN que codifica la proteína deseada retirando el promotor del ADN origen por digestión con enzimas de restricción e insertando la secuencia del promotor aislado en el vector.

Los promotores adecuados para su uso con huéspedes procariotas y eucariotas son conocidos en la técnica, y se describen con más detalle en la publicación PCT n.º WO97/25428.

La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de los componentes enumerados anteriormente emplea técnicas de fijación estándar. Los plásmidos aislados o fragmentos de ADN se escinden, adaptan y vuelven a fijar en la forma deseada para generar los plásmidos requeridos.

Para el análisis para confirmar las secuencias correctas en plásmidos construidos, se pueden usar mezclas de fijación para transformar células de *E. coli*, tales como la cepa K12-294 de *E. coli* (ATCC® 31.446), y seleccionar los transformantes satisfactorios por su resistencia a ampicilina o tetraciclina si fuera apropiado. Los plásmidos de los transformantes se preparan, analizan por digestión con endonucleasas de restricción y/o secuencian usando técnicas estándar conocidas en la técnica. (Véanse, por ejemplo, Messing *et al.*, Nucleic Acids Res. 1981, 9:309; Maxam *et al.*, Methods in Enzymology 1980, 65:499).

Se pueden emplear vectores de expresión que proporcionen la expresión transitoria en células de mamífero. En general, la expresión transitoria implica el uso de un vector de expresión que se pueda replicar eficazmente en una célula huésped, de modo que la célula huésped acumule muchas copias del vector de expresión y, a su vez, sintetice altos niveles de un polipéptido deseado codificado por el vector de expresión (Sambrook *et al.*, *supra*). Los sistemas de expresión transitorios, que comprenden un vector de expresión adecuado y una célula huésped, permiten la identificación positiva conveniente de polipéptidos codificados por ADN clonados, así como el cribado rápido de dichos polipéptidos para determinar las propiedades biológicas o fisiológicas deseadas.

Otros procedimientos, vectores y células huésped adecuados para la adaptación a la síntesis de una proteína heteróloga deseada en un cultivo de células de vertebrado recombinantes se describen en Gething *et al.*, Nature 1981, 293:620-625; Mantei *et al.*, Nature 1979, 281:40-46; los documentos EP 117.060; y EP 117.058.

Para la producción a gran escala, de acuerdo con la presente invención, las células CHO se transfectan y preferentemente se transforman con los vectores de expresión descritos anteriormente y se cultivan en medios de nutrientes modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

La transfección se refiere a la adopción de un vector de expresión por una célula huésped, se exprese o no, de hecho, cualquier secuencia codificante. Numerosos procedimientos de transfección son conocidos por el experto en la técnica, por ejemplo, $CaPO_4$ y electroporación. La transfección satisfactoria se reconoce, en general, cuando se produce cualquier indicación del funcionamiento de este vector dentro de la célula huésped.

La transformación quiere decir introducir ADN en un organismo de modo que el ADN sea replicable, como un elemento extracromosómico o bien como integrante cromosómico. Dependiendo de la célula huésped usada, la transformación se realiza usando técnicas estándar apropiadas para dichas células. El tratamiento con calcio que emplea cloruro de calcio, como se describe en Sambrook *et al.*, 1989, *supra*, o electroporación, se usa, en general, para procariotas u otras células que contienen barreras de paredes celulares sustanciales. Se usa la infección con *Agrobacterium tumefaciens* para la transformación de determinadas células vegetales, como se describe (Shaw *et al.*, Gene 1983, 23:315 y la publicación PCT n.º WO 89/05859). Además, se pueden transfectar plantas usando tratamiento con ultrasonidos, publicación PCT n.º WO 91/00358, publicada el 10 de enero de 1991.

Para las células de mamífero sin dichas paredes celulares, se puede emplear el procedimiento de precipitación con fosfato de calcio (Graham y van der Eb, Virology 1978, 52:456-457). Se han descrito aspectos generales de las transformaciones en sistemas de células huésped de mamífero en la patente de EE. UU. n.º 4.399.216. Para obtener diversas técnicas para transformar células de mamífero, véanse también Keown *et al.*, Methods in Enzymology 1990, 185:527-537 y Mansour *et al.*, Nature 1988, 336:348-352.

Durante la producción a gran escala, para empezar el ciclo de producción, normalmente se permite que un pequeño número de células huésped recombinantes transformadas crezcan en cultivo durante varios días. Una vez que las células se han sometido a varias tandas de replicación, se transfieren a un recipiente más grande donde se preparan para someterse a fermentación. Los medios en los que se cultivan las células y los niveles de oxígeno, nitrógeno y dióxido de carbono que existen durante el ciclo de producción pueden tener un impacto significativo sobre el procedimiento de producción. Se determinan específicamente parámetros de crecimiento para cada línea celular y estos parámetros se miden con frecuencia para garantizar las condiciones óptimas de crecimiento y producción.

Cuando las células crecen en números suficientes, se transfieren a depósitos de producción a gran escala para empezar la fase de producción y se cultivan durante un periodo de tiempo más largo. En este punto del procedimiento, se puede recoger la proteína recombinante. Típicamente, se genomanipulan las células para que secreten el polipéptido en los medios de cultivo celular, por lo que la primera etapa en el procedimiento de purificación es separar las células de los medios. La recogida incluye normalmente la centrifugación y filtración para producir un líquido de cultivo celular recogido (HCCF). A continuación, se somete el medio a varias etapas de purificación adicionales que retirarán cualquier resto celular, proteínas no deseadas, sales, minerales u otros elementos indeseables. Al final del procedimiento de purificación, la proteína recombinante es altamente pura y es adecuada para su uso terapéutico humano.

Aunque este procedimiento ha sido objeto de mucho estudio y mejoras durante las últimas décadas, existe margen de mejoras adicionales en la producción comercial a gran escala de proteínas recombinantes, tales como anticuerpos. Por tanto, los incrementos de la viabilidad celular, longevidad y productividad específica de los cultivos de células huésped de mamífero y las mejoras en el valor de las proteínas recombinantes producidas tienen un auténtico impacto sobre el precio de la proteína recombinante producida y, en el caso de las proteínas terapéuticas, el precio y la disponibilidad de los medicamentos.

La presente invención se refiere a un procedimiento mejorado para la producción de anticuerpos heterólogos, fragmentos de anticuerpo e inmunoadhesinas en cultivo de células CHO, usando un medio de cultivo libre de glutamina con asparagina añadida en la fase de producción del procedimiento de cultivo celular. Los medios de cultivo usados en el procedimiento de la presente invención se pueden basar en cualquier medio disponible comercialmente para la producción recombinante de proteínas en células CHO.

Los ejemplos de medios de cultivo disponibles comercialmente incluyen F10 de Ham (Sigma), medio mínimo esencial ("MEM", Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y medio de Eagle modificado de Dulbecco ("DMEM", Sigma). Cualquiera de dichos medios se puede complementar según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleósidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco Gentamycin™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos presentes normalmente en concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También se puede incluir cualquier otro complemento necesario a concentraciones apropiadas que serían conocidas por los expertos en la técnica. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son las usadas previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión, y serán evidentes para el experto en la técnica. Además, los medios de cultivo de la presente invención se pueden basar en cualquiera de los medios descritos en Ham y McKeehan, Meth. Enz., 58: 44 (1979); Barnes y Sato, Anal. Biochem., 102: 255 (1980); la pat. de EE. UU. n.º 4.767.704; pat. de EE. UU. n.º 4.657.866; pat. de EE. UU. n.º 4.927.762; pat. de

EE. UU. n.º 5.122.469 o pat. de EE. UU. n.º 4.560.655; los documentos WO 90/03430; y WO 87/00195, siempre que se omita la glutamina como ingrediente.

En condiciones libres de glutamina, se requiere asparagina, puesto que las células de mamífero pueden sintetizar asparagina solo en presencia de glutamina. Se sintetiza asparagina por transferencia de amida desde glutamina en presencia de asparagina sintasa. Se añade asparagina al medio de cultivo a una concentración de 10 mM.

En general, se pueden hallar principios, protocolos y técnicas prácticas para maximizar la productividad de los cultivos de células de mamífero, y se pueden adaptar para la producción de proteínas recombinantes usando los medios de cultivo celular en el presente documento.

Los nutrientes y factores de crecimiento necesarios para el medio, incluyendo sus concentraciones, para una línea celular particular, se determinan de forma empírica sin experimentación excesiva como se describe, por ejemplo, en *Mammalian Cell Culture*, Mather, ed. (Plenum Press: NY, 1984); Barnes y Sato, Cell, 22: 649 (1980) *o Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach,* M. Butler, ed. (IRL Press, 1991). Un medio adecuado contiene un componente del medio basal, tal como una formulación basada en DMEM/HAM F-12 (para obtener la composición de los medios DMEM y HAM F12 y especialmente medios libres de suero, véanse las formulaciones de medios de cultivo en el American Type Culture Collection Catalogue of Cell Lines and Hybridomas, sexta edición, 1988, páginas 346-349), con concentraciones modificadas de algunos componentes, tales como aminoácidos, sales, azúcar y vitaminas, y que contienen opcionalmente glicina, hipoxantina y timidina; insulina humana recombinante, peptona hidrolizada, tal como PRIMATONE HS™ o PRIMATONE RL™ (Sheffield, Inglaterra), o el equivalente; un agente protector de células, tal como PLURONIC F68™ o el poliol plurónico equivalente; GENTAMYCIN™; y oligoelementos. Las formulaciones del medio como se describe en la pat. de EE. UU. n.º 5.122.469, caracterizadas por la presencia de altos niveles de determinados aminoácidos, así como PS-20 como se describe a continuación, son apropiadas en particular.

Las glucoproteínas de la presente invención se pueden producir por células en cultivo que expresan la glucoproteína deseada en una variedad de condiciones de cultivo celular. Se pueden usar procedimientos que incluyan, pero sin limitarse a, un biorreactor de lecho fluidizado, biorreactor de fibras huecas, cultivo en frasco giratorio o sistema de biorreactores con depósito agitado, en los dos últimos sistemas, con o sin microportadores, y hecho funcionar de forma alternativa en un modo por lotes, por lotes alimentados o continuo.

En un modo de realización particular, se realiza el cultivo celular de la presente invención en un sistema de biorreactores con depósito agitado y se emplea un procedimiento de cultivo por lotes alimentados. En el cultivo por lotes alimentados preferente, las células huésped CHO y el medio de cultivo se suministran inicialmente a un recipiente de cultivo y se alimentan nutrientes de cultivo adicionales, de forma continua o en incrementos discretos, al cultivo durante el cultivo, con o sin recogida periódica de células y/o productos antes de la finalización del cultivo. El cultivo por lotes alimentados puede incluir, por ejemplo, un cultivo por lotes alimentados semicontinuo, en el que se retira periódicamente el cultivo completo (incluyendo las células y el medio) y se reemplaza por medio recién preparado. El cultivo por lotes alimentados se distingue del simple cultivo por lotes en que todos los componentes para cultivar células (incluyendo las células y todos los nutrientes de cultivo) se suministran al recipiente de cultivo al comienzo del procedimiento de cultivo. El cultivo por lotes alimentados se puede distinguir además del cultivo por perfusión en la medida en que el sobrenadante no se retira del recipiente de cultivo durante el procedimiento (en el cultivo por perfusión, las células se retienen en el cultivo, por ejemplo, por filtración, encapsulación, sujeción a microportadores, etc., y el medio de cultivo se introduce de forma continua o intermitente y se retira del recipiente de cultivo).

Además, las células del cultivo se pueden propagar de acuerdo con cualquier esquema o rutina que pueda ser adecuada para la célula huésped particular y el plan de producción particular contemplado. Por lo tanto, la presente invención contempla un procedimiento de cultivo de una única etapa o de múltiples etapas. En un cultivo de una única etapa, las células huésped se inoculan en un entorno de cultivo y se emplean los procedimientos de la presente invención durante una única fase de producción del cultivo celular. De forma alternativa, se concibe un cultivo de múltiples fases. En el cultivo de múltiples fases, se pueden cultivar las células en una serie de etapas o fases. Por ejemplo, se pueden cultivar células en una primera etapa o cultivo en fase de crecimiento, en el que las células, posiblemente retiradas del almacenamiento, se inoculan en un medio adecuado para promover el crecimiento y la alta viabilidad. Las células se pueden mantener en la fase de crecimiento durante un periodo de tiempo adecuado por la adición de medio recién preparado al cultivo de células huésped.

De acuerdo con un aspecto específico de la invención, se diseñan condiciones de cultivo celular por lotes alimentados o continuo para potenciar el crecimiento de las células CHO en la fase de crecimiento del cultivo celular. En la fase de crecimiento, se cultivan células en condiciones y durante un periodo de tiempo que se maximiza para su crecimiento. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, pH, oxígeno disuelto (DO_2), y similares, son las usadas con el huésped particular y serán evidentes para el experto en la técnica. En general, el pH se ajusta a un nivel de entre aproximadamente 6,5 y 7,5 usando un ácido (por ejemplo, CO_2) o bien una base (por ejemplo, Na_2CO_3 o NaOH). Un intervalo de temperaturas adecuado para cultivar células de mamífero, tales como células CHO, es entre aproximadamente 30 a 40 °C y preferentemente aproximadamente 37 °C, y un DO_2

adecuado es entre 5-90 % de saturación de aire.

En una fase particular, se pueden usar las células para inocular una fase o etapa de producción del cultivo celular. De forma alternativa, como se describe anteriormente, la fase o etapa de producción puede ser continua con la fase o etapa de inoculación o crecimiento.

La producción de una proteína diana en células de mamífero, por ejemplo, CHO, típicamente emplea un procedimiento semicontinuo, con lo que las células se cultivan en un "tren de semillas" durante diversos periodos de tiempo y se transfieren periódicamente a fermentadores con inóculo para generar suficiente masa celular para inocular un fermentador de producción a escala más grande. Por tanto, las células usadas para la producción de la proteína deseada están en cultivo durante diversos periodos de tiempo hasta una máxima edad celular predefinida. Los parámetros del procedimiento de cultivo celular, tales como densidad de las semillas, pH, DO_2 y temperatura durante el cultivo, duración del cultivo de producción, condiciones de funcionamiento de la recogida, etc., son una función de la línea celular y el medio de cultivo particulares usados, y se pueden determinar de forma empírica, sin experimentación excesiva.

De acuerdo con la presente invención, se controla el entorno de cultivo celular durante la fase de producción del cultivo celular. En un aspecto preferente, la fase de producción del procedimiento de cultivo celular está precedida por una fase de transición del cultivo celular en que se integran los parámetros para la fase de producción del cultivo celular.

El polipéptido deseado, tal como el anticuerpo, se recupera preferentemente del medio de cultivo como un polipéptido secretado, aunque también se puede recuperar de los lisados de células huésped cuando se produce directamente sin una señal secretora. Si el polipéptido está unido a membrana, se puede liberar de la membrana usando una solución de detergente adecuada (por ejemplo, Triton-X 100) o su región extracelular se puede liberar por escisión enzimática.

Cuando el polipéptido se produce en una célula recombinante distinta de una de origen humano, está libre de proteínas o polipéptidos de origen humano. Sin embargo, normalmente es necesario recuperar o purificar proteínas recombinantes de proteínas o polipéptidos de células recombinantes para obtener preparaciones que sean sustancialmente homogéneas en cuanto al polipéptido deseado. Como primera etapa, el medio de cultivo o lisado se puede centrifugar para retirar los restos celulares particulados. Después de esto, el polipéptido heterólogo se purifica de proteínas y polipéptidos solubles contaminantes, siendo los siguientes procedimientos ejemplares de procedimientos de purificación adecuados: por fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, tal como SP-Sepharose™ o CM-Sepharose™; hidroxiapatita; cromatografía de interacción hidrófoba; precipitación con etanol; cromatoenfoque; precipitación con sulfato de amonio; filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75™; y/o diafiltración.

Se pueden aislar polipéptidos recombinantes, por ejemplo, por cromatografía de afinidad.

Un inhibidor de proteasa, tal como fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), también puede ser útil para inhibir la degradación proteolítica durante la purificación, y se pueden incluir antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes casuales. Un experto en la técnica apreciará que se pueden usar procedimientos de purificación adecuados para la purificación y aislamiento de proteínas recombinantes, incluyendo anticuerpos, en el presente documento, y modificar si fuera necesario, usando técnicas estándar.

Se puede medir directamente la expresión de la proteína heteróloga deseada en una muestra, por ejemplo, por transferencia de Southern convencional, transferencia de Northern para cuantificar la transcripción del ARNm (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1980, 77:5201-5205), transferencia en mancha (análisis del ADN), o hibridación *in situ*, usando una sonda marcada apropiadamente, basada en las secuencias proporcionadas en el presente documento. Se pueden emplear diversos marcadores, lo más comúnmente radioisótopos, y, en particular, ^{32}P. Sin embargo, también se pueden emplear otras técnicas, tales como usar nucleótidos modificados con biotina para su introducción en un polinucleótido. La biotina sirve entonces como el sitio de unión a avidina o anticuerpos, que se pueden marcar con una amplia variedad de marcadores, tales como radionúclidos, fluorescentes o enzimas. De forma alternativa, se pueden emplear anticuerpos que puedan reconocer dúplex específicos, incluyendo dúplex de ADN, dúplex de ARN y dúplex de ADN-ARN híbridos o dúplex de ADN-proteína. A su vez, se pueden marcar los anticuerpos y se puede llevar a cabo el ensayo donde el dúplex se una a una superficie, de modo que tras la formación del dúplex en la superficie, se pueda detectar la presencia de anticuerpo unido al dúplex.

De forma alternativa, se puede medir la expresión génica por procedimientos inmunológicos, tales como tinción inmunohistoquímica de células o cortes histológicos y ensayo de cultivo celular o de líquidos corporales, para cuantificar directamente la expresión del producto génico. Con las técnicas de tinción inmunohistoquímica, se prepara una muestra celular, típicamente por deshidratación y fijación, seguido de reacción con anticuerpos marcados específicos para el producto génico acoplado, donde los marcadores normalmente son visualmente detectables, tales como marcadores enzimáticos, marcadores fluorescentes, marcadores luminiscentes y similares. Los anticuerpos útiles para su tinción inmunohistoquímica y/o ensayo de líquidos de muestra pueden ser

monoclonales o bien policlonales, y se pueden preparar en cualquier mamífero.

2. *Anticuerpos*

En un modo de realización preferente, se usan los procedimientos de la presente invención para la producción recombinante de anticuerpos, incluyendo anticuerpos terapéuticos y de diagnóstico. Los anticuerpos dentro del alcance de la presente invención incluyen, pero no se limitan a: anticuerpos anti-HER2, incluyendo trastuzumab (HERCEPTIN®) (Carter *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 89:4285-4289 (1992), patente de EE. UU. n.º 5.725.856); anticuerpos anti-CD20, tales como "C2B8" anti-CD20 quimérico como en la patente de EE. UU. n.º 5.736.137 (RITUXAN®), una variante quimérica o humanizada del anticuerpo 2H7 como en la patente de EE. UU. n.º 5.721.108B1, o tositumomab (BEXXAR®); anti-IL-8 (St John *et al., Chest,* 103:932 (1993) y la publicación internacional n.º WO 95/23865); anticuerpos anti-VEGF, incluyendo anticuerpos anti-VEGF humanizados y/o madurados en afinidad, tales como el anticuerpo anti-VEGF humanizado huA4.6.1 AVASTIN® (Kim *et al., Growth Factors,* 7:53-64 (1992), publicación internacional n.º WO 96/30046 y documento WO 98/45331, publicado el 15 de octubre de 1998); anticuerpos anti-PSCA (documento WO01/40309); anticuerpos anti-CD40, incluyendo S2C6 y variantes humanizadas del mismo (documento WO00/75348); anti-CD11a (patente de EE. UU. n.º 5.622.700, documento WO 98/23761, Steppe *et al., Transplant Intl.* 4:3-7 (1991) y Hourmant *et al., Transplantation* 58:377-380 (1994)); anti-IgE (Presta *et al., J. Immunol.* 151:2623-2632 (1993), y la publicación internacional n.º WO 95/19181); anti-CD18 (patente de EE. UU. n.º 5.622.700, emitida el 22 de abril de 1997, o como en el documento WO 97/26912, publicado el 31 de julio de 1997); anti-IgE (incluyendo E25, E26 y E27; patente de EE. UU. n.º 5.714.338, emitida el 3 de febrero de 1998, o patente de EE. UU. n.º 5.091.313, emitida el 25 de febrero de 1992, documento WO 93/04173, publicado el 4 de marzo de 1993, o solicitud internacional n.º PCT/US98/13410, presentada el 30 de junio de 1998, patente de EE. UU. n.º 5.714.338); anticuerpo anti-receptor de Apo-2 (documento WO 98/51793, publicado el 19 de noviembre de 1998); anticuerpos anti-TNF-α, incluyendo cA2 (REMICADE®), CDP571 y MAK-195 (véanse la patente de EE. UU. n.º 5.672.347, emitida el 30 de septiembre de 1997, Lorenz *et al., J. Immunol.* 156(4):1646-1653 (1996) y Dhainaut *et al., Crit. Care Med.* 23(9):1461-1469 (1995)); anti-factor tisular (TF) (patente europea n.º 0 420 937 B1, concedida el 9 de noviembre de 1994); anti-integrina $\alpha_4\beta_7$ humana (documento WO 98/06248, publicado el 19 de febrero de 1998); anti-EGFR (anticuerpo 225 quimerizado o humanizado, como en el documento WO 96/40210, publicado el 19 de diciembre de 1996); anticuerpos anti-CD3, tales como OKT3 (patente de EE. UU. n.º 4.515.893, emitida el 7 de mayo de 1985); anticuerpos anti-CD25 o anti-tac, tales como CHI-621 (SIMULECT®) y (ZENAPAX®) (véase la patente de EE. UU. n.º 5.693.762, emitida el 2 de diciembre de 1997); anticuerpos anti-CD4, tales como el anticuerpo cM-7412 (Choy *et al., Arthritis Rheum* 39(1):52-56 (1996)); anticuerpos anti-CD52, tales como CAMPATH-1H (Riechmann *et al., Nature 332:323-337* (1988)); anticuerpos anti-receptor de Fc, tales como el anticuerpo M22 dirigido frente a FcγRI como en Graziano *et al., J. Immunol.* 155(10):4996-5002 (1995); anticuerpos frente al antígeno carcinoembrionario (CEA), tales como hMN-14 (Sharkey *et al., Cancer Res.* 55 (23 Supl): 5935s-5945s (1995); anticuerpos dirigidos frente a células epiteliales de mama, incluyendo huBrE-3, hu-Mc 3 y CHL6 (Ceriani *et al., Cancer Res.* 55(23): 5852s-5856s (1995); y Richman *et al., Cancer Res.* 55 (23 Sup): 5916s-5920s (1995)); anticuerpos que se unen a células de carcinoma de colon, tales como C242 (Litton *et al., Eur J. Immunol.* 26(1): 1-9 (1996)); anticuerpos anti-CD38, por ejemplo, AT 13/5 (Ellis *et al., J. Immunol.* 155(2):925-937 (1995)); anticuerpos anti-CD33, tales como Hu M195 (Jurcic *et al., Cancer Res* 55 (23 Supl):5908s-5910s (1995) y CMA-676 o CDP771; anticuerpos anti-CD22, tales como LL2 o LymphoCide (Juweid *et al., Cancer Res* 55 (23 Supl):5899s-5907s (1995)); anticuerpos anti-EpCAM, tales como 17-1A (PANOREX®); anticuerpos anti-GpIIb/IIIa, tales como abciximab o Fab c7E3 (REOPRO®); anticuerpos anti-RSV, tales como MEDI-493 (SYNAGIS®); anticuerpos anti-CMV, tales como PROTOVIR®; anticuerpos anti-VIH, tales como PRO542; anticuerpos antihepatitis, tales como el anticuerpo anti-Hep B OSTAVIR®; anticuerpo anti-CA 125 OvaRex; anticuerpo anti-epítopo de GD3 idiotípico BEC2; anticuerpo anti-αvβ3 VITAXIN®; anticuerpo anti-carcinoma de células renales humano, tal como ch-G250; ING-1; anticuerpo anti-17-1A humano (3622W94); anticuerpo anti-tumor colorrectal humano (A33); anticuerpo anti-melanoma humano R24 dirigido frente a ganglíosido GD3; anticuerpos anti-carcinoma de células escamosas humano (SF-25); y anticuerpos anti-antígeno leucocitario humano (HLA), tales como Smart ID10 y el anticuerpo anti-HLA DR Oncolym (Lym-1). Los antígenos diana preferentes para el anticuerpo en el presente documento son: receptor HER2, VEGF, IgE, CD20, CD11a y CD40.

Muchos de estos anticuerpos se usan ampliamente en la práctica clínica para tratar diversas enfermedades, incluyendo cáncer.

En determinados modos de realización específicos, se usan los procedimientos de la presente invención para la producción de los siguientes anticuerpos.

Anticuerpos anti-CD20

Rituximab (RITUXAN®) es un anticuerpo monoclonal murino/humano quimérico genomanipulado dirigido frente al antígeno CD20. Rituximab es el anticuerpo llamado "C2B8" en la pat. de EE. UU. n.º 5.736.137, emitida el 7 de abril de 1998 (Anderson *et al.).* Rituximab está indicado para el tratamiento de pacientes con linfoma no hodgkiniano de linfocitos B, positivo para CD20, de escasa malignidad o folicular y recidivante o resistente al tratamiento. Los estudios sobre el mecanismo de acción *in vitro* han demostrado que rituximab se une al

complemento humano y lisa las líneas de linfocitos B linfáticos a través de la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) (Reff *et al.,* Blood 83(2):435-445 (1994)). Adicionalmente, tiene una actividad significativa en los ensayos para determinar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Más recientemente, rituximab ha demostrado que tiene efectos antiproliferativos en los ensayos de incorporación de timidina tritiada e induce directamente la apoptosis, mientras que otros anticuerpos anti-CD19 y CD20 no lo hacen (Maloney *et al.,* Blood 88(10):637a (1996)). La sinergia entre rituximab y las quimioterapias y toxinas también se ha observado experimentalmente. En particular, rituximab sensibiliza las líneas celulares de linfoma de linfocitos B humanas resistentes a los fármacos a los efectos citotóxicos de doxombicina, CDDP, VP-1 6, toxina diftérica y ricina (Demidem *et al.,* Cancer Chemotherapy & Radiopharmaceuticals 12(3): 177-186 (1997)). Los estudios preclínicos *in vivo* han demostrado que rituximab provoca una disminución de los linfocitos B de la sangre periférica, ganglios linfáticos y médula ósea de los macacos cangrejeros, presuntamente a través de procesos mediados por el complemento y las células (Reff *et al.,* Blood 83(2):435-445 (1994)).

Las patentes y publicaciones de patente relacionadas con los anticuerpos frente a CD20 incluyen las pat. de EE. UU. n.os 5.776.456, 5.736.137, 6.399.061 y 5.843.439, así como la solicitud de patentes de EE. UU. n.os US 2002/0197255A1, US 2003/0021781A1, US 2003/0082172 A1, US 2003/0095963 A1, US 2003/0147885 A1 (Anderson *et al.);* pat. de EE. UU. n.º 6.455.043B1 y los documentos WO00/09160 (Grillo-Lopez, A.); WO00/27428 (Grillo-Lopez y White); WO00/27433 (Grillo-Lopez y Leonard); WO00/44788 (Braslawsky *et al.);* WO01/10462 (Rastetter, W.); WO01/10461 (Rastetter y White); WO01/10460 (White y Grillo-Lopez); solicitud de EE. UU. n.º US2002/0006404 y el documento WO02/04021 (Hanna y Hariharan); solicitud de EE. UU. n.º US2002/0012665 A1 y el documento WO01/74388 (Hanna, N.); solicitud de EE. UU. n.º US 2002/0058029 A1 (Hanna, N.); solicitud de EE. UU. n.º US 2003/0103971 A1 (Hariharan y Hanna); solicitud de EE. UU. n.º US2002/0009444A1, y los documentos WO01/80884 (Grillo-Lopez, A.); WO01/97858 (White, C.); solicitud de EE. UU. n.º US2002/0128488A1 y los documentos WO02/34790 (Reff, M.); WO02/060955 (Braslawsky *et* al.); WO2/096948 (Braslawsky *et al.);* WO02/079255 (Reff y Davies); pat. de EE. UU. n.º 6.171.586B1 y los documentos WO98/56418 (Lam *et al.);* WO98/58964 (Raju, S.); WO99/22764 (Raju, S.); WO99/51642, pat. de EE. UU. n.º 6.194.551B1, pat. de EE. UU. n.º 6.242.195B1, pat. de EE. UU. n.º 6.528.624B1 y pat. de EE. UU. n.º 6.538.124 (Idusogie *et al.);* los documentos WO00/42072 (Presta, L.); WO00/67796 (Curd *et al.);* WO01/03734 (Grillo-Lopez *et al.);* solicitud de EE. UU. n.º US 2002/0004587A1 y el documento WO01/77342 (Miller y Presta); solicitud de EE. UU. n.º US2002/0197256 (Grewal, I.); solicitud de EE. UU. n.º US 2003/0157108 A1 (Presta, L.); pat. de EE. UU. n.os 6.090.365B1, 6.287.537B1, 6.015.542, 5.843.398 y 5.595.721, (Kaminski *et al.);* pat. de EE. UU. n.os 5.500.362, 5.677.180, 5.721.108 y 6.120.767 (Robinson *et al.);* pat. de EE. UU. n.º 6.410.391B1 (Raubitschek *et al.);* pat. de EE. UU. n.º 6.224.866B1 y los documentos WO00/20864 (Barbera-Guillem, E.); WO01/13945 (Barbera-Guillem, E.); WO00/67795 (Goldenberg); solicitud de EE. UU. n.º US 2003/01339301 A1 y los documentos WO00/74718 (Goldenberg y Hansen); WO00/76542 (Golay *et al.);* WO01/72333 (Wolin y Rosenblatt); pat. de EE. UU. n.º 6.368.596B1 (Ghetie *et al.);* solicitud de EE. UU. n.º US2002/0041847 A1, (Goldenberg, D.); solicitud de EE. UU. n.º US2003/0026801A1 (Weiner y Hartmann); documento WO02/102312 (Engleman, E.); solicitud de patente de EE. UU. n.º 2003/0068664 (Albitar *et al.);* los documentos WO03/002607 (Leung, S.); WO 03/049694 y US 2003/0185796 A1 (Wolin *et al.)*; WO03/061694 (Sing y Siegall); US 2003/0219818 A1 (Bohen *et al.);* US 2003/0219433 A1 y WO 03/068821 (Hansen *et al.)*, incorporándose cada uno expresamente en el presente documento por referencia. Véanse, también, la pat. de EE. UU. n.º 5.849.898 y la solicitud EP n.º 330.191 (Seed *et al.);* la pat. de EE. UU. n.º 4.861.579 y el documento EP332.865A2 (Meyer y Weiss); la pat. de EE. UU. n.º 4.861.579 (Meyer *et al.)* y el documento WO95/03770 (Bhat *et al.).*

Las publicaciones relacionadas con el tratamiento con rituximab incluyen: Perotta y Abuel "Response of chronic relapsing ITP of 10 years duration to Rituximab", resumen n.º 3360 Blood 10(1) (parte 1-2): p. 88B (1998); Stashi *et al.,* "Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody treatment for adults with chronic idopathic thrombocytopenic purpura" Blood 98(4):952-957 (2001); Matthews, R. "Medical Heretics" New Scientist (7 de abril de 2001); Leandro *et al.,* "Clinical outcome in 22 patients with rheumatoid arthritis treated with B lymphocyte depletion" Ann Rheum Dis 61:833-888 (2002); Leandro *et al.,* "Lymphocyte depletion in rheumatoid arthritis: early evidence for safety, efficacy and dose response. Arthritis & Rheumatism 44(9): S370 (2001); Leandro *et al.,* "An open study of B lymphocyte depletion in systemic lupus erythematosus", Arthritis & Rheumatism 46(1):2673-2677 (2002); Edwards y Cambridge "Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete B lymphocytes" Rheumatology 40:205-211 (2001); Edwards *et al.,* "B-lymphocyte depletion therapy in rheumatoid arthritis and other autoimmune disorders" Biochem. Soc. Trans. 30(4):824-828 (2002); Edwards *et al.,* "Efficacy and safety of Rituximab, a B-cell targeted chimeric monoclonal antibody: A randomized, placebo controlled trial in patients with rheumatoid arthritis. Arthritis & Rheumatism 46(9): S197 (2002); Levine y Pestronk "IgM antibody-related polyneuropathies: B-cell depletion chemotherapy using Rituximab" Neurology 52: 1701-1704 (1999); DeVita *et al.,* "Efficacy of selective B cell blockade in the treatment of rheumatoid arthritis" Arthritis & Rheumatism 46:2029-2033 (2002); Hidashida *et al.,* "Treatment of DMARD-Refractory rheumatoid arthritis with rituximab", presentado en el Consejo Científico Anual del American College of Rheumatology; 24-29 de octubre; New Orleans, La. 2002; Tuscano, J. "Successful treatment of Infliximab-refractory rheumatoid arthritis with rituximab", presentado en el Consejo Científico Anual del American College of Rheumatology; 24-29 de octubre; New Orleans, La. 2002. Sarwal *et al.,* N. Eng. J. Med. 349(2): 125-138 (10 de julio de 2003) informa de la heterogeneidad molecular en el rechazo agudo de aloinjerto renal identificada por la detección con micromatrices de ADN.

En diversos modos de realización, la divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos anti-CD20 humanizados. En determinados modos de realización, la composición de anticuerpos humanizados de la divulgación comprende además alteraciones aminoacídicas en la Fc de IgG y presenta afinidad de unión incrementada por FcRn humano frente a un anticuerpo que tenga Fc de IgG natural, en al menos 60 veces, al menos 70 veces, al menos 80 veces, más preferentemente al menos 100 veces, preferentemente al menos 125 veces, incluso más preferentemente de al menos 150 veces a aproximadamente 170 veces.

El sitio de N-glucosilación en IgG está en Asn297 en el dominio C_H2. Las composiciones de anticuerpos humanizados incluyen composiciones de cualquiera de los anticuerpos humanizados precedentes que tienen una región Fc, en las que aproximadamente un 80-100 % (y preferentemente aproximadamente un 90-99 %) del anticuerpo en la composición comprende una estructura glucídica de núcleo maduro que está desprovista de fucosa, unida a la región Fc de la glucoproteína. Se demostró en el presente documento que dichas composiciones presentan una mejora sorprendente en la unión a Fc(RIIIA(F158), que no es tan eficaz como Fc(RIIIA (V158) en la interacción con IgG humana. Fc(RIIIA (F158) es más común que Fc(RIIIA (V158) en estadounidenses de raza negra e individuos de raza blanca normales y sanos. Véase Lehrnbecher *et al.,* Blood 94:4220 (1999). Históricamente, los anticuerpos producidos en las células de ovario de hámster chino (CHO), uno de los huéspedes industriales más comúnmente usados, contienen de aproximadamente un 2 a un 6 % en la población que no esté fucosilada. Sin embargo, YB2/0 y Lec13 pueden producir anticuerpos con de un 78 a un 98 % de especies no fucosiladas. Shinkawa *et al.,* J Bio. Chem. 278 (5), 3466-347 (2003), informaron de que los anticuerpos producidos en las células YB2/0 y Lec13, que tienen menos actividad FUT8, muestran actividad ADCC significativamente incrementada *in vitro*. La producción de anticuerpos con contenido de fucosa reducido también se describe, por ejemplo, en Li *et al.,* (GlycoFi) "Optimization of humanized IgGs in glycoengineered *Pichia pastoris*" en la publicación en línea de Nature Biology del 22 de enero de 2006; Niwa R. *et al.,* Cancer Res. 64(6):2127-2133 (2004); los documentos US 2003/0157108 (Presta); US 6.602.684 y US 2003/0175884 (Glycart Biotechnology); US 2004/0093621, US 2004/0110704, US 2004/0132140 (todos de Kyowa Hakko Kogyo).

Un anticuerpo humanizado biespecífico engloba un anticuerpo en el que un brazo del anticuerpo tiene al menos la región de unión a antígeno de la cadena H y/o L de un anticuerpo humanizado y el otro brazo tiene especificidad de unión a la región V para un segundo antígeno. En modos de realización específicos, los antígenos se seleccionan del grupo que consiste en CD-20, CD3, CD64, CD32A, CD16, NKG2D u otros ligandos activadores de NK.

Anticuerpos anti-HER2

Una versión humanizada recombinante del anticuerpo frente a HER2 murino 4D5 (huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, trastuzumab o HERCEPTIN®; patente de EE. UU. n.º 5.821.337) es clínicamente activa en pacientes con cánceres de mama metastásicos que sobreexpresan HER2 que han recibido un extenso tratamiento antineoplásico anterior (Baselga *et al., J. Clin. Oncol.* 14:737-744(1996)). Trastuzumab recibió la autorización de comercialización de la Food and Drug Administration (FDA) el 25 de septiembre de 1998 para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico en los que sus tumores sobreexpresan la proteína HER2. En noviembre de 2006, la FDA autorizó Herceptin como parte de un régimen de tratamiento que contenía doxorrubicina, ciclofosfamida y paclitaxel, para el tratamiento complementario de pacientes con cáncer de mama con ganglios positivos y positivo para HER2.

En diversos modos de realización, la divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos anti-HER2 humanizados. Se han descrito anticuerpos frente a HER2 con diversas propiedades en Tagliabue *et al.,* Int. J. Cancer 47:933-937 (1991); McKenzie *et al.,* Oncogene 4:543-548 (1989); Maier *et al.,* Cancer Res. 51:5361-5369 (1991); Bacus *et al.,* Molecular Carcinogenesis 3:350-362 (1990); Stancovski *et al.,* PNAS (USA) 88:8691-8695 (1991); Bacus *et al.,* Cancer Research 52:2580-2589 (1992); Xu *et al.,* Int. J. Cancer 53:401-408 (1993); documento WO94/00136; Kasprzyk *et al.,* Cancer Research 52:2771-2776 (1992); Hancock *et al.,* Cancer Res. 51:4575-4580 (1991); Shawver *et al.,* Cancer Res. 54:1367-1373 (1994); Arteaga *et al., Cancer Res.* 54:3758-3765 (1994); Harwerth *et al.,* J. Biol. Chem. 267:15160-15167 (1992); patente de EE. UU. n.º 5.783.186; y Klapper *et al.,* Oncogene 14:2099-2109 (1997).

Anticuerpos anti-VEGF

Los anticuerpos anti-VEGF, incluyendo anticuerpos anti-VEGF humanizados y/o madurados en afinidad, tales como el anticuerpo anti-VEGF humanizado huA4.6.1 AVASTIN® (Kim *et al., Growth Factors,* 7:53-64 (1992), publicación internacional n.º WO 96/30046 y documento WO 98/45331, publicado el 15 de octubre de 1998), están autorizados por la FDA para el tratamiento del cáncer. En diversos modos de realización, la divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos anti-VEGF humanizados.

Anticuerpos anti-CD11a

El anticuerpo anti-CD11a humanizado efalizumab o Raptiva® (patente de EE. UU n.º 6.037.454) recibió la

autorización de comercialización de la Food and Drug Administration el 27 de octubre de 2003 para el tratamiento de la psoriasis. Un modo de realización proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos anti-CD11a humanos.

Anticuerpos Apomab

También se pueden producir anticuerpos con respecto a anticuerpos frente al receptor DR5 (anti-DR5) de acuerdo con la presente invención. Dichos anticuerpos anti-DR5 incluyen específicamente todas las variantes de anticuerpo divulgadas en la publicación PCT n.º WO 2006/083971, tales como los anticuerpos anti-DR5 designados Apomabs 1.1, 2.1, 3.1, 4.1, 5.1, 5.2, 5.3, 6.1, 6.2, 6.3, 7.1, 7.2, 7.3, 8.1, 8.3, 9.1, 1.2, 2.2, 3.2, 4.2, 5.2, 6.2, 7.2, 8.2, 9.2, 1.3, 2.2, 3.3, 4.3, 5.3, 6.3, 7.3, 8.3, 9.3 y 25.3, específicamente Apomab 8.3 y Apomab 7.3, preferentemente Apomab 7.3. Todo el contenido del documento WO 2006/083971 se incorpora expresamente por la presente por referencia. Apomab es un anticuerpo monoclonal completamente humano que es un agonista del receptor proapoptótico (PARA) dirigido a DR5 diseñado específicamente para inducir la apoptosis. La apoptosis es un proceso natural por el que las células dañadas o no deseadas, incluyendo las que son cancerosas, mueren y se eliminan del cuerpo. El receptor proapoptótico DR5 se expresa en una amplia gama de neoplasias malignas.

Anticuerpos anti-BR3 e inmunoadhesinas

También se pueden producir anticuerpos con respecto a anticuerpos frente al BR3 (anti-BR3) y también se pueden producir inmunoadhesinas BR3-Fc de acuerdo con la presente invención. Dichos anticuerpos anti-BR3 e inmunoadhesinas incluyen específicamente todas las variantes divulgadas en la publicación de la solicitud de EE. UU. n.º 20050070689. Todo el contenido de la publicación de la solicitud de EE. UU. n.º 20050070689 se incorpora expresamente por la presente por referencia.

3. *Procedimientos generales para la producción recombinante de anticuerpos*

Los anticuerpos y otras proteínas recombinantes en el presente documento se pueden producir por técnicas bien conocidas de la tecnología de ADN recombinante. Por tanto, aparte de los anticuerpos específicamente identificados anteriormente, el profesional experto podría generar anticuerpos dirigidos frente a un antígeno de interés, por ejemplo, usando las técnicas descritas a continuación.

Selección y preparación de antígenos

El anticuerpo en el presente documento se dirige frente a un antígeno de interés. Preferentemente, el antígeno es un polipéptido biológicamente importante y la administración del anticuerpo a un mamífero que padece una enfermedad o trastorno puede dar como resultado un beneficio terapéutico en ese mamífero. Sin embargo, también se contemplan anticuerpos dirigidos frente a antígenos no polipeptídicos (tales como antígenos glucolipídicos asociados a tumor; véase la patente de EE. UU 5.091.178). Si el antígeno es un polipéptido, puede ser una molécula transmembranaria (por ejemplo, un receptor) o ligando, tal como un factor de crecimiento. Los antígenos ejemplares incluyen las proteínas descritas en la sección (3) a continuación. Las dianas moleculares ejemplares para los anticuerpos englobados por la presente invención incluyen proteínas CD tales como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD22, CD34, CD40; miembros de la familia de receptores ErbB, tales como el receptor para EGF, el receptor HER2, HER3 o HER4; moléculas de adhesión celular, tales como LFA-1, Mac1, p150,95, VLA-4, ICAM-1, VCAM e integrina αv/β3, incluyendo las subunidades α o bien β de la misma (por ejemplo, anticuerpos anti-CD11a, anti-CD18 o anti-CD11b); factores de crecimiento, tales como VEGF; IgE; antígenos de grupos sanguíneos; receptor flk2/flt3; receptor de obesidad (OB); receptor *mpl*; CTLA-4; proteína C o cualquiera de los otros antígenos mencionados en el presente documento. Los antígenos a los que se unen los anticuerpos enumerados anteriormente se incluyen específicamente dentro del alcance en el presente documento.

Se pueden usar antígenos solubles o fragmentos de los mismos, conjugados opcionalmente a otras moléculas, como inmunógenos para generar anticuerpos. Para las moléculas transmembranarias, tales como receptores, se pueden usar fragmentos de estos (por ejemplo, el dominio extracelular de un receptor) como inmunógeno. De forma alternativa, se pueden usar células que expresen la molécula transmembranaria como inmunógeno. Dichas células se pueden derivar de una fuente natural (por ejemplo, líneas de células cancerosas) o pueden ser células que se hayan transformado por técnicas recombinantes para expresar la molécula transmembranaria.

Otros antígenos y formas de los mismos útiles para preparar anticuerpos serán evidentes para los expertos en la técnica.

Anticuerpos policlonales

Se producen preferentemente anticuerpos policlonales en animales por múltiples inyecciones subcutáneas (s.c.) o intraperitoneales (i.p.) del antígeno pertinente y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno a una proteína que sea inmunógena en la especie que se va a inmunizar, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, seroalbúmina, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de la soja, usando un agente bifuncional o derivatizante,

por ejemplo, éster de maleimidobenzoilsulfosuccinimida (conjugación a través de residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, $SOCl_2$ o $R^1N=C=NR$, donde R y R^1 son grupos alquilo diferentes.

Los animales se inmunizan frente al antígeno, conjugados inmunógenos o derivados combinando, por ejemplo, 100 µg o 5 µg de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la solución por vía intradérmica en múltiples sitios. Un mes más tarde, los animales se refuerzan con de 1/5 a 1/10 de la cantidad original de antígeno o conjugado en adyuvante completo de Freund por inyección subcutánea en múltiples sitios. De siete a 14 días más tarde, se extrae sangre de los animales y el suero se somete a ensayo para determinar el valor de anticuerpos. Los animales se refuerzan hasta la estabilización del valor. Preferentemente, el animal se refuerza con el conjugado del mismo antígeno, pero conjugado a una proteína diferente y/o a través de un reactivo de reticulación diferente. También se pueden preparar conjugados en cultivo de células recombinantes como fusiones de proteínas. También se usan adecuadamente agentes de agregación, tales como alumbre, para potenciar la respuesta inmunitaria.

Anticuerpos monoclonales

Se pueden preparar anticuerpos monoclonales usando el procedimiento de hibridoma descrito en primer lugar por Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975), o se pueden preparar por procedimientos de ADN recombinante (patente de EE. UU. n.º 4.816.567).

En el procedimiento de hibridoma, se inmuniza un ratón u otro animal huésped apropiado, tal como un hámster o un macaco, como se describe anteriormente en el presente documento, para inducir linfocitos que produzcan o puedan producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína usada para la inmunización. De forma alternativa, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*. A continuación, se fusionan los linfocitos con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)).

Las células de hibridoma así preparadas se siembran y cultivan en un medio de cultivo adecuado, por ejemplo, que contenga preferentemente una o más sustancias que inhiban el crecimiento o supervivencia de las células de mieloma originales no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma originales están desprovistas de la enzima hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas típicamente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), evitando dichas sustancias el crecimiento de células carentes de HGPRT.

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

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

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

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, líquido ascítico o suero por procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales, tales como, por ejemplo, cromatografía con proteína A-Sepharose, con hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad. Preferentemente, se usa el procedimiento de cromatografía con proteína A descrito en el presente documento.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que se puedan unir específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos monoclonales). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferente de dicho ADN. Una vez aislado, se puede disponer el ADN en vectores de expresión, que, a

continuación, se transfectan en células huésped, tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma, que de otro modo no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes.

También se puede modificar el ADN, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante para los dominios constantes de la cadena pesada y ligera humana en lugar de las secuencias murinas homólogas (patente de EE. UU. n.º 4.816.567; Morrison, *et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA,* 81:6851 (1984)), o uniendo de forma covalente a la secuencia codificante de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido distinto a inmunoglobulina.

Típicamente, dichos polipéptidos distintos a inmunoglobulina se sustituyen con los dominios constantes de un anticuerpo, o se sustituyen con los dominios variables de un sitio de combinación con antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprenda un sitio de combinación con antígeno que tenga especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación con antígeno que tenga especificidad por un antígeno diferente.

En otro modo de realización, se pueden aislar anticuerpos monoclonales de las colecciones de fagos con anticuerpos generadas usando las técnicas descritas en McCafferty *et al., Nature,* 348:552-554 (1990). Clackson *et al., Nature,* 352:624-628 (1991) y Marks *et al., J. Mol. Biol.,* 222:581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, usando colecciones de fagos. Las publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo nM) por barajado de cadenas (Marks *et al., Bio/Technology,* 10:779-783 (1992)), así como la infección combinatoria y la recombinación *in vivo* como una estrategia para construir colecciones de fagos muy grandes (Waterhouse *et al., Nuc. Acids. Res.,* 21:2265-2266 (1993)). Por tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas de hibridoma tradicionales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

Anticuerpos humanizados y humanos

Un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácido introducidos en él de una fuente que no sea humana. Estos residuos de aminoácido no humanos a menudo se denominan residuos de "importación", que típicamente se toman de un dominio variable de "importación". La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y sus colaboradores (Jones *et al., Nature,* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al., Nature,* 332:323-327 (1988); Verhoeyen *et al., Science,* 239:1534-1536 (1988)), sustituyendo las CDR o secuencias de CDR de roedor con las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. En consecuencia, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de EE. UU. n.º 4.816.567) en los que se ha sustituido sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto con la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR se sustituyen con residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

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

Es importante además que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, de acuerdo con un procedimiento preferente, los anticuerpos humanizados se preparan por un procedimiento de análisis de las secuencias originales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias originales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están comúnmente disponibles y son consabidos por los expertos en la técnica. Están disponibles programas informáticos que ilustran y presentan estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del probable papel de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata de unirse a su antígeno. De esta forma, se pueden seleccionar y combinar residuos de FR a partir de las secuencias receptoras y de importación de modo que se logre la característica de anticuerpo deseada, tal como una afinidad incrementada por el/los antígeno(s) diana. En general, los residuos de CDR están directamente y lo más sustancialmente implicados en influir en la unión a antígeno.

De forma alternativa, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que, tras su inmunización, pueden producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de

inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la deleción homocigótica del gen de la región de unión a la cadena pesada (J_H) de anticuerpo en ratones mutantes quiméricos y de la estirpe germinal da como resultado la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de la micromatriz genética de inmunoglobulina de la estirpe germinal humana en dichos ratones mutantes de la estirpe germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición a antígeno. Véanse, por ejemplo, Jakobovits *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 90:2551 (1993); Jakobovits *et al., Nature,* 362:255-258 (1993); Bruggermann *et al., Year in Immuno.,* 7:33 (1993); y Duchosal *et al., Nature* 355:258 (1992). También se pueden derivar anticuerpos humanos de colecciones de presentación en fagos (Hoogenboom *et al., J. Mol. Biol.,* 227:381 (1991); Marks *et al., J. Mol. Biol.,* 222:581-597 (1991); Vaughan *et al., Nature Biotech* 14:309 (1996)).

Fragmentos de anticuerpo

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaban por medio de digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véanse, por ejemplo, Morimoto *et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) y Brennan *et al., Science,* 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos se pueden producir ahora directamente por células huésped recombinantes. Por ejemplo, se pueden aislar los fragmentos de anticuerpo de las colecciones de fagos con anticuerpos analizadas anteriormente. De forma alternativa, se pueden recuperar directamente los fragmentos Fab'-SH de *E. coli* y acoplar químicamente para formar fragmentos $F(ab')_2$ (Carter *et al.,* Bio/Technology 10:163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, se pueden aislar directamente fragmentos $F(ab')_2$ del cultivo de células huésped recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán evidentes para el profesional experto. En otros modos de realización, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv monocatenario (scFv) (véase el documento WO 93/16185).

Anticuerpos multiespecíficos

Los anticuerpos multiespecíficos tienen especificidades de unión por al menos dos antígenos diferentes. Aunque dichas moléculas normalmente solo se unirán a dos antígenos (es decir, anticuerpos biespecíficos, BsAb), los anticuerpos con especificidades adicionales, tales como los anticuerpos triespecíficos, se engloban por esta expresión cuando se usan en el presente documento.

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

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

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, se puede acoplar uno de los anticuerpos en el heteroconjugado a avidina, el otro a biotina. Por ejemplo, se han propuesto dichos anticuerpos para dirigir células del sistema inmunitario a células no deseadas (patente de EE. UU. n.º 4.676.980) y para el tratamiento de la infección por VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 03089). Se pueden preparar anticuerpos heteroconjugados usando cualquier procedimiento de reticulación conveniente. Los agentes de reticulación adecuados son bien conocidos en la técnica y se divulgan en la patente de EE. UU. n.º 4.676.980, junto con una serie de técnicas de reticulación.

En la literatura también se han descrito técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos usando un enlace químico. Brennan *et al., Science*, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que se escinden proteolíticamente anticuerpos intactos para generar fragmentos $F(ab')_2$. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente que forma complejos con ditiol arsenito de sodio para estabilizar los ditioles vecinos y evitar la formación de disulfuro intermolecular. A continuación, los fragmentos Fab' generados se convierten en derivados de tionitrobenzoato (TNB). A continuación,

uno de los derivados Fab'-TNB se reconvierte en Fab'-tiol por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Se pueden usar los anticuerpos biespecíficos producidos como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

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

También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar directamente fragmentos de anticuerpo biespecífico del cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny *et al., J. Immunol.,* 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos de las cremalleras de leucina de las proteínas Fos y Jun se enlazaron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes por fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y, a continuación, se volvieron a oxidar para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este procedimiento también se puede utilizar para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpos" descrita por Hollinger *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico. Los fragmentos comprenden un dominio variable de la cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (V_L) por un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. En consecuencia, se obliga a que los dominios V_H y V_L de un fragmento se emparejen con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando de este modo dos sitios de unión a antígeno. También se ha informado de otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico por el uso de dímeros de Fv monocatenario (sFv). Véase Gruber *et al., J. Immunol.,* 152:5368 (1994). De forma alternativa, los anticuerpos pueden ser "anticuerpos lineales" como se describe en Zapata *et al., Protein Eng.* 8(10):1057-1062 (1995). En resumen, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos Fd en tándem (V_H-C_H1-V_H-C_H1) que forman un par de regiones de unión a antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

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

Inmunoadhesinas

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

Típicamente, en dichas fusiones, el polipéptido quimérico codificado retendrá al menos los dominios bisagra, C_H2 y C_H3 funcionalmente activos de la región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina. También se realizan fusiones al extremo C de la porción Fc de un dominio constante, o inmediatamente N terminal con respecto al C_H1 de la cadena pesada o la región correspondiente de la cadena ligera. El sitio preciso en el que se realiza la fusión no es crucial; los sitios particulares son bien conocidos y se pueden seleccionar para optimizar la actividad biológica, la secreción o las características de unión de la inmunoadhesina.

En un modo de realización preferente, la secuencia de adhesina se fusiona al extremo N del dominio Fc de inmunoglobulina G_1 (IgG_1). Es posible fusionar toda la región constante de la cadena pesada a la secuencia de adhesina. Sin embargo, más preferentemente, se usa una secuencia que empieza en la región bisagra justo en dirección 5' del sitio de escisión por papaína que define químicamente Fc de IgG (es decir, el residuo 216, asumiendo que el primer residuo de la región constante de la cadena pesada es 114) o sitios análogos de otras inmunoglobulinas en la fusión. En un modo de realización en particular preferente, la secuencia de aminoácidos de adhesina se fusiona a (a) la región bisagra y C_H2 y C_H3 o (b) los dominios C_H1, bisagra, C_H2 y C_H3, de una cadena pesada de IgG.

Para las inmunoadhesinas biespecíficas, las inmunoadhesinas se ensamblan como multímeros, y, en particular, como heterodímeros o heterotetrámeros. En general, estas inmunoglobulinas ensambladas tendrán estructuras unitarias conocidas. Una unidad estructural básica de cuatro cadenas es la forma en la que existen IgG, IgD e IgE. Se repite una unidad de cuatro cadenas en las inmunoglobulinas de mayor peso molecular; la IgM existe, en general, como un pentámero de cuatro unidades básicas unidas entre sí por enlaces disulfuro. La globulina IgA, y ocasionalmente la globulina IgG, también pueden existir en forma multimérica en suero. En el caso del multímero, cada una de las cuatro unidades puede ser igual o diferente.

Se representan en diagrama esquemáticamente diversas inmunoadhesinas ensambladas ejemplares dentro del alcance del presente documento a continuación:

AC_L-AC_L;

AC_H-(AC_H, AC_L-AC_H, AC_L-V_HC_H o V_LC_L-AC_H);

AC_L-AC_H-(AC_L-AC_H, AC_L-V_HC_H, V_LC_L-AC_H o V_LC_L-V_HC_H)

AC_L-V_HC_H-(AC_H, o AC_L-V_HC_H o V_LC_L-AC_H);

V_LC_L-AC_H-(AC_L-V_HC_H o V_LC_L-AC_H); y

$(A\text{-}Y)_n$-(V_LC_L–V_HC_H)$_2$,

en las que cada A representa secuencias de aminoácidos de adhesina idénticas o diferentes;

V_L es un dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina;

V_H es un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina;

C_L es un dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina;

C_H es un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina;

n es un número entero mayor que 1;

Y designa el residuo de un agente de reticulación covalente.

Por motivos de brevedad, las estructuras anteriores solo muestran rasgos característicos clave; no indican unión (J) u otros dominios de las inmunoglobulinas, ni tampoco se muestran enlaces disulfuro. Sin embargo, si se requieren dichos dominios para la actividad de unión, se interpretará que están presentes en las localizaciones habituales que ocupan en las moléculas de inmunoglobulina.

De forma alternativa, las secuencias de adhesina se pueden insertar entre las secuencias de la cadena pesada y de la cadena ligera de inmunoglobulina, de modo que se obtenga una inmunoglobulina que comprenda una cadena pesada quimérica. En este modo de realización, las secuencias de adhesina se fusionan al extremo 3' de una cadena pesada de inmunoglobulina en cada brazo de una inmunoglobulina, entre la bisagra y el dominio C_H2 o bien entre los dominios C_H2 y C_H3. Se ha informado de construcciones similares por Hoogenboom, *et al., Mol. Immunol.* 28:1027-1037 (1991).

Aunque no se requiera la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en las inmunoadhesinas de la presente invención, una cadena ligera de inmunoglobulina puede estar presente asociada de forma covalente a un polipéptido de fusión cadena pesada de inmunoglobulina-adhesina o bien directamente fusionada a la adhesina. En el primer caso, el ADN que codifica una cadena ligera de inmunoglobulina típicamente se coexpresa con el ADN que codifica la proteína de fusión cadena pesada de inmunoglobulina-adhesina. Tras la secreción, la cadena pesada híbrida y la cadena ligera se asociarán de forma covalente para proporcionar una estructura similar a inmunoglobulina que comprenda dos pares cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina enlazadas por disulfuro. Los procedimientos adecuados para la preparación de dichas estructuras se divulgan, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 4.816.567, emitida el 28 de marzo de 1989.

Las inmunoadhesinas se construyen lo más convenientemente fusionando la secuencia de ADNc que codifica la porción de adhesina sin cambio de pauta de lectura a una secuencia de ADNc de inmunoglobulina. Sin embargo, también se puede usar la fusión a fragmentos genómicos de inmunoglobulina (véanse, por ejemplo, Aruffo *et al., Cell* 61:1303-1313 (1990); y Stamenkovic *et al.,* Cell 66:1133-1144 (1991)). Este último tipo de fusión requiere la presencia de secuencias reguladoras de Ig para la expresión. Se pueden aislar ADNc que codifican regiones constantes de la cadena pesada de IgG en base a secuencias publicadas de colecciones de ADNc derivadas de bazo o linfocitos de sangre periférica, por técnicas de hibridación o reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los ADNc que codifican la "adhesina" y las partes de inmunoglobulina de la inmunoadhesina se insertan en tándem en un vector plasmídico que dirige la expresión eficaz en las células huésped elegidas.

Se proporcionan otros detalles de la invención en los siguientes ejemplos no limitantes.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos solo se ofrecen para propósitos ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la presente invención de ninguna forma. Los reactivos disponibles comercialmente a los que se hace referencia en los ejemplos se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante, a menos que se indique de otro modo. La fuente de aquellas células identificadas en los siguientes ejemplos, y por toda la memoria descriptiva, por los números de acceso a ATCC® es la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia.

Ejemplo 1

Producción de polipéptidos en medio de producción libre de glutamina

Materiales y procedimientos:

Líneas celulares. En estos estudios, se usaron células huésped CHO que expresaban un anticuerpo Apomab, un anticuerpo anti-VEGF y la proteína de fusión BR3-Fc, respectivamente. Las células huésped se adaptaron en cultivos en suspensión y libres de suero. Se prepararon reservas congeladas como bancos de células patrón o de trabajo en los medios descritos a continuación.

Se llevó a cabo el mantenimiento de las líneas celulares usando matraces de agitación con ventilación Corning® de 250 ml o 1 litro mantenidos en una estufa de incubación humidificada de CO_2 de alcance directo Thermo Scientific Forma® mantenida a 37 °C y CO_2 al 5 %. Se agitaron los matraces a una tasa de 150 rpm en un agitador de plataforma New Brunswick Scientific Innova®-2100 con una plataforma con sustrato de aluminio personalizada. Los cultivos celulares se subcultivaron cada 3 o 4 días con medios recién preparados y se sembraron a un 0,11 % o 0,20 % de hematocrito (PCV). Se obtuvo el PCV usando un tubo para PCV KIMAX® USA de 10 ml de vidrio.

Medios y condiciones de cultivo. Se iniciaron los estudios de los medios usando un matraz de agitación con ventilación Corning de 250 ml inoculado una vez, dos veces o tres veces a un volumen de trabajo de 100 ml a un 0,20 % de PCV para todos los casos usando el cultivo celular de un matraz de agitación con ventilación Corning® de 1 litro de partida con un volumen de trabajo de 500 ml. Se obtuvo el PCV usando un tubo para PCV KIMAX® USA de 10 ml de vidrio.

Antes del inicio del estudio, se centrifugó el cultivo celular a 1000 rpm durante 5 minutos en una centrifugadora Sorvall® RT 6000B para completar un 100 % de intercambio de medios de medios de inóculo que contenían glutamina con los medios de prueba respectivos. Se evaluaron diferentes concentraciones de glutamina, glutamato, asparagina y aspartato en los diferentes medios de prueba. Se sometieron a prueba las siguientes concentraciones: glutamina 0-10 mM, glutamato 1-10 mM, asparagina 0-15 mM, aspartato 1-10 mM. Se evaluaron las condiciones de los medios en estudios con DOE factorial completo.

También se sometió a prueba el efecto del medio libre de glutamina sobre el medio DMEM/F12 disponible comercialmente. Se usó el medio a una concentración 5x (7,05 g/l) con asparagina adicional (10 mM en total), aspartato (10 mM en total), glutamina (10 mM en total para el medio que contenía glutamina), glutamato (1 mM en total) y glucosa (8 g/l en total). Se compararon el medio libre de glutamina y que contenía glutamina usando células que expresaban el anticuerpo Apomab y anti-VEGF.

Se mantuvieron los matraces de agitación en una estufa de incubación humidificada de CO_2 de alcance directo Thermo Scientific Forma® mantenida a 37 °C y CO_2 al 5 %. Se agitaron los matraces a una tasa de 150 rpm en un agitador de plataforma New Brunswick Scientific Innova®-2100 con una plataforma con sustrato de aluminio personalizada.

El medio usado contenía los siguientes componentes:

Sales orgánicas y oligoelementos

Paramolibdato de amonio, tetrahidrato

Óxido de amonio y vanadio

Cloruro de calcio, anhidro

Sulfato cúprico, pentahidrato

Sulfato ferroso, heptahidrato

Cloruro de potasio

Cloruro de magnesio, anhidro

Sulfato de manganeso, monohidrato

Cloruro de níquel, hexahidrato

Ácido selenoso

Metasilicato de sodio, nonahidrato

Fosfato de sodio, monobásico, monohidrato

Cloruro de estaño, dihidrato

Sulfato de cinc, heptahidrato

Lípidos

Ácido linoleico

Ácido lipoico (también conocido como ácido tióctico)

Putrescina, diclorhidrato

Aminoácidos

L-alanina

L-arginina, monoclorhidrato

L-asparagina

Ácido L-aspártico

L-cisteína, monoclorhidrato, monohidrato

Ácido L-glutámico

L-glutamina

L-histidina, monoclorhidrato, monohidrato

L-isoleucina

L-leucina

L-lisina, monoclorhidrato

L-metionina

L-fenilalanina

L-prolina

L-serina

L-treonina

L-triptófano

L-tirosina, sal disódica, dihidrato

L-valina

Vitaminas

Biotina

Pantotenato de D-calcio

Cloruro de colina

Ácido fólico

I-inositol

Niacinamida

Piridoxina, monoclorhidrato

Riboflavina

Tiamina, monoclorhidrato

Vitamina B-12

Fuente de carbono, factores de crecimiento y otros

Pluronic F-68

D-glucosa

Bicarbonato de sodio

Piruvato de sodio

Cloruro de sodio

Hidróxido de sodio

Insulina

Galactosa

También se sometió a prueba el medio de cultivo DMEM/F-12 disponible comercialmente, que tenía los siguientes componentes;

VITAMINAS	(mg/l)
Biotina	0,00365
Pantotenato de D-calcio	2,24
Cloruro de colina	8,98
Cianocobalamina	0,68
Ácido fólico	2,65
i-inositol	12,6
Niacinamida	2,0185
Piridoxal HCl	2
Piridoxina HCl	0,031
Riboflavina	0,219
Tiamina HCl	2,17
AMINOÁCIDOS	
L-alanina	4,455
L-arginina HCl	147,5
L-asparagina, monohidrato	7,5
Ácido L-aspártico	6,65
L-cisteína HCl, monohidrato	17,56
L-cistina 2HCl	31,29
Ácido L-glutámico	7,35
L-glutamina	365

Glicina	18,75
L-histidina HCl, monohidrato	31,48
L-isoleucina	54,47
L-leucina	59,05
L-lisina HCl	91,25
L-metionina	17,24
L-fenilalanina	35,48
L-prolina	17,25
L-serina	26,25
L-treonina	53,45
L-triptófano	9,02
L-tirosina 2Na, dihidrato	55,79
L-valina	52,85
OTROS	
Dextrosa anhidra	3151
HEPES	3575
Hipoxantina, sal sódica	2,39
Ácido linoleico	0,042
Ácido DL-α-lipoico	0,105
Rojo de fenol, sal sódica	8,602
Putrescina 2HCl	0,081
Piruvato de sodio	55
Timidina	0,365
AÑADIR: bicarbonato de sodio	1200
SALES INORGÁNICAS	
Cloruro de calcio anhidro	116,61
Sulfato cúprico, pentahidrato	0,00125
Nitrato férrico, nonahidrato	0,05
Sulfato ferroso, heptahidrato	0,417
Cloruro de magnesio anhidro	28,61
Sulfato de magnesio anhidro	48,84
Cloruro de potasio	311,8
Cloruro de sodio	6999,5
Fosfato de sodio dibásico anhidro	71,02
Fosfato de sodio monobásico monohidrato	62,5
Sulfato de cinc, heptahidrato	0,4315

El medio para el cultivo de inóculo (en oposición a la fase de producción) se complementó normalmente con glutamina 5 mM, 8 g/l de glucosa y metotroxato 75-2000 nM.

Para los estudios, se realizó el ajuste de pH según fue necesario para mantener el valor de pH a 7,00 ± 0,10 usando carbonato de sodio 1 M. Se realizó el ajuste del valor del pH añadiendo 1 ml/l de carbonato de sodio 1 M para elevar las unidades de pH hasta 0,10.

Se analizó el cultivo celular hasta 14 días tomando una muestra de 3,5 ml y se analizó para determinar el recuento de células viables, la viabilidad y el tamaño celular usando un contador de células Beckman Coulter ViCell ™-1.0. El análisis de los nutrientes se realizó usando el Nova 400 Biomedical Bioprofile®. Se midió la osmolalidad usando un osmómetro para múltiples muestras Advanced® Instrument (modelo 3900). Se obtuvo la concentración de valor de producto recombinante usando la HPLC en Agilent, serie 1100.

Proteínas recombinantes. Las proteínas recombinantes producidas fueron Apomab (TRAIL), anti-VEGF y la inmunoadhesina BR3-Fc.

Análisis de los datos. Se llevaron a cabo análisis estadísticos de los datos usando un diseño de experimento factorial completo, que es un experimento en el que su diseño consiste en dos o más factores, cada uno con

valores o "niveles" posibles discretos, y en el que sus unidades experimentales adoptan todas las combinaciones posibles de estos niveles en todos los factores de este tipo. Un diseño factorial completo también se puede llamar diseño completamente cruzado. Dicho experimento permite estudiar el efecto de cada factor sobre la variable de respuesta, así como los efectos de las interacciones entre los factores sobre la variable de respuesta.

Resultados

Como se muestra en las figuras 1-5, el uso de un medio de producción libre de glutamina incrementó el valor de proteínas recombinantes final del anticuerpo Apomab, la inmunoadhesina BR3-Fc y el anticuerpo anti-VEGF. En cada caso, el análisis según la gráfica de cubos de los resultados de los valores usando un DOE factorial completo que evalúa el efecto de diferentes concentraciones de glutamina, glutamato, asparagina y aspartato predice que se logra el valor más alto en medios libres glutamina complementados con asparagina 10 mM, ácido aspártico 10 mM y ácido glutámico 1 mM. (figuras 1-3)

Se muestra el efecto de la asparagina en condiciones libres de glutamina, bajo contenido de glutamato y alto contenido de aspartato sobre el valor de anticuerpos Apomab en la figura 4. En medio libre de glutamina, se incrementó significativamente el valor de anticuerpos Apomab en presencia de asparagina 2,5-15 mM en comparación con los cultivos libres de glutamina sin asparagina. En estas condiciones, la presencia o ausencia de glutamato no tuvo ningún efecto sobre el valor.

La producción de valores de anticuerpos Apomab en diversas concentraciones de asparagina y aspartato en condiciones libres de glutamina y con bajo contenido de glutamato se ilustra en la figura 5. Se observó un efecto de valoración positivo cuando se incrementó el aspartato de 0 a 10 mM en estas condiciones.

El efecto del medio libre de glutamina complementado con asparagina 10 mM, ácido aspártico 10 mM y ácido glutámico 1 mM sobre el valor se demuestra en las figuras 6 A-C, en el que el valor final para el anticuerpo Apomab, el anticuerpo anti-VEGF y la inmunoadhesina BR3-Fc (A-C, respectivamente) fue significativamente mayor en medio libre de glutamina en comparación con el medio que contenía glutamina.

Se obtuvieron resultados similares usando el medio de cultivo DMEM/F-12 comercial. Como se muestra en las figuras 7 A y B, el valor final para el anticuerpo Apomab y el anticuerpo anti-VEGF (A y B, respectivamente) fue significativamente mayor en medio DMEM/F12 libre de glutamina complementado con asparagina 10 mM, ácido aspártico 10 mM y ácido glutámico 1 mM en comparación con el medio DMEM/F12 que contenía glutamina complementado con asparagina 10 mM, ácido aspártico 10 mM y ácido glutámico 1 mM.

Como se muestra en las figuras 8 y 9, el uso de un medio de producción libre de glutamina también incrementaba la producción específica medida como Qp (mg/ml-células/día). Las figuras 8 A-C ilustran que la productividad específica celular (Qp) para el anticuerpo Apomab, el anticuerpo anti-VEGF y la inmunoadhesina BR3-Fc (A-C, respectivamente) fue significativamente mayor en medio libre de glutamina complementado con asparagina 10 mM, ácido aspártico 10 mM y ácido glutámico 1 mM en comparación con el medio que contenía glutamina. Las figuras 9 A y B ilustran que la productividad específica celular para el anticuerpo Apomab y el anticuerpo anti-VEGF (A y B, respectivamente) fue significativamente mayor en medio DMEM/F12 libre de glutamina complementado con asparagina 10 mM, ácido aspártico 10 mM y ácido glutámico 1 mM en comparación con el medio DMEM/F12 que contenía glutamina.

Como se muestra en las figuras 10 y 11, se demostró que el uso de un medio de producción libre de glutamina mejoraba la viabilidad celular y prolongaba significativamente la longevidad del cultivo. Las figuras 10 A-C ilustran que la viabilidad celular para el anticuerpo Apomab, el anticuerpo anti-VEGF y la inmunoadhesina BR3-Fc (A-C, respectivamente) fue mayor en medio libre de glutamina complementado con asparagina 10 mM, ácido aspártico 10 mM y ácido glutámico 1 mM en comparación con el medio que contenía glutamina. Las figuras 11 A y B indican que, en medio DMEM/F12, la viabilidad celular no se mejoró de forma consistente en medio libre de glutamina complementado con asparagina 10 mM, ácido aspártico 10 mM y ácido glutámico 1 mM. Cabe señalar que la viabilidad fue mayor para el anticuerpo Apomab (figura 11 A), pero menor para el anticuerpo anti-VEGF (figura 11 B) en comparación con el medio que contenía glutamina.

Como se muestra en las figuras 12 y 13, el uso de un medio de producción libre de glutamina redujo significativamente la acumulación de NH_4^+ en comparación con el medio que contenía glutamina. Las figuras 12 A-C ilustran que los niveles de amoníaco fueron normalmente menores en los cultivos libres de glutamina complementados con asparagina 10 mM, ácido aspártico 10 mM y ácido glutámico 1 mM en comparación con los cultivos que contenían glutamina. Las figuras 13 A y B ilustran que los niveles de amoníaco se redujeron significativamente en medio DMEM/F12 libre de glutamina complementado con asparagina 10 mM, ácido aspártico 10 mM y ácido glutámico 1 mM en comparación con el medio DMEM/F12 que contenía glutamina.

La invención descrita de forma ilustrativa en el presente documento se puede poner en práctica adecuadamente en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones, que no se divulgue específicamente en el presente documento. Por tanto, por ejemplo, los términos "que comprende", "que incluye", "que contiene", etc.,

se leerán de forma expansiva y sin limitación.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir un polipéptido en una célula de ovario de hámster chino (CHO) que expresa dicho polipéptido, en el que el polipéptido se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos, fragmentos de anticuerpo e inmunoadhesinas, comprendiendo dicho procedimiento cultivar la célula durante una fase de producción del cultivo en un medio de cultivo de producción inicialmente libre de glutamina complementado con asparagina 10 mM.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la célula es una célula CHO dhfr$^-$.

3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el medio de producción está libre de suero.

4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el medio de cultivo de producción comprende uno o más ingredientes seleccionados del grupo que consiste en

1) una fuente de energía;

2) aminoácidos esenciales;

3) vitaminas;

4) ácidos grasos libres; y

5) oligoelementos.

5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el medio de cultivo de producción comprende adicionalmente uno o más ingredientes seleccionados del grupo que consiste en:

1) hormonas y otros factores de crecimiento;

2) sales y tampones; y

3) nucleósidos.

6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la fase de producción es una fase de cultivo por lotes o por lotes alimentados.

7. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de aislar dicho polipéptido.

8. El procedimiento de la reivindicación 7, que comprende además determinar uno o más de viabilidad celular, longevidad del cultivo, productividad específica y valor de proteínas recombinantes final tras el aislamiento.

9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho fragmento de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en Fab, Fab', F(ab')2, scFv, (scFv)2, dAb, fragmentos de la región determinante de la complementariedad (CDR), anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo monocatenario, minicuerpos, diacuerpos y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

10. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo es quimérico, humanizado o humano.

11. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo es un anticuerpo terapéutico o un fragmento biológicamente funcional del mismo.

12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que dicho anticuerpo terapéutico se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos anti-HER2; anticuerpos anti-CD20; anticuerpos anti-IL-8; anticuerpos anti-VEGF; anticuerpos anti-CD40, anticuerpos anti-CD11a; anticuerpos anti-CD18; anticuerpos anti-IgE; anticuerpos anti-receptor de Apo-2; anticuerpos anti-factor tisular (TF); anticuerpos anti-integrina α4β7 humana; anticuerpos anti-EGFR; anticuerpos anti-CD3; anticuerpos anti-CD25; anticuerpos anti-CD4; anticuerpos anti-CD52; anticuerpos anti-receptor de Fc; anticuerpos anti-antígeno carcinoembrionario (CEA); anticuerpos dirigidos frente a células epiteliales de mama; anticuerpos que se unen a células de carcinoma de colon; anticuerpos anti-CD38; anticuerpos anti-CD33; anticuerpos anti-CD22; anticuerpos anti-EpCAM; anticuerpos anti-GpIIb/IIIa; anticuerpos anti-RSV; anticuerpos anti-CMV; anticuerpos anti-VIH; anticuerpos antihepatitis; anticuerpos anti-CA 125; anticuerpos anti-αvβ3; anticuerpos anti-carcinoma de células renales humano; anticuerpos anti-17-1A humano; anticuerpos anti-tumor colorrectal humano; anticuerpo anti-melanoma humano R24 dirigido frente a gangliósido GD3; anticuerpos anti-carcinoma de células escamosas humano; y anticuerpos anti-antígeno leucocitario humano (HLA) y anticuerpos anti-HLA DR.

13. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que dicho anticuerpo terapéutico es un anticuerpo que se une a un receptor HER, VEGF, IgE, CD20, CD11a, CD40, BR3 o DR5.

14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que dicho receptor HER es HER1 y/o HER2.

15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que el receptor HER es HER2.

16. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que dicho anticuerpo terapéutico es un anticuerpo que se une a CD20.

17. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que dicho anticuerpo terapéutico es un anticuerpo que se une a VEGF.

18. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que dicho anticuerpo terapéutico es un anticuerpo que se une a CD11a.

19. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que dicho anticuerpo terapéutico se une a un receptor DR5.

20. El procedimiento de la reivindicación 19, en el que dicho anticuerpo terapéutico se selecciona del grupo que consiste en los Apomabs 1.1, 2.1, 3.1, 4.1, 5.1, 5.2, 5.3 , 6.1, 6.2, 6.3, 7.1, 7.2, 7.3, 8.1, 8.3, 9.1, 1.2, 2.2, 3.2, 4.2, 5.2, 6.2, 7.2, 8.2, 9.2, 1.3, 2.2, 3.3, 4.3, 5.3, 6.3, 7.3, 8.3, 9.3 y 25.3.

21. El procedimiento de la reivindicación 19, en el que dicho anticuerpo terapéutico es Apomab 8.3 o Apomab 7.3.

22. El procedimiento de la reivindicación 21, en el que dicho anticuerpo terapéutico es Apomab 7.3.

23. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que dicho anticuerpo terapéutico es un anticuerpo anti-BR3 o inmunoadhesina BR3-Fc.

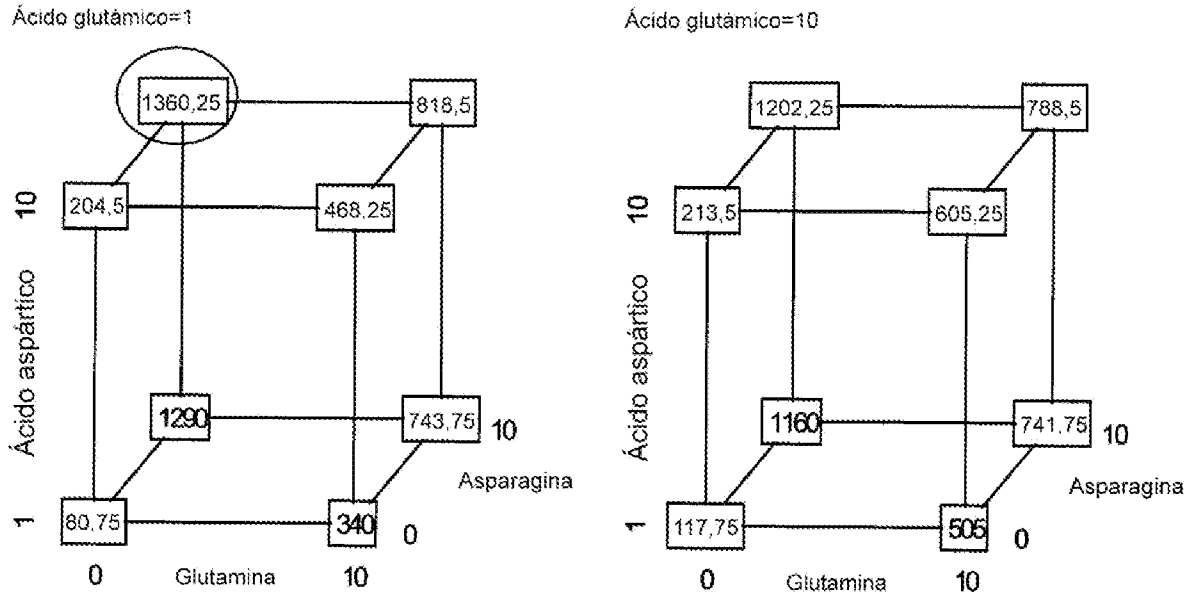

Ácido glutámico=1
1360,25
818,5
204,5
468,25
1290
743,75
80,75
340
Ácido aspártico
10
1
0
Glutamina
10
Asparagina
10
0
Ácido glutámico=10
1202,25
788,5
213,5
605,25
1160
741,75
117,75
505
Ácido aspártico
10
1
0
Glutamina
10
Asparagina
10
0

Figura 1.

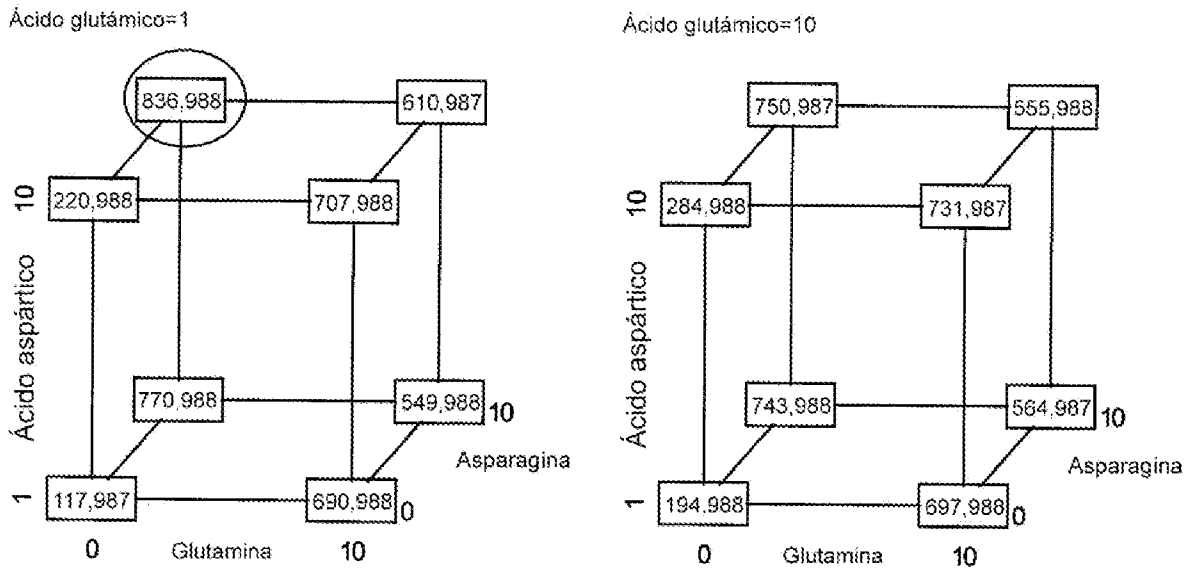

Ácido glutámico=1
836,988
610,987
220,988
707,988
770,988
549,988
117,987
690,988
Ácido aspártico
10
1
0
10
Glutamina
Asparagina
Ácido glutámico=10
750,987
555,988
284,988
731,987
743,988
564,987
194,988
697,988

Figura 2.

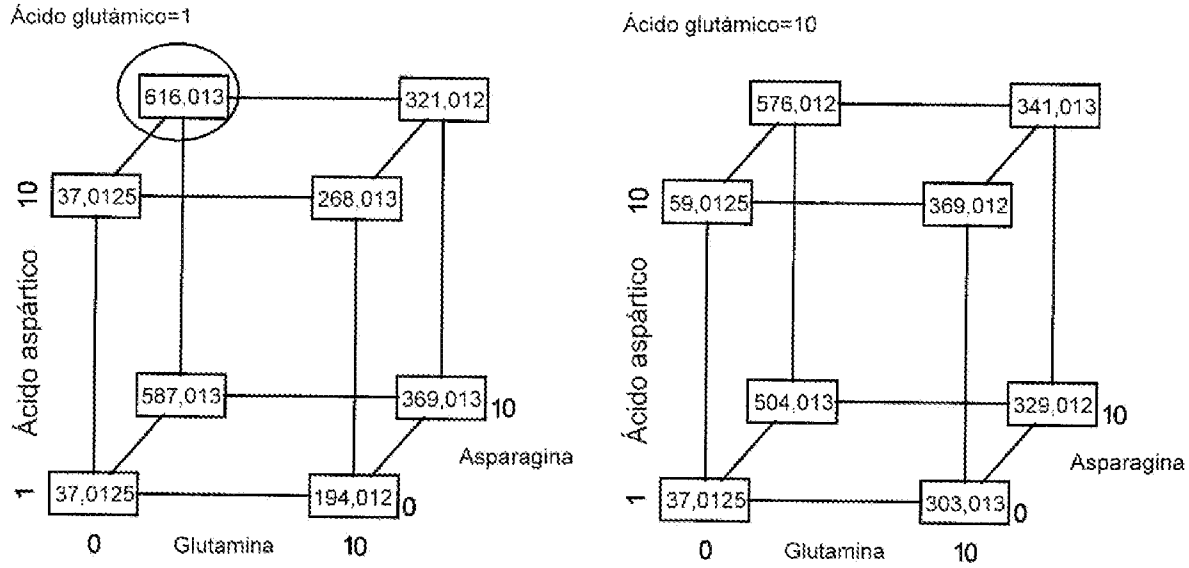

Ácido glutámico=1
616,013
321,012
37,0125
268,013
587,013
369,013
37,0125
194,012
Ácido aspártico
10
1
0
Glutamina
10
Asparagina
10
0
Ácido glutámico=10
576,012
341,013
59,0125
369,012
504,013
329,012
37,0125
303,013
Ácido aspártico
10
1
0
Glutamina
10
Asparagina
10
0

Figura 3.

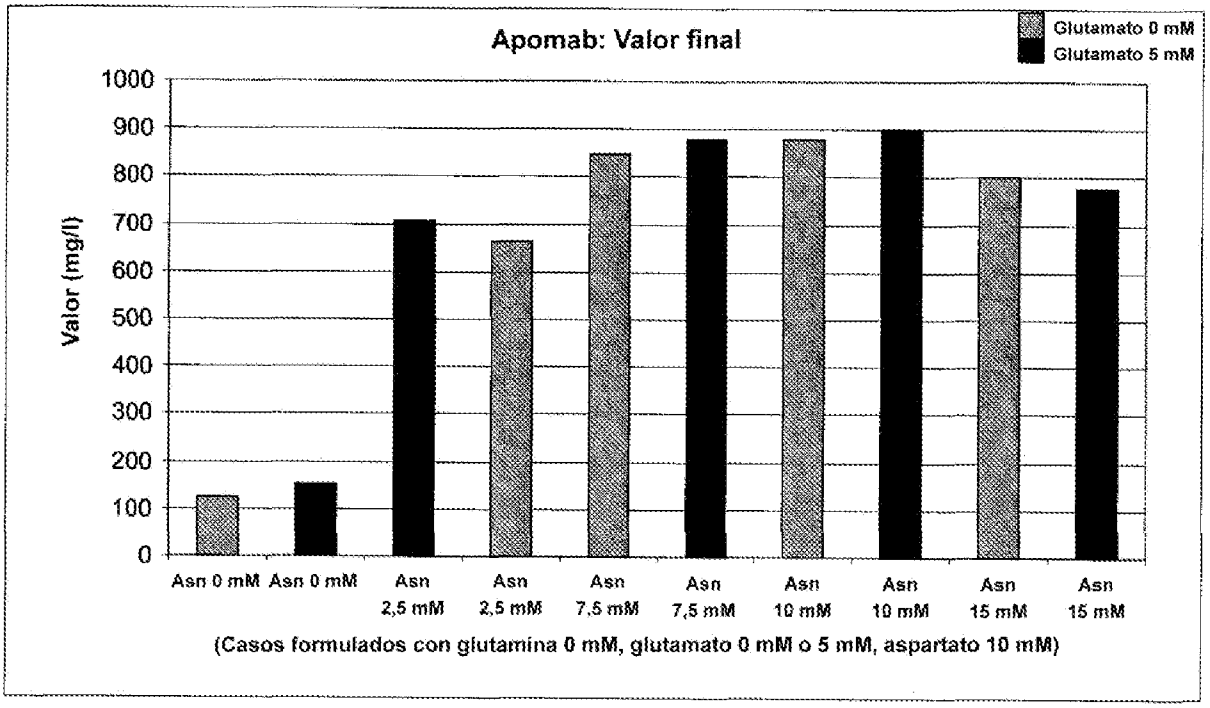
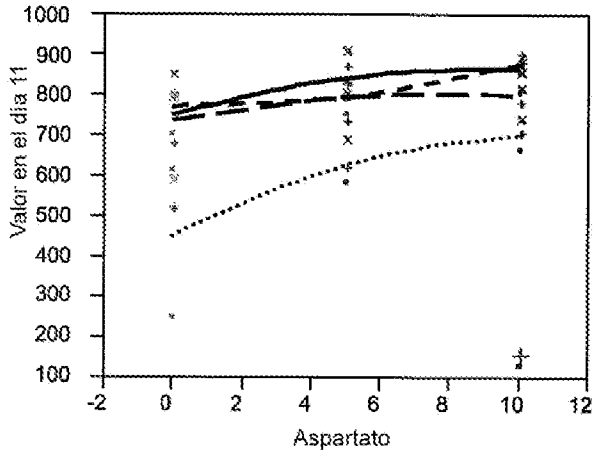

Apomab: Valor final
Glutamato 0 mM
Glutamato 5 mM
Valor (mg/l)
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
Asn 0 mM
Asn 0 mM
Asn 2,5 mM
Asn 2,5 mM
Asn 7,5 mM
Asn 7,5 mM
Asn 10 mM
Asn 10 mM
Asn 15 mM
Asn 15 mM
(Casos formulados con glutamina 0 mM, glutamato 0 mM o 5 mM, aspartato 10 mM)

Figura 4.

Ajuste bivariante del valor en el día 11 por aspartato glutamina=0



Ajuste por spline de suavizado, lambda=1 asparagina==2,5
Ajuste por spline de suavizado, lambda=1 asparagina==7,5
Ajuste por spline de suavizado, lambda=1 asparagina==10
Ajuste por spline de suavizado, lambda=1 asparagina==15

Ajuste por spline de suavizado, lambda=1 asparagina==2,5

R^2	0,573894
Error de la suma de cuadrados	73461,63

Ajuste por spline de suavizado, lambda=1 asparagina==7,5

R^2	0,65596
Error de la suma de cuadrados	11556,31

Ajuste por spline de suavizado, lambda=1 asparagina==10

R^2	0,408718
Error de la suma de cuadrados	25684,65

Ajuste por spline de suavizado, lambda=1 asparagina==15

R^2	0,220438
Error de la suma de cuadrados	26400,64

Figura 5.

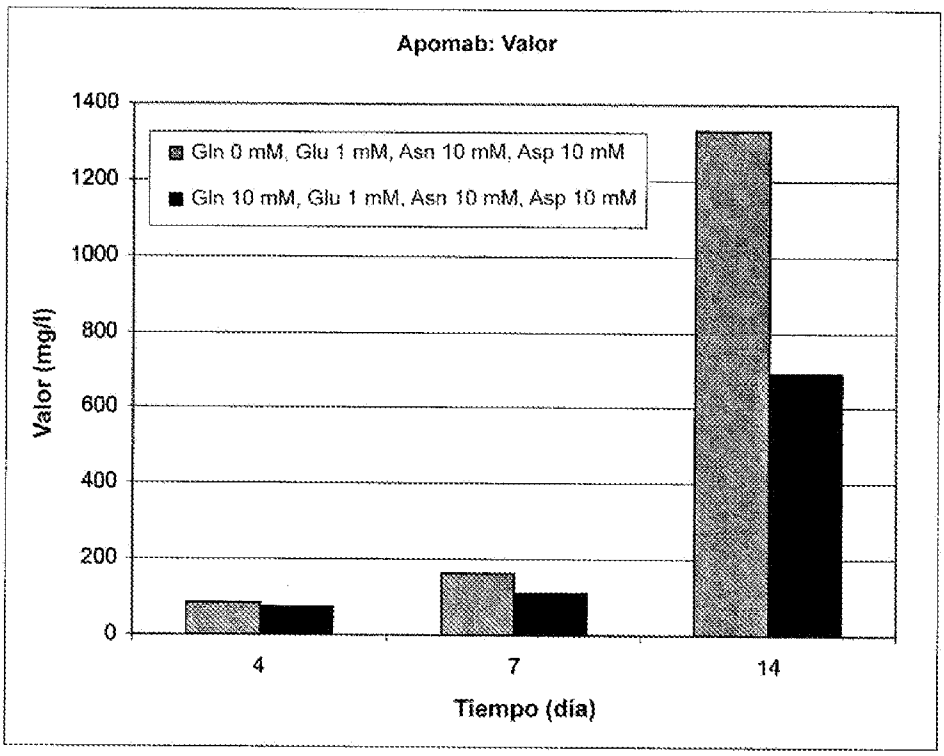

Apomab: Valor
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
Valor (mg/l)
Gln 0 mM, Glu 1 mM, Asn 10 mM, Asp 10 mM
Gln 10 mM, Glu 1 mM, Asn 10 mM, Asp 10 mM
4
7
14
Tiempo (día)

Figura 6A

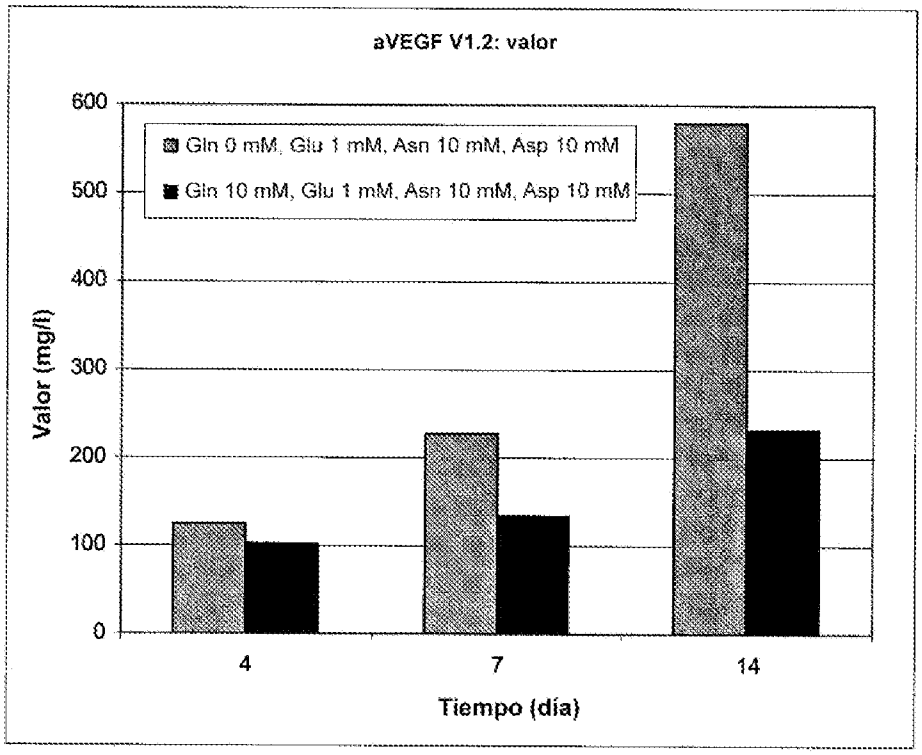

aVEGF V1.2: valor
Gln 0 mM, Glu 1 mM, Asn 10 mM, Asp 10 mM
Gln 10 mM, Glu 1 mM, Asn 10 mM, Asp 10 mM
Valor (mg/l)
600
500
400
300
200
100
0
4
7
14
Tiempo (día)

Figura 6B

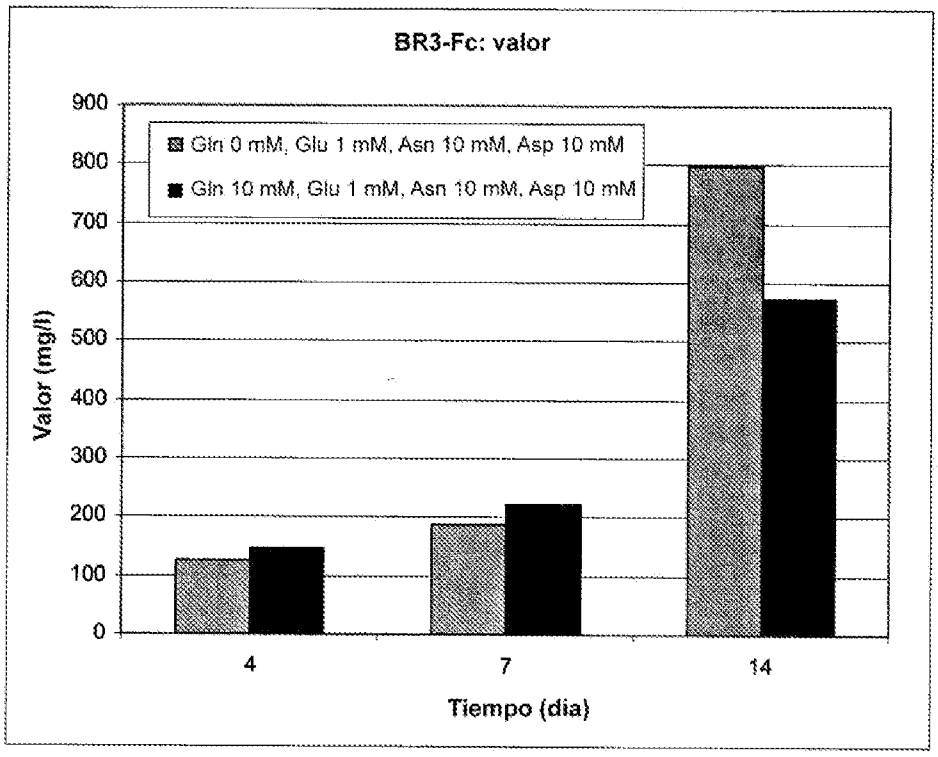

BR3-Fc: valor
Gln 0 mM, Glu 1 mM, Asn 10 mM, Asp 10 mM
Gln 10 mM, Glu 1 mM, Asn 10 mM, Asp 10 mM
Valor (mg/l)
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
4
7
14
Tiempo (dia)

Figura 6C

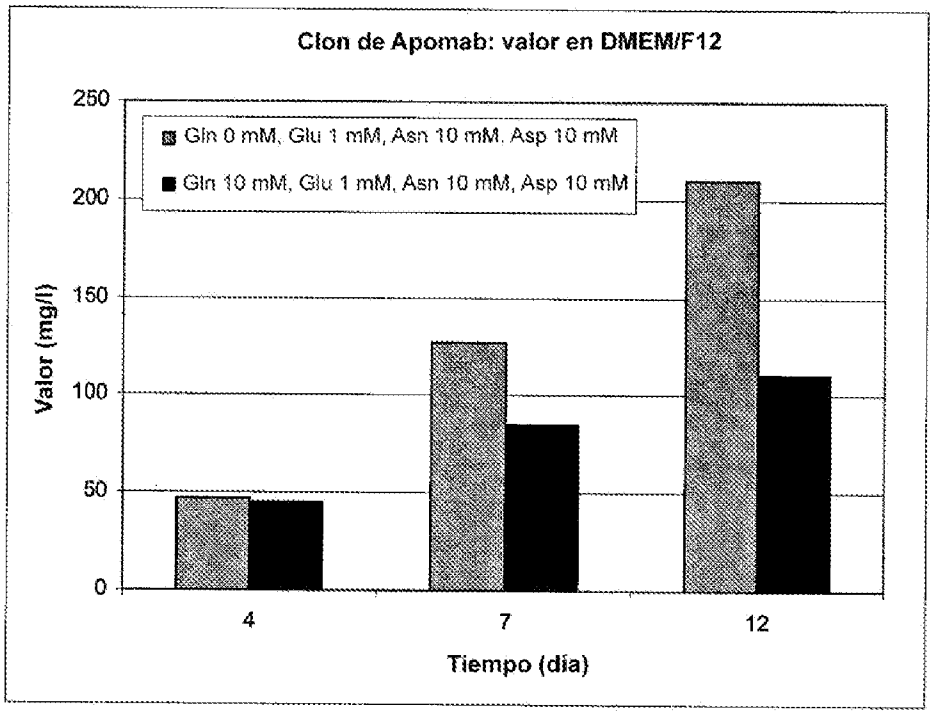

Clon de Apomab: valor en DMEM/F12
Gln 0 mM, Glu 1 mM, Asn 10 mM, Asp 10 mM
Gln 10 mM, Glu 1 mM, Asn 10 mM, Asp 10 mM
Valor (mg/l)
250
200
150
100
50
0
4
7
12
Tiempo (día)

Figura 7A

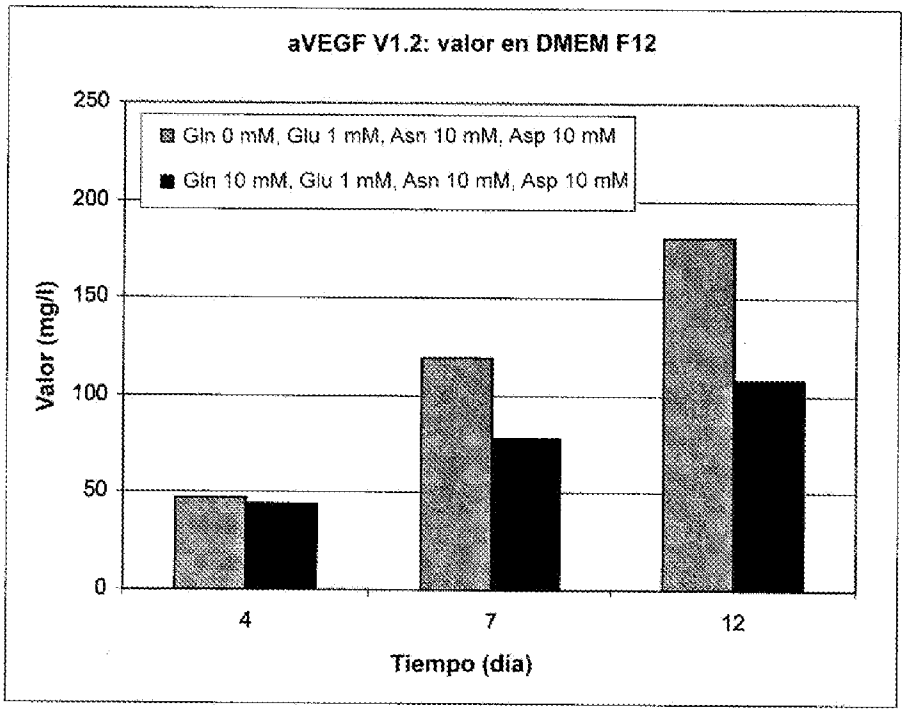

aVEGF V1.2: valor en DMEM F12
Gln 0 mM, Glu 1 mM, Asn 10 mM, Asp 10 mM
Gln 10 mM, Glu 1 mM, Asn 10 mM, Asp 10 mM
Valor (mg/l)
250
200
150
100
50
0
4
7
12
Tiempo (día)

Figura 7B

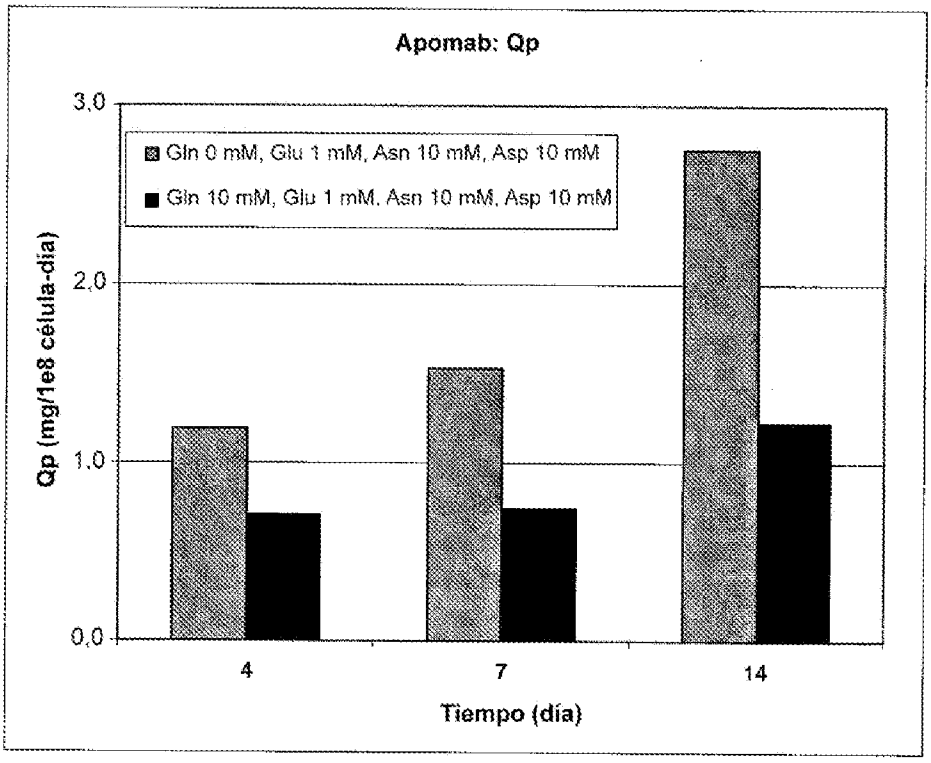

Apomab: Qp
3,0
2,0
1,0
0,0
Qp (mg/1e8 célula-día)
Gln 0 mM, Glu 1 mM, Asn 10 mM, Asp 10 mM
Gln 10 mM, Glu 1 mM, Asn 10 mM, Asp 10 mM
4
7
14
Tiempo (día)

Figura 8A

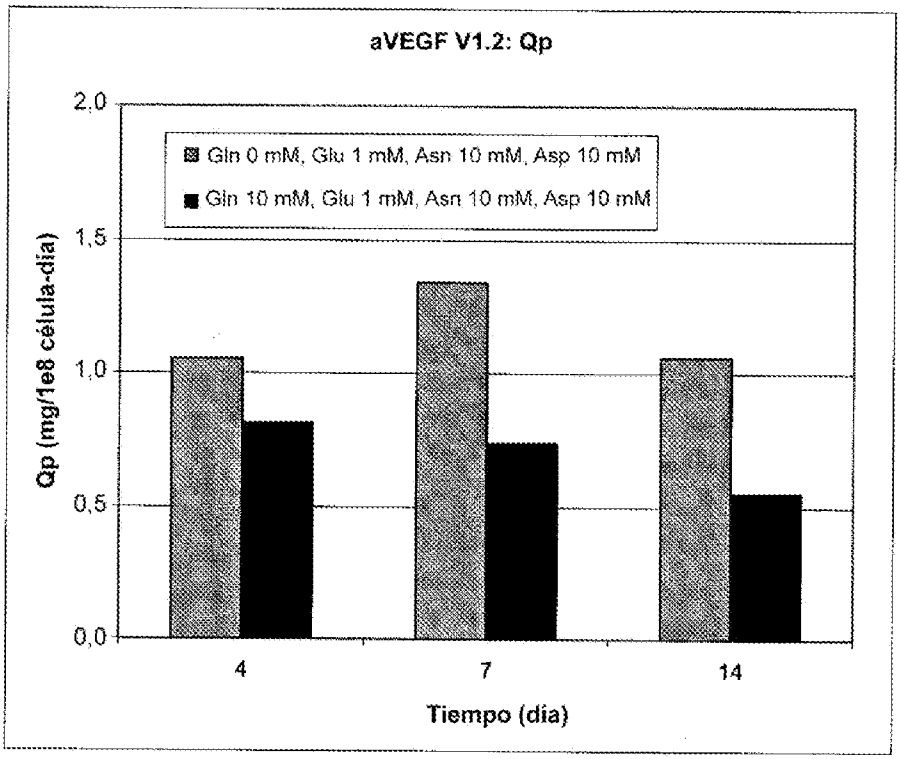

aVEGF V1.2: Qp
Gln 0 mM, Glu 1 mM, Asn 10 mM, Asp 10 mM
Gln 10 mM, Glu 1 mM, Asn 10 mM, Asp 10 mM
Qp (mg/1e8 célula-día)
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
4
7
14
Tiempo (día)

Figura 8B

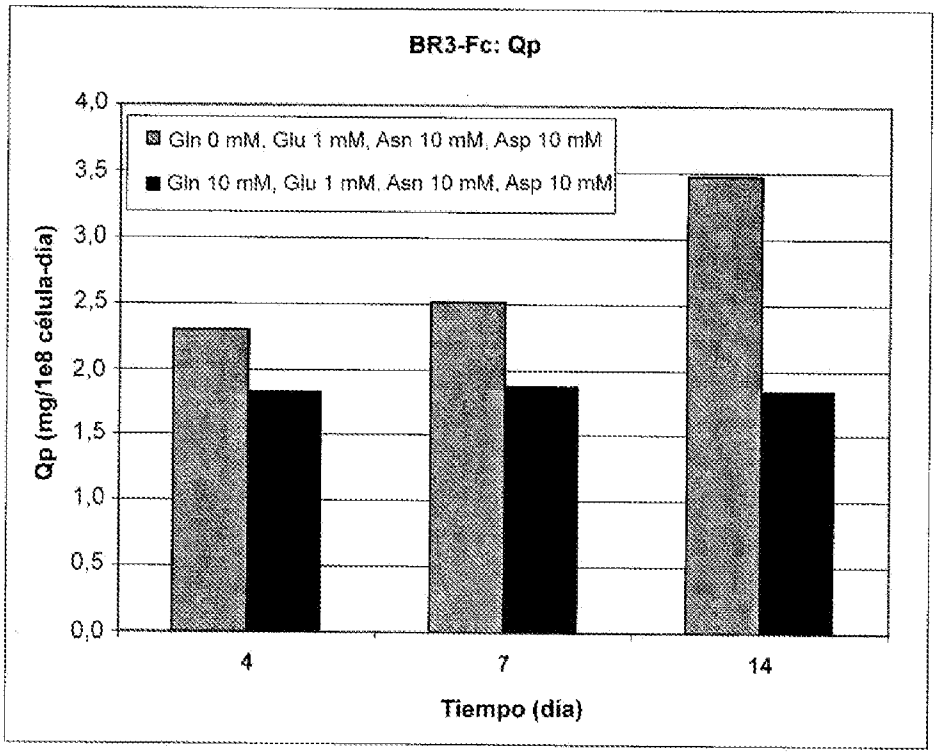

BR3-Fc: Qp
Gln 0 mM, Glu 1 mM, Asn 10 mM, Asp 10 mM
Gln 10 mM, Glu 1 mM, Asn 10 mM, Asp 10 mM
Qp (mg/1e8 célula-día)
4,0
3,5
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
4
7
14
Tiempo (día)

Figura 8C

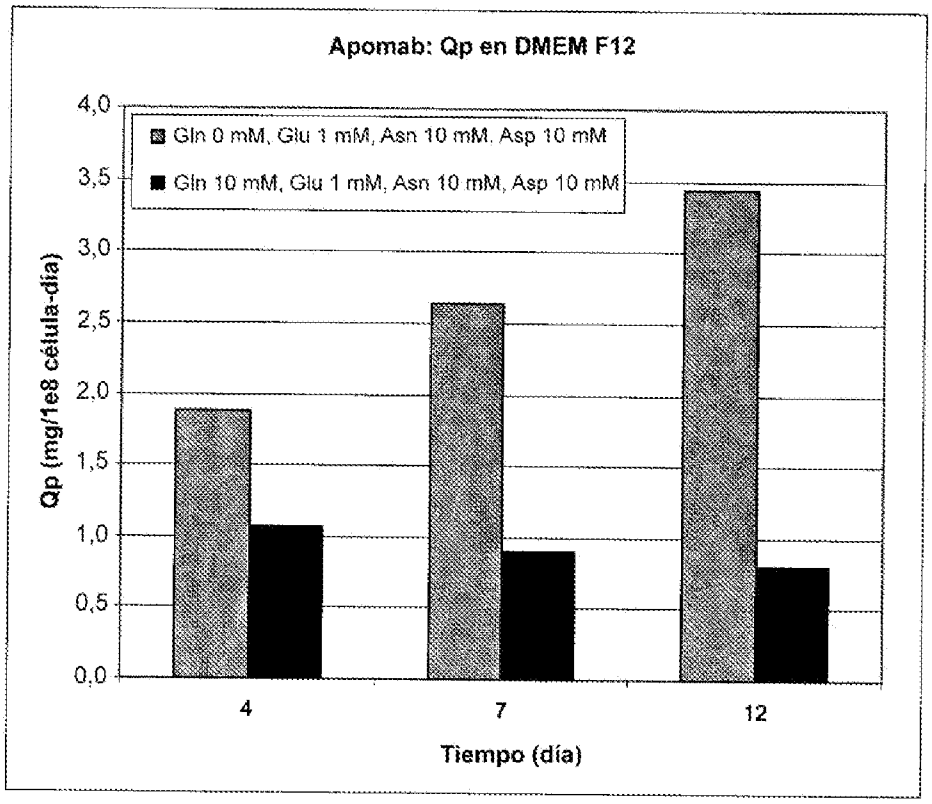

Apomab: Qp en DMEM F12
Gln 0 mM, Glu 1 mM, Asn 10 mM, Asp 10 mM
Gln 10 mM, Glu 1 mM, Asn 10 mM, Asp 10 mM
Qp (mg/1e8 célula-día)
4,0
3,5
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
4
7
12
Tiempo (día)

Figura 9A

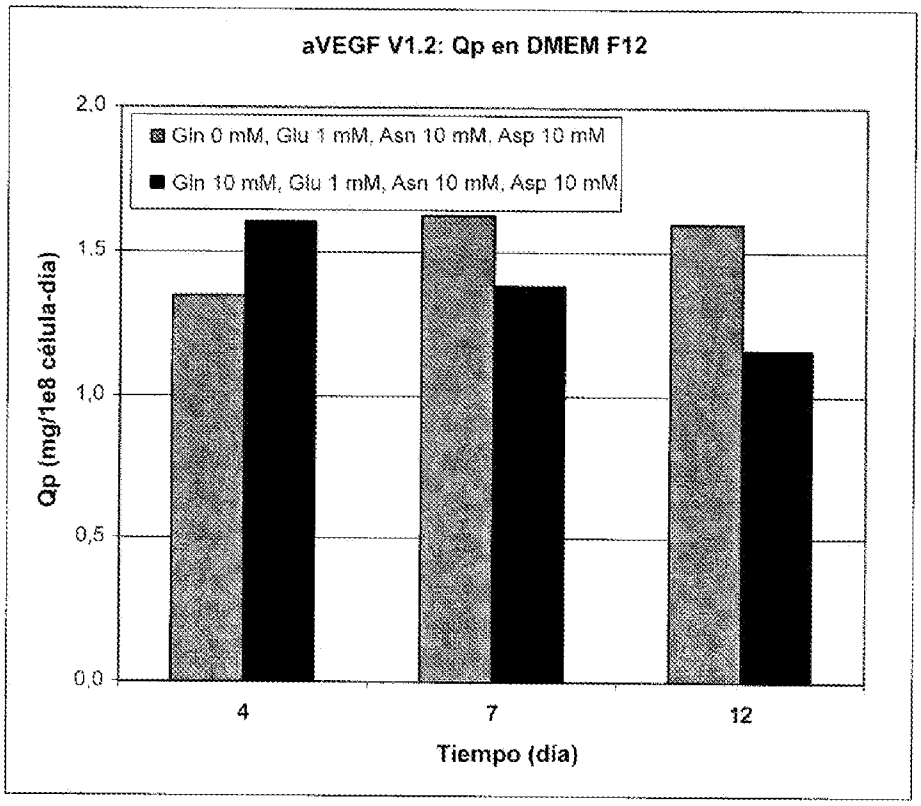

aVEGF V1.2: Qp en DMEM F12
Gln 0 mM, Glu 1 mM, Asn 10 mM, Asp 10 mM
Gln 10 mM, Glu 1 mM, Asn 10 mM, Asp 10 mM
Qp (mg/1e8 célula-día)
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
4
7
12
Tiempo (día)

Figura 9B

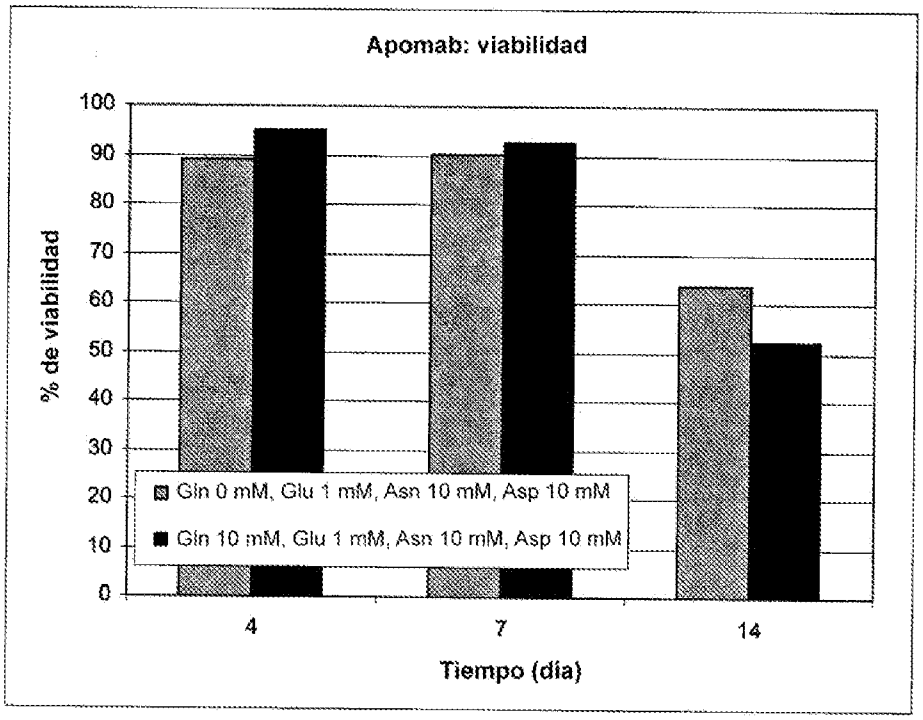

Apomab: viabilidad
% de viabilidad
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
4
7
14
Tiempo (día)
Gln 0 mM, Glu 1 mM, Asn 10 mM, Asp 10 mM
Gln 10 mM, Glu 1 mM, Asn 10 mM, Asp 10 mM

Figura 10A

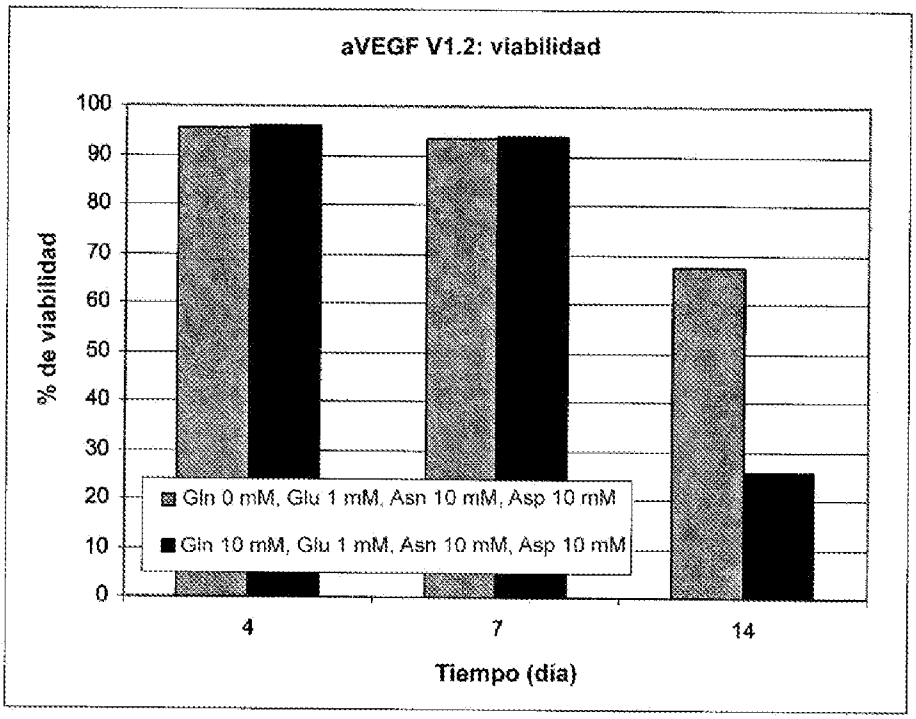

aVEGF V1.2: viabilidad
% de viabilidad
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Gln 0 mM, Glu 1 mM, Asn 10 mM, Asp 10 mM
Gln 10 mM, Glu 1 mM, Asn 10 mM, Asp 10 mM
4
7
14
Tiempo (día)

Figura 10B

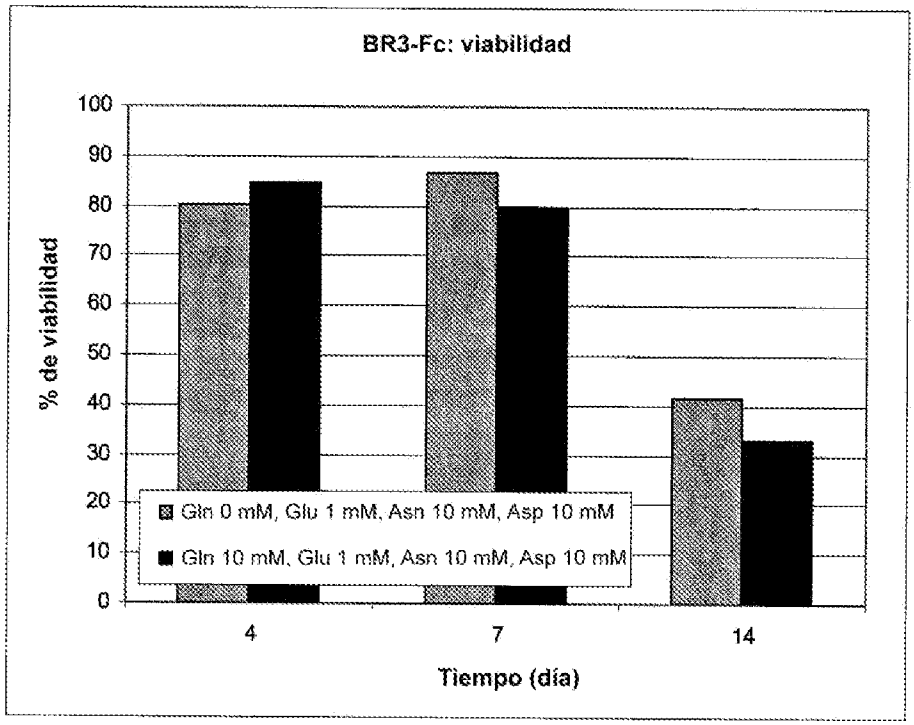

BR3-Fc: viabilidad
% de viabilidad
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Gln 0 mM, Glu 1 mM, Asn 10 mM, Asp 10 mM
Gln 10 mM, Glu 1 mM, Asn 10 mM, Asp 10 mM
4
7
14
Tiempo (día)

Figura 10C

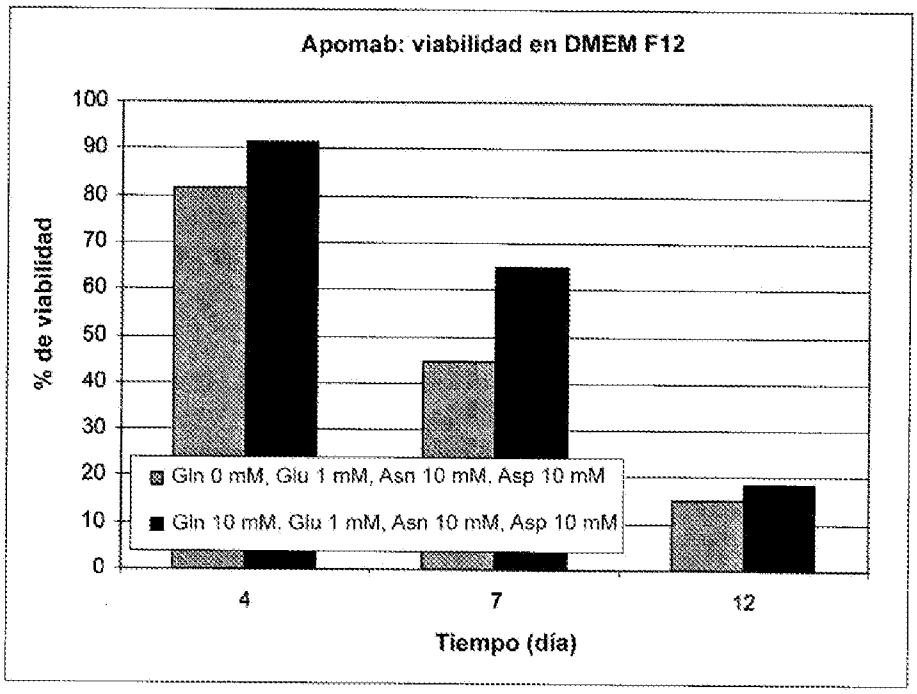

Apomab: viabilidad en DMEM F12
% de viabilidad
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
4
7
12
Tiempo (día)
Gln 0 mM, Glu 1 mM, Asn 10 mM, Asp 10 mM
Gln 10 mM, Glu 1 mM, Asn 10 mM, Asp 10 mM

Figura 11A

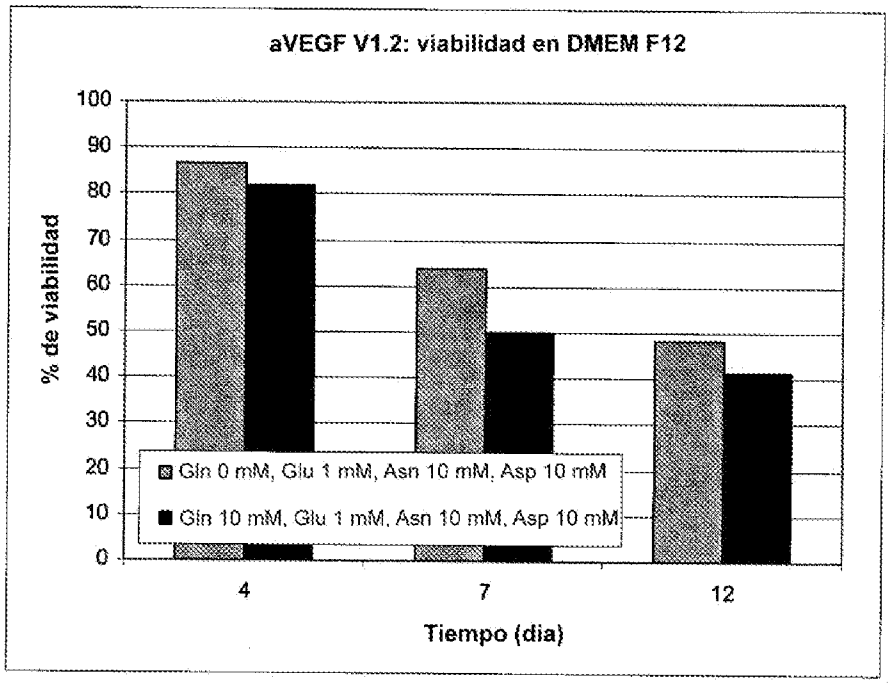

aVEGF V1.2: viabilidad en DMEM F12
% de viabilidad
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Gln 0 mM, Glu 1 mM, Asn 10 mM, Asp 10 mM
Gln 10 mM, Glu 1 mM, Asn 10 mM, Asp 10 mM
4
7
12
Tiempo (dia)

Figura 11B

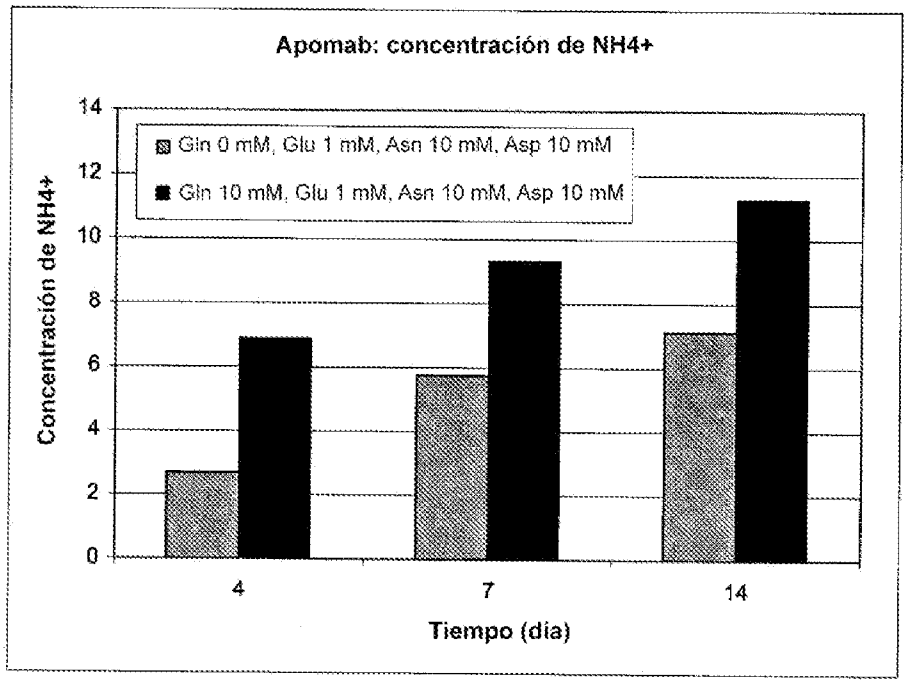

Apomab: concentración de NH4+
Concentración de NH4+
14
12
10
8
6
4
2
0
Gln 0 mM, Glu 1 mM, Asn 10 mM, Asp 10 mM
Gln 10 mM, Glu 1 mM, Asn 10 mM, Asp 10 mM
4
7
14
Tiempo (dia)

Figura 12A

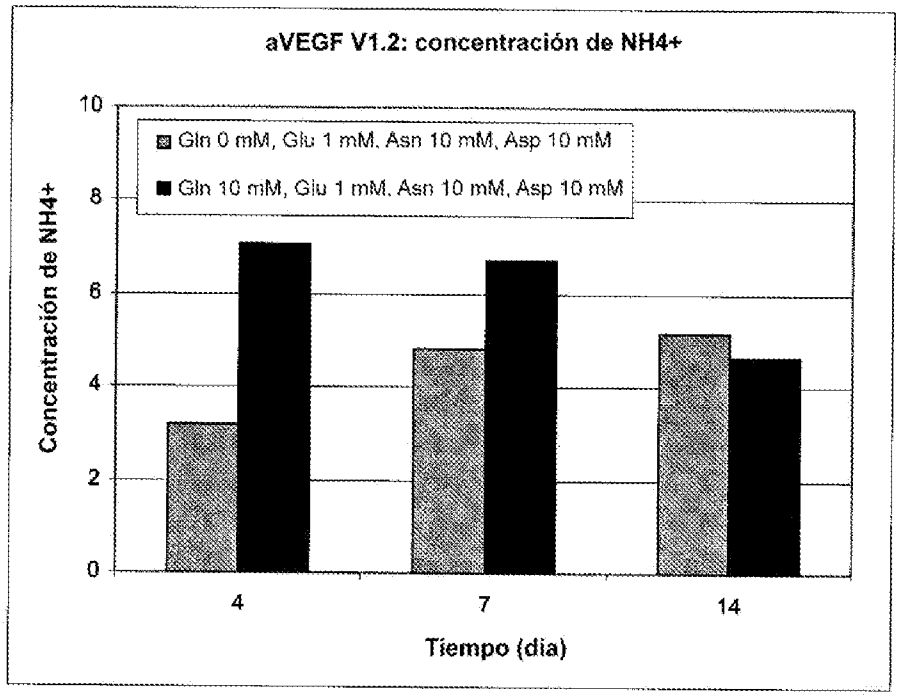

aVEGF V1.2: concentración de NH4+
Gln 0 mM, Glu 1 mM, Asn 10 mM, Asp 10 mM
Gln 10 mM, Glu 1 mM, Asn 10 mM, Asp 10 mM
Concentración de NH4+
10
8
6
4
2
0
4
7
14
Tiempo (dia)

Figura 12B

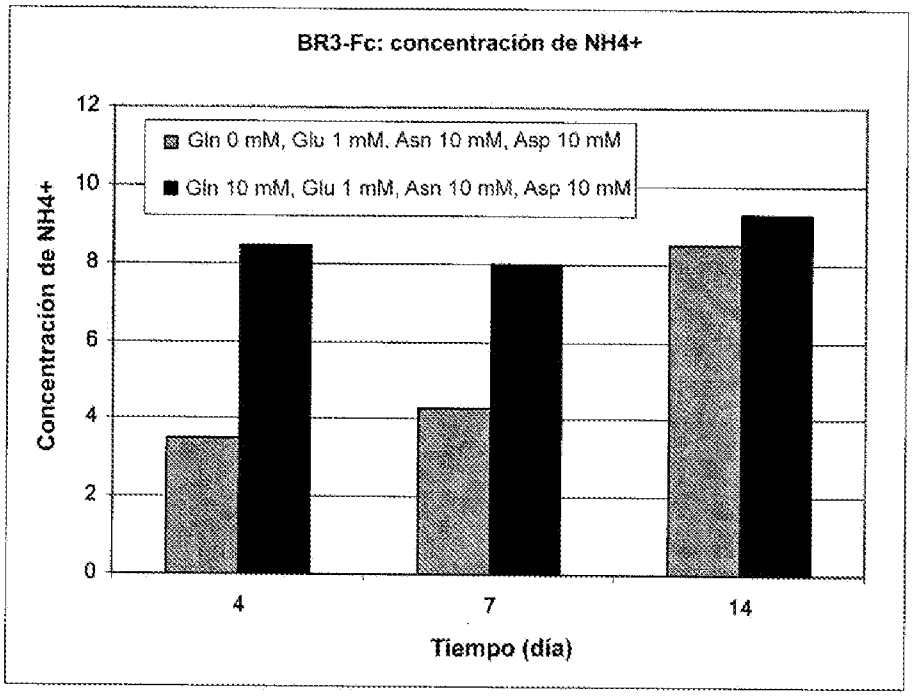

BR3-Fc: concentración de NH4+
Gln 0 mM, Glu 1 mM, Asn 10 mM, Asp 10 mM
Gln 10 mM, Glu 1 mM, Asn 10 mM, Asp 10 mM
Concentración de NH4+
12
10
8
6
4
2
0
4
7
14
Tiempo (día)

Figura 12C

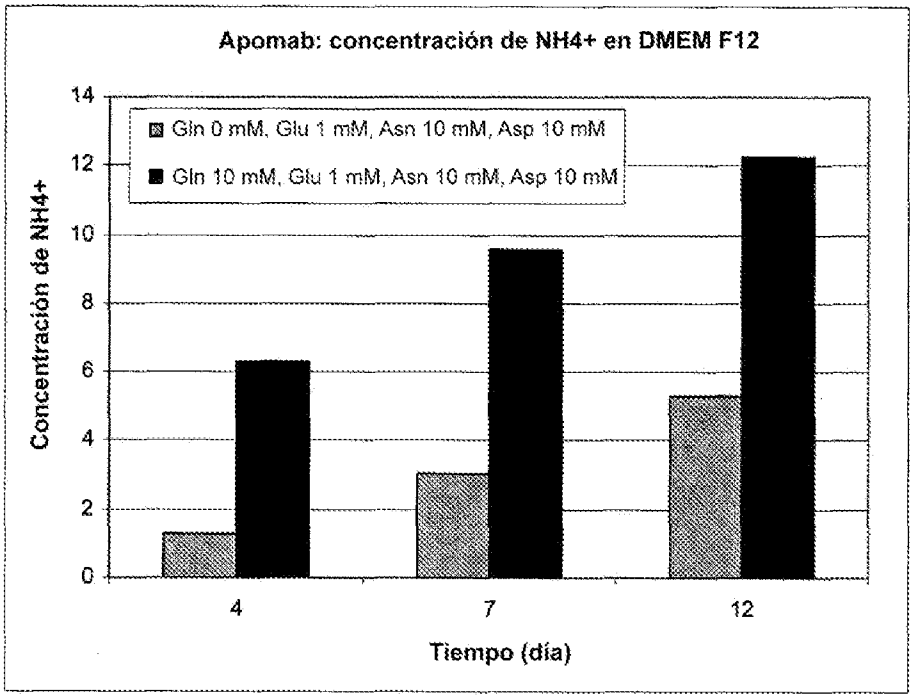

Apomab: concentración de NH4+ en DMEM F12
Gln 0 mM, Glu 1 mM, Asn 10 mM, Asp 10 mM
Gln 10 mM, Glu 1 mM, Asn 10 mM, Asp 10 mM
Concentración de NH4+
0
2
4
6
8
10
12
14
4
7
12
Tiempo (día)

Figura 13A

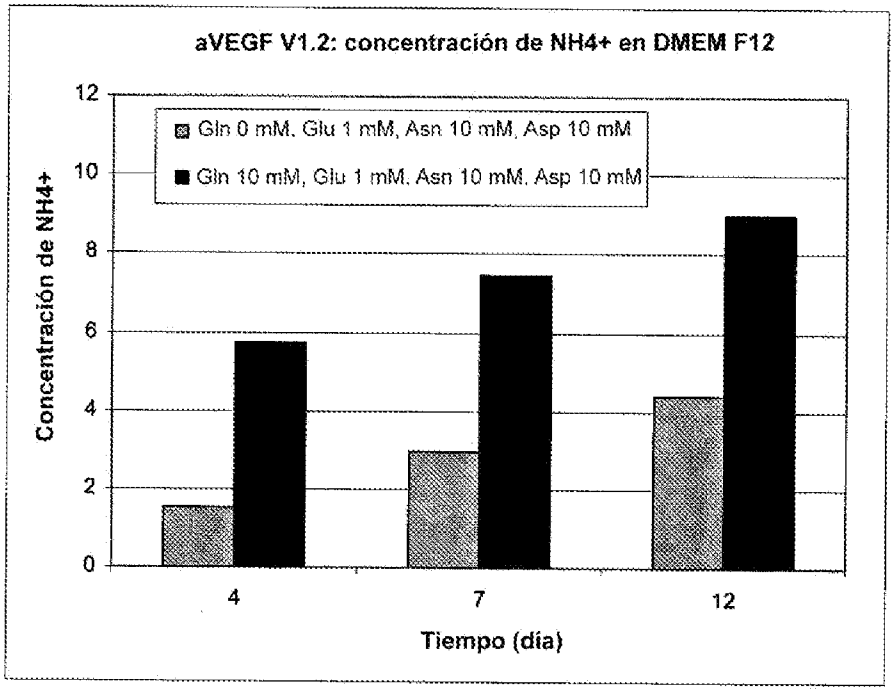

aVEGF V1.2: concentración de NH4+ en DMEM F12
Gln 0 mM, Glu 1 mM, Asn 10 mM, Asp 10 mM
Gln 10 mM, Glu 1 mM, Asn 10 mM, Asp 10 mM
Concentración de NH4+
0
2
4
6
8
10
12
4
7
12
Tiempo (día)

Figura 13B