



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 316 919**

51 Int. Cl.:

C07K 19/00 (2006.01) **C12N 15/62** (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01) **C12N 1/21** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) **A61K 39/00** (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01) **G01N 33/573** (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01) **C07K 14/505** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04077554 .6**

96 Fecha de presentación : **05.12.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1589034**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.10.2005**

54 Título: **Anticuerpos diseñados racionalmente.**

30 Prioridad: **05.12.2000 US 251448 P**
04.05.2001 US 288889 P
29.05.2001 US 294068 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2009

73 Titular/es: **ALEXION PHARMACEUTICALS, Inc.**
352 Knotter Drive
Cheshire, Connecticut 06410, US

72 Inventor/es: **Bowdish, Katherine S.;**
Frederickson, Shana y
Renshaw, Mark

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 316 919 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos diseñados racionalmente.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a moléculas de anticuerpos y a péptidos biológicamente activos como reactivos para diagnóstico y terapéuticos.

10 **Antecedentes de la técnica relacionada**

Los anticuerpos son producidos por los linfocitos B y defienden contra la infección. Los anticuerpos son producidos en millones de formas, cada una con una secuencia de aminoácidos diferente. Las moléculas de anticuerpo se componen de dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas. Cuando son digeridas por la enzima papaína, se producen dos fragmentos Fab idénticos junto con un fragmento Fc. Cuando se digieren con la enzima pepsina se produce un fragmento F(ab')₂. Las cadenas ligera y pesada están constituidas por regiones constantes y variables. Dentro de las regiones variables están las regiones hipervariables (regiones determinantes de complementariedad aka (CDR)) que forman la secuencia de unión al antígeno. Las partes restantes de las regiones variables se denominan regiones marco.

20 Importantes funciones biológicas, tales como la unión del receptor, la activación y la actividad enzimática, son atribuibles con frecuencia a regiones discretas de moléculas de proteínas mayores que comprenden un número limitado de restos de aminoácidos. Los péptidos que presentan unión, activación o actividad enzimática se han descubierto también cribando bancos de péptidos generados por el enlace aleatorio de restos de aminoácidos. Estos péptidos pueden no corresponder a una disposición lineal de aminoácidos en una molécula de proteína mayor que presenta actividad biológica similar y se denominan epítopos de péptido discontinuo o mimótopos. Se han descrito y clonado determinados péptidos miméticos. Véase, por ejemplo, la patente US nº 6.083.913 (trombopoyetina (TPO) mimética), patente US nº 5.835.382 (eritropoyetina (EPO) mimética), patente US nº 5.830.851 (EPO mimética) y Wrighton *et al.*, *Science* (1996) 273:458-63. Los epítopos y mimótopos peptídicos debido a su pequeño tamaño son ventajosos en potencia sobre las moléculas de proteína mayores para su utilización como agentes terapéuticos. Sin embargo, los resultados con estos péptidos como terapéuticos con frecuencia pueden ser insatisfactorios. Un inconveniente para la utilización de los péptidos como reactivos terapéuticos es que generalmente son inestables *in vivo*, es decir, sus índices de purificación a partir de suero pueden ser muy rápidos. Además, es difícil prever la actividad, terapéutica o de otro modo, de un péptido si se fusiona en una molécula mayor ya que los cambios de configuración y otras fuerzas moleculares pueden interferir con la actividad del péptido o negar totalmente ésta. Se han hecho intentos para introducir determinados polipéptidos en las regiones CDR de los anticuerpos. Véase, por ejemplo, la solicitud PCT WO 94/18221. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, debido a los cambios de configuración que pueden producirse por los aminoácidos circundantes, la actividad biológica de los polipéptidos activos puede disminuir o anularse. Por consiguiente, un objetivo en la presente memoria consiste en proporcionar anticuerpos diseñados racionalmente o fragmentos de los mismos que incluyen péptidos biológicamente activos para su utilización como reactivos de diagnóstico y terapéuticos.

El documento WO 00/61637 da a conocer el agonista receptor de EPO y los anticuerpos antagonistas y su utilización en la mejora de la eritropoyesis. El documento WO 99/25378 da a conocer anticuerpos en los que se ha sustituido una CDR por un ligando para un receptor.

Sumario

En la presente memoria se proporcionan anticuerpos recombinantes biológicamente activos que simulan la actividad de la eritropoyetina (EPO), procedimientos de preparación de dichos anticuerpos y procedimientos para su utilización en terapia y diagnóstico. Estos anticuerpos y los fragmentos de los mismos no adolecen de ninguna de las desventajas de los péptidos aislados, como anticuerpos naturalmente tienen vidas medias largas en el suero y son muy específicos en la unión a su diana. Se ha descubierto de manera sorprendente que la incorporación de aminoácidos específicos que rodean a un péptido diana que se ha combinado en una molécula de anticuerpo aumenta realmente la actividad biológica del péptido.

Las inmunoglobulinas tienen un péptido de interés insertado en la región determinante de complementariedad (CDR) de una molécula de anticuerpo. La molécula de anticuerpo sirve como estructura para la presentación del péptido y proporciona aumento de estabilidad del péptido. El péptido opcionalmente sustituye todos los aminoácidos de una región CDR, o puede añadirse a una CDR existente, con lo que la especificidad del antígeno original se destruye, en la que la región CDR está definida por uno de los dos esquemas aceptados (véase, Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed. (1991), NIH Publication 91-3242 y Chothia *et al.*, *J. Mol. Bio.* (1992) (227)776-98). Además, pueden introducirse al azar aminoácidos adicionales que flanquean el péptido y permiten la identificación de la presentación óptima del péptido en el marco del anticuerpo. Se ha descubierto de manera sorprendente que en determinados casos una prolina que flanquea el péptido proporciona un aumento de la actividad biológica.

En determinadas formas de realización una molécula de inmunoglobulina presenta restos de aminoácidos correspondientes a una región determinante de complementariedad (CDR) sustituida con restos de aminoácidos que com-

ES 2 316 919 T3

prende un péptido hemopoyético biológicamente activo que es un mimético de la eritropoyetina. En otra forma de realización específica, los restos de aminoácidos correspondientes a por lo menos dos regiones determinantes de complementariedad (CDR) se sustituyen cada uno por restos de aminoácidos que comprenden dicho péptido biológicamente activo. En una molécula individual de inmunoglobulina, una o más regiones determinantes de complementariedad pueden sustituirse con un péptido; por ejemplo, CDR3 de una cadena pesada, CDR3 de una cadena ligera, CDR3 tanto de cadena pesada como de ligera, CDR2 y CDR3 de cadena pesada o CDR2 y CDR3 de cadena ligera. Son posibles otras combinaciones de regiones CDR sustituidas, incluyendo la sustitución de CDR1. Además, en lugar de la sustitución de un CDR, se podría añadir el péptido a una CDR natural sin la sustitución existente de restos de aminoácidos aunque destruyendo todavía la especificidad original del antígeno.

De este modo, en un aspecto, se proporciona un péptido biológicamente activo con aumento de actividad añadiendo una prolina a su terminal carboxi para formar un péptido prolongado por la prolina biológicamente activo que se utiliza para sustituir o añadir por lo menos una fracción de por lo menos una región CDR en una molécula de inmunoglobulina. En otro aspecto, se proporciona una molécula de inmunoglobulina que tiene un péptido mimético EPO como sustitución para por lo menos una región CDR natural. En este aspecto, los péptidos miméticos EPO pueden opcionalmente prolongarse con prolina como se describe en la presente memoria.

En las formas de realización más específicas la molécula de inmunoglobulina es un Fab, un ScFv, una región variable de la cadena pesada, una cadena ligera o una molécula completa de IgG. La molécula de inmunoglobulina puede presentar también un dominio de dimerización, con el fin de permitir a las moléculas de inmunoglobulina que presenten solamente una CDR sustituida con un péptido para dimerizar y de este modo activar los receptores que requieren dimerización para la activación.

En determinadas formas de realización, el péptido biológicamente activo que es un mimético de EPO puede ser un epítipo del péptido lineal o un epítipo del péptido discontinuo. Además, el péptido biológicamente activo, cuando se sustituye para una región CDR, puede tener además de prolina, uno, dos o más restos de aminoácido flanqueantes adicionales próximos al terminal amino y/o carboxi del péptido, que están colocados entre el péptido y los restos de la región marco de la inmunoglobulina (es decir, en el que estaba la unión entre una CDR y el marco adjunto). Los restos de aminoácidos flanqueantes no están por lo general presentes en el péptido activo. Si se prefiere los restos de aminoácido flanqueantes son ya conocidos, los restos de aminoácidos flanqueantes son codificados por codones que designan los restos de aminoácidos específicos. Sin embargo, utilizando inicialmente codones, tales como NNK, NNY, NNR, NNS y similares, que designan múltiples restos de aminoácidos, se genera un conjunto de péptidos que se diferencian unos de otro meramente en los restos flanqueantes. Los restos de aminoácidos flanqueantes pueden determinar la presentación del péptido en la molécula de inmunoglobulina o el fragmento de la misma y de este modo pueden influir en la unión y/o actividad biológica presentada por el péptido. Este conjunto aleatorio de aminoácidos flanqueantes permite la selección del mejor contexto que presente la secuencia peptídica dentro del marco del anticuerpo que da como resultado la unión específica a la molécula diana y la presentación de la actividad biológica óptima. El cribado de bancos de inmunoglobulinas con un péptido común pero diferentes restos de aminoácidos flanqueantes puede realizarse utilizando ensayos de unión, crecimiento y activación conocidos por los expertos en la materia y tal como se describe en la presente memoria.

El péptido que sustituye los restos de aminoácidos que comprenden una CDR es un mimético de EPO que se une específicamente a una molécula diana y cuya utilidad podría ser alterada por la incorporación de un marco de anticuerpo. El péptido que es un mimético de EPO presenta una actividad específica (por ejemplo, agonista, etc.). En una forma de realización específica el péptido es un agonista para un receptor de la superficie celular que es para EPO. En las formas de realización particularmente útiles, la sustitución de por lo menos una parte de una CDR con un péptido que es un mimético de EPO proporciona un anticuerpo que actúa como agonista. El péptido que es un mimético de EPO utilizado para sustituir por lo menos una parte de una CDR puede tener propiedades de agonista. Mejor aún, la actividad agonista puede presentarse solamente cuando el péptido está sustituido por al menos una parte de una CDR y de este modo está presente en un anticuerpo modificado genéticamente. En dichas formas de realización, la presencia o ausencia de prolina que flanquea al péptido no es crítica, pero en algunos casos puede resultar preferido.

De este modo, en un aspecto la presente descripción proporciona un anticuerpo agonista que comprende una estructura de anticuerpo modificada genéticamente que contiene por lo menos un péptido que es un mimético de EPO biológicamente activo insertado en, o en lugar de al menos una parte de, una o más CDR. El péptido biológicamente activo presenta actividad agonista antes de la inserción en la estructura del anticuerpo. En determinadas formas de realización la estructura de anticuerpo está modificada genéticamente para que contenga dos péptidos que pueden dimerizarse entre sí.

Incluso en otro aspecto, la presente descripción proporciona una molécula de inmunoglobulina que comprende una región en la que los restos de aminoácido correspondientes a por lo menos una parte de una región determinante de complementariedad (CDR) están sustituidos con un péptido biológicamente activo, que es un mimético de EPO con lo que la molécula de inmunoglobulina presenta actividad agonista. El péptido biológicamente activo presenta actividad agonista antes de la inserción en la estructura del anticuerpo. En las formas de realización especialmente útiles la molécula de inmunoglobulina presenta actividad agonista de c-mpl.

ES 2 316 919 T3

Incluso en otro aspecto, la presente descripción proporciona una molécula de inmunoglobulina que comprende un péptido biológicamente activo que es un mimético de EPO insertado en una región determinante de complementariedad (CDR), con lo que la molécula de inmunoglobulina presenta actividad agonista.

5 Incluso en otro aspecto, la presente descripción proporciona una molécula de inmunoglobulina que comprende una región en la que los restos de aminoácido correspondientes a por lo menos una parte de una región determinante de complementariedad (CDR), se sustituyen por un péptido biológicamente activo que es un mimético de EPO, con lo que la molécula de inmunoglobulina presenta actividad agonista de c-mpl.

10 El péptido biológicamente activo que puede sustituir los restos de aminoácido de una CDR es un péptido mimético de EPO agonista. Dicho péptido agonista de EPO tiene como secuencia de aminoácidos DYHCRMGLTWVCK PLGG (SEC. ID. n°: 3). Son posibles otras secuencias de aminoácidos para los péptidos miméticos del agonista EPO, que pueden encontrarse utilizando ensayos de unión, crecimiento y activación conocidos por los expertos en la materia y como se describe en la presente memoria. Los péptidos miméticos de EPO agonistas cuando se colocan en regiones
15 CDR pueden también tener uno o más restos de aminoácidos adicionales en los terminales amino y/o carboxilo del péptido que llegan a estar unidos por enlace covalente a restos de inmunoglobulina. De este modo, en las formas de realización específicas proporcionadas en la presente memoria son moléculas de inmunoglobulina (IgG) (por ejemplo, Fab, scFv, cadenas pesadas o ligeras) que tienen una región CDR sustituida con un péptido mimético de EPO. El mimético de EPO comprende por lo menos la secuencia DYHCRMGLTWVCKPLGG (SEC. ID. n°: 3). Asimismo,
20 pueden tener opcionalmente una prolina adicional en la posición corriente abajo inmediata.

Cualquier molécula de inmunoglobulina (anticuerpo) podía proporcionar potencialmente la estructura y tener una CDR sustituida con un péptido que es un mimético de EPO según la presente descripción. Para la utilización terapéutica o de diagnóstico *in vivo* resulta preferido que el anticuerpo sea de origen humano o humanizado, tal como
25 una inmunoglobulina de la vacuna contra el tétanos. Además, independientemente de la presencia de aminoácidos flanqueantes adicionales o junto con la misma unidos al péptido, uno o más restos de aminoácidos en otras regiones de la inmunoglobulina, otra(s) región(s) de CDR y/o regiones del marco, pueden alterarse al modificar la unión, actividad y/o expresión presentada por el péptido en el contexto de la molécula de inmunoglobulina.

30 Se contempla que después de la destrucción de anticuerpos recombinantes biológicamente activos, dichos recombinantes pueden estar sometidos a procedimientos al azar conocidos en la técnica por introducir mutaciones en uno o más puntos en la secuencia para alterar la actividad biológica de los anticuerpos. Tras la generación de dichos mutantes que utilizan procedimientos al azar tales como los descritos en la presente memoria, en los recombinantes resultantes se puede ensayar la actividad utilizando ensayos de unión, crecimiento, expresión y activación.
35

Se proporcionan además moléculas de ácido nucleico que codifican moléculas de inmunoglobulina que tienen los aminoácidos de una o más regiones de CDR sustituidos por un péptido biológicamente activo que es un mimético de EPO. Estas moléculas de ácido nucleico pueden estar presentes en un vector de expresión, que puede introducirse
40 (transfectarse) en una célula hospedadora recombinante para la expresión de estas moléculas. Se proporcionan también procedimientos de producción de una molécula de inmunoglobulina que contiene un péptido biológicamente activo que es un mimético de EPO que comprende cultivar una célula hospedadora recombinante en condiciones tales que se expresa el ácido nucleico contenido dentro de la célula.

45 Se proporcionan también composiciones, que comprenden una molécula de inmunoglobulina que tiene restos de aminoácidos correspondientes a una CDR sustituida con restos de aminoácidos que comprenden un péptido mimético EPO y un portador farmacéuticamente aceptable.

Se proporcionan además péptidos miméticos de EPO con restos flanqueantes adicionales que son adecuados para la sustitución de las CDR. Se proporcionan también moléculas de ácido nucleico que codifican estos péptidos.
50

Se proporcionan además procedimientos de modificación genética de moléculas de inmunoglobulina que presentan una actividad agonista en los que un péptido biológicamente activo que es un mimético de EPO sustituye por lo menos a una parte de una o más regiones CDR de las cadenas ligera y/o pesada. Los procedimientos comprenden insertar una molécula de ácido nucleico que codifica un péptido biológicamente activo que es un mimético de EPO
55 en lugar de al menos una región CDR de una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina o añadir la molécula a la secuencia natural de CDR y a continuación expresar la molécula de ácido nucleico que codifica el dominio variable de la cadena pesada o ligera de inmunoglobulina junto con su dominio de la región variable complementaria, de modo que se asocian los dos dominios.

60 Se proporciona además procedimientos para modificar genéticamente moléculas de inmunoglobulina que presentan una actividad (propiedad) del péptido EPO biológicamente activo en el que un péptido biológicamente activo sustituye una o más regiones CDR de las cadenas ligeras y/o pesadas. Los procedimientos comprenden insertar una molécula de ácido nucleico que codifica un péptido biológicamente activo que es un mimético de EPO en lugar de por lo menos una parte de una región CDR de una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena pesada o ligera de
65 inmunoglobulina o añadir la molécula a una secuencia de CDR natural; y expresar la molécula de ácido nucleico que codifica el dominio variable de la cadena pesada o ligera de inmunoglobulina junto con su dominio de la región variable de complementariedad, de modo que las dos cadenas se asocian.

ES 2 316 919 T3

En otro aspecto, esta descripción proporciona un procedimiento para producir en un polipéptido una secuencia de unión que puede unirse a un agente preseleccionado, incluyendo el procedimiento las etapas que consisten en introducir una secuencia nucleotídica que codifica una secuencia de restos de aminoácido que define dicha secuencia de unión en una región CDR de un ácido nucleico que comprende un gen con cadena pesada o ligera de inmunoglobulina ampliando la región CDR del gen de inmunoglobulina, teniendo la secuencia nucleotídica introducida la fórmula $-X_a-$
5 $Y-X_b$, en la que X es igual o diferente en cada caso y representa un trinucleótido aleatorio, la suma de a y b es 4 o menos e Y es una secuencia nucleotídica que codifica un dominio de reconocimiento mínimo de dicha secuencia de unión. En las formas de realización especialmente útiles, se consigue la ampliación utilizando PCR de superposición, sin embargo, cualquier técnica de ampliación conocida podría ampliarse, tal como, los procedimientos dados a conocer en el documento WO 94/18221.

Incluso en otro aspecto, esta descripción proporciona procedimientos para la creación de un banco de anticuerpos monoclonales que puede ser cribado para una actividad deseada. Estos procedimientos de preparación de un banco incluyen las etapas de inserción de una molécula de ácido nucleico que codifica un péptido biológicamente activo que
15 es un mimético de EPO en, o en lugar de por lo menos una parte de, una o más regiones CDR de una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina, proporcionando hasta un par de trinucleótidos aleatorios o parte de una molécula de ácido nucleico insertada, y expresar un banco de anticuerpos monoclonales. En formas de realización particularmente útiles, se proporciona un par de trinucleótidos al azar en ambos lados de las moléculas de ácido nucleico insertadas. En el banco de anticuerpos monoclonales producido de este modo puede
20 criarse a continuación una actividad deseada.

En una forma de realización específica, los anticuerpos presentan diferentes aminoácidos que flanquean el péptido en el aminoácido y el terminal carboxilo donde el péptido llega a estar unido a la estructura del anticuerpo. Esto, produce una población de moléculas de anticuerpo que puede diferenciarse en la presentación del péptido. Se criba la
25 población para los anticuerpos que presentan la actividad biológica del péptido que es un mimético de EPO. En una forma de realización preferida, el aminoácido adyacente inmediatamente al péptido es una prolina.

Si la actividad del péptido biológicamente activo que es un mimético de EPO es para activar una molécula diana, esto puede requerir la dimerización de dos moléculas diana (por ejemplo receptores en las superfamilias hematopo-
30 yéticas). Para que se produzca la dimerización, deben colocarse dos péptidos en cada unión a una molécula diana de modo que las dos moléculas diana unidas puedan a continuación asociarse de manera apropiada. Esto puede realizarse teniendo dos péptidos presentes en el mismo anticuerpo o produciendo dos moléculas de anticuerpo que contiene cada una un péptido para unirse conjuntamente. De este modo, por ejemplo, un solo péptido puede insertarse en por lo menos una parte de una CDR o sustituirse por ella y a continuación expresarse como inmunoglobulina o un fragmento
35 $F(ab')_2$. Como otro ejemplo, pueden insertarse dos péptidos o sustituirse por al menos una parte de una o más CDR y se expresa como cualquier anticuerpo.

La identificación de anticuerpos puede realizarse con el ensayo de adhesión celular sobre plástico con células que tienen moléculas en la superficie a las que se une específicamente el péptido. Puede también utilizarse la unión a la
40 fase sólida utilizando moléculas diana purificadas. La unión puede realizarse en solución utilizando moléculas diana marcadas. Además, los anticuerpos pueden identificarse mediante la utilización de ensayos biológicos para la actividad agonista o antagonista del péptido que es un mimético de EPO.

Se proporcionan también bancos de moléculas de inmunoglobulina diferentes en las que los restos de aminoácidos correspondientes a una región determinante de complementariedad (CDR) se sustituyen con restos de aminoácidos que comprenden un péptido biológicamente activo que es un mimético de EPO que presenta por lo menos un resto de aminoácido adicional en el terminal amino o carboxilo y moléculas de inmunoglobulina se diferencian por el resto de aminoácido adicional del péptido.

En las formas de realización específicas el péptido biológicamente activo es un mimético de EPO. Los anticuerpos del banco se presentan en el fago.

Se proporcionan además procedimientos para estimular la proliferación, diferenciación o crecimiento de células, que incluyen poner en contacto las células con una cantidad eficaz de una molécula de inmunoglobulina que tiene una
55 o más CDR sustituida con un péptido biológicamente activo que es un mimético de EPO que se une a un receptor en la superficie de las células.

Las moléculas de inmunoglobulina pueden utilizarse en un procedimiento de estimulación de la proliferación, diferenciación o crecimiento de células hematopoyéticas, que comprende poner en contacto las células con una cantidad eficaz de una molécula de inmunoglobulina que tiene una o más CDR sustituida con un péptido mimético de EPO.

Las moléculas de inmunoglobulina pueden utilizarse en un procedimiento de activación de una proteína del receptor hemodimérico, poniendo en contacto el receptor con una molécula de inmunoglobulina que tiene una región CDR sustituida con un péptido biológicamente activo que es un mimético de EPO que se une específicamente al receptor y
65 que ha sido dimerizada.

ES 2 316 919 T3

Descripción de los dibujos

La Figura 1 es una representación en diagrama del vector pRL4.

5 Las Figuras 2A y B presentan la secuencia de la estructura del anticuerpo de la vacuna contra el tétanos humana, las cadenas ligera y pesada, respectivamente.

10 La Figura 3 es un diagrama que representa el injerto del péptido mimético AF12505 de TPO en la región CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo con la estructura de la vacuna contra el tétanos. XX representa los aminoácidos aleatorios adyacentes.

La Figura 4 es un diagrama de la construcción de un péptido clonado en la región CDR3 de la cadena pesada.

15 La Figura 5 representa las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de los clones que codifican el péptido mimético AF1205 de TPO con diferentes restos flanqueantes aleatorios.

20 La Figura 6A-C representa la secuencia del ácido nucleico del plásmido pRL8 (SEC. ID. n°: 60). pRL8 es una versión modificada de pRL4 (pRL4 es conocido también como pComb 3X). El pRL4 fue modificado entre las secuencias de restricción Spe I y Sfi I cercanas (mostrada con subrayado) que incluye un enlazador flexible (región bisagra kappa murina) seguido de un dominio de dimerización de cremallera Jun leucina.

La Figura 7 es una representación esquemática de una parte del plásmido pRL8.

25 La Figura 8 representa la secuencia de ácido nucleico de una parte del plásmido pRL8 (SEC. ID. n°: 52) junto con las secuencias de aminoácidos correspondientes a determinadas secuencias de ácido nucleico delineadas (SEC. ID. n°: 53).

30 La Figura 9 es un diagrama que presenta las secuencias de determinados clones positivos para TPO en la presente memoria.

La Figura 10 es un gráfico de barras que presenta la actividad de determinados clones de Fab que contienen 2 péptido miméticos de TPO.

35 La Figura 11 es un gráfico de barras que presenta la actividad de determinados clones de Fab que contienen 2 ó 3 péptido miméticos de TPO.

La Figura 12 representa gráficamente la actividad del clon 59 reflejada por inducción de la actividad de luciferasa.

40 La Figura 13A representa la secuencia de aminoácidos y la secuencia del ácido nucleico de la cadena pesada 5G1.1-TPO (SEC. ID. n°: 67 y n°: 68, respectivamente).

45 La Figura 13B representa la secuencia de aminoácidos y la secuencia del ácido nucleico de la cadena ligera 5G1.1-TPO (SEC. ID. n°: 69 y n°: 70, respectivamente).

La Figura 14 es un gráfico de barras que presenta el análisis FACS de la unión del receptor cMpl del péptido mimético 5G1.1+ TPO purificado en comparación con el anticuerpo precursor 5G1.1.

50 La Figura 15 es un gráfico de barras que presenta la actividad comparativa del anticuerpo 5G1.1 que contiene el péptido mimético de TPO en relación con las células transfectadas con un vector de referencia que no contiene ningún cMpl-R y las células transfectadas con un vector que contiene cMpl-R.

La Figura 16 presenta la secuencia del clon 429/Xb4 (SEC. ID. n°: 116).

55 La Figura 17 es un diagrama de flujo que presenta las etapas iniciales de preparación del vector pRL5-Kappa.

La Figura 18 es un diagrama de flujo que presenta etapas adicionales para la preparación del vector pRL5-Kappa.

60 La Figura 19 es una cartografía del vector pRL5.

La Figura 20 es un diagrama esquemático del vector pRL5-Kappa.

La Figura 21A-I presenta la secuencia del ácido nucleico del vector pRL5-Kappa.

65 Descripción detallada

Como se utiliza en la presente memoria, “inmunoglobulina” se refiere a una molécula o moléculas de inmunoglobulina completa(s) que contiene(n) partes inmunológicamente activas de las moléculas de inmunoglobulinas completas

ES 2 316 919 T3

e incluye Fab, F(ab')₂, scFv, Fv, regiones variables de la cadena pesada y regiones variables de la cadena ligera. Los términos inmunoglobulina y anticuerpo se utilizan indistintamente en la presente memoria.

5 Cualquier péptido que es un mimético de EPO que presenta una propiedad útil es adecuado para la inserción en una estructura de anticuerpo. Las actividades y utilizaciones peptídicas incluyen, pero no se limitan a, unir un receptor, unir una molécula de la superficie unida a la membrana, unir un ligando, unir una enzima o proteína estructural, activar o inhibir un reactor, administración del fármaco dirigida o cualquier actividad enzimática. Se seleccionan normalmente los péptidos cuya utilidad puede aumentarse a partir del aumento de estabilidad proporcionado en ellos cuando se presenta en el contexto de una molécula de inmunoglobulina. Debe apreciarse que "actividad biológica" tal como se utiliza en la presente memoria incluye cualquier actividad asociada a una molécula con actividad en un sistema biológico, incluyendo, pero sin limitarse a, la actividad estimulante o inhibidora desencadenada por la interacciones proteína-proteína así como la cinética que rodea a dichas interacciones incluyendo la estabilidad de un complejo proteína-proteína. Potenciando o aumentando la "actividad biológica" en la presente memoria significa incluir un aumento de la actividad total o un aumento en cualquier componente de actividad total. Debe apreciarse que el péptido puede presentar una actividad biológica (tal como, por ejemplo, unión simplemente a una diana) antes de la inserción en la estructura de anticuerpo, y una actividad biológica diferente o aumentada (tal como, por ejemplo, actividad agonista) tras la inserción en la estructura de anticuerpo.

20 Pueden también descubrirse péptidos que son miméticos de EPO utilizando procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Con objeto de identificar una región de una proteína que está implicada en una función biológica específica, un sondeo de los fragmentos del péptido más cortos que forman esta proteína puede poner de manifiesto el epítipo responsable del péptido lineal. Alternativamente sondando bancos de péptidos aleatorios, un péptido que representa un epítipo lineal óptimo o un epítipo discontinuo puede descubrirse que simula la actividad de la proteína natural. Un procedimiento para la selección se denomina presentación del fago del péptido. En este método, un banco de epítipo del péptido aleatorio se genera de modo que los péptidos están presentes en la superficie de la partícula de bacteriófago. Estas colecciones, o bancos, de péptidos pueden entonces sondarse para los que pueden unirse a una proteína diana inmovilizada específica. (Pasqualini, R. *et al.*, *J. Cell Biol.*, 130, 1995, 1189-1196; Wrighton, N.C., *et al.*, *Science*, 273, 1996, páginas 458-463; Cwirla, S.E., *et al.*, *Science*, 276, 1997, páginas 1696-1699; Koivunen *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 268, 1993, páginas 20205-20210; Koivunen *et al.*, *Bio/Technol.*, 13, 1995, páginas 265-270; Healy *et al.*, *Biochem.*, 34, 1995, páginas 3948-3955; Pasqualini *et al.*, *J. Cell Biol.*, 130, 1995, páginas 1189-1196). Son también posibles sistemas alternativos de selección de péptido incluyendo la presentación en la superficie de la célula y la presentación en el ribosoma.

35 Los péptidos miméticos que son miméticos de EPO utilizados según esta descripción son generalmente menores o iguales al número de restos de aminoácidos que forman una región CDR, aunque podrían ser mayores.

40 Cualquier anticuerpo puede actuar como secuencia de la estructura, sin embargo por lo general seleccionar anticuerpos humanos como terapéuticos humanos es uno de los últimos objetivos. Los anticuerpos humanos o humanizados es menos probable que produzcan una respuesta inmunitaria desfavorable en un paciente humano. El criterio principal en la selección de un anticuerpo para servir como marco para la inserción de un péptido, es que la sustitución de una o más CDR del anticuerpo con el péptido debe cambiar la especificidad del antígeno. El anticuerpo puede ser un anticuerpo completo o un fragmento Fab, scFv o F(ab')₂ o porción de los mismos.

45 Alternativamente, un banco de anticuerpos puede tener una o más CDR de cadena pesada y/o ligera sustituida con un péptido deseado. El banco resultante puede a continuación ser cribado para identificar los anticuerpos que tienen una actividad deseada. Debe entenderse que puede también proporcionarse aleatorización con un péptido sustituido para generar un banco de anticuerpos.

50 Un anticuerpo útil es la vacuna antitetánica (TT) Fab, ya que es humana y debido a la modificación del HCDR3 es suficiente para cambiar la especificidad del antígeno del anticuerpo (Barbas *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 116, 1994, páginas 2161-2162 y Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 1995, páginas 2529-2533).

55 El injerto de una secuencia de ADN del péptido de selección en un anticuerpo con el fin de sustituir la(s) CDR (s) de un anticuerpo por la secuencia peptídica se realiza utilizando técnicas de ADN recombinante conocidas por los expertos en la materia.

60 Los ejemplos de procedimientos que pueden utilizarse para injertar un péptido deseado con actividad biológica que es un mimético de EPO en lugar de la región de CDR incluyen, pero no se limitan a, superposición de PCR, clonación de la secuencia de la enzima de restricción, mutagénesis específica en el sitio y medios completamente sintéticos. Para una descripción de las técnicas que implican el superposición de PCR, véase, por ejemplo, el Ejemplo 1 en la presente memoria. La mutagénesis específica para el sitio puede realizarse de varias maneras. Una está basada en la mutagénesis dut/ung Kunkel (Kunkel, T.A., *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1985) vol. 82, págs. 488-92). El kit Muta-Gene de mutagénesis *in vitro* está disponible en BioRad basado en esta metodología (n°C de cat. 170-3581 ó 170-3580). Varias amplificaciones por PCR basados en métodos de mutagénesis están también disponibles en el mercado tal como el kit para mutagénesis dirigida al sitio QuickChange de Stratagene y el kit de mutagénesis dirigido al sitio basado en la PCR ExSite. Otro procedimiento distinto de PCR está disponible en Omega como sistema de mutagénesis dirigida al sitio *in vitro* GeneEditor. Los medios completamente sintéticos son también bien conocidos y descritos, por ejemplo, en Deng, *et al.*, *Methods Mol. Biol.* (1995) 51:329-42; Kutemeler *et al.*, *Biotechniques*, (1994) 17(2): 242-246; Shi

ES 2 316 919 T3

et al., *PCR Methods Appl.*, (1993) 3(1): 46-53 y Knupnik *et al.*, *J. Mol. Biol.*, (2000) 11:296(1): 571-86 incorporado cada uno como referencia en la presente memoria. Además, los procedimientos anteriores utilizados para sustituir toda o una porción de por lo menos una secuencia de CDR puede utilizarse para injertar un péptido deseado que es un mimético de EPO en o adyacente a al menos una secuencia de CDR natural sin sustituir la secuencia de CDR original.
5 De esta manera, se forma un montaje de fusión CDR/péptido mimético de biológicamente activo.

Se contempla que pueden añadirse secuencias flanqueantes a los extremos del terminal carboxilo y/o amino del péptido biológicamente activo que es un mimético de EPO. Las secuencias flanqueantes pueden ser útiles para reducir limitaciones estructurales en el péptido injertado que lo permitan adoptar más fácilmente una configuración necesaria para la actividad biológica. En una forma de realización preferida, una región flanqueante que incluye una prolina se une por enlace covalente al terminal carboxi del péptido biológicamente activo para crear un péptido biológicamente activo prolongado con prolina que es un mimético de EPO.
10

En una forma de realización, puede generarse una región flanqueante colocando al azar dos posiciones de aminoácido en cada lado de un injerto del péptido con objeto de determinar la mejor secuencia. De esta manera, puede generarse un banco que tiene miembros con múltiples secuencias variadas. En los montajes resultantes se analiza a continuación la actividad biológica como se describe a continuación por, por ejemplo, técnicas de adhesión celular sobre plástico. Pueden generarse proteínas recombinantes que tengan aminoácidos aleatorios en posiciones específicas. Esto puede realizarse modificando el ADN de codificación. Cuando se introduce aleatorización en una posición del codón del aminoácido específico, una "estrategia de dopado" preferida del desoxirribonucleótido es $(NNK)_x$ con objeto de comprender los 20 aminoácidos y minimizar el número de codones de terminación codificados. Por consiguiente, N puede ser A, C, G o T (nominalmente equimolar), K es G o T (nominalmente equimolar) y x es por lo general hasta aproximadamente 5, 6, 7 u 8 o más, produciendo de este modo bancos de mono-, di-, tri-, tetra-, penta-, hexa-, hepta- y octa-péptidos o más. La tercera posición puede ser también G o C, denominada "S". Por lo tanto, NNK o NNS (i) codifica todos los aminoácidos, (ii) codifica solamente un codón de terminación, y (iii) reducen el intervalo del sesgo del codón desde 6:1 a 3:1. Existen 32 codones posibles resultantes del motivo NNK: 1 por cada 12 aminoácidos, 2 por cada 5 aminoácidos, 3 por cada 3 aminoácidos y solamente uno de los tres codones de terminación. Otras alternativas incluyen, pero no se limitan a:
15

30 $(NNN)_x$ que podría proporcionar todos los aminoácidos posibles y todas las terminaciones;

$(NNY)_x$ elimina todas las terminaciones e incluso comprende 14 de los 20 aminoácidos;

35 $(NNR)_x$ comprende 14 de los 20 aminoácidos; y

$(NNS)_x$ comprende los 20 aminoácidos y solamente una terminación.

La posición del tercer nucleótido en el codón puede ser modificada genéticamente como es habitual utilizando cualquiera de las mezclas degeneradas conocidas. Sin embargo, el grupo NNK, NNN, NNY, NNR, NNS comprende las estrategias de dopado más frecuentemente utilizadas y las utilizadas en la presente memoria.
40

El conjunto de anticuerpos modificados genéticamente que se crea durante este procedimiento pueden ser examinados por aquellos que presentan propiedades del péptido como, por ejemplo, los anticuerpos presentados al fago, esencialmente como ha sido descrito en Barbas, C.F., III, Kang, A.S., Lerner, R.A. y Benkovic, S.J., Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 1991, páginas 7978-7982 incorporada en la presente memoria como referencia. Esta tecnología permite anticuerpos recombinantes (como anticuerpos completos, Fab, $F(ab')_2$ o scFv) que se expresen en la superficie de un bacteriófago filamentoso. Este mismo fago tendrá en su interior los genes que codifican este anticuerpo específico.
50

Se contempla que cualquier otro procedimiento conocido de introducción de aleatorización en una secuencia puede utilizarse en la presente memoria. Por ejemplo, la PCR propensa a error puede introducir mutaciones aleatorias en secuencias de ácido nucleico (véase, por ejemplo, Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.*, (1992) 226(3): 889-96). En resumen, la PCR se realiza en condiciones que comprometen la fidelidad de la réplica, introduciendo de este modo mutaciones aleatorias en las secuencias como las que realizarían los expertos en la materia. Tras la generación de dichos mutantes aleatorios, pueden colocarse en formatos de presentación del fago, adheridas al plástico y de este modo evaluarse su actividad. Asimismo, determinadas bacterias conocidas por proporcionar mutaciones aleatorias de genes, tales como las células Epicurian Coli[®] XL1-Red (disponibles en el mercado en Stratagen, La Jolla, CA.) que lo hace de este modo durante la replicación del plásmido puede utilizarse para proporcionar mutantes aleatorios en los que se identifica a continuación la actividad biológica según la presente exposición.
55
60

Se contempla también que la aleatorización puede introducirse en cualquier punto en la secuencia nucleotídica tras la incorporación de un péptido activo que es un mimético de EPO en el anticuerpo para alterar la actividad biológica general del anticuerpo. De esta manera, no solamente pueden hacerse alteraciones en la actividad biológica de un péptido mimético que es un mimético de EPO produciendo mutaciones dentro de la secuencia del péptido, sino mutaciones en la estructura circundante pueden incorporarse con los montajes resultantes que se ensayan para las alteraciones en la actividad o expresión biológica. Realmente, se contempla que pueden generarse y ensayarse bancos con repertorios de montajes múltiples resultantes de dicha aleatorización.
65

ES 2 316 919 T3

Pueden utilizarse bancos monocatenarios según la presente exposición porque un dominio de unión completo está contenido en un polipéptido. La región variable de la cadena ligera se separa de la región variable de la cadena pesada mediante una región enlazadora. La utilización de enlazadores cortos (<11 aminoácidos) favorece un complejo dimérico donde V_H de un ScFv se asocia con V_L de otra molécula de ScFv y viceversa, estas moléculas se denominan diacuerpos (Kortt, A.A., Malky, R.L., Caldwell, J.B., Gruen, L.C., Ivanci, N., Lawrence, M.G. *et al. Eur. J. Biochem.* 221:151-157, 1994). Esto es debido a que el plegamiento del ScFv monomérico está debilitado con enlazadores de < 11 aminoácidos (Alfthan, K., Takkinen, K., Sizman, D., Soderlund, H. y Teeri, T.T. *Protein-Eng.* 8:725-731, 1995). Los enlazadores más largos (> 11 aminoácidos) favorecen el plegamiento del ScFv monomérico en un dominio de unión con un solo antígeno, excluyendo de este modo la formación del dímero.

Un vector útil de presentación del fago es pRL4 que es conocido también como pComb 3X (véase la Fig. 1). Este vector permite la presentación de productos de expresión híbridos en la superficie de las partículas agrupadas del fagómido. pRL4 es una versión modificada de pComb3H (Barbas, C.F. III y Burton, D.R. 1994. *Monoclonal Antibodies from Combinatorial Libraries*. Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual, Cold Spring Harbor, N.Y.; Burton, D.R.; Barbas, C.F. III. *Advances in Immunology* 57:191-280, 1994; Lang, I.M., Chuang, T.L., Barbas, C.F. 3^a, Schleef, R.R. *J. Biol. Chem.* 271:30126-30135, 1996; Rader y Barbas, Phage Display, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2000). El diseño de pRL4 permite la dimerización de dominios scFv de unión del antígeno en la superficie del fago y en forma soluble como se detalla a continuación. Cuando el plásmido se transforma en un hospedador bacteriano *supE* tal como ER2537 (F' *Sup E*, New England Biolabs, Beverly, MA), la mutación ámbar se suprime aproximadamente el cincuenta por ciento del tiempo. De esta forma la mitad de los scFv expresados se fusionan con la proteína del gen III del fago filamentososo (aminoácidos 230-406) y la otra mitad se terminará justo antes de que el gen III produzca scFv soluble. Tanto los productos de fusión scFv-pIII como scFv solubles tienen una secuencia señal *Omp A* y serán transportados al periplasma donde serán capaces de formar complejos diméricos de scFv, denominados diacuerpos (Kortt, A.A., Malby, R.L., Caldwell, J.B., Gruen, L.C., Ivanci, N., Lawrence, M.C. *et al. Eur. J. Biochem.* 221: 151-157, 1994). Es de esperar que los diacuerpos se plieguen de modo que el V_H de un scFv se empareje con el V_L de un segundo scFv-pIII produciendo fragmentos de anticuerpo divalentes. En un hospedador no-*sup E*, tal como TOP1OF' (Invitrogen, Carlsbad, CA), el codón de terminación ámbar se reconoce que proporciona diacuerpos scFv solubles.

En el montaje final de la expresión monocatenaria en pRL4, los fragmentos de anticuerpo monocatenario se clonan corriente abajo del activador *lacZ* de *E. coli*, el punto de unión del ribosoma y la secuencia principal *omp A*. Estos elementos permiten la producción de la expresión por IPTG y la secreción fuera de la célula mediante la secuencia principal *omp A* cuando se expresan en la cepa ER2537 supresora. Se fusionan fragmentos monocatenarios en el marco con las secuencias del gen III (gIII) del fago filamentososo (aminoácidos 230-406). El producto de la proteína gIII, pIII, es una proteína de recubrimiento menor necesaria para la infección. Durante la producción del activador por IPTG, la fusión anticuerpo-pIII monocatenaria se sintetiza y se transporta al espacio periplásmico bacteriano. En el espacio periplásmico, las proteínas de fusión scFv-gen se insertan en la membrana. En la superinfección con el fago cooperador, estos fragmentos se exportan fuera de la célula sobre la superficie del fago como fragmentos de pIII-anticuerpo. Otras posibles proteínas que pueden utilizarse para la fusión sobre la superficie de los fagómidos incluyen la proteína pVIII de la proteína del recubrimiento filamentososa y otras proteínas del recubrimiento.

Los bancos de fragmento Fab, que mantienen el punto de reconocimiento del antígeno natural, son útiles para asegurar que se mantiene la afinidad.

En el montaje con expresión de Fab del híbrido final en pRL4, las cadenas ligera y pesada se clonan como un fragmento Sfil único. De esta manera, los fragmentos de la cadena ligera se clonan corriente abajo del activador *lacZ* de *E. coli*, el punto de unión del ribosoma y la secuencia principal *omp A*. Estos elementos permiten la inducción de la expresión por IPTG y la secreción de la célula mediante la secuencia principal *omp A*. Los fragmentos de la cadena ligera son seguidos de un codón de terminación, una segunda secuencia de unión del ribosoma, la secuencia principal *pel B* de *E. coli* y la cadena pesada. Los genes híbridos de la cadena pesada se fusionan en el marco con las secuencias del gen III (gIII) del fago filamentososo (aminoácidos 230-406). Un codón de terminación ámbar está presente en la unión de la fusión. En un hospedador bacteriano *sup E* tal como ER2357 (New England Biolabs, Beverly, MA), se suprime la mutación ámbar. En el momento de la producción del promotor, un solo mensaje policistrónico se transcribe y se traduce como dos polipéptidos, una proteína de fusión cadena ligera y cadena pesada-gen III. Siguiendo la síntesis de los polipéptidos se transportan al espacio periplásmico bacteriano como dirigidos por las secuencias principales. En el espacio periplásmico las proteínas de fusión pIII con la cadena pesada se insertan en la membrana y las cadenas ligera y pesada se asocian covalentemente mediante enlaces disulfuro, formando los puntos de unión del antígeno. La región constante humana CH1 y las secuencias C_L incluyen las cisteínas que forman el enlace disulfuro entre las cadenas pesada y ligera. En el momento de la superinfección con el fago cooperador, estos fragmentos se exportan fuera de la célula en la superficie del fago como fusión Fab-cpIII. En un hospedador no-*sup E*, tal como TOP1OF' (Invitrogen, Carlsbad, CA), el codón de terminación ámbar se reconoce que produce fragmentos Fab solubles. Las importantes características del sistema de presentación del fago pRL4 utilizado incluyen una etiqueta de purificación His 6, una etiqueta de epítipo HA siguiendo la cadena pesada, así como un codón de terminación ámbar suprimible que está situado entre la cadena pesada y el gen III del fago. La etiqueta HA es reconocida por HA. El anticuerpo 11 (Babco, Berkeley, CA) y el anticuerpo 12CA5 (Roche Molecular Biochemical, Indianapolis, Ind.). La etiqueta His6 permite la purificación por afinidad de los fragmentos de anticuerpo por cromatografía de níquel-quelato (Qiagen, Valencia, CA). La terminación ámbar permite una rápida conversión de un producto de fusión Fab-cpIII (para la incorporación en el

ES 2 316 919 T3

recubrimiento del fago) cuando la terminación se suprime, al Fab soluble que se prepara en un hospedador bacteriano no supresor.

5 La selección implica el aislamiento del banco de los mejores candidatos que se unen específicamente a la molécula diana de los péptidos y presentan actividad biológica.

10 El fago que expresa fragmentos de anticuerpo en su superficie puede producirse y concentrarse de modo que todos los miembros de un banco pueden dejarse que se unan a la molécula diana. La molécula diana puede estar inmovilizada sobre una placa de microvalorador, sobre las células completas, las membranas o las células completas, o estar presente en solución. El Ab-fago no específico se lava y las partículas de fago unidas se liberan del antígeno, con frecuencia mediante la utilización de un pH bajo. El Ab-fago recuperado es infeccioso y por eso puede ampliarse en un hospedador bacteriano. Por lo general, se realizan muchas rondas de esta clase de selección. Los clones del fragmento de anticuerpo individuales pueden analizarse a continuación como Fab solubles o scFv para la identificación de los que reconocen específicamente la molécula diana.

15 Antes de cualquier estrategia de selección, los bancos iniciales se electroporan en las células hospedadoras, tales como ER2537. Los cultivos del banco se cultivan hasta la fase log y se superinfectan con el fago cooperador, tal como VCSM13, un fago cooperador disponible en el mercado (Stratagene, La Jolla, CA). La superinfección proporciona los componentes del fago restantes necesarios para el empaquetamiento de los plásmidos en partículas de fagómido. Alternativamente, puede utilizarse la presentación del fago sin la utilización del fago cooperador. Después del cultivo de toda la noche, los fagómidos en el sobrenadante del cultivo se precipitan con polietilenglicol (PEG). El fago precipitado con PEG se utiliza en la adhesión de células sobre plástico (superficie de la célula en fase sólida, internalización y membrana). La clasificación por FACS o la clasificación magnética para purificar anticuerpos de unión específica de aglutinantes no específicos.

25 En las células basadas en la adhesión de las células sobre plástico, los bancos de anticuerpo-fago se incuban con células diana y el fago no adherente se elimina con múltiples lavados. Un protocolo de adhesión de células en plástico típico es el siguiente:

- 30 1. Se bloquean partículas de fago con PBS + BSA al 1% o FBS al 10% + leche en polvo al 4% + NaN_3 (excepto cuando los anticuerpos interiorizados se analizan).
2. Se añaden células diana a los fagos bloqueados (aproximadamente 5×10^6 células).
- 35 3. Se mezcla y se rota lentamente a 4°C o 37°C .
4. Se lavan las células dos veces con 1 ml de PBS/BSA al 1%/ NaN_3 enfriado en hielo o PBS/BSA al 1%/ NaN_3 a temperatura ambiente.
- 40 5. El anticuerpo-fago específico unido a las células puede eluirse a pH bajo, por ejemplo con ácido cítrico 76 mM pH 2,5 en PBS durante 5 a 10 minutos a temperatura ambiente.
6. Se neutraliza el fago eluido con Tris-HCl 1 M pH 7,4.
- 45 7. Después de la neutralización, puede utilizarse anticuerpo-fago para infectar las bacterias ER2537 y ampliar durante el cultivo toda la noche para la ronda de adhesión siguiente de las células al plástico.

50 Generalmente, se realizan 3 a 4 rondas de adhesión de las células al plástico en cada banco. Los ELISA del fago que utilizan anticuerpo secundario disponible en el mercado (anticuerpo-HRP anti-M13 de oveja) o los ELISAs de anticuerpo soluble que utilizan un anticuerpo HA. 11 disponible en el comercio (Babco, Berkeley, CA) que reconoce la etiqueta HA incorporada en cada anticuerpo de las secuencias PRL4, pueden realizarse después de cada ronda de adhesión al plástico para permitir la estimación del enriquecimiento de anticuerpos de unión sobre no aglutinantes. Después de la última ronda de adhesión al plástico, el anticuerpo-fago puede seleccionarse como colonias individuales procedentes de placas de agar-agar, cultivarse como anticuerpo monoclonal-fago e identificarse por ELISA para la identificación de aglutinantes específicos. Puede utilizarse también el análisis FACS. Específicamente, el anticuerpo-fago se infecta en bacterias Top10F⁺ y se colocan en placas para las colonias individuales. Las colonias individuales son formas seleccionadas en placas de agar-agar, se cultivan y se inducen con IPTG. El anticuerpo soluble se identifica por ELISA para la identificación de aglutinantes específicos. La identificación puede realizarse contra células vivas, 60 contra células intactas, células diana fijadas suavemente o proteína(s) recombinante(s).

Los procedimientos para la adhesión de células completas se han descrito anteriormente (Siegel, D.L., Chang, T.Y., Russell, S.L., y Bunya, V.Y. 1997 *J. Immunol. Methods* 206:73-85 incorporada en la presente memoria como referencia). Otras técnicas para la selección que pueden aplicarse incluyen la clasificación celular activada por fluorescencia (FAC). Los procedimientos alternativos para la selección que utilizan bancos incluyen, pero no se limitan a, 65 presentación de ribosomas e hibridación en placa a un antígeno marcado.

Después de la adhesión celular al plástico para aislar aglutinantes de anticuerpo de alta afinidad, puede realizarse el bioanálisis para cribados funcionales de anticuerpos agonistas. La dimerización es con frecuencia un requisito previo para la activación de muchos receptores y de este modo el bioanálisis se enfoca en los anticuerpos agonistas que estimulan receptores por activación de la dimerización. Como se ha descrito anteriormente, la multivalencia monocateneria se aproxima al diseño del enlazador. La multivalencia del fragmento Fab puede aproximarse de numerosas maneras. Numerosos artículos recientes en la bibliografía han demostrado éxito en la formación del fragmento del anticuerpo dimérico que es aplicable a la presentación del fago (DeKruif, J., y Logtenberg, T. 1996. *J. Biol. Chem.* 271:7630-7634, Pack, P. y Pluckthun, A. 1992. *Biochemistry* 31:1579-1584, y Holliger, P., y Winter, G. 1993. *Current Opin. Biotech.* 4:446-449). Los Fab divalentes pueden crearse por lo menos de dos maneras. En un método la dimerización se consigue mediante la adición de un dominio de dimerización a pRL4, que forma pRL8 (véanse las Figs. 6A-C, 7 y 8). Existen numerosos dominios de dimerización (lexA, dedos de Zn, fos, jun, etc.) que pueden utilizarse en estos vectores para obtener la multivalencia de fragmentos Fab. Se seleccionan dominios de dimerización a partir de pero sin limitarse a, los siguientes: jun (DeKruif, J. y Logtenberg, T. *J. Biol. Chem.* 271:7630-7634, 1996; Kostelny, S.A., Cole, M.S., y Tso, J.Y. *J. Immunol.* 148:1547-1553, 1992) la región de dimerización LexA (Kim, B. y Little, J.W. *Science* 255:203-206, 1992), el dominio de dimerización GCN4 de levadura (van Heeckeren, W.J., Sellers, J.W., Struhl, K. *Nucleic Acids Res.* 20:3721-3724, 1992), la invertasa Gin del bacteriófago Mu (Spaeny-Dekking, L., Schlicher, E., Franken, K., van de Putte, P., Goosen, N. *J. Bacteriol.* 34:1779-1786, 1995), el dominio de dimerización de la proteína NTRC de *E. coli* (Klose, K.E., North, A.K., Stedman, K.M., Kustu, S. *J. Mol. Biol.* 241:233-245, 1994) y el dominio de dimerización ICP4 de VSH-1 (Gallinari, P., Wiebauer, K., Nardi, M.C., Jircny, J. *J. Virol.* 68:3809-3820, 1994) incorporados todos como referencia. También puede utilizarse un dominio de dímero a alta temperatura de organismos thermus (MacBeath, G., Kast, P., Hilvert, D., *Biochemistry* 37:100062-73, 1998 y MacBeath, G., Kast, P., Hilvert, D., *Science* 279:1958-61, 1998). Estos son dominios funcionales que cuando se incorporan en una molécula permiten que se produzca la dimerización. Además, la dimerización puede conseguirse en células mediante la utilización de vectores IgG completos, o dominios de dimerización tales como los dominios de dimerización CH3. Los expertos en la materia están familiarizados con estos y otros dominios de dimerización y en su utilización para dimerizar proteínas.

Los procedimientos adicionales que pueden utilizarse para generar montajes de anticuerpo que contienen por lo menos dos regiones de unión son conocidos. El anticuerpo o fragmentos de anticuerpo creados por cada uno de estos métodos podría(n) utilizarse para pruebas de actividad del anticuerpo agonístico como se describe en el Ejemplo 1 a continuación para IgG completa producida en células de mamífero. Estos procedimientos incluyen la dimerización química de Fab, la pegilación de Fab, la producción de Fab², la generación de IgG completa en células bacterianas y la utilización de diacuerpos (scFv). Es importante que cualquiera de las formas de anticuerpo generadas para análisis de la actividad agonística podrían utilizarse como producto terapéutico final.

La dimerización química puede conseguirse también utilizando varios reactivos químicos de reticulación. Por ejemplo, SMCC (trans-4 (maleimidilmetil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo) de Molecular Probes (Eugene, Oregon), n°C de cat. S-1534. Este reactivo modificará los grupos amino primarios en el anticuerpo. Después de incubar el anticuerpo con el SMCC a temperatura ambiente, la reacción se desarrolla en una columna PD-10. Este Fab modificado con maleimida puede añadirse a un segundo Fab o a un lote por separado del mismo Fab que ha sido tratado con TCEP [(hidrocloruro de Tris (2-carboxietil)fosfina): Molecular Probes n° de cat. T-2556] para reducir los grupos tiol a SH. La reacción de reducción se realiza en la oscuridad durante 15 minutos. La conjugación de maleimida Fab y el tiol reducido con Fab se produce en una proporción 1:1. Los dímeros se aíslan pasando la reacción sobre una columna de filtración en gel sephadex 200. Para la dimerización pueden utilizarse otros enlazadores químicos conocidos por los expertos en la materia. Se ha descrito la producción de un Fab' que tiene un resto de cisteína más modificado genéticamente en la región bisagra, por ejemplo, en la patente US n° 5.677.425 y Carter, *et al.*, *BioTechnology*, vol. 10, feb. 1992, páginas 163-167 cuyas descripciones se incorporan a la presente memoria como referencia. Esta región de tiol puede utilizarse para la conjugación a restos tales como polietilenglicol (PEG). La tecnología de pegilación es conocida, por ejemplo, véase Koumenis *et al.*, *Int. J. Pharm.* (2000) 198(1): 83-95, incorporada en la presente memoria como referencia, que hace posible unir dos moléculas de Fab' utilizando el acoplamiento de PEG.

La tecnología para producir Fab² mediante bacterias implica la clonación de la región bisagra de IgG y opcionalmente parte del CH2, como parte del Fd que incluye cisteínas adicionales y se describe, por ejemplo, en Better, *et al.*, *PNAS USA* (1993) 90(2): 457-61. Los grupos tiol adicionales en la bisagra Fd pueden interactuar y dar lugar a que dos moléculas de Fab' se dimericen, creando un Fab². El Fab² puede purificarse directamente a partir de células bacterianas. Además, el Fab' no dimerizado procedente de las bacterias puede aislarse y convertirse químicamente en Fab².

Como se describió al principio, las regiones variables del anticuerpo pueden clonarse como una sola cadena en la que la ligera variable (VL) está conectada a la pesada variable (VH) mediante una región enlazadora. Si esta región enlazadora es corta (por ejemplo 5 a 7 aminoácidos), el plegamiento del scFv favorecerá la asociación de dos scFv donde la VL de un par scFv está con la VH de la segunda scFv. De esta manera, dos regiones de unión al antígeno se presentan en el diacuerpo.

Los montajes de anticuerpo que contienen dos regiones de unión pueden generarse utilizando cualquiera de estos procedimientos con objeto de probar la actividad agonista y/o utilizarse como producto terapéutico final.

Después de las etapas de adherencia de las células al plástico o de clasificación de los bancos de Fab, el banco de moléculas adheridas al plástico está limitado con Sac I y *Spe* I y clonados en pRL8. La subclonación al vector pRL8 individualmente o en masa después de la clasificación de FACS o la apelmazamiento permite la expresión de los Fab de unión soluble dimérica para el análisis en bioanálisis. En el pRL8, los fragmentos de anticuerpo son transportados al espacio periplásmico y forman dímeros ahí. La ventaja de este método es que permite la adherencia en el plástico de fragmentos Fab monoméricos, favoreciendo los Fab de alta afinidad.

Otro método utiliza un anticuerpo secundario. El pRL4 tiene la etiqueta decapéptido de hemaglutinina reconocida por el anticuerpo HA. 11 disponible en el mercado (Babco, Berkeley, CA). Los Fab identificados en la clasificación por FACS o la apelmazamiento que deben analizarse en bioanálisis se preincuban con HA. 11 que activará la dimerización, antes de la adición al bioanálisis.

Una vez la unión de los scFv o de los Fab se ha identificado por adhesión al plástico u otro procedimiento de selección, los clones individuales, que expresan cada uno un único fragmento de anticuerpo dimerizado en la superficie del fago se determinan por proliferación, diferenciación, activación o efectos de supervivencia en células diana. Además, el anticuerpo dimerizado soluble se examina en bioanálisis.

Análisis biológico para la identificación de la actividad EPOide

1. Formación de la colonia eritroide de médula ósea en metilcelulosa (Wrighton *et al.*, *Science*, 1996, vol. 273 páginas 458-463).
2. Proliferación de células TF-1 (estirpe celular de eritroleucemia humana). Las células TF-1 expresan tanto la forma completa como la truncada del Epo-R. (*J. Cell Physiol.*, 1989, vol. 140, páginas 323-334).
3. El receptor de EPO se acopla directamente a la JAK2 cinasa para provocar la fosforilación de la tirosina. Epo produce cFos en células TF-1. Activación de la transcripción de c-Fos. (Witthuhn *et al.*, *Cell*, (1993), vol. 74, páginas 227-236).

Pueden utilizarse numerosos bioanálisis en la identificación de alto rendimiento. Los expertos en la materia están familiarizados con estos y otros bioanálisis adecuados. Se han desarrollado varios ensayos no radioactivos en los que puede analizarse la síntesis del ADN o la actividad enzimática. Por ejemplo, puede utilizarse un ensayo de proliferación de células MTT (Promega Corporation, Madison, WI) que se basa en un ensayo descrito por Mosmann (Mossmann, T. 1983, *J. Immunol. Methods* 65:55-57 incorporada en la presente memoria como referencia). Este protocolo es rápido y sencillo. En un ensayo, una sal de tetrazolio, MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio), se convierte en un producto de formazán azul por actividad mitocondrial de la deshidrogenasa en células vivas. El contenido de deshidrogenasa, y por consiguiente la cantidad de producto coloreado producido, es proporcional al número de células. El producto coloreado es detectable en un lector de placas ELISA a 570 nm. Se realizan ensayos por triplicado, en masa en placas de microvaloración de 96 pocillos. En resumen, se colocan en placas células diana en alícuotas de 100 μ l en medio de cultivo en placas de 96 pocillos. Después de la adición de varias concentraciones de anticuerpos, se incuban las células durante 48 a 72 horas a 37°C y CO₂ al 5% en una atmósfera totalmente humidificada. Se añade MTT a cada pocillo y se controla la proliferación mediante lector de placas ELISA.

Por ejemplo, en ensayos de proliferación que utilizan TF-1, las células bacterianas que contienen anticuerpos que expresan fagómidos se cultivan durante la noche a 37°C en placas con pocillos oscuros de 96 pocillos en 1 ml de un medio que es una mezcla de medio de células de mamífero y medio bacteriano (en el caso de las células TF-1: RPMI 2.7/SB 0,3/Carb 100 μ g/ml). Las células TF-1 son una estirpe celular de eritroleucemia de la médula ósea humana que responde a múltiples citocinas (Kitamura, T., Tange, T., Terasawa, T., Chiba, S., Kuwaki, T., Miyagawa, K., Piao, Y.F., Miyazono, K., Urabe, A., Takaku, F., *Cell Physiol.* 140:323-334, 1989; Kitamura, T., Tojo, A., Kuwaki, T., Chiba, S., Miyazono, K., Urabe, A., Takaku, F., *Blood* 73:375-380, 1989; Kitamura, T., Takaku, F., Miyajima, A., *Int. Immunol.* 3:571-577, 1991). Al día siguiente, los cultivos de toda la noche se subcultivan 1/10 en placas recientes, y se colocan a 37°C durante 2 horas. Después de la inducción con IPTG a 37°C durante 4 horas, se centrifugan las placas a 2.000 rpm/15' a temperatura ambiente. Se filtran 50 μ l de cada sobrenadante del cultivo en placas filtrantes de 96 pocillos (Millipore) para esterilizar placas de ensayo de 96 pocillos. Las células de mamífero se lavan previamente para eliminar el factor de crecimiento y se vuelven a poner en suspensión a una concentración de 1×10^5 células/ml. Se añaden 50 μ l de células a cada pocillo. Las placas de ensayo se incuban en una incubadora a 37°C/5% de CO₂ durante 72 horas. A las 72 horas, las placas se revelan añadiendo 40 μ l de medio/MTS/PMS por pocillo. El MTS es una versión mejorada más soluble de MTT. Ambos ensayos están basados en la conversión celular de la sal de tetrazolio. Un kit de ensayo de proliferación de MTS (n°C de catálogo G5421) puede adquirirse en Promega, Inc. (Madison, WI). Las placas se mantienen en la incubadora a 37°C/CO₂ y se leen a una D.O.₄₉₀ a la hora, 4 horas, 8 horas con el lector de microplacas.

Las actividades de las citocinas con frecuencia son sinérgicas. La sinergia podría manifestarse mediante la unión de ligandos a dos receptores diferentes que a continuación envían la señal correcta o mediante un efecto de cebado por el que la interacción del ligando/receptor ceba la célula para responder a una segunda citocina. Además, las citocinas que actúan inicialmente en el desarrollo del linaje son con frecuencia más sinérgicas que las citocinas que actúan en las etapas finales en una serie de reacciones de desarrollo. Por consiguiente, pueden utilizarse concentraciones subóptimas de factores de crecimiento en estos bioanálisis para examinar el sinergismo. Las condiciones de las concentraciones

ES 2 316 919 T3

subóptimas se determinan en cada ensayo. Éste se realiza añadiendo diluciones en serie de factores de crecimiento, individualmente y como mezcla, a los análisis y determinando las concentraciones por debajo de las cuales un solo factor no activa una respuesta en comparación con la mezcla, y la concentración por debajo de la cual la mezcla no activa una respuesta en el bioanálisis. Las células de estroma de la médula ósea pueden añadirse también en bioanálisis para proporcionar otros factores necesarios que pueden desempeñar una función en una respuesta sinérgica.

Además, la proliferación celular puede examinarse controlando la síntesis de ADN. Un ensayo colorimétrico, no radioactivo que examina la incorporación de 5-bromo-2'-desoxi-uridina (BrdU) (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) puede realizarse en un formato de placa de microvaloración. En esta memoria, las células se cultivan en placas de 96 pocillos y se incuban con BrdU y concentraciones subóptimas de citocinas. La cantidad de BrdU se determina después de marcar con un anticuerpo anti-BrdU marcado con peroxidasa. Los resultados finales se analizan mediante el lector de placas de ELISA a 405 nm.

También puede utilizarse un ensayo radioactivo de mitogénesis que mide la velocidad de síntesis de ADN como indicación de proliferación (Raines y Ross, *Methods of Enzymol.* 109: 749-773, 1985). En estos ensayos, se examinan los cambios en la velocidad de incorporación de [³H]-timidina en células diana. De nuevo, estos ensayos permiten la identificación simultánea y rápida de muchos fragmentos de anticuerpo. Se han utilizado ampliamente como un procedimiento conveniente de evaluación de los efectos estimulantes e inhibidores del crecimiento de muchas células diferentes. Se cultivan las células en suspensión hasta que alcanzan la velocidad de crecimiento exponencial. Las células se lavan a continuación exentas del medio en el que se cultivan y se vuelven a colocar en placas en el medio reciente. Se toman alícuotas de las células en placas de 96 pocillos en un volumen total de 100 μ l a una concentración de aproximadamente $1-2 \times 10^5$ células/ml. Se añaden diluciones del sobrenadante del fago, anticuerpos Fab o ScFv dimerizados solubles y se incuban las células durante 18 a 48 horas en una incubadora gasificada con CO₂ a una temperatura de 37°C. Tras la incubación, se añade [³H]timidina (937 kBp) a cada pocillo y se incuban durante 4 horas más. Las células se retiran a continuación de la incubadora y se hace el recuento directamente en un contador de centelleo de microplaca de bench top tal como el Top Count NXT Instrument de Packard (Packard, Meriden, CT). Alternativamente las células pueden transferirse en serie a filtros GF/C en un recogedor de células Millipore (Millipore, Bedford, MA) o a un aparato similar. La radioactividad asociada al material ácido insoluble retenido en el filtro se determina a continuación. Se aplican diluciones de factores de crecimiento disponibles en el mercado a los pocillos de referencia positiva. Las referencias negativas incluirían sobrenadantes de células que llevan plásmidos que no contienen inserción o anticuerpos irrelevantes tratados de manera similar. Se comparan las actividades que activan el crecimiento relativo del patrón y los diluyentes de los sobrenadantes del fago en la prueba para cuantificar la actividad que favorece el crecimiento en la muestra.

La activación puede determinarse ensayando segundos mensajeros o ensayos de lectura de la transcripción.

Puede ensayarse la supervivencia, por ejemplo, controlando la apoptosis utilizando ensayos tal como los ensayos en túnel o por otros procedimientos conocidos por los expertos en la materia.

Otros ensayos útiles para analizar la transducción de señal celular, la actividad de las cinasas y fosfatasa y por último las actividades celulares como resultado de la actividad agonista incluyen la medición de la generación de segundos mensajeros, por ejemplo AMPc, Ca⁺⁺, diacilglicerol (DAG) e 1,4,5-trifosfato de inositol (IP3). La medición de puntas en la concentración de calcio intracelular, pH intracelular y potencial de la membrana en ensayos de identificación de alto rendimiento puede realizarse utilizando instrumentos tal como el sistema lector de placas de diagnóstico por imagen fluorométrico FLIPR (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Numerosas sondas fluorescentes están disponibles para el examen de concentraciones del segundo mensajero (Molecular Probes, Eugene, OR). La medición de las concentraciones de segundos mensajeros puede realizarse también a nivel de una sola célula (DeBernardi, M.A. y Brooker, G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:4577-4582, 1996). Además, serían útiles los ensayos que examinan otros episodios de señalización tal como la fosforilación, apoptosis o concentraciones de ARN o proteína de genes específicos. Por ejemplo, se ha demostrado que la mayoría de las citocinas activan la enzima PI 3-K (estudiado en Silvennoinen, O., Ihle, J.N. *Signaling by the Hematopoietic Cytokine Receptors*, R.G. Landes company, Austin, TX 1996). Además, se ha demostrado que la familia Jak de las tirosina cinasas es mediadora central para la señalización del receptor de citocina (Ihle, J.N., Witthuhn, B.A., Quelle, F.W. *Annu. Rev. Immunol.* 13:369-398, 1995). Además, varias otras tirosina cinasas, por ejemplo, miembros de la familia Src, se activan en respuesta a determinadas estimulaciones de citocina. En el caso del ARN o de las proteínas, por ejemplo, c-Jun y c-Fos son reguladas por incremento rápida y temporalmente durante la estimulación de la citona, mientras que la inducción con c-Myc es más lenta. Estas proteínas se requieren para la transición y proliferación de G1 (estudiado en Silvennoinen, O., Ihle, J.N. *Signaling by the Hematopoietic Cytokine Receptors*, R.G. Landes Company, Austin, TX 1996). Podrían utilizarse los tamices de alto rendimiento que detectan aumentos en estos transcritos.

En ensayos de lectura de la transcripción, se observan cambios en la transcripción de genes específicos tras la exposición de las células a un factor de crecimiento o a un factor de crecimiento mimético (agonista o anticuerpo inhibidor). Por ejemplo, en un ensayo de lectura de myc, a las células tales como la estirpe celular de la mezcla FDCP dependiente de IL-3 se le priva del factor de crecimiento IL-3 durante 8 horas, seguido de la exposición a miméticos del factor de crecimiento o a factores de crecimiento naturales durante 2 horas a 37°C. En este momento, se recogen las células, se aísla el ARN y se realizan reacciones en cadena de la transcriptasa inversa-polimerasa (RT-PCR) con cebadores específicos para el gen myc. Las reacciones RT-PCR se electroforizan en geles de agarosa horizontales para la cuantificación del producto de PCR. En este caso, se está controlando la expresión de un solo gen.

ES 2 316 919 T3

Alternativamente el ensayo para los cambios de la expresión de los genes puede controlarse utilizando tecnología CHIP, los anticuerpos agonistas podrían identificarse en condiciones de gran sensibilidad de la sonda y un intervalo dinámico. De esta manera, hasta 10.000 o más podrían analizarse para cambios en la expresión. Los genes deseados que podrían controlarse podrían incluir c-myc, c-jun, NF- κ B, entre otros. Estos genes están corriente debajo de varias trayectorias de transducción de señal y su expresión debería cambiar en una respuesta mitógena. En un tipo de CHIP disponible en el mercado (Affymetrix, Santa Clara, CA), los oligonucleótidos de los genes de ensayo deseados podrían ser impresos sobre la superficie del cristal. Las células diana se exponen a anticuerpos agonistas de ensayo. Se aísla el ARN de las células expuestas a anticuerpos del agonista de ensayo, se copia al ADNc y se transcribe *in vitro* en presencia de biotina. La hibridación del ARNm transcrito *in vitro* y biotinilado se utiliza como sonda en las matrices. Los chips se escanean a continuación para determinar los genes que presentan aumentos en la transcripción durante la exposición a los anticuerpos agonistas de ensayo. En otra versión de la tecnología CHIP (Incyte, Palo Alto, CA), la cantidad de ADN no está normalizada en el cristal, por lo tanto, se constituiría una hibridación competitiva. Se aísla el ARN de las células antes y después de la exposición al agonista. El ADN se prepara a partir de cada muestra por lo que una reacción de ADNc tiene una etiqueta incorporada, por ejemplo, Cy-3, y otra población de ADNc tiene una etiqueta diferente incorporada, por ejemplo Cy-5. Se detectan las señales y se comparan en un escáner de láser doble para recoger las imágenes.

Pueden utilizarse también ensayos visuales tales como los ensayos de formación de colonias de metilcelulosa tradicionales (Stem Cell Technologies, Vancouver BC, Canadá). En estos ensayos, se puntúan el crecimiento de las colonias y los cambios morfológicos al microscopio óptico. El examen visual de proliferación o de efectos de diferenciación en cultivos de agar-agar semisólidos o de metilcelulosa puede realizarse utilizando la estirpe celular apropiada. Williams Hematology 5 (eds. E. Beutler, M.A. Lichtman, B.S. Coller L.T.J. Kipps), McGraw-Hill, Inc., págs. L22-L26, 1995). La adición de la metilcelulosa permite a la descendencia clonal de una sola célula progenitora permanecer junto a ella y facilita el reconocimiento y enumeración de distintas colonias. Todos los componentes necesarios se añaden a un medio básico de metilcelulosa (tal como MDD de Iscove, BSA, (-mercaptoetanol, L-glutamina) excepto los complementos del factor estimulante de colonias y anticuerpos de ensayo (sobrenadantes del fago, anticuerpos solubles) se añaden para comprobar si pueden ser sustituidos por factores de crecimiento. Las células en el cultivo de metilcelulosa se incuban durante 10 a 12 días después de la adición de anticuerpos en una atmósfera humidificada a 37°C de CO₂ al 5% en aire. Después de 10 a 12 días de incubación, recuentan las colonias utilizando un microscopio invertido. Después de otros 8 a 10 días, se recuentan las colonias de nuevo. Se hacen comparaciones entre el medio que contiene los anticuerpos y las referencias con y sin factores de crecimiento. Además, pueden seleccionarse colonias de entre metilcelulosa y las células individuales examinadas citológicamente por tinción con tinte de Wright (véase Atlas of Hematological Cytology, F.G.J. Hayhoe y R.J. Flemans, Wiley-InterScience 1970).

Las afinidades de unión al receptor de fragmentos de anticuerpo pueden calcularse (Lfas & Johnson, 1990) a partir de las constantes de velocidad de asociación y disociación medidas utilizando un sistema de resonancia de plasmón de superficie BIACORE (Farmacia Biosensor). Se activa un chip biodetector para acoplamiento covalente del receptor gD-mpl utilizando el hidrocloreuro de N-etil-N''-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) según las instrucciones del proveedor (Farmacia Biosensor). gD-mpl es el tampón intercambiado en el tampón de acetato sódico 10 mM (pH 4,5) y se diluye a aproximadamente 30 μ g/ml. Se inyecta una alícuota (5 μ l) a un caudal de 1 μ l/min para conseguir aproximadamente 400 unidades de respuesta (RU) de la proteína acoplada. Por último, se inyecta etanolamina 1 M como agente de bloqueo. Para las mediciones de la cinética, se inyectan 1,5 diluciones en serie de anticuerpo en el tampón PBS/Tween (Tween-20 al 0,05% en solución salina tamponada con fosfato) a 25°C utilizando un caudal de 20 μ l/min. Las constantes de disociación del equilibrio, K_d , de las mediciones de SPR se calculan como k_{off}/k_{on} . Las desviaciones estándar, s_{on} para k_{on} y s_{off} para k_{off} , se obtienen por lo general de las mediciones con concentraciones de proteínas >4 (k_{on}) o con concentraciones de proteínas >7 (k_{off}). Se fijan los datos de disociación a un modelo simple $AB \rightarrow A+B$ para obtener k_{off} +/- d.est. (desviación estándar de las mediciones). Se calculan las constantes de velocidad de pseudoprimer orden (k_s) para cada curva de asociación y se representación en función de la concentración de proteínas para obtener $k_{on} \pm$ d.est. (desviación estándar de arranque).

Para la conversión de los clones del anticuerpo en IgG completas, las regiones de codificación de ambas cadenas ligera y pesada, o fragmentos de las mismas, pueden clonarse por separado de un vector bacteriano en vector(es) de mamífero. Un solo sistema de vector, tal como pDR1 o sus derivados, puede utilizarse para clonar tanto los casetes de cadena ligera como pesada en el mismo plásmido. Alternativamente, pueden utilizarse los vectores con expresión doble donde plásmidos independientes producen las cadenas pesadas y ligeras. Es necesario que las secuencias señal de mamífero estén ya presentes en el/los vector(es) final(es) o adjuntas al extremo 5' de las inserciones de ADN de cadena ligera y pesada. Esto puede realizarse mediante la transferencia inicial de las cadenas en un(os) vector(es) lanzadera que contiene(n) las secuencias principales de mamífero apropiadas. Después de la digestión con enzima de restricción, las regiones con cadena pesada y cadena ligera, o los fragmentos de las mismas se introducen en el/los vector(es) final(es) donde las regiones constantes restantes para IgG1 se proporcionan con o sin intrones. En algunos casos donde se utilizan intrones, el diseño del cebador para ampliar por PCR las regiones variables con cadena ligera y pesada de pRL4 puede necesitarse para incluir las regiones de donante de corte y empalme del exón con objeto de obtener el corte y empalme apropiado y la producción de los anticuerpos en células de mamífero.

Con el sistema de expresión del vector (plásmido individual o doble), la producción de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo pueden ser conducidas por activadores que actúan en células de mamífero tales como, pero sin limitarse a, CMV, SV40 o activadores de IgG. Además, el/los vector(es) contendrá(n) un marcador seleccionable para el crecimiento en bacterias (tales como, pero sin limitarse a, resistencia a ampicilina, cloranfenicol, kanamicina o

ES 2 316 919 T3

zeocina). Los marcadores seleccionables para las células de mamífero (tales como, pero sin limitarse a, resistencia a DHFR, GS, gpt, neomicina o higromicina) pueden estar presentes en el/los vector(es) de IgG, o podrían proporcionarse en un plásmido por separado por cotransfección.

5 Los expertos en la materia que utilizan técnicas conocidas deberían poder sintetizar anticuerpos en otros organismos tales como levaduras, mamíferos, insectos y plantas (Carlson, J.R. y Weissman, I.L., *Mol. Cell. Biol.*, 8:2647-2650, 1988; Trill, J.J., Shatzman, A.R., Ganguly, S. *Curr. Opin. Biotechnol.* 6:553-560, 1995; Hiatt, A., Cafferkey, R. Bowdish, K. *Nature* 342: 76-78, 1989).

10 Como se expuso anteriormente, los anticuerpos de acuerdo con la descripción en la presente memoria proporcionan un aumento de la vida media a (duración de actuación) para la actividad de pequeños péptidos o péptido miméticos que son miméticos de EPO descritos en la presente memoria. En otro aspecto, la vida media del suero de un anticuerpo puede prolongarse preparando anticuerpos que están pegilados. Véase, por ejemplo, Lee *et al.*, *Bioconjug. Chem* (1999) 10(6): 973-81, incorporada en la presente memoria como referencia.

15 Las moléculas comprendidas en las reivindicaciones pueden utilizarse en diagnósticos donde los anticuerpos o fragmentos de los mismos se conjugan con marcadores detectables o se utilizan como anticuerpos primarios con anticuerpos secundarios que están conjugados con los marcadores detectables. Los marcadores detectables incluyen, marcadores radioactivos y no radioactivos y son bien conocidos por los expertos en la materia. Los marcadores no
20 radioactivos comunes incluyen enzimas detectables tal como la peroxidasa de rábano picante, la fosfatasa alcalina y las moléculas fluorescentes. Las moléculas fluorescentes absorben la luz a una longitud de onda y la emiten a otra, permitiendo de este modo la observación con, por ejemplo, un microscopio de fluorescencia. Los espectrofotómetros, microscopios de fluorescencia, lectores de placa de fluorescente y clasificadores de flujo son bien conocidos y con frecuencia se utilizan para detectar moléculas específicas que resultan fluorescentes acoplándolas mediante enlace covalente a un colorante fluorescente. Los fluorocromos tal como la proteína verde fluorescente, los mutantes
25 desplazados al rojo de la proteína verde fluorescente, el ácido aminocumarin-acético (AMCA), el isotiocianato de fluoresceína (FITC), el isotiocianato de tetrametilchodamina (TRITC), el rojo de Texas, Cy3.0 y Cy5.0 son ejemplos de marcadores útiles.

30 Pueden utilizarse moléculas en estrategias de aislamiento de células tal como la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) si se utilizan marcadores fluorescentes, en la clasificación de células activadas por fluorescencia, células activadas con moléculas fluorescentes se clasifican electrónicamente en un citómetro de flujo tal como un citómetro FACS IV de Becton-Dickinson (San José, California) o un instrumento equivalente. Las moléculas fluorescentes son anticuerpos que reconocen antígenos específicos de la superficie de la célula. Los anticuerpos se
35 conjugan con marcadores fluorescentes tal como el isotiocianato de fluoresceína (FITC) o la ficoeritrina (PE).

La clasificación magnética también es posible. En los procedimientos de clasificación magnética, el anticuerpo se une directamente o indirectamente a micropelotas magnéticas. Las células se recubren previamente con anticuerpos que reconocen las moléculas de la superficie de la célula, por ejemplo, los receptores involucrados en la proliferación,
40 diferenciación, activación o supervivencia. Los anticuerpos están unidos a perlas magnéticas conjugadas con una inmunoglobulina secundaria que se une al anticuerpo primario que presenta el péptido, tal como la etiqueta molecular HA modificada genéticamente en cada anticuerpo. Las células se separan a continuación con un imán. La clasificación magnética puede ser la selección positiva donde las células de interés se unen mediante el anticuerpo y por consiguiente el imán, o la selección negativa donde las células no deseadas se aíslan en el imán.

45 Alternativamente, pueden utilizarse anticuerpos radiomarcados para diagnóstico.

Los anticuerpos y fragmentos de los mismos dados a conocer en la presente memoria son útiles para la ampliación de una variedad de tipos de células clínicamente aplicables. El tratamiento puede ser *in vivo* o *ex vivo*. Por ejemplo, los
50 anticuerpos agonistas son útiles para tratar pacientes que padecen una insuficiencia en una población de células producida por la enfermedad, trastorno o tratamiento relacionado, por ejemplo, por supresión de la hematopoyesis donde una cantidad inferior al número normal de células de un linaje o linajes dados está presente en un paciente. Lo que se expone a continuación representa solamente algunos ejemplos de las afecciones que pueden tratarse con los anticuerpos que contienen péptidos biológicamente activos dados a conocer en la presente memoria, aquellos que ponen en
55 práctica la técnica podrían identificar otras enfermedades y afecciones que se beneficiarían de dicho tratamiento. Por ejemplo, los pacientes infectados por VIH, los pacientes que experimentan quimioterapia, los pacientes de trasplante de médula ósea, los pacientes de trasplante de células madre y los pacientes que padecen trastornos mieloproliferantes presentan niveles subnormales de linajes hematopoyéticos específicos.

60 Los pacientes sometidos a diálisis renal con frecuencia padecen anemia relacionada con el tratamiento con niveles subnormales de glóbulos rojos. En la anemia aplásica, la supresión de la médula ósea puede producir pancitopenia o puede afectar solamente a los glóbulos rojos, a los glóbulos blancos o a las plaquetas. Los anticuerpos expuestos aumentarán el arsenal de agentes terapéuticos para éstas y otras enfermedades y los trastornos caracterizados por insuficiencias en poblaciones de células específicas, tales como las células hematopoyéticas.

65 Las moléculas comprendidas por la invención reivindicada pueden utilizarse también para la proliferación *ex vivo* y diferenciación de las células. Esto es útil para la terapia génica, por ejemplo, para métodos tradicionales con vector vírico y para autotrasplantes de médula ósea.

ES 2 316 919 T3

Además, determinados anticuerpos según la presente descripción pueden estar radiomarcados para radioinmunoterapia o conjugados a toxinas para administrar dichas toxinas a tipos de células específicas y dar como resultado la destrucción de esas células.

5 Los anticuerpos miméticos de EPO en la presente memoria estimulan la hematopoyesis de manera similar a la EPO natural. Dicha terapia es útil para tratar enfermedades en las que la producción de glóbulos rojos está afectada tal como en la insuficiencia renal crónica. La actividad biológica de los anticuerpos miméticos de EPO puede determinarse utilizando análisis *in vitro* o *in vivo*.

10 Un análisis *in vitro* mide el efecto de los anticuerpos miméticos de eritropoyetina en la eritropoyesis en células intactas de bazo de ratón según el procedimiento de Krystal, G., *Exp. Hematol.* 11:649-660 (1983). Para identificar la actividad en varias formas de realización de los anticuerpos miméticos de EPO, por ejemplo, *in vitro* o *in vivo*, puede evaluarse la extensión de la eritropoyesis o la unión al receptor en los anticuerpos miméticos de EPO. Las pruebas para determinar la actividad biológica son bien conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, la actividad biológica de la eritropoyetina puede medirse tal como se describe en, por ejemplo, la patente US nº 5.614.184 y en la
15 patente US nº 5.580.853 incorporadas a la presente memoria como referencia.

La vía de administración del anticuerpo está de acuerdo con procedimientos conocidos, por ejemplo, inyección o infusión por las vías intravenosa, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, subcutánea, intraocular, intraarterial, intratecal, por inhalación o intralesional, tópica o por sistemas de liberación prolongada como se apunta a continuación. El anticuerpo se administra preferentemente continuamente por infusión o por inyección intravenosa rápida. Se puede administrar los anticuerpos de manera local o generalizada.

Los anticuerpos de la invención pueden prepararse en una mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable. Las técnicas para la formulación y administración de los compuestos de la presente solicitud pueden encontrarse en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición. Esta composición terapéutica puede administrarse por vía intravenosa o por las fosas nasales o el pulmón, preferentemente en forma líquida o de aerosol en polvo (liofilizada). La composición puede administrarse también por vía parenteral o subcutánea según se desee. Cuando se administra por vía generalizada, la composición terapéutica debe ser estéril, exenta de pirógenos y en una solución parenteralmente aceptable con la debida atención al pH, la isotonicidad y la estabilidad. Estas
25 condiciones son bien conocidas por los expertos en la materia.

En resumen, las formulaciones de dosificación de los compuestos de la presente invención se preparan para almacenamiento o administración mezclando el compuesto que tiene el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizantes fisiológicamente aceptables. Dichos materiales no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones utilizadas y pueden incluir tampones tales como TRIS HCl, fosfato, citrato, acetato y otras sales de ácidos orgánicos; antioxidantes tal como el ácido ascórbico; péptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente diez restos) tal como poliarginina, proteínas, tal como albúmina del suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tal como la povidona; aminoácidos tales como glicina, ácido glutámico, ácido aspártico o arginina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo la celulosa o sus derivados, glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tal como EDTA; alcoholes de azúcar tal como manitol o sorbitol; contraiones tales como sodio y/o tensioactivos no iónicos tal como TWEEN, PLURONICS o polietilenglicol.

Cuando se utilizan para la administración *in vivo*, la formulación del anticuerpo debe ser estéril y puede formularse según la práctica farmacéutica convencional. Esto se realiza fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles, antes o después de la liofilización y redisolución. El anticuerpo ordinariamente estará almacenado en forma liofilizada o en solución. Pueden resultar preferidos otros vehículos tales como los aceites vegetales naturales como el aceite de sésamo, cacahuete o de semillas de algodón o un vehículo de grasa sintética como el oleato de etilo o similares. Pueden incorporarse tampones, conservantes, antioxidantes y similares según la práctica farmacéutica
50 aceptada.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su utilización incluyen composiciones en las que uno o más anticuerpos diseñados racionalmente están contenidos en una cantidad eficaz para conseguir su objetivo pretendido. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad de anticuerpo eficaz para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas de la enfermedad o prolongar la supervivencia del paciente que está siendo tratado. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está comprendida dentro de las capacidades de los expertos en la materia, especialmente a la luz de la descripción detallada proporcionada en la presente memoria. Pueden determinarse dosis terapéuticamente eficaces utilizando procedimientos *in vitro* e *in vivo*.

Una cantidad eficaz de anticuerpo que debe utilizarse terapéuticamente dependerá, por ejemplo, de los objetivos terapéuticos, la vía de administración y la enfermedad del paciente. Además, el médico tendrá en cuenta varios factores conocidos para modificar la acción de los fármacos incluyendo la gravedad y el tipo de enfermedad, peso corporal, sexo, dieta, duración y vía de administración, otras medicaciones y otros factores clínicos aplicables. Por consiguiente, será necesario para el terapeuta valorar la dosis y modificar la vía de administración tal como se requiere para obtener el efecto terapéutico óptimo. Por lo general, el médico administrará el anticuerpo hasta que se alcance una dosis que consiga el efecto deseado. El avance de esta terapia se controla fácilmente por análisis convencionales.

ES 2 316 919 T3

Para cualquier anticuerpo que contenga un péptido, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de los análisis del cultivo celular. Por ejemplo, puede formularse una dosis en modelos animales para conseguir un intervalo de concentración en circulación que incluye la EC₅₀ determinada en el cultivo celular (por ejemplo, la concentración de la molécula de ensayo que favorece o inhibe la proliferación o diferenciación celular). Dicha información puede utilizarse para determinar más exactamente las dosis útiles en seres humanos.

La toxicidad y eficacia terapéutica de las moléculas de anticuerpo descritas en la presente memoria pueden determinarse por procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos de células o en animales experimentales, por ejemplo, para determinar la LD₅₀ (dosis letal para el 50% de la población) y la ED₅₀ (dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxico y terapéutico es el índice terapéutico y puede expresarse como relación entre LD₅₀ y ED₅₀. Resultan preferidas las moléculas que presentan grandes índices terapéuticos. Los datos obtenidos a partir de estos ensayos de cultivo celular y estudios en animales pueden utilizarse para formular una gama de dosis para su utilización en seres humanos. La dosis de dichas moléculas está situada preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluyen la ED₅₀ con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma farmacéutica empleada y de la vía de administración utilizada. La formulación, vía de administración y dosis exactas pueden ser seleccionadas por cada médico a la vista de la enfermedad del paciente. (Véase, por ejemplo, Fingi *et al.*, 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", cáp. 1 pág. 1).

La cantidad de dosis y el intervalo puede ajustarse en cada caso para proporcionar concentraciones en el plasma de anticuerpo que sean suficientes para favorecer o inhibir la proliferación o diferenciación celular o la concentración mínima eficaz (MEC). La MEC variará para cada anticuerpo, pero puede estimarse a partir de datos *in vitro* utilizando los ensayos descritos. Las dosis necesarias para conseguir la MEC dependerán de las características individuales y de la vía de administración. Sin embargo, pueden utilizarse análisis HPLC o bioanálisis para determinar las concentraciones en el plasma.

Los intervalos de dosis pueden determinarse utilizando el valor MEC. Las moléculas de anticuerpo deberían administrarse utilizando un régimen que mantenga las concentraciones en el plasma superiores a la MEC durante el 10 al 90% del tiempo, preferentemente entre el 30 y el 90% y aún más preferentemente entre el 50 y el 90%.

En los casos de administración local o de absorción selectiva, la concentración local eficaz del anticuerpo puede no estar relacionada con la concentración en el plasma.

Una dosis diaria típica puede oscilar entre aproximadamente 1 µg/kg hasta 1.000 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Por lo general, el médico administrará la molécula hasta que se alcance una dosis que consiga el efecto deseado. La evolución de esta terapia se controla fácilmente mediante análisis convencionales.

Dependiendo del tipo y de la gravedad de la enfermedad, desde aproximadamente 0,001 mg/kg hasta aproximadamente 1.000 mg/kg, más preferentemente de aproximadamente 0,01 mg a 100 mg/kg, más preferentemente de aproximadamente 0,010 a 20 mg/kg del anticuerpo agonista puede ser una dosis experimental inicial para la administración al paciente, o bien, por ejemplo, mediante una o más administraciones independientes o por infusión continua. Para las administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la enfermedad, el tratamiento se repite hasta que se produce la supresión deseada de los síntomas de la enfermedad o se consigue la mejora deseada en la enfermedad del paciente. Sin embargo, pueden ser también útiles otros regímenes de dosis.

Ejemplos

Los ejemplos siguientes se proporcionan únicamente a título ilustrativo y no limitativo del alcance de la invención. Los ejemplos 1 a 4 y 6 a 7 son ejemplos comparativos y el ejemplo 5 es un ejemplo de la invención.

Ejemplo 1

Construcción del banco de secuencias miméticas de TPO injertadas en un marco de anticuerpo humano

Un péptido mimético de TPO agonista IEGPTLRQWLAARA (SEC. ID. n°: 1) se injertó en CDR3 con cadena pesada Fab (HCDR3) de la vacuna antitetánica (TT), sustituyendo la secuencia completa de HCDR3 GDTIFGVTMGY YAMDV (SEC. ID. n°: 4). La Figura 2A presenta la secuencia para el anticuerpo de la vacuna contra el tétanos humana empleado. Se emprendieron dos métodos de injerto. En el primer método se insertó el péptido agonista en la región H-CDR3 con dos glicinas flanqueantes a cada lado. Esto se hizo para reducir las limitaciones estructurales en el péptido injertado de modo que pudiera adoptarse más fácilmente la configuración deseada. En el segundo método, se situaron al azar dos posiciones de aminoácido a cada lado del péptido injertado con objeto de que pudiera conseguirse la mejor presentación del péptido (Figura 3). Estos dos métodos se emprendieron con objeto de determinar si el péptido solo era suficiente o si se requerían restos específicos para la presentación apropiada del péptido agonista en la estructura del anticuerpo, proporcionando de este modo su actividad al anticuerpo.

La Figura 4 esboza el procedimiento de construcción del banco. En resumen, el Fab de la vacuna antitetánica se amplió en dos fragmentos. El fragmento A se amplió utilizando un cebador transcrito (N-Omp: 5' TAT CGC GAT TGC AGT GGC ACT GGC 3') (SEC. ID. n°: 5) que se hibridó con el Omp A principal para la cadena ligera en

ES 2 316 919 T3

combinación con el cebador posterior (TPOCDR3-B: 5' GC CAG CCA TTG CCG CAG CGT CGG CCC TTC AAT YNN YNN TCT CGC ACA ATA ATA TAT GGC 3' (SEC. ID. n°: 6) que se hibridó en el extremo marco de la cadena pesada (FR) 3. El cebador inverso contenía una cola que codifica el CDR3 nuevo. El fragmento B se generó utilizando un cebador transcrito (TPOCDR3-F: 5' CCG ACG CTG CGG CAA TGG CTG GCG GCG CGC GCG NNY NNY TGG GGC CAA GGG ACC ACC GT 3') (SEC. ID. n°: 7) que se hibridó al FR4 y el cebador inverso Seq-G3Rev (5' TCA AAA TCA CCG GAA CCA GAG C 3') (SEC. ID. n°: 8) que se hibridó en la región del gen III del plásmido, corriente abajo de la señal de terminación de la cadena pesada. El cebador TPOCDR3-F poseía también una cola de bases que codificaba la nueva región CDR3. Se utilizó TAQ ADN polimerasa (Perkin Elmer) en el programa de PCR siguiente: 94°C 30 segundos, a continuación 30 ciclos de 94°C durante 15 s., 55°C durante 15 segundos y 72° durante 90 segundos, seguido de un periodo de ampliación a 72° durante 10 minutos y una pausa a 4°C. Una vez generados los fragmentos por PCR y purificado el gel, se combinaron durante una PCR de extensión del solapamiento. Las regiones codificadas por el nuevo cebador CDR3 eran complementarias y proporcionaron 23 bases de solapamiento. Se utilizaron los cebadores N-Omp y SeqG3Rev en el protocolo de solapamiento de PCR para generar el producto de Fab ADN completo. Se utilizó la Taq ADN polimerasa (Perkin Elmer) en el siguiente programa de PCR: 94°C 30", a continuación 20 ciclos de 94°C 30", 56°C 30" y 72°C 3' 15", a continuación un periodo de ampliación de 72°C durante 15' seguido de una pausa a 4°C. Tras la purificación en gel del producto Fab, se realizó una digestión con Sfi 1 a 50°C durante 5 horas. Se ligaron las inserciones en el vector pRL4 digerido con Sfi 1 durante la noche. Los productos de ligadura fueron etanol precipitado, vuelto a poner en suspensión en H₂O y a continuación sometido a electroporación en bacterias ER2537 competitivas (cepa supresora, New England Biolabs). Tras una hora de agitación en 5 ml de SOC, se añadió un volumen igual de SB. Se añadió carbenicilina a 20 µg/ml y se agitó el cultivo durante una hora a 37°, seguido de una hora a 37° en 50 µg/ml de carbenicilina. El cultivo del banco se transfirió a un matraz que contenía 100 ml de SB reciente, 50 µg/ml de carbenicilina y 10¹² VCS M13 fago cooperador. Después de dos horas a 37°C, se añadió kanamicina para seleccionar las bacterias que habían sido infectadas con el fago cooperador. Al día siguiente, se centrifugaron los cultivos durante la noche y se precipitó el fago en el sobrenadante en hielo utilizando PEG al 4%/NaCl 0,5 M. Tras la centrifugación del fago, se volvió a poner en suspensión el sedimento en BSA al 1%/PBS, se filtró y se dializó frente a PBS. Los fagos del banco se almacenaron a 4°.

La construcción de los FAB que contienen el péptido unido de manera no aleatoria se realizó tal como se describió anteriormente por cebadores de sustitución TPOCDR3-B y TPOCDR3-F con cebadores específicos alternativos. Para el anticuerpo injertado con PP-(IEGPTLRQWLAARA)-GG (SEC. ID. n°: 25), los cebadores utilizados fueron TPOCDR3g-B (5' GC CAG CCA TTG CCG CAG CGT CGG CCC TTC AAT NGG NGG TCT CGC ACA ATA ATA TAT GGC 3') (SEC. ID. n°: 9) y TPOCDR3g-F (5' CCG ACG CTG CGG CAA TGG CTG GCG GCG CGC GCG GGN GGN TGG GGC CAA GGG ACC ACC GT 3') (SEC. ID. n°: 10). Para el anticuerpo injertado con GG-(IEGPTLRQWLAARA)-GG (SEC. ID. n°: 29), los cebadores utilizados fueron TPO-CDR3-ggB (5' GC CAG CCA TTG CCG CAG CGT CGG CCC TTC AAT NCC NCC TCT CGC ACA ATA ATA TAT GGC 3') (SEC. ID. n°: 11) y TPOCDR3g-F (5' CCG ACG CTG CGG CAA TGG CTG GCG GCG CGC GCG GGN GGN TGG GGC CAA GGG ACC ACC GT 3') (SEC. ID. n°: 12).

Selección del banco CDR3 de la cadena pesada del péptido mimético de TPO

Con el fin de seleccionar la presentación óptima del péptido, se llevó a cabo el ensayo de adhesión de células en plástico en plaquetas humanas. Debido a que las plaquetas expresan aproximadamente 1.800 receptores de TPO por célula en su superficie (receptores cMpl), representaban una célula diana adecuada. Además, las plaquetas están disponibles fácilmente en el banco de sangre local. A 1 ml de plaquetas humanas concentradas actualizadas del banco de sangre, se añadieron 50 µl de Fab del fago recién preparado en un tubo cónico de 15 ml con NaN₃ al 0,1%. Se mezcló el tubo a temperatura ambiente durante 1 a 2 horas. Por lo general, 10 ml de suero humano al 50% (extraído de las plaquetas restantes) + {IMDM/FBS al 10%/azida al 0,1%/EDTA 2 mM} al 50% se añadió al fago/células. Se sedimentaron las plaquetas a 5.500 × g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se purgó el sobrenadante y se dejó el sedimento en reposo bajo ~500 µl de lavado durante 20 minutos. Las plaquetas se volvieron a poner en suspensión muy suavemente y a continuación se añadieron al fago/células 10 ml de suero humano al 25% (extraído de las plaquetas restantes) + {IMDM/FBS al 10%/azida al 0,1%/EDTA 2 mM} al 75%. Se repitió la centrifugación, el reposo del sedimento y la resuspensión de las plaquetas. En las rondas 3 y 4 del ensayo de adherencia de las células al plástico, se realizó un tercer lavado. El fago/células lavadas se transfirió a un tubo eppendorf y se centrifugó a 5.200 × g. Se eluyó el fago de las plaquetas 10 minutos a temperatura ambiente utilizando tampón de elución ácido (HCl 0,1 M, 1 mg/ml de BSA y glicina a pH 2,2). Se sedimentaron las plaquetas a velocidad máxima y el fago eluido se transfirió a un tubo cónico de 50 ml y se neutralizó con base Tris 2 M. Se dejó continuación infectar el fago con bacterias ER2537 frescas durante 15 minutos a temperatura ambiente y se amplió durante la noche tal como se describió anteriormente. Se realizaron cuatro rondas de adhesión de plaquetas al plástico.

Después de la cuarta ronda de adhesión de las células al plástico, las mezclas de los 3 clones de Fab expresadas como proteínas solubles en la cepa TOP10F' bacteriana no supresora (Invitrogen, Carlsbad, CA) se determinó por los Fac la unión a las plaquetas utilizando la etiqueta del epítipo HA de los Fab con anti-HA de rata de gran afinidad seguido de antirrata-FITC (Sigma, St. Louis, Missouri). Los 25 µl de plaquetas humanas concentradas indicadas (lavadas una vez con PBS/EDTA 5 mM/FBS al 2%) se incubaron con 100 µl de sobrenadante bacteriano (60 µl de sobrenadante bacteriano procedente de estos clones de Fab mezclados se incubaron previamente con 40 µl de leche al 5%/PSS a 4°C durante 15 minutos) a temperatura ambiente durante 20 a 30 minutos. Se añadió 1 ml de tampón FACS (PBS/FBS al 2%/EDTA 5 mM) y se centrifugaron las células a 5.200 × g durante 5 minutos. Las células sedimentadas se volvieron a poner en suspensión en 50 µl de anticuerpo diluido a 1:10 (en PBS/BSA al 1%/NaN₃ al 0,1%) se añadió

ES 2 316 919 T3

a 2°C anticuerpo anti-HA [clon 3F10 de gran afinidad anti-HA de IgG de rata (Roche Molecular Biochemicals)]. Después de 30 minutos a temperatura ambiente, se lavaron las células con 1 ml de tampón FACS como anteriormente. Tras la centrifugación, se volvieron a poner en suspensión las células en 100 µl de anticuerpo FITC de IgG antirrata (Sigma) a 3°C diluido a 1:160 (en PBS/BSA al 1%/NaN₃ al 0,1%) y se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Se lavaron las células con 1 ml de tampón FACS, a continuación se volvieron a poner en suspensión en 200 µl de tampón FACS para análisis. Como referencia positiva se utilizó un Ab anti-IIb/IIIa de oveja disponible en el mercado por FITC anti-oveja. Muchas mezclas de los Fab fueron claramente positivas para la unión de las plaquetas por los Fac. Después de los análisis de Fac se realizaron a continuación para identificar los clones individuales que estaban unidos a las plaquetas.

Examen de candidatos individuales por actividad de unión

Se determinó la reactividad de varios Fab, como sobrenadantes bacterianos, para la vacuna antitetánica del antígeno original con el fin de determinar si esta especificidad de unión se conservaba. El anti-TT Fab con estructura de anticuerpo no se une a su antígeno TT, sino a BSA. Sin embargo, clones de Fab injertados con cuatro péptido miméticos de TPO no presentaban unión significativa a TT o BSA. Como se observa en los experimentos previos, la sustitución de HCDR3 de Fab anti-TT fue suficiente para cambiar la especificidad del anticuerpo.

Para examinar mejor las capacidades de fijación de los Fab se realizó análisis de los Fac en células CMK, estirpe celular megacariocítica (procedente de la German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) que expresa también el receptor de cMpl. Los clones de Fab que se unen a las células CMK se analizaron a continuación para verificar que la unión de la plaqueta y la célula CMK se produjo mediante el receptor de cMpl. Para este experimento, se transfectaron células 293 EBNA con o sin el cMpl-R, que había sido clonado a partir de las células Tf-1 por RT-PCR. Se incubaron 1 × 10⁶ células transfectadas con el sobrenadante bacteriano de cada clon Fab (bloqueado previamente como se describió anteriormente) durante 20 a 30 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugaron las células a 2.000 rpm durante 5 minutos. Se volvieron a poner en suspensión las células sedimentadas en 90 µl de tampón FACS (PBS/FBS al 2%/EDTA 1 mM) a continuación se añadieron 10 µl de anticuerpo anti-HA a 2° [clon 3F10 de gran afinidad anti-HA de IgG de rata (Boehringer Mannheim Biochemicals) para una dilución final 1:10. Después de 20 minutos a temperatura ambiente, se lavaron las células con 1 ml de tampón FACS. Tras la centrifugación, se volvieron a poner en suspensión las células en 100 µl de anticuerpo PE con IgG antirrata a 3° (Research Diagnostics Incorporated, RDI) diluido 1:50 (en PBS/BSA al 1%/NaN₃ al 0,1%) y se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Se lavaron las células con 1 ml de tampón FACS, a continuación se volvieron a poner en suspensión en 200 µl de tampón FACS para análisis. Los Fab seleccionados durante el apelmazamiento demostraron una unión potente a las células transfectadas con el cMpl-R pero no a las células transfectadas con el vector de referencia que carecen del cMpl-R. Esto indica que la unión a la superficie celular se produjo de manera específica por el receptor de cMpl. El Fab anti-T no se une al vector de referencia ni a las células 293 transfectadas con cMpl-R. Sin embargo, el clon X1c de Fab presenta un desplazamiento del 3% de unión de las células transfectadas de referencia (receptor no de cMpl) para el 95% de unión de las células que expresan el cMpl-R.

Examen de candidatos individuales por la secuencia

El análisis de la secuencia de los clones de Fab que se unen específicamente al receptor cMpl (véase Fig. 5), puso de manifiesto la selección de los aminoácidos preferidos en el punto de unión corriente abajo. Los datos de la secuencia de ADN se analizaron y las secuencias de aminoácidos y de ADN son las siguientes:

Clon	Propiedades de la unión	SEC. ID. n°:	Secuencia
X1a	débil	25	Pro Pro (péptido de 14 aa) Gly Gly
X1a-11	débil	27	Gly Gly (péptido de 14 aa) Gly Gly
X1a-13	débil	29	Gly Gly (péptido de 14 aa) Gly Gly
X1c	fuerte	31	Trp Leu (péptido de 14 aa) Pro Val
X2c	débil	33	Met Ile (péptido de 14 aa*) Val Gly
X2a	fuerte	35	Val Val (péptido de 14 aa) Pro Val
X3b	fuerte	37	Gly Pro (péptido de 14 aa) Pro Asp
X4b	fuerte	39	Leu Pro (péptido de 14 aa) Pro Val
X4c	fuerte	41	Ser Leu (péptido de 14 aa) Pro Ile
X5a	fuerte	43	Thr Met (péptido de 14 aa) Pro Val
X5c	fuerte	45	Trp Leu (péptido de 14 aa) Pro-Val
X7a	débil	47	Thr Arg (péptido de 14 aa*) Cys Ser
X7b	débil		mutante por eliminación este clon ha perdido el péptido
X7c	fuerte	49	Gln Thr (péptido de 14 aa) Pro Asp

ES 2 316 919 T3

Se descubrió que todos los clones que demostraron una unión fuerte, contenían una prolina justo corriente abajo del péptido mimético de TPO de 14 aminoácidos. La selección por apelmazamiento de una prolina en la posición del enlazador corriente abajo representa la terminación de una selección sorprendente de aminoácido que proporciona características mejoradas de unión al péptido mimético TPO injertado. Los aglutinantes débiles no contenían esta prolina aunque contenían todavía el péptido mimético de TPO. Debe observarse que el clon X7a tenía una mutación imperceptible en este péptido (GCG a GCA que conserva el Ala en la posición 11 en el péptido) y este clon X2c presentaba una mutación en este péptido que conecta un Thr para Ala en la posición 11 del péptido.

Ensayos biológicos

Se determinó la actividad agonista de los clones utilizando un ensayo basado en la transcripción que mide la actividad de la luciferasa conducido por el activador c-Fos. La dimerización del receptor de cMpl activa a Jak que estimula la trayectoria de la MAP cinasa. De este modo puede medirse la activación analizando la producción de luciferasa y la actividad estimulada por la MAP cinasa mediante el activador cFos. Dado que se requiere la dimerización del receptor de cMpl para la activación, la IgG completa o los fragmentos dimerizados de Fab que pueden dimerizar el receptor, podrían utilizarse para estimular la actividad del receptor de cMpl. Los Fab producidos en las bacterias se dimerizaron mediante la etiqueta HA que utiliza el anticuerpo anti-HA 12CA5. Cantidades crecientes de 12CA5 se añadieron a los Fab bacterianos para dimerizar los clones de Fab con objeto de que puedan a su vez dimerizar y activar el receptor de cMpl. Para la medición de las actividades agonistas el Fab que contiene sobrenadantes bacterianos (2 ml) mezclados con 12CA5 se aplicaron a células NIH3T3 que habían sido cotransfectadas con un vector de referencia o con el receptor de cMpl y el montaje indicador del activador de Fos/luciferasa. Se realizaron cotransfecciones de células 3T3 colocando células 3T3 de NIH a razón de 3×10^5 células por placa de 6 cm y a continuación transfec-tando al día siguiente. Se transfectaron células 3T3 de NIH utilizando el reactivo de lipofección Efectina (Qiagen), transfec-tando cada placa con 0,1 μg de pEGFP (trazador para medir la eficacia de la transfección), 0,2 μg del activador de Fos/montaje de luciferasa y 0,7 μg del vector de referencia vacío o el plásmido que expresa el receptor de cMpl. Se colocaron células 3T3 en suero al 0,5% 24 horas después de la transfección y se incubaron durante 24 horas más en este medio bajo en suero para reducir la activación de fondo del activador de Fos. Se aplicaron a continuación sobrenadantes de anticuerpo a estas células durante 6 horas. Se recogieron las células y se realizaron ensayos con luciferasa utilizando 50 μg del lisado celular. No fue estimulada ninguna activación por los anticuerpos en ausencia de expresión del receptor de cMpl. Sin embargo, se observó actividad agonista en las células 3T3 cotransfectadas con el receptor de cMpl. Esto permitió demostrar que la actividad del agonista observada era por el receptor de cMpl y su interacción con el anticuerpo. Estos datos son los siguientes:

<u>Sobrenadantes bacterianos con 12CA5</u>		
<u>Tratamiento CELL</u>	<u>Actividad de luciferasa plegada relativa</u>	
	<u>cMpl-R transfectada</u>	<u>Referencia transfectada</u>
Sin tratar:	1,0	1,0
+ 10% FCS	3,43	3,0
+ TPA	2,3	2,42
+ TPO	2,32	0,76
+ X4c sup (solo)	1,03	0,94
+ X4c + 60 μl α -HA	1,97	0,84
+ X4c + 30 μl α -HA	1,52	0,87
+ X4c + 10 μl α -HA	1,22	0,86
+ X4c + 3 μl α -HA	0,94	0,68
+ X4c + 1 μl α -HA	0,91	1,05
+ X4c + 0,3 μl α -HA	1,01	0,95

La activación del receptor de cMpl puede determinarse de manera similar utilizando las IgG completas (convertidas a partir de Fab como se describe en la presente memoria) producidas por transfección transitoria o estable de células de mamífero en lugar de los Fab producidos por bacterias, dimerizados por 12CA5 anti-HA. La transfección experimentalmente transitoria puede realizarse esencialmente como se describe en la presente memoria. Para las transfecciones, 2×10^6 células (tales como 293 EBNA) se colocarían en placas de 6 cm para cada muestra de ensayo. Al día siguiente cada placa se transfectaría con 2,5 μg de ADN completo (2 μg del o de los plásmido(s) completo(s) de la cadena ligera y de la cadena pesada, 0,25 μg de pAdVantage (Promega, Madison, Wisconsin) y 0,25 μg de pEGFP) utilizando el reactivo Efectina (Qiagen). Las células 293 se colocarían en suero al 0,5% 24 horas después de la transfección y se incubarían durante 24 horas más en este medio bajo en suero para obtener la IgG completa. Los

ES 2 316 919 T3

factores de crecimiento residuales son insignificantes en este medio en receptores de estimulación como se observa en los experimentos de las referencias. Después de 24 horas los sobrenadantes se recogerían y se centrifugarían durante 5 minutos a 3.000 rpm para eliminar cualquier célula residual. Para la medición de las actividades agonistas de las IgG completas, se aplicarían 3 ml de los sobrenadantes de las células 293 acondicionados a las células NIH3T3 como se describió anteriormente.

Ejemplo 2

Bancos adicionales que contienen secuencias miméticas de TPO injertadas en un marco de anticuerpo humano

Otro método para unir dos péptidos agonísticos en un marco de anticuerpo consiste en insertar el péptido agonista en más de una posición en un fragmento individual de Fab. Con este objeto, se construyeron bancos adicionales que contienen secuencias miméticas de TPO injertadas en un marco de anticuerpo humano. Tras la selección de los péptidos presentados de manera apropiada en el contexto de CDR1, CDR2 o CDR3 de la cadena ligera, o CDR2 de la cadena pesada, se combinaron las secuencias de unión en una molécula individual de Fab, por ejemplo como se presenta en la Tabla 1 a continuación y se analiza el aumento de actividad.

TABLA 1

Péptido 1	Péptido 2
H-CDR3	H-CDR2
H-CDR3	L-CDR1
H-CDR3	L-CDR2
H-CDR3	L-CDR3
H-CDR2	L-CDR2
H-CDR2	L-CDR3
L-CDR3	L-CDR2

Se han construido cuatro bancos adicionales por separado sustituyendo la CDR2 de la cadena pesada así como CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera por el péptido mimético de TPO flanqueado por 2 aminoácidos al azar utilizando la estrategia de dopado con NNK. La generación de los bancos fue similar a la descrita para el banco del péptido TPO de CDR3 de la cadena pesada, excepto que solamente la cadena (pesada o ligera) que se ha modificado para formar un banco se amplió por PCR y se utilizó como inserción. Se efectuó la PCR utilizando el Expand High Fidelity System (Roche) que contiene una mezcla de Taq y Pwo polimerasas. Se realizó la primera ronda de PCR utilizando el programa: 94°30", a continuación 30 ciclos de 94°15", 56°30" y 72°2', seguido de prolongación durante 10' a 72° y una pausa a 4°. Se realizó la PCR por superposición durante 10 ciclos sin cebadores utilizando el programa listado anteriormente para permitir que la plantilla del ADN completo fuera generada por las polimerasas. Se añadieron a continuación cebadores a los tubos de reacción de PCR durante 20 ciclos del mismo programa para ampliación.

Para el banco de HCDR2, se creó el fragmento A utilizando VH conducido por el cebador transcrito (5' GCT GCC CAA CCA GCC ATG GCC 3') (SEC. ID. n°: 13), que se hibridó con la señal principal pel B situada enfrente de la cadena pesada, y el cebador inverso HR2 CMPL, ANTI (5' AGC CAG CCA CTG GCG CAG GGT TGG GCC TTC GAT MNN MNN TCC CAT CCA CTC AAG CCC TTG 3') (SEC. ID. n°: 51) que se hibridó con el extremo del FR2 de la cadena pesada. El cebador inverso contenía una cola que codifica el nuevo CDR2. El fragmento B se creó utilizando el cebador transcrito HR2 cMpI CODE (5' CCA ACC CTG CGC CAG TGG CTG GCT GCT CGC GCT NNK NNK AGA GTC ACC ATT ACC GCG GAC 3') (SEC. ID. n°: 14) que se hibridó en FR3 de la cadena pesada y el cebador transcrito N-dp (5' AGC GTA GTC CGG AAC GTC GTA CGG 3') (SEC. ID. n°: 15) que se hibridó con la región de la etiqueta del epítipo HA del plásmido, corriente abajo de la región constante de la cadena pesada. El cebador HR2 cMpI CODE tenía también una cola de bases que codificaba la nueva región CDR2. Una vez generados los fragmentos por PCR y purificado el gel, se combinaron para una extensión con solapamiento por PCR. Las nuevas regiones codificadas por el cebador CDR2 eran complementarias y proporcionaron 24 bases de superposición. Se utilizaron los cebadores leadVH y N-dp en el protocolo de PCR por superposición para generar el producto del ADN completo de la cadena pesada. Tras la purificación en gel del producto de la cadena pesada se realizó una digestión con Xho I/Spe I a 37° durante 3 horas. Las inserciones se purificaron en gel y a continuación se ligaron en el vector pRL4 digerido con Xho I/Spe I que contenía la cadena ligera anti-TT. Se precipitaron los productos de la ligadura y se realizó la electroporación en bacterias ER2537 como se describió anteriormente para la generación del banco de Fab-fago.

El banco de CDR3 de la cadena ligera se preparó asimismo utilizando cebadores para el Fragmento A del cebador N-omp transcrito y el cebador complementario LR3 cMpI ANTI (5' AGC CAG CCA CTG GCG CAG GGT TGG GCC TTC GAT MNN MNN ACA GTA GTA CAC TGC AAA ATC 3') (SEC. ID. n°: 16) y para el Fragmento B del cebador transcrito LR3 cMpI CODE (5' CCA ACC CTG CGC CAG TGG CTG GCT GCT CGC GCT NNK NNK TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG 3') (SEC. ID. n°: 17) y el cebador complementario leadB (5' GGC CAT GGC TGG TTG GGC AGC 3') (SEC. ID. n°: 18). El cebador leadB se hibridó con la secuencia principal pelB situada antes

ES 2 316 919 T3

del VH. El cebador complementario LR3 cMpl ANTI y los cebadores transcritos LR3 cMpl CODE se hibridaron a los FR3 y FR4 de la cadena ligera anti-TT respectivamente. Ambos cebadores LR3 cMpl contienen una cola de nucleótidos que codifican el nuevo banco de péptidos CDR3, que proporciona la región de superposición de 24 pares de bases para la fusión por PCR del Fragmento A y del Fragmento B. Tras la purificación de los productos de PCR de cadena ligera, se realizó una digestión con Sac I/Xba I a 37°C durante 3 horas. Los fragmentos de cadena ligera se ligaron a continuación en pRL4 digerido con Sac I/Xba I que contenía la cadena pesada anti-TT durante la noche a temperatura ambiente. Se precipitaron los productos de ligadura y se realizó la electroporación en bacterias ER2537 como se describió anteriormente para la generación del banco Fab-fago.

La construcción del banco de CDR2 de cadena ligera se realizó como se describió anteriormente para el banco CDRD3 de cadena ligera con la excepción de que los cebadores específicos LR2 cMpl ANTI (5' AGC CAG CCA CTG GCG CAG GGT TGG GCC TTC GAT MNN MNN ATA GAT GAG GAG CCT GGG AGC 3') (SEC. ID. n°: 19) que se hibridó en el extremo de FR2 de cadena ligera y el cebador LR2 cMpl CODE (5' CCA ACC CTG CGC CAG TGG GCT GCT CGC GCT NNK NNK GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT 3') (SEC. ID. n°: 20) que se hibridó al principio de FR3 de cadena ligera se utilizaron en lugar de los cebadores LR3 cMpl.

La construcción del banco de CDR1 de cadena ligera se realizó también como se describió anteriormente para el banco de CDRD3 de cadena ligera con la excepción de que los cebadores específicos TPOLR1CODE

(5' CCAACCCTGCGCCAGTGGCTGGCTGCTCGCGCTNNKNNKTGGTACCAGCAGAAA CCTGGC 3') (SEC. ID. n°: 58) que se hibridó al principio del FR2 de cadena ligera y el cebador TPOLR1ANTI

(5' AGCCAGCCACTGGCGCAGGGTTGGGCCTTCGATMNNMNNGCAGGAGAGGGTGG CTCTTTC 3') (SEC. ID. n°: 59) que se hibridó al final de FR1 de cadena ligera se utilizaron en lugar de los cebadores LR3 cMpl.

Los tres bancos adicionales, que sustituyen por separado a CDR2 de cadena pesada y CDR2 y CDR3 de cadena ligera con el péptido mimético TPO flanqueado por dos aminoácidos al azar que utilizan la estrategia de dopado de NNK, se apelmazaron por separado en plaquetas, como se describió anteriormente en el Ejemplo 1 para el banco de sustitución de CDR3 de cadena pesada. Se realizaron cuatro rondas de apelmazamiento y los clones se identificaron por FACS en plaquetas y el receptor de cMpl transfectó las células 293 como se describió anteriormente. Se obtuvieron dos clones positivos de estas identificaciones. Estos clones tenían el péptido mimético de TPO en el CDR2 de cadena pesada. A diferencia de los clones de CDR3 de cadena pesada ninguno de los clones CDR2 de cadena pesada tenía una prolina en posición corriente abajo. En su lugar se descubrió que ambos contenían una tirosina en la posición corriente arriba (véase la Figura 9-clones HC-CDR2 n°C 24 y n°C 39).

Los bancos, incluyendo LCDR1, se sometieron por separado a otro experimento de apelmazamiento utilizando células 293 transfectadas con el receptor cMpl en lugar de las plaquetas durante el apelmazamiento. Se observó que las células 293 se transfectan de manera reproducible con una gran eficacia y expresan niveles muy altos del receptor de cMpl funcional en su superficie. De este modo estas células representaban una célula diana adecuada para su utilización en el apelmazamiento. Para estos experimentos diferentes grupos de placas de células 293 se transfectaron por separado y sucesivamente cuatro días en una fila. Cada grupo de placas se utilizó sucesivamente para las cuatro rondas independientes de apelmazamiento. Cada ronda de recogida de células y apelmazamiento se produjo dos días después de la transfección. Para la recogida, se retiraron las células de las placas utilizando tampón de disociación de células, se centrifugaron a 1.500 rpm durante 5 minutos y se volvieron a poner en suspensión en IMDM enriquecido con FCS al 10%, azida sódica al 0,1% y EDTA 5 mM a una concentración de 1×10^6 células por ml (3×10^6 para LC-CDR1). En la ronda uno pan, se aplicaron por separado 3×10^{11} fagos de cada banco a 2 ml de células (6×10^6 para LC-CDR1 y 2×10^6 células para los demás) y se rotaron en un tubo cónico de 15 ml durante dos horas a temperatura ambiente. Se lavaron las células dos veces utilizando 10 ml de tampón IMDM/FCS al 10%/azida sódica al 0,1%/EDTA 5 mM. Se eluyeron los fagos en ácido y se ampliaron como se describió anteriormente en el Ejemplo 1. En la ronda dos se utilizaron 4×10^6 células (6×10^6 para LC-CDR1) en 2 ml de tampón y 3×10^{11} fagos de la ronda uno ampliada el fago eluido se combinó con 3×10^{11} fagos de un banco no apelmazado y se añadieron a las células. El lavado, la elución y la ampliación se procesó de manera similar a la ronda uno. En la ronda tres se utilizaron 4×10^6 células (6×10^6 para LC-CDR1) en 2 ml de tampón y se utilizaron 3×10^{11} fagos de fago eluido de la ronda dos ampliada. Se lavaron las células tres veces antes de la elución. En la ronda cuatro, se utilizaron otra vez 4×10^6 células (6×10^6 para LC-CDR1) en 2 ml de tampón y se utilizaron 3×10^{11} fagos de los fagos eluidos y ampliados de la ronda tres ampliada. Se lavaron de nuevo las células tres veces antes de la elución. Por lo menos treinta clones individuales se identificaron por FACS en células 293 transfectadas con el receptor de cMpl como se describió anteriormente. Se obtuvieron 12 clones positivos del banco CDR2 de la cadena pesada y 25 clones positivos se obtuvieron del banco CDR2 de la cadena ligera y se obtuvieron 14 clones positivos del banco CDR1 de cadena ligera. Se analizaron más los clones por la secuencia de ADN. Los restos de aminoácido flanqueantes seleccionados para los clones positivos se representan en la Figura 9 adjunta. Resulta interesante mencionar que los Fab injertados con CDR2 de cadena ligera presentan una selección fuerte para una prolina (Pro) corriente arriba del péptido mimético de TPO.

ES 2 316 919 T3

Ejemplo 3

Se han generado combinaciones de los clones de Fab injertados con el péptido mimético de TPO de la Figura 9. De este modo un solo anticuerpo puede contener múltiples copias del péptido mimético de TPO con una sola cadena ligera o pesada. Alternativamente, tanto las cadenas ligeras como las pesadas pueden contener injertos de péptido que dan múltiples copias en un solo Fab. Se agruparon los clones positivos seleccionados procedentes del mismo banco de CDR. Se construyeron nuevos bancos combinando el grupo del péptido mimético de TPO que contiene CDR con el grupo del otro. Se prepararon combinaciones donde uno de los péptidos miméticos de TPO está en la cadena ligera y el otro está en la cadena pesada utilizando técnicas de clonación sencillas que utilizan los ADN plásmidos agrupados y secuencias de restricción únicas que flanquean las cadenas pesada (Xho I-SpeI) y las cadenas ligeras (Sac I-Xba I). Por ejemplo, el ADN plásmido para las cadenas pesadas injertadas con péptido H-CDR3 se combinaron y se digirieron mediante Xho I y Spe I. Se ligaron las inserciones de cadena pesada purificada en el plásmido digerido con Xho I/Spe I que contenía los injertos de L-CDR2. El banco resultante contenía cadenas pesadas con injertos del péptido CDR3 y cadenas ligeras con injertos del péptido CDR2. Debe entenderse que cada uno de los clones podía combinarse también en lugar de utilizar mezclas de clones para el emparejamiento de los dos CDR que contienen péptido. Por ejemplo, un clon con una sola cadena pesada con un injerto de péptido CDR3 se emparejó con varios clones CDR1 de cadena ligera individual para crear los Fab con múltiples copias de péptido miméticos de TPO.

Las combinaciones donde se combinaron dos péptidos miméticos de TPO dentro de una cadena pesada dada se realizaron utilizando PCR de solapamiento para generar el fragmento para clonación. Se utilizaron dos cebadores solapantes que se unen entre CDR2 y CDR3 y cebadores flanqueantes, tales como los cebadores "N omp" y "lead B" de la cadena ligera y los cebadores "Lead VH" y "Ndp" para la cadena pesada. Por ejemplo, para combinar H-CDR2 y H-CDR3 la primera PCR se realizó utilizando lead VH (un cebador que se hibrida en el vector en la señal principal pelB de la cadena pesada) y la hibridación del cebador transcrito en FR3 utilizando el ADN plásmido mezclado con H-CDR2 como plantilla. La secuencia de este cebador fue 5' CCA TGT AGG CTG TGC CCG TGG ATT 3' (SEC. ID. n°: 63). En una reacción independiente, los plásmidos agrupados que contienen los injertos H-CDR3 experimentaron PCR con un cebador transcrito que se hibrida en FR3 (que es transcrito con el cebador inverso FR3 anterior) y N-dp (que se hibrida en el vector en una secuencia de la etiqueta del epítipo). La secuencia de este cebador fue 5' CCA CGG GCA CAG CCT ACA TGG AGC 3' (SEC. ID. n°: 64). Los primeros productos de la PCR se purificaron a continuación combinados en una reacción de PCR de solapamiento, donde la fusión de los dos fragmentos se produjo mediante las secuencias de FR2 complementarias. El producto de la cadena pesada completa fue clonado por Xho I/Spe I en el plásmido que contiene la cadena ligera de la vacuna antitetánica. En las cinco clases de Fab que llevan múltiples copias de los péptidos miméticos de TPO se crearon como se detalla en la Tabla 2 a continuación.

TABLA 2

Péptido 1	Péptido 2	Péptido 3
H-CDR3	H-CDR2	
H-CDR3	L-CDR2	
H-CDR2	L-CDR2	
H-CDR3	H-CDR2	L-CDR2
H-CDR3	L-CDR1	

Se determinó la actividad biológica de 20 clones de cada banco de combinación y de cuatro clones individuales de H-CDR3 más L-CDR1 en un ensayo indicador de luciferasa como se describió anteriormente. Véanse las Figuras 10 y 11. En ambos experimentos, las referencias negativas pueden incluir células no inducidas, células tratadas con un Fab irrelevante (vacuna antitetánica), células tratadas con un clon de Fab que solamente se unen débilmente al receptor cMpl y X4b y/o X1c Fab que no se unen al receptor de cMpl sino que solamente tienen un solo dominio de unión y de este modo no pueden activar el receptor. La referencia positiva era la adición de TPO. Todas las muestras restantes eran de bancos de combinación recién formados. Como puede observarse, varios clones tienen actividad significativa como los Fab. Esto indica que la incorporación de múltiples péptidos miméticos de TPO en una sola molécula de Fab es capaz de unirse a dos receptores y producir la activación del receptor.

De hecho, utilizando Fab 59 la actividad agonista obtenida puede ser tan alta como la actividad de TPO natural. El clon 59 que contiene dos péptidos miméticos de TPO (muestra HC CDR3 × 4c y muestra 19 de LC-CDR2 identificada en la Fig. 9) y una etiqueta de His6 se purificó parcialmente a partir de una preparación periplásmica bacteriana por FPLC utilizando cromatografía en columna de níquel. La actividad de este Fab se midió y se observó que era aproximadamente equivalente a la de TPO (véase la Figura 12), estimada por inducción específica con cMpl-R de actividad de luciferasa en comparación directa con concentraciones conocidas de TPO. Se realizó una transferencia Western cuantitativa con objeto de determinar las concentraciones del anticuerpo Fab 59.

ES 2 316 919 T3

Estos Fab, o dos de otras varias combinaciones de CDR, podrían utilizarse como producto terapéutico. Alternativamente, estos clones podrían convertirse en secuencias marco de la estirpe germinal (con o sin optimización del codón) para su utilización como agente terapéutico siempre que se mantenga la actividad.

5 Ejemplo 4

El injerto del péptido mimético de TPO en el clon X4b de Fab se ha trasplantado en la CDR3 de cadena pesada de otro marco de anticuerpo, 5G1.1. La construcción de 5G1.1 se describe en la solicitud US nº 08/487.283, incorporada a esta memoria como referencia. Se clonó la secuencia en 5G1.1 de tal modo que sustituya al CDR3 natural con 5' ttg cca ATT GAA GGG CCG ACG CTG CGG CAA TGG CTG GCG GCG CGC GCG cct gtt 3' (SEC. ID. nº: 65). El trasplante del péptido traducido en aminoácidos es Leu Pro Ile Glu Gly Pro Thr Leu Arg Gln Trp Leu Ala Ala Arg Ala Pro Val (SEC. ID. nº: 66). El péptido 5G1+ se produjo como un anticuerpo de IgG completo (véanse las Figuras 13A y 13B).

Se analizó por análisis FACS la capacidad del anticuerpo del péptido 5G1.1+ purificado así como la del 5G1.1 precursor para unirse al receptor de cMpl. Se comparó la unión al receptor que expresa y no expresa las células 293 receptoras. Véase la Figura 14. La tinción FACS se realizó esencialmente como se describió anteriormente en la presente memoria, con la excepción de que la detección se realizó utilizando el fragmento F(ab')₂ conjugado con PE de IgG (H+L) anti-humana de cabra. Las referencias negativas de 3º solamente Fab irrelevante de la vacuna antitetánica y Fab X1a que se unen débilmente al receptor de cMpl mostraron todas muy poca tinción. Sin embargo, la unión de Fab X1c y X4b presentaban una tinción fuerte como lo hizo el péptido 5G1.1+. Ninguno de estos clones demostró unión a las células que expresan sin receptor lo que indica que la tinción de las células está sucediendo por reconocimiento específico del receptor de cMpl. El 5G1.1 precursor sin el péptido mimético de TPO no presentaba tinción con ninguna de las células probadas.

Se ha determinado la capacidad de IgG completa del péptido 5G1.1+ para activar el receptor cMpl que utiliza el ensayo indicador de luciferasa (véase la Figura 15). Los resultados en la presente memoria indican que la configuración de una IgG completa produce limitaciones estéricas en su capacidad para llevar de manera productiva los dos receptores de cMpl unidos para activación. La actividad del montaje IgG completo de 5G1.1 que contiene el péptido mimético de TPO en las posiciones de CDR3 de la cadena pesada, fue solamente débil activando y requirió aproximadamente concentraciones molares 100 a 200 veces superiores en comparación con TPO, para estimular una actividad equivalente. Como se observó anteriormente con los experimentos de unión, la activación por el 5G1.1 que contiene el péptido se observó solamente cuando el cMpl-R se expresó en la superficie de la célula. No se observó unión específica al receptor o actividad con el 5G1.1 precursor que no contiene el péptido. Estos resultados demuestran que la unión y la actividad del péptido mimético TPO y las secuencias que flanquean el aminoácido seleccionado no está limitada o es específica del marco del anticuerpo de la vacuna contra el tétanos, pero puede aplicarse a otros marcos del anticuerpo. De este modo las secuencias de aminoácidos flanqueantes que se seleccionaron durante el apelmazamiento son específicas para la presentación del péptido mimético de TPO en una posición de CDR dada, pero no para la secuencia de aminoácidos del marco del anticuerpo.

40 Ejemplo 5

Construcción del banco de secuencias miméticas de Epo injertadas en un marco de anticuerpo humano

Se injertó por separado un péptido mimético de EPO agonista DYHCRMGPLTWVCKPLGG (SEC. ID. nº: 3) (denominada EMP2 en Wrighton *et al.*, 1996) en la región CDR3 de la cadena pesada y ligera de Fab de la vacuna antitetánica creando dos bancos de anticuerpo como XXDYHXRMGPLTWVXKPLGGXX (SEC. ID. nº: 71). Se generaron posiciones al azar utilizando una estrategia de dopado con NNK. Como en el caso del péptido mimético de EPO, dos aminoácidos que flanquean el péptido mimético de EPO se colocaron al azar con el fin de seleccionar la presentación óptima del péptido. Además los residuos de cisteína, que formaban un puente disulfuro en el péptido cíclico original, se colocaron al azar. Esto se hizo no solamente porque las CDR ya forman estructuras de bucle y también de este modo el puente disulfuro no era necesario para limitar el péptido, sino también porque las cisteínas podían de hecho destruir los puentes disulfuro normales del anticuerpo.

La CDR 3 de la cadena pesada del anticuerpo anti-TT se sustituyó completamente por el injerto del banco del péptido de EPO. La generación del banco fue esencialmente como se describe para el banco CDR2 de la cadena pesada de TPO. Se utilizaron dos cebadores alternativos para el banco de HCDR3: el cebador complementario HR3 EPO ANTI (5' CAC CCA GGT CAG TGG GCC CAT GCG MNN ATG ATA GTC MNN MNN TCT CGC ACA ATA ATA TAT GGC 3') (SEC. ID. nº: 21) que se hibridaron al final de FR3 de cadena pesada y el cebador delantero HR3 EPO CODE (5' CGC ATG GGC CCA CTG ACC TGG GTG NNK AAA CCA CTG NNK NNK TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC 3') (SEC. ID. nº: 22) que se hibridaron a FR4 de la cadena pesada.

El banco del péptido CDR3 EPO de la cadena ligera se construyó esencialmente como se describió anteriormente para el banco del péptido CDR3 TPO de la cadena ligera utilizando el cebador complementario LR3 EPO ANTI (5' CAC CCA GGT CAG TGG GCC CAT GCG MNN ATG ATA GTC MNN MNN ACA GTA GTA CAC TGC AAA ATC 3') (SEC. ID. nº: 23) que se hibridó al final de FR3 de cadena ligera y el cebador delantero LR3 EPO CODE (5' CGC ATG GGC CCA CTG ACC TGG GTG NNK AAA CCA CTG NNK NNK TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG 3') (SEC. ID. nº: 24) que se hibridó a FR4 de la cadena ligera.

ES 2 316 919 T3

Selección del banco Cdr3 de la cadena pesada del péptido mimético de Epo y el banco Cdr3 de la cadena ligera

Se realizó la selección para la presentación del péptido por apelmazamiento en fase sólida en el receptor de EPO soluble. En este procedimiento, 1 μ g de EPO humana-R soluble purificado (hEPO-sR de R&D Systems, Mineápolis, MN n° de cat. 307-ER-050) se inmovilizó en una placa de microvaloración toda la noche a 4°. Después de lavar el hEPO-sR libre, las placas se bloquearon con BSA al 1%/PBS durante una hora a 37°C. Los fagos, preparados como se describió anteriormente, se añadieron a los pocillos y se incubaron dos horas a 37°C. Se realizaron los lavados utilizando PBS/Tween 20 al 0,5% durante 5' a temperatura ambiente por lavado. Se realizaron 1, 5, 10 y 10 lavados en las primera, segunda, tercera y cuarta rondas de apelmazamiento respectivamente. Una vez completadas las etapas de lavado, los fagos unidos a Fab se eluyeron con 30 μ l de tampón de elución durante 10' a temperatura ambiente. Los fagos eluidos se neutralizaron a continuación y se ampliaron tal como se describe en el Ejemplo 1.

Ejemplo 6

Se generó un banco por inserción de un péptido mimético de TPO y se seleccionaron previamente los aminoácidos adyacentes (NP-IEGPTLRQWLAARA-RG) (SEC. ID. n°: 61) en una colección de fragmentos del gen kappa humano, en este caso el CDR2 de cadena ligera. Se han generado previamente existencias de cadenas ligeras de kappa humano procedentes de donantes de linfocitos de la sangre periférica humana (PBL) y se han clonado en pBluescriptII SK+. Estas construcciones sirvieron como fuente de fragmentos génicos del anticuerpo.

Genotecas de anticuerpos

El ARN completo de los PBL humanos se aisló utilizando el reactivo TRI (Molecular Research Center, Cincinnati, OH) seguido de purificación del ARNm con el sistema de purificación del ARNm Oligotex (QIAGEN, Valencia, CA) según las instrucciones del kit. Se preparó la primera cadena del ADNc utilizando el kit SuperScript RTase II cDNA Synthesis (Life Technologies, Rockville, Maryland) con un cebador oligo dT modificado. La secuencia del cebador fue 5' TAGGATGCGGCCGCACAGGTC (T₂₀) 3' (SEC. ID. n°: 62). Se purificaron las muestras en una columna kit spin de purificación por PCR (QIAGEN, Valencia, CA) según las instrucciones del kit. Se ampliaron los productos de la cadena ligera utilizando el cebador complementario "Not I" y los cebadores transcritos que se hibridaron en la posición del marco 1 (FR1) de las cadenas Kappa de la 1ª cadena del ADNc. El cebador "Not I" tenía la secuencia que era idéntica al extremo 5' del cebador oligo dT modificado (5' TAGGATGCGGCCGCACAGGTC 3') (SEC. ID. n°: 72). El conjunto de cebadores FR1 kappa utilizados fue:

35 XVB Vk1a CACGCGCACAACACGTCTAGARACATCCAGATGACCCAG (SEC. ID. n°: 73)
XVB Vk1b CACGCGCACAACACGTCTAGAGMCATCCAGTTGACCCAG (SEC. ID. n°: 74)
40 XVB Vk1c CACGCGCACAACACGTCTAGAGCCATCCRGATGACCCAG (SEC. ID. n°: 75)
XVB Vk1d CACGCGCACAACACGTCTAGAGTCATCTGGATGACCCAG (SEC. ID. n°: 76)
45 XVB Vk2a CACGCGCACAACACGTCTAGAGATATTGTGATGACCCAG (SEC. ID. n°: 77)
XVB Vk2b CACGCGCACAACACGTCTAGAGATRRTTGTGATGACTCAG (SEC. ID. n°: 78)
50 XVB Vk3a CACGCGCACAACACGTCTAGAGAAATTGTGTTGACRCAG (SEC. ID. n°: 79)
XVB Vk3b CACGCGCACAACACGTCTAGAGAAATAGTGATGACGCAG (SEC. ID. n°: 80)
55 XVB Vk3c CACGCGCACAACACGTCTAGAGAAATTGTAATGACACAG (SEC. ID. n°: 81)
XVB Vk4a CACGCGCACAACACGTCTAGAGACATCGTGATGACCCAG (SEC. ID. n°: 82)
60 XVB Vk5a CACGCGCACAACACGTCTAGAGAAACGACACTCACGCAG (SEC. ID. n°: 83)
XVB Vk6a CACGCGCACAACACGTCTAGAGAAATTGTGCTGACTCAG (SEC. ID. n°: 84)
65 XVB Vk6b CACGCGCACAACACGTCTAGAGATGTTGTGATGACACAG (SEC. ID. n°: 85)

ES 2 316 919 T3

Una reacción de ampliación típica contenía 2 μ l de reacción de ADNc, dNTP, cebador complementario "Not I", uno de los cebadores delanteros de XVB, el tampón Opti-prime n° 5 (Stratagene, La Jolla, CA) y la mezcla Expand High Fidelity polymerase (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN). Se calentaron las muestras a 94°C durante 2 minutos, a continuación se llevaron a través de 10 ciclos de 94°C durante 15 segundos, 56°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, seguido de 20 ciclos de 94°C durante 15 segundos, 56°C durante 30 segundos y 72°C durante (1 minuto + 5 segundos/ciclo). Los ciclos fueron seguidos por una incubación prolongada a 72°C (7 minutos) antes de una pausa a 4°C. Se precipitaron los productos con etanol y a continuación se purificaron en gel. Se aislaron los fragmentos de aproximadamente 850 bp y a continuación se digirieron con Xba I y Sac I. Los productos kappa resultantes se ligaron en pBluescript II SK+ que se había digerido a sí mismo con Xba I y Sac I. Los productos de ligadura se trataron por electroporación en Top10F' (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se cultivaron durante la noche. Se utilizó el sedimento bacteriano para aislar el ADN del banco kappa con el kit de aislamiento de ADN MAXIprep de QIAGEN.

15 *Construcción del banco marco con el péptido mimético de TPO*

Para la construcción del banco marco de cadena ligera de TPO, se utilizaron cantidades iguales de cuatro bancos de la cadena ligera kappa diferentes de cuatro pacientes diferentes como plantilla de partida para las reacciones de PCR (25 ng totales por reacción). El péptido mimético de TPO y los aminoácidos adyacentes seleccionados se incorporaron en las cadenas ligeras por PCR de solapamiento. En la primera ronda de PCR una serie de cebadores complementarios (cebadores VK ANTI) que se unen al FR2 de la cadena ligera kappa se combinaron por separado con el cebador transcrito T7 seq-F (5'-ATTAATACGACTCACTATAGGG-3') (SEC. ID. n°: 86) para sintetizar la pieza del terminal N de la cadena ligera y parte del péptido mimético de TPO en la posición LC CDR2. Una segunda serie de cebadores transcritos (cebadores VK CODE), que se une a FR3, se combinaron por separado con el cebador complementario T3 (5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3') (SEC. ID. n°: 87) para sintetizar el resto del péptido mimético de TPO en la posición LC CDR2 y la mitad del terminal C de la cadena ligera por PCR. Se realizaron reacciones por separado para cada par de combinación de cebador por duplicado.

30 **VK6ANTI**
5'AGCCAGCCACTGGCGCAGGGTTGGGCCTTCGATCGGGTTCCTGATGAGGAGC
TTTGGRG-3' (SEC.ID.N°: 88)

35 **VK5ANTI**
5'AGCCAGCCACTGGCGCAGGGTTGGGCCTTCGATCGGGTTTTGAATAATGAAAA
TAGCAG-3' (SEC.ID. N°: 89)

40 **VK4ANTI**
5'AGCCAGCCACTGGCGCAGGGTTGGGCCTTCGATCGGGTTGTAAATGAGCARCT
TAGGAG-3' (SEC. ID. N°: 90)

45 **VK3ANTI**
5'AGCCAGCCACTGGCGCAGGGTTGGGCCTTCGATCGGGTTATAGATGAGGAGC
CTGGGMG-3' (SEC. ID.N°: 91)

50 **VK2AANTI**
5'AGCCAGCCACTGGCGCAGGGTTGGGCCTTCGATCGGGTTATAAATTAGGCGCC
TTGGAG-3' (SEC. ID. N°: 92)

55 **VK2BANTI**
5'AGCCAGCCACTGGCGCAGGGTTGGGCCTTCGATCGGGTTATAGATYAGGAGCT
GTGGAG-3' (SEC. ID. N°: 93)

ES 2 316 919 T3

VK1AANTI

5'AGCCAGCCACTGGCGCAGGGTTGGGCCTTCGATCGGGTTATAGATCAGGAGCT
TAGGA-3' (SEC. ID. N°: 94)

5

VK1BANTI

5'AGCCAGCCACTGGCGCAGGGTTGGGCCTTCGATCGGGTTRTAGATCAGGAGCT
TAGGG-3' (SEC. ID. N°: 95)

10

15

VK1CANTI

5'AGCCAGCCACTGGCGCAGGGTTGGGCCTTCGATCGGGTTATAGATCAGGGACT
TAGGG-3' (SEC. ID. N°: 96)

20

25

VK1DANTI

5'AGCCAGCCACTGGCGCAGGGTTGGGCCTTCGATCGGGTTATAGATCAGGYGCT
TAGGG-3' (SEC. ID. N°: 97)

30

VK6CODE

5'CCAACCCTGCGCCAGTGGCTGGCTGCTCGCGCTCGTGGTGGGGTCCCCTCGA
GGTTCAG-3' (SEC. ID. N°: 98)

35

40

VK5CODE

5'CCAACCCTGCGCCAGTGGCTGGCTGCTCGCGCTCGTGGTGAATCCCACCTC
GATTCAG-3' (SEC. ID. N°: 99)

45

VK4CODE

5'CCAACCCTGCGCCAGTGGCTGGCTGCTCGCGCTCGTGGTGGGGTCCCTGACC
GATTCAG-3' (SEC. ID. N°: 100)

50

55

VK3ACODE

5'CCAACCCTGCGCCAGTGGCTGGCTGCTCGCGCTCGTGGTGGCATCCCAGMCA
GGTTCAG-3' (SEC. ID. N°: 101)

60

65

VK3BCODE

5'CCAACCCTGCGCCAGTGGCTGGCTGCTCGCGCTCGTGGTGGTATCCCAGCCA
GGTTCAG-3' (SEC. ID. N°: 102)

ES 2 316 919 T3

VK2ACODE

5'CCAACCCTGCGCCAGTGGCTGGCTGCTCGCGCTCGTGGTGGAGTSCCAGAYA
GGTTCAG-3' (SEC. ID. N°: 103)

VK2BCODE

5'CCAACCCTGCGCCAGTGGCTGGCTGCTCGCGCTCGTGGTGGGGTCCCWGACA
GRITTCAG-3' (SEC. ID. N°: 104)

VK1ACODE

5'CCAACCCTGCGCCAGTGGCTGGCTGGCTGCTCGCGCTCGTGGTGGGGTCCCATCAA
GGTTCAG-3' (SEC. ID. N°: 105)

VK1BCODE

5'CCAACCCTGCGCCAGTGGCTGGCTGGCTGCTCGCGCTCGTGGTGGGGTCCCATCTC
GGTTCAG-3' (SEC. ID. N°: 106)

Los fragmentos de las primeras rondas de PCR se purificaron en gel. Los fragmentos purificados se combinaron a continuación, de manera específica de la familia de anticuerpos, en reacciones PCR de solapamiento para generar la cadena ligera completa. Se realizaron reacciones para cada familia por triplicado utilizando 40 ng de la pieza tanto del terminal N como del terminal C de la cadena ligera en cada reacción. Las reacciones se introdujeron durante 10 ciclos antes de la adición de los cebadores T3 y T7 Seq-F, seguidas de 25 ciclos adicionales después de la adición del cebador. Los productos de PCR de fusión de LC completa se purificaron en gel, se digirieron con Sac I y Xba I y a continuación se purificó en gel otra vez. Las inserciones de la cadena ligera se ligaron a continuación en un vector de presentación del fago apropiado que se había digerido igualmente con Xba I y Sac I y se purificaron en gel. El vector pRL5-kappa utilizado tenía secuencias de restricción que eran compatibles con los fragmentos LC y contenía la región constante kappa restante de la secuencia Sac I natural para la Cys del terminal C. Además, la cadena pesada de la vacuna antitetánica fue insertada en el vector por Xho I y Spe I para la producción de Fab.

La mezcla de ligadura se transformó por electroporación en bacterias XL-1 Blue (Stratagene, La Jolla, CA) y se amplió. El banco se apelmazó cuatro rondas en células 293 EBNA transfectadas con el cMpl-R de manera similar a la descrita anteriormente. En los clones obtenidos durante apelmazamiento se identificó la unión por análisis FAC en las células 293 EBNA transfectadas con o sin el cMpl-R como se describió anteriormente. Se obtuvieron numerosos clones, que se unen específicamente a cMpl-R. La marca del ADN de las cadenas ligeras resultantes por digestión con Bst N1 indicaba que los clones podrían dividirse en 5 grupos diferentes. El secuenciado parcial de 8 de estos clones demostró que los marcos de por lo menos dos familias con cadena ligera kappa diferentes se seleccionaron durante el ensayo de adhesión de células en plástico (VK1 y VK3). En una prueba inicial, 3 de los clones del marco de la cadena ligera se combinaron con la cadena pesada de X4b para crear un Fab con 2 péptidos miméticos de TPO. Estos clones provocaron la actividad del cMpl-R en los ensayos con luciferasa como se describió anteriormente. El nivel de activación utilizando sobrenadantes bacterianos de dicho clon 429/X4n (véase la Figura 16) fue aproximadamente 10 a 20 veces inferior que el observado con TPO, estimado comparando la actividad a concentraciones conocidas de TPO y utilizando transferencias Western cuantitativas para determinar la concentración del anticuerpo en el sobrenadante. Pueden identificarse clones adicionales de manera similar con objeto de identificar los clones con mayor actividad.

Estos Fab, u otros varios LC, HC o combinaciones de CDR dentro de la cadena, podrían utilizarse como producto terapéutico. Alternativamente estos clones podrían convertirse en secuencias de la línea germinal del marco (con o sin optimización del codón) para su utilización como agente terapéutico siempre que se mantenga la actividad.

Modificación de los vectores pAX131 y pRL5 de presentación del fago

La secuencia Not I en el pAX131 se separó digiriendo el vector con Not I utilizando la polimerasa de Klenow para rellenar en los salientes de Not I y a continuación volver a ligar el vector. Véase la Figura 17. Se realizó la modificación adicional digiriendo pAX 131 con EcoR I y Xba I. Se generó una inserción que sustituyó los elementos separados por

ES 2 316 919 T3

dicha digestión utilizando oligonucleótidos solapantes con los cambios siguientes: conversión de la secuencia Sac I en una nueva secuencia Xba I (único subrayado en las secuencias de cebador a continuación), conversión de la secuencia Xba I original en una secuencia Not I (doble subrayado en las secuencias del cebador a continuación) y finalizando la inserción con un saliente de Spe I que es compatible con el saliente generado por el digesto Xba I del vector. La ligadura de la inserción EcoR1/Spe I en el vector de corte EcoR I/Xba I produjo un híbrido Spe I/Xba I que no cortó ya con Spe I o Xba I en esta región. Las secuencias de los oligos utilizados fueron: "EcoSpe" 5' AA TTC AAG GAG TTA ATT ATG AAA AAA ACC GCG ATT GCG ATT GCG GTG GCG CTG GCG GGC TTT GCG ACC GTG GCC CAG GCG GCC TCT AGA ATC TGC GGC CGC a 3' (SEC. ID. n°: 107) y "SpeEco" 5' ct agt GCG GCC GCA GAT TCT AGA GGC CGC CTG GGC CAC GGT CGC AAA GCC CGC CAG CGC CAC CGC AAT CGC AAT CGC GGT TTT TTT CAT AAT TAA CTC CTT G 3' (SEC. ID. n°: 108).

El vector intermedio creado fue pAX131Xba/Not. La región constante kappa humana se insertó entre las secuencias Xba I y Not I generando pAX131-kappa (véase la Figura 18). La región constante kappa humana fue ampliada por PCR procedente de ADNc humano utilizando cebadores que introdujeron la secuencia Xba I corriente arriba y en la posición corriente abajo un codón de terminación TAA seguido por una secuencia Not I. Los cebadores utilizados fueron CKXba I (5' GGA GTC TAG ATA ACT GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC 3') (SEC. ID. n°: 109) y CKNotI (5' AGG AGC GGC CGC TTA ACA CTC TCC CCT GTT GAA GCT C 3') (SEC. ID. n°: 110).

Las modificaciones por clonación de la cadena ligera incorporadas en pAX131-kappa fueron enviadas en el vector pRL5 (modificado por tener su secuencia Not I separada tal como se describió anteriormente) desplazando el fragmento EcoR I al Xho I. Véanse las Figuras 19 y 20. Este vector se denominó pRL5-kappa. (Véanse las Figuras 21A-I).

Ejemplo 7

Banco del núcleo de H-CDR2

Se construyó un banco adicional de HC CDR2 en el que se insertó en la cadena pesada una secuencia del núcleo del péptido mimético de TPO (GPTLRQWL) (SEC. ID. n°: 112) flanqueado por un solo aminoácido aleatorio en cada lado sustituyendo parcialmente la CDR2 (GXGPTLRQWLXYAQKFQG) (SEC. ID. n°: 113). La construcción del banco con sustitución de CDR2 parcial en la cadena pesada se realizó también como se describió anteriormente para el banco CDR2 de la cadena pesada a excepción del cebador específico 8HCR2anti0 (5' CAGC CACTGGCGCAGGGTTGGGCCMNNCCCTCCCATCCACTCAAGCCC-3') (SEC. ID. n°: 114) que se hibridó al final del FR2 de la cadena pesada y el cebador 8HCR2code (5' GGCCCAACCCTGCGCCAGTGGCTGNNKTACG CACAGAAATTCCAG GGCAGAGTC ACCATT-3') (SEC. ID. n°: 115) que se hibridó al principio de FR3 de la cadena pesada se utilizaron en lugar de los cebadores HR2 cMpl descritos anteriormente. El banco con sustitución parcial de CDR2 de la cadena pesada se sometió a cuatro rondas de adhesión en plástico en células 293 EBNA transfectadas con el cMpl-R como se describió anteriormente. Estos clones pueden identificarse entonces para los clones de unión positiva por análisis FAC como se describió anteriormente.

Debe apreciarse que pueden introducirse varias modificaciones en las formas de realización dadas a conocer en la presente memoria. Por consiguiente, la descripción anterior se proporciona únicamente a título de ejemplo no limitativo de las formas de realización preferidas. Resultarán evidentes para los expertos en la materia otras modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas a la presente memoria.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Molécula de inmunoglobulina que comprende una región en la que los restos de aminoácidos correspondientes a por lo menos una parte de una región determinante de complementariedad (CDR) están sustituidos con un péptido mimético que es un mimético de eritropoyetina (EPO); o en la que el péptido mimético que es un mimético de eritropoyetina se inserta en una CDR.
- 10 2. Molécula de inmunoglobulina según la reivindicación 2, que comprende además por lo menos una secuencia flanqueante que incluye por lo menos un aminoácido unido de manera covalente a por lo menos un extremo del péptido mimético.
- 15 3. Molécula de inmunoglobulina según la reivindicación 2, en la que por lo menos una secuencia flanqueante incluye una secuencia flanqueante que presenta una prolina que está unida de manera covalente al péptido mimético.
- 20 4. Molécula de inmunoglobulina según la reivindicación 3, en la que por lo menos una secuencia flanqueante incluye una secuencia flanqueante que presenta una prolina que está unida de manera covalente al terminal carboxi del péptido mimético.
- 25 5. Molécula de inmunoglobulina según la reivindicación 1, en la que por lo menos dos regiones determinantes de complementariedad (CDR) están sustituidas por el péptido mimético o en la que el péptido mimético está insertado en dos CDR.
- 30 6. Molécula de inmunoglobulina según la reivindicación 1, en la que la molécula de inmunoglobulina se selecciona de entre el grupo constituido por el fragmento Fab, el fragmento F(ab')₂ y el fragmento scFv.
- 35 7. Molécula de inmunoglobulina según la reivindicación 1, en la que la molécula de inmunoglobulina es una molécula completa de IgG.
- 40 8. Molécula de inmunoglobulina según la reivindicación 1, en la que la CDR está situada en una cadena ligera.
- 45 9. Molécula de inmunoglobulina según la reivindicación 1, en la que la CDR está situada en una cadena pesada.
- 50 10. Molécula de inmunoglobulina según la reivindicación 1, en la que la CDR se selecciona de entre el grupo constituido por una CDR3 de una cadena pesada y una CDR2 de una cadena ligera.
- 55 11. Molécula de inmunoglobulina según la reivindicación 1, en la que la CDR se selecciona de entre el grupo constituido por una CDR3 de una cadena pesada y una CDR2 de una cadena pesada.
- 60 12. Molécula de inmunoglobulina según la reivindicación 1, en la que la CDR se selecciona de entre el grupo constituido por una CDR3 de una cadena pesada y una CDR1 de una cadena ligera.
- 65 13. Molécula de inmunoglobulina según la reivindicación 1, en la que se sustituyen los restos de aminoácidos correspondientes a una parte de más de una CDR.
- 70 14. Molécula de inmunoglobulina según la reivindicación 1, en la que las regiones CDR3 de una cadena pesada y de una cadena ligera se sustituyen con el péptido mimético.
- 75 15. Molécula de inmunoglobulina según la reivindicación 1, en la que por lo menos una parte de la CDR está sustituida con un péptido mimético que es un mimético de EPO y en la que la CDR se selecciona de entre el grupo constituido por la CDR2 de una cadena pesada y la CDR2 de una cadena ligera.
- 80 16. Molécula de inmunoglobulina según la reivindicación 1, en la que por lo menos una parte de la CDR está sustituida con un péptido mimético que es un mimético de EPO y en la que la CDR se selecciona de entre el grupo constituido por la CDR1 de una cadena pesada y la CDR1 de una cadena ligera.
- 85 17. Molécula de inmunoglobulina según la reivindicación 1, en la que por lo menos una parte de la CDR está sustituida con un péptido mimético que es un mimético de EPO y en la que la CDR se selecciona de entre el grupo constituido por la CDR3 de una cadena pesada y la CDR3 de una cadena ligera.
- 90 18. Inmunoglobulina según la reivindicación 1, en la que el mimético de EPO corresponde a la secuencia presentada en la SEC. ID. n°: 3.
- 95 19. Molécula de inmunoglobulina según la reivindicación 1, en la que la molécula de inmunoglobulina es humana.
- 100 20. Molécula de inmunoglobulina según la reivindicación 19, en la que la molécula de inmunoglobulina es de un toxoide antitetánico.

ES 2 316 919 T3

21. Ácido nucleico que codifica una molécula de inmunoglobulina según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

22. Vector de expresión que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 21.

23. Célula hospedadora transformada con un vector de expresión según la reivindicación 22.

24. Procedimiento de producción de una molécula de inmunoglobulina que comprende cultivar una célula hospedadora según la reivindicación 23 en condiciones adecuadas para la expresión de la inmunoglobulina.

25. Composición que comprende una inmunoglobulina según la reivindicación 1 y un portador farmacéuticamente aceptable.

26. Procedimiento de ingeniería de una molécula de inmunoglobulina que presenta una actividad de un péptido biológicamente activo que comprende:

proporcionar un ácido nucleico que codifica una molécula de inmunoglobulina;

sustituir por lo menos una parte de por lo menos una región de codificación de la CDR con un ácido nucleico que codifica un péptido biológicamente activo que es un mimético de eritropoyetina (EPO), o insertar el ácido nucleico que codifica el mimético de EPO en por lo menos una región que codifica la CDR, para formar un montaje de ácido nucleico sustituido con un péptido biológicamente activo; y

expresar el péptido codificado por el montaje de ácido nucleico junto con una cadena de anticuerpo seleccionada de entre el grupo constituido por cadena pesada y cadena ligera, en una célula hospedadora adecuada de modo que se forma un heterodímero.

27. Procedimiento según la reivindicación 26, en el que el péptido biológicamente activo incluye una prolina unida de manera covalente a su terminal carboxi.

28. Utilización de una molécula de inmunoglobulina que presenta una o más regiones CDR sustituidas con un péptido mimético de EPO, o en la que el péptido mimético de EPO se inserta en por lo menos una CDR, para la preparación de un medicamento destinado a aumentar la producción de glóbulos rojos.

29. Molécula de inmunoglobulina que comprende una región en la que los restos de aminoácidos correspondientes a por lo menos una parte de una CDR se sustituyen con un péptido biológicamente activo, que es un mimético de eritropoyetina (EPO); o en la que el mimético de EPO está insertado en por lo menos una CDR; en la que el péptido biológicamente activo está flanqueado por una prolina en el terminal carboxi del péptido biológicamente activo.

30. Molécula de inmunoglobulina según la reivindicación 29, en la que por lo menos dos regiones CDR están sustituidas con el péptido biológicamente activo, o en la que el péptido biológicamente activo se inserta en por lo menos dos regiones CDR.

31. Ácido nucleico que codifica una molécula de inmunoglobulina según la reivindicación 29.

32. Vector de expresión que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 31.

33. Célula hospedadora transformada con un vector de expresión según la reivindicación 32.

34. Banco que contiene moléculas de inmunoglobulina variadas en el que los restos de aminoácidos correspondientes a por lo menos una parte de por lo menos una CDR se sustituyen con un péptido mimético que es un mimético de eritropoyetina (EPO), presentando el péptido mimético por lo menos una secuencia flanqueante que ha sido aleatorizada para generar moléculas de inmunoglobulina con secuencias de aminoácidos variables.

35. Banco que contiene moléculas de inmunoglobulina variadas en el que un péptido mimético que es un mimético de EPO se inserta en por lo menos una CDR, presentando el péptido mimético por lo menos una secuencia flanqueante aleatorizada para generar moléculas de inmunoglobulina con secuencias de aminoácidos variables.

36. Molécula de inmunoglobulina según la reivindicación 29, en la que el péptido biológicamente activo está flanqueado tanto en su terminal carboxi como en su terminal amino.

37. Molécula de inmunoglobulina que comprende una región en la que los restos de aminoácidos correspondientes a por lo menos una parte de una CDR se sustituyen con un péptido biológicamente activo que es un mimético de eritropoyetina (EPO), o en la que el péptido biológicamente activo que es un mimético de eritropoyetina se inserta en por lo menos una CDR, en la que el péptido biológicamente activo está flanqueado en su terminal carboxi con una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo constituido por prolina-valina, prolina-ácido aspártico, prolina-isoleucina, serina-asparagina, serina-lisina, serina-glicina, serina-arginina, leucina-histidina, leucina-ácido glutámico, leuci-

ES 2 316 919 T3

na-alanina, leucina-fenilalanina, valina-glutamina, valina-serina, valina-alanina, valina-asparagina, isoleucina-serina, isoleucina-tirosina, asparagina-prolina, asparagina-serina, asparagina-triptófano, asparagina-valina, fenilalanina-valina, treonina-serina, metionina-alanina, arginina-serina, arginina-glicina, arginina-treonina, arginina-leucina, arginina-valina, triptófano-arginina, triptófano-triptófano, alanina-arginina, ácido aspártico-valina, glicina-tirosina, glutamina-arginina, y glicina-lisina.

38. Molécula de inmunoglobulina según la reivindicación 37, en la que el péptido biológicamente activo está flanqueado con una prolina en su terminal amino.

39. Molécula de inmunoglobulina que comprende una región en la que los restos de aminoácidos correspondientes a por lo menos una parte de una CDR se sustituyen con un péptido biológicamente activo que es un mimético de eritropoyetina (EPO), o en la que el mimético de EPO se inserta en por lo menos una CDR, en la que el péptido biológicamente activo está flanqueado en su terminal amino con una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo constituido por triptófano-leucina, valina-valina, glicina-prolina, leucina-prolina, leucina-tirosina, serina-leucina, serina-isoleucina, serina-prolina, treonina-metionina, treonina-tirosina, treonina-prolina, glutamina-treonina, glutamina-ácido glutámico, glutamina-leucina, arginina-metionina, arginina-asparagina, arginina-treonina, arginina-glicina, arginina-serina, lisina-ácido glutámico, lisina-glicina, alanina-histidina, histidina-glicina, histidina-leucina y asparagina-prolina.

40. Molécula de inmunoglobulina según la reivindicación 39, en la que el péptido biológicamente activo está flanqueado con una prolina en su terminal carboxi.

41. Molécula de inmunoglobulina según la reivindicación 5, en la que por lo menos dos CDR se seleccionan de entre el grupo constituido por CDR3 de cadena pesada-CDR2 de cadena pesada, CDR3 de cadena pesada-CDR2 de cadena ligera, CDR2 de cadena pesada-CDR2 de cadena ligera, CDR3 de cadena pesada-CDR2 de cadena pesada-CDR2 de cadena ligera y CDR3 de cadena pesada-CDR1 de cadena ligera.

30

35

40

45

50

55

60

65

pRL4

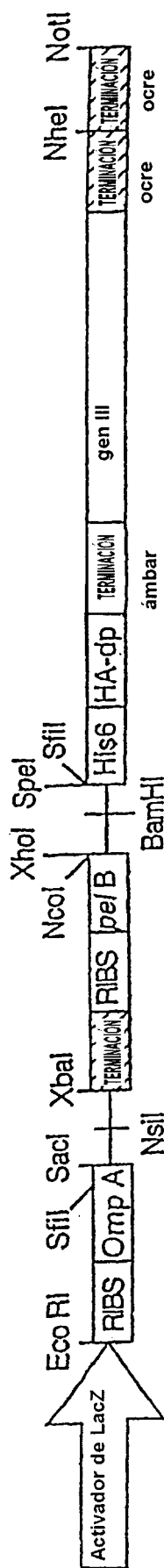


Fig. 1

ES 2 316 919 T3

(SEC.ID. n°: 54)

Secuencia de anticuerpo humano (Secuencia TT)

Cadena pesada: las secuencias de clonación Xho I y Spe I están subrayadas

```

1                               11
gag gtg cag ctg CTC GAG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG TCC TCG GTG AAG
glu val gln leu leu glu gln ser gly ala glu val lys lys pro gly ser ser val lys
21
GTC TCC TGC AGG GCT TCT GGA GGC ACC TTC AAC AAT TAT GCC ATC AGC TGG GTG CGA CAG
val ser cys arg ala ser gly gly thr phe asn asn tyr ala ile ser trp val arg gln
41
GCC CCT GGA CAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA GGG ATC TTC CCT TTC CGT AAT ACA GCA AAG
ala pro gly gln gly leu glu trp met gly gly ile phe pro phe arg asn thr ala lys
61
TAC GCA CAA CAC TTC CAG GGC AGA GTC ACC ATT ACC GCG GAC GAA TCC ACG GGC ACA GCC
tyr ala gln his phe gln gly arg val thr ile thr ala asp glu ser thr gly thr ala
81
TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC ACG GCC ATA TAT TAT TGT GCG AGA GGG
tyr met glu leu ser ser leu arg ser glu asp thr ala ile tyr tyr cys ala arg gly
101
GAT ACG ATT TTT GGA GTG ACC ATG GGA TAC TAC GCT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC
asp thr ile phe gly val thr met gly tyr tyr ala met asp val trp gly gln gly thr
121
ACG GTC ACC GTC TCC GCA GCC TCC ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCA CCC TCC
thr val thr val ser ala ala ser thr lys gly pro ser val phe pro leu ala pro ser
141
TCC AAG AGC ACC TCT GGG GGC ACA GCG GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG GAC TAC TTC CCC
ser lys ser thr ser gly gly thr ala ala leu gly cys leu val lys asp tyr phe pro
161
GAA CCG GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTG ACC AGC GGC GTG CAC ACC TTC CCG
glu pro val thr val ser trp asn ser gly ala leu thr ser gly val his thr phe pro
181
GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC TAC TCC CTC AGC AGC GTG GTG ACC GTG CCC TCC AGC
ala val leu gln ser ser gly leu tyr ser leu ser ser val val thr val pro ser ser
201
AGC TTG GGC ACC CAG ACC TAC ATC TGC AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC AAG GTG
ser leu gly thr gln thr tyr ile cys asn val asn his lys pro ser asn thr lys val
221
GAC AAG AAA GTT GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA act agt
asp lys lys val glu pro lys ser cys asp lys thr ser

```

Fig. 2A

ES 2 316 919 T3

Secuencia de anticuerpo humano (Secuencia TT) (SEC. ID. n°: 55)

Cadena ligera: las secuencias de clonación Sac I y Xba I están subrayadas

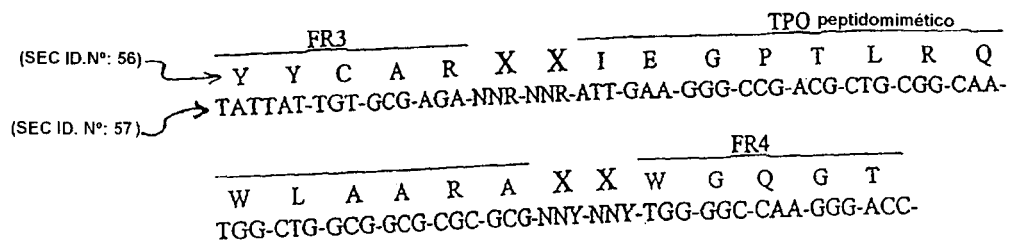
```

1                               11
gag ctc acg cag tct cca ggc acc ctg tct ttg tct cca ggg gaa aga gcc acc ctc tcc
glu leu thr gln ser pro gly thr leu ser leu ser pro gly glu arg ala thr leu ser
21                               31
tgc agg gcc agt cac agt gtt agc agg gcc tac tta gcc tgg tac cag cag aaa cct ggc
cys arg ala ser his ser val ser arg ala tyr leu ala trp tyr gln gln lys pro gly
41                               51
cag gct ccc agg ctc ctc atc. tat ggt aca tcc agc agg gcc act ggc atc cca gac agg
gln ala pro arg leu leu ile tyr gly thr ser ser arg ala thr gly ile pro asp arg
61                               71
ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc aga ctg gag cct gaa
phe ser gly ser gly ser gly thr asp phe thr leu thr ile ser arg leu glu pro glu
81                               91
gat ttt gca gtg tac tac tgt cag cag tat ggt ggc tca ccg tgg ttc ggc caa ggg acC
asp phe ala val tyr tyr cys gln gln tyr gly gly ser pro trp phe gly gln gly thr
101                              111
AAG GTG GAA CTC AAA CGA ACT GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT GAT
lys val glu leu lys arg thr val ala ala pro ser val phe ile phe pro pro ser asp
121                              131
GAG CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC AGA
glu gln leu lys ser gly thr ala ser val val cys leu leu asn asn phe tyr pro arg
141                              151
GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT AAC TCC CAG GAG AGT
glu ala lys val gln trp lys val asp asn ala leu gln ser gly asn ser gln glu ser
161                              171
GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACG CTG AGC
val thr glu gln asp ser lys asp ser thr tyr ser leu ser ser thr leu thr leu ser
181                              191
AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG GGC CTG AGC
lys ala asp tyr glu lys his lys val tyr ala cys glu val thr his gln gly leu ser
201                              211
TTG CCC GTC ACA AAG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT TAG Ttc tag a
leu pro val thr lys ser phe asn arg gly glu cys AMB

```

Fig. 2B

Procedimiento de injerto del péptido en el anticuerpo con secuencias aleatorias que rodean la secuencia del péptido



El peptidomimético de TPO se injertó en la zona CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo de la vacuna antitetánica. El péptido estaba flanqueado en ambos lados de dos aminoácidos aleatorios, mostrados como "X" en la figura.

Fig. 3

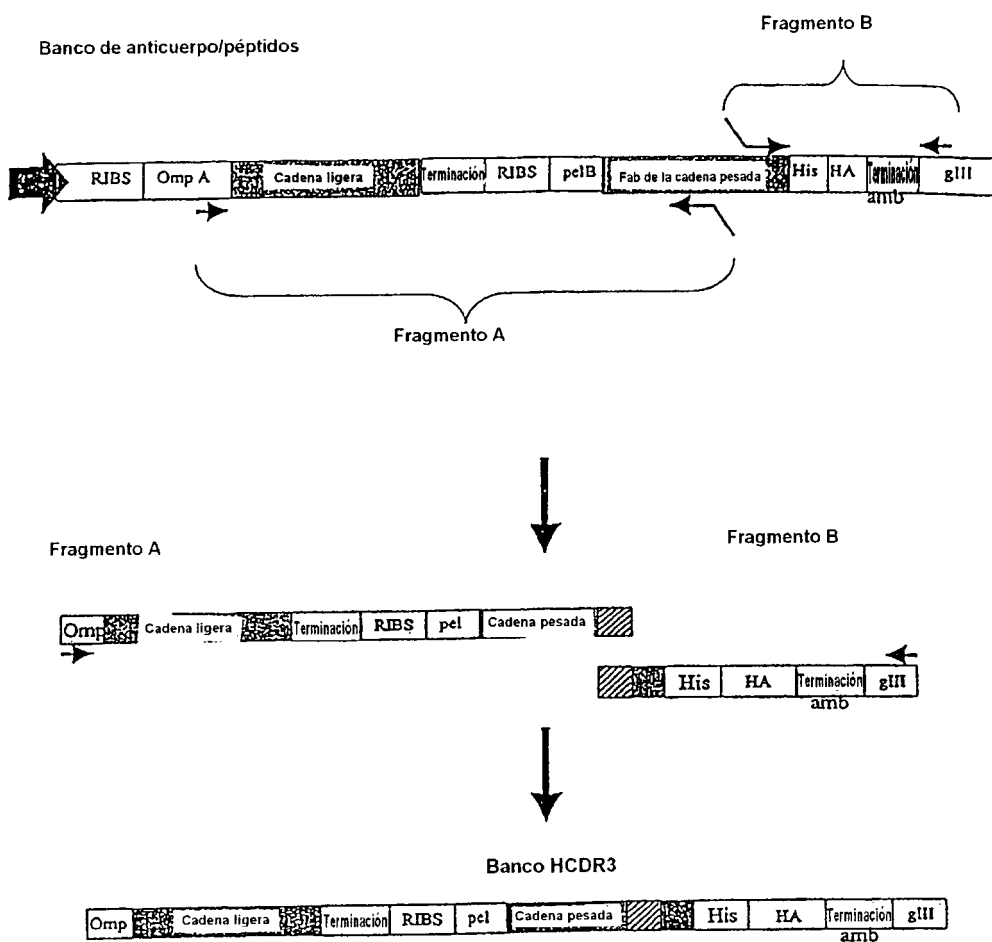


Fig. 4

CLON	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS	SEC. ID. n°
X1a	Pro-Pro-Ile-Glu-Gly-Pro-Thr-Leu-Arg-Gln-Trp-Leu-Ala-Ala-Arg-Ala-Gly-Gly CCG-CCC-ATT-GAA-GGG-CCG-ACG-CTG-CGG-CAA-TGG-CTG-GCG-GCG-GGA-GGC	25 26
X1a-11	Gly-Gly-Ile-Glu-Gly-Pro-Thr-Leu-Arg-Gln-Trp-Leu-Ala-Ala-Arg-Ala-Gly-Gly GGG-GGT-ATT-GAA-GGG-CCG-ACG-CTG-CGG-CAA-TGG-CTG-GCG-GCG-GGC-GGA	27 28
X1a-13	Gly-Gly-Ile-Glu-Gly-Pro-Thr-Leu-Arg-Gln-Trp-Leu-Ala-Ala-Arg-Ala-Gly-Gly GGC-GGT-ATT-GAA-GGG-CCG-ACG-CTG-CGG-CAA-TGG-CTG-GCG-GCG-GGA-GGC	29 30
X1c	Trp-Leu-Ile-Glu-Gly-Pro-Thr-Leu-Arg-Gln-Trp-Leu-Ala-Ala-Arg-Ala-Pro-Val TGG-CTG-ATT-GAA-GGG-CCG-ACG-CTG-CGG-CAA-TGG-CTG-GCG-GCG-CCT-GTC	31 32
X2c	Met-Ile-Ile-Glu-Gly-Pro-Thr-Leu-Arg-Gln-Trp-Leu-Ala-Ala-Arg-Ala-Val-Gly ATG-ATA-ATT-GAA-GGG-CCG-ACG-CTG-CGG-CAA-TGG-CTG-GCG-GCG-GTT-GGC	33 34
X3a	Val-Val-Ile-Glu-Gly-Pro-Thr-Leu-Arg-Gln-Trp-Leu-Ala-Ala-Arg-Ala-Pro-Val GTG-GTA-ATT-GAA-GGG-CCG-ACG-CTG-CGG-CAA-TGG-CTG-GCG-GCG-CCT-GTT	35 36
X3b	Gly-Pro-Ile-Glu-Gly-Pro-Thr-Leu-Arg-Gln-Trp-Leu-Ala-Ala-Arg-Ala-Pro-Asp GGG-CCG-ATT-GAA-GGG-CCG-ACG-CTG-CGG-CAA-TGG-CTG-GCG-GCG-CGC-GAT	37 38
X4b	Leu-Pro-Ile-Glu-Gly-Pro-Thr-Leu-Arg-Gln-Trp-Leu-Ala-Ala-Arg-Ala-Pro-Val TTG-CCA-ATT-GAA-GGG-CCG-ACG-CTG-CGG-CAA-TGG-CTG-GCG-GCG-CCT-GTT	39 40
X4c	Ser-Leu-Ile-Glu-Gly-Pro-Thr-Leu-Arg-Gln-Trp-Leu-Ala-Ala-Arg-Ala-Pro-Ile TCA-CTG-ATT-GAA-GGG-CCG-ACG-CTG-CGG-CAA-TGG-CTG-GCG-GCG-CGC-ATC	41 42
X5a	Thr-Met-Ile-Glu-Gly-Pro-Thr-Leu-Arg-Gln-Trp-Leu-Ala-Ala-Arg-Ala-Pro-Val ACA-ATG-ATT-GAA-GGG-CCG-ACG-CTG-CGG-CAA-TGG-CTG-GCG-GCG-CGC-GTT	43 44
X5c	Thr-Thr-Ile-Glu-Gly-Pro-Thr-Leu-Arg-Gln-Trp-Leu-Ala-Ala-Arg-Ala-Pro-Val ACG-ACA-ATT-GAA-GGG-CCG-ACG-CTG-CGG-CAA-TGG-CTG-GCG-GCG-CCT-GTC	45 46
X7a	Thr-Arg-Ile-Glu-Gly-Pro-Thr-Leu-Arg-Gln-Trp-Leu-Ala-Ala-Arg-Ala-Cys-Ser ACA-CGG-ATT-GAA-GGG-CCG-ACG-CTG-CGG-CAA-TGG-CTG-GCG-GCG-TGC-AGC	47 48
X7b	no peptide deletion mutant	
X7c	Gln-Thr-Ile-Glu-Gly-Pro-Thr-Leu-Arg-Gln-Trp-Leu-Ala-Ala-Arg-Ala-Pro-Asp CAG-ACA-ATT-GAA-GGG-CCG-ACG-CTG-CGG-CAA-TGG-CTG-GCG-GCG-CCT-CAC	49 50

Fig. 5

(SEC ID n°: 60)

GGGAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAATTCGCGTTAAATTTTTGTAA
 ATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCATTATAATC
 AAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCAGTTTGGAAACAAGAGT
 CCACTATTAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATC
 AGGGCGATGGCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGGTC
 GAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCCTAAAGGGAGCCCCCGATTAG
 GCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAAGAAAGC
 GAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGT
 AACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCAGGTGGC
 ACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACA
 TTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAAT
 ATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCCGCCCTATTCCC
 TTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGTCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAA
 GTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGG
 ATCTCAACAGCGGTAAGATCCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAAGTTTTCCA
 ATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCCTATTGA
 CGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTG
 GTTGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTACGGATGGCATGGACAGTAA
 GAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTT
 ACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAAC
 ATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAG
 CCATACCAAACGACGAGCTGTACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAAC
 GTTGCCAAACCTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCCGGCAACAAT
 TAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGC
 CCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGT
 CTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCCTATCGT
 AGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACA
 GATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCAATTGGTAAGTGTACAGACCAA
 GTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTCATTTTTTAAATTTAAAAGG
 ATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCCTAACGTGA
 GTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTT
 GAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAAAACCACCG
 CTACCAGCGGTGGTTTTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAA
 GGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAACTGTCTTCTAGTGTAG
 CCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAATCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGC
 TCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTA
 CCGGGTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGA'AAAGGCGCAGCGGTCCGGCTG
 AACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGA

Fig. 6A

ES 2 316 919 T3

ACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGG
AGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGC
ACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACCGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGT
TTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGG
AGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACCGCGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTG
CTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCCTGATTTCTGTGGATAA
CCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACC
GAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAA
CCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCAGACAGGTT
TCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTC
ACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTG
TGGAATTGTGAGCGGATAACAATTGAATTCAGGAGGAATTTAAAATGAAAA
GACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTTTCGCTACCGTGGCCCAG
GCGGCCGAGCTCGGCCATGGCTGGTTGGGCAGCGAGTAATAACAATCCAGCG
GCTGCCGTAGGCAATAGGTATTTCAATTGACTGTCTCCTTGGCGACTAGCTA
GTTTAGAATTCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCC
GCTCACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGG
GGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGC
TTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGTTACTAATGATGGTGATGGTGATGGCTAG
TTTTGTACAAGATTTGGGCTCAACTTICTTGTCACCTTGGTGTGCTGGGCT
TGTGATTCACGTTCAGATGTAGGTCTGGGTGCCCAAGCTGCTGGAGGGCAG
GGTCACCACGCTGCTGAgGGAGTAGAGTCTGAGGACTGTAGGACAGCCGGG
AAGGTGTGCACGCGCTGGTCAgGGCGCTGAgTTCCACGACACcGTGCGCCGG
TTCgGGGAAGTAGTCCTTGACCAGGCAGCCAGGGCCGCTGTGCCCCAGAG
GTGCTCTTGAGAGAGGGTGCCAGGGGGAAGACCGATGGGCCCTTGGTGGAG
GCTGCGGAGACGGTGACCGTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAG
GCTCCTCATCTATGGTACATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCC
AGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGC
CTGAAGATTTTGCAGTGTACTACTGTCAGCAGTATGGTGGCTCACCGTGGTTC
GGCCAAGGGACCAAGGTGGAACCTCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCT
TCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTG
TGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGG
ATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAG
CAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGA
CTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCacccatcagggctgagttgcccgtcac
aaagagcttcaacggaggagagtgttaatTCTAGATAATTAATTAGGAGGAATTTAAAATGAA
ATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCTGCCCAACCAG
CCATGGCCGAGGTGCAGCTGCTCGAGATGAGCGATAAAATFATTACCTGAC
TGACGACAGTTTTGACACGGATGTACTCAAAGCGGACGGGGGCATCCTCGTC
GATTTCTGGGCAGAGTGGTGCGGTCCGTGCAAAATGATCGCCCCGATTTCTGG
ATGAAATCGCTGACGAATATCAGGGCAAACCTGACCGTTGCAAAACTGAACAT
CGATCAAAACCCTGGCACTGCGCCGAAATATGGCATCCGTGGTATCCCCACT
CTGCTGCTGTTCAAAAACGGTGAAGTGGCGGCAACCAAAGTGGGTGCACTTG
TCTAAAGGTCAGTTGAAAGAGTTCCTCGACGCTAACCTGGCGTACCCGTACG
ACGTTCCGGACTACGGTTCTACTAGTccgaaaccgtctacccaccggctcttctgaggggccgc
atcgcccgtctggaggaaaaagtgaaccctgaaagctcagaactccgagctggcgtccactgcuacatgctgcgcaac

Fig. 6B

ES 2 316 919 T3

agtggcacagctgaaacagaaagtatgaaccatggcggllgtgctagtGGCCAGGCCGGCCAGCACCAT
CACCATCACCATGGCGCATACCCGTACGACGTTCCGGACTACGCTTCTTAGG
AGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGCTCTGAGGGAGG
CGGTTCCGGTGGTGGCTCTGGTTCCGGTGATTTTGATTATGAAAAGATGGCAA
ACGCTAATAAGGGGGCTATGACCGAAAATGCCGATGAAAACGCGCTACAGTC
TGACGCTAAAGGCAAACCTTGATTCTGTCGCTACTGATTACCGTGCTGCTATCG
ATGGTTTCATTGGTGACGTTTCCGGCCTTGCTAATGGTAATGGTGCTACTGGT
GATTTTGCTGGCTCTAATCCCAAATGGCTCAAGTCGGTGACGGTGATAATTC
ACCTTTAATGAATAATTTCCGTCAATATTTACCTTCCCTCCCTCAATCGGTTGA
ATGTCGCCCTTTTGTCTTTAGCGCTGGTAAACCATATGAATTTTCTATTGATTG
TGACAAAATAAACTTATTCCGTGGTGTCTTTGCGTTTCTTTTATATGTTGCCAC
CTTTATGTATGTATTTTCTACGTTTGCTAACATACTGCGTAATAAGGAGTCTTA
AGCTAGCTAATTAATTTAAGCGGCCGCAGATCT

Fig. 6C

pRL8

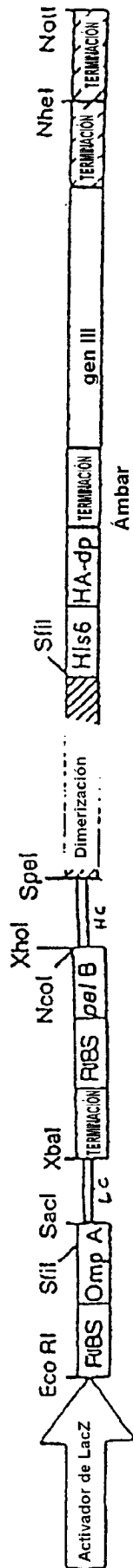


Fig. 7

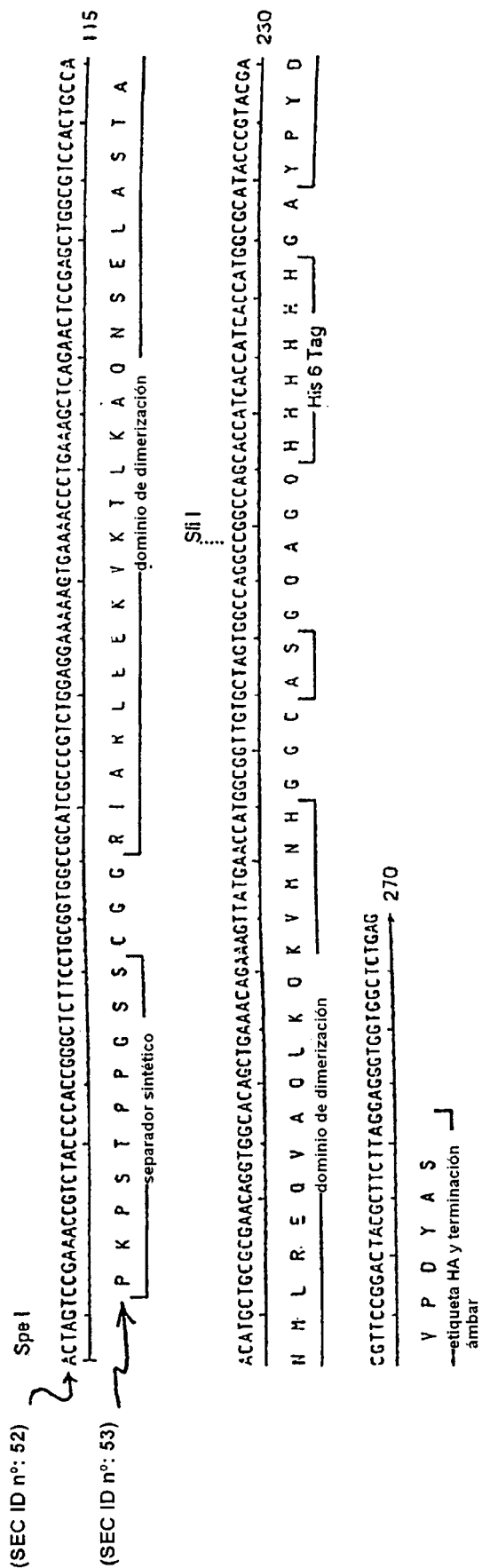


Fig. 8

ES 2 316 919 T3

Clones positivos a TPO

nnk nnk

nnk nnk

1 2 IEGPTLRQWLAARA 3 4

	Muestra	nnk nnk		nnk nnk		Aminoácidos		Aminoácidos	
		1	2	3	4	1	2	3	4
HC CDR3	X1c	tgg	ctg	cct	gtc	Trp	Leu	Pro	Val
	X3a	gtg	gta	cct	gtt	Val	Val	Pro	Val
	X3b	ggg	ccg	ccc	gat	Gly	Pro	Pro	Asp
	X4b	ttg	cca	cct	gtt	Leu	Pro	Pro	Val
	X4c	tca	ctg	ccc	atc	Ser	Leu	Pro	Ile
	X5a	aca	atg	ccc	gtt	Thr	Met	Pro	Val
	X5c	acg	aca	cct	gtc	Trp	Leu	Pro	Val
	X7c	cag	aca	cct	cac	Gln	Thr	Pro	Asp
HC CDR2	24	ctt	tat	tct	aat	Leu	Tyr	Ser	Asn
	39	act	tac	ttg	cat	Thr	Tyr	Leu	His
	3	agg	atg	ctc	gag	Arg	Met	Leu	Glu
	7	aag	gaa	tct	aag	Lys	Glu	Ser	Lys
	8	gcg	cat	gtg	cag	Ala	His	Val	Gln
	10	cag	gag	att	agt	Gln	Glu	Ile	Ser
	11	cgg	aat	aat	ccg	Arg	Asn	Asn	Pro
	19	cag	cta	aat	tct	Gln	Leu	Asn	Ser
	25	agt	att	ttt	gtc	Ser	Ile	Phe	Val
	28	ggg	ccc	act	agt	Gly	Pro	Thr	Ser
LC CDR1	10	aag	ggt	gtt	agt	Lys	Gly	Val	Ser
	11	cat	ggg	gtg	gct	His	Gly	Val	Ala
	12a	cgt	acg	atg	gct	Arg	Thr	Met	Ala
	12b	cgt	ggt	gtt	aat	Arg	Gly	Val	Asn
	14	cgt	tcg	ctt	gcg	Arg	Ser	Leu	Ala
	16	cgg	ggt	gtt	gcg	Arg	Gly	Val	Ala
	18	agg	acg	gtg	tct	Arg	Thr	Val	Ser
	47	aag	ggg	gtg	gcg	Lys	Gly	Val	Ala
LC CDR2	1	aat	ccg	agg	ggt	Asn	Pro	Arg	Gly
	2	tcg	cct	cgg	agt	Ser	Pro	Arg	Ser
	3	tcg	cct	cgt	acg	Ser	Pro	Arg	Thr
	4	tcg	cct	tgg	cgt	Ser	Pro	Trp	Arg
	5	act	ccg	aat	tgg	Thr	Pro	Asn	Trp
	6	aat	cct	gcg	agg	Asn	Pro	Ala	Arg
	7	aat	ccg	tcg	ggg	Asn	Pro	Ser	Gly
	9	aat	cct	tat	tag	Asn	Pro	Tyr	Stop
	10	aat	ccg	cgg	tct	Asn	Pro	Arg	Ser
	11	aat	ccg	gat	gtg	Asn	Pro	Asp	Val
	12	tcg	ccg	tcg	ccg	Ser	Pro	Ser	Arg
	13	aat	cct	ctg	ttt	Asn	Pro	Leu	Phe
	14	aat	ctt	ggg	tat	Asn	Pro	Gly	Tyr
	15	aat	cct	att	agt	Asn	Pro	Ile	Ser
	16	aat	cct	cag	ccg	Asn	Pro	Gln	Arg
18	aat	ccg	cgg	acg	Asn	Pro	Arg	Thr	
19	aat	ccg	cgt	ggg	Asn	Pro	Arg	Gly	
20	cat	ttg	aga	ctg	His	Leu	Arg	Leu	
21	aag	tag	att	tat	Lys	Stop	Ile	Tyr	
23	aat	cct	ggt	aag	Asn	Pro	Gly	Lys	
24	aat	cct	cgt	ggg	Asn	Pro	Arg	Gly	
26	aat	cct	aat	gtg	Asn	Pro	Asn	Val	
27	tct	ccg	cgg	ggt	Ser	Pro	Arg	Val	
29	acg	cct	cgg	ggt	Thr	Pro	Arg	Gly	
	30	cct	tag	tgg	tgg	Pro	Stop	Trp	Trp

FIG. 9

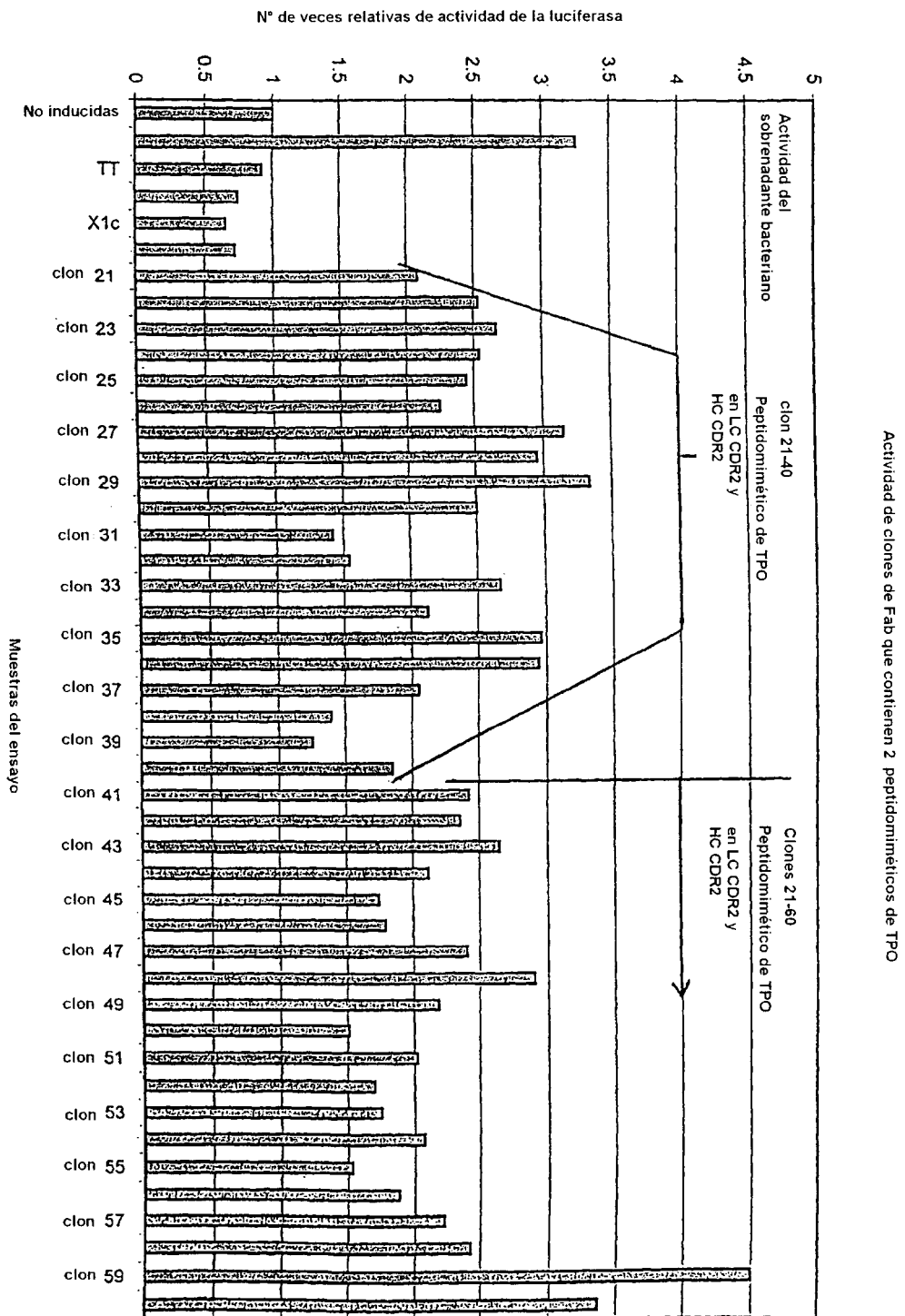


FIGURA 10

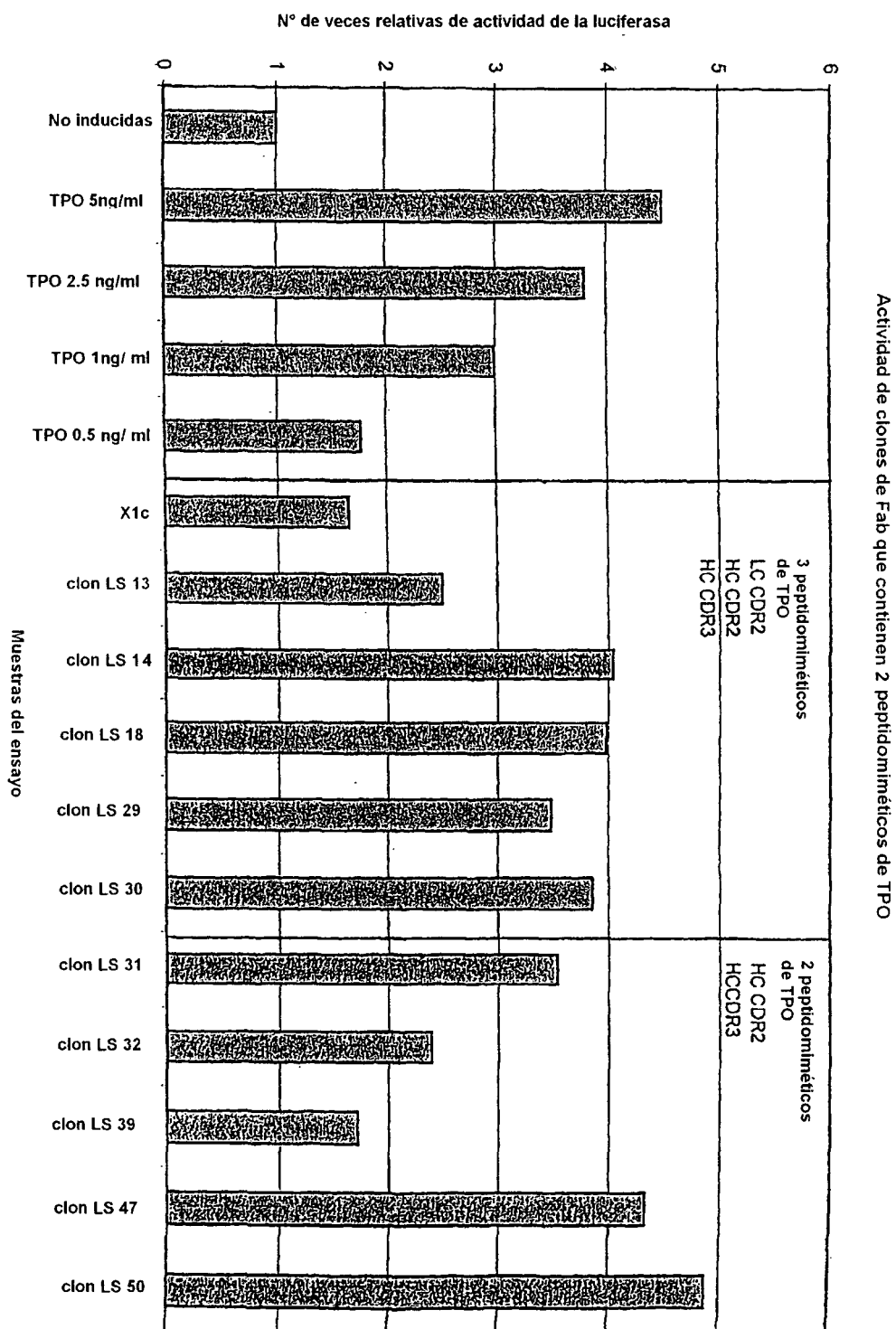


FIGURA 11

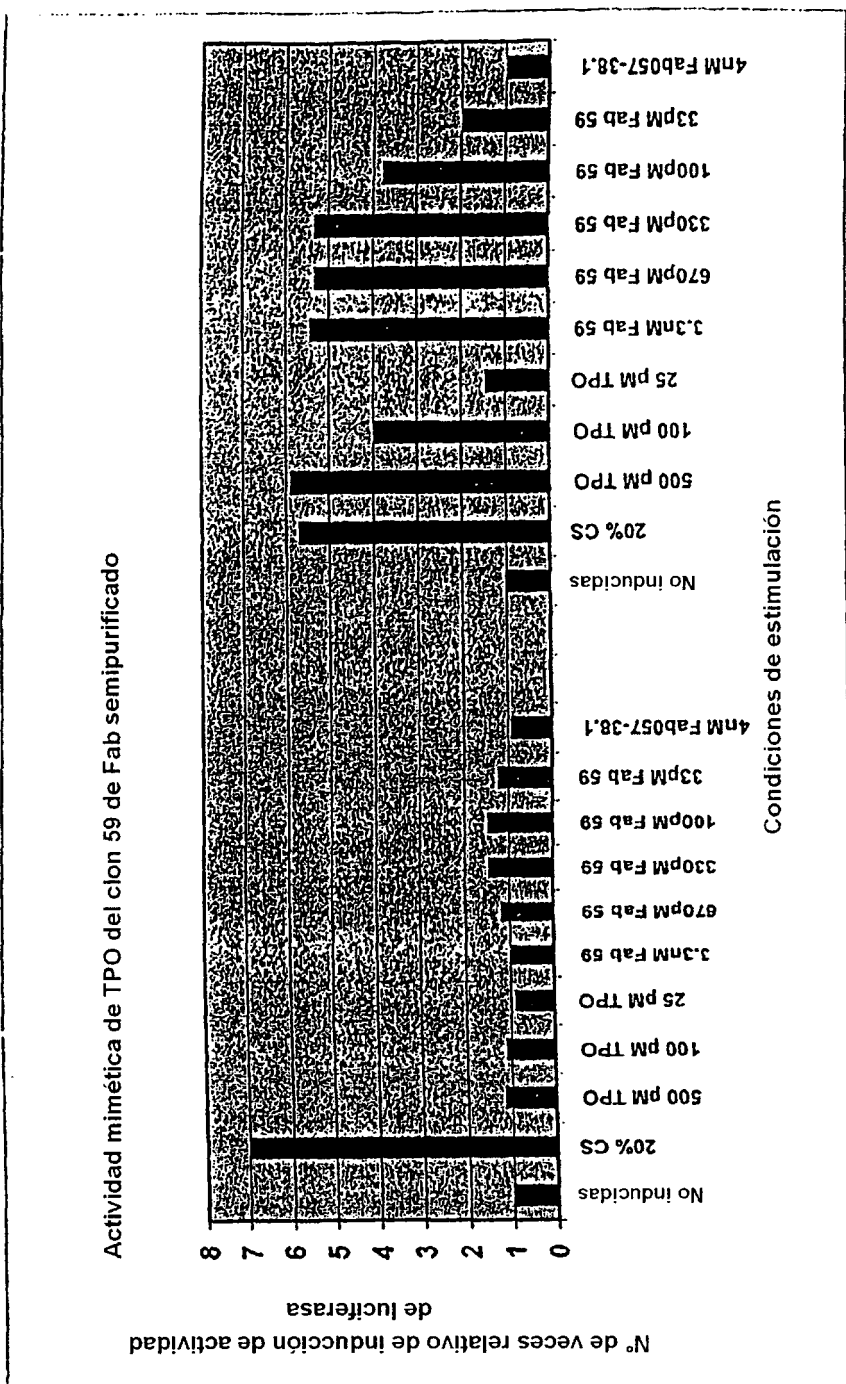


Fig. 12

(SEC ID n°: 67)

5G1.1 – Secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada de TPO (negrita indica mimético de TPO)

MKIWSWVILFLLSVTAGVHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFSNYWIQW
VRQAPGQGLEWMGEILPGSGSTEYTENFKDRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED
TAVYYCARLPIEGPTLRQWLAARAPVWGQGLVTVSSASTKGPSVFLAPCSR
STSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
PSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVCPAPPVAGPSVFLFPKP
KDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQ
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRL
TVDKSRWQEGNVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSLGK.

(SEC ID n°: 68)

5G1.1 – Secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada de TPO (negrita indica mimético de TPO)

ATGAAGTGGAGCTGGGTTATTCCTCCTCCTGTCAGTAACTGCCGGCGTCCA
CTCCCAAGTCCAAGTGGTCAATCCGGCGCCGAGGTCAAGAAGCCAGGGGCC
TCAGTCAAAGTGTCTGTAAAGCTAGCGGCTATATTTTTCTAATTATTGGAT
TCAATGGGTGCGTCAGGCCCGGGCAGGGCCTGGAATGGATGGGTGAGATC
TTACCGGGCTCTGGTAGCACCGAATATACCGAAAATTTAAAGACCGTGTA
CTATGACGCGTGACACTTCGACTAGTACAGTATACATGGAGCTCTCCAGCCTG
CGATCGGAGGACACGGCCGTCTATTATTGCGCGCGTTTGCCAATTGAAGGG
CCGACCGTGCAGCAATGGCTGGCGGCGCGCGCCTGTTTGGGGTCAAG
GAACCCTGGTCACTGTCTCGAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCC
CTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCC
TGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGCGC
CCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGTGTCTTACAGTCTCAGGACTCT
ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGAC
CTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAC
AGTTGAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGCCACCGTGCCAGCACCACTGTG
GCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCCTCATGAT
CTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGAC
CCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCA
AGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAATTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGC
TCCTACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAA
GGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCC
AAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCAGGAG
GAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACC
CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACT
ACAAGACCAGCCTCCCGTGTGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGC
AGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCT
CCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGGCCTCTCCCT
GTCTCTGGGTAAATGA

Fig. 13A

ES 2 316 919 T3

(SEC ID nº: 69)

5G1.1 – Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera

→ *MDMRVPAOLLGLLLWLRGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCGASENIYGALN*
WYQQKPGKAPKLLIYGATNLADGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQ
NVLNTPPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGEC.

(SEC ID nº: 70)

5G1.1 – Secuencia de ácido nucleico de la cadena ligera

→ ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTACTCTGGCTCCG
AGGTGCCAGATGTGATATCCAGATGACCCAGTCCCCGTCCTCCCTGTCCGCCT
CTGTGGGGGATAGGGTCAACATCACCTGCGGCGCCAGCGAAAACATCTATGG
CGCGCTGAACTGGTATCAACAGAAAACCCGGGAAAGCTCCGAAGCTTCTGATT
TACGGTGCGACGAACCTGGCAGATGGAGTCCCTTCTCGCTTCTCTGGATCCGG
CTCCGGAACGGATTTCACTCTGACCATCAGCAGTCTGCAGCCTGAAGACTTC
GCTACGTATTACTGTCAGAACGTTTTAAATACTCCGTTGACTTTCGGACAGGG
TACCAAGGTGAAATAAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCC
CGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTGTGTGCCTGCTG
AATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCC
TCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACA
GCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGA
AACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCCT
CACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

Nota: Cursiva indica secuencia principal

Fig. 13B

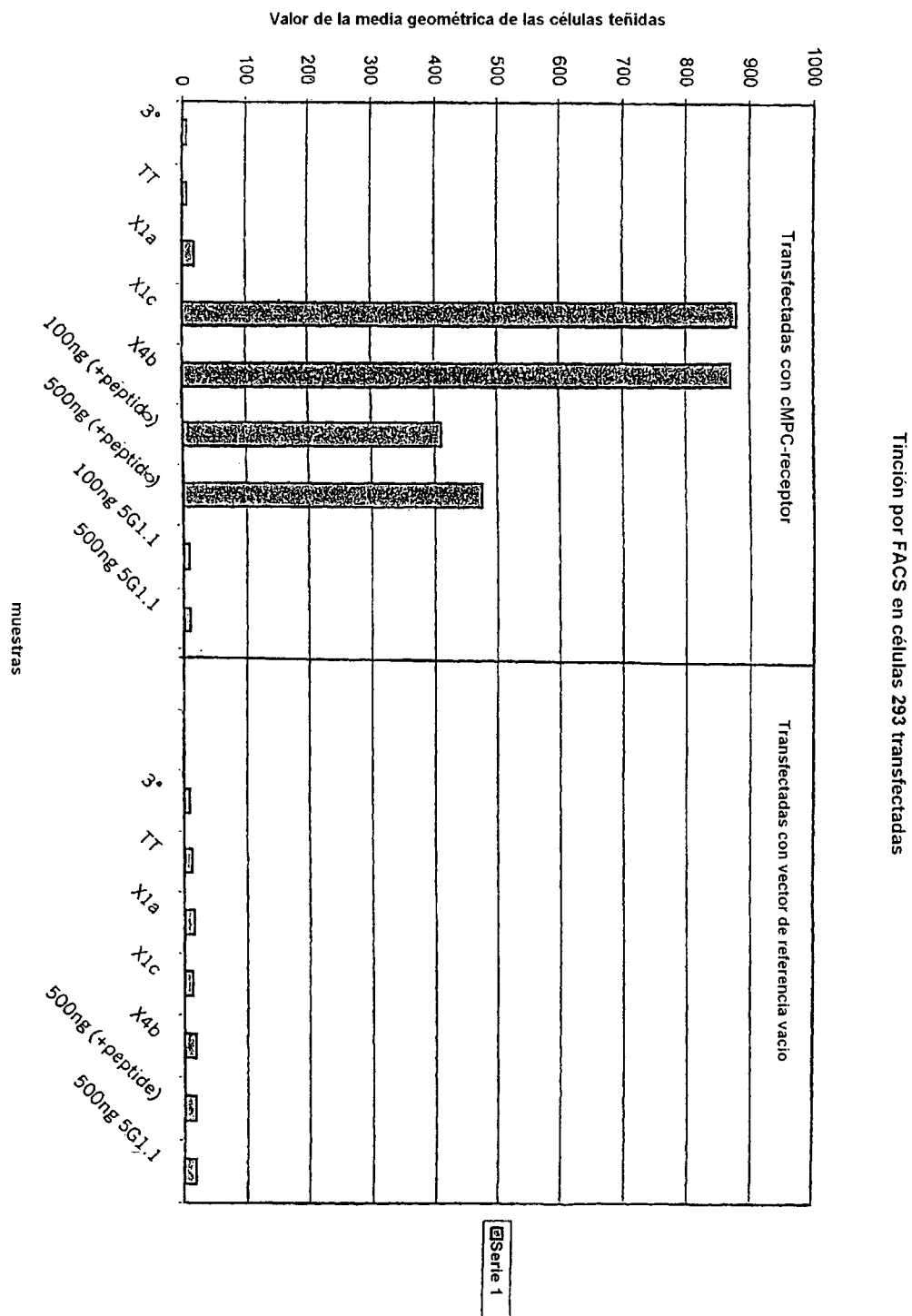


FIGURA 14

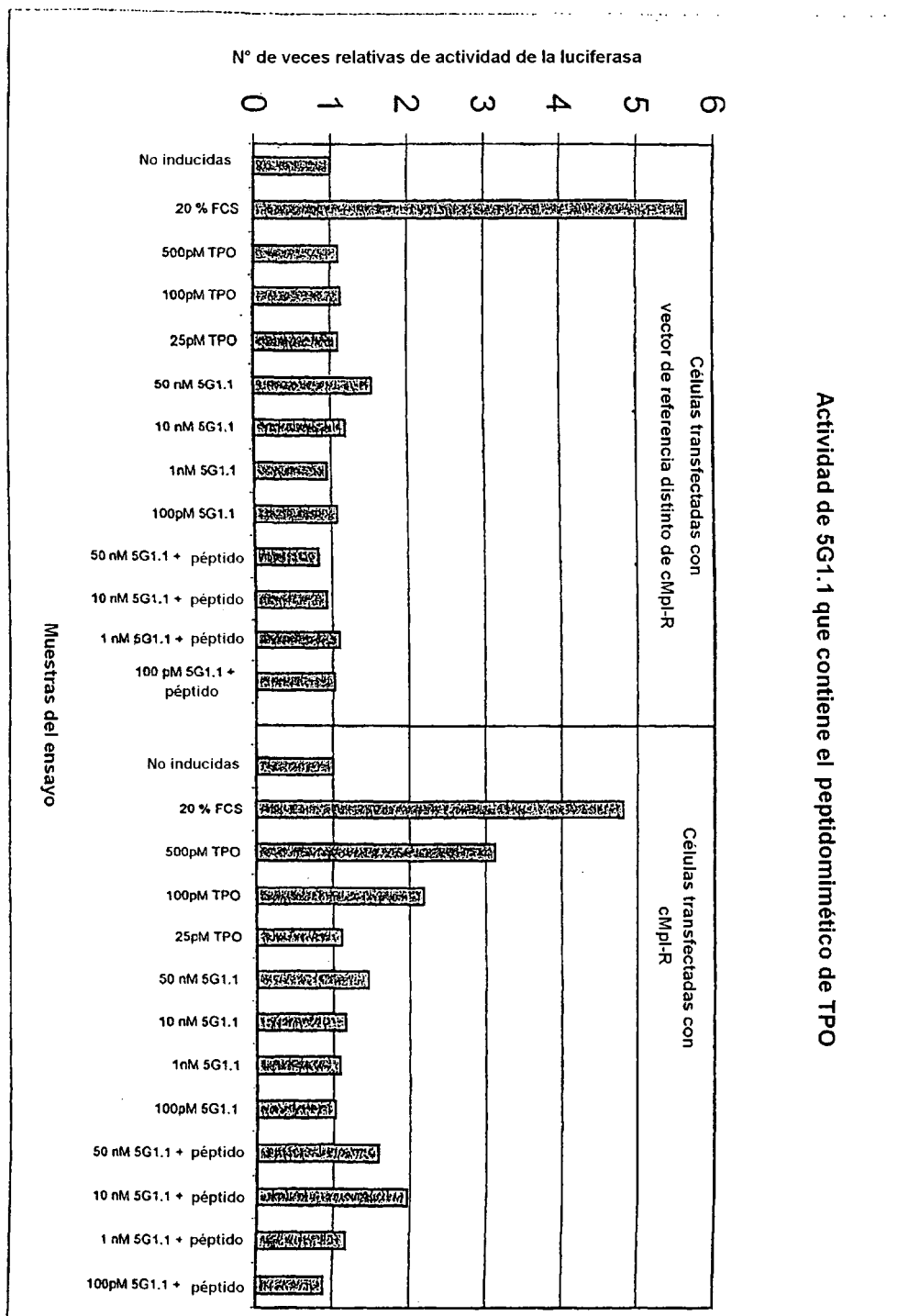


FIGURA 15

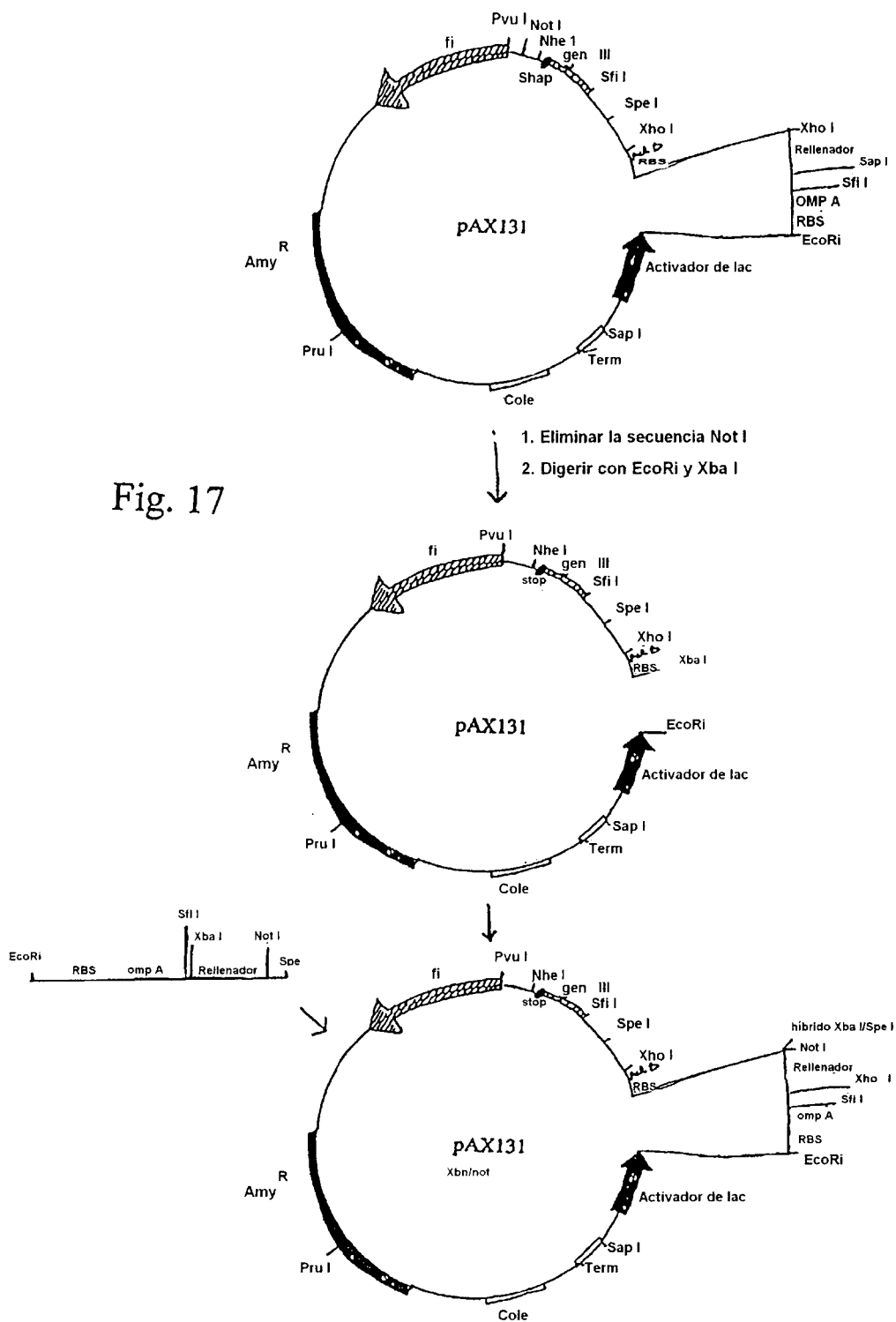


Fig. 17

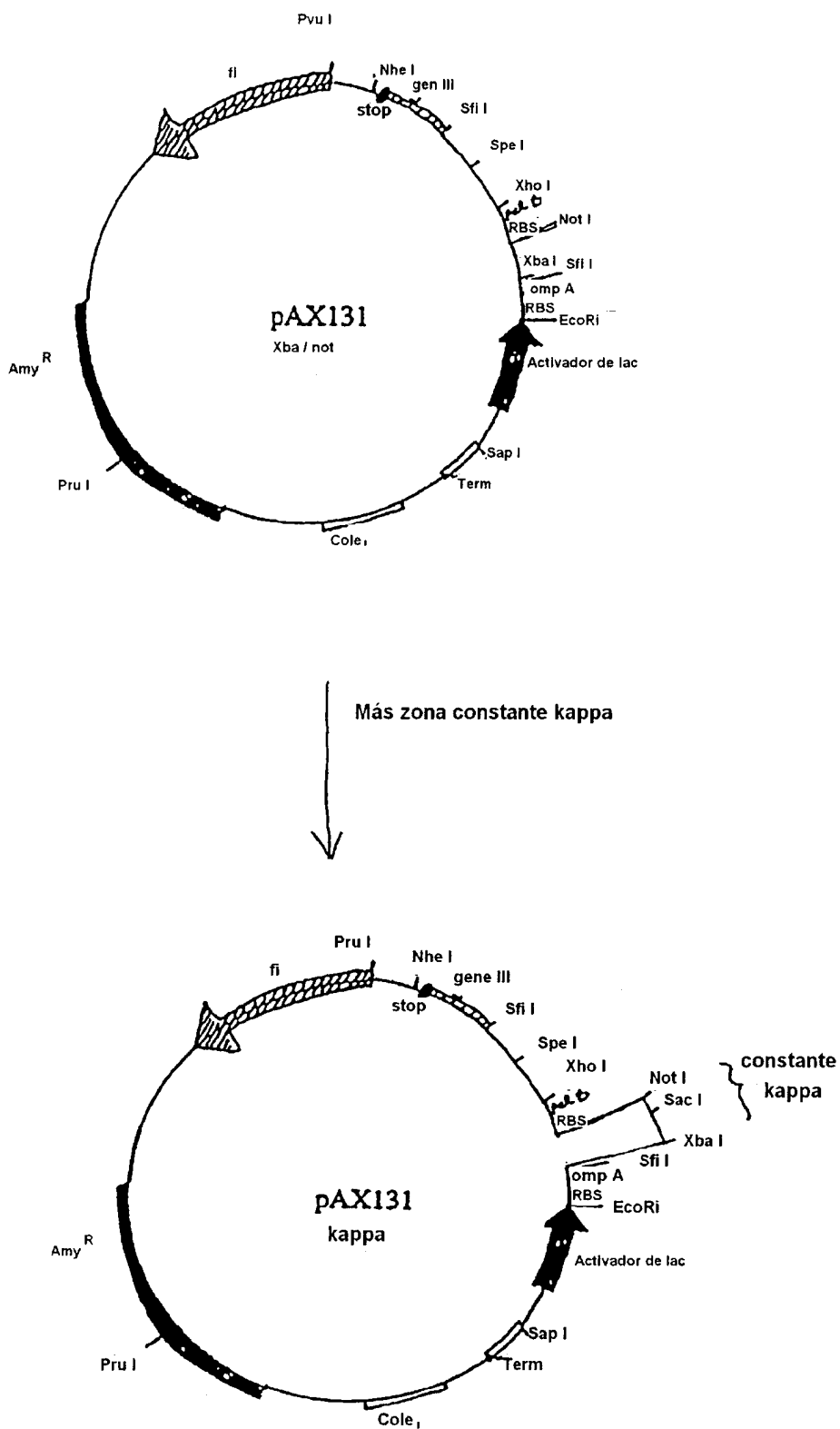


Fig. 18

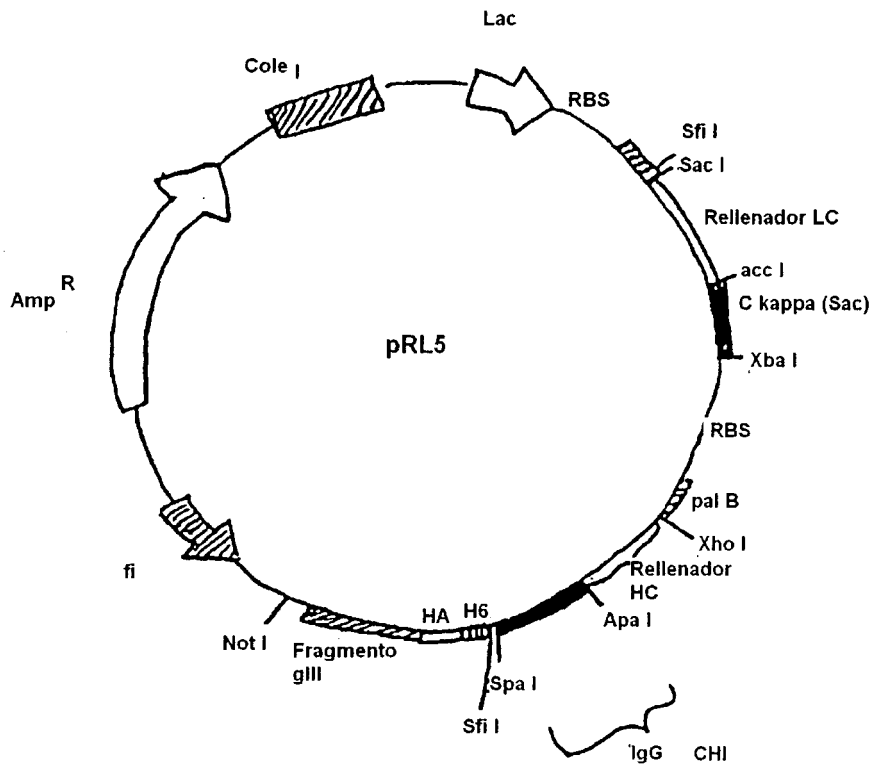


Fig. 19

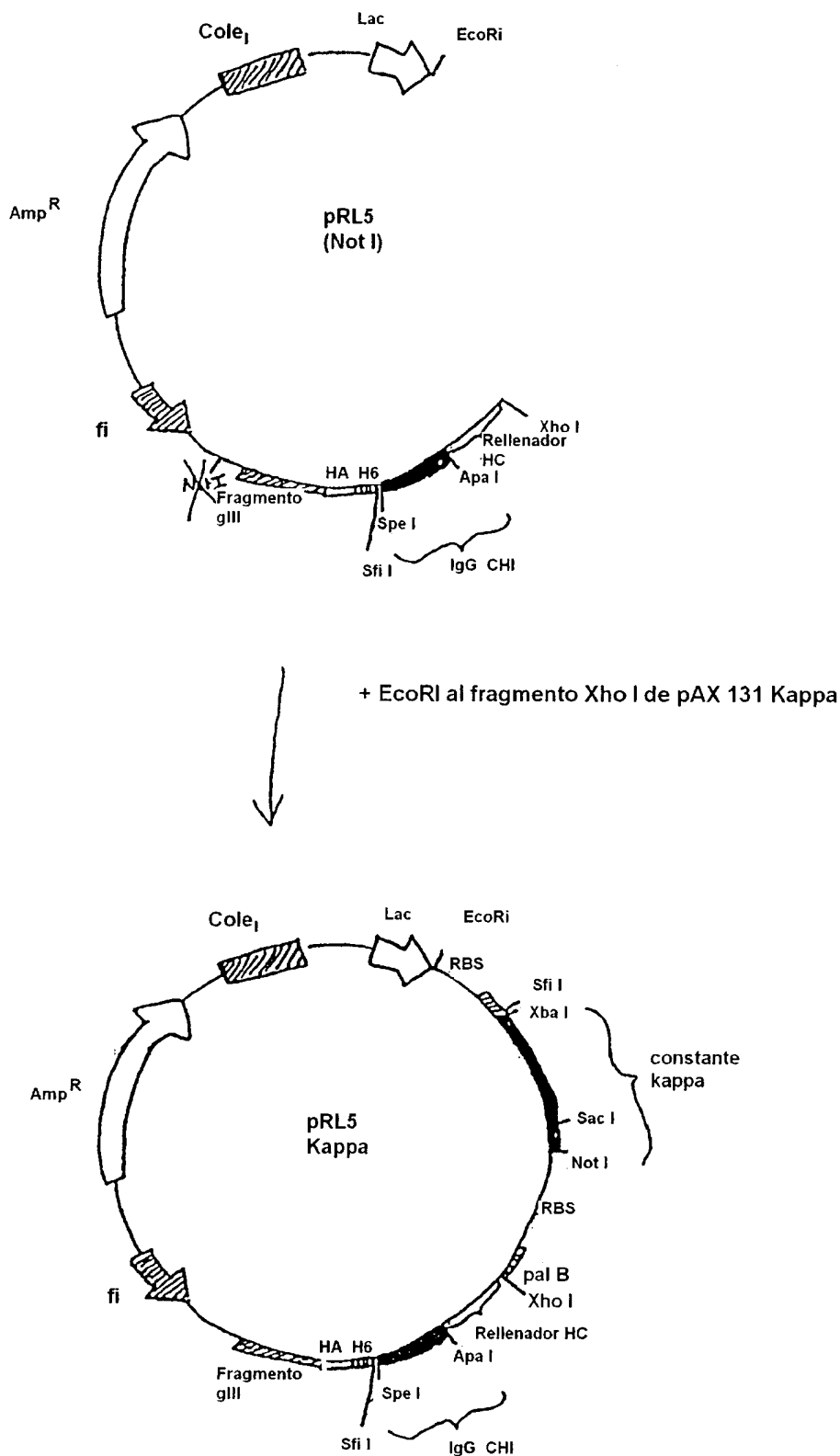


Fig. 20

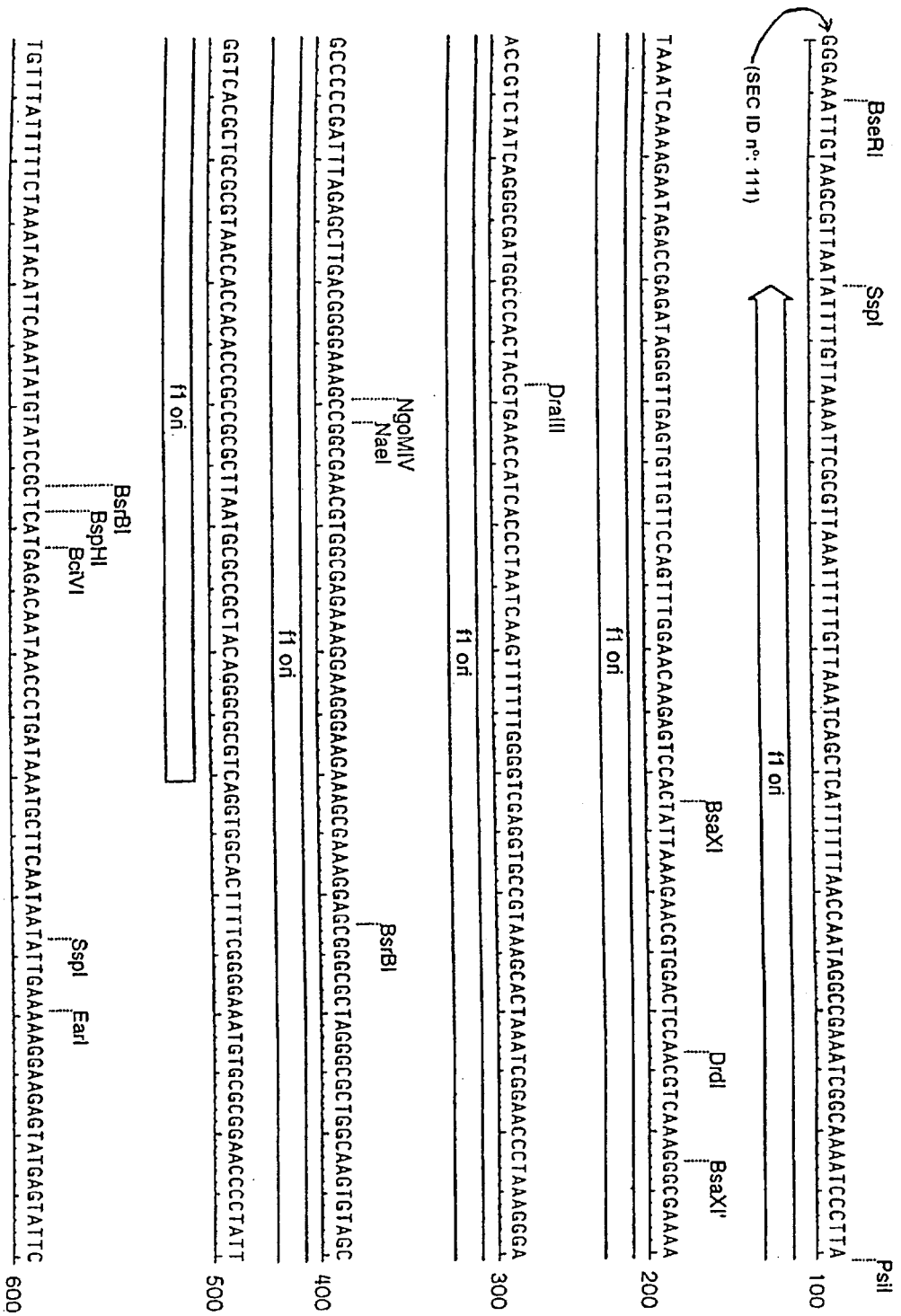


Fig. 21A

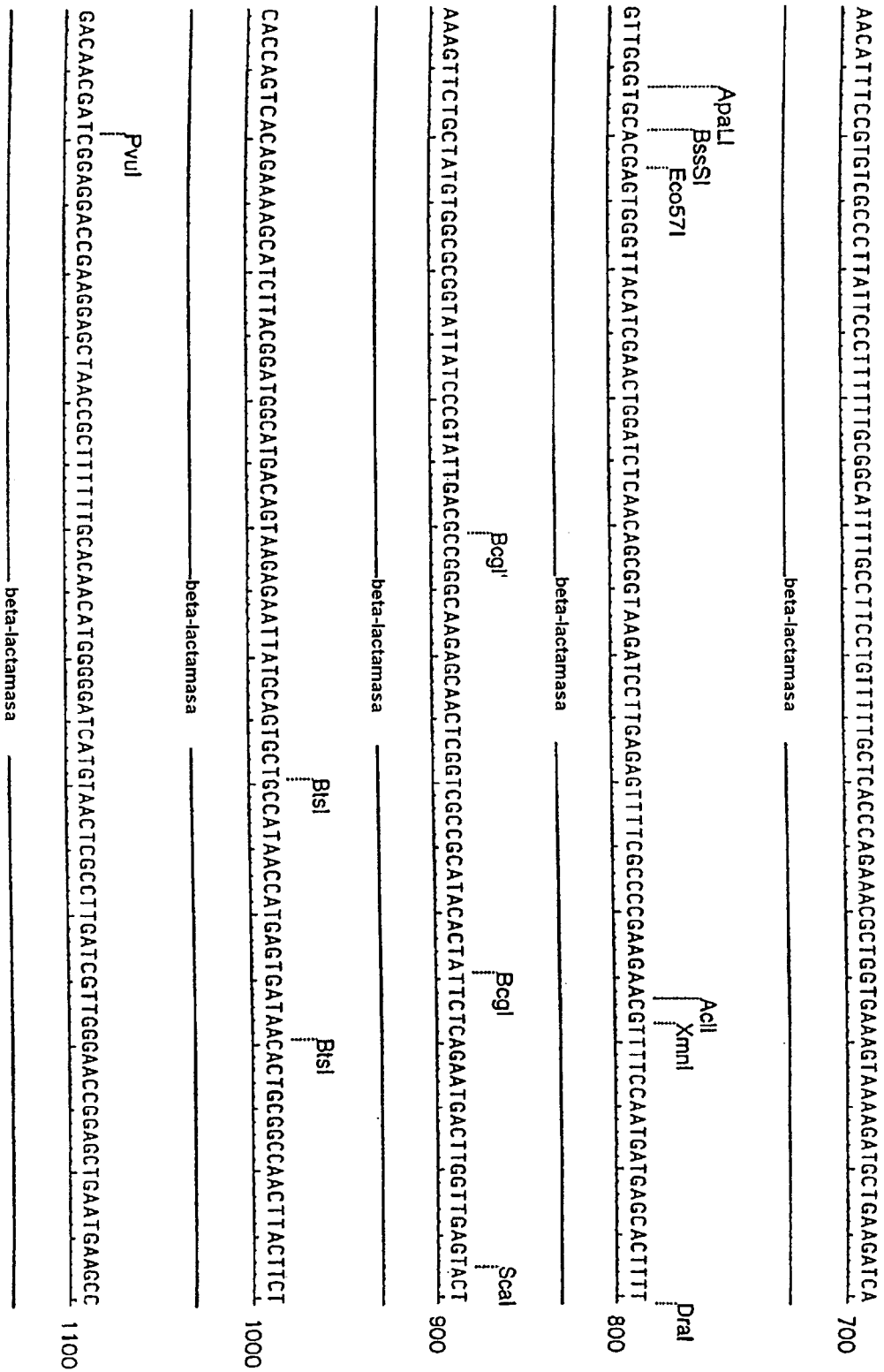


Fig. 21B

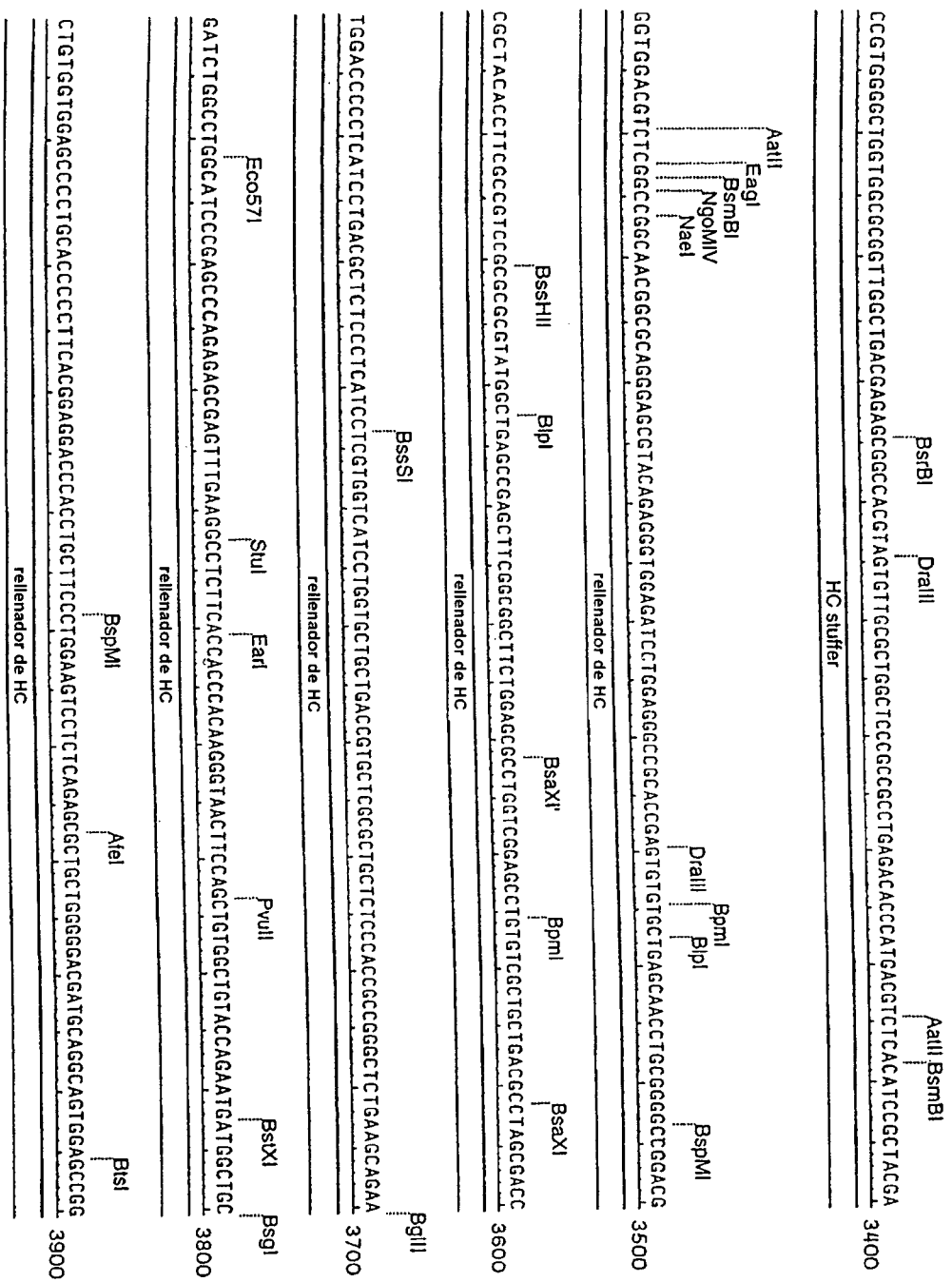


Fig. 21C

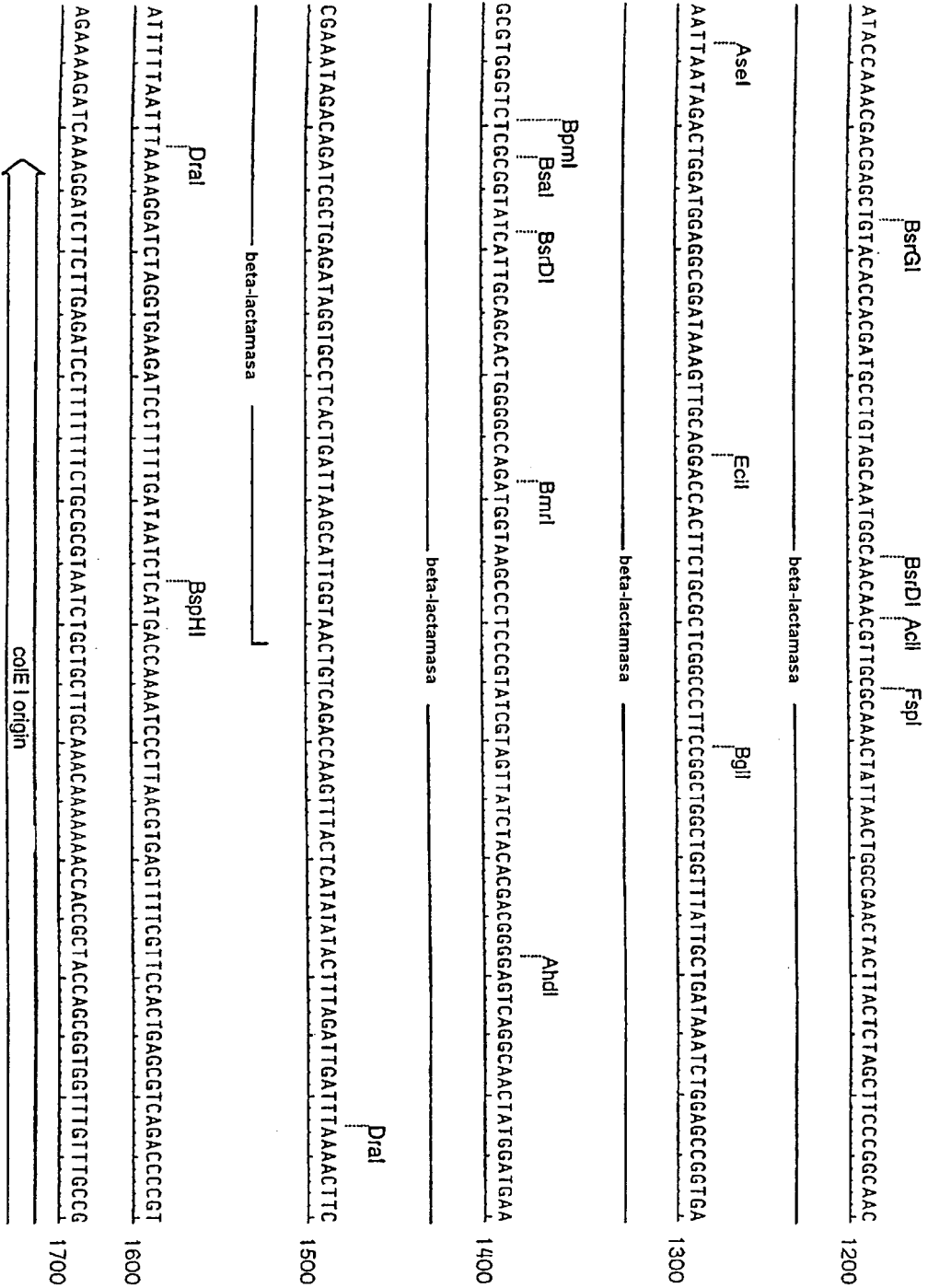


Fig. 21D

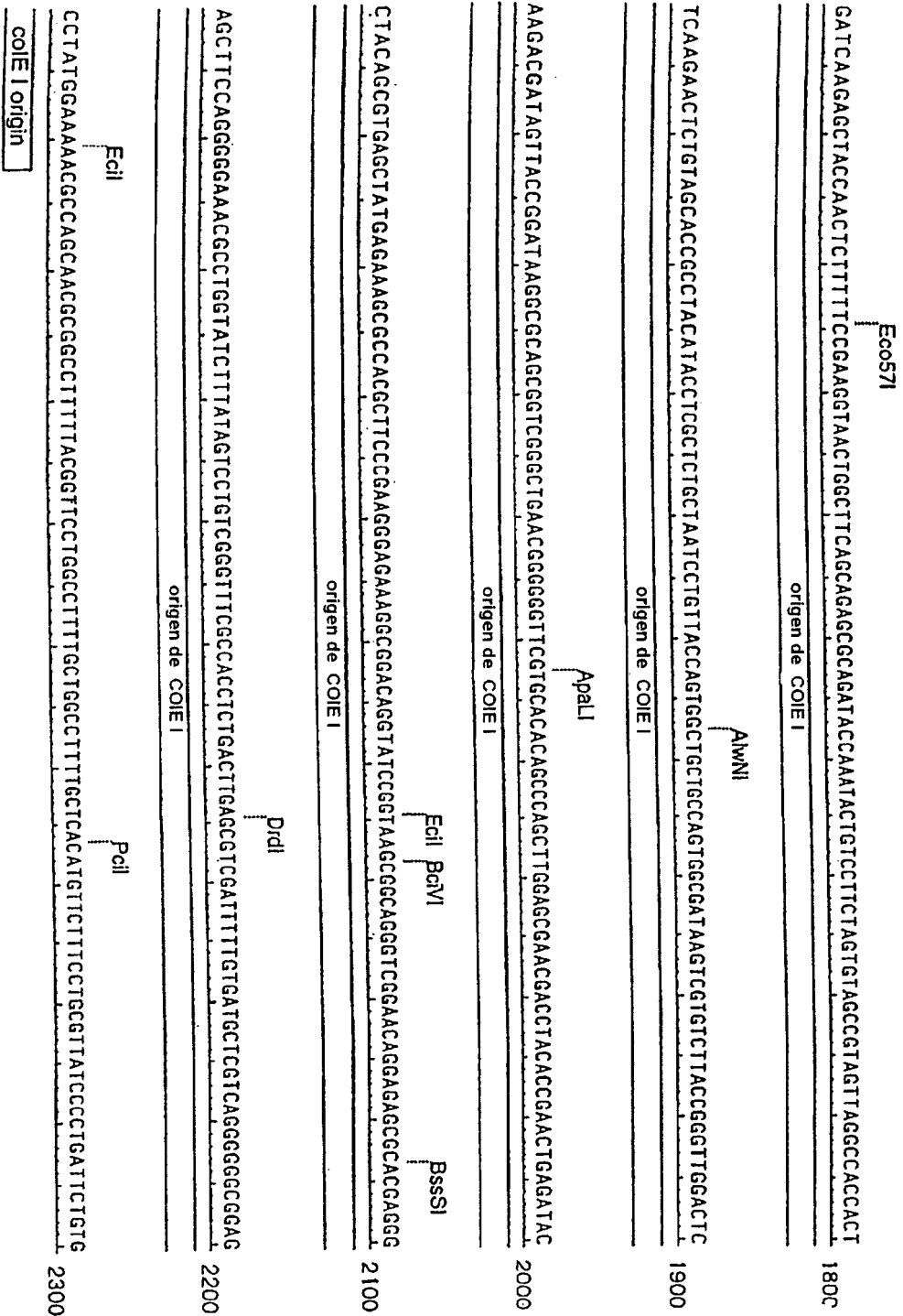


Fig. 21E

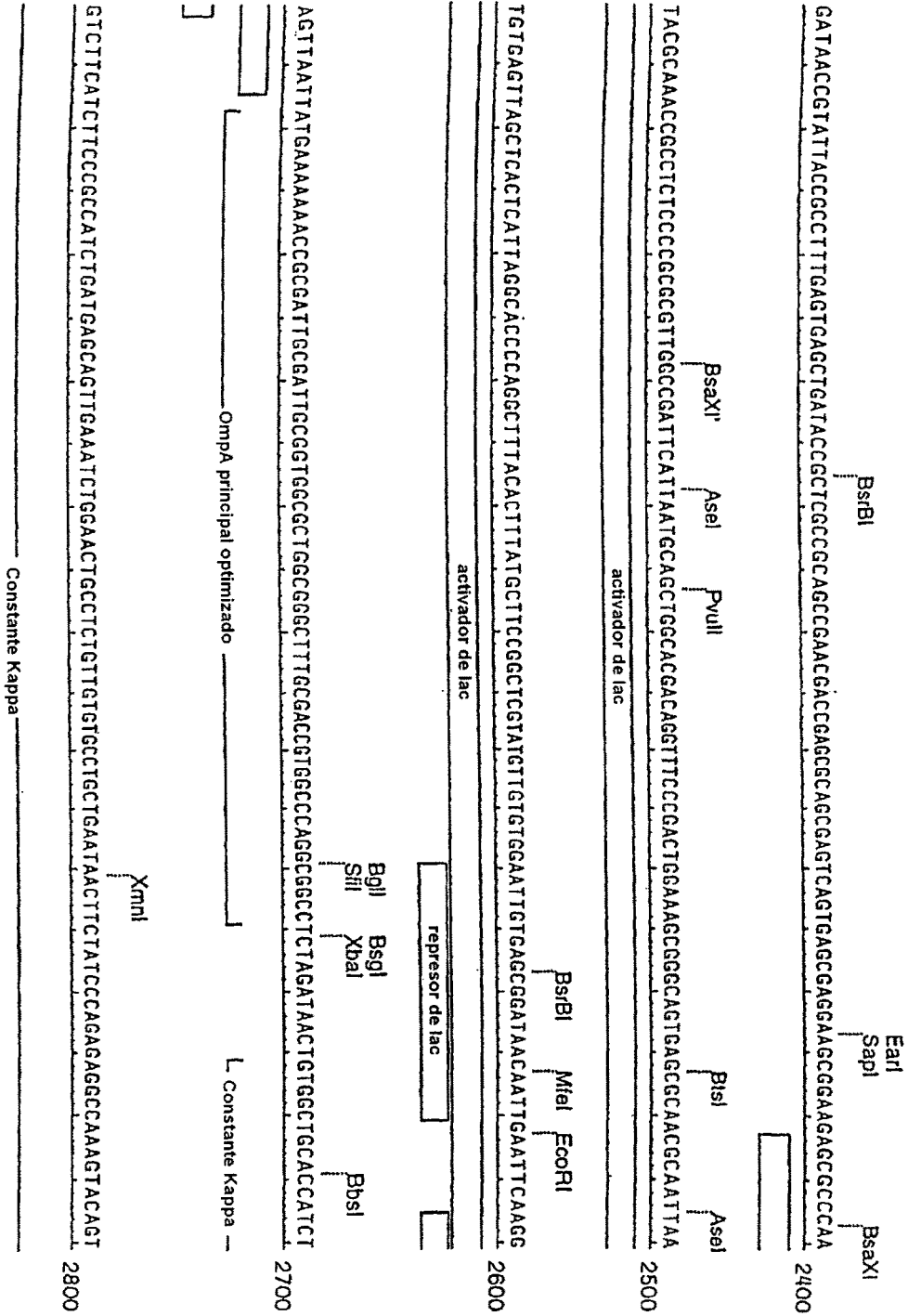


Fig. 21F

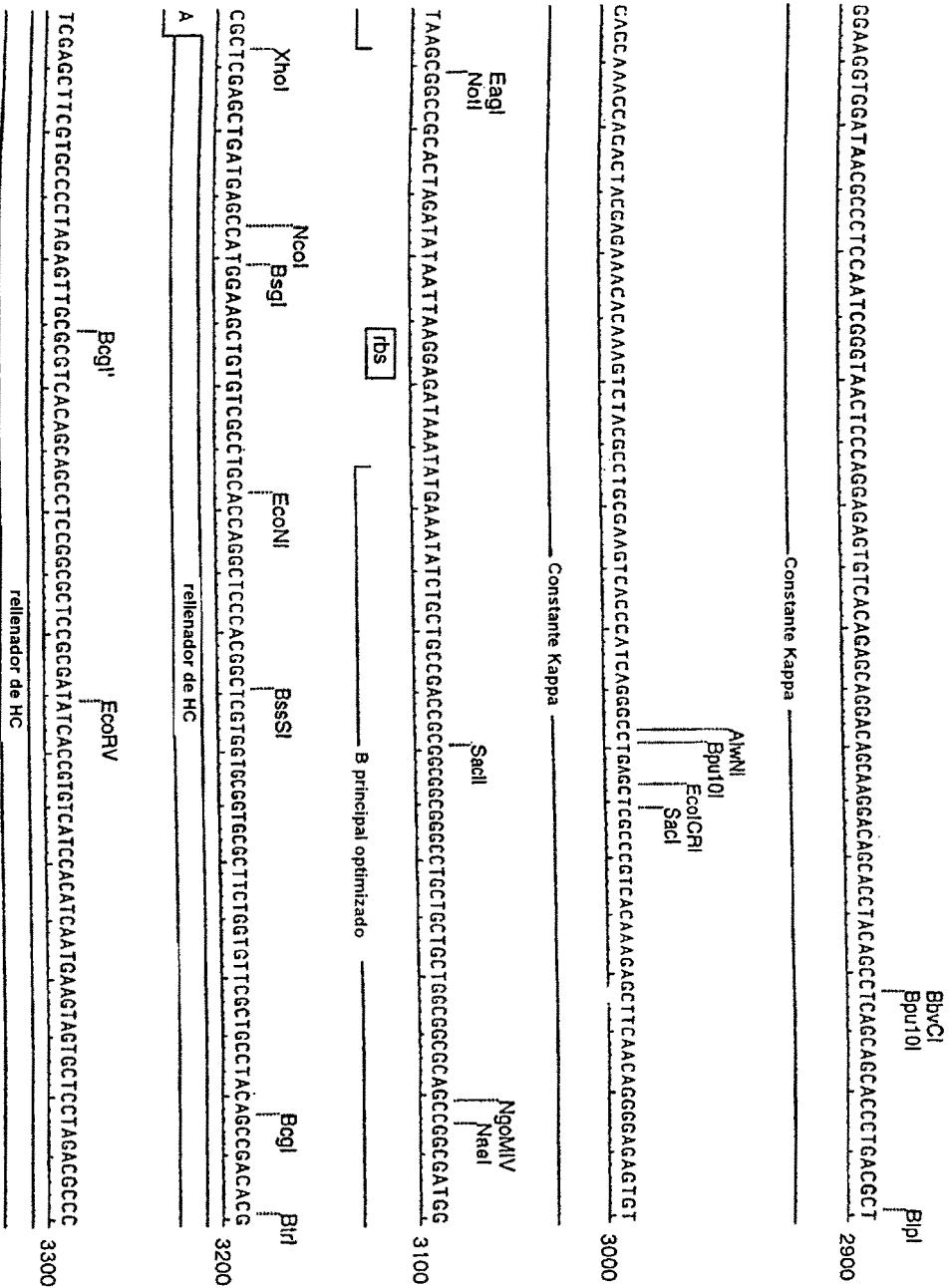


Fig. 21G

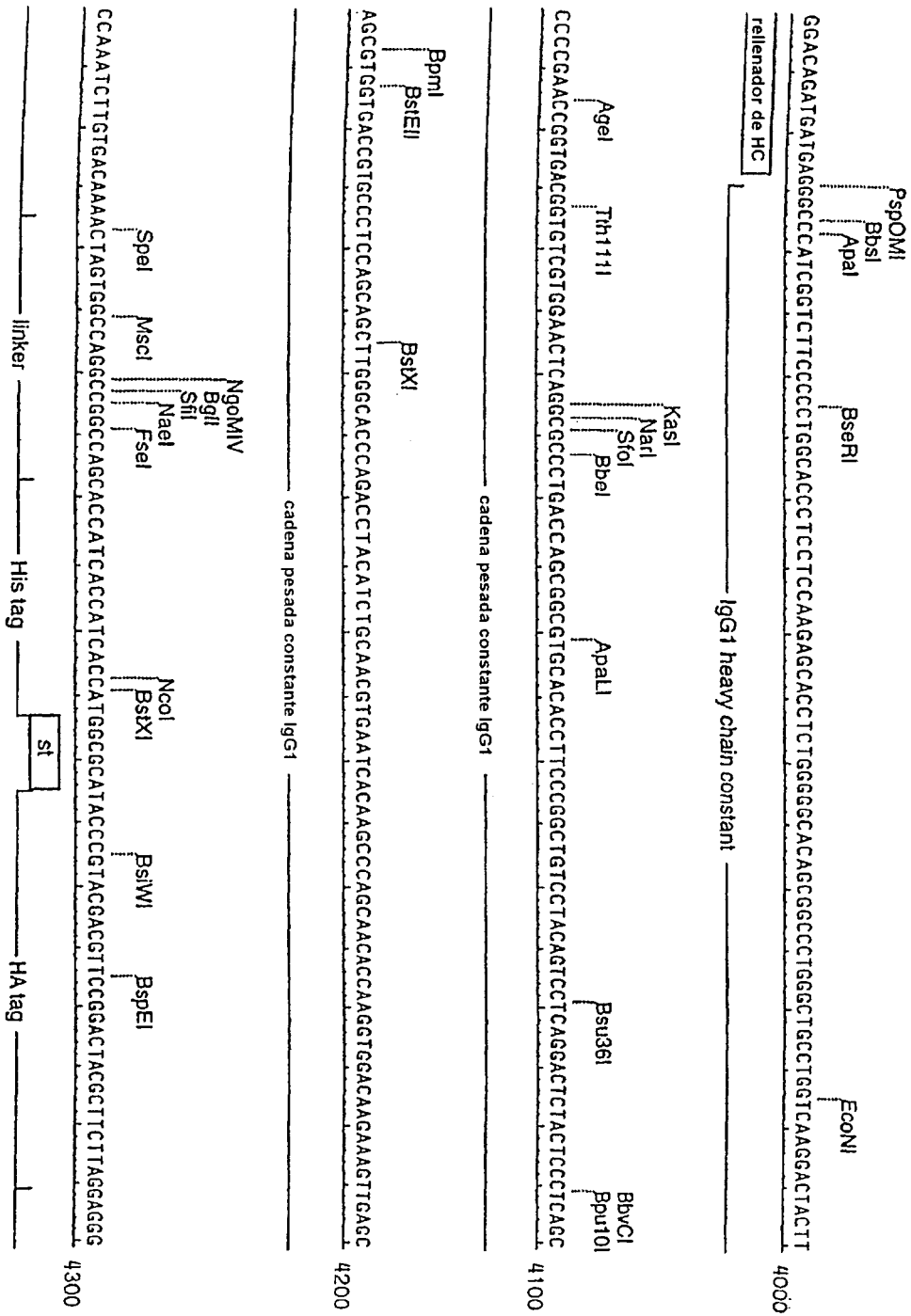


Fig. 21H

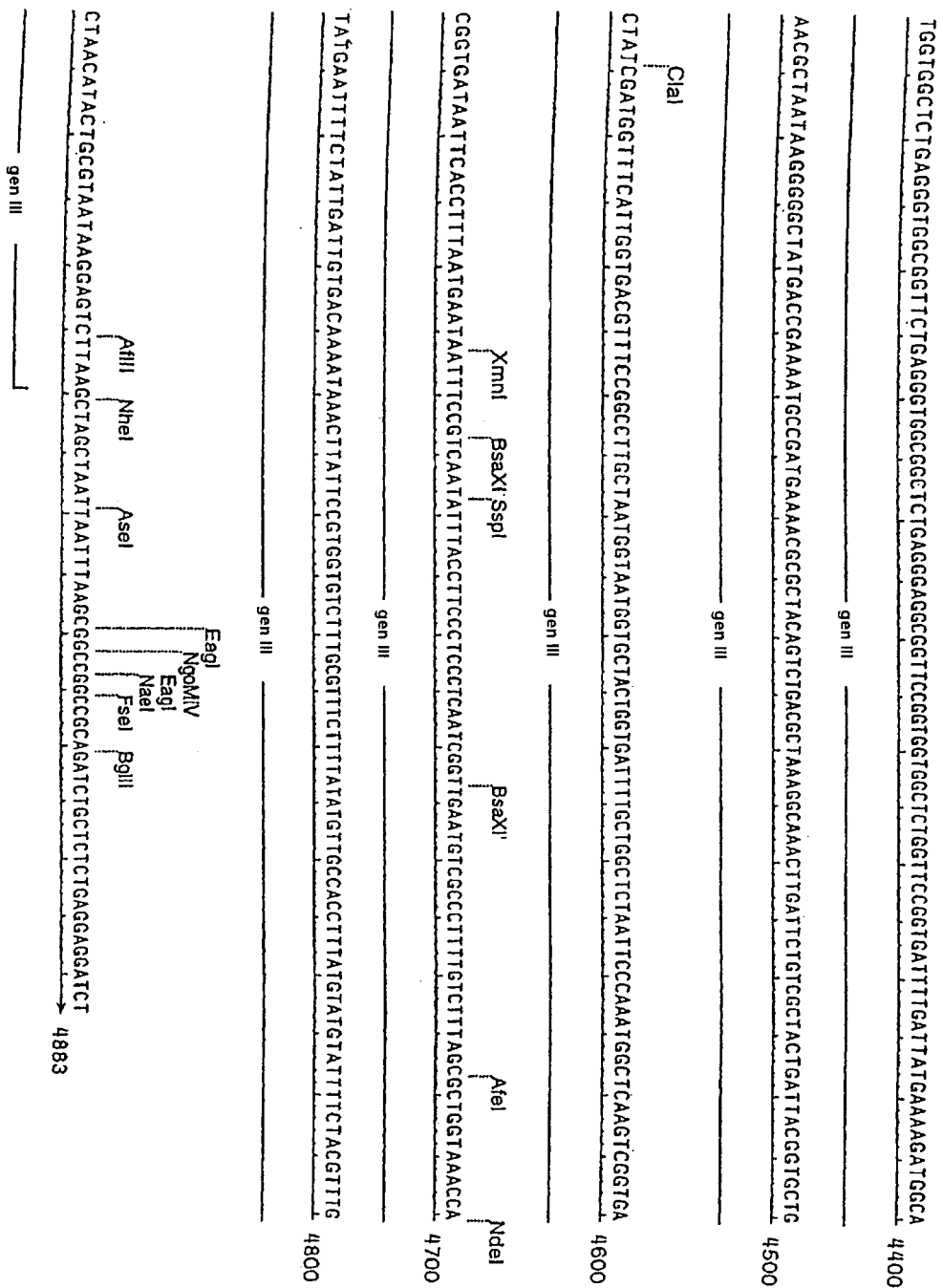


Fig. 21I