



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 317 645**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)	C07K 16/00 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)	C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)	C07K 14/48 (2006.01)
C07K 14/61 (2006.01)	C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01)	C12N 1/21 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)	A61K 39/395 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **96911483 .4**

96 Fecha de presentación : **28.03.1996**

97 Número de publicación de la solicitud: **0821732**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.02.1998**

54 Título: **Polipéptidos modificados con vida media aumentada.**

30 Prioridad: **14.04.1995 US 422093**

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: **Genentech, Inc.**
1 DNA Way
South San Francisco, California 94080-4990, US

72 Inventor/es: **Presta, Leonard, G. y**
Snedecor, Bradley, R.

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

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

Polipéptidos modificados con vida media aumentada.

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

La invención hace referencia a polipéptidos que se han mutado para contener un epitopo de unión al receptor de tipo silvestre. Más particularmente, esta invención hace referencia a polipéptidos que se eliminan por el riñón con un epitopo de la región Fc de una molécula de IgG, lo que da como resultado una vida media circulante más prolongada.

Descripción de la bibliografía relacionada

En 1964 se sugirió que un receptor específico existía en equilibrio rápido con el espacio intravascular y que protegía las moléculas de IgG de la degradación. Brambell y col., *Nature*, 203:1352-1355 (1964). Véase también Brambell, *The Lancet*, 1087-1093 (1965). Se ha demostrado que el riñón es el sitio principal de catabolismo de los fragmentos de inmunoglobulina, aproximadamente para el 90% de su catabolismo endógeno. Wochener y col., *J. Exp. Med.*, 126:207 (1967). La existencia de un receptor implica que la molécula de Ig tiene secuencias específicas o determinantes conformacionales que han de unirse con dicho receptor. Ya que la región Fc de IgG producida por proteólisis tiene la misma vida media *in vivo* que la molécula de IgG intacta y los fragmentos Fab se degradan rápidamente (Spiegelberg y Wiegler, *J. Exp. Med.*, 121:323-338 [1965]; Waldman y Ghetie, *Catabolism of Immunoglobulins*, *Progress in Immunol.*, 1:1187-1191 [Academic Press, New York:1971]; Spiegelberg, in *Advances in Immunology*, vol. 19, F.J. Dixon y H.G. Kunkel, eds. [Academic Press, NY:1974], pp. 259-294; y revisado por Zuckier y col., *Semin. Nucl. Med.*, 19:166-186 [1989]), se pensó que las secuencias relevantes de IgG_{2b} de ratón se hallaban en el dominio CH2 o CH3 y que la delección de uno u otro dominio podrían conducir a una degradación rápida. De hecho, el fragmento del dominio CH2 de la IgG humana producida mediante digestión con tripsina del fragmento Fc persistía en la circulación en conejos igual de tiempo que el fragmento Fc de la molécula de IgG; por el contrario, el fragmento (pFc') del dominio CH3 de la IgG humana también producido por digestión con tripsina del fragmento Fc se eliminaba rápidamente, lo que indicaba que el sitio catabólico de la IgG se localizaba en el dominio CH2. Ellerson y col., *J. Immunol.*, 116:510 (1976); Yasmeen y col., *J. Immunol.*, 116:518 (1976). Otros estudios han demostrado que las secuencias en el dominio CH3 son importantes para la determinación de las diferentes vidas medias intravasculares de los anticuerpos IgG_{2b}T e IgG_{2a}h en el ratón. Pollock y col., *Eur. J. Immunol.*, 20:2021-2027 (1990).

Las tasas catabólicas de las variantes de IgG que no se unen al receptor Fc de alta afinidad FcRI o al C1q son indiferenciables de la tasa de aclaramiento del anticuerpo de tipo silvestre parental, lo que indica que el sitio catabólico es distinto de los sitios implicados en la unión de FcR1 o C1q. Wawrzynczak y col., *Molec. Immunol.*, 29:221 (1992). También, el aclaramiento renal de los residuos de carbohidratos de la molécula de IgG o del fragmento de Fc tiene un papel menor o no tiene ningún efecto sobre la vida media *in vivo*, y la magnitud de este efecto depende del isotipo de la molécula de IgG. Nose y Wigzell, *Proc Natl Acad Sci, USA*, 80:6632 (1983); Tao y Morrison, *J. Immunol.*, 143:2595 (1989); Wawrzynczak y col., *Mol. Immunol.*, 29:213 (1992).

Se hallaron complejos de proteína A Staphilococal-IgG se eliminaban más rápidamente del suero que las moléculas de IgG no complejadas. Dima y col., *Eur. J. Immunol.*, 13:605 (1983). Para determinar si los residuos cercanos al punto de contacto Fc-SpA estaban implicados en el aclaramiento de IgG, Kim y col., *Eur. J. Immunol.*, 24:542-548 (1994) se realizaron experimentos de mutagénesis dirigida para cambiar residuos aminoacídicos de un fragmento Fc-bisagra derivado de la molécula IgG1 murina y determinar los efectos de estas mutaciones sobre la farmacocinética del fragmento Fc-bisagra. Los autores mostraron que el sitio de la molécula IgG1 que controla la tasa catabólica (el "sitio catabólico") se localiza en la interfaz del dominio CH2-CH3 y se solapa con el sitio de unión de la proteína A Staphylococcal. Véase la patente internacional WO 93/22332, publicada el 11 de Noviembre de 1993. El fenómeno del catabolismo también se estudió por Zuckier y col., *Cancer*, 73:794-799 (1994). El catabolismo de la IgG también se discute por Masson, *J. Autoimmunity*, 6:683-689 (1993).

La patente internacional WO 94/04689 describe una proteína con un dominio citotóxico, un dominio de unión al ligando y un péptido que enlaza estos dos dominios que contienen un dominio de región constante de IgG con la propiedad de aumentar la vida media de la proteína en el suero de mamíferos.

Un dibujo tridimensional de un fragmento Fc y de su complejo con el fragmento B de la proteína A de *Staphylococcus aureus* se proporcionó por Deinsenhofer, *Biochemistry*, 20:2364 (1981).

Se ha demostrado que el aclaramiento se reduce en gran manera cuando el tamaño molecular excede los 70KDa, nivel de corte del tamaño en la filtración glomerular, Knauf y col., *Relationship of Effective Molecular Size to Systemic Clearance in Rats of Recombinant Interleukin-2 Chemically Modified with Water-soluble Polymers*, *L Biochem*, 263:15064-15070 (1988).

Resumen de la invención

Según ello, en una realización la invención proporciona una variante polipeptídica de un polipéptido de interés, el cual se elimina por el riñón y no contiene una región Fc de una IgG. Dicha variante comprende un epitopo de unión al receptor de tipo silvestre de una región Fc de una IgG y tiene una vida media más prolongada *in vivo* que el polipéptido de interés, tal como se describe en las reivindicaciones.

En otro aspecto, la invención proporciona el ácido nucleico que codifica la variante polipeptídica, un vector replicable que comprende el ácido nucleico, una célula huésped que comprende el ácido nucleico, y un procedimiento para la producción de una variante polipeptídica que comprende el cultivo de células huésped en medio de cultivo y la recuperación de la variante polipeptídica del mencionado cultivo de células huésped. La molécula de ácido nucleico puede estar o no marcada con una molécula detectable.

En otro aspecto, la invención proporciona un polipéptido que no es un Fc, y dicho polipéptido comprende una o más de las secuencias (5' a 3') siguientes: HQNLSDGK (Nº ID SEC:1) o HQNISDGK (Nº ID SEC:2) y comprende también la secuencia: PKNSSMISNTP (Nº ID SEC:3).

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para la preparación de una variante polipeptídica que comprende la modificación de un polipéptido de interés que se elimina por el riñón y que no contiene una región Fc de una IgG, de modo que comprende un epitopo de unión de tipo silvestre de una región Fc de una IgG y tiene una vida media *in vivo* aumentada, tal como se especifica en las reivindicaciones.

En otra realización adicional, la invención proporciona un procedimiento para la preparación de una variante polipeptídica que tiene una vida media *in vivo* aumentada, dicho procedimiento comprende:

(1) identificar la secuencia y la conformación de un epitopo de unión de tipo silvestre a una región Fc de una molécula IgG;

(2) modificar la secuencia de un polipéptido de interés que se elimina por el riñón y que no contiene una región Fc para incluir en la secuencia y conformación del epitopo de unión identificado;

(3) analizar el polipéptido modificado de la etapa (2) para verificar que presente una vida media más prolongada que la del polipéptido de interés; y

(4) si el polipéptido no tiene una vida media más prolongada *in vivo*, modificar además la secuencia del polipéptido de interés para incluir la secuencia y conformación del epitopo de unión identificado y analizar la duración de la vida media *in vivo* hasta conseguir una vida media más prolongada *in vivo*.

En otro aspecto, la invención proporciona la utilización de una variante de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del trastorno mediado por LFA-1 en un mamífero, preferentemente un paciente, que necesite de dicho tratamiento en donde el polipéptido es un fragmento Fab, un fragmento (Fab')₂, un diacuerpo, un fragmento Fv de cadena sencilla o un receptor y actúa como un antagonista de LFA-1. Más preferentemente, esta variante es un fragmento Fab o (Fab')₂ de anti-LFA-1 (tal como un Fab o (Fab')₂ anti-CD18) con una vida media aumentada en el suero tal como se indica aquí.

La región Fc debe ser colocada (trasplantada) a una región de un polipéptido de interés que no altere su conformación para no perder su actividad biológica, y se debe situar de modo que no interfiera con la capacidad del polipéptido para unirse con un ligando o un antígeno con el fin de mantener su actividad biológica.

Descripción resumida de las figuras

Las Figuras 1A y 1B muestran la farmacocinética del suero de cinco construcciones Fab o (Fab')₂ en ratones después de administrar dosis únicas intravenosas de 2 mg/kg. En la Figura 1A, la variante Fab v1B se representa como cuadrados rellenos, el control Fab se indica por rombos rellenos, la variante Fab v2 se indica por triángulos rellenos, la variante Fab v1 se indica por círculos rellenos y F(ab')₂ con doble enlace disulfuro por círculos vacíos. En la Figura 1B, el control Fab se representa como triángulos rellenos, la variante Fab v2 como círculos abiertos; la variante Fab v1 como cuadrados abiertos; la variante Fab v1B como círculos rellenos; y F(ab')₂ de doble enlace disulfuro como cuadrados rellenos. Las moléculas se describen de modo más completo en las tablas siguientes.

La Figura 2 muestra un alineamiento de las porciones relevantes de las secuencias aminoácidas del dominio CH1 de IgG1 (Nº ID SEC:4), el dominio CH1 de IgG2 humana (Nº ID SEC:5), el dominio CH1 de IgG3 humana (Nº ID SEC:6), el dominio CH1 de IgG4 (Nº ID SEC:7), el dominio CK de kappa humana (Nº ID SEC:8), y el dominio CL de lambda humana (EC ID NO:9), con alineamiento con la variante Fab v1b derivada del anticuerpo anti-CD18 (Nº ID SEC:10), que se describe en el Ejemplo 1. En esta Figura, los residuos aminoácidos y/o las posiciones de interés y de más importancia para la invención dentro de la secuencia de Fabv1b (es decir, Nº ID SECs:3 y 1) se representan subrayadas y con asteriscos, respectivamente.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Definiciones

5 Tal como se utiliza aquí, “polipéptido de interés” hace referencia a un polipéptido que tiene una actividad biológica, que se elimina por el riñón, y que no contiene una región Fc de una IgG. Una “región Fc de una IgG” hace referencia a la porción Fc de una inmunoglobulina del isotipo IgG, bien conocida por los expertos en la materia de tecnología de anticuerpos. Ejemplos de dichos polipéptidos son los péptidos y proteínas de fuentes eucariotas tales como la levadura, las aves, las plantas, los insectos o los mamíferos, o de fuentes bacterianas como por ejemplo *E. coli*. El polipéptido
10 de interés puede aislarse de fuentes naturales o generarse de forma sintética o recombinante. En una realización preferida, el polipéptido de interés contiene un dominio Ig o un dominio de tipo Ig, por ejemplo un dominio de unión al antígeno.

El aclaramiento renal de polipéptidos de interés depende al menos en parte del peso molecular del polipéptido. Los
15 polipéptidos de peso molecular demasiado grande no se eliminarán por los riñones de un mamífero. Un ejemplo de un análisis para determinar si el polipéptido de interés (o variante) se elimina por el riñón es un estudio clínico en donde el polipéptido de interés o variante polipeptídica se marcan con un marcador detectable y se administran al mismo tipo de mamífero que se tratará utilizando un régimen de tratamiento idéntico al que se utilizaría en el tratamiento renal. Después, se obtiene una muestra clínica de orina del mamífero y se analiza para determinar si se detecta el marcaje. Si éste se detecta, el polipéptido o variante de interés se han eliminado por los riñones.

Como norma general, los polipéptidos que se eliminan por los riñones tienen un peso molecular en el intervalo de 5000-10.000 daltons, aunque moléculas algo superiores o inferiores también pueden incluirse dentro del ámbito de la invención si pueden pasar la prueba de aclaramiento renal citada más arriba.

25 El polipéptido de interés es activo biológicamente si tiene una función o actividad efectora o antigénica *in vivo* que esté causada o generada de forma directa o indirecta por el polipéptido (bien en su conformación nativa o desnaturalizada) o un fragmento del mismo. Las funciones efectoras incluyen la unión al receptor y cualquier actividad de unión al vehículo, agonismo o antagonismo del polipéptido de interés, especialmente la transducción de una señal proliferativa incluyendo la replicación, la función reguladora del ADN, la modulación de la actividad biológica de diversos factores de crecimiento, la activación del receptor, la desactivación, la sobre o infra-regulación, el crecimiento celular o la diferenciación y similares. La actividad biológica incluye la posesión de un epitopo o sitio antigénico que sea capaz de reaccionar de forma cruzada con los anticuerpos dirigidos contra el polipéptido de interés o equivalentes del mamífero.

35 Ejemplos de polipéptidos de interés de mamíferos incluyen moléculas como por ejemplo la renina, una hormona de crecimiento, incluyendo la hormona de crecimiento humana; la hormona de crecimiento bovino; el factor de liberación de la hormona de crecimiento; la hormona paratiroidea; la hormona estimulante del tiroides; las lipoproteínas; la α -1 antitripsina; la cadena A de la insulina; la cadena B de la insulina; la proinsulina; trombopoyetina; la hormona estimulante del fólculo; la calcitonina; la hormona luteinizante; el glucagón; los factores de coagulación como el factor VIIIc, el factor IX, el factor tisular y el factor de von Willebrand y los factores anticoagulantes como la Proteína C; el factor natriurético atrial; el tensoactivo pulmonar; un activador del plasminógeno, como la uroquinasa o el activador del plasminógeno de tipo tisular o de orina humana (t-PA); la bombesina; la trombina; el factor de crecimiento hematopoyético, el factor alfa y beta de necrosis tumoral; la encefalina; una albúmina sérica como la albúmina sérica humana; la sustancia inhibidora mulleriana; la cadena A de la relaxina; la cadena B de la relaxina; la prorelaxina; el péptido asociado a la gonadotropina de ratón; una proteína microbiana como la beta-lactamasa; la DNasa; la inhibina; la activina; el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); los receptores de hormonas o factores de crecimiento; la integrina; la proteína A o D; los factores reumatoides; un factor neurotrófico como el factor neurotrófico derivado del cerebro (FNDc), la neurotrofina-3, -4, -5, o -6 (NT-3, NT-4, NT-5, o NT-6), o un factor de crecimiento nervioso como el NGF- β ; las cardiotrofinas (factor de hipertrofia cardíaca) como la cardiotrofina-1 (CT-1); el factor de crecimiento plaquetar (PDGF); el factor de crecimiento de fibroblastos como el aFGF y el bFGF; el factor de crecimiento epitelial (EGF); el factor de crecimiento transformante (TGF) como el TGF- α y el TGF- β , incluyendo el TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 o TGF- β 5; el factor-I y -II de crecimiento de tipo insulina (IGF-I, IGF-II); des(I-3)-IGF-I (IGF-I de cerebro), las proteínas de unión al factor de crecimiento de tipo insulina; las proteínas CD como CD-3, CD-4, CD-8 y CD-19; la eritropoyetina; los factores osteoinductivos; las inmunotoxinas; una proteína morfogenética del hueso (BMP); un interferón como el interferón alfa, -bet, y -gamma; los factores estimuladores de colonias (CSFs), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF y G-CSF; las interleuquinas (ILs); por ejemplo, IL-1, a IL-10; un anticuerpo anti-HER2 sin una región nativa Fc de una IgG; la superóxido dismutasa; los receptores de células T; las proteínas de membrana de superficie; el factor acelerador de la descomposición; el antígeno viral como, por ejemplo, una porción de la cubierta del virus del SIDA; las proteínas de transporte; los receptores de direccionamiento; las adresinas; las proteínas reguladoras; los anticuerpos sin una región Fc nativa de una IgG; y los fragmentos de cualquiera de los polipéptidos listados anteriormente.

Los polipéptidos de interés preferidos son los polipéptidos de mamífero. Ejemplos de dichos polipéptidos de mamífero incluyen los fragmentos de anticuerpo como el Fv, el Fab, (Fab')₂ y un fragmento anti-HER-2 sin el dominio IgGFc, el t-PA, el gp120, la DNasa, el IFG-I, el IGF-II, la hormona del crecimiento, cadenas de relaxina, factor de liberación de la hormona del crecimiento, las cadenas de insulina o proinsulina, la uroquinasa, las inmunotoxinas, las neurotrofinas y los antígenos. Más preferentemente, el polipéptido es un Fab, un (Fab')₂, un diacuerpo, un fragmento

Fv, un fragmento Fv de cadena sencilla, o un receptor. Aún más preferentemente, el polipéptido es un anti-IgE, anti-HER2 o Fab o (Fab')₂ anti-CD18, y más preferentemente es humano o humanizado.

Tal como se utiliza aquí, “variante de polipéptido” hace referencia a una variante de secuencia aminoacídica del polipéptido de interés, incluyendo variantes con una o más sustituciones aminoacídicas, inserciones, y/o deleciones. Dichas variantes están activas biológicamente, tal como se definió anteriormente, y necesariamente tienen menos del 100% de identidad de secuencias con el polipéptido de interés. En una realización preferida, la variante polipeptídica biológicamente activa tiene una secuencia aminoacídica que comparte al menos un 70% de identidad de secuencia aminoacídica con el polipéptido de interés, preferiblemente al menos un 75%, más preferiblemente al menos un 80%, todavía más preferiblemente al menos un 85%, incluso más preferiblemente al menos un 90%, y más preferiblemente al menos un 95% aproximadamente.

El término “vida media *in vivo*” hace referencia a la vida media de la variante del polipéptido de interés circulante en la sangre de un mamífero determinado.

Tal como se utiliza aquí, el término “epitopo de unión al receptor de tipo silvestre” hace referencia a un epitopo de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) que es responsable del aumento de la vida media en el suero *in vivo* de la molécula de IgG. Como ejemplo, la Figura 2 muestra los epitopos representativos subrayados y los residuos importantes con asteriscos. Los isotipos de IgG1, IgG2 e IgG4 son los preferidos para determinar el epitopo de unión al receptor.

“La reacción en cadena de la polimerasa” o la “PCR” hacen referencia a un procedimiento o técnica en la que cantidades mínimas de un fragmento específico de ácido nucleico, ARN y/o ADN, se amplifican tal como se describe en la patente americana 4.683.195, publicada el 28 de Julio de 1987. Por lo general, se necesita que esté disponible la información de la secuencia de los extremos de la región de interés o de más allá, para poder diseñar los cebadores oligonucleotídicos; estos cebadores serán idénticos o similares en su secuencia con las cadenas opuestas al molde a amplificar. Los nucleótidos 5'terminales de los dos cebadores pueden coincidir con los extremos del material amplificado. La PCR puede utilizarse para amplificar las secuencias de ARN específicas, las secuencias de ADN específicas del DNA genómico total, y el ADNc transcrito del ARN celular total, secuencias de bacteriófagos o plásmidos, etc. Véase Mullis y col., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263 (1987); Elrich, ed., PCR Technology, (Stockton Press, NY, 1989) para metodología general. Tal como se utiliza aquí, la PCR se considera que es un ejemplo, pero no el único, de procedimiento de reacción de la polimerasa de ácidos nucleicos para amplificar una muestra de ácido nucleico a analizar. Dicho procedimiento comprende la utilización de un ácido nucleico conocido como un cebador y una polimerasa de ácido nucleico para amplificar o generar un fragmento específico de ácido nucleico.

“Anticuerpos” (Abs) e “inmunoglobulinas” (Igs) son glicoproteínas que tienen las mismas características estructurales. Mientras que los anticuerpos presentan especificidad de unión con un antígeno específico, las inmunoglobulinas incluyen tanto los anticuerpos como otras moléculas de tipo anticuerpo que carecen de especificidad antigénica. Los polipéptidos de la última clase se producen, por ejemplo, a niveles bajos por el sistema linfático y a niveles muy aumentados por los mielomas.

“Anticuerpos nativos” e “inmunoglobulinas nativas” son generalmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y de dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de puentes disulfuro varía entre las cadenas pesadas de isotipos de inmunoglobulina distintos. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracatenarios espaciados regularmente. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (VH) seguido por un número determinado de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (VL) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de cadena ligera se alinea con el primer dominio constante de cadena pesada y el dominio variable de cadena ligera se alinea con el dominio variable de cadena pesada. Los residuos aminoacídicos particulares se cree que forman una interfaz entre los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada (Clothia y col., J. Mol. Biol. 186:651-663 [1985]; Novotny y Haber, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:4592-4596 [1985]).

El término “variable” hace referencia al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren extensamente en su secuencia entre los anticuerpos y se utilizan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno específico. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye equitativamente a lo largo de los dominios variables de anticuerpos, sino que se concentra en tres segmentos denominados regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) o regiones hipervariables, tanto en los dominios variables de cadena ligera como los de cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se denominan regiones de entramado (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan en gran parte una estructura de hoja β . Las CDRs en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las regiones FR y, con las CDRs de la otra cadena, contribuyendo a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (véase Kabat y col., *supra*). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión del anticuerpo al antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente del anticuerpo.

La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos idénticos de unión al antígeno, denominados fragmentos “Fab”, cada uno con un sitio de unión al antígeno, y un fragmento “Fc” residual, cuyo nombre refleja su

capacidad para cristalizar rápidamente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación antigénica y es capaz de unirse de forma cruzada con el antígeno.

“Fv” es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento y un sitio de unión al antígeno.

- 5 Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena ligera y pesada en estrecha asociación, aunque no covalente. Es en esta configuración que las tres CDRs de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión antigénico en la superficie del dímero VH-VL. Conjuntamente, las 6 CDRs confieren especificidad de unión antigénica al anticuerpo. Sin embargo, incluso un dominio variable sencillo (o la mitad de un Fv que comprende sólo tres CDRs específicas para un antígeno) tiene la capacidad para reconocer y unirse al antígeno, aunque con una
- 10 afinidad menor que el sitio de unión completo.

- El fragmento Fab también contiene el dominio constante de cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxiterminal del dominio de cadena pesada CH1 incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la denominación aquí para Fab' en donde el(los) residuo(s) cisteína(s) de los dominios
- 15 constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpos F(ab')₂ se producen originalmente como parejas de fragmentos Fab' con las cisteínas de la bisagra entre ellos. Otros acoplantes químicos de fragmentos de anticuerpo son también conocidos.

- 20 Los fragmentos de anticuerpo “Fv de cadena sencilla” o “sFv” comprenden los dominios VH y VL del anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una cadena polipeptídica única. Por lo general, el polipéptido Fv comprende además un engrace polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que el sFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de sFv véase Pluckthun, A. en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp, 269-315 (1994).

- 25 Las “cadenas ligeras” de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrados pueden incluirse en uno de los tipos claramente distintos, denominados Kappa (κ) y lambda (λ), según las secuencias aminoacídicas de sus dominios constantes.

- 30 Dependiendo de la secuencia aminoacídica del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden incluirse en clases diferentes. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y algunas de estas pueden dividirse además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden con las clases distintas de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las estructuras de las subunidades y de las configuraciones tridimensionales
- 35 de las clases distintas de inmunoglobulinas son bien conocidas.

- El término “anticuerpo” se utiliza en el sentido más amplio y abarca específicamente anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos agonistas y antagonistas), composiciones de anticuerpo con especificidad poliepitópica, anticuerpos biespecíficos, diacuerpos, y moléculas de una sola cadena, así como los fragmentos de anticuerpo (por
- 40 ejemplo, Fab, F(ab')₂ y Fv), siempre que presenten la actividad biológica deseada.

- El término “anticuerpo monoclonal” tal como se utiliza aquí hace referencia a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos esencialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por las mutaciones posibles que puedan ocurrir de forma natural y que puedan estar presentes
- 45 en cantidades mínimas. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, están dirigidos contra un sitio antigénico único. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpo convencionales (policlonales) que incluyen típicamente anticuerpos distintos dirigidos contra determinantes distintos (epitopos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un determinante único sobre el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales presentan la ventaja de que se sintetizan mediante cultivo de hibridomas, no contaminados por otras inmunoglobulinas. El modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo como el obtenido a partir de una población esencialmente homogénea de anticuerpo, y que no debe interpretarse como que la producción del anticuerpo requiera de ningún procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a utilizar de acuerdo con la presente invención pueden generarse mediante el procedimiento del hibridoma descrito en primer lugar por Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495 (1975), o pueden generarse mediante procedimientos del ADN recombinante (véase por ejemplo la
- 50 patente americana U.S. 4.816.567 [Cabilly y col.]). Los “anticuerpos monoclonales” también pueden aislarse a partir de librerías de anticuerpos de fagos mediante las técnicas descritas por Clackson y col., *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991), por ejemplo.

- Los anticuerpos monoclonales incluyen aquí específicamente los anticuerpos “quiméricos” en los que una porción de la cadena pesada y/o la cadena ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en los anticuerpos
- 60 derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpo, mientras que el resto de la (s) cadena(s) es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de otras especies o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpo, así como a fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (Cabilly y col., *supra*; Morrison y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:6851-6855 [1984]).

Las formas “humanizadas” de los anticuerpos no-humanos (por ejemplo los murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de lo mismo (como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de

unión al antígeno de los anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no-humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las cuales los residuos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor se reemplazan por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) como el ratón, la rata o el conejo con la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región de entramado Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentren ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias CDR o de entramado importadas. Estas modificaciones se realizan para perfeccionar y optimizar la realización del anticuerpo. Por lo general, el anticuerpo humanizado comprenderá esencialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o esencialmente todas las regiones CDR corresponden con las de una inmunoglobulina no humana y todas o esencialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado óptimamente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles véase, Jones y col., *Nature*, 321:522-525 (1986); Reichmann y col., *Nature*, 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992). El anticuerpo humanizado incluye un anticuerpo Primatized™ en donde la región de unión antígeno-anticuerpo se deriva de un anticuerpo producido mediante inmunización de monos con el antígeno de interés.

El término “no-inmunogénico en un humano” significa que tras el contacto con el polipéptido de interés, o la variante polipeptídica, en un vehículo aceptable farmacéuticamente y en una cantidad efectiva terapéuticamente con el tejido adecuado de un humano, no se demuestra la existencia de sensibilidad o resistencia al polipéptido de interés, o variante, tras una segunda administración del polipéptido de interés o variante después de un periodo de latencia adecuado (por ejemplo de 8 a 14 días).

El término “diacuerpos” hace referencia a fragmentos pequeños de anticuerpos con dos sitios de unión al antígeno, en los cuales dichos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado con un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Mediante la utilización de un engarce que sea demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son forzados a aparearse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión antigénica. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, la patente europea EP 404.097; la patente internacional WO 93/11161; y Holliger y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

El término “trastornos mediados por LFA-1” hace referencia a estados patológicos causados por interacciones de adherencia celular que implican al receptor LFA-1 en los linfocitos. Ejemplos de dichos trastornos incluyen las respuestas inflamatorias de células T como las enfermedades inflamatorias de la piel, incluyendo la psoriasis; las respuestas asociadas con la enfermedad inflamatoria de los intestinos (como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa); el síndrome de la insuficiencia respiratoria; la dermatitis; la meningitis; la encefalitis; la uveitis; condiciones alérgicas como el eczema y el asma y otras condiciones que impliquen la infiltración de células T y las respuestas inflamatorias; las reacciones de hipersensibilidad cutánea (incluyendo las producidas por el género *Toxicodendron* como *Toxicodendron diversilobum* o hiedra venenosa o el *Toxicodendron pubescens*); aterosclerosis; deficiencia en la adhesión leucocitaria; enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide, el lupus sistémico eritematoso (LSE), la diabetes mellitus, la esclerosis múltiple, el síndrome de Reynaud, la tiroiditis autoinmune, la encefalomiелitis autoinmune experimental, el síndrome de Sjorgen, la diabetes juvenil, y las respuestas inmunes asociadas con la hipersensibilidad retardada mediada por citoquinas y linfocitos T típica de tuberculosis, sarcoidosis, polioiosis, granulomatosis y vasculitis; la anemia perniciosa; las enfermedades que implican la diapédesis de leucocitos; el trastorno inflamatorio de SNC, el síndrome de lesión multiorgánica secundaria a septicemia o trauma; la anemia hemolítica autoinmune; la miastemina grave; las enfermedades mediadas por el complejo antígeno-anticuerpo; todos los tipos de trasplantes, ya sea enfermedad del injerto vs. huésped o enfermedad del huésped vs. injerto; el choque hemorrágico; la toxicidad pulmonar al oxígeno; la fibrosis pulmonar; la reparación de heridas; los linfomas de células B; etc.

En particular, las indicaciones preferidas para los anticuerpos contra CD11a o CD11b son la psoriasis, el rechazo del trasplante, el asma, la reparación de heridas, y la fibrosis pulmonar; las indicaciones preferidas para los anticuerpos anti-CD18 son el choque hemorrágico, la meningitis, la encefalitis, la esclerosis múltiple, el asma y la toxicidad pulmonar al oxígeno; y la indicación preferida para los anticuerpos contra CD20 es el linfoma de células B.

El término “tratamiento” hace referencia tanto al tratamiento terapéutico como al profiláctico o a las medidas preventivas. Aquellos que necesiten de tratamiento incluyen aquellos que ya presentan la enfermedad, así como aquellos con predisposición a presentarla o aquellos en los que se desee prevenir dicha enfermedad.

El término “mamífero” para los propósitos de tratamiento hace referencia a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo el hombre, los animales domésticos y de granja, del zoo, deportivos o los animales de compañía, como perros, caballos, gatos, ovejas, cerdos, vacas, etc. Preferiblemente, el mamífero es un humano.

El término “antagonista de LFA-1” hace referencia por lo general a un anticuerpo dirigido contra CD11a o CD18 o contra ambos, pero también incluye las formas solubles de ICAM-1 (por ejemplo, el dominio extracelular de ICAM-1), los anticuerpos contra ICAM-1, y los fragmentos de lo mismo, u otras moléculas capaces de inhibir la interacción de LFA-1 y de ICAM-1.

El término “anticuerpo anti-LFA-1” o “MAB anti-LFA-1” hace referencia a un anticuerpo dirigido contra CD11a o CD18, o ambos. Los anticuerpos anti-CD11a incluyen por ejemplo, MHM24 (Hildreth y col., (Eur. J. Immunol., 13:202-208 [1983]), R3.1 (IgG1; Rothelin, Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc., Ridgefield, CT), 25-3 (o 25:; una IgG1 disponible por Immunotech, France; véase Olive y col., en Feldmann, ed., Human T Cell Clones. A new approach to immune regulation, Clifton, NJ, Humana, [1996] p. 173), KBA (IgG2a; Nishimiura y col., Cell Immunol., 107:32 [1987]; Nishimura y col., Cell Immunol., 94:122 [1986] p. 173); KBA 8IgG2a; Nishimura y col., Cell Immunol., 107:32 [1987]; Nishimura y col., Cell Immunol., 94:122 [1985]), M7/15 (IgG2b; Springer y col., Immunol. Rev., 68:171 [1982]), IOT16 (Vermot Desroches y col., Scand. J. Immunol., 33:277-286 [1991]), SPVL7 (Vermot Desroches y col., *supra*), y M17 (IgG2a; disponibles en ATCC, los cuales son anticuerpos anti-CD11a murino de rata).

Ejemplos de anticuerpos anti-CD18 incluyen el MHM23 (Hildreth y col., *supra*), M18/2 (IgG2a; Sanches-Madrid y col., J. Exp. Med., 158:586 [1983]), H52 (Fekete y col., J. Clin. Lab. Immunol., 31:145-149 [1990]), Mas191c (Vermot Desroches y col., *supra*), IOT18 (Vermot Desroches y col., *supra*), 60.3 (Taylor y col., Clin. Exp. Immunol., 71:324-328 [1988]), y 60.1 (Campana y col., Eur. J. Immunol., 16:537-542 [1986]).

Otros ejemplos de antagonistas de LFA-1 adecuados, incluyendo anticuerpos, se describen en Hutchings y col., Nature, 348:639 (1990), patente internacional WO91/18011 publicada el 28/11/91, patente internacional WO 91/16928 publicada el 14/11/91, patente internacional WO 91/169278 publicada el 14/11/91, Can. Pat. Appln. 2.008.368 publicada el 13/6/91, patente internacional WO 90/15076 publicada el 12/12/90, patente internacional WO 80/10652 publicada el 20/9/90, patente europea 387.668 publicada el 19/9/90, patente europea EP 379.904 publicada el 1/8/90, patente europea EP 346.078 publicada el 13/12/89, patente americana U.S. 5.071.964, patente americana US 5.002.869, patente australiana 88115518 publicada el 10/11/88, patente europea EP 289.949 publicada el 9/11/88 y patente europea EP 303.692 publicada el 22/2/89.

Modos para llevar a cabo la invención

Descripción general de la invención

La presente invención concierne a la incorporación de un epitopo de unión al receptor de tipo silvestre de la región Fc de una IgG en un polipéptido de interés con el fin de incrementar su vida media circulante, pero sin perder su actividad biológica. Ello puede realizarse mediante utilización de cualquier procedimiento, como por ejemplo mutación de la región adecuada en el polipéptido de interés para mimetizar la región Fc, o mediante incorporación del epitopo en una etiqueta peptídica que a continuación se fusiona con el polipéptido de interés en cualquiera de los extremos o en el medio, o mediante síntesis del ADN o síntesis peptídica.

Un procedimiento sistemático para la preparación de dicha variante polipeptídica que tiene una vida media aumentada *in vivo* comprende diversas etapas. La primera implica la identificación de la secuencia y conformación de un epitopo de unión al receptor de tipo silvestre en una región Fc de una molécula de IgG. Una vez se ha identificado dicho epitopo, la secuencia del polipéptido de interés se modifica para incluir la secuencia y conformación del epitopo de unión identificado. Después de mutar la secuencia, la variante polipeptídica se analiza para ver si tiene una vida media más prolongada *in vivo* que la del polipéptido original, es decir, el polipéptido de interés. Si la variante polipeptídica no tiene una vida media más prolongada *in vivo* después del análisis, su secuencia se modifica una vez más para incluir la secuencia y conformación del epitopo de unión identificado. El polipéptido modificado se analiza de nuevo para comprobar que la vida media *in vivo* es más prolongada, y este proceso se continúa hasta la obtención de una molécula que presente una vida media *in vivo* más prolongada.

El epitopo de unión al receptor de tipo silvestre que se ha de incorporar en el polipéptido de interés es cualquier epitopo adecuado tal como se definió más arriba, y su naturaleza dependerá de por ejemplo el tipo de polipéptido a modificar. La transferencia se realiza de modo que la actividad biológica del polipéptido de interés se mantenga, es decir, la porción transferida no afecte adversamente la conformación del polipéptido de interés ni afecte su unión con ligandos que confieran su actividad biológica. Por ejemplo, si el polipéptido de interés es un anticuerpo, el epitopo de unión al receptor silvestre no se colocará de modo que pueda interferir con el sitio de unión antígeno-anticuerpo del anticuerpo.

El polipéptido de interés contiene un dominio Ig o de tipo Ig que no es un dominio CH2 y en donde el epitopo de unión al receptor se coloca entre este dominio Ig o de tipo Ig. Este epitopo constituye una región en donde cualquiera de los residuos aminoacídicos de uno o de los dos bucles del dominio Fc se transfieren a una posición análoga del dominio Ig o de tipo Ig del polipéptido de interés. Preferentemente, se transfieren tres o más residuos de uno o dos bucles del dominio Fc. El epitopo se obtiene del dominio CH2 de la región Fc (por ejemplo, de una IgG) y se transfiere a CH1, CH3 o a la región VH, o a más de una región, de un dominio de Ig o de tipo Ig, o el epitopo se obtiene del dominio CH2 de la región Fc y se transfiere a la región CL o VL, o a ambas, de un dominio Ig o de tipo Ig del polipéptido de interés.

Por ejemplo, para los propósitos de las variantes en donde el polipéptido de interés es un anti-CD18, como referencia véase la Figura 2, que ilustra las estructuras primarias consenso relevantes de diversas Igs, es decir, dominio CH1 de IgG1 humana, dominio CH1 de IgG2 humana, dominio CH1 de IgG3 humana, dominio CH1 de IgG4 humana, dominio CL de kappa humana y dominio CL de lambda humana, así como la secuencia específica para v1b de Fab,

una variante preferida FAb anti-CD18 de la presente invención. Además, la Fig. 2 indica los residuos de Fab v1b que son de interés o de mayor importancia. En una realización preferida, los residuos de importancia son aquellos con un asterisco en la Figura 2, es decir en un bucle de Fab v1b, residuos MIS con un residuo T un aminoácido más hacia el extremo C-terminal, y otro bucle de Fab v1b, HQN con un residuo D dos aminoácidos más hacia el extremo C-terminal y un residuo D un aminoácido más hacia el extremo C-terminal.

En otra realización preferida, el epitopo de unión al receptor de tipo silvestre es un polipéptido que no es un Fc que contenga la secuencia(s) (5' a 3'):

PKNSSMISNTP (N° ID SEC:3),

y opcionalmente contiene además la secuencia seleccionada del grupo que consiste en HQNLSDBGK (N° ID SEC:1) O HQNLSDBGK (N° ID SEC:2), en particular si el polipéptido de interés es un Fab o (Fab')₂.

En otra realización preferida, el epitopo de unión al receptor de tipo silvestre es un polipéptido que no es un Fc y que contiene la(s) secuencia(s) (5' a 3'): HQNLSDBGK (N° ID SEC:1) o (HQNLSDBGK (N° ID SEC:2), y la secuencia: PKNSSMISNTP (N° ID SEC:3). Este epitopo se fusiona de forma adecuada con el polipéptido de interés, y un aspecto preferido se contempla un péptido que se fusiona con el polipéptido de interés. Ejemplos de polipéptidos de interés adecuados para este propósito incluyen aquellos que tienen una estructura secundaria o terciaria alterada, con sus consecuencias adversas, si la secuencia está mutada, como la hormona de crecimiento o el factor de crecimiento nervioso.

En una realización, la variante puede prepararse mediante procedimientos recombinantes. Por ello, el ácido nucleico que codifica la variante se prepara en un vector replicable y dicho vector se utiliza para transfectar o transformar células huésped adecuadas para su expresión. La variante polipeptídica se produce mediante cultivo de células huésped en un medio de cultivo y la recuperación de la variante polipeptídica del cultivo de células huésped.

Si la variante polipeptídica se secreta, se recupera a partir del medio de cultivo. En otra realización, la variante polipeptídica se prepara mediante modificación de un polipéptido de interés que se elimina por el riñón y que no contiene una región Fc de una IgG de modo que comprende un epitopo de unión al receptor de tipo silvestre de una región Fc de una IgG y tiene una vida media *in vivo* más prolongada. La etapa de modificación se realiza preferentemente mediante el procedimiento de Kunkel, mutagénesis dirigida, mutagénesis por casete, o mutagénesis por PCR. La mutagénesis según Kunkel se describe en Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:488-492 (1985).

2. Preparación de polipéptidos de interés y sus variantes

La mayor parte de la discusión atañe a la producción del polipéptido de interés o variante polipeptídica mediante cultivo de células con un vector que contenga el ácido nucleico codificante del polipéptido de interés o variante polipeptídica y la recuperación del polipéptido o variante polipeptídica del cultivo celular. Se prevé además que el polipéptido de interés pueda producirse mediante recombinación homóloga, tal como se proporciona en la patente internacional WO 91/06667 publicada el 16 de Mayo de 1991. En resumen, este procedimiento implica la transformación de células de mamífero primarias que contienen el polipéptido endógeno (por ejemplo, células humanas si el polipéptido es humano) con una construcción (es decir, el vector) que comprende un gen amplificable (por ejemplo, el de la dihidrofolato reductasa (DHFR) u otros discutidos más adelante) y al menos una región flanqueante de una longitud de al menos 150 pb que es homóloga con una secuencia de ADN en el locus de la región codificante del gen del polipéptido de interés para proporcionar la amplificación del gen que codifica el polipéptido de interés. El gen amplificable debe hallarse en un lugar que no interfiera con la expresión del gen que codifica el polipéptido de interés. La transformación se realizó de modo que la construcción se integrara de forma homóloga en el genoma de células primarias para definir una región amplificable.

A continuación, se seleccionan las células primarias por la presencia del gen amplificable u otro marcador presente en la construcción. La presencia del gen marcador determinar la presencia y la integración de la construcción en el genoma del huésped. No es necesario realizar otra selección adicional, ya que la selección se realizará en el segundo huésped. Si se desea, puede determinarse la ocurrencia de recombinación homóloga mediante PCR y secuenciando las secuencias de DNA amplificadas resultantes, o determinando la longitud del fragmento de PCR cuando el ADN de los integrantes homólogos correctos estén presentes y expandiendo sólo aquellos que contengan dichos fragmentos. También si se desea, las células seleccionadas pueden amplificarse en este punto estresando las células con el agente de amplificación adecuado (como el metotrexato si el gen amplificable es el DHFR), para obtener así múltiples copias del gen diana. Preferentemente, sin embargo, la etapa de amplificación no se realiza hasta después de la segunda transformación descrita más abajo.

Después de la etapa de selección, las porciones de ADN genómico, suficientemente grandes para incluir la región amplificable entera, se aíslan de las células primarias seleccionadas. Las células huésped secundarias de expresión en mamíferos se transforman a continuación con las porciones de ADN genómicas y se clonan, por último se seleccionan los clones que contengan la región amplificable. Dicha región amplificable se amplifica mediante un agente de amplificación, si no lo está ya en las células primarias. Por último, las células huéspedes secundarias de expresión que comprenden ahora múltiples copias de la región amplificable que contiene el polipéptido de interés se crecen para expresar el gen y producir el polipéptido.

A. Aislamiento del ADN que codifica el polipéptido de interés

El ADN que codifica el polipéptido de interés puede obtenerse a partir de cualquier librería de ADNc preparada del tejido que supuestamente presente el ARNm que codifica el polipéptido de interés y que lo exprese a un nivel detectable. El gen que codifica el polipéptido de interés también puede obtenerse de una librería genómica o mediante la síntesis de oligonucleótidos *in vitro*, asumiendo que la secuencia nucleotídica o aminoacídica sea conocida.

Las librerías se criban con sondas diseñadas para identificar el gen de interés o la proteína codificada por éste. Para las librerías de expresión de ADNc, sondas adecuadas incluyen anticuerpos monoclonales o policlonales que reconocen y se unen de forma específica con el polipéptido de interés; los oligonucleótidos de aproximadamente 20-80 bases de longitud que codifican porciones conocidas o posibles del ADNc que codifica el polipéptido de interés de la misma o distinta especie; y/o los ADNcs complementarios u homólogos o fragmentos de lo mismo que codifican el mismo o un gen similar. Sondas adecuadas para el cribado de librerías de ADN incluyen, pero no se limitan a, oligonucleótidos, ADNcs, o fragmentos de lo mismo que codifican el mismo o un gen similar, y/o ADNcs o fragmentos de ADN genómicos homólogos. El cribado de la librería de ADNc o genómica con la sonda seleccionada puede realizarse utilizando procedimientos estándares tal como se describe en los capítulos 10-12 de Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).

Un medio alternativo para aislar el gen que codifica el polipéptido de interés es utilizar la metodología de la PCR tal como se describe en la Sección 14 de Sambrook y col., *supra*. Este procedimiento requiere de la utilización de oligonucleótidos tal como se describe más abajo.

Un procedimiento preferido para la práctica de la presente invención es utilizar secuencias oligonucleotídicas seleccionadas cuidadosamente para cribar las librerías de ADNc de tejidos diversos.

Las secuencias de oligonucleótidos seleccionadas como sondas deberían ser de longitud suficiente y lo suficientemente no ambiguas para minimizar falsos positivos. La(s) secuencia(s) nucleotídica(s) se basan generalmente en secuencias nucleotídicas conservadas o altamente homólogas. Los oligonucleótidos pueden generarse en una o más posiciones. La utilización de oligonucleótidos degenerados puede ser de especial importancia si una librería se criba de una especie en la que no se conoce la utilización de codón preferencial.

El oligonucleótido debe estar marcado para que pueda ser detectado tras hibridación con el ADN de la librería a cribar. El procedimiento preferido de marcaje es utilizar ATP-marcado con P^{32} mediante polinucleótido quinasa, tal como es bien conocido en la materia, para marcar radioactivamente el oligonucleótido. Sin embargo, pueden utilizarse otros procedimientos para marcar el oligonucleótido, incluyendo, pero sin limitarse a, la biotinización o el marcaje enzimático.

De particular interés es el ácido nucleico que codifica el polipéptido de interés y que codifica un polipéptido de secuencia completa. En algunas realizaciones preferidas, la secuencia del ácido nucleico incluye la secuencia señal del polipéptido de interés. El ácido nucleico que tiene toda la secuencia codificante de la proteína se obtiene mediante cribado de librerías de ADNc seleccionadas o genómicas mediante la utilización de la secuencia aminoacídica deducida descrita aquí por primera vez, si fuera necesario, mediante utilización de procedimientos convencionales de extensión de cebador tal como se describe en la Sección 7.79 de Sambrook y col., *supra*, para detectar precursores e intermediarios del procesamiento del ARNm que no se han retro-transcrito en ADNc.

B. Preparación de variantes del polipéptido de interés

Las variantes del polipéptido de interés se preparan de forma adecuada introduciendo cambios nucleotídicos adecuados tal como se indicó más arriba para la región Fc en el ADN que codifica el polipéptido de interés, o mediante síntesis *in vitro* de la variante del polipéptido deseado. Dichas variantes incluyen, por ejemplo, delecciones de, o inserciones o sustituciones de, residuos dentro de la secuencia aminoacídica del polipéptido de interés de modo que contengan el epitopo adecuado y tengan una vida media más prolongada en el suero. Se realizará cualquier combinación de delección, inserción, y sustitución con tal de conseguir la construcción final, siempre que la construcción final presente las características deseadas. Los cambios aminoacídicos también pueden alterar procesos post-traduccionales del polipéptido de interés, como el cambio del número o posición de sitios de glicosilación. Además, al igual que muchos genes de mamífero, el polipéptido de interés puede estar codificado por genes con múltiples exones.

Para diseñar las variantes de secuencia aminoacídica del polipéptido de interés, se determinará la naturaleza de la mutación para el polipéptido específico de interés a modificar. Por ejemplo, un dominio de inmunoglobulina o de tipo inmunoglobulina se modificará inicialmente mediante localización de bucles que son estructuralmente similares a los dos bucles en CH2 de IgG que contiene el epitopo del receptor de tipo silvestre. Los sitios de mutación pueden modificarse individualmente o en serie, por ejemplo, mediante (1) sustitución en primer lugar con aminoácidos conservados y luego con selecciones más radicales, dependiendo de los resultados logrados, (2) deleccionando el residuo diana, o (3) insercionando residuos de la misma o diferente clase adyacentes con el sitio localizado, o combinaciones de las opciones 1-3.

Un procedimiento de utilidad para la identificación de ciertos residuos o regiones del polipéptido de interés que son localizaciones preferidas para la mutagénesis se denomina “mutagénesis por cribado de alaninas”, tal como se describe por Cunningham y Welles, Science, 244:1081-1085 (1989). Aquí, se identifica un residuo o grupo de residuos diana (por ejemplo residuos cargados como la arg, asp, his, lys y glu) y se reemplaza por un aminoácido cargado negativamente o neutro (más preferentemente alanina o polialanina) para alterar la interacción de los aminoácidos con el entorno acuoso que lo envuelve dentro o fuera de la célula. Aquellos dominios que demuestren una sensibilidad funcional con las sustituciones se refinan mediante introducción posterior de otras variantes en los sitios de sustitución. En consecuencia, mientras que el sitio de introducción de una variación de secuencia aminoacídica está predeterminado, la naturaleza de la mutación *per se* no necesita estar predeterminada. Por ejemplo, para optimizar la realización de una mutación en un sitio dado, se realiza la mutagénesis del cribado de alaninas o aleatoria en el codón o región diana y las variantes producidas se criban para obtener una vida media circulante más prolongada.

Las deleciones de secuencia aminoacídica se hallan generalmente en el intervalo de 1 a 30 residuos, más preferentemente entre 1 a 10 residuos, y típicamente son contiguas. Las deleciones contiguas generalmente se realizan en números pares de residuos, pero las deleciones de un número impar o de un solo residuo también se incluyen dentro de la invención. Como ejemplo, las deleciones pueden introducirse en regiones de homología baja entre los anticuerpos LFA-1 que comparten la mayor identidad de secuencia con la secuencia aminoacídica del polipéptido de interés para modificar la vida media del polipéptido. Las deleciones del polipéptido de interés en áreas de homología importante con uno de los sitios de unión de los otros ligandos modificarán probablemente la actividad biológica del polipéptido de interés. Se seleccionará el número consecutivo de deleciones para preservar la estructura terciaria del polipéptido de interés en el dominio afectado, por ejemplo, la hoja beta-plegada o la hélice alfa.

Las inserciones de secuencia aminoacídica incluyen fusiones amino- y/o carboxi-terminal en un intervalo de longitud de un residuo a polipéptidos que contienen cientos o más residuos, así como inserciones intra-secuencia de un solo o múltiples residuos aminoacídicos. Las inserciones intra-secuencia (es decir, inserciones dentro de la secuencia polipeptídica madura) pueden ser del orden de 1 a 10 residuos, más preferentemente de 1 a 3. Las inserciones se realizan preferentemente en números pares de residuos, aunque no es un requisito. Los ejemplos de inserciones incluyen inserciones con la porción interna del polipéptido de interés, así como fusiones N- o C-terminales con proteínas o polipéptidos que contienen el epitopo deseado que dará como resultado, tras la fusión, un aumento en la vida media.

Un tercer grupo de variantes son las variantes de sustitución aminoacídica. Estas variantes tienen por lo menos un residuo aminoacídico delecionado en la molécula polipeptídica y un residuo distinto insertado en su lugar. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis por sustitución incluyen uno o más bucles en los anticuerpos. Otros sitios de interés son aquellos en los que residuos particulares del polipéptido obtenido a partir de especies diversas son idénticos entre todas las especies animales del polipéptido de interés, este grado de conservación sugiere la importancia de conseguir una actividad biológica común con estas moléculas. Estos sitios, especialmente los que se hallan dentro de una secuencia de al menos tres sitios conservados de forma idéntica, se sustituyen de forma relativamente conservada. Dichas sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla I bajo el encabezamiento de sustituciones preferidas. Si dichas sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces se introducen cambios más esenciales, denominados sustituciones ejemplares en la Tabla 1, o tal como se describe más adelante en referencia a las clases de aminoácidos, y posteriormente se criban sus productos.

TABLA 1

Residuo original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferidas
Ala (A)	Val; leu; ile	Val
Arg (R)	Lys; gln; asn	Lys
Asn (N)	Gln; his; lys; arg	Gln

ES 2 317 645 T3

	Asp (D)	Glu	Glu
	Cys (C)	Ser	Ser
5	Gln (Q)	Asn	Asn
	Glu (E)	Asp	Asp
	Gly (G)	Pro; ala	Ala
10	His (H)	Asn; gln; lys; arg	Arg
	Ile (I)	Leu; val; met; ala;	
		phe;norleucina;	
15	Leu (L)	Norleucina;ile	Ile
		Val;met;ala;phe	
	Lys (K)	Arg;gln;as	Arg
20	Met (M)	Leu;phe;ile	Leu
	Phe (F)	Leu ;val ;ile ;ala ;	Leu
		Tyr	
25	Pro (P)	Ala	Ala
	Ser (S)	Thr	Thr
30	Thr (T)	Ser	Ser
	Trp (W)	Tyr ;phe	Tyr
	Tyr (Y)	Trp ;phe ;thr ;ser	Phe
35	Val (V)	Ile ;leu ;met ;phe ;	leu
		Ala ;norleucina	

40 Las modificaciones esenciales en función del polipéptido de interés se logran seleccionando las sustituciones que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura del esqueleto del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en hoja o en hélice, (b) el cambio o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los residuos que ocurren de forma natural se dividen

45 en dos grupos basados en sus propiedades comunes de las cadenas laterales:

(1) hidrofobicidad: norleucina, met, ala, val, leu, ile:

(2) hidrofílico neutro: cys, ser, thr

50 (3) ácido: asp, glu

(4) básico: asn, gln, his, lys, arg

55 (5) residuos que influyen la orientación de la cadena: gly, pro; y

(6) aromáticos: trp, tyr, phe.

60 Las sustituciones no conservadas implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otro de clase distinta. Dichos residuos sustituidos también pueden introducirse en sitios de sustitución conservada o, más preferentemente, en los sitios restantes (no-conservados).

65 Puede ser deseable inactivar una o más dianas de corte presentes en la molécula. Estas dianas se identifican mediante inspección de la secuencia aminoacídica, en el caso de la tripsina, por ejemplo, para un residuo arginil o lisinil. Una vez identificadas las dianas de corte, se inactivan éstas al corte proteolítico mediante sustitución del residuo diana por otro residuo; preferentemente un residuo básico como la glutamina o un residuo hidrofílico como la serina; mediante delección del residuo; o mediante inserción de un residuo prolil inmediatamente después del residuo.

En otra realización, cualquiera de los residuos metionil distinto al residuo metionil de inicio de la secuencia señal, o cualquier residuo localizado aproximadamente en los tres residuos N- o C-terminal respecto a cada uno de los mencionados residuos metionil, se sustituye por otro residuo (preferentemente según la Tabla 1) o se deleciona. Alternativamente, aproximadamente de 1-3 residuos se insertan en dichos sitios adyacentes.

También pueden sustituirse cualquiera de los residuos cisteína no implicados en el mantenimiento de la conformación adecuada del polipéptido de interés, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y prevenir una unión aberrante.

En la primera realización, las moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencia aminoacídica del polipéptido de interés se preparan mediante diversos procedimientos conocidos en la materia. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, la preparación mediante mutagénesis dirigida por oligonucleótidos (o mutagénesis de sitio dirigida), mutagénesis por PCR, y mutagénesis por casete de una variante preparada con anterioridad o de una versión no variante del polipéptido sobre el cual se basa la variante ("polipéptido de interés").

La mutagénesis mediada por oligonucleótidos es un procedimiento preferido para la preparación de las variantes de sustitución, delección e inserción. Esta técnica es bien conocida en la materia tal como se describe en Adelman y col., DNA, 2:183 (1983). En resumen, el ADN se altera mediante hibridación con un oligonucleótido que codifica una mutación deseada con un molde de ADN, en donde el molde se halla en la forma de una cadena sencilla de un plásmido o un bacteriófago que contiene la secuencia de ADN no alterada o nativa del polipéptido a variar. Después de la hibridación, se utiliza una ADN polimerasa para sintetizar una segunda cadena complementaria del molde que por ello incorporará el cebador oligonucleotídico, y codificará la alteración seleccionada del ADN.

Por lo general, se utilizan oligonucleótidos de al menos 25 nucleótidos de longitud. Un oligonucleótido óptimo tendrá de 12 a 15 nucleótidos que sean completamente complementarios con el molde en cada extremo del nucleótido(s) codificante(s) de la mutación. Ello asegura que el oligonucleótido hibride adecuadamente con la molécula de ADN molde de cadena sencilla. Los oligonucleótidos se sintetizan fácilmente mediante técnicas conocidas en la materia tal como se describe por Crea y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75:5765 (1978).

El molde de ADN puede generarse mediante vectores derivados del bacteriófago M13 (los vectores M13mp18 y M13mp19 son útiles disponibles comercialmente), o vectores que contengan un origen de de replicación de fago de cadena sencilla tal como se describe por Viera y col., Meth. Enzymol., 153:3 (1987). Por ello, el ADN que se ha de mutar puede insertarse en uno de estos vectores para generar el molde de cadena sencilla. La producción de molde de cadena sencilla es tal como se describe en las Secciones 4.21-4.41 de Sambrook y col., *supra*.

Alternativamente, el molde de ADN de cadena sencilla puede generarse mediante desnaturalización del DNA plasmídico de doble cadena (u otro) mediante técnicas estándares.

Para la modificación de la secuencia de ADN original para generar las variantes de polipéptidos de la presente invención, el oligonucleótido se hibrida con el molde de cadena sencilla en condiciones adecuadas de hibridación. Una enzima polimerizante de ADN, generalmente el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I, se añade para sintetizar la cadena complementaria del molde utilizando el oligonucleótido como cebador para la síntesis. Se forma entonces una molécula de heterodúplex con una cadena de ADN que codifica la forma mutada del polipéptido y otra cadena (el molde original) que codifica el original, secuencia no modificada del polipéptido. Esta molécula heterodúplex se transforma a continuación en una célula huésped adecuada, generalmente una procariota como *E. coli* JM101. Después de que las células hayan crecido, se plaquean en placas de agarosa y se criban con un cebador oligonucleotídico marcado radioactivamente con P³² para identificar las colonias de bacterias que contienen el ADN mutado. La región mutada se extrae y se coloca en un vector adecuado para la producción de proteína, generalmente un vector de expresión del tipo utilizado típicamente para la transformación de un huésped adecuado.

El procedimiento descrito más arriba puede modificarse para crear una molécula heterodúplex en donde ambas cadenas del plásmido contengan la mutación (mutaciones). Las modificaciones se realizan de la manera siguiente. El oligonucleótido de cadena sencilla se hibrida con el molde de cadena sencilla tal como se ha descrito más arriba. Una mezcla de tres desoxiribonucleótidos, desoxiriboadenosina (sATP), desoxiriboguanosina (dGTP), y desoribotimidina (dTTP), se combinan con una tio-desoxiribocitosina denominada dCTP-(α S) (los cuales pueden obtenerse del American Corporation). Esta mezcla se añade al complejo molde-oligonucleótido. Tras adición de la ADN polimerasa a la mezcla, se genera una cadena de ADN idéntica al molde excepto para las bases mutadas. Además, esta nueva cadena de ADN contendrá dCTP-(α S) en lugar de dCTP, que sirve para protegerla de la digestión con endonucleasas de restricción.

Después de cortar la cadena molde del heterodúplex de cadena doble con una enzima de restricción adecuada, la cadena molde se digiere con nucleasa ExoIII u otra nucleasa adecuada más allá de la región que contiene la diana (s) a mutar. La reacción se para a continuación para dejar una molécula que es sólo parcialmente de cadena sencilla. A continuación se forma un homodúplex de ADN de cadena doble con ADN polimerasa en presencia de los 4 desoxiribonucleótidos trifosfatos, ATP y ADN ligasa. Esta molécula de homodúplex puede transformarse en una célula huésped adecuada como por ejemplo *E. coli* JM101, tal como se describió más arriba.

Los mutantes del ADN codificante del polipéptido con uno o más aminoácidos a sustituir pueden generarse de diversas formas. Si los aminoácidos se localizan próximos en la cadena polipeptídica, pueden mutarse simultáneamente con un oligonucleótido que codifique todas las sustituciones de aminoácidos deseadas. Sin embargo, si los aminoácidos se localizan a cierta distancia unos de otros (separados por más de unos 10 aminoácidos), es más difícil de generar un oligonucleótido único que codifique todos los cambios deseados. En su lugar, puede utilizarse uno de los dos procedimientos alternativos.

En el primer procedimiento, un oligonucleótido separado se genera para cada aminoácido a sustituir. Los oligonucleótidos se hibridan al ADN molde de cadena sencilla simultáneamente, y se sintetiza la segunda cadena de ADN a partir del molde que codificará las sustituciones de aminoácidos deseadas.

El procedimiento alternativo implica dos o tres rondas de mutagénesis para producir el mutante deseado. La primera ronda es tal como se describió para los mutantes sencillos: se utiliza el ADN de tipo silvestre para el molde, un oligonucleótido que codifica la primera sustitución (sustituciones) deseada se hibrida con este molde y se genera la molécula de ADN heterodúplex. La segunda ronda de mutagénesis utiliza el ADN mutado producido en la primera ronda de mutagénesis como molde. De este modo, el molde ya contiene una o más mutaciones. El oligonucleótido que codifica la sustitución (sustituciones) de aminoácidos deseados se hibrida con este molde, y la cadena resultante de ADN codifica ahora las mutaciones de ambas rondas de mutagénesis. Este ADN resultante puede utilizarse como molde en una tercera ronda de mutagénesis y así sucesivamente.

La mutagénesis por PCR es también adecuada para generar las variantes aminoacídicas de la presente invención. Mientras que la discusión siguiente hace referencia al ADN, se entenderá que la técnica también halla aplicación para el ARN. La técnica de la PCR hace referencia por lo general al siguiente proceso (véase Erlich, *supra*, el capítulo de R. Higuchi, p. 61-70). Cuando se utilizan cantidades pequeñas de ADN molde como material de inicio en una PCR, pueden utilizarse cebadores que difieran ligeramente en la secuencia de la región correspondiente en un ADN molde para generar cantidades relativamente grandes de un fragmento de ADN que difiera de la secuencia molde únicamente en las posiciones en donde los cebadores difieren del molde. Para la introducción de una mutación en un ADN plasmídico, uno de los cebadores se diseña para solapar la posición de la mutación y para contener la mutación: la secuencia del otro cebador debe ser idéntica a un tramo de secuencia del otro cebador y debe hallarse en una región de secuencia de la cadena opuesta del plásmido, pero esta secuencia puede localizarse en cualquier sitio en el plásmido. Sin embargo, es preferible que la secuencia del segundo cebador se localice a unos 200 nucleótidos del primero, de modo que al final toda la región del ADN amplificada por los cebadores pueda secuenciarse fácilmente. La amplificación de PCR utilizando una pareja como la descrita da como resultado una población de fragmentos de ADN que difieren en la posición de la mutación especificada por el cebador, y posiblemente en otras posiciones, ya que el copiado del molde es en cierta manera propenso a los errores.

Si el cociente del molde respecto al material del producto es extremadamente bajo, la gran mayoría de los fragmentos de ADN incorporan la(s) mutación(mutaciones) deseada(s). Este producto se utiliza para reemplazar la región correspondiente en el plásmido que sirvió como molde de PCR utilizando tecnología del ADN estándar. Pueden introducirse simultáneamente mutaciones en posiciones separadas utilizando un segundo cebador mutante, o realizando una segunda PCR con cebadores distintos y ligando los dos fragmentos de PCR resultante simultáneamente con el fragmento del vector en una ligación de tres (o más) etapas.

En un ejemplo específico de mutagénesis por PCR, el ADN del plásmido molde (1 μ g) se lineariza mediante digestión con una endonucleasa de restricción que tiene una diana de reconocimiento única en el ADN fuera de la región a amplificar. De este material, se añaden 100 ng a una mezcla de PCR que contiene tampón de PCR, con cuatro desoxinucleótidos trifosfatos incluidos en los equipos GeneAmp® (obtenidos de PerkinElmer Cetus, Norwalk, CT y Emeryville, CA), y 25 pmoles de cada cebador oligonucleotídico, a un volumen final de 50 μ l. La mezcla de reacción se recubre con 35 μ l de aceite mineral. La mezcla de reacción se desnaturaliza durante 5 minutos a 100°C, se coloca brevemente en hielo y luego se añade la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq) (5 unidades/ μ l, de Perkin Elmer Cetus) por debajo de la capa de aceite mineral. La mezcla de reacción se inserta en un DNA Thermal Cycle (de Perkin Elmer Cetus) programado de la manera siguiente:

2 min a 55°C
30 s, 72°C, luego 19 ciclos de:
30 s a 94°C
30 s a 55°C y
30 s a 72°C.

Al término del programa, el vial de reacción se retira del termociclador y se transfiere la fase acuosa a un nuevo vial, se extrae con fenol/cloroformo (50:50 vol) y se precipita con etanol, y se recupera el ADN mediante procedimientos estándares. Este material se somete subsiguientemente a tratamientos adecuados para su inserción en un vector.

Otro procedimiento para la preparación de variantes, la mutagénesis por casete, se basa en la técnica descrita por Wells y col., *Gene*, 34:315 (1985). El material de inicio es el plásmido (u otro vector) que contenga el ADN a mutar. Se identifican los codones en el ADN a mutar. Debe existir una diana única de endonucleasa de restricción en cada uno de los extremos del sitio(s) de mutación identificado(s). Si no hubiera una diana de restricción, es posible generarla utilizando el procedimiento de mutagénesis por oligonucleótidos descrito anteriormente para introducirlas en las localizaciones adecuadas en el ADN. Después de haber introducido las dianas de restricción en el plásmido, éste se corta por dichas dianas para su linearización. Se sintetiza un oligonucleótido de doble cadena que codifique la secuencia del ADN entre las dianas de restricción y que contenga la mutación (mutaciones) deseada(s) mediante procedimientos estándares. Las dos cadenas se sintetizan separadamente y luego se hibridan juntas utilizando técnicas estándares. Este oligonucleótido de doble cadena se refiere como el casete. Este casete se diseña para tener extremos 3' y 5' compatibles con los extremos del plásmido linearizado, de modo que pueda ligarse directamente con el plásmido. Este plásmido contiene ahora la secuencia del ADN mutada.

C. Inserción de ácido nucleico en el vector replicable

El ácido nucleico (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) que codifica la variante polipeptídica se inserta en un vector replicable para su posterior clonaje (amplificación del ADN) o para la expresión. Muchos vectores están disponibles, y la selección del vector adecuado dependerá de 1) si se ha de utilizar para la amplificación del ADN o para la expresión del ADN, 2) el tamaño del ácido nucleico a insertar en el vector, y 3) la célula huésped a transformar con el vector. Cada vector contiene diversos componentes dependiendo de su función (amplificación del ADN o expresión del ADN) y de la célula huésped con la que es compatible. Los componentes del vector incluyen por lo general, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento intensificador de la transcripción, un promotor, y una secuencia de finalización de la transcripción.

(i) Componente de secuencia señal

Las variantes polipeptídicas de la presente invención pueden producirse no sólo directamente, sino también con un polipéptido heterólogo, preferentemente una secuencia señal u otro polipéptido que tenga una diana de corte específica en el extremo N terminal de la variante polipeptídica madura. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN que se ha insertado en el vector. La secuencia señal heteróloga seleccionada debería ser una secuencia que pueda ser reconocida y procesada por la célula huésped (es decir, cortada por una peptidasa señal). Para las células huésped procariontas que no reconozcan ni procesen el polipéptido de secuencia señal de interés, la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal seleccionada, por ejemplo, a partir del grupo que consiste en la fosfatasa alcalina, penicilinas, Ipp, o los líderes de la enterotoxina termoestable II. Para la secreción en levaduras, la secuencia señal original o de tipo silvestre puede sustituirse por ejemplo por el líder de la invertasa de levadura, el líder del factor alfa de levadura (incluyendo los líderes del factor- α de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, el último descrito en la patente americana U.S. 5.010.182 publicada el 23 de Abril de 1991), el líder de la fosfatasa ácida, el líder de la amilasa salivar de ratón, el líder de la carboxipeptidasa, el líder de BAR1, el líder de la lipasa de *Humicola lanuginosa*, el líder de la glucoamilasa de *C. albicans* (patente europea EP 362.179, publicada el 4 de Abril de 1990), o la secuencia señal descrita en la patente internacional WO 90/1346 publicada el 15 de Noviembre de 1990. Para la expresión de células de mamífero, la secuencia señal humana (es decir, la presecuencia del polipéptido que dirige normalmente la secreción del polipéptido nativo de interés a partir del cual se deriva la variante de interés de las células humanas *in vivo*) es satisfactoria, aunque otras secuencias señal de mamífero también pueden ser adecuadas, como las secuencias señal de otros polipéptidos animales y las secuencias señal de polipéptidos secretados de la misma o especies relacionadas, así como los líderes secretores virales, por ejemplo, la señal gD del *Herpes simplex*.

El ADN para dicha región precursora se liga en la misma pauta de lectura con el ADN que codifica la variante polipeptídica madura.

(ii) Componente de origen de replicación

Tanto los vectores de expresión como los de clonaje contienen una secuencia de ácido nucleico que permite al vector replicarse en una o más células huésped seleccionadas. Por lo general, en los vectores de clonaje esta secuencia es tal que permite al vector replicarse independientemente del ADN cromosómico del huésped, e incluye los orígenes de replicación o secuencias de replicación autónomas. Dichas secuencias son bien conocidas para diversas bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación a partir del plásmido pBR322 (ATCC 37.017), o a partir de vectores bacterianos disponibles comercialmente como por ejemplo, pKK223-3 (Farmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) y pGEM1 (Promega Biotech, Madison, Wis.), es adecuado para la gran mayoría de bacterias Gram-negativas, el origen del plásmido 2 μ es adecuado para levaduras, y diversos orígenes virales (SV40, polioma, adenovirus, VSV, o BPV) son de utilidad para los vectores de clonaje en células de mamífero. Por lo general, el componente de replicación no es necesario para los vectores de expresión en mamíferos (el origen de SV40 puede utilizarse de forma típica sólo porque contiene un promotor temprano).

Muchos de los vectores de expresión son vectores "lanzadera", es decir, son capaces de replicarse en al menos una clase de organismos pero pueden transfectarse en otro organismo para su expresión. Por ejemplo, un vector se clona en *E. coli* y luego el mismo vector se transfecta en células de levaduras o de mamífero para su expresión aún cuando no sea capaz de replicarse independientemente del cromosoma de la célula huésped.

El ADN también puede amplificarse mediante inserción en el genoma del huésped. Ello se logra utilizando especies de *Bacillus* como huéspedes, por ejemplo mediante inclusión en el vector de una secuencia de ADN que sea complementaria con una secuencia hallada en el ADN genómico de *Bacillus*. La transfección de *Bacillus* con este vector resulta en la recombinación homóloga con el genoma y la inserción del ADN. Sin embargo, la recuperación del ADN genómico que codifica la variante polipeptídica es más compleja que la de un vector replicado exógenamente porque se requiere la digestión con enzimas de restricción para extraer el ADN.

(iii) *Componente de gen de selección*

Los vectores de expresión y clonaje deberían contener un gen de selección, también denominado un marcador seleccionable. Este gen codifica una proteína necesaria para la supervivencia o el crecimiento de las células huéspedes transformadas que crecen en un medio de cultivo selectivo. Las células huéspedes no transformadas con el vector que contiene el gen no sobrevivirán en el medio de cultivo. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato, o tetraciclina, (b) complementan las deficiencias auxotróficas, o (c) aportan los nutrientes críticos no disponibles por el medio complejo, por ejemplo, el gen que codifica la racemasa D-alanina para *Bacilli*.

Un ejemplo de esquema de selección utiliza un fármaco para parar el crecimiento de una célula huésped. Aquellas células que se transforman con éxito con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia al fármaco y por ello sobreviven al régimen de selección. Ejemplos de dicha selección dominante utilizan el fármaco neomicina (Southern y col., *J. Molec. Appl. Genet.*, 1:327 [1982]), el ácido micofenólico (Mulligan y col., *Science*, 209: 1422 [1980]), o higromicina (Sugden y col., *Mol. Cell. Biol.*, 5:410-413 [1985]). Los tres ejemplos proporcionados anteriormente utilizan genes bacterianos bajo control eucariota para convertir la resistencia al fármaco G418 o neomicina (geneticina), xgpt (ácido micofenólico), o higromicina, respectivamente.

Otro ejemplo de marcadores seleccionables para células de mamífero son aquellos que permiten la identificación de células competentes para incorporar el ácido nucleico, como el DHFR o la timidina quinasa. Los transformantes de células de mamífero se colocan bajo presión de selección que sólo los transformantes se adaptan únicamente para sobrevivir en virtud de haber incorporado el marcador. La presión de selección se impone mediante cultivo de los transformantes en condiciones en las cuales la concentración del agente de selección en el medio se cambia sucesivamente, lo que conduce a la amplificación de ambos genes de selección y del ADN que codifica la variante polipeptídica. La amplificación es el proceso por el que genes en mayor demanda para la producción de una proteína crítica para el crecimiento se hallan reiteradamente dentro del cromosoma de generaciones sucesivas de células recombinantes. Se sintetizan cantidades aumentadas de la variante polipeptídica a partir del ADN amplificado. Otros ejemplos de genes amplificables incluyen la metalotioneína-I y la II, preferentemente los genes de metalotioneína de primates, la adenosina deaminasa, la descarboxilasa ornitina, etc.

Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección DHFR se identifican en primer lugar mediante cultivo de todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Una célula huésped adecuada cuando se utiliza el DHFR de tipo silvestre es la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en actividad DHFR, preparada y propagada tal como describe Urlaub y Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980). Las células transformadas se exponen a continuación a niveles crecientes de metotrexato. Ello conduce a la síntesis de copias múltiples del gen DHFR, y, concomitantemente, múltiples copias de otro ADN contenido en los vectores de expresión, como el ADN que codifica la variante polipeptídica. Esta técnica de amplificación puede utilizarse con cualquiera de los huéspedes adecuados, por ejemplo ATCC No. CCL61 CHO-K1, a pesar de la presencia de DHFR endógeno si, por ejemplo, se utiliza un gen DHFR mutante que sea altamente resistente a Mtx (patente europea EP 117.060).

Alternativamente, las células huésped (en particular las huéspedes de tipo silvestre que contienen el gen DHFR endógeno) transformadas o co-transformadas con secuencias de ADN que codifica la variante polipeptídica, la proteína DHFR de tipo silvestre y otro marcador seleccionable como la aminoglicósido 3-fosfotransferasa (APH) pueden seleccionarse mediante crecimiento celular en medio que contenga un agente de selección para el marcador seleccionable como un antibiótico aminoglicósido, por ejemplo, kanamicina, neomicina, o G418. Véase la patente americana U.S. 4.065.199.

Un gen de selección adecuado para utilizar en levaduras es el gen *trp1* presente en el plásmido de levadura YRp7 (Stinchcomb y col., *Nature*, 282:39 [1979]; Kingsman y col., *Gene*, 7:141 [1979]; o Tschemper y col., *Gene*, 10:157 [1980]). El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura carente de la capacidad para crecer con triptófano, por ejemplo, ATCC, No. 44076 o PEP4-1 (Jones, *Genetics*, 85:12 [1977]). La presencia de la lesión *trp1* en el genoma de la célula huésped de levadura proporciona un entorno eficaz para detectar la transformación mediante crecimiento en ausencia de triptófano. De modo similar, las cepas de levadura deficientes en *Leu2* (ATCC No. 20.622 o 38.626) se complementan mediante plásmidos conocidos que portan el gen *Leu2*.

Además, los vectores derivados del plásmido circular 1,6 μ m pKD1 pueden utilizarse para la transformación de levaduras *Kluyveromyces*. Bianchi y col., *Curr. Genet.* 12:185 (1987). Más recientemente, un sistema de expresión para la producción a gran escala de quimosina de ternera se reportó para *K. lactis*. Van den Berg, *Bio/Technology*, 8:135 (1990). También se han descrito vectores de expresión de copias múltiples y estables para la secreción de albúmina sérica humana recombinante por cepas industriales de *Kluyveromyces*. Fleer y col., *Bio/Technology*, 9:968-975 (1991).

(iv) *Componente de promotor*

Los vectores de expresión y clonaje contienen generalmente un promotor que es reconocido por el organismo huésped y está unido operativamente al ácido nucleico. Los promotores son secuencias no traducidas localizadas
 5 cadena arriba (5') al codón de inicio de un gen estructural (generalmente entre 100 a 1000 pb) que controlan la transcripción y la traducción de una secuencia de ácido nucleico determinada, como la secuencia de ácido nucleico de las variantes polipeptídicas, con las que está unido operativamente. Dichos promotores se incluyen dentro de dos clases, los inducibles y los constitutivos. Los promotores inducibles son promotores que inician niveles aumentados de transcripción de ADN bajo su control en respuesta a ciertos cambios en las condiciones de cultivo, por ejemplo, la
 10 presencia o la ausencia de un nutriente o un cambio de temperatura. Actualmente, son bien conocidos un gran número de promotores reconocidos por diversas células huéspedes potenciales. Estos promotores están unidos operativamente al ADN codificante de la variante polipeptídica mediante eliminación del promotor a partir del ADN original mediante digestión con enzimas de restricción e inserción de la secuencia del promotor aislada en el vector. El promotor del polipéptido de interés y muchos promotores heterólogos pueden utilizarse para dirigir la amplificación y/o la expresión
 15 del ADN. Sin embargo, los promotores heterólogos son los preferidos, ya que generalmente permiten una mayor transcripción y rendimientos superiores de la variante polipeptídica de forma recombinante, en comparación con el promotor del polipéptido de interés.

Los promotores adecuados para utilizar con los huéspedes procariotas incluyen los sistemas de promotor de la β -lactamasa y la lactosa (Chang y col., *Nature*, 275:615 [1978]; y Goeddel y col., *Nature*, 281: 544 [1979]), la fosfatasa alcalina, un sistema de promotor del triptófano (trp) (Goeddel y col., *Nucleic Acids Sci. USA* 80:21-25 [1983]). Sin embargo, también son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Sus secuencias nucleotídicas se han publicado, con lo que es posible para un experto en la materia ligarlas al ADN codificante de la variante polipeptídica (Siebenlist y col., *Cell*, 20:269[1980]) mediante la utilización de engarces o adaptadores para aportar cualquier diana de restricción necesaria. Los promotores para utilizar en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) unida operativamente con el ADN que codifica la variante polipeptídica.

Las secuencias promotoras son conocidas en los eucariotas. Virtualmente todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada a aproximadamente 25 a 30 bases cadena arriba del sitio de inicio de la transcripción.
 30 Otra secuencia hallada a 70-80 bases cadena arriba del sitio de inicio de la transcripción de muchos genes es una región CXCAAT en donde X puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de muchos genes eucariotas es una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola poliA en el extremo 3' de la secuencia codificante. Todas las secuencias se insertan adecuadamente en vectores de expresión eucariotas.

Ejemplos de secuencias promotoras para utilizar con huéspedes de levadura incluyen los promotores de la 3-fosfoglicerato quinasa (Hitzeman y col., *J. Biol. Chem.*, 225:2073 [1980]) u otras enzimas glicolíticas (Hess y col., *J. Adv. Enzyme Reg.*, 7:149 [1969]; y Holland, *Biochemistry*, 17:4900 [1978]), como la enolasa, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, la hexoquinasa, la piruvato descarboxilasa, la fosfofructoquinasa, la glucosa-6-fosfato isomerasa, la 3-fosfoglicerato mutasa, la piruvato quinasa, la triosafofosfato isomerasa, la fosfoglucosa isomerasa y la glucoquinasa.

Otros promotores de levadura, que son promotores inducibles con la ventaja adicional de poseer una transcripción controlada en condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras de la alcohol deshidrogenasa 2, la isocitocromo C, la fosfatasa ácida, las enzimas de degradación asociadas con el metabolismo del nitrógeno, la metalotioneína, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y las enzimas responsables de la utilización de la maltosa y la galactosa.
 45 Los vectores y promotores adecuados para utilizar en la expresión de levaduras se describen además en Hitzeman y col., patente europea EP 73.657. Los intensificadores de la transcripción se utilizan ventajosamente con promotores de levaduras.

La transcripción de la variante polipeptídica de vectores en células huésped de mamífero está controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos a partir del genoma de virus como el virus del polio, el virus de la viruela aviar (patente inglesa UK 2.211.504, publicada el 5 de Julio de 1989), el adenovirus (como el Adenovirus 2), el virus del papiloma aviar, el virus del sarcoma aviar, el citomegalovirus, un retrovirus, el virus de la hepatitis B y más preferentemente el Virus Simio 40 (SV40), de promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, el promotor de la actina o un promotor de inmunoglobulina, de los promotores de proteínas choque térmico, y del promotor normalmente asociado con la secuencia de la variante polipeptídica siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de célula huésped.

Los promotores temprano y tardío del virus SV40 se obtienen como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación viral de SV40. Fiers y col., *Nature*, 273: 113 (1979); Mulligan y Berg, *Science*, 209:1422-1427 (1980); Pavlakis y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:7398-7402 (1981). El promotor temprano inmediato del citomegalovirus se obtiene de forma conveniente como un fragmento de restricción HindIII. Greenaway y col., *Gene*, 18:355-360 (1982). Un sistema para la expresión del ADN en huéspedes de mamífero utilizando el virus del papiloma bovino como vector se describe en la patente americana U.S. 4.419.446. Una modificación de este sistema se describe en la patente americana 4.601.979. Véase también Gray y col., *Nature*, 295:503-508 (1982) sobre la expresión de este ADNc que codifica el interferón inmune en células de mono; Reyes y col., *Nature*, 297:598-601 (1982) sobre la expresión del ADNc en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina quinasa del virus herpes simplex; Canaani y Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:6777-6781 (1982) sobre la expresión de secuencias CAT bacterianas en células de riñón de mono CV-1, fibroblastos embrionales de pollo, células de ovario de

hámster chino, células HeLa y células NIH-3T3 con la repetición larga terminal del virus del sarcoma de Rous como promotor.

(v) *Componente de elemento intensificador de la transcripción*

La transcripción de un ADN que codifica la variante polipeptídica de la presente invención por eucariotas superiores a menudo se incrementa mediante inserción con una secuencia intensificadora en el vector. Los intensificadores son elementos de acción en cis del ADN, generalmente de 10 a 300 pb que actúan sobre un promotor para aumentar su transcripción. Los intensificadores son relativamente independientes de su orientación y posición, se han hallado en 5' (Laimins y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:993 [1981]) y 3' (Lusky y col., Mol. Cell. Bio., 3:1108 [1983]) respecto a la unidad de transcripción, dentro de un intrón (Banerji y col., Cell, 33:729 [1983]), así como dentro de la propia secuencia codificante (Osborne y col., Mol. Cell Bio. 4:1293 [1984]). Muchas secuencias intensificadoras son ahora conocidas de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína, e insulina). Típicamente, sin embargo, se utilizará una secuencia intensificadora de un virus de células eucariotas. Ejemplos incluyen el intensificador del SV40 en la región tardía del origen de replicación (pb 100-270), el intensificador del promotor temprano de citomegalovirus, el intensificador del poliovirus sobre la región tardía del origen de replicación, y los intensificadores de adenovirus. Véase también Yaniv, Nature, 297:17-18 (1982) sobre elementos intensificadores para la activación de promotores eucariotas. El intensificador puede ajustarse en el vector en una posición 5' a 3' respecto a la variante del polipéptido que codifica la secuencia, pero preferentemente se localiza en el extremo 5' del promotor.

(vi) *Componente de finalización de la transcripción*

Los vectores de expresión utilizados en células huésped eucariotas (levaduras, hongos, insectos, plantas, animales, humanos, o células nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la finalización de la transcripción y para la estabilización del ARNm. Dichas secuencias están disponibles por lo general a partir del extremo 5' y, ocasionalmente del 3', regiones no traducidas de los ADNs o ADNc virales. Estas regiones contienen segmentos nucleotídicos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm que codifica la variante polipeptídica.

(vii) *Construcción y análisis de vectores*

La construcción de vectores adecuados que contengan uno o más de los componentes listados anteriormente utiliza técnicas estándares de ligación. Los plásmidos aislados o los fragmentos de ADN se cortan, se recortan o rellenan sus extremos, y se religan en la forma deseada para generar los plásmidos requeridos.

Para el análisis de confirmación de secuencias correctas en los plásmidos construidos, las mezclas de ligación se utilizan para transformar la cepa *E. coli* K12 294 (ATCC 31.446) y se seleccionan los transformantes por su resistencia a ampicilina o tetraciclina, si fuera necesario. Se preparan los plásmidos de los transformantes y se analizan mediante digestión con endonucleasas de restricción, y/o secuenciación por el procedimiento de Messing y col., Nucleic Acids Res, 9:309 (1981) o mediante el procedimiento de Maxam y col., Methods in Enzymology, 65:499 (1980).

(viii) *Vectores de expresión transitoria*

De especial interés en la práctica de la presente invención son los vectores de expresión que proporcionan la expresión transitoria en células de mamífero del ADN que codifica la variante polipeptídica. En general, la expresión transitoria implica la utilización de un vector de expresión que sea capaz de replicarse eficientemente en una célula huésped, de modo que la célula huésped acumule muchas copias del vector de expresión y, a su vez, sintetice niveles elevados de un polipéptido deseado codificado por el vector de expresión. Sambrook y col., *supra*, pp.16.17-16.22. Los sistemas de expresión transitoria, que comprenden un vector de expresión adecuado y una célula huésped, permiten la identificación positiva y conveniente de las variantes polipeptídicas codificadas por los ADNs clonados, así como el cribado rápido de dichos polipéptidos por sus propiedades biológicas o fisiológicas. Por ello, los sistemas de expresión transitoria son de particular utilidad en la invención con el propósito de identificar variantes polipeptídicas que sean biológicamente activas.

(ix) *Ejemplos de vectores de células de vertebrados*

Otros procedimientos, vectores y células huésped adecuadas para la adaptación a la síntesis de la variante polipeptídica en el cultivo de células de vertebrados se describen en Gething y col., Nature, 293:620-625 (1981); Mantei y col., Nature, 281:40-46 (1979); patente europea EP 117.060; patente europea EP 117.058. Un plásmido de especial utilidad para la producción en cultivo de células de mamífero de la variante polipeptídica es el pRK5 (patente europea EP 307.247) o el pSVI6B (patente internacional WO 91/08291 publicada el 13 de Junio de 1991). El PRK5 derivado PRK%B (Holmes y col., Science, 253:1278-1280 [1991]) es particularmente adecuado aquí para dicha expresión.

D. *Selección y transformación de células huésped*

Las células huésped adecuadas para el clonaje y la expresión de vectores de la invención son las procariotas, levaduras, o eucariotas superiores como las descritas más arriba. Las procariotas adecuadas para este propósito incluyen el género eubacteria, como los organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo, las Enterobacteriáceas como

Escherichia, por ejemplo *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como *Bacilli* como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P descrito en la patente DD 266.710 publicada el 12 de Abril de 1989), *Pseudomonas* como *P. aeruginosa* y *Streptomyces*. Un huésped de clonaje preferido de *E. coli* es *E. coli* 294 (ATCC 31.446), aunque también son adecuadas otras cepas como *E. coli*B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537), *E. coli* DH5 α y *E. coli* W3110 (ATCC 27.325). Estos ejemplos son ilustrativos en lugar de limitantes. La cepa W3110 es un huésped particularmente preferido o un huésped parental porque es una cepa de huésped común para las fermentaciones del producto de ADN. Preferentemente, la célula huésped secreta cantidades mínimas de enzimas proteolíticas. Por ejemplo, la cepa W3110 puede modificarse para generar una mutación genética en los genes que codifican proteínas endógenas para el huésped. Ejemplos de dichos huéspedes incluyen la cepa 1A2 de *E. coli* W3110, que tiene el genotipo completo de *tonA* Δ , cepa 9E4 de *E. coli* W3110, que tiene el genotipo completo de *tonA* Δ *ptr3*; cepa 27C7 de *E. coli* W31130 (ATCC 55.244) que tiene el genotipo completo de *tonA* Δ *ptr3* *phoAE15* Δ (*argF-lac*)169 Δ *degP* Δ *ompT* *Kan*^r; cepa 37D6 de *E. coli* W3110 con el genotipo completo de *tonA* Δ *ptr3* *phoAE15* Δ (*argF-lac*)169 Δ *degP* Δ *ompT* Δ *rbs7* *ilvG* *Kan*^r; cepa 40B4 de *E. coli* W3110 que es la cepa 37D6 con una delección *degP* que anula la resistencia a la kanamicina; y una cepa d *E. coli* que tiene una proteasa periplásmica mutante descrita en la patente americana U.S. 4.946.783 publicada el 7 de Agosto de 1990. Alternativamente, también son adecuados los procedimientos *in vitro* de clonaje, por ejemplo, PCR u otras reacciones de la polimerasa de ácidos nucleicos.

Además de los microbios procariotas, los eucariotas como los hongos filamentosos o las levaduras son huéspedes de clonaje o expresión adecuados para los vectores que codifican las variantes polipeptídicas. *Saccharomyces cerevisiae*, o la levadura común, es la más comúnmente utilizada entre los microorganismos huésped eucariotas. Sin embargo, otros géneros, especies y cepas están disponibles comúnmente y son útiles en la presente invención, como *Schizosaccharomyces pombe* (Beach y Nurse, Nature, 290:140 [1981]; patente europea EP 139.383 publicada el 2 de Mayo de 1985); huéspedes de *kluyveromyces* (patente americana U.S. 4.943.529; Fleer y col., *supra*) como por ejemplo *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt y col., J. Bacteriol., 737 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12.242), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045)), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilae* (ATCC 36.906; Van den Berg y col., *supra*), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; Yarrowia (patente europea EP 402.226); *Pichia pastoris* (patente europea EP 183.070); Streekrishna y col., J. Basic Microbiol., 28:265-278 [1988]; Candida; *Trichoderma reesia* (patente europea EP 244.234); *Neurospora crassa* (Case y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:5259-5263 [1979]); *Schwanniomyces* como *Schwanniomyces occidentalis* (patente europea EP 394.538 publicada el 31 de Octubre de 1990); y los hongos filamentosos como por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypcladium* (patente internacional WO 91/00357 publicada el 10 de Enero de 1991), y huéspedes de *Aspergillus* como *A. nidulans* (Ballance y col., Biochem. Biophys. Res. Commun., 112:284-289 [1983]; Tilburn y col., Gene, 26:205-211 [1983]; Yelton y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:1470-1474 [1984]) y *A. niger* (Kelly y Hynes, EMBO J, 4:475-479 [1985]).

Las células huésped adecuadas para la producción de la variante polipeptídica se derivan de organismos multicelulares. Dichas células huésped son capaces de realizar procesamiento complejo y actividades de glicosilación. En principio, cualquier cultivo de células eucariotas es abordable, bien sea del cultivo de vertebrados o de invertebrados. Ejemplos de células de invertebrados incluyen células de plantas e insectos. Se han identificado numerosas cepas de baculovirus y variantes y sus células huésped de insecto permisivas correspondientes de huéspedes como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), y *Bombix mori* se han identificado. Véase por ejemplo Luckow y col., Bio/Technology, 6:47-55 (1988); Miller y col., en Genetic Engineering, Setlow, K.J.K. y col., eds., vol. 8 (Plenum Publishing, 1986), pp. 277-279; y Maeda y col., Nature, 315:592-594 (1985). Una diversidad de cepas virales para la transfección están disponibles públicamente, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombix mori* NPV, y dichos virus pueden utilizarse aquí como el virus de la presente invención, en particular para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

Las células de plantas del algodón, maíz, patata, soja, tomate, y tabaco pueden utilizarse como huéspedes. Típicamente, las células de plantas se transfectan mediante incubación con ciertas cepas de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, que se ha manipulado previamente para contener el ADN. Durante la incubación del cultivo de células vegetales con *A. tumefaciens*, el ADN que codifica la variante polipeptídica se transfiere al huésped de células vegetales de modo que se transfecta, y en condiciones adecuadas, expresará el ADN. Además, las secuencias reguladoras y señal compatibles con las células vegetales están disponibles, como el promotor de la nopalina sintasa y las secuencias de poliadenilación. Depicker y col., J. Mol. Appl. Gen., 1:562 (1982). Además, los segmentos de ADN aislados de la región cadena arriba del gen T-ADN 780 son capaces de activar o incrementar los niveles de transcripción de los genes de expresión en plantas en el tejido vegetal que contiene el ADN recombinante, patente europea EP 321.196 publicada el 21 de Junio de 1989.

Debido al gran interés por las células de vertebrados, la propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo de tejidos) se ha convertido en un procedimiento de rutina en los últimos años (Tissue Culture, Academic Press, Kruse y Patterson, editores, [1973]). Ejemplos de líneas celulares huésped de mamíferos son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrional humana (293 o las células 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham y col., J. Gen. Virol., 36:59 [1977]); las células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); las células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, Proc Natl Acad Sci USA, 77:4216 [1980]); las células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol Reprod, 23:243-251 [1980]); las células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); las células de riñón de mono verde africano (VERO-

76, ATCC CRL-1587); las células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL2); las células de riñón canino (MDK; ATCC CCL 34); las células de hígado de rata HB (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); células de tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather y col., Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

Las células huésped se transfectan y transforman preferentemente con los vectores de expresión o clonaje anteriores de la presente invención y se cultivan en un medio convencional con nutrientes modificado de forma adecuada para la inducción de promotores, selección de transformantes o amplificación de genes que codifican las secuencias deseadas. La transfección hace referencia a la incorporación de un vector de expresión por una célula huésped independientemente de que las secuencias codificantes se expresen. Numerosos procedimientos de transfección son conocidos por el experto en la materia, por ejemplo, CaPO_4 y electroporación. Por lo general, se reconoce que una transfección ha tenido éxito cuando se observa cualquier indicio de funcionabilidad de este vector dentro de la célula huésped.

La transformación hace referencia a la introducción de ADN en un organismo para que el ADN sea replicable, bien como un elemento extracromosómico o un elemento integrado en el cromosoma. Dependiendo de la célula huésped utilizada, la transformación se realiza utilizando técnicas estándares adecuadas a dichas células. El tratamiento con calcio utiliza el cloruro de calcio, tal como se describe en la sección 1.82 de Sambrook y col., *supra*, o se utiliza de forma general la electroporación para procariotas u otras células que contienen barreras celulares importantes. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se utiliza para la transformación de ciertas células vegetales, tal como se describe por Shaw y col., Gene, 23:315 (1983) y la patente internacional WO 89/05859 publicada el 29 de Junio de 1989. Además, las plantas pueden transfectarse con un tratamiento de ultrasonidos tal como se describe en la patente internacional WO 91/00358 publicada el 10 de Enero de 1991.

Para las células de mamífero sin paredes celulares, el procedimiento de la precipitación por calcio de Graham y van der Eb, Virology, 52:456-457 (1978) es el preferido. Los aspectos generales de las transformaciones de sistemas de célula huésped de mamífero se han descrito por Axel en la patente americana US 4.399.216 publicada el 16 de Agosto de 1983. Las transformaciones en levaduras se llevan a cabo típicamente según el procedimiento de Van Solingen y col., J. Bact., 130:946 (1977) y Hsiao y col., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76:3829 (1979). Sin embargo, otros procedimientos para la introducción de ADN en las células, como la microinyección nuclear, la electroporación, la fusión de protoplastos bacterianos con células intactas, o los policones, por ejemplo el polibreno, la poliornitina, etc., también pueden utilizarse. Para diversas técnicas para las células de mamífero, véase Keown y col., Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990) y Mansour y col., Nature, 336:348-352 (1988).

35 E. Cultivo de células huésped

Las células procariotas utilizadas para producir la variante polipeptídica de la presente invención se cultivan en un medio adecuado tal como se describe en Sambrook y col., *supra*.

Las células de mamífero utilizadas para producir la variante polipeptídica de la presente invención pueden cultivarse en diversos medios. Los medios comerciales disponibles son por ejemplo el Ham F-10 (Sigma), F-12 (Sigma), Medio Esencial Mínimo (MEM, Sigma), RPMI-1640 (Sigma), Medio Eagle Modificado de Dulbecco (ID-MEM, Sigma), y D-MEM/F-12 (Gibco BRL) son adecuados para el cultivo de células huésped. Además, cualquiera de los procedimientos descritos, por ejemplo, en Ham y Wallace, Methods in Enzymology, 58:44 (1979); Barnes y Sato, Anal. Biochem., 102:255 (1980); patentes americanas US 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 5.122.469; o 4.560.655; patente americana US Re. 30.985; patente internacional WO 90/03430; o patente internacional WO 87/00195 pueden utilizarse como medio de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios puede suplementarse según sea necesario con hormonas y/o otros factores de crecimiento (como la insulina, la transferrina, la aprotinina, y/o el factor de crecimiento epitelial [EGF]), sales (como el cloruro de sodio, el calcio, el magnesio y el fosfato), tampones (como el HEPES), los nucleósidos (como la adenosina y la timidina), antibióticos (como el fármaco GentamicinaTM), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos presentes generalmente a concentraciones finales del orden micromolar), y la glucosa o una fuente de energía equivalente. Cualquier otro suplemento necesario también puede incluirse en concentraciones adecuadas que serán conocidas por los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, como la temperatura, el pH y similares, son las utilizadas previamente para la expresión de las células huésped seleccionadas, y serán evidentes a un experto en la materia.

En general, los principios, protocolos y técnicas prácticas para la maximización de la productividad de cultivos de células de mamífero *in vitro* pueden hallarse en Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Bbutler, ed. (IRL Press, 1991).

Las células huésped referidas en esta descripción abarcan las células en cultivo *in vitro* así como las que se hallan en el animal huésped.

65 F. Detección de la Amplificación/Expresión Génicas

La amplificación génica y/o la expresión pueden cuantificarse en una muestra de forma directa, por ejemplo, mediante transferencia convencional de Southern, transferencia de Northern para cuantificar la transcripción de ARNm (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 5301-5205 [1980]), la transferencia de mancha (análisis de ADN), o la

hibridación *in situ*, utilizando una sonda marcada adecuadamente, derivada de las secuencias aquí proporcionadas. Pueden utilizarse diversos marcajes, generalmente radioisótopos, el P^{32} en particular. Sin embargo, también pueden utilizarse otras técnicas, como los nucleótidos modificados con biotina para la introducción en un polinucleótido, como el radionúclido, fluorocromos, enzimas y otros. Alternativamente, pueden utilizarse anticuerpos que reconozcan

5 dúplex específicos, incluyendo dúplex de ADN, dúplex de ARN y dúplex de ADN-ARN o dúplex ADN-proteína. Los anticuerpos a su vez pueden marcarse y el ensayo puede llevarse a cabo si el dúplex está unido a una superficie, de modo que tras la formación del dúplex sobre la superficie, pueda detectarse la presencia del anticuerpo unido al dúplex.

10 La expresión génica, alternativamente, puede cuantificarse mediante procedimientos inmunológicos, como las técnicas de tinción inmunohistoquímicas específica para el producto génico acoplado, si los marcajes son visualmente detectables, como los marcajes enzimáticos, los marcajes fluorescentes, los luminiscentes y otros. Una técnica de tinción sensible adecuada para utilizar en la presente invención se describe en Hsu y col., *Am. J. Clin. Path.* 75:734-738 (1980).

15 Los anticuerpos de utilidad para la tinción inmunohistoquímica y/o el ensayo de fluidos de la muestra pueden ser monoclonales o policlonales, y pueden prepararse en cualquier mamífero. De forma conveniente, los anticuerpos pueden prepararse contra una variante polipeptídica tal como se describe en la Sección 4 de más adelante.

20 G. Purificación de polipéptidos

Si la variante se produce intracelularmente, como una primera etapa, los restos de partículas, bien de células huésped como de fragmentos lisados, se eliminan, por ejemplo, mediante centrifugación o ultracentrifugación; opcionalmente pueden concentrarse con un filtro para proteínas disponible comercialmente, seguido de la separación de

25 la variante polipeptídica de otras impurezas mediante uno o más etapas seleccionadas entre cromatografía de afinidad, columnas de fraccionamiento de intercambio iónico (por ejemplo, sobre dietilaminoetil (DEAE) o matrices que contienen grupos carboximetil o sulfopropil), cromatografía sobre Blue-Sepharose, CM Blue-Sepharose, MONO-Q, MONO-S, lentejas de lectin-Sepharose, WGA-Sepharose, Con A-Sepharose, Eter Toyopearl, Butil Toyopearl, Fenil Toyopearl, o proteína A-Sepharose, cromatografía por SDS-PAGE, cromatografía de sílice, electrocromatografía, HPLC de fase inversa (por ejemplo, gel de sílice con grupos alifáticos anexados), filtración en gel, por ejemplo, cribado molecular con Sephadex o cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía sobre columnas que se unen selectivamente al polipéptido y precipitación con etanol y sulfato amónico.

La variante polipeptídica recombinante producida en cultivo de bacterias generalmente puede aislarse mediante

35 extracción inicial de los sedimentos celulares, seguido de una o más etapas de concentración, precipitación de proteínas por sales, intercambio iónico acuoso, etapas de cromatografía de exclusión por tamaño. Adicionalmente, la variante polipeptídica recombinante puede purificarse mediante cromatografía por afinidad. Por último, es posible utilizar HPLC para las etapas de purificación finales. Las células microbianas utilizadas en la expresión de ácidos nucleicos que codifican la variante polipeptídica pueden romperse mediante cualquier procedimiento incluyendo ciclos de congelación-descongelación, sonicación, disrupción mecánica, o mediante la utilización de agentes de lisis celular.

Un inhibidor de proteasas como el metilsulfonilfluoruro (PMSF) puede incluirse en cualquiera de las etapas para inhibir la proteólisis y los antibióticos pueden incluirse para prevenir el crecimiento de contaminantes adventicios.

En otra realización, los sobrenadantes de sistemas que secretan la variante polipeptídica recombinante en el medio de cultivo se concentran en primer lugar utilizando un filtro de concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Millipore Pellicon. Después de la etapa de concentración, el concentrado puede aplicarse a una matriz de purificación. Por ejemplo, una matriz de afinidad adecuada puede comprender un

50 ligando para la proteína, una lectina o un anticuerpo unido a un soporte adecuado. Alternativamente, puede utilizarse una resina de intercambio aniónico, por ejemplo, una matriz o un sustrato que tenga grupos DEAE colgantes. Matrices adecuadas incluyen la acrilamida, la agarosa, el dextrano, la celulosa, u otros tipos comúnmente utilizados en la purificación de proteínas. Alternativamente, puede utilizarse una etapa de intercambio catiónico. Intercambiadores catiónicos adecuados incluyen diversas matrices insolubles que comprenden grupos sulfopropil o carboximetil. Los grupos sulfopropil son particularmente preferidos.

Por último, puede utilizarse una o más etapas de RP-HPLC que utilizan medio RP-HPLC, por ejemplo gel de sílice con grupos metil u otros grupos alifáticos, para una mejor purificación de la composición de variante polipeptídica. También pueden utilizarse algunas o todas las etapas de purificación anteriores, en combinaciones varias, también

60 pueden utilizarse para proporcionar una variante polipeptídica recombinante.

La fermentación de levaduras que produce la variante polipeptídica como un polipéptido secretado simplifica en gran manera la purificación. La variante polipeptídica recombinante secretada resultante de una fermentación a gran escala puede purificarse mediante procedimientos análogos a los descritos por Urdal y col., *J. Chromatog.*, 296:171 (1984). Esta referencia describe dos etapas de RP-HPLC secuenciales para la purificación de IL-2 recombinante humano en una columna HPLC preparativa. Alternativamente, pueden utilizarse técnicas como la cromatografía de afinidad, para purificar la variante polipeptídica.

La variante polipeptídica de mamífero sintetizada en el cultivo recombinante se caracteriza por la presencia de componentes de células humanas, incluyendo proteínas, en cantidad y características que dependen de las etapas de purificación incorporadas para recuperar la variante polipeptídica del cultivo. Estos componentes son generalmente de origen de levaduras, procariotas, o eucariotas superiores no humanas y preferentemente están presentes en cantidades contaminantes inocuas, del orden de < 1% en peso.

H. Modificaciones covalentes de variantes polipeptídicas

Las modificaciones de las variantes polipeptídicas se incluyen dentro del ámbito de la invención. Pueden generarse mediante síntesis química o mediante corte enzimático o químico de la variante polipeptídica, si fuera pertinente. Otros tipos de modificaciones covalentes de la variante polipeptídica se introducen en la molécula mediante reacción de los residuos aminoácidos de la variante polipeptídica con un agente derivatizante orgánico que sea capaz de reaccionar con las cadenas laterales o los residuos N- o C-terminales.

Los residuos cisteinil reaccionan generalmente con α -haloacetatos (y las correspondientes aminas), como el ácido clomacético o la cloroacetamida, para proporcionar derivados carboximetil o carboxiamidometil. Los residuos cisteinil también se derivan mediante reacción con bromotrifluoroacetona, ácido α -bromo- β -(5-imidozoi) propiónico, cloroacetyl fosfato, N-alquilmaleimidas, 3-nitro-2-piridil disulfuro, metil 2-piridil disulfuro, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenil, o cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol.

Los residuos histidil se derivatizan mediante reacción con dietilpirocarbonato a pH 5,5-7,0 porque este agente es relativamente específico para la cadena lateral de histidil. También es de utilidad el para-bromofenacil bromuro; la reacción se lleva a cabo generalmente en cacodilato sódico 0,1 M a pH 6,0.

Los residuos terminales de lisina y los del extremo amino-terminal se hacen reaccionar con ácido succínico u otros anhídridos de ácido carboxílico. La derivatización con estos agentes tiene el efecto de revertir la carga de los residuos de lisina. Otros reactivos adecuados para derivatizar los residuos que contienen α -amino incluyen los imidoésteres como el metil picolinimidato, el fosfato de piridoxal, piridoxal, clorohidruro, ácido trinitrobenzenosulfónico, O-metilourea, 2,4-pentanediona, y la reacción catalizada por transaminasa con glioxilato.

Los residuos arginil se modifican mediante reacción con uno o más reactivos convencionales, como por ejemplo el fenilglioxal, 2,3-butanediona, 1,2-ciclohexanediona y la nihidrina. La derivatización de residuos de arginina requiere que la reacción se realice en condiciones alcalinas debido al pK_a elevado del grupo funcional de la guanidina. Además, estos reactivos pueden reaccionar con los grupos de lisina así como con el grupo amino-epsilon de la arginina.

La modificación específica de los residuos tirosil puede realizarse, con un interés particular en la introducción de marcapuntos espectrales en los residuos tirosil mediante reacción con compuestos de diazonio aromáticos o tetranitrometano. Más comúnmente se utilizan el N-acetilimidazol y el tetranitrometano para formar especies O-acetil tirosil y derivados 3-nitro, respectivamente. Los residuos tirosil se yodian con I^{125} o I^{131} para preparar proteínas marcadas para utilizar en el radioinmunoensayo, para ello es adecuado el procedimiento de la cloramina T descrito más arriba.

Los grupos carboxilo (aspartil o glutamil) se modifican selectivamente mediante reacción con carbodiimidas ($R-N=C=N-R'$) si R y R' son grupos alquilo distintos, como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-4-etil) carbodiimida o 1-etil-3-(4,4-dimetilpentenil) carbodiimida. Además, los residuos aspartil y glutamil se convierten en residuos asparraguinil y glutaminil mediante reacción con iones amonio.

Los residuos asparraguinil y glutaminil se desaminan frecuentemente en los residuos correspondientes glutamil y aspartil. Estos residuos se desaminan en condiciones neutras o básicas. La forma desamidada de estos residuos se halla dentro del ámbito de la invención.

Otras modificaciones incluyen la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de seril o treonil, la metilación de grupos α -amino de cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86), la acetilación de la amina-terminal y la desamidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal.

Otro tipo de modificación covalente de la variante polipeptídica incluida dentro del ámbito de la presente invención comprende la alteración del patrón de glicosilación original de la variante polipeptídica. Mediante alteración se hace referencia a la delección de una o más porciones de carbohidratos halladas en la variante polipeptídica, y/o a la adición de uno o más sitios de glicosilación que no se hallen en la variante polipeptídica.

La glicosilación de variantes polipeptídicas es típicamente N- u O-glicosilación. N- u O- hace referencia a la unión de la porción de carbohidrato con la cadena lateral de un residuo de asparraguina. Las secuencias tripeptídicas asparraguina-X-serina y asparraguina-X-treonina, si X es cualquier aminoácido excepto la prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática de la porción de carbohidrato con la cadena lateral de la asparraguina. La O-glicosilación hace referencia a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa a un ácido hidroxiamino, más comúnmente serina o treonina, aunque también pueden utilizarse la 5-hidroxiprolina o la 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glicosilación a la variante polipeptídica se logra convenientemente mediante modificación de la secuencia aminoacídica de modo que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para sitios de N-glicosilación). La modificación también puede realizarse mediante adición de, o sustitución por, uno o más residuos a la secuencia de la variante polipeptídica original (para sitios de O-glicosilación). Para mayor

5 facilidad, la secuencia aminoacídica de la variante polipeptídica se modifica preferiblemente a través de cambios a nivel del ADN, en particular mutando el ADN que codifica la variante polipeptídica en las bases preseleccionadas de modo que los codones que se generen se traducirán en los aminoácidos deseados. La(s) mutación(mutaciones) de ADN pueden generarse mediante la utilización de los procedimientos descritos más arriba.

10 Otro medio de aumentar el número de porciones de carbohidrato en la variante polipeptídica es mediante el acoplamiento químico o enzimático de glicósidos con la variante polipeptídica. Estos procedimientos presentan una ventaja, no requieren la producción de la variante polipeptídica en una célula huésped que tenga capacidades de glicosilación para N- u O-glicosilación. Dependiendo del modo de acoplamiento utilizado, el (los) azúcar(es) pueden unirse a: (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfidrilo libres como la cisteína, (d) grupos hidroxilo libres

15 como los de la serina, treonina o hidroxiprolina, (e) residuos aromáticos como los de la fenilalanina, tirosina, o triptófano, o (f) el grupo amida de la glutamina. Estos procedimientos se describen en la patente internacional internacional WO 87/05330 publicada el 11 de Septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, CRC Crit. Rev, Biochem., pp. 259-306 (1981).

20 La eliminación de las porciones de carbohidratos presentes en la variante polipeptídica pueden lograrse química o enzimáticamente. La desglicosilación química requiere la exposición de la variante polipeptídica con el ácido trifluorometanosulfónico, o un compuesto equivalente. Este tratamiento da como resultado el corte de la mayoría de los azúcares excepto del azúcar de unión (N-acetilglucosamino o N-acetilgalactosamino), dejando intacta la variante polipeptídica. La desglicosilación se describe por Hakimuddin, y col., Arch. Biochem. Biophys., 259:52 (1987) y por

25 Edge y col., Anal. Biochem., 118:131 (1981). El corte enzimático de las porciones de carbohidrato en las variantes polipeptídicas puede lograrse mediante la utilización de diversas endo- y exo-glicosidasas tal como se describe por Thotakura y col., Meth. Enzymol., 138:350 (1987).

30 La glicosilación en los sitios de glicosilación potenciales puede prevenirse mediante la utilización del compuesto tucamicina tal como se describe por Duskin y col., J. Biol. Chem., 257:3105 (1982). La tucanmicina bloquea la formación de las uniones proteína-N-glicósido.

Otro tipo de modificación covalente de la variante polipeptídica comprende la unión de la variante polipeptídica con una variedad de polímeros no proteicos, por ejemplo, el polietilén glicol, el propilén glicol o los polioxialquilenos, en

35 la forma indicada en las patentes americanas U.S. 4.640.835; 4.496.689; 4.31.144; 4.670.417; 4.791.192 o 4.179.337.

3. Composiciones terapéuticas: Administración de Variantes

Entre los usos de variantes de anti-CD18 se incluyen aplicaciones anti-Mac 1/anti-neutrófilo así como anti-LFA-1. Si la variante polipeptídica actúa como un anticuerpo, opcionalmente podría fusionarse con un segundo polipéptido y el anticuerpo o la fusión del mismo podrían utilizarse para aislar y purificar la proteína a la cual se une a partir de una fuente, tal como un antígeno CD11 o CD18. En otra realización, la invención proporciona un método para detectar CD11a o CD18 *in vitro* o *in vivo* que consiste en contactar el fragmento del anticuerpo anti-CD11a o CD18 con una muestra, especialmente una muestra de suero, sospechosa de contener CD11a o CD18 y detectar si ha ocurrido la

45 unión.

La variante polipeptídica también se utiliza aquí adecuadamente en pruebas diagnósticas cuantitativas como estándar o control contra la cual pueden prepararse muestras con cantidades desconocidas de la variante polipeptídica.

50 Las formulaciones terapéuticas de la variante polipeptídica se preparan para su indicación particular para el almacénamiento mezclando la variante polipeptídica con el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes, o estabilizantes opcionales fisiológicamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Oslo, A., Ed., [1980]), en forma de pasta liofilizada o soluciones acuosas. Los transportadores, excipientes, o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de unos 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparraguina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas, agentes quelantes tales como EDTA; azúcares alcoholes tales como manitol o sorbitol; parejas iónicas formadoras de sales tales como sodio; y/o surfactantes no iónicos tales como Tween, Pluronic, o polietilenglicol (PEG).

Típicamente, la variante polipeptídica utilizada en el procedimiento de esta invención se formula mezclándola a temperatura ambiente a un pH adecuado, y con el grado de pureza deseado, con vehículos fisiológicamente aceptables, es decir, vehículos que no sean tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas. El pH de la formulación depende principalmente del uso particular y de la concentración de la variante, pero preferiblemente se encuentra en un rango aproximado de entre 3 y 8. La formulación en un tampón a pH de aproximadamente 5-8 es una realización adecuada.

La variante polipeptídica para su utilización aquí es preferiblemente estéril. La esterilidad se consigue fácilmente mediante filtración estéril a través de membranas (0,2 micras). La variante polipeptídica normalmente se guardará como una solución acuosa, aunque también son aceptables formulaciones liofilizadas para su reconstitución posterior.

5 La composición de la variante se formulará, dosificará, y administrará de manera compatible con la buena práctica médica. Entre los factores a considerar en este contexto se incluyen el trastorno en particular a tratar, el mamífero en particular a tratar, la condición clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de liberación del agente, el método de administración, la pauta de administración, y otros factores conocidos por los médicos practicantes. La “cantidad terapéuticamente efectiva” de la variante polipeptídica a administrar se determinará según dichas conside-
10 raciones, y, para una variante antagonista de LFA-1, es la cantidad mínima necesaria para prevenir, mejorar, o tratar el trastorno mediado por LFA-1, incluyendo el tratamiento de la artritis reumatoide, la reducción de respuestas inflamatorias, la inducción de tolerancia a inmunoestimulantes, la prevención de una respuesta inmune que resultaría en el rechazo de un injerto por parte del huésped o viceversa, o la prolongación de la supervivencia de un injerto trasplan-
15 tado. La cantidad de la variante está preferiblemente por debajo de la cantidad que sea tóxica para el huésped o que transforma al huésped significativamente más susceptible a las infecciones.

Como propuesta general, la cantidad inicial farmacéuticamente efectiva de la variante antagonista de LFA-1 ad-
ministrada parenteralmente por dosis estará en el intervalo aproximado de entre 0,1 y 20 mg/kg de peso corporal del
20 paciente al día, siendo el intervalo típico inicial de la variante antagonista de LFA-1 utilizada de aproximadamente 0,3 a 15 mg/kg/día.

Como se indica más arriba, sin embargo, estas cantidades sugeridas de la variante antagonista de LFA-1 están sometidas a una gran discreción terapéutica. El factor clave en la selección de una dosis y pauta de administración adecuadas es el resultado obtenido, tal como se indicó anteriormente. Por ejemplo, inicialmente se podrían necesitar
25 dosis relativamente más altas para el tratamiento de un rechazo agudo y continuado del injerto, o en una fase más tardía para el tratamiento de un rechazo agudo, el cual se caracteriza por una disminución repentina de la función del injerto.

Cuando la posología subsiguiente es inferior al 100% de la posología inicial, se calcula como posología diaria. Por
30 tanto, por ejemplo, si el régimen de posología consiste en inyecciones diarias de 2 mg/kg/día durante 2 semanas, se-
guidas de una dosis bisemanal de 0,5 mg/kg/día durante 99 días, esto equivaldría a una dosis subsiguiente de alrededor del 1,8% de la dosis inicial, calculada por día (es decir, $2/\text{día}/100\% = 0,5/14 \text{ días}/x\%$, $x \approx 1,8\%$). Preferiblemente, la posología subsiguiente es inferior al 50%, más preferiblemente, inferior al 25%, más preferiblemente, inferior al 10%,
35 todavía más preferiblemente, inferior al 5%, y lo más preferible, inferior al 2% de la posología inicial de la variante del antagonista de LFA-1.

Para obtener los resultados más eficaces para la variante del antagonista de LFA-1, dependiendo del trastorno, se proporciona la posología inicial lo más pronto posible después del primer indicio, diagnóstico, aparición, u ocurrencia
40 del trastorno o durante las remisiones de enfermedades autoinmunes. Preferiblemente, la posología inicial comienza antes de la exposición al antígeno, como en el caso de injertos trasplantados. Además, cuando la posología inicial tiene lugar antes de la exposición al antígeno o esencialmente de manera simultánea, es preferible que la posología subsiguiente se lleve a cabo durante un periodo de tiempo más largo que el de la posología inicial, particularmente para trasplantes, y que sean dosis intermitentes de mantenimiento continuo que no necesiten ser continuadas durante la vida del paciente.

45 La pauta de administración preferida para la variante antagonista de LFA-1 es una posología inicial (es decir, administrada antes o al mismo tiempo que ocurre la respuesta inmune no deseada en una dosis administrada no menos frecuentemente que a diario e incluyendo de manera continua por infusión) y una posología subsiguiente de una dosis administrada periódicamente no más de aproximadamente una vez a la semana. Más preferentemente, dependiendo
50 del trastorno específico, y particularmente para trasplantes, la posología inicial diaria se administra durante al menos una semana, preferiblemente por lo menos unas 2 semanas, tras la exposición al antígeno, por ejemplo, al injerto, o inicio de una respuesta inmune aguda (como en enfermedades autoinmunes), y la posología subsiguiente se administra no más de una vez cada dos semanas (preferiblemente una vez cada dos semanas) durante al menos unas 5 semanas, preferiblemente durante al menos unas 10 semanas, después de finalizar la posología inicial.

55 En otra realización preferida, en particular si la variante antagonista es un Fab o (Fab')₂ de anticuerpos anti-CD11a o anti-CD18, la posología inicial termina aproximadamente al cabo de 1 día a 4 semanas después de realizar el trasplante, más preferiblemente entre de 1 a 3 semanas, más preferiblemente entre 2 a 3 semanas, y comienza aproximadamente desde 1 semana antes del trasplante hasta más o menos de manera simultánea con el trasplante.

60 La variante polipeptídica se administra a través de cualquier medio adecuado, incluyendo parenteral, subcutáneo, intraperitoneal, intrapulmonar, e intranasal, y, si se desea para tratamiento inmunosupresor local, administración intralesional (incluyendo por perfusión o contactando el injerto con el antagonista antes del trasplante). Entre las infusiones parenterales se incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intra-arterial, intraperitoneal, o subcutánea. Ade-
65 más, la variante antagonista de LFA-1 se administra adecuadamente mediante infusión por pulsos, particularmente con dosis decrecientes de la variante antagonista de LFA-1. Preferiblemente la posología de dicha variante se administra mediante inyecciones, más preferiblemente inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de que la administración sea breve o crónica.

La variante polipeptídica de la presente invención se formula no necesariamente, pero opcionalmente, con uno o más agentes comúnmente utilizados para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. Por ejemplo, en la artritis reumatoide, se podría administrar una variante de antagonista de LFA-1 junto con un glucocorticosteroide. Además, la terapia con péptidos de receptores de células T es adecuada como terapia auxiliar para prevenir los indicios clínicos de encefalomiелitis autoinmune. Offner y col., Science, 251: 430-432 (1991). Para trasplantes, la variante de antagonista de LFA-1 podría administrarse por separado o junto con un agente inmunosupresor tal como se define más arriba, por ejemplo, la ciclosporina A, para modular el efecto inmunosupresor. La cantidad efectiva de dichos agentes adicionales depende de la cantidad de variante de antagonista de LFA-1 presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento, y otros factores comentados más arriba. Éstos se utilizan generalmente en las mismas dosis y con las mismas vías de administración que las utilizadas hasta ahora o aproximadamente de entre el 1 y el 99% de las dosis utilizadas hasta el momento.

Las diferentes enfermedades autoinmunes descritas más arriba se tratan con variantes de antagonistas de LFA-1 de tal manera que se induce una tolerancia inmune contra el propio antígeno atacado como resultado de la enfermedad. En este aspecto, las enfermedades autoinmunes se parecen al rechazo del huésped *versus* injerto y se tratan con variantes de antagonistas de LFA-1 de manera análoga. Sin embargo, en estas enfermedades el paciente ya está generando una respuesta inmune contra el antígeno diana, a diferencia del caso de los trasplantes antes del injerto. Por tanto, es conveniente inducir en primer lugar y mantener posteriormente un estado transitorio de inmunosupresión mediante procedimientos convencionales en dichos pacientes, por ejemplo, mediante el uso convencional de ciclosporina A u otros agentes inmunosupresores convencionales (solos o junto con la variante antagonista de LFA-1), o monitorizar al paciente hasta la ocurrencia de un periodo de remisión (una ausencia o disminución sustancial de indicios patológicos o funcionales de la respuesta inmune).

Preferiblemente, la inmunosupresión transitoria se induce mediante la depleción de células T utilizando terapias convencionales. Esto se continúa con la administración de la variante antagonista de LFA-1 para prevenir una recaída cuando se retire el agente inductor de la inmunosupresión o cuando la remisión se interrumpa de otra manera. Alternativamente, la condición de remisión del paciente se monitoriza de cerca para detectar indicios de debilidad, e inmediatamente después de la aparición inicial de debilidad funcional o bioquímica se comienza el régimen de posología inicial y se continúa hasta que la debilidad remite. La administración de la variante antagonista de LFA-1 durante este periodo constituye la dosis inicial descrita en la presente invención.

En el caso de enfermedades autoinmunes, la dosis inicial se extenderá alrededor de 1 a 16 semanas. A partir de entonces, el régimen de mantenimiento de menor dosis de variante de antagonista de LFA-1 se administrará esencialmente de la misma manera que se ha expuesto aquí para la mejora del rechazo al injerto o huésped, aunque en algunos casos es conveniente extender la dosis subsiguiente o de mantenimiento durante periodos más largos que con los injertos. En una realización de la presente invención, si se sabe que un antígeno o una composición que contiene el antígeno es responsable de la respuesta inmune, entonces se administrará el antígeno al paciente (opcionalmente con IL-1 y/o interferón gamma) después de la dosis inicial de la variante de antagonista de LFA-1 y la dosis de variante antagonista se mantendrá a partir de entonces para suprimir la regeneración de una respuesta inmune contra el antígeno mientras se inmunosuprime mínimamente la respuesta del paciente a otros antígenos.

Se aislará al paciente, preferiblemente en un ambiente estéril tal como el que se utiliza actualmente en la práctica de trasplantes, en el momento del tratamiento inicial con la variante de antagonista de LFA-1. El paciente deberá estar libre de cualquier infección. No es necesario mantener estas condiciones durante la dosis de mantenimiento, y de hecho ésta es una de las ventajas de esta invención, es decir, que el paciente sea capaz de generar una respuesta inmune esencialmente normal a los antígenos del ambiente (aparte del injerto o antígeno propio) mientras es tratado con la posología de mantenimiento.

La presente invención es particularmente apropiada para prolongar la supervivencia e incrementar la tolerancia de injertos trasplantados. Los trasplantes opcionalmente se monitorizan funcionalmente de manera sistemática durante el periodo crítico postoperatorio (los primeros tres meses) utilizando cualquier procedimiento adecuado. Tal procedimiento es la angiografía intravenosa con radionucleidos utilizando pertecnato-Tc99m, tal como se describe en Thomsen y col., Acta Radiol., 29: 138-140 (1988). Además, el procedimiento aquí es apropiado para la perfusión multiorgánica simultánea y el trasplante. Toledo-Pereyra y MacKenzie, Am. Surg., 46: 161-164 (1980).

En algunos casos, es conveniente modificar la superficie del injerto para proporcionar grupos cargados positiva o negativamente, ya sea utilizando un aminoácido o polímero adecuado o uniendo una fuente fisiológicamente aceptable de grupos funcionales cargados. Por ejemplo, una superficie cargada negativamente es apropiada para disminuir la coagulación sanguínea en los vasos sanguíneos. También es conveniente en ciertas circunstancias convertir la superficie en hidrofóbica o hidrofílica acoplando, por ejemplo, fenilalanina, serina o lisina a la superficie. Un agente inmunosupresor particularmente efectivo para estas modificaciones de superficie es el glutaraldehído.

Como se menciona más arriba, antes del trasplante se administra opcionalmente una cantidad efectiva de la variante de antagonista de LFA-1 para inducir la tolerancia al injerto. Se podría emplear la misma dosis y pauta de administración que se utiliza para el post-trasplante inicial. Además, antes del trasplante, opcionalmente, se contacta el injerto con una composición de TGF- β como se describe en Patente Americana U.S. 5.135.915, cuya descripción se incorpora como referencia. Brevemente, el contacto implica de manera adecuada la incubación o perfusión del injerto con la composición o la aplicación de la composición a una o más superficies del injerto. El tratamiento

to tiene lugar generalmente durante por lo menos un minuto, y preferiblemente entre 1 minuto y 72 horas, y más preferiblemente entre 2 minutos y 24 horas, dependiendo de factores tales como la concentración de TGF- β en la formulación, el injerto a tratar, y el tipo particular de formulación. También tal como se indicó, el injerto se perfunde simultánea o separadamente con la variante de antagonista de LFA-1. La perfusión se consigue mediante cualquier procedimiento adecuado. Por ejemplo, un órgano se puede perfundir a través de un dispositivo que proporcione una presión constante de perfusión teniendo un regulador de presión y un desagüe situados entre la bomba y el órgano, tal como se describe en la patente DD 213.134 publicada el 5 de septiembre de 1984. De manera alternativa, el órgano se sitúa en una cámara hiperbárica mediante una puerta de cierre hermético y el perfusado se envía a la cámara mediante una bomba que extrae el fluido del reservorio mientras el perfusado utilizado se devuelve al reservorio gracias a una válvula, tal como se describe en la patente europea EP 125.847 publicada el 21 de noviembre de 1984.

Después de tratar el injerto, éste puede guardarse adecuadamente durante periodos prolongados de tiempo o utilizarse inmediatamente en el procedimiento de trasplante. Se puede aumentar la vida útil, tal como se describió más arriba, mediante el uso de un sustituto sanguíneo en la formulación (es decir, emulsión perfluoroquímica), o mediante la perfusión del injerto con una formulación de un agente isotónico en frío que contenga TGF- β y con un anticoagulante seguido de glicerol para permitir la congelación de los órganos extraídos sin destrucción de las células, tal como se describe en la patente JP 60061501 publicada el 9 de abril de 1985. Además, los órganos se pueden conservar con fluidos de perfusión conocidos (que contengan TGF- β y/o antagonista de LFA-1 tal como se indicó) mientras los órganos se enfrían a temperaturas de congelación, para preservar el órgano semi-permanentemente sin necrosis, tal como se describe en las patentes americanas U.S. 4.462.215 y 4.494.385.

Respecto a los trasplantes cardíacos específicamente, Parent y col., Cryobiology, 18: 571-576 (1981) reportan que la perfusión coronaria fría a 5°C antes del trasplante aumenta la protección del homoinjerto durante el periodo inicial de implantación. Cualquiera de estos procedimientos, u otros, están dentro del ámbito de la presente invención si se consideran necesarios para la preservación del injerto.

Antes del trasplante, preferiblemente se lava el injerto de la composición de TGF- β , ya sea empapándolo en una solución de suero fisiológico o mediante otros medios adecuados para este propósito. No es conveniente eliminar la variante de antagonista de LFA-1 antes del trasplante.

También, antes del trasplante, opcionalmente, se proporcionan al huésped una o más transfusiones sanguíneas específicas de donante para ayudar a la supervivencia del injerto. Un procedimiento alternativo es someter al huésped a irradiación linfóide total antes o después de la operación de trasplante. Se puede realizar cualquier otro procedimiento pre-trasplante que pueda ser beneficioso para el receptor del trasplante en particular como parte del procedimiento de la presente invención.

4. Preparación de Anticuerpos (en donde la Variante es un Derivado de Anticuerpo)

(i) Materiales y Métodos de Partida

Se conocen inmunoglobulinas (Ig) y ciertas variantes de las mismas y muchas se han preparado en un cultivo recombinante de células. Por ejemplo, véase la patente americana U.S. 4.745.055; patente europea EP 256.654; patente europea EP 120.694; patente europea EP 125.023; patente europea EP 255.694; patente europea EP 266.663; Patente internacional WO 88/03559; Faulkner y col., Nature, 298: 286 (1982); Morrison, J. Immunol., 123: 793 (1979); Koehler y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU, 77: 2197 (1980); Raso y col., Cancer Res., 41: 2073 (1981); Morrison y col., Ann. Rev. Immunol., 2:239 (1984); Morrison, Science, 229: 1202 (1985); y Morrison y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU, 81: 6851 (1984). También se conocen cadenas reordenadas de inmunoglobulina. Véase, por ejemplo, patente americana U.S. 4.444.878; patente internacional WO88/03565; y patente europea EP 68.763 y las referencias allí citadas. La fracción de inmunoglobulina en las variantes polipeptídicas de la presente invención podría obtenerse a partir de los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3, o IgG-4, IgA, IgE, IgD, o IgM, pero preferiblemente a partir de IgG-1 o IgG-3.

(ii) Anticuerpos Policlonales

Los anticuerpos policlonales se obtienen generalmente en animales mediante inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno relevante y un adyuvante. Podría ser útil conjugar el antígeno relevante con una proteína que fuera inmunogénica en la especie a inmunizar, por ejemplo, la hemocianina de lapa californiana, la albúmina sérica, la tiroglobulina bovina, o el inhibidor de la tripsina de soja utilizando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, el maleidobenzotilato de sulfosuccinimida (conjugación a través de residuos de cisteína), la N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), el glutaraldehído, el anhídrido succínico, SOCl₂, o R¹N=C=NR, donde R y R¹ son grupos alquilo diferentes.

Los animales se inmunizan contra el antígeno, conjugados inmunogénicos, o derivados combinando 1 mg o 1 µg del péptido o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la solución intradérmicamente en múltiples sitios. Al cabo de un mes los animales se refuerzan con aproximadamente 1/5 a 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. Al cabo de 7 a 14 días, se extrae la sangre de los animales y el

suero se somete a un ensayo de titulación de anticuerpos. Los animales se refuerzan hasta que el título se estabilice. Preferiblemente, el animal se refuerza con el conjugado del mismo antígeno, pero conjugado con una proteína diferente y/o a través de un reactivo de entrecruzamiento diferente. Los conjugados también pueden generarse en cultivo celular recombinante como fusiones de proteínas. También, se utilizan adecuadamente agentes agregantes tales como el alumbre para potenciar la respuesta inmune.

(iii) *Anticuerpos monoclonales*

Se obtienen anticuerpos monoclonales a partir de una población de anticuerpos esencialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones que ocurren de forma natural y que podrían estar presentes en cantidades menores. Por tanto, el modificador “monoclonal” indica que el carácter del anticuerpo no es una mezcla de anticuerpos discretos.

Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se podrían fabricar utilizando el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler y Milstein, *Nature*, 256: 495 (1975), o se podrían hacer mediante procedimientos del ADN recombinante (Cabilly y col., *supra*).

En el procedimiento del hibridoma, un ratón u otro huésped animal apropiado, como un hámster, se inmuniza, tal como se ha descrito hasta aquí, para obtener linfocitos que produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína utilizada para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos se podrían inmunizar *in vitro*. Los linfocitos se fusionan entonces con células de mieloma utilizando un agente fusionante adecuado, tal como el polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principle and Practice*, págs.59-103 [Academic Press, 1986]).

Las células de hibridoma preparadas de este modo se siembran y crecen en un medio de cultivo adecuado que preferiblemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina-guanina-fosforibosil-transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá típicamente hipoxantina, aminopterina, y timidina (medio HAT), cuyas sustancias evitan el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Las células de mieloma preferidas son aquellas que se fusionan eficientemente, aportan una producción estable y elevada de anticuerpo por las células productoras de anticuerpo, y son sensibles a un medio tal como el medio HAT. Entre éstas, las líneas celulares de mieloma preferidas son las líneas de mieloma murino, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-1 I disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California EEUU, y las células SP-1 disponibles en el American Type Culture Collection, Rockville, Maryland EEUU. También se han descrito líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133: 3001 [1984]; Brodeur y col., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, págs. 51-63 [Marcel Dekker, Inc., New York, 1987]).

El medio de cultivo en el cual se crecen las células de hibridoma se analiza para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferiblemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina por inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como un radioinmunoensayo (RIA) o un ensayo de inmunodetección ligada a enzima (ELISA).

La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se puede determinar, por ejemplo mediante el análisis de Scatchard de Munson y Pollard, *Anal. Biochem.*, 107: 220 (1980).

Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos con la especificidad, afinidad, y/o actividad deseada, los clones se podrían subclonar mediante análisis de dilución limitante y crecer mediante procedimientos estándares (Goding, *supra*). Entre los medios de cultivo adecuados para este propósito se incluyen, por ejemplo, el medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma se podrían crecer *in vivo* como tumores ascíticos en animales.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, fluido ascítico, o suero mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas tales como, por ejemplo, la proteína A-Sepharose, la cromatografía en hidroxilapatita, la electroforesis en gel, la diálisis, o la cromatografía de afinidad.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y secuenciar fácilmente utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas de oligonucleótidos capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se podría colocar en vectores de expresión, los cuales se transfectan entonces en células huésped tales como células *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que de lo contrario no producirían proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Entre los artículos de revisión sobre expresión de ADN recombinante en bacterias que codifica el anticuerpo se incluyen Skerra y col., *Curr. Opin. in Immunol.*, 5: 256-262 (1993) y Plückthun, *Immunol. Revs.*, 130: 151-188 (1992).

En otra realización, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo se pueden aislar a partir de librerías de fagos de anticuerpos utilizando las técnicas descritas en McCafferty y col., *Nature*, 348: 552-554 (1990), utilizando el antígeno apropiado tal como CD11a, CD18, IgE, o HER-2 para seleccionar un anticuerpo o fragmento de anticuerpo adecuado. Clackson y col., *Nature*, 325: 624-628 (1991) y Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, utilizando librerías de fagos. Publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (rango nM) mediante el barajamiento de cadenas (Mark y col., *Bio/Technology*, 10: 779-783 [1992]), así como la infección combinada y la recombinación *in vivo* como estrategias para construir librerías de fagos muy extensas (Waterhouse y col., *Nuc. Acids. Res.*, 21: 2265-2266 [1993]). Por lo tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas tradicionales de anticuerpos monoclonales de hibridomas para el aislamiento de anticuerpos “monoclonales”.

El ADN también puede modificarse, por ejemplo, reemplazando las secuencias codificantes de los dominios constantes ligeros y pesados humanos por los homólogos murinos (Cabilly y col., *supra*; Morrison, y col., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 81: 6851 [1984]), o mediante la unión covalente de toda o parte de la secuencia que codifica un polipéptido no inmunoglobulínico con la secuencia que codifica la inmunoglobulina.

Típicamente dichos polipéptidos no inmunoglobulínicos son sustituidos por los dominios constantes de un anticuerpo, o son sustituidos por los dominios variables de un sitio de unión al antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo quimérico bivalente que comprende un sitio de unión al antígeno que tiene especificidad para un antígeno y otro sitio de unión al antígeno que tiene especificidad para un antígeno diferente.

También se pueden preparar anticuerpos quiméricos o híbridos *in vitro* utilizando procedimientos conocidos en síntesis química de proteínas incluyendo aquéllos que involucran agentes de entrecruzamiento. Por ejemplo, se podrían construir inmunotoxinas utilizando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Entre los ejemplos de reactivos adecuados para este propósito se incluyen el iminotiolato y el metil-4-mercaptopbutirimidato.

Para aplicaciones diagnósticas, las variantes aquí derivadas a partir de anticuerpos típicamente se marcarán con una fracción detectable. La fracción detectable puede ser cualquiera capaz de producir, directa o indirectamente, una señal detectable. Por ejemplo, la fracción detectable podría ser un radioisótopo, tal como H^3 , C^{14} , P^{32} , S^{35} , o I^{125} ; un compuesto fluorescente o un quimioluminiscente, tal como el isotiocianato de fluoresceína, la rodamina, o la luciferina; marcadores con isótopos radiactivos, tales como, por ejemplo, I^{125} , P^{32} , C^{14} , o H^3 ; o una enzima, tal como la fosfatasa alcalina, la beta-galactosidasa, o la peroxidasa de rábano picante.

Se podría emplear cualquier procedimiento conocido en la materia para conjugar separadamente la variante polipeptídica con la fracción detectable, incluyendo los procedimientos descritos por Hunter y col., *Nature*, 144: 945 (1962); David y col., *Biochemistry*, 13: 1014 (1974); Pain y col., *J. Immunol. Meth.*, 40: 219 (1981); y Nygren, *J. Histochem. y Cytochem.*, 30: 407 (1982).

(iv) Anticuerpos humanizados y humanos

Los procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la materia. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él a partir de una fuente no humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos son a menudo denominados residuos “de importación”, los cuales se toman a partir de un dominio variable “de importación”. La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones y col., *Nature*, 321: 522-525 [1986]; Riechmann y col., *Nature*, 332: 323-327 [1988]; Verhoeven y col., *Science*, 239: 1534-1536 [1988]), mediante la sustitución de las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano por CDRs o secuencias CDR de ratón. Por consiguiente, dichos anticuerpos “humanizados” son anticuerpos quiméricos (Cabilly y col., *supra*), donde esencialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados típicamente son anticuerpos humanos en los cuales algunos residuos CDR y posiblemente algunos residuos FR son sustituidos por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

La elección de dominios variables humanos, ligeros y pesados, para utilizarlos en la fabricación de anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con la estrategia comúnmente llamada “mejor ajuste”, se criba la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor contra la librería completa de secuencias conocidas de dominio variable humano. Y a continuación se acepta la secuencia humana más cercana a la del roedor como región de entramado humana (FR) del anticuerpo humanizado (Sims y col., *J. Immunol.*, 151: 2296 [1993]; Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196: 901 [1987]). Otro método utiliza una región de entramado particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. La misma región de entramado se podría utilizar para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU*, 89: 4285 [1992]; Presta y col., *J. Immunol.*, 151: 2623 [1993]).

Es además importante que los anticuerpos se humanicen con retención de una alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, de acuerdo a un procedimiento preferido, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y varios productos humanizados utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Modelos tridimensionales de inmunoglobulina están disponibles comúnmente y resultan familiares para aquéllos expertos en la materia. Hay disponibles programas informáticos, los cuales ilustran y muestran las posibles estructuras de conformación tridi-

mensional de las secuencias candidatas de inmunoglobulina seleccionadas. La inspección de esta ilustración permite el análisis del posible papel de los residuos en el funcionamiento de la secuencia candidata de inmunoglobulina, es decir, el análisis de los residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse al antígeno. En este sentido, los residuos FR se pueden seleccionar y combinar a partir de secuencias consenso y de importación de manera que se obtenga la característica deseada del anticuerpo, tal como la afinidad aumentada por el(los) antígeno(s) diana. En general, los residuos CDR están directa y muy esencialmente involucrados en la influencia de unión al antígeno.

Alternativamente, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que sean capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción endógena de inmunoglobulina. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión (JH) de la cadena pesada de anticuerpo en ratones quiméricos y mutantes de líneas germinales resulta en la inhibición completa de la producción endógena de anticuerpos. La transferencia del conjunto de genes de inmunoglobulina de línea germinal humana en dicha línea germinal de ratones mutantes resultará en la producción de anticuerpos humanos tras la infección por un antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU, 90: 2551-255 (1993); Jakobovits y col., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann y col., Year in Immuno., 7:33 (1993). También se pueden producir anticuerpos humanos en librerías de expresión de fagos (Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381 [1991]; Marks y col., J. Mol. Biol., 222: 581 [1991]).

(v) Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos (BsAbs) son anticuerpos que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos se pueden derivar a partir de anticuerpos enteros o de fragmentos de anticuerpo (por ejemplo anticuerpos biespecíficos F(ab')₂).

Los procedimientos para la fabricación de anticuerpos biespecíficos son conocidos en la materia. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos completos se basa en la co-expresión de dos pares de cadena ligera-cadena pesada de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen diferentes especificidades (Millstein y Cuello, Nature, 305: 537-539 [1983]). Debido a la distribución aleatoria de cadenas pesadas y ligeras, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, la cual se hace normalmente mediante pasos de cromatografía de afinidad, es más bien pesada, y los rendimientos de producto son bajos. Métodos similares se describen en Patente Internacional WO 93/08829, publicada el 13 de mayo de 1993, y en Traunecker y col., EMBO J., 10: 3655-3659 (1991).

Según una aproximación diferente y más preferida, los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación antígeno-anticuerpo) se fusionan con secuencias de dominios constantes de inmunoglobulinas. La fusión se realiza preferiblemente con un dominio constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina, comprendiendo por lo menos parte de las regiones bisagra, CH2, y CH3. Es preferible que la primera región constante de la cadena pesada (CH1) contenga el sitio necesario para unirse a la cadena ligera, presente en por lo menos una de las fusiones. Los ADNs que codifican las fusiones de las cadenas pesadas de la inmunoglobulina, y, si se desea, la cadena ligera de la inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad para ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos polipeptídicos en aquellas realizaciones donde proporciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas utilizadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Es posible, sin embargo, insertar las secuencias que codifican dos o tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de por lo menos dos cadenas polipeptídicas en proporciones iguales resulta en rendimientos elevados o cuando proporciones no tienen ninguna importancia particular.

En una realización preferida de esta aproximación, los anticuerpos biespecíficos se componen de un cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y de un par híbrido cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se ha encontrado que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de las combinaciones de cadenas de inmunoglobulinas no deseadas, puesto que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una vía fácil de separación. Esta aproximación se describe en patente internacional WO 94/04690 publicada el 3 de marzo de 1994. Para más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh y col., Methods in Enzymology, 121: 210 (1986).

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos entrecruzados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado se puede unir a avidina, el otro a biotina. Se ha propuesto, por ejemplo, que dichos anticuerpos dirijan las células del sistema inmune contra las células indeseadas (Patente Americana US 4.676.980), y para el tratamiento de la infección por VIH (patentes internacionales WO 91/00360, WO92/200373, y patente europea EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados se podrían construir utilizando cualquier método de entrecruzamiento conveniente. Los agentes de entrecruzamiento adecuados son bien conocidos en la materia, y se describen en patente americana US 4.676.980, junto con una serie de técnicas de entrecruzamiento.

También se han descrito otras técnicas para la generación de anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos utilizando la unión química. Brennan y col.,

Science, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en donde se cortan anticuerpos intactos para generar fragmentos $F(ab')_2$. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de grupos ditioi arsenito de sodio para estabilizar ditioles consecutivos y prevenir la formación intermolecular de disulfuro. Los fragmentos Fab' generados se convierten entonces en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados Fab' -TNB se reconvierte a continuación en Fab' -tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivativo Fab' -TNB para formar el BsAb. Los BsAbs producidos se pueden utilizar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Progresos recientes han facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab' -SH a partir de *E. coli*, los cuales se pueden acoplar químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby y col., J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992) describen la producción de la molécula BsAb $F(ab')_2$ completamente humanizada. Cada fragmento Fab' se secretó en *E. coli* por separado y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el BsAb. El BsAb formado de este modo era capaz de unirse a células que sobreexpresaban el receptor HER2 y a células T humanas normales, así como de desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de cáncer de mama humano. Véase también Rodrigues y col., Int. J. Cancers, (Suppl.) 7: 45.50 (1992).

Se han descrito varias técnicas para fabricar y aislar fragmentos de BsAb directamente a partir del cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido heterodímeros de $F(ab')_2$ biespecíficos utilizando cremalleras de leucina. Kostelny y col., J. Immunol., 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos de la cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y entonces se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpo. La tecnología "diacuerpo" descrita en Hollinger y col., Proc. Natl. Acad. Sci. (EEUU), 90: 6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para fabricar fragmentos de BsAb. Los fragmentos comprenden un dominio variable de la cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (V_L) mediante un ligando, el cual es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Como consecuencia, los dominios V_H y V_L de un fragmento están forzados a unirse con los dominios complementarios V_L y V_H de otro fragmento, formando como consecuencia dos sitios de unión al antígeno. También se ha reportado otra estrategia para fabricar fragmentos de BsAb mediante el uso de dímeros Fv de cadena única (sFv). Véase Gruber y col., J. Immunol., 152: 5368 (1994). Estos investigadores diseñaron un anticuerpo el cual comprendía los dominios V_H y V_L de un primer anticuerpo unidos mediante un ligando de 25 residuos aminoácidos a los dominios V_H y V_L de un segundo anticuerpo. La molécula renaturalizada se unía a la fluoresceína y al receptor de células T y redireccionaba la lisis de las células tumorales humanas que tenían fluoresceína unida covalentemente a su superficie.

5. Usos de las Variantes de Anticuerpo

Las variantes de anticuerpos son útiles en ensayos de diagnóstico para un antígeno de interés, por ejemplo, su producción en células, tejidos, o suero específicos. Las variantes de anticuerpos se marcan de la misma manera que la descrita anteriormente y/o se inmovilizan sobre una matriz insoluble. En una realización de un ensayo de unión al antígeno, una composición que se une al antígeno se inmoviliza sobre una matriz insoluble, la muestra a analizar se contacta con la variante de anticuerpo inmovilizada para adsorber el antígeno, y entonces el antígeno inmovilizado se contacta con variantes de anticuerpos específicas para el antígeno, y se determina mediante marcadores únicos tales como fluoróforos discretos o semejantes. Determinando la presencia y/o cantidad de cada marcador único, se puede determinar la proporción y cantidad relativa del antígeno.

Las variantes de anticuerpos de esta invención también son útiles para la inmunización pasiva de pacientes.

Las variantes de anticuerpos también son útiles para la purificación por afinidad de un antígeno de interés a partir de un cultivo celular recombinante o de origen natural.

Ensayos de diagnóstico adecuados para un antígeno y sus variantes de anticuerpos son bien conocidos *per se*. Además de los bioensayos descritos en los ejemplos de más abajo en donde la variante candidata se prueba para ver si tiene una actividad biológica adecuada y una vida media aumentada, son útiles técnicas de inmunoensayo competitivo, tipo sándwich y de inhibición estérica. Los procedimientos competitivos y de tipo sándwich emplean un paso de separación de fases como parte integral del procedimiento, mientras que los ensayos de inhibición estérica se llevan a cabo en una sola mezcla de reacción. Fundamentalmente, se utilizan los mismos procedimientos para el ensayo de antígeno y para sustancias que se unen al antígeno, aunque ciertos métodos serán más preferibles dependiendo del peso molecular de la sustancia que se analiza. Por lo tanto, la sustancia a analizar se denomina aquí analito, independientemente de su estado ya sea antígeno o variante de anticuerpo, y las proteínas que se unen al analito se denominan parejas de unión, tanto si son anticuerpos, receptores celulares de superficie, o antígenos.

Todos los métodos analíticos para el antígeno o sus variantes de anticuerpos utilizan uno o más de los reactivos siguientes: análogo de analito marcado, análogo de analito inmovilizado, pareja de unión marcada, pareja de unión inmovilizada, y conjugados estéricos. Los reactivos marcados también se conocen como "trazadores".

La inmovilización de reactivos se requiere para ciertos métodos de ensayo. La inmovilización implica la separación de la pareja de unión de cualquier analito que quede libre en disolución. Esto se consigue convencionalmente o bien insolubilizando la pareja de unión o análogo de analito antes del procedimiento de ensayo, como por ejemplo por adsorción a una matriz o superficie insoluble en agua (Bennich y col., Patente America U.S. 3.720.760), o bien por

ES 2 317 645 T3

unión covalente (por ejemplo, utilizando entrecruzamiento con glutaraldehído), o bien insolubilizando después la pareja o el análogo, por ejemplo, por inmunoprecipitación.

Otros métodos de ensayo, conocidos como ensayos competitivos o tipo sándwich, están bien establecidos y se utilizan extensamente en la industria de diagnóstico comercial.

Los ensayos competitivos se basan en la capacidad de un análogo de marcador para competir con el analito de la muestra a analizar por un número limitado de sitios de unión en una pareja de unión común. La pareja de unión generalmente se insolubiliza antes o después de la competición y entonces el marcador y analito unidos a la pareja de unión se separan del trazador y analito no unido. Esta separación se consigue decantando (cuando la pareja de unión se había preinsolubilizado) o centrifugando (cuando la pareja de unión se había precipitado después de la reacción competitiva). La cantidad de analito de la muestra a analizar es inversamente proporcional a la cantidad de trazador unido cuantificada según la cantidad de sustancia marcada. Se preparan curvas dosis-respuesta con cantidades conocidas de analito y se comparan con los resultados de la prueba para determinar cuantitativamente la cantidad de analito presente en la muestra a analizar. Estos ensayos se denominan sistemas ELISA cuando se utilizan enzimas como marcadores de detección.

Otra especie de ensayo competitivo, llamado ensayo “homogéneo”, no necesita una separación de fase. Aquí, se prepara un conjugado de una enzima con el analito y se utiliza de tal manera que cuando el anti-analito se une al analito la presencia del anti-analito modifica la actividad de la enzima. En este caso, el antígeno o sus fragmentos inmunológicamente activos se conjugan con un puente orgánico bifuncional a una enzima, tal como la peroxidasa. Los conjugados se seleccionan para su utilización con anti-polipéptidos de manera que la unión del anti-polipéptido inhibe o potencia la actividad enzimática del marcador. Este método *per se* se practica extensamente con el nombre de EMIT.

Los conjugados estéricos se utilizan en métodos de impedimento estérico para ensayos homogéneos. Estos conjugados se sintetizan mediante la unión covalente de un hapteno de bajo peso molecular a un analito pequeño de manera que el anti-hapteno sea esencialmente incapaz de unirse al conjugado al mismo tiempo que el anti-analito. En este procedimiento de ensayo el analito presente en la muestra a analizar se unirá al anti-analito, permitiendo por consiguiente la unión del anti-hapteno con el conjugado, que resulta en un cambio de las características del hapteno conjugado, por ejemplo, un cambio en la fluorescencia cuando el hapteno es un fluoróforo.

En particular los ensayos tipo sándwich son útiles para la determinación de variantes polipeptídicas o polipéptidos de variantes de anticuerpos. En ensayos secuenciales tipo sándwich se utiliza una pareja de unión inmovilizada para adsorber el analito de la muestra a analizar, la muestra a analizar se elimina mediante lavados, el analito unido se utiliza para adsorber la pareja de unión marcada, y el material unido se separa entonces del marcador residual. La cantidad de marcador unido es directamente proporcional al analito de la muestra a analizar. En ensayos tipo sándwich “simultáneos” la muestra a analizar no se separa antes de añadir la pareja de unión marcada. Un ensayo subsiguiente tipo sándwich utilizando un anticuerpo monoclonal como un anticuerpo y un anticuerpo policlonal como el otro es útil para analizar la actividad antigénica de las muestras.

Los ejemplos anteriores corresponden meramente a ensayos de diagnóstico para la variante polipeptídica y la variante de anticuerpo. Otros métodos desarrollados ahora o de aquí en adelante para la determinación de estos analitos se incluyen dentro del ámbito de la invención, incluyendo los bioensayos descritos más arriba.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo ilustrativo y no como limitación. Las descripciones de todas las citas en esta especificación se incorporan expresamente aquí como referencias.

Ejemplo I

Métodos

Construcción del plásmido

El plásmido molde, pH52, utilizado para la construcción de los Fabs (de aquí en adelante denominados Fab) empleados en este ejemplo se derivó del plásmido pB0475 descrito en Cunningham y col., Science 243: 1330-1336 (1989). Dos sitios *Bam*HI que flanquean el origen F1 se extrajeron del pB0475 y el ADN que codifica la hormona de crecimiento humano se sustituyó por ADN que codifica el Fab H52 anti-CD18, versión OZ (Eigenbrot y col., Protein, 18: 49-62 [1994]) utilizando los sitios *Eco*RV y *Sph*I. Por lo tanto, pH52 contiene ADN que codifica Fab H52 anti-CD18 (versión OZ), los péptidos señal STII de la cadena ligera y pesada, la región promotora de la fosfatasa alcalina, una región del fago auxiliar M13, y resistencia a ampicilina. Las variantes Fab se construyeron mediante mutagénesis de pH52 por el método Kunkel (Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82: 488-492 [1985]) utilizando los siguientes oligonucleótidos:

oligo V1A 5' GTGACCGTGCCTCACCAGAGCTTGGGCAC3' (Nº ID. SEC: 12)

cambia Ser195-Ser196 a His195-Gln196

ES 2 317 645 T3

oligo V1B 5'TGGCACCCCTCCCCTAAGAACTCGAGCATGATCAGCAACACACCGGCCCTGGGC3' (Nº ID. SEC: 13)

cambia Ser127-Ser-Lys-Ser-Thr-Ser-Gly-Gly-Thr-Ala-Ala139 (Nº ID. SEC: 14)

a Ser127-Pro-Lys-Asn-Ser-Ser-Met-Ile-Ser-Asn-Thr-Pro-Ala139 (Nº ID. SEC: 15)

oligo V1C 5' TGGCACCCCTCCAAATCGAGCATCACAGCGGCCCT3' (Nº ID. SEC: 16)

cambia Ser127-Ser-Lys-Ser-Thr-Ser-Gly-Gly-Thr137 (Nº ID. SEC: 17)

a Ser127-Lys-Ser-Ser-Ile-Thr137 (Nº ID. SEC: 18)

oligo V2 5' TGGTGACCGTGATCTCGAGCCACTTGGGCCAGCAGACCTACATC3' (Nº ID. SEC: 19)

cambia Val193-Pro-Ser-Ser-Ser-Leu-Gly-Thr-Gln203 (Nº ID. SEC: 20)

a Val193-Ile-Ser-Ser-His-Leu-Gly-Gln-Gln203 (Nº ID. SEC: 21)

Los números de los residuo de aminoácido están de acuerdo a la numeración descrita en Kabat y col., *supra*, NIH Publ. No. 91-3242, Vol. I, páginas 647-669 (1991).

El Fab v1 incorporó los oligos VIA y V1C; el Fab v1b incorporó los oligos V1A y V1B; el Fab v2 incorporó el oligo V2. Se seleccionaron los plásmidos que codificaban Fab v1, Fab v1b, y Fab v2 y se comprobaron las secuencias de ADN utilizando la secuenciación de didesoxinucleótidos (protocolo Sequenase™, United States Biochemical). Las construcciones F(ab')₂ se fabricaron insertando el ADN que codifica la región bisagra de la IgG1 seguida de una "cremallera de leucina" en el extremo C-terminal del domino constante de cadena pesada H52.

La secuencia de aminoácidos insertada era:

CPPCPAPELLGGRMKQLEDKVEELLSKNYHLENEVARLKKLVGGER (Nº ID. SEC: 22).

Otro conjunto de versiones de Fab está basado en Fab v1b, es decir, la variante que mostró una vida media más larga, utilizando los siguientes oligonucleótidos:

oligo V1D 5' TCGAGCATGATCTCTAGAACACCGGCCCC3' (Nº ID. SEC: 23)

cambia Asn136 a Arg136

oligo V1E 5' GCCTCACCAGAACCTAGGCACCAAGACCTACATCTG3' (Nº ID. SEC: 24)

cambia Ser197 a Asn197 y Gln203 a Lys203

oligo V1F 5' GCCTCACCAGAACTTAAGCGACGGAAAGACCTACATCTGC3' (Nº ID. SEC: 25)

cambia Gln 196-Ser-Leu-Gly-Thr-Gln-Thr204 (Nº ID. SEC: 26)

a Gln196-Asn-Leu-Ser-Asp-Gly-Lys-Thr204 (Nº ID. SEC: 27)

oligo V1G 5' GCCTCACCAGAAATATTACAGATGGCAAGACCTACATCTGC3' (Nº ID. SEC: 28)

cambia Gln 196-Ser-Leu-Gly-Thr-Gln-Thr204 (Nº ID. SEC: 29)

a Gln196-Asn-Ile-Ser-Asp-Gly-Lys-Thr204 (Nº ID. SEC: 30)

El Fab v3 incorpora el oligo V1D; el Fab v4 incorpora el oligo V1E; el Fab v5 incorpora el oligo V1F; y el Fab v6 incorpora el oligo V1G.

ES 2 317 645 T3

Expresión de ADN que codifica las Variantes

Para cada variante, el plásmido de ADN se transformó en *E. coli*. Los transformantes se plaquearon en placas de Caldo de Luria (LB) con 5 mg/mL de carbenicilina y se incubaron a 37°C durante toda la noche. Se inoculó una sola colonia en 5 mL [LB + 5 mg/ml de carbenicilina] y se creció durante 6-7 horas a 37°C. El cultivo de 5 mL se añadió entonces a 500 mL de medio mínimo AP5 en un frasco con deflector de 2 L y se creció durante 16 horas a 37°C.

El medio mínimo AP5 se produjo como sigue: Para 1 litro se añade 1,5 g de glucosa (SigmaTM G-7021), 2,2 g de casaminoácidos (DifcoTM 0231-01-0), 0,3 g de extracto de levadura certificado (DifcoTM 0127-01-7), 0,19 g de MgSO₄ anhidro o 0,394 g de MgSO₄·7H₂O (SigmaTM M2773), 1,07 g de cloruro de amonio (SigmaTM A9434), 0,075 g de KCl (SigmaTM P5405), 4,09 g de NaCl (SigmaTM S3014), 120,0 mL de trietanolamina 1M pH 7,4, ajustado a 1,0 L con agua Super-QTM, así como trietanolamina 1M pH 7,4 que consiste en 133,21 mL de trietanolamina, Liquid (SigmaTM T1377) y 950 mL de agua Super-QTM, pH a 7,4 con HCl (MallinckrodtTM 2612), ajustado a 1,0 L con agua Super-QTM. Esto se filtra a través de un filtro SealkleenTM de 0,1 mm y se guarda a 2-8°C. El periodo de caducidad es de 6 meses.

Las células se centrifugaron a 3000 rpm durante 30 minutos en una frasco de centrífuga de 1 L, el sobrenadante se decantó y las células sedimentadas se congelaron durante 1 hora. El sedimento se resuspendió en 10 mL de tampón TE frío (TRIS 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,6) con 100 µL de benzamidina 0,1 M (Sigma) añadidos. El sedimento resuspendido se agitó en hielo durante 1 hora, se centrifugó a 18.000 rpm durante 15 minutos, y el sobrenadante se decantó y se mantuvo en hielo.

El sobrenadante se pasó entonces por una columna Protein G-SepharoseTM Fast Flow (Pharmacia) [0,5 mL de volumen de matriz] previamente equilibrada mediante el paso de 10 mL de tampón TE a través de la columna. La columna se lavó entonces con 10 mL de tampón TE, y el Fab se eluyó con 2,5 mL de ácido acético 100 mM, pH 2,8, en un tubo con 0,5 mL de TRIS, pH 8,0. El eluyente se concentró en un Centricon-30TM (Amicon) en una centrífuga hasta 0,5 mL, se añadieron 2 mL de solución salina tamponada con fosfato al eluyente concentrado, y la mezcla resultante se reconcentró a 0,5 mL. Se migraron geles de SDS-PAGE para asegurarse de que se había producido proteína.

Métodos Analíticos Utilizados Durante el Procedimiento de Purificación de Variantes Anti-CD11/CD18 Fab y fragmentos de anticuerpo F(ab')₂

Para analizar los productos obtenidos en cada paso del proceso de purificación, se utilizaron electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) y dos métodos diferentes de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Entre los métodos de HPLC utilizados se incluyen cromatografía en fase reversa y cromatografía de intercambio catiónico, los cuales se realizaron en un sistema HPLC de WATERSTM.

La cromatografía en fase reversa se llevó a cabo en una columna PLRP-STM de fase reversa de 4,6 x 50 mm, con un tamaño de partícula de 8 mm (Polymer Laboratories, Shropshire, UK), mantenida a 50°C. Las proteínas se eluyeron utilizando un gradiente lineal creciente desde 31% de B hasta 41% de B. El Tampón A contenía 0,1% de ácido trifluoroacético en agua desionizada, y el Tampón B contenía 0,1% de ácido trifluoroacético en acetonitrilo con grado de pureza HPLC. La velocidad de flujo se mantuvo a 2 mL/min y el perfil de proteínas se monitorizó a 214 nm.

El análisis por cromatografía de intercambio catiónico se llevó a cabo en una columna de carboxi-sulfono Bakerbond (CSX)TM de 50 x 4,6 mm (J. T. Baker Phillipsburg, NJ), mantenida a 55°C. Las proteínas se eluyeron utilizando un gradiente lineal creciente desde pH 6,0 hasta pH 8,0 a una velocidad de flujo constante de 2 mL/min utilizando una longitud de onda de detección de 280 nm. El Tampón A contenía 16 mM de cada uno de los tampones HEPES/PIPES/MES, pH 6,0, y el Tampón B contenía 16 mM de cada uno de los tampones HEPES/PIPES/MES, pH 8,0. Para la separación de las diferentes variantes de Fab, se pasó un gradiente lineal durante 22 min desde 25% de B hasta 56% de B. Para la separación de los fragmentos de anticuerpo Cremallera- F(ab')₂ y F(ab')₂, se pasó un gradiente lineal desde el 40% hasta el 100% de B en 22 minutos.

El análisis por SDS-PAGE se llevó a cabo en geles prepolimerizados NovexTM (Novex, San Diego, CA.). Las proteínas se tiñeron utilizando el método de tinción de plata de Morrissey. Morrissey, Anal. Biochem., 117: 307-310 (1981).

Purificación del Fragmento de Anticuerpo Fab Anti-CD11/CD18 y Variantes de Fab

El fragmento de anticuerpo Fab anti-CD 11/CD 18 y las diferentes variantes de Fab se aislaron utilizando el mismo esquema de separación y purificación.

Extracción

Las células sedimentadas congeladas (100 g) se resuspendieron a temperatura ambiente en tampón MES 120 mM, pH 6,0, con EDTA 5 mM (5 ml de tampón por g de células sedimentadas) y se rompieron completamente mediante tres pasajes a través de un microfluidizador (Microfluidics Corporation, Newton, MA). El homogenado se ajustó a 0,25% (v/v) de polietilenimina (PEI) y el resto sólido se extrajo mediante centrifugación (7280 x g, 30 min, 4°C).

Cromatografía ABX

El sobrenadante que contenía el fragmento de anticuerpo se diluyó a una conductividad de 2,5 milisiemens con agua purificada, se filtró a través de un filtro de 0,22 micras (Suporcap-50™, Gelman Sciences, Ann Arbor, Michigan), y entonces se cargó en una columna Bakerbond ABX de 1,6 x 9,5 cm (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) equilibrada en MES 50 mM/EDTA disódico 5 mM, pH 6,0 (Tampón A). El efluente se monitorizó con UV a 280 nm. Después de cargarla, se lavó la columna con Tampón A hasta que la señal UV retornó al nivel basal. Los fragmentos de anticuerpo se eluyeron con un gradiente de 20 volúmenes de columna desde 0 hasta 100 mM de sulfato de amonio en tampón A. Las fracciones se analizaron con una columna de intercambio catiónico como se describe más arriba en la sección de Métodos Analíticos y se agruparon adecuadamente.

Cromatografía de Alta Eficiencia en Sepharose SP (SPHP)

El agrupado de la cromatografía ABX se diluyó con agua para inyección (WFI) a una conductividad de menos de 4 mS y se cargó en una columna de SPHP de 1,6 x 9,2 cm (Pharmacia Biotech Inc. Piscataway, NJ), equilibrada con tampón MOPS 25 mM, pH 6,9. La separación se consiguió con un gradiente lineal de 20 volúmenes de columna desde 0 hasta 20 mM de acetato de sodio en tampón MOPS 25 mM, pH 6,9. Las fracciones se analizaron por CSX HPLC y SDS-PAGE como se describe en la sección de Métodos Analíticos y se agruparon adecuadamente.

Formulación

Las agrupaciones del SPHP que contenían los fragmentos de anticuerpo se concentraron a 5 mg/mL utilizando celdillas de agitación Amicon y filtros de membrana YM 10 (Amicon, Inc. Beverly, MA). Se cambió el tampón de las muestras de anticuerpo purificadas y concentradas a solución salina tamponada con fosfato (PBS) mediante cromatografía de filtración en gel en una columna de Sephadex™ G-25 (Pharmacia Biotech Inc. Piscataway, NJ).

Determinaciones de Endotoxinas

Las determinaciones de endotoxinas se realizaron con el ensayo del lisado de amebocitos del *Limulus* (Associates of Cape Cod Inc., Woods Hole, MA). Las muestras que contenían menos de 2 unidades de endotoxinas (Ue) por mg de proteína se utilizaron en los estudios farmacocinéticos.

Purificación del Fragmento de Anticuerpo F(ab')₂ Anti-CD11/CD18

El fragmento F(ab')₂ se purificó inicialmente por cromatografía ABX como una variante (Fab')₂ con cremallera de leucina [cremallera-F(ab')₂]. Esta construcción se diseñó mediante la adición de un dominio de cremallera de leucina después de la región bisagra de la cadena pesada H52. Después de la purificación, el dominio de cremallera de leucina se cortó mediante digestión con pepsina tras la cual se purificó el F(ab')₂ por cromatografía SPHP y Phenyl Toyopearl™ tal como se describe más abajo.

Extracción y Cromatografía ABX del Fragmento de Anticuerpo Cremallera-F(ab)₂

La extracción y la cromatografía ABX del fragmento de anticuerpo cremallera-F(ab)₂ se llevó a cabo tal como se describe más arriba para las variantes del fragmento de anticuerpo Fab.

Digestión con Pepsina del Fragmento de Anticuerpo Cremallera-F(ab')₂

El fragmento Cremallera-F(ab')₂ purificado por ABX se trató con pepsina para extraer la porción de la cremallera de leucina de la molécula para obtener el fragmento de anticuerpo F(ab'). La muestra purificada por ABX se concentró a 5 mg/mL en celdillas de agitación Amicon y entonces se diluyó 1:3,5 con tampón de citrato de sodio 100 mM, pH 3,5. A esta solución se le añadió pepsina (1 mg/mL) disuelta en tampón de citrato de sodio 100 mM, pH 3,5, en una proporción pepsina:proteína de 1:12. Después de 4 horas a temperatura ambiente, el pH de la mezcla se elevó a pH 6,4 con NaOH al 10%.

Cromatografía SPHP del Fragmento de Anticuerpo Cremallera-F(ab')₂ Tratado con Pepsina

La purificación del fragmento de anticuerpo F(ab')₂ del dominio de la cremallera de leucina y de fragmentos de anticuerpo no deseados se consiguió por cromatografía SPHP como se describe más arriba para las variantes del fragmento de anticuerpo Fab.

Cromatografía Phenyl Toyopearl™ del Fragmento de Anticuerpo F(ab')₂ purificado por SPHP

La agrupación de F(ab')₂ purificado por SPHP se llevó a 1,5 M en sulfato de amonio mediante la adición de sulfato de amonio sólido. El agrupado condicionado se cargó entonces en una columna Toyopearl™ 650M (Tosohas, Montgomeryville, PA) 1,6 x 10 cm equilibrada con sulfato de amonio 1,5 M, acetato de sodio 50 mM, pH 5,4 (Tampón A). Se pasó un gradiente de 20 volúmenes de columna desde 70% de Tampón A hasta 100% de sulfato de amonio 0,15 M en acetato de sodio 50 mM, pH 5,4 (Tampón B). Las fracciones se analizaron por HPLC en fase reversa y CSX y SDS-PAGE como se describe en la sección de Métodos Analíticos más arriba.

ES 2 317 645 T3

Formulación del Fragmento de Anticuerpo $F(ab')_2$ y Cuantificación de Endotoxinas

La formulación del fragmento de anticuerpo $F(ab')_2$ purificado se realizó como se describe más arriba para las variantes del fragmento de anticuerpo Fab. Después de la determinación de endotoxinas, las muestras que contenían menos de 2 uE por mg de proteína se utilizaron para los estudios farmacocinéticos expuestos más abajo.

Estudio farmacocinético de las Construcciones Anti-CD11/18 en Ratones después de Administración Intravenosa

El objetivo de este estudio farmacocinético de una sola dosis de cinco fragmentos de anticuerpo humanizados huH52 anti-CD18 (construcciones) en ratones era determinar si el aclaramiento inespecífico de los fragmentos de anticuerpo estaba afectado por las alteraciones en aminoácidos del dominio constante. Se recogieron muestras de suero de ratones CD1 machos a lo largo de un periodo de 24 horas y se midieron las concentraciones de anti-CD18 humano en suero por ELISA.

Los fragmentos de anticuerpo anti-CD18 investigados se derivaron de fragmentos de anticuerpo monoclonal humanizado Fab recombinantes producidos en *E. coli* como se describe más arriba. Se investigaron el fragmento Fab y la construcción en la cual se juntaron dos subunidades Fab' mediante dos enlaces disulfuro. Finalmente, se construyeron tres nuevas versiones del Fab original mediante la alteración de aminoácidos en el dominio constante. Véase la tabla Diseño del Estudio más abajo para una mayor descripción de las construcciones.

Los sitios de unión al antígeno de la construcción están dirigidos contra la subunidad CD18 del complejo de glicoproteína CD11/CD18 en la superficie de leucocitos. Estos fragmentos de anticuerpo son específicos de chimpancé y hombre; por lo tanto, la información farmacocinética del suero obtenida en ratones proporciona una descripción del aclaramiento inespecífico de los fragmentos.

Debido a que se esperaban farmacocinéticas lineales en este estudio, se eligió una sola dosis de 2 mg/kg en lugar de dosis múltiples.

Diseño del estudio^a

Número de grupo	ID de la construcción	Descripción de la construcción
1	Fab	Fragmento Fab solo
2	Doble disulfuro	Dos subunidades Fab' unidas por un doble enlace disulfuro
3	Fabv1	nueva versión 1 del Fab original construida mediante la alteración de aminoácidos en el dominio constante
4	Fabv1B	nueva versión 2 del Fab original construida mediante la alteración de aminoácidos en el dominio constante
5	Fabv2	
a: Cada grupo consistió en 20 ratones machos; cada ratón recibió una dosis de 2 mg/kg.		

Se estudiaron las farmacocinéticas de las cinco construcciones de anticuerpo en ratones Crl:CD-1[®] (ICR)BR VAF/Plus[®] macho (aproximadamente 20-30 g). Cinco grupos, cada uno consistente en veinte ratones, recibieron una dosis de bolo intravenosa de 2 mg/kg por la vena de la cola. Se tomaron muestras de sangre a los 5 y 30 minutos, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20, y 24 horas post-dosis. Se recogió el suero y se determinaron las concentraciones de los fragmentos de anticuerpo en un ELISA MAC-1 Capture como sigue:

Placas de 96 pocillos de microtitulación se recubrieron durante la noche con anticuerpo monoclonal murino anti-CD18. Después de una incubación durante la noche a 4°C, se lavaron las placas tres veces con tampón de lavado de ELISA y se bloquearon durante una hora con diluyente de ELISA. El tampón de lavado de ELISA es solución salina tamponada con fosfato (PBS)/0,05% de Polysorbate™ 20. Este tampón se prepara por litro como 50 mL de PBS 20 X/1,0% de Polysorbate™ 20 (mezcla obtenida mediante la disolución de 160 g de NaCl, 4,0 g de KCl, 22,6 g de Na₂HPO₄, y 4,0 g de KH₂PO₄ en agua destilada o desionizada, añadiendo 10,0 mL de Polysorbate™ 20 [Sigma™ P-1379 o equivalente], ajustado a 1000 mL, y filtrándolo en condiciones estériles utilizando un filtro de 0,22 mm o menor), y ajustado a 1,0 L con agua destilada o desionizada, guardado a temperatura ambiente. El periodo de caducidad es de 2 semanas a partir de la fecha de preparación.

El diluyente de ELISA era PBS/0,5% de BSA/0,05% de Polysorbate™ 20/0,01% de Thimerosal™/CaCl₂ 1 mM / MgCl₂ 1 mM. Este diluyente se preparó por litro como 5,0 g de albúmina sérica bovina (Armour™ N0068 o equivalente), 50 mL de PBS 20 X/ 1,0% de Polysorbate™ 20/0,2% de Thimerosal™ (mezcla obtenida mediante la disolución de 160 g de NaCl, 4,0 g de KCl, 22,6 g de Na₂HPO₄, y 4,0 g de KH₂PO₄ en agua destilada o desionizada, y añadiendo 10,0 mL de Polysorbate™ 20 [Sigma™ P-1379 o equivalente], y 2,0 g de Thimerosal™ [Sigma T-5125 o equivalente], ajustado a 1000 mL, 0,1% (v/v) de CaCl₂ 1 M (Genentech™ A3165), 0,1% (v/v) de MgCl₂ 1M (Genentech™ A3167), ajustado a 1,0 L con agua destilada o desionizada, y guardado a 2-8°C, con un periodo de caducidad de 1 mes a partir de la fecha de preparación.

Después del bloqueo, las placas se lavaron otra vez tres veces con tampón de lavado ELISA. A continuación se capturó MAC1 soluble (CD11b/VD18 según se describe en Berman y col., J. Cell. Biochem., 52: 183-195 [1993]) de un concentrado de medio, condicionado por células CHO que expresaban el heterodímero truncado CD116/CD18. Después de un periodo de incubación de 2 horas, se lavaron las placas seis veces con tampón de lavado ELISA y se añadieron 100 µL de la muestra de suero de ratón en prueba o del estándar que contenía el Fab anti-CD18 humano recombinante homólogo. Las muestras de suero de ratón se diluyeron primero 1/10 en diluyente ELISA y después 1/4 más en diluyente de muestra; se tomaron 100 µL de esta dilución inicial 1/40. El diluyente de muestra es 10% de suero de Ratón Swiss Webster en diluyente ELISA. Después de una segunda incubación de 2 horas, las placas se lavaron otra vez seis veces con tampón de lavado ELISA y se añadieron 100 µL de F (ab')₂ conjugado con peroxidasa de rábano picante dirigido contra Fab humano. Después de una incubación de 1 hora a temperatura ambiente, las placas se lavaron con tampón de lavado ELISA como se describe más arriba y se añadieron 100 µL de suero tamponado con fosfato, pH 7,2, con 2,2 mmol/L de ortofenileno diamina (OPD) y 0,012% (v/v) de peroxidasa de hidrógeno (H₂O₂) a cada pocillo. Cuando el color se había desarrollado completamente, se paró la reacción con 100 µL por pocillo de 4,5 mol/L de ácido sulfúrico. Se midió la absorbancia de los contenidos del pocillo a 492 nm y se restó la absorbancia de fondo a 405 nm utilizando un lector de placa automático de SLT Labinstruments. Se redujeron los datos utilizando un programa de ajuste de curvas de cuatro parámetros basado en un algoritmo para la estimación por mínimos cuadrados de los parámetros no lineales.

Se analizaron los datos de concentraciones de suero *versus* tiempo utilizando un programa no lineal de ajuste de curvas y se estimaron los parámetros farmacocinéticos siguientes. D'Argenio y Schumitzky, ADAPT II User's Guide, Biomedical Simulations Resource, University of Southern California, Los Angeles, Publicación 2, 1990.

Se utilizó un modelo de dos compartimentos para caracterizar los datos de concentración de suero *versus* tiempo para los cinco grupos. Véase Tabla 2 para parámetros de modelo primarios y parámetros farmacocinéticos calculados. El modelo de ajuste de dos compartimentos se aplica a los resultados y se muestra en Figuras 1A y 1B. Se proporciona un listado de datos en la Tabla 3. El volumen del compartimento central se aproximaba al volumen de plasma para todos los grupos.

TABLA 2

Estimaciones de los Parámetros Primarios y Secundarios del Modelo Farmacocinético Determinadas Tras la Administración de 2 mg/kg de Construcciones a Ratones					
Número de grupo	1	2	3	4	5
Ligando	Fab	Doble S-S	Fab v1	Fab v1B	Fab v2
Dosis (mg/kg)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
V ₁ /W (mL/kg) ^a	44,7	53,9	51,7	42,3	49,1
K _e (hr ⁻¹) ^b	4,22	0,486	3,35	1,89	3,86

ES 2 317 645 T3

	$K_{cp}(\text{hr}^{-1})^c$	0,431	0,581	1,21	4,01	1,77
5	$K_{pc}(\text{hr}^{-1})^d$	1,40	1,09	1,22	3,42	1,33
	$CL/W(\text{mL/hr/kg})^e$	189	26	173	80	190
	$t_{1/2\alpha}(\text{hr})^f$	0,14	0,37	0,14	0,08	0,11
10	$t_{1/2\beta}(\text{hr})$	0,57	2,5	0,84	0,92	0,83
	$T_{\max}(\text{min})^g$	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
	$C_{\max}(\mu\text{g/mL})^h$	34	35	28	34	26
15	$C_o(\mu\text{g/mL})^i$	39	46	39	44	39
	AUC/dosis/W	9,3	96	12	23	10
20	$T(\text{hr})^k$	0,24	2,1	0,30	0,53	0,26

^a Volumen del compartimento central calculado según la ecuación $V = \text{dosis}/\Sigma A_i$.

^b K_e es la constante de velocidad asociada con la eliminación de material del compartimento central.

^c K_{cp} es la constante de velocidad asociada con la transferencia de material del compartimento central al compartimento periférico.

^d K_{pc} es la constante de velocidad asociada con la transferencia de material del compartimento periférico al compartimento central.

^e Aclaramiento del suero normalizado por el peso.

^f $t_{1/2\alpha}$ y $t_{1/2\beta}$ son las vidas medias inicial y terminal asociadas con cada fase exponencial.

^g Tiempo de concentración máxima observada.

^h Concentraciones máximas observadas.

ⁱ Concentración a tiempo cero estimada a partir de la función de disposición en ΣA_i .

^j Área bajo la curva de concentración de suero normalizada por dosis y peso versus curva de tiempo.

^k Tiempo de permanencia.

ES 2 317 645 T3

TABLA 3

Listado de Datos: Datos de concentración vs. tiempo para 2 mg/kg de construcciones anti-CD18 humano. ^a Concentración (µg/mL)					
Tiempo (horas)	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
0,083	28,12	34,28	26,1	28,16	25,16
0,083	33,89	34,67	28,38	33,63	26,39
0,5	4,84	26,6	4,67	10,61	4,25
0,5	5,17	20,74	5,83	12,83	4,21
1	0,91	16,18	2,1	7,16	1,95
1	1,09	18,24	2,13	6,89	1,54
2	0,16	11,01	0,82	3,71	0,76
2	0,31	12	0,57	4,9	0,68
4	0,31	6,36	0,14	0,91	0,15
4	LTS ^b	6,78	0,14	0,67	0,12
8	LTS	1,95	LTS	LTS	LTS
8	LTS	1,66	LTS	LTS	LTS
12	LTS	0,71	LTS	LTS	LTS
12	LTS	0,88	LTS	LTS	LTS
16	LTS	0,17	LTS	LTS	LTS
16	LTS	0,16	LTS	LTS	LTS
20	LTS	0,1	LTS	LTS	LTS
20	LTS	0,08	LTS	LTS	LTS
24	LTS	0,08	LTS	LTS	LTS
24	LTS	LTS	LTS	LTS	LTS
^a Datos de Concentración representan una muestra por ratón.					
^b LTS = Menos que la sensibilidad del ensayo (0,13 µg/ml para los grupos 1 y 3-5; 0,06 µg/ml para el grupo 2).					

Resultados

Los resultados se muestran en las Figuras 1A y 1B, donde la Fig. 1A muestra las farmacocinéticas de las cinco construcciones durante un periodo de tiempo de 0 a 5 horas, y la Fig. 1B muestra las farmacocinéticas de las cinco construcciones durante un periodo de tiempo de 0 a 25 horas. Las vidas medias iniciales (o fase α) variaron igual que lo hicieron las vidas medias terminales (fase β). La variante Fab v1B tuvo un aclaramiento de 80 mL/hr/kg, la cual es alrededor de tres veces más alta que la del (Fab')₂ de doble disulfuro. Los Fab v1, Fab, y Fab v2 tuvieron un aclaramiento alrededor de 3 veces mayor que el Fab v1B y un aclaramiento alrededor de 6 veces mayor que el (Fab')₂ de doble disulfuro (173, 189, y 190 mL/hr/kg, respectivamente).

ES 2 317 645 T3

El peso molecular efectivo del Fab original fue 49 kD, y su aclaramiento fue de 189 mL/hr/kg.

Las versiones Fab 1, 1B, y 2 todas tienen pesos moleculares similares a los del Fab original, aunque la versión 1B se eliminó del suero 2 veces más despacio. Por lo tanto, alteraciones de la secuencia de aminoácidos en el dominio constante de Fab afectan al aclaramiento. El efecto observado en la fase beta de vida media muestra que con las dos variantes menos exitosas 1 y 2, había un efecto detectable que no era suficiente para aumentar significativamente el tiempo de permanencia global.

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad en este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- WO 9322332 A [0004]
- WO 9404689 A [0005]
- US 4683195 A [0025]
- US 4816567 A, Cabilly [0036]
- EP 404097 A [0040]
- WO 9311161 A [0040]
- WO 9118011 A [0048]
- WO 9116928 A [0048]
- WO 9116927 A [0048]
- CA 2008368 [0048]
- WO 9015076 A [0048]
- WO 9010652 A [0048]
- EP 387668 A [0048]
- EP 379904 A [0048]
- EP 346078 A [0048]
- EP 121389 A [0048]
- US 5071964 A [0048]
- US 5002869 A [0048]
- AU 8815518 [0048]
- EP 289949 A [0048]
- EP 303692 A [0048]
- WO 9106667 A [0057]
- US 5010182 A [0095]
- EP 362179 A [0095]
- WO 9013646 A [0095]
- EP 117060 A [0103] [0119]
- US 4965199 A [0104]
- EP 36776 A [0108]
- EP 73657 A, Hitzeman [0111]
- GB 2211504 A [0112]
- US 4419446 A [0113]
- US 4601978 A [0113]
- EP 117058 A [0119]
- EP 307247 A [0119]
- WO 9108291 A [0119]
- DD 266710 [0120]
- US 4946783 A [0120]
- EP 139383 A [0121]
- US 4943529 A [0121]
- EP 402226 A [0121]
- EP 183070 A [0121]
- EP 244234 A [0121]
- EP 394538 A [0121]
- WO 9100357 A [0121]
- EP 321196 A [0123]
- WO 8905859 A [0126]

ES 2 317 645 T3

- WO 9100358 A [0126]
- US 4399216 A [0127]
- US 4767704 A [0129]
- US 4657866 A [0129]
- 5 • US 4927762 A [0129]
- US 5122469 A [0129]
- US 4560655 A [0129]
- US 30985 A [0129]
- WO 9003430 A [0129]
- WO 8700195 A [0129]
- 10 • WO 8705330 A [0154]
- US 4640835 A [0157]
- US 4496689 A [0157]
- US 4301144 A [0157]
- 15 • US 4670417 A [0157]
- US 4791192 A [0157]
- US 4179337 A [0157]
- US 5135915 A [0178]
- DD 213134 [0178]
- EP 125847 A [0178]
- 20 • JP 60061501 B [0179]
- US 4462215 A [0179]
- US 4494385 A [0179]
- US 4745055 A [0183]
- 25 • EP 256654 A [0183]
- EP 120694 A [0183]
- EP 125023 A [0183]
- EP 255694 A [0183]
- EP 266663 A [0183]
- WO 8803559 A [0183]
- 30 • US 4444878 A [0183]
- WO 8803565 A [0183]
- EP 68763 A [0183]
- WO 9308829 A [0207]
- 35 • WO 9404690 A [0209]
- US 4676980 A [0210] [0210]
- WO 9100360 A [0210]
- WO 92200373 A [0210]
- EP 03089 A [0210]
- 40 • US 3720760 A, Bennich [0219]

Documentos que no son patentes citados en la descripción

- 45 • **BRAMBELL** *et al. Nature*, 1964, vol. 203, 1352-1355 [0002]
- **BRAMBELL**. *The Lancet*, 1965, 1087-1093 [0002]
- **WOCHNER** *et al. J. Exp. Med.*, 1967, vol. 126, 207 [0002]
- 50 • **SPIEGELBERG; WIEGLE**. *J. Exp. Med.*, 1965, vol. 121, 323-338 [0002]
- Catabolism of Immunoglobulins. **WALDMANN; GHETIE**. *Progress in Immunol. Academic Press*, 1971, vol. 1, 1187-1191 [0002]
- 55 • **SPIEGELBERG**. *Advances in Immunology. Academic Press*, 1974, vol. 19, 259-294 [0002]
- **ZUCKIER** *et al. Semin. Nucl. Med.*, 1989, vol. 19, 166-186 [0002]
- 60 • **ELLERSON** *et al. J. Immunol.*, 1976, vol. 116, 510 [0002]
- **YASMEEN** *et al. J. Immunol.*, 1976, vol. 116, 518 [0002]
- **POLLOCK** *et al. Eur. J. Immunol.*, 990, vol. 20, 2021-2027 [0002]
- 65 • **WAWRZYNCZAK** *et al. Molec. Immunol.*, 1992, vol. 29, 221 [0003]

ES 2 317 645 T3

- NOSE; WIGZELL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, vol. 80, 6632 [0003]
- TAO; MORRISON. *J. Immunol.*, 1989, vol. 143, 2595 [0003]
- 5 • WAWRZYNCZAK *et al. Mol. Immunol.*, 1992, vol. 29, 213 [0003]
- DIMA *et al. Eur. J. Immunol.*, 1983, vol. 13, 605 [0004]
- KIM *et al. Eur. J. Immunol.*, 1994, vol. 24, 542-548 [0004]
- 10 • ZUCKIER *et al. Cancer*, 1994, vol. 73, 794-799 [0004]
- MASSON. *J. Autoimmunity*, 1993, vol. 6, 683-689 [0004]
- 15 • DEISENHOFER. *Biochemistry*, 1981, vol. 20, 2364 [0006]
- KNAUF *et al. Relationship of Effective Molecular Size to Systemic Clearance in Rats of Recombinant Interleukin-2 Chemically Modified with Water-soluble Polymers. L Biochem*, 1988, vol. 263, 15064-15070
- 20 • MULLIS *et al. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1987, vol. 51, 263 [0025]
- PCR Technology. Stockton Press, 1989 [0025]
- CLOTHIA *et al. J. Mol. Biol.*, 1985, vol. 186, 651-663 [0027]
- 25 • NOVOTNY; HABER. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 4592-4596 [0027]
- PLUCKTHUN, A. The Pharmacology of Monoclonal Antibodies. Springer-Verlag, 1994, vol. 113, 269-315
- 30 • KOHLER; MILSTEIN. *Nature*, 1975, vol. 256, 495 [0036] [0187]
- CLACKSON *et al. Nature*, 1991, vol. 352, 624-628 [0036]
- MARKS *et al. J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581-597 [0036] [0196]
- 35 • MORRISON *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 6851-6855 [0037]
- JONES *et al. Nature*, 1986, vol. 321, 522-525 [0038] [0202]
- 40 • REICHMANN *et al. Nature*, 1988, vol. 332, 323-329 [0038]
- PRESTA. *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1992, vol. 2, 593-596 [0038]
- HOLLIGER *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 6444-6448 [0040]
- 45 • HILDRETH *et al. Eur. J. Immunol.*, 1983, vol. 13, 202-208 [0046]
- Human T cell Clones. A new Approach to Immune Regulation. Humana, 1986, 173 [0046]
- 50 • NISHIMURA *et al. Cell. Immunol.*, 1987, vol. 107, 32 [0046]
- NISHIMURA *et al. Cell. Immunol.*, 1985, vol. 94, 122 [0046]
- SPRINGER *et al. Immunol. Rev.*, 1982, vol. 68, 171 [0046]
- 55 • VERMOT DESROCHES *et al. Scand. J. Immunol.*, 1991, vol. 33, 277-286 [0046]
- SANCHES-MADRID *et al. J. Exp. Med.*, 1983, vol. 158, 586 [0047]
- 60 • FEKETE *et al. J. Clin. Lab Immunol.*, 1990, vol. 31, 145-149 [0047]
- TAYLOR *et al. Clin. Exp. Immunol.*, 1988, vol. 71, 324-328 [0047]
- CAMPANA *et al. Eur. J. Immunol.*, 1986, vol. 16, 537-542 [0047]
- 65 • HUTCHINGS *et al. Nature*, 1990, vol. 348, 639 [0048]
- KUNKEL. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1985, vol. 82, 488-492 [0056] [0227]

ES 2 317 645 T3

- **WELLS.** *Science*, 1989, vol. 244, 1081-1085 [0069]
- **ADELMAN et al.** *DNA*, 1983, vol. 2, 183 [0079]
- 5 • **CREA et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978, vol. 75, 5765 [0080]
- **VIERA et al.** *Meth. Enzymol.*, 1987, vol. 153, 3 [0081]
- **WELLS et al.** *Gene*, 1985, vol. 34, 315 [0093]
- 10 • **SOUTHERN et al.** *J. Molec. Appl. Genet.*, 1982, vol. 1, 327 [0101]
- **MULLIGAN et al.** *Science*, 1980, vol. 209, 1422 [0101]
- 15 • **SUGDEN et al.** *Mol. Cell. Biol.*, 1985, vol. 5, 410-413 [0101]
- **URLAUB; CHASIN.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4216 [0103] [0124]
- **STINCHCOMB et al.** *Nature*, 1979, vol. 282, 39 [0105]
- 20 • **KINGSMAN et al.** *Gene*, 1979, vol. 7, 141 [0105]
- **TSCHEMPER et al.** *Gene*, 1980, vol. 10, 157 [0105]
- 25 • **JONES.** *Genetics*, 1977, vol. 85, 12 [0105]
- **BIANCHI et al.** *Curr. Genet.*, 1987, vol. 12, 185 [0106]
- **VAN DEN BERG.** *Bio/Technology*, 1990, vol. 8, 135 [0106]
- 30 • **FLEER et al.** *Bio/Technology*, 1991, vol. 9, 968-975 [0106]
- **CHANG et al.** *Nature*, 1978, vol. 275, 615 [0108]
- 35 • **GOEDEL et al.** *Nature*, 1979, vol. 281, 544 [0108]
- **GOEDEL.** *Nucleic Acids Res*, 1980, vol. 8, 4057 [0108]
- **DEBOER et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, vol. 80, 21-25 [0108]
- 40 • **SIEBENLIST et al.** *Cell*, 1980, vol. 20, 269 [0108]
- **HITZEMAN et al.** *J. Biol. Chem.*, 1980, vol. 225, 2073 [0110]
- 45 • **HESS et al.** *J. Adv. Enzyme Reg.*, 1968, vol. 7, 149 [0110]
- **HOLLAND.** *Biochemistry*, 1978, vol. 17, 4900 [0110]
- **FIERS et al.** *Nature*, 1978, vol. 273, 113 [0113]
- 50 • **MULLIGAN; BERG.** *Science*, 1980, vol. 209, 1422-1427 [0113]
- **PAVLAKIS et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, vol. 78, 7398-7402 [0113]
- 55 • **GREENAWAY et al.** *Gene*, 1982, vol. 18, 355-360 [0113]
- **GRAY et al.** *Nature*, 1982, vol. 295, 503-508 [0113]
- **REYES et al.** *Nature*, 1982, vol. 297, 598-601 [0113]
- 60 • **CANAANI; BERG.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, vol. 79, 5166-5170 [0113]
- **GORMAN et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, vol. 79, 6777-6781 [0113]
- 65 • **LAIMINS et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, vol. 78, 993 [0114]
- **LUSKY et al.** *Mol. Cell Bio.*, 1983, vol. 3, 1108 [0114]

ES 2 317 645 T3

- **BANERJI** *et al. Cell*, 1983, vol. 33, 729 [0114]
- **OSBORNE** *et al. Mol. Cell Bio.*, 1984, vol. 4, 1293 [0114]
- 5 • **YANIV**. *Nature*, 1982, vol. 297, 17-18 [0114]
- **MESSING** *et al. Nucleic Acids Res.*, 1981, vol. 9, 309 [0117]
- **MAXAM** *et al. Methods in Enzymology*, 1980, vol. 65, 499 [0117]
- 10 • **GETHING** *et al. Nature*, 1981, vol. 293, 620-625 [0119]
- **MANTEI** *et al. Nature*, 1979, vol. 281, 40-46 [0119]
- 15 • **HOLMES** *et al. Science*, 1991, vol. 253, 1278-1280 [0119]
- **BEACH; NURSE**. *Nature*, 1981, vol. 290, 140 [0121]
- **SREEKRISHNA** *et al. J. Basic Microbiol.*, 1988, vol. 28, 265-278 [0121]
- 20 • **CASE** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, vol. 76, 5259-5263 [0121]
- **BALLANCE** *et al. Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1983, vol. 112, 284-289 [0121]
- 25 • **TILBUM** *et al. Gene*, 1983, vol. 26, 205-221 [0121]
- **YELTON** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 1470-1474 [0121]
- **KELLY; HYNES**. *EMBO J.*, 1985, vol. 4, 475-479 [0121]
- 30 • **LUCKOW** *et al. Bio/Technology*, 1988, vol. 6, 47-55 [0122]
- **MILLER** *et al. Genetic Engineering*. Plenum Publishing, 1986, vol. 8, 277-279 [0122]
- 35 • **MAEDA** *et al. Nature*, 1985, vol. 315, 592-594 [0122]
- **DEPICKER** *et al. J. Mol. Appl. Gen.*, 1982, vol. 1, 561 [0123]
- Tissue Culture. *Academic Press*, 1973 [0124]
- 40 • **GRAHAM** *et al. J. Gen Virol.*, 1977, vol. 36, 59 [0124]
- **MATHER**. *Biol. Reprod.*, 1980, vol. 23, 243-251 [0124]
- 45 • **MATHER** *et al. Annals N.Y. Acad. Sci.*, 1982, vol. 383, 44-68 [0124]
- **SHAW** *et al. Gene*, 1983, vol. 23, 315 [0126]
- **GRAHAM; VAN DER EB**. *Virology*, 1978, vol. 52, 456-457 [0127]
- 50 • **VAN SOLINGEN** *et al. J. Bact.*, 1977, vol. 130, 946 [0127]
- **HSIAO** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1979, vol. 76, 3829 [0127]
- 55 • **KEOWN** *et al. Methods in Enzymology*, 1990, vol. 185, 527-537 [0127]
- **MANSOUR** *et al. Nature*, 1988, vol. 336, 348-352 [0127]
- **HAM; WALLACE**. *Methods in Enzymology*, 1979, vol. 58, 44 [0129]
- 60 • **BARNES; SATO**. *Anal. Biochem.*, 1980, vol. 102, 255 [0129]
- Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach. *IRL Press*, 1991 [0130]
- 65 • **THOMAS**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 5201-5205 [0132]
- **HSU** *et al. Am. J. Clin. Path.*, 1980, vol. 75, 734-738 [0133]

ES 2 317 645 T3

- **URDAL** *et al.* *J. Chromatog.*, 1984, vol. 296, 171 [0140]
- **T.E. CREIGHTON**. *Proteins: Structure and Molecular Properties*. W.H. Freeman & Co, 1983, 79-86 [0150]
- 5 • **APLIN; WRISTON**. *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 1981, 259-306 [0154]
- **HAKIMUDDIN** *et al.* *Arch. Biochem. Biophys.*, 1987, vol. 259, 52 [0155]
- **EDGE** *et al.* *Anal. Biochem.*, 1981, vol. 118, 131 [0155]
- 10 • **THOTAKURA** *et al.* *Meth. Enzymol.*, 1987, vol. 138, 350 [0155]
- **DUSKIN** *et al.* *J. Biol. Chem.*, 1982, vol. 257, 3105 [0156]
- 15 • *Remington's Pharmaceutical Sciences*. 1980 [0160]
- **OFFNER** *et al.* *Science*, 1991, vol. 251, 430-432 [0171]
- **THOMSEN** *et al.* *Acta Radiol.*, 1988, vol. 29, 138-140 [0176]
- 20 • **TOLEDO-PEREYRA; MACKENZIE**. *Am. Surg.*, 1980, vol. 46, 161-164 [0176]
- **PARENT** *et al.* *Cryobiology*, 1981, vol. 18, 571-576 [0180]
- 25 • **FAULKNER** *et al.* *Nature*, 1982, vol. 298, 286 [0183]
- **MORRISON**. *J. Immun.*, 1979, vol. 123, 793 [0183]
- **KOEHLER** *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 2197 [0183]
- 30 • **RASO** *et al.* *Cancer Res.*, 1981, vol. 41, 2073 [0183]
- **MORRISON** *et al.* *Ann. Rev. Immunol.*, 1984, vol. 2, 239 [0183]
- 35 • **MORRISON**. *Science*, 1985, vol. 229, 1202 [0183]
- **MORRISON** *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 6851 [0183]
- 40 • **GODING**. *Monoclonal Antibodies: Principle and Practice*. *Academic Press*, 1986, 59-103 [0188]
- **KOZBOR**. *J. Immunol.*, 1984, vol. 133, 3001 [0190]
- 45 • **BRODEUR** *et al.* *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*. *Marcel Dekker, Inc*, 1987, 51-63 [0190]
- **MUNSON; POLLARD**. *Anal. Biochem.*, 1980, vol. 107, 220 [0192]
- **SKERRA** *et al.* *Curr. Opinion in Immunol.*, 1993, vol. 5, 256-262 [0195]
- 50 • **PLÜCKTHUN**. *Immunol. Revs.*, 1992, vol. 130, 151-188 [0195]
- **MCCAFFERTY** *et al.* *Nature*, 1990, vol. 348, 552-554 [0196]
- 55 • **CLACKSON** *et al.* *Nature*, 1991, vol. 325, 624-628 [0196]
- **MARK** *et al.* *Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 779-783 [0196]
- **WATERHOUSE** *et al.* *Nuc. Acids. Res.*, 1993, vol. 21, 2265-2266 [0196]
- 60 • **MORRISON** *et al.* *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1984, vol. 81, 6851 [0197]
- **HUNTER** *et al.* *Nature*, 1962, vol. 144, 945 [0201]
- 65 • **DAVID** *et al.* *Biochemistry*, 1974, vol. 13, 1014 [0201]
- **PAIN** *et al.* *J. Immunol.*, 1981, vol. 40, 219 [0201]

ES 2 317 645 T3

- **NYGREN.** *J. Histochem. and Cytochem.*, 1982, vol. 30, 407 [0201]
- **RIECHMANN et al.** *Nature*, 1988, vol. 332, 323-327 [0202]
- 5 • **VERHOEYEN et al.** *Science*, 1988, vol. 239, 1534-1536 [0202]
- **SIMS et al.** *J. Immunol.*, 1993, vol. 151, 2296 [0203]
- **HOTHIA; LESK.** *J. Mol. Biol.*, 1987, vol. 196, 901 [0203]
- 10 • **CARTER et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 4285 [0203]
- **PRESTA et al.** *J. Immunol.*, 1993, vol. 151, 2623 [0203]
- 15 • **JAKOBOVITS et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 2551-255 [0205]
- **JAKOBOVITS et al.** *Nature*, 1993, vol. 362, 255-258 [0205]
- **BRUGGERMANN et al.** *Year in Immuno.*, 1993, vol. 7, 33 [0205]
- 20 • **HOOGENBOOM; WINTER.** *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 227, 381 [0205]
- **MARKS et al.** *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581 [0205]
- 25 • **MILLSTEIN; CUELLO.** *Nature*, 1983, vol. 305, 537-539 [0207]
- **TRAUNECKER et al.** *EMBO J.*, 1991, vol. 10, 3655-3659 [0207]
- **SURESH et al.** *Methods in Enzymology*, 1986, vol. 121, 210 [0209]
- 30 • **BRENNAN et al.** *Science*, 1985, vol. 229, 81 [0211]
- **SHALABY et al.** *J. Exp. Med.*, 1992, vol. 175, 217-225 [0212]
- 35 • **RODRIGUES et al.** *Int. J. Cancers*, 1992, vol. 7, 45.50 [0212]
- **KOSTELNY et al.** *J. Immunol.*, 1992, vol. 148 (5), 1547-1553 [0213]
- **HOLLINGER et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1993, vol. 90, 6444-6448 [0213]
- 40 • **GRUBER et al.** *J. Immunol.*, 1994, vol. 152, 5368 [0213]
- **CUNNINGHAM et al.** *Science*, 1989, vol. 243, 1330-1336 [0227]
- 45 • **EIGENBROT et al.** *Protein*, 1994, vol. 18, 49-62 [0227]
- **KABAT et al.** *NIH Publ. No.91-3242*, 1991, vol. I, 647-669 [0228]
- **MORRISSEY.** *Anal. Biochem.*, 1981, vol. 117, 307-310 [0239]
- 50 • **BERMAN et al.** *J. Cell. Biochem.*, 1993, vol. 52, 183-195 [0259]
- **D'ARGENIO; SCHUMITZKY.** ADAPT II User's Guide. *Biomedical Simulations Resource*, 1990 [0260]

REIVINDICACIONES

1. Variante polipeptídica de un polipéptido de interés, el cual se elimina por el riñón y no contiene una región Fc de una IgG, en donde la variante polipeptídica contiene un dominio Ig o un dominio de tipo Ig distinto a un dominio CH₂, y en donde dicha variante comprende un epitopo de unión de tipo silvestre de una región Fc de una IgG que es responsable del aumento de la vida media en el suero *in vivo* de la IgG, y en donde el epitopo se obtiene del dominio CH₂ de la región Fc y está presente en:
 - (a) la región CH₁, o
 - (b) la región CH₃, o
 - (c) la región V_H, o
 - (d) una combinación de dos o de la totalidad de las partes (a), (b) y (c), o
 - (e) la región C_L, o
 - (f) la región V_L, o
 - (g) ambas (e) y (f) anteriores
 del dominio de Ig o del dominio de tipo Ig, y cuya variante que tiene una vida media más prolongada *in vivo* que la del polipéptido de interés.
2. Variante según la reivindicación 1, en la cual el dominio de Ig o dominio de tipo Ig comprende un dominio CH₁.
3. Variante según la reivindicación 1, en la cual el epitopo se obtiene del dominio CH₂ de la región Fc y se transfiere al dominio Ig o de tipo Ig.
4. Variante según la reivindicación 3, en donde el epitopo se obtiene del dominio CH₂ de la región Fc y luego se transfiere a CH₁, CH₃ o V_H, o a más de una de dichas regiones, de un dominio Ig o de tipo Ig.
5. Variante según la reivindicación 3, en donde el epitopo se obtiene del dominio CH₂ de la región Fc y se transfiere a la región C_L o V_L, o a ambas de un dominio Ig o de tipo Ig.
6. Variante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el polipéptido de interés es un Fab, un (Fab)₂, un diacuerpo, un fragmento Fv, un fragmento Fv de una sola cadena, o un receptor.
7. Variante según la reivindicación 6, en donde el polipéptido de interés es un antagonista de LFA-1.
8. Variante según la reivindicación 7 en donde el polipéptido de interés es un Fab o (Fab)₂ de un anticuerpo anti-LFA-1.
9. Variante según la reivindicación 8 en donde el polipéptido de interés es un anti-CD18 Fab o anti-CD18 (Fab)₂.
10. Variante según la reivindicación 9, el cual es humano o humanizado.
11. Variante según la reivindicación 9 o la 10, en donde el epitopo comprende una secuencia aminoacídica MIS (MIS) con un residuo de treonina (T) después de un aminoácido C-terminal a la secuencia MIS.
12. Variante según la reivindicación 11, en donde el epitopo se localiza entre los residuos aminoacídicos análogos a los aminoácidos 127 y 139 de un dominio CH₁ tal como se muestra en la Figura 2.
13. Variante según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en donde el epitopo comprende una secuencia aminoacídica histidina, glutamina, asparraguina (HQN) con un residuo aspártico (D) después de dos aminoácidos C terminales a la secuencia HQN y de un residuo lisina (K) después de un aminoácido C terminal al residuo D.
14. Variante según la reivindicación 13, en donde el epitopo se localiza entre los residuos de aminoácidos análogos a las posiciones 195 y 203 de un dominio CH₁ tal como se muestra en la Figura 2.
15. Variante según la cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el epitopo comprende la secuencia PKNSSMISNTP (N° ID SEC:3).
16. Variante según la reivindicación 15 que además comprende la secuencia HQSLGTQ (N° ID SEC:11).
17. Variante según la reivindicación 15 que además comprende la secuencia HQNLSGDK (N° ID SEC:1).

ES 2 317 645 T3

18. Variante según la reivindicación 15 que además comprende la secuencia HQNISDGK (N° ID SEC:2).

19. Variante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en donde el epitopo comprende las secuencias: HQNLSDGK (N° ID SEC:1), HQNISDGK (N° ID SEC:2) o HQSLGTQ (N° ID SEC:11) y PKNSSMISNTP (N° ID SEC:3).

20. Variante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en donde el epitopo se fusiona con el polipéptido de interés.

21. Variante según la reivindicación 20, en donde el polipéptido de interés es la hormona de crecimiento o el factor de crecimiento neuronal.

22. Ácido nucleico que codifica la variante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21.

23. Vector replicable que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 22.

24. Célula huésped que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 22 o el vector replicable de la reivindicación 23.

25. Procedimiento para la producción de una variante polipeptídica que comprende el cultivo de células huésped de la reivindicación 24 en un medio de cultivo y la recuperación de la variante a partir del cultivo de células huésped.

26. Procedimiento según la reivindicación 25 en donde la variante se recupera a partir de cualquier medio de cultivo.

27. Procedimiento para la preparación de una variante polipeptídica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, que comprende la modificación de un polipéptido de interés que se aclara por el riñón y que no contiene una región Fc de una IgG que es responsable para el aumento de la vida media *in vivo* en el suero de la IgG, en donde el epitopo de unión al receptor de tipo silvestre se obtiene del dominio CH₂ de una región Fc y está contenido en

(a) la región CH₁, o

(b) la región CH₃, o

(c) la región V_H, o

(d) una asociación de dos o de la totalidad de las partes (a), (b) y (c), o

(e) la región C_L, o

(f) la región V_L, o

(g) ambas (e) y (f) anteriores

del dominio de Ig o del dominio de tipo Ig y cuya variante tiene una vida media *in vivo* más prolongada que el polipéptido de interés.

28. Procedimiento según la reivindicación 27 en donde la etapa de modificación se realiza mediante mutagénesis dirigida, por casete o por PCR o mediante síntesis *in vitro* de la variante polipeptídica deseada.

29. Procedimiento según la reivindicación 27 o 28, que comprende:

(a) identificación de la secuencia y de la conformación de un epitopo de unión al receptor de una región Fc de una IgG que es responsable del aumento en la vida media del suero de la IgG, en donde el epitopo se obtiene del dominio CH₂ de una región Fc;

(b) modificación de la secuencia de un polipéptido de interés que se elimina clara por el riñón y que no contiene una región Fc de una IgG, para incluir la secuencia y la conformación del epitopo de unión identificado;

(c) análisis del polipéptido modificado de la etapa (b) para una vida media más prolongada que la del polipéptido de interés; y

(d) si el polipéptido modificado no tiene una vida media más prolongada, se realizan modificaciones adicionales de la secuencia del polipéptido de interés para incluir la secuencia y la conformación del epitopo de unión identificado y se realizan análisis adicionales hasta obtener una vida media *in vivo* más prolongada.

ES 2 317 645 T3

30. Variante de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 14, para utilizar en un procedimiento de tratamiento de la psoriasis, el rechazo del trasplante, el asma, la reparación de la herida, la fibrosis pulmonar, el choque hemorrágico, la encefalitis, la esclerosis múltiple, la toxicidad al oxígeno pulmonar, o el linfoma de células B.

- 5 31. Utilización de la variante de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 14 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la psoriasis, el rechazo del trasplante, el asma, la reparación de la herida, la fibrosis pulmonar, el choque hemorrágico, la encefalitis, la esclerosis múltiple, la toxicidad al oxígeno pulmonar, o el linfoma de células B.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

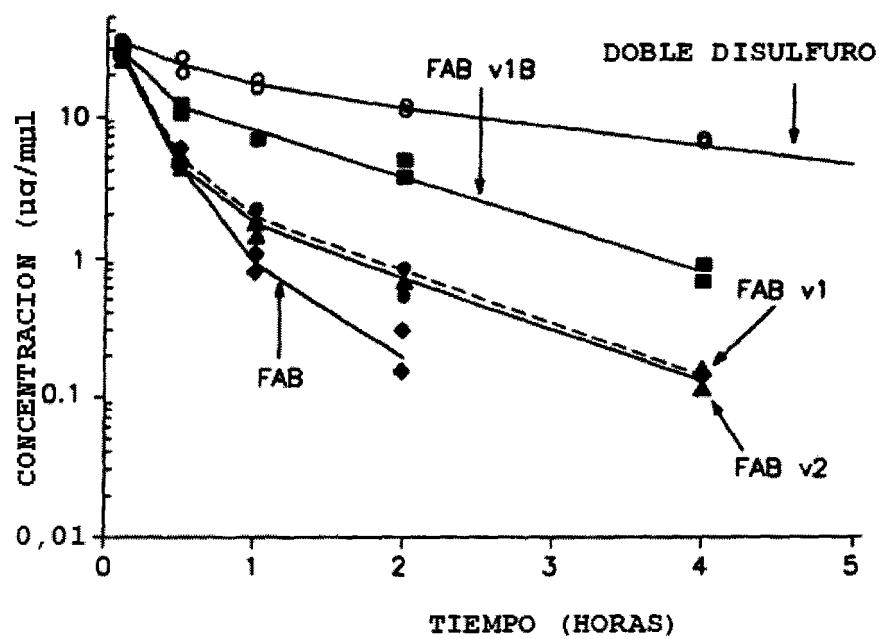


FIG. 1a

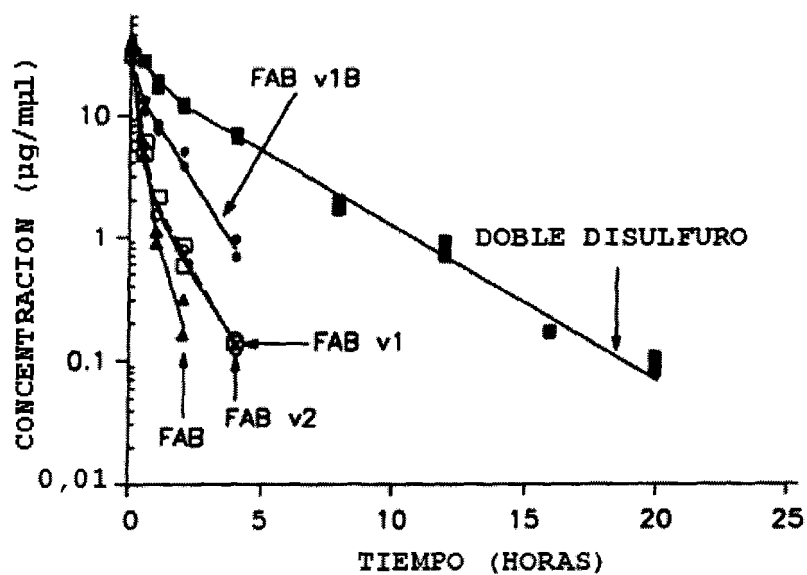


FIG. 1b

hIgG1	Secuencia del dominio CH1 de IgG1 humana		
hIgG2	Secuencia del dominio CH1 de IgG2 humana		
hIgG3	Secuencia del dominio CH1 de IgG3 humana		
hIgG4	Secuencia del dominio CH1 de IgG4 humana		
humK	Secuencia del dominio CL de Kappa humana		
humL	Secuencia del dominio CL de Kappa humana		

	114	128	139
	↓	↓	↓
hIgG1	A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L		
hIgG2	A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E S T A A L		
hIgG3	A S T K G P S V F P L A P C S R S T S G G T A A L		
hIgG4	A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E S T A A L		
	108	122	131
	↓	↓	↓
humK	R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V		
humL	Q P K A A P S V T L F P P S S E E L Q A N K A T L		

FabCABv1b	A S T K G P S V F P L A P S P K N S S M I S N T P A L		
de interés		P K N S S M I S N T P	
más importante		-----	*** *
hIgG1	G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S		
hIgG2	G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S		
hIgG3	G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S		
hIgG4	G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S		
humK	V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q		
humL	V C L I S D F Y P G A V T V A W K A D S S P V		

FabCABv1b	G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S		
hIgG1	G V H T F P A V L Q S S G - - - L Y S L S S V		
hIgG2	G V H T F P A V L Q S S G - - - L Y S L S S V		

FIG. 2a

```

                                                    V
hIgG4      G V H T F P A V L Q S S G - - - L Y S L S S V
humK       S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T
humL       K A G V E T T T P S K Q S N N - K Y A A S S Y
-----
FabCABv1b G V H T F P A V L Q S S G - - - L Y S L S S V

                193                200 203
                ↓                ↓   ↓
hIgG1      V T V P S S S L G T - Q T Y I C N V N H K P S
hIgG2      V T V P S S N F G T - Q T Y T C N V D H K P S
hIgG3      V T V P S S S L G T - Q T Y T C N V N H K P S
hIgG4      V T V P S S S L G T - K T Y T C N V D H K P S
                181                190
                ↓                ↓
humK       L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L
humL       L S L T P E Q W K S H R S Y S C Q V T H E G S
-----
FabCABv1b V T V P H Q S L G T - Q T Y I C N V N H K P S
de interés      H Q N L S D G K

más importante  * * *      *   *

```

```

hIgG1      N T K V D K R V - - -
hIgG2      N T K V D K T V - - -
hIgG3      N T K V D K R V - - -
hIgG4      N T K V D K R V - - -

humK       S S P V T K S F N R G E C
humL       T V E K T V A P T E C S
-----
FabCABv1b N T K V D K R V - - -

```

FIG. 2b

ES 2 317 645 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE: Genentech Inc.
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCION: Polipéptidos modificados con vida media aumentada
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 31
- 10 (iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:
- (A) DIRIGIDO A: Genentech, Inc.
- (B) CALLES: Point San Bruno Blvd, 460
- 15 (C) CIUDAD: South San Francisco
- (D) ESTADO: California
- (E) PAIS: Estados Unidos
- 20 (F) CODIGO POSTAL: 94080
- (v) FORMATO LEGIBLE POR ORDENADOR
- (A) TIPO DE MEDIO: 3,5 pulgadas, 1,44 Mb disco flexible
- (B) ORDENADOR: PC compatible IBM
- 25 (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: WinPatin (Genentech)
- (vi) DATOS DE SOLICITUD ACTUAL:
- 30 (A) NÚMERO DE SOLICITUD:
- (B) FECHA DE SOLICITUD:
- (C) CLASIFICACIÓN:
- 35 (viii) INFORMACIÓN DEL ABOGADO/AGENTE:
- (A) NOMBRE: Lee, Wendy M.
- (B) NÚMERO DE REGISTRO: 00.000
- 40 (C) NÚMERO DE CASO/REFERENCIA: P0932CT
- (ix) INFORMACIÓN TELECOMUNICACIONES:
- (A) TELÉFONO: 415/225-1994
- 45 (B) TELEFAX: 415/952-9881
- (C) TELEX: 910/371-7168

(2) INFORMACION PARA N° ID SEC:1:

- 50 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 8 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- 55 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: N° ID. SEC:1:

His Gln Asn Leu Ser Asp Gly Lys
1 5 8

(2) INFORMACION PARA N° ID SEC:2:

- 65 (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 8 aminoácidos

ES 2 317 645 T3

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: N° ID SEC:2:

His Gln Asn Ile Ser Asp Gly Lys
1 5 8

(2) INFORMACION PARA N° ID SEC:3:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 11 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: N° ID SEC:3:

Pro Lys Asn Ser Ser Met Ile Ser Asn Thr Pro
1 5 10 11

(2) INFORMACION PARA N° ID SEC: 4:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 98 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: N° ID SEC: 4:

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
1 5 10 15

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
20 25 30

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
35 40 45

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
50 55 60

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
65 70 75

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
80 85 90

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val
95 98

(2) INFORMACION PARA N° ID SEC:5:

ES 2 317 645 T3

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 98 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: N° ID SEC: 5:

10	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser
	1 5 10 15
15	Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
	20 25 30
20	Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
	35 40 45
25	Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
	50 55 60
30	Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn
	65 70 75
35	Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
	80 85 90
40	Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val
	95 98

(2) INFORMACION PARA N° ID SEC:6:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 98 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: N° ID SEC: 6:

45	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser
	1 5 10 15
50	Arg Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
	20 25 30
55	Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
	35 40 45
60	Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
	50 55 60
65	Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
	65 70 75
70	Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
	80 85 90
75	Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val
	95 98

ES 2 317 645 T3

(2) INFORMACION PARA N° ID SEC:7:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 98 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: N° ID SEC: 7:

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	1	5	10	15
Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	20	25	30	
Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	35	40	45	
Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	50	55	60	
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	65	70	75	
Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	80	85	90	
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val								95	98		

(2) INFORMACION PARA N° ID SEC:8:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 107 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: N° ID SEC: 8:

Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	1	5	10	15
Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	20	25	30	
Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	35	40	45	
Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	50	55	60	
Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	65	70	75	
Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	80	85	90	
His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	95	100	105	
Glu	Cys														107			

ES 2 317 645 T3

(2) INFORMACION PARA N° ID SEC:9:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 105 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: N° ID SEC:9:

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

(2) INFORMACION PARA N° ID SEC:10:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 100 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: N° ID SEC:10:

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

ES 2 317 645 T3

(2) INFORMACION PARA N° ID SEC:11:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 7 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: N° ID SEC:11:

His Gln Ser Leu Gly Thr Gln
1 5 7

(2) INFORMACION PARA N° ID SEC:12:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 29 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: N° ID SEC:12:

GTGACCGTGC CTCACCAGAG CTTGGGCAC 29

(2) INFORMACION PARA N° ID SEC:13:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 53 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: N° ID SEC:13:

TGGCACCCTC CCCTAAGAAC TCGAGCATGA TCAGCAACAC ACCGGCCCCTG 50
GGC 53

(2) INFORMACION PARA N° ID SEC:14:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 11 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: N° ID SEC:14:

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
1 5 10 11

(2) INFORMACION PARA N° ID SEC:15:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 13 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 317 645 T3

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: N° ID SEC:15

Ser Pro Lys Asn Ser Ser Met Ile Ser Asn Thr Pro Ala
5 1 5 10 13

(2) INFORMACION PARA N° ID SEC:16:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- 10 (A) LONGITUD: 34 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
15 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: N° ID SEC:16:

20 TGGCACCTC CAAATCGAGC ATCACAGCGG CCCT 34

(2) INFORMACION PARA LA N° ID SEC:17:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 9 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: N° ID SEC:17:

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
1 5 9

(2) INFORMACION PARA N° ID SEC:18:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- 40 (A) LONGITUD: 6 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácidos
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: N° ID SEC:18:

Ser Lys Ser Ser Ile Thr
1 5 6

(2) INFORMACION PARA LA N° ID SEC:19:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- 55 (A) LONGITUD: 44 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA: sencilla
60 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: N° ID SEC:19

TGGTGACCGT GATCTCGAGC CACTTGGGCC AGCAGACCTA CATC 44

(2) INFORMACION PARA LA N° ID SEC:20:

ES 2 317 645 T3

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: N° ID SEC:20:

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
1 5 9

(2) INFORMACION PARA LA N° ID SEC:21:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: N° ID SEC:21:

Val Ile Ser Ser His Leu Gly Gln Gln
1 5 9

(2) INFORMACION PARA LA N° ID SEC:22:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 45 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: N° ID SEC:22:

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Arg Met Lys
1 5 10 15

Gln Leu Glu Asp Lys Val Glu Glu Leu Leu Ser Lys Asn Tyr His
20 25 30

Leu Glu Asn Glu Val Ala Arg Leu Lys Lys Leu Val Gly Glu Arg
35 40 45

(2) INFORMACION PARA N° ID SEC:23:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 28 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: N° ID SEC:23:

TCGAGCATGA TCTCTAGAAC ACCGGCCC 28

(2) INFORMACION PARA N° ID SEC:24:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

ES 2 317 645 T3

- (A) LONGITUD: 36 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: N° ID SEC:24:

GCCTCACCAG AACCTAGGCA CCAAGACCTA CATCTG 36

(2) INFORMACION PARA N° ID SEC:25:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 40 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: N° ID SEC:25:

GCCTCACCAG AACTTAAGCG ACGGAAAGAC CTACATCTGC 40

(2) INFORMACION PARA LA N° ID SEC:26:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 7 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: N° ID SEC:26:

Gln Ser Leu Gly Thr Gln Thr
1 5 7

(2) INFORMACION PARA LA N° ID SEC:27:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 8 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: N° ID SEC:27:

Gln Asn Leu Ser Asp Gly Lys Thr
1 5 8

(2) INFORMACION PARA N° ID SEC:28:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 40 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: N° ID SEC:28:

ES 2 317 645 T3

CCCTCACCAG AATATTACAG ATGGCAAGAC CTACATCTGC 40

(2) INFORMACION PARA LA N° ID SEC:29:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 7 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: N° ID SEC:29:

Gln Ser Leu Gly Thr Gln Thr
1 5 7

(2) INFORMACION PARA LA N° ID SEC:30:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 8 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: N° ID SEC:30:

Gln Asn Ile Ser Asp Gly Lys Thr
1 5 8

(2) INFORMACION PARA LA N° ID SEC:31:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 8 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: N° ID SEC:31:

Val Ile Ser Ser His Leu Gly Gln
1 5 8