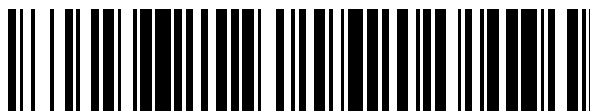


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 222**

51 Int. Cl.:
C07K 16/00 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06764991 .3**
- 96 Fecha de presentación: **17.07.2006**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1913026**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.04.2008**

54 Título: **FRAGMENTOS DE ANTICUERPO MODIFICADOS.**

30 Prioridad:
19.07.2005 GB 0514779

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.02.2012

73 Titular/es:
UCB PHARMA, S.A.
ALLÉE DE LA RECHERCHE 60
1070 BRUSSELS, BE

72 Inventor/es:
HUMPHREYS, David Paul

74 Agente: **Pérez Barquín, Eliana**

ES 2 374 222 T3

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

DESCRIPCIÓN

Fragmentos de anticuerpo modificados

- 5 La presente invención se refiere a fragmentos de anticuerpo y más específicamente proporciona fragmentos de anticuerpo a los que se unen una o más moléculas efectoras y métodos para su producción.

La alta especificidad y afinidad de regiones variables de anticuerpos hace que sean agentes terapéuticos y de diagnóstico ideales, particularmente para modular interacciones proteína:proteína. Los fragmentos de anticuerpo están demostrando ser agentes terapéuticos versátiles, tal como se observa mediante el reciente éxito de productos tales como ReoPro®. La función de direccionamiento codificada en Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ y otros fragmentos de anticuerpo puede usarse directamente o puede conjugarse con una o más moléculas efectoras tales como fármacos citotóxicos, toxinas o moléculas poliméricas para aumentar la eficacia. Por ejemplo, dado que estos fragmentos carecen de una región Fc tienen una semivida en circulación corta en animales pero esto puede mejorarse mediante conjugación con determinados tipos de polímero tales como polietilenglicol (PEG). Se ha mostrado que aumentar el tamaño del PEG conjugado aumenta la semivida en circulación desde minutos hasta muchas horas y se ha demostrado la modificación de un Fab' con PEG que oscila desde 5 kDa hasta 100 kDa (Chapman *et al.*, 1999, Nature Biotechnology, 17, 780-783; Leong *et al.*, 2001, Cytokine, 16, 106-119; Chapman, 2002, Advanced Drug Delivery Reviews, 54, 531-545). Actualmente fragmentos de anticuerpo pegilados tales como CDP870 están sometidos a ensayos clínicos en los que el efecto del PEG conjugado es llevar la semivida en circulación hasta niveles aceptables para la terapia.

Pueden unirse moléculas efectoras a fragmentos de anticuerpo mediante varios métodos diferentes, incluyendo mediante azúcares de aldehído o más comúnmente mediante cualquier grupo funcional de aminoácido terminal o de cadena lateral de aminoácido disponible ubicado en el fragmento de anticuerpo, por ejemplo cualquier grupo amino, imino, tiol, hidroxilo o carboxilo libre. El sitio de unión de moléculas efectoras puede ser o bien al azar o bien específico del sitio.

La unión al azar se logra con frecuencia mediante aminoácidos tales como lisina y esto da como resultado que se unen moléculas efectoras en varios sitios a lo largo de todo el fragmento de anticuerpo dependiendo de la posición de las lisinas. Aunque esto ha sido satisfactorio en algunos casos, no puede controlarse la ubicación exacta y el número de moléculas efectoras unidas y esto puede conducir a pérdida de actividad por ejemplo si se unen demasiado pocas y/o pérdida de afinidad si por ejemplo interfieren con el sitio de unión a antígeno (Chapman 2002 Advanced Drug Delivery Reviews, 54, 531-545). Como resultado, la unión específica del sitio controlada de moléculas efectoras es habitualmente el método de elección.

La unión específica del sitio de moléculas efectoras se logra lo más comúnmente mediante la unión a residuos de cisteína ya que tales residuos son relativamente poco frecuentes en fragmentos de anticuerpo. Las regiones bisagra de anticuerpo son regiones populares para la unión específica del sitio ya que contienen residuos de cisteína y están alejadas de otras regiones del anticuerpo que probablemente participan en la unión a antígeno. Las regiones bisagra adecuadas o bien se producen de manera natural en el fragmento o bien pueden crearse usando técnicas de ADN recombinante (véase por ejemplo el documento US 5.677.425; el documento WO98/25971; Leong *et al.*, 2001 Cytokine, 16, 106-119; Chapman *et al.*, 1999 Nature Biotechnology, 17, 780-783). Alternativamente, o además, también pueden diseñarse mediante ingeniería cisteínas específicas del sitio en el fragmento de anticuerpo por ejemplo para crear cisteína(s) expuesta(s) en la superficie para la unión de molécula efectora (documento US 5.219.996).

Recientemente se han descrito ejemplos de fragmentos de anticuerpo en los que se usan cisteínas nativas y modificadas por ingeniería para la unión específica del sitio de moléculas efectoras (véanse los documentos W02005003169, W02005003170 y W02005003171). En todos estos fragmentos está ausente el enlace disulfuro entre cadenas nativas entre las regiones constantes de la cadena pesada y ligera (C_{H1} y C_L) o bien porque las cisteínas entre cadenas se han usado como sitio de unión para moléculas efectoras o bien porque las cisteínas entre cadenas se han sustituido por otro aminoácido para evitar la unión de molécula efectora a esas cisteínas. Estos fragmentos también pueden comprender cisteínas, modificadas por ingeniería, para su uso como sitios de unión de molécula efectora. En un ejemplo estas cisteínas, modificadas por ingeniería, son un par de cisteínas, modificadas por ingeniería, que forman un enlace disulfuro entre las regiones constantes de la cadena pesada y ligera del material de partida de fragmento de anticuerpo; sin embargo dicho enlace disulfuro se pierde una vez que las moléculas efectoras se unen a esas cisteínas. El documento WO 03/080674 trata de una cisteína, modificada por ingeniería.

La presente invención proporciona conjugados alternativos de fragmento de anticuerpo-molécula efectora en los que las cadenas pesada y ligera de los fragmentos de anticuerpo están unidas mediante un enlace disulfuro entre cadenas, modificado por ingeniería, que no es el enlace disulfuro entre cadenas nativas. Este enlace disulfuro entre cadenas, modificado por ingeniería, se retiene durante la unión de molécula efectora incluso cuando se usan fuertes agentes reductores. La invención también proporciona sitios en la superficie de contacto cadena ligera:cadena pesada del anticuerpo en la que pueden diseñarse mediante ingeniería satisfactoriamente pares de cisteínas para

introducir un enlace disulfuro que está lo suficientemente incrustado como para ser ampliamente inaccesible para agentes reductores y moléculas efectoras.

5 Una ventaja particular de estos fragmentos se encuentra en que el enlace disulfuro entre las cisteínas entre cadenas modificadas por ingeniería permanecen intactas durante la unión de molécula efectora.

10 Por tanto, según la presente invención se proporciona un fragmento de anticuerpo al que se une una o más moléculas efectoras caracterizado porque está ausente el enlace disulfuro entre cadenas nativas entre las regiones constantes de la cadena pesada (C_{H1}) y ligera (C_L) y las regiones constantes de la cadena pesada (C_{H1}) y la cadena ligera (C_L) están unidas mediante un enlace disulfuro entre cadenas entre un par de cisteínas modificadas por ingeniería, una en la región constante de la cadena ligera (C_L) y la otra en la región constante de la cadena pesada (C_{H1}).

15 La expresión "enlace disulfuro entre cadenas nativas" tal como se usa en el presente documento se refiere al enlace disulfuro entre cadenas que existe entre la cisteína en las regiones constantes de la cadena pesada y ligera codificada en un gen de anticuerpo de línea germinal que se produce de manera natural. En particular las cisteínas entre cadenas nativas son una cisteína en la región constante de la cadena ligera (C_L) y una cisteína en la primera región constante de la cadena pesada (C_{H1}) que están unidas mediante enlace disulfuro entre sí en anticuerpos que se producen de manera natural. Pueden encontrarse normalmente ejemplos de tales cisteínas en la posición 214 de la cadena ligera y 233 de la cadena pesada de IgG1 humana, 127 de la cadena pesada de IgM, IgE, IgG2, IgG3, IgG4 humanas y 128 de la cadena pesada de IgD e IgA2B humanas, tal como se define por Kabat *et al.*, 1987, en Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, EE.UU. Se apreciará que las posiciones exactas de estas cisteínas pueden variar de la de los anticuerpos que se producen de manera natural si se ha realizado cualquier modificación, tal como delección, inserción y/o sustitución al fragmento de anticuerpo.

20 En los fragmentos de anticuerpo de la presente invención está ausente el enlace disulfuro entre cadenas nativas. El enlace disulfuro entre cadenas nativas puede estar ausente porque una o más moléculas efectoras se unen a las cisteínas entre cadenas, véanse por ejemplo los fragmentos descritos en los documentos W02005003170 y W02005003171. Por tanto, en una realización de la invención está ausente el enlace disulfuro entre cadenas nativas porque una molécula efectora está unida a la cisteína entre cadenas nativas de C_L y la cisteína entre cadenas nativas de C_{H1} en el fragmento de anticuerpo. En una realización la cisteína entre cadenas de C_L a la que se une una molécula efectora está en la posición 214 de la cadena ligera y la cisteína entre cadenas de C_{H1} a la que se une una molécula efectora está en la posición 233 de la cadena pesada.

25 En otra realización está ausente el enlace disulfuro entre cadenas nativas en los fragmentos de anticuerpo de la presente invención porque las cisteínas entre cadenas se han sustituido por otro aminoácido, tal como serina. Se han descrito fragmentos de anticuerpo en los que las cisteínas entre cadenas nativas se han sustituido por serina en el documento W02005003169.

30 En los fragmentos de anticuerpo de la presente invención las regiones constantes de la cadena pesada y ligera están unidas mediante un enlace disulfuro entre cadenas entre una cisteína, modificada por ingeniería, en la región constante de la cadena ligera (C_L) y una cisteína, modificada por ingeniería, en la región constante de la cadena pesada (C_{H1}). La expresión "cisteína modificada por ingeniería" tal como se usa en el presente documento se refiere a una cisteína que se ha introducido en la secuencia del fragmento de anticuerpo en una posición en la que no se produce una cisteína en la secuencia de anticuerpo de línea germinal natural. Normalmente la cisteína, modificada por ingeniería, sustituye a otro aminoácido normalmente encontrado en esa posición. Las cisteínas se diseñan normalmente mediante ingeniería como un par de cisteínas que consisten en una cisteína en la región constante de la cadena pesada (C_{H1}) y una cisteína en la región constante de la cadena ligera (C_L). El par de cisteínas permite formar un enlace disulfuro entre la cadena pesada y ligera del fragmento de anticuerpo.

35 Un experto en la técnica puede determinar empíricamente posiciones adecuadas para las cisteínas modificadas por ingeniería, modificando mediante ingeniería las cisteínas en las regiones constantes de la cadena pesada y ligera y someténdolas a prueba para determinar la presencia de un enlace disulfuro entre las cisteínas antes y después de la unión de molécula efectora usando los métodos descritos en el presente documento, tal como SDS-PAGE no reductor y de inmunotransferencia. El experto puede identificar posibles sitios que pueden ser adecuados para la introducción de residuos de cisteína usando información disponible en la técnica tal como estructuras cristalinas, por rayos X, de anticuerpos combinadas con programas informáticos que predicen sitios para la introducción de puentes disulfuro o la inspección visual de las estructuras (véase, por ejemplo, el documento US20030125232). Se han modificado mediante ingeniería los enlaces disulfuro en varias proteínas modelo tanto con el fin de tratar de estabilizar la proteína como también con el fin de estudiar los requisitos estructurales y vecinos de los aminoácidos de cisteína si van a formar un par disulfuro (revisado en Dani *et al.*, Prot. Eng. 2003 v16 p187-193). También se ha creado software informático que podría usarse para identificar potencialmente sitios útiles para la introducción de cisteínas novedosas que forman enlaces disulfuro (Dani *et al.*, 2003). El análisis de los conjuntos de datos de las proteínas de referencia por Dani *et al.* mostró que es deseable elegir posiciones que están en regiones relativamente móviles cerca de la superficie de la proteína. Esto garantiza que la estructura de la proteína puede relajarse sin

incurrir en una penalización energética significativa. Se han estabilizado variantes basadas en el plegamiento de Ig de anticuerpos mediante la introducción de enlaces disulfuro, de la manera más notable regiones Fv como 'dsFv' (Glockshuber *et al.*, 1990 *Biochemistry* 29:1362-1367), para la estabilización de 'minianticuerpos' de scFv dimerizados con cremallera de leucina (Pack y Pluckthun 1992 *Biochemistry* 31:1579-1584) y para la dimerización de dominios de scFv (McCartney *et al.*, 1994 *Protein Engineering* 8: 301-304). El dominio CH3 de la región Fc de IgG también tenía cisteínas introducidas en las 6 posiciones con el fin de ayudar en la heterodimerización de Fc deseada (Merchant *et al.*, 1998 *Nature Biotech.* 16:677-681).

Las propiedades físicas de los enlaces disulfuros nativos se han descrito en detalle (Petersen *et al.*, *Prot. Eng* 1999 v12 p535-548) y la distancia azufre-azufre tiene un valor óptimo de aproximadamente 2,02 Å y un intervalo preferido muy estrecho de entre 2,00 y 2,04 Å. La distancia C α -C α tiene un valor óptimo de aproximadamente 5,8 Å pero también mayor amplitud de su intervalo de aproximadamente 4,8 a 6,4 Å. También se sabe que los enlaces disulfuro no son rectos con respecto a los átomos C α y C β : el ángulo C β SS es de aproximadamente 105° mientras que el ángulo C α C β S es de aproximadamente 115°. En una realización, pueden seleccionarse residuos basándose en su distancia C α -C α que está preferiblemente en el intervalo de 2,0 a 10 Å, más preferiblemente en el intervalo de 4,8 a 6,4 Å, incluso más preferiblemente cerca del valor óptimo de aproximadamente 5,8 Å. En otra realización, también pueden considerarse pares fuera del intervalo de distancia teórica C α -C α puesto que se sabe tanto que las estructuras cristalinas representa una única conformación estática de múltiples proteínas de conformación como que todas las proteínas y proteínas diméricas y regiones polipeptídicas particulares de las mismas son flexibles y móviles y por tanto pueden adaptarse a distancias teóricas C α -C α mayores o menores. Además, también pueden someterse a prueba ubicaciones en la superficie de contacto cKappa:CH1 puesto que es menos probable que las ubicaciones con una ubicación muy central estén expuestas al disolvente.

Preferiblemente, la cisteína de cadena ligera, modificada por ingeniería, de cKappa o clambda se introduce en una cualquiera de las posiciones 116, 119 ó 210 de C_L de IgG1 humana. Preferiblemente la cisteína de cadena pesada se introduce en una cualquiera de las posiciones 138, 128 ó 129 de C_{H1} de IgG1 humana. En una realización el enlace disulfuro entre cadenas es entre una cisteína, modificada por ingeniería, en la posición 116 de C_L y una cisteína, modificada por ingeniería, en la posición 138 de C_{H1}. En otra realización, el enlace disulfuro entre cadenas es entre una cisteína, modificada por ingeniería, en la posición 119 de C_L y una cisteína, modificada por ingeniería, en la posición 128 de C_{H1}. En otra realización, el enlace disulfuro entre cadenas es entre una cisteína, modificada por ingeniería, en la posición 210 de C_L y una cisteína, modificada por ingeniería, en la posición 129 de C_{H1}.

La presente invención también proporciona productos intermedios útiles para la producción de los conjugados de anticuerpo-molécula efectora de la presente invención. Por consiguiente, la presente invención también proporciona un fragmento de anticuerpo en el que las regiones constantes de la cadena pesada (C_{H1}) y la cadena ligera (C_L) se unen mediante un enlace disulfuro entre cadenas entre un par de cisteínas, modificadas por ingeniería, caracterizado porque la posición del par de cisteínas se selecciona de la posición 119 de la cadena ligera y 138 de la cadena pesada, la posición 119 de la cadena ligera y 128 de la cadena pesada o la posición 210 de la cadena ligera y 129 de la cadena pesada.

Los expertos en la técnica entenderán que debido a los altos niveles de similitud estructural y de secuencia entre ambos isotipos humanos, cadena ligeras kappa y lambda y entre especies, especialmente hombre; ratón, rata, conejo, hámster, camélidos y tiburones que pueden determinarse posiciones de residuos y mutarse a cisteína en estas secuencias de anticuerpo.

Los fragmentos de anticuerpo de la presente invención pueden prepararse mediante el uso de técnicas de ADN recombinante que implican la manipulación y nueva expresión de ADN que codifica para regiones constantes y variables de anticuerpos. Pueden usarse técnicas convencionales de biología molecular para modificar, añadir o deletar aminoácidos o dominios adicionales, según se desee. Cualquier alteración a las regiones variables o constantes está englobada todavía por las expresiones regiones 'variable' y 'constante' tal como se usan en el presente documento. Preferiblemente, se usa PCR para introducir residuos de cisteína, modificados por ingeniería, en las regiones constantes de cadena pesada (C_{H1}) y ligera (C_L). Se conocen bien en la técnica métodos para diseñar cebadores de PCR adecuados y las secuencias de los dominios de anticuerpo C_{H1} y C_L están fácilmente disponibles (Kabat *et al.*, citado anteriormente). Alternativamente, pueden introducirse cisteínas usando técnicas de mutagénesis dirigida al sitio tales como las descritas en White (Ed.), *PCR Protocols: Current Methods and Applications* (1993).

El material de partida del fragmento de anticuerpo para su uso en la presente invención puede ser cualquier par de cadena pesada y cadena ligera que comprende una región variable (V_H/V_L) y una constante (C_H/C_L). Preferiblemente el fragmento de anticuerpo es un fragmento Fab o Fab' o un Fab truncado tal como se describe en el documento W02005003170.

Los fragmentos Fab' para su uso en la presente invención pueden tener una región bisagra nativa o una modificada. La región bisagra nativa es la región bisagra asociada normalmente con el dominio C_{H1} de la molécula de anticuerpo. Una región bisagra modificada es cualquier región bisagra que difiere en la longitud y/o composición con

respecto a la región bisagra nativa. Tales regiones bisagra pueden incluir regiones bisagra de cualquier especie adecuada, tales como regiones bisagra de ser humano, ratón, rata, conejo, cerdo, hámster, camello, llama o cabra. Otras regiones bisagra modificadas pueden comprender una región bisagra completa derivada de un anticuerpo de una clase o subclase diferente de la del dominio C_H1. Por tanto, por ejemplo, un dominio C_H1 de clase γ 1 puede unirse a una región bisagra de clase γ 4. Alternativamente, la región bisagra modificada puede comprender parte de una región bisagra natural o una unidad de repetición en la que cada unidad en la repetición se deriva de una región bisagra natural. En una alternativa adicional, la región bisagra natural puede alterarse convirtiendo uno o más residuos de cisteína u otros residuos en residuos neutros, tales como alanina, o convirtiendo residuos situados adecuadamente en residuos de cisteína. Mediante tales medios, puede aumentarse o disminuirse el número de residuos de cisteína en la región bisagra. Además, pueden controlarse otras características de la región bisagra, tales como la distancia de la(s) cisteína(s) de la región bisagra de la cisteína de cadena ligera entre cadenas, la distancia entre las cisteínas de la región bisagra y la composición de otros aminoácidos en la región bisagra que pueden afectar a las propiedades de la región bisagra tales como la flexibilidad, por ejemplo, pueden incorporarse glicinas en la región bisagra para aumentar la flexibilidad rotacional o pueden incorporarse prolina para reducir la flexibilidad. Alternativamente, pueden incorporarse combinaciones de residuos cargados o hidrófobos en la región bisagra para conferir propiedades de multimerización. Otras regiones bisagra modificadas pueden ser totalmente sintéticas y pueden diseñarse para tener propiedades deseadas tales como longitud, composición y flexibilidad. Ya se han descrito varias regiones bisagra modificadas por ejemplo, en los documentos US5.677.425, W09915549, WO9825971 y WO2005003171.

El material de partida del fragmento de anticuerpo de la presente invención puede derivarse de cualquier isotipo de anticuerpo incluyendo, por ejemplo, IgG, IgM, IgA, IgD y IgE y subclases de las mismas incluyendo por ejemplo IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4. Preferiblemente el fragmento de anticuerpo de la presente invención se deriva de IgG1. El material de partida del fragmento de anticuerpo puede obtenerse a partir de cualquier especie incluyendo por ejemplo ratón, rata, conejo, cerdo, hámster, camello, llama, cabra o ser humano. Pueden obtenerse partes del fragmento de anticuerpo a partir de más de una especie por ejemplo los fragmentos de anticuerpo pueden ser quiméricos. En un ejemplo las regiones constantes son a partir de una especie y las regiones variables son a partir de otra. En otro ejemplo, la región variable del fragmento de anticuerpo se ha creado usando técnicas de ingeniería de ADN recombinante. Tales versiones modificadas por ingeniería incluyen las creadas, por ejemplo, a partir de regiones variables de anticuerpos naturales mediante inserciones, deleciones o cambios en o a las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos naturales. Los ejemplos particulares de este tipo incluyen los dominios de región variable, modificados por ingeniería, que contienen al menos una CDR y opcionalmente uno o más aminoácidos de región de entramado de un anticuerpo y el resto del dominio de la región variable de un segundo anticuerpo.

Los fragmentos de anticuerpo recombinantes de la presente invención, una vez producidos en una célula huésped pueden extraerse y purificarse usando cualquier método adecuado conocido en la técnica. Los métodos de purificación adecuados incluyen, pero no se limitan a, cromatografía de exclusión molecular, de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad con proteína A, G o L e intercambio iónico.

Los métodos para crear y fabricar fragmentos de anticuerpo recombinantes se conocen bien en la técnica (véanse, por ejemplo, Boss *et al.*, documento US 4.816.397; Cabilly *et al.*, documento US 6.331.415; Shrader *et al.*, documento WO 92/02551; Orlandi *et al.*, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 3833; Riechmann *et al.*, 1988, Nature, 322, 323; Queen *et al.*, documento US 5.585.089; Adair, documento WO91/09967; Mountain y Adair, 1992, Biotechnol. Genet. Eng. Rev, 10, 1-142; Verma *et al.*, 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181).

El fragmento de anticuerpo de la presente invención podrá en general unirse selectivamente a un antígeno. El antígeno puede ser cualquier antígeno asociado a células, por ejemplo un antígeno de superficie celular en células tales como células bacterianas, células de levaduras, células T, células endoteliales o células tumorales, o puede ser un antígeno soluble. Los antígenos también puede ser cualquier antígeno relevante desde el punto de vista médico tal como los antígenos regulados por incremento durante enfermedad o infección, por ejemplo receptores y/o sus ligandos correspondientes. Los ejemplos particulares de antígenos de superficie celular incluyen moléculas de adhesión, por ejemplo integrinas tales como β 1-integrinas por ejemplo VLA-4, E-selectina, P-selectina o L-selectina, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD11a, CD11b, CD18, CD19, CD20, CD23, CD25, CD33, CD38, CD40, CD45, CDW52, CD69, antígeno carcinoembionario (CEA), globulina de grasa láctea humana (HMFG1 y 2), antígenos de CMH de clase I y CMH de clase II, y VEGF, y cuando sea apropiado, receptores de los mismos. Los antígenos solubles incluyen interleucinas tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, IL-16 o IL-17, antígenos virales por ejemplo antígenos del virus respiratorio sincitial o citomegalovirus, inmunoglobulinas, tales como IgE, interferones tales como interferón α , interferón β o interferón γ , factor de necrosis tumoral- α , factor de necrosis tumoral- β , factores estimulantes de colonias tales como G-CSF o GM-CSF, y factores de crecimiento derivados de plaquetas tales como PDGF- α , y PDGF- β y cuando sea apropiado receptores de los mismos.

La expresión molécula efectora tal como se usa en el presente documento incluye, por ejemplo, agentes antineoplásicos, fármacos, toxinas (tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano o vegetal y fragmentos de las mismas, por ejemplo, ricina y fragmentos de la misma) proteínas biológicamente activas, por ejemplo enzimas, otro anticuerpo o fragmentos de anticuerpo, polímeros que se producen de manera natural o

sintéticos, ácidos nucleicos y fragmentos de los mismos, por ejemplo, ADN, ARN y fragmentos de los mismos, radionúclidos, particularmente radioyoduro, radioisótopos, metales quelados, nanopartículas y grupos indicadores tales como compuestos fluorescentes o compuestos que pueden detectarse mediante RMN o espectroscopía ESR.

- 5 Los agentes antineoplásicos particulares incluyen agentes citotóxicos y citostáticos, por ejemplo, agentes alquilantes, tales como mostazas de nitrógeno (por ejemplo clorambucilo, melfalán, mecloretamina, ciclosfosfamida, o mostaza de uracilo) y derivadas de los mismas, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida, busulfano; o cisplatino; antimetabolitos, tales como metotrexato, fluorouracilo, floxuridina, citarabina, mercaptopurina, tioguanina, ácido fluoracético o ácido fluorocítrico, antibióticos, tales como bleomicinas (por ejemplo sulfato de bleomicina),
 10 doxorubicina, daunorubicina, mitomicinas (por ejemplo mitomicina C), actinomicinas (por ejemplo dactinomicina) plicamicina, caliqueamicina y derivados de la misma, o esperamicina y derivados de la misma; inhibidores mitóticos, tales como etopósido, vincristina o vinblastina y derivados de los mismos; alcaloides tales como elipticina; polioles tales como taxicina-I o taxicina-II; hormonas, tales como andrógenos (por ejemplo dromostanolona o testolactona),
 15 progestinas (por ejemplo acetato de megestrol o acetato de medroxiprogesterona), estrógenos (por ejemplo difosfato de dimetilstilbestrol, fosfato de poliestradiol o fosfato de estramustina) o antiestrógenos (por ejemplo tamoxifeno); antraquinonas, tales como mitoxantrona, ureas, tales como hidroxurea; hidrazinas, tales como procarbazona; o imidazoles, tales como dacarbazina.

20 Los metales quelados incluyen quelatos de metales di o tripositivos que tienen un número de coordinación de desde 2 hasta 8 incluidos. Los ejemplos particulares de tales metales incluyen tecnecio (Tc), renio (Re), cobalto (Co), cobre (Cu), oro (Au), plata (Ag), plomo (Pb), bismuto (Bi), indio (In), galio (Ga), itrio (Y), terbio (Tb), gadolinio (Gd) y escandio (Sc). En general el metal es preferiblemente un radionúclido. Los radionúclidos particulares incluyen ^{99m}Tc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{58}Co , ^{60}Co , ^{67}Cu , ^{195}Au , ^{199}Au , ^{110}Ag , ^{203}Pb , ^{206}Bi , ^{207}Bi , ^{111}In , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{88}Y , ^{90}Y , ^{160}Tb , ^{153}Gd , ^{177}Lu y ^{47}Sc .

25 El metal quelado puede ser por ejemplo uno de los tipos anteriores de metal quelado con cualquier agente quelante polidentado adecuado, por ejemplo poliaminas acíclicas o cíclicas, poliéteres, (por ejemplo éteres corona y derivados de los mismos); poliamidas; porfirinas; y derivados carbocíclicos.

30 En general, el tipo de agente quelante dependerá del metal en uso. Sin embargo, un grupo particularmente útil de agentes quelantes en conjugados según la invención son poliaminas acíclicas y cíclicas, especialmente ácidos poliaminocarboxílicos, por ejemplo ácido dietilentriaminapentacético y derivados de los mismos, y aminas macrocíclicas, por ejemplo derivados de tetra-aza y tri-aza cíclicos (por ejemplo tal como se describe en la memoria descriptiva de la patente internacional n.º WO 92/22583); y poliamidas, especialmente desferrioxamina y derivados
 35 de la misma.

Otras moléculas efectoras incluyen proteínas, péptidos y enzimas. Los enzimas de interés incluyen, pero no se limitan a, enzimas proteolíticas, hidrolasas, liasas, isomerasas, transferasas. Proteínas, polipéptidos y péptidos de interés incluyen, pero no se limitan a, inmunoglobulinas, albúmina, toxinas tales como abrina, ricina A, exotoxina de
 40 *Pseudomonas* o toxina diftérica, una proteína tal como insulina, factor de necrosis tumoral, interferón α , interferón β , factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de las plaquetas o activador de plasminógeno tisular, un agente trombótico o un agente antiangiogénico, por ejemplo angiostatina o endostatina, o un modificador de la respuesta biológica tal como una linfocina, interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6), factor estimulante de las colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de las colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento nervioso (NGF) u otros factores de crecimiento e inmunoglobulinas.
 45

Otras moléculas efectoras pueden incluir sustancias detectables útiles por ejemplo en diagnóstico. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, núclidos radiactivos, metales que emiten positrones (para su uso en tomografía de emisión de positrones) e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. Véase en general la patente estadounidense n.º 4.741.900 para iones metálicos que pueden conjugarse con anticuerpos para su uso como diagnóstico. Las enzimas adecuadas incluyen peroxidasa del rábano, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; los grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina, avidina y biotina; los materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo y ficoeritrina; los materiales luminiscentes adecuados incluyen luminol; los materiales bioluminiscentes adecuados incluyen luciferasa, luciferina y aequorina; y los núclidos radioactivos adecuados incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In y ^{99}Tc .
 50
 55

Los polímeros que se producen de manera natural o sintéticos para su uso como moléculas efectoras incluyen, por ejemplo, polímeros de polialquileno, polialquilenilo o polioxialquilenilo de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituidos o polisacáridos ramificados o no ramificados, por ejemplo a homo- o heteropolisacárido tal como lactosa, amilosa, dextrano o glucógeno.
 60

Los sustituyentes opcionales particulares que pueden estar presentes en los polímeros sintéticos anteriormente mencionados incluyen uno o más grupos hidroxilo, metilo o metoxilo. Ejemplos particulares de polímeros sintéticos incluyen poli(etilenglicol), poli(propilenglicol), poli(alcohol vinílico) de cadena lineal o ramificada opcionalmente
 65

sustituídos o derivados de los mismos, especialmente poli(etilenglicol) opcionalmente sustituido tal como metoxipoli(etilenglicol) o derivados del mismo.

“Derivados” tal como se usa en el presente documento pretende incluir derivados reactivos, por ejemplo grupos reactivos selectivos para tiol tales como un éster o ácido α -halocarboxílico, por ejemplo yodoacetamida, una imida, por ejemplo maleimida, una vinilsulfona o maleimidadas con enlaces disulfuro. El grupo reactivo puede unirse directamente o mediante un segmento conector con el polímero. Se apreciará que el residuo de un grupo de este tipo en algunos casos formará parte del producto como grupo de unión entre el fragmento de anticuerpo y el polímero.

El tamaño del polímero puede variarse según se desee, pero generalmente estará en un intervalo de peso molecular promedio de desde 500 Da hasta 100.000 Da, preferiblemente desde 5.000 hasta 40.000 Da y más preferiblemente desde 10.000 hasta 40.000 Da y de 20.000 a 40.000 Da. El tamaño del polímero puede seleccionarse en particular basándose en el uso pretendido del producto, por ejemplo la capacidad para ubicarse en determinados tejidos tales como tumores o prolongar la semivida en circulación (para una revisión véase Chapman, 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 531-545). Por tanto, por ejemplo, cuando el producto pretende dejar la circulación y penetrar en el tejido, por ejemplo para su uso en el tratamiento de un tumor, puede ser ventajoso usar un polímero de pequeño peso molecular, por ejemplo con un peso molecular de aproximadamente 5.000 Da. Para aplicaciones en las que el producto permanece en la circulación, puede ser ventajoso usar un polímero de peso molecular superior, por ejemplo que tiene un peso molecular en el intervalo de desde 20.000 Da hasta 40.000 Da.

Los polímeros particularmente preferidos incluyen un polímero de polialquileno, tal como un poli(etilenglicol) o, especialmente, un metoxipoli(etilenglicol) o un derivado del mismo, y especialmente con un peso molecular en el intervalo de desde aproximadamente 10.000 Da hasta aproximadamente 40.000 Da.

Los polímeros de la presente invención pueden obtenerse comercialmente (por ejemplo de Nippon Oil y Fats; Nektar Therapeutics) o pueden prepararse a partir de materiales de partida comercialmente disponibles usando procedimientos químicos convencionales.

Las moléculas efectoras pueden unirse usando procedimientos de ADN recombinante o químicos convencionales en los que el fragmento de anticuerpo se une o bien directamente o bien a través de un agente de acoplamiento a la molécula efectora. Técnicas para conjugar tales moléculas efectoras con anticuerpos se conocen bien en la técnica (véanse, Hellstrom *et al.*, *Controlled Drug Delivery*, 2ª Ed., Robinson *et al.*, eds., 1987, págs. 623-53; Thorpe *et al.*, 1982, *Immunol. Rev.*, 62:119-58 y Dubowchik *et al.*, 1999, *Pharmacology and Therapeutics*, 83, 67-123). Los procedimientos químicos particulares incluyen por ejemplo los descritos en la memoria descriptiva de las patentes internacionales números WO 93/06231, WO92/22583, WO90/09195, WO89/01476, W09915549 y W003031581. Alternativamente, cuando la molécula efectora es una proteína o polipéptido la unión puede lograrse usando procedimientos de ADN recombinante, por ejemplo tal como se describe en la memoria descriptiva de la patente europea n.º 392745.

Las moléculas efectoras pueden unirse al fragmento de anticuerpo de la presente invención mediante cualquier cadena lateral de aminoácido disponible o grupo funcional de aminoácido terminal ubicado en el fragmento de anticuerpo, por ejemplo cualquier grupo amino, imino, tiol, hidroxilo o carboxilo libre. Tales aminoácidos pueden producirse de manera natural en el fragmento de anticuerpo o pueden modificarse mediante ingeniería en el fragmento usando métodos de ADN recombinante. Véase por ejemplo el documento US 5.219.996. Preferiblemente, las moléculas efectoras se unen covalentemente mediante un grupo tiol de un residuo de cisteína ubicado en el fragmento de anticuerpo, o bien producido manera natural o bien modificado por ingeniería. Las cisteínas naturales adecuadas para la unión incluyen las cisteínas entre cadenas de C_H1 y C_L y cisteínas en la región bisagra tal como se describió en el presente documento anteriormente. El enlace covalente en general será un enlace disulfuro, un enlace tio-éter o, en particular, un enlace azufre-carbono. Cuando se usa un grupo tiol como punto de unión, pueden usarse moléculas efectoras apropiadamente activadas, por ejemplo derivados de tiol selectivos tales como tal como maleimida, piridilditio, vinilsulfona, yodoacetilo, bromoacetilo y derivados de cisteína.

Se apreciará que cuando existen dos o más moléculas efectoras unidas al fragmento de anticuerpo estas pueden ser idénticas o diferentes y pueden unirse al fragmento de anticuerpo en sitios diferentes. También se apreciará que dos o más moléculas efectoras pueden unirse al fragmento de anticuerpo en un único sitio mediante el uso por ejemplo de una estructura de conexión ramificada para unir dos o más moléculas efectoras y proporcionar un único sitio de unión.

En un aspecto preferido de la presente invención al menos una de las moléculas efectoras unida al fragmento de anticuerpo es una molécula de polímero, preferiblemente PEG o un derivado del mismo. Con respecto a la unión de restos de poli(etilenglicol) (PEG) en general, se hace referencia a “Poli(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications”, 1992, J.Milton Harris (ed), Plenum Press, Nueva York; “Poli(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications”, 1997, J. Milton Harris y S.Zalipsky (eds), American Chemical Society, Washington DC y “Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences”, 1998, M. Aslam y A. Dent, Grove Publishers, Nueva York.

Preferiblemente todas las moléculas efectoras unidas al fragmento de anticuerpo de la presente invención son PEG y cada molécula se une covalentemente a través de un grupo de maleimida a un o más grupos tioles en el fragmento de anticuerpo. El PEG puede ser cualquier molécula lineal o ramificada en un intervalo de peso molecular promedio de desde 500 Da hasta 100.000 Da, preferiblemente desde 5.000 hasta 40.000 Da y más preferiblemente desde 10.000 hasta 40.000 Da y 20.000 hasta 40.000 Da. Para unir moléculas de PEG ramificadas, preferiblemente se une un residuo de lisina covalentemente al grupo maleimida. Para cada uno de los grupos amina en el residuo de lisina preferiblemente se une al polímero de metoxipoli(etilenglicol). En un ejemplo, el peso molecular de cada polímero unido a la lisina es de aproximadamente 20.000 Da y el peso molecular total de toda la molécula de polímero es por tanto de aproximadamente 40.000 Da.

Las cisteínas adecuadas a las que las moléculas efectoras pueden unirse incluyen, cuando están presentes, cisteínas entre cadenas nativas, cisteínas en la región bisagra y otras cisteínas, modificadas por ingeniería, en otro lugar en el fragmento de anticuerpo, tal como la superficie.

Fragmentos particulares según este aspecto de la invención incluyen aquellos en los que:

- (i) El fragmento de anticuerpo es un fragmento Fab' y una molécula efectora se une a la bisagra.
- (ii) El fragmento de anticuerpo es un fragmento Fab' en el que la cisteína entre cadenas nativas de C_L y la cisteína entre cadenas nativas de C_{H1} se han sustituido por otro aminoácido, preferiblemente serina y una molécula efectora se une a la bisagra.
- (iii) El fragmento de anticuerpo es un fragmento Fab o un fragmento Fab truncado en el que una molécula efectora se une a cada una de las cisteínas entre cadenas nativas.
- (iv) El fragmento de anticuerpo es un fragmento Fab' y una molécula efectora se une a la cisteína entre cadenas nativas de C_L y la cisteína entre cadenas nativas de C_{H1} y a una cisteína en la región bisagra.

Los conjugados de fragmento de anticuerpo-molécula efectora de la presente invención pueden producirse usando cualquier método adecuado conocido en la técnica. En una realización en la que al menos un sitio de unión de molécula efectora en el fragmento de anticuerpo es una cisteína, la cisteína se reduce preferiblemente para producir un grupo tiol libre adecuado para la unión de la molécula efectora. Los fragmentos de anticuerpo modificados según la invención pueden prepararse, por tanto, haciendo reaccionar un fragmento de anticuerpo tal como se describe en el presente documento que contiene al menos un residuo de cisteína reactivo con una molécula efectora, preferiblemente una molécula efectora activada de manera selectiva por tiol.

Por consiguiente, la presente invención proporciona además un método de producción de un fragmento de anticuerpo al que se unen una o más moléculas efectoras caracterizado porque está ausente el enlace disulfuro entre cadenas nativas entre las regiones constantes de la cadena pesada (C_{H1}) y ligera (C_L) y las regiones constantes de la cadena pesada (C_{H1}) y la cadena ligera (C_L) se unen mediante un enlace disulfuro entre cadenas entre un par de cisteínas, modificadas por ingeniería, una en la región constante de la cadena ligera (C_L) y la otra en la región constante de la cadena pesada (C_{H1}), comprendiendo dicho método:

- a) tratar un fragmento de anticuerpo en el que las regiones constantes de cadena pesada y cadena ligera se unen mediante un enlace disulfuro entre cadenas entre una cisteína, modificada por ingeniería, en la cadena ligera (C_L) y una cisteína, modificada por ingeniería, en las regiones constantes de cadena pesada (C_{H1}) con un agente reductor que puede generar un grupo tiol libre en una cisteína de la región constante de la cadena ligera y/o la pesada y/o, cuando está presente, la región bisagra
- b) hacer reaccionar el fragmento tratado con una molécula efectora.

Pueden unirse moléculas efectoras adicionales en cualquier lugar en el fragmento de anticuerpo, en particular las regiones constantes y/o, cuando está presente, la región bisagra. Si hay dos o más moléculas efectoras que van a unirse a cisteínas en el fragmento de anticuerpo, éstas pueden unirse o bien simultáneamente o bien secuencialmente repitiendo el procedimiento. Preferiblemente si se unen dos o más moléculas efectoras a cisteínas en el fragmento de anticuerpo, se unen simultáneamente.

El método de la presente invención también se extiende a una o más etapas antes y/o después del método de reducción descrito anteriormente en las que se unen moléculas efectoras adicionales al fragmento de anticuerpo usando cualquier método adecuado tal como se describió anteriormente, por ejemplo mediante otras cadenas laterales de aminoácido disponibles tales como grupos amino e imino.

El agente reductor para su uso en la producción de los fragmentos de anticuerpo modificados de la presente invención es cualquier agente reductor que puede reducir las cisteínas disponibles en el fragmento de anticuerpo de la presente invención para producir tioles libres para la unión de la molécula efectora. Preferiblemente, el agente

reductor reduce el enlace disulfuro entre cadenas nativas entre la cisteína entre cadenas de C_L y la cisteína entre cadenas de C_{H1} , cuando están presentes, para permitir la unión de moléculas efectoras a dichas cisteínas. Preferiblemente, el agente reductor no reduce el enlace disulfuro entre cadenas entre las cisteínas, modificadas por ingeniería. Resultará evidente para un experto en la técnica que pueden identificarse agentes reductores adecuados determinando el número de tioles libres producidos tras tratarse el fragmento de anticuerpo con el agente reductor. Se conocen bien en la técnica métodos para determinar el número de tioles libres, véase por ejemplo Lyons *et al.*, 1990, Protein Engineering, 3, 703. Se conocen ampliamente en la técnica agentes reductores para su uso en la presente invención, por ejemplo, los descritos en Singh *et al.*, 1995, Methods in Enzymology, 251, 167-73. Los ejemplos particulares incluyen agentes reductores basados en tiol tales como glutatión reducido (GSH), β -mercaptoetanol (β -ME), β -mercaptoetilamina (β -MA) y ditioneitol (DTT). Otros métodos para reducir los fragmentos de anticuerpo de la presente invención incluyen usar métodos electrolíticos, tales como el método descrito en Leach *et al.*, 1965, Div. Protein. Chem, 4, 23-27 y usar métodos de fotorreducción, tales como el método descrito en Ellison *et al.*, 2000, Biotechniques, 28 (2), 324-326. Preferiblemente sin embargo, el agente reductor para su uso en la presente invención es un agente reductor no basado en tiol que puede liberar uno o más tioles en un fragmento de anticuerpo. Preferiblemente, el agente reductor no basado en tiol puede liberar los tioles entre cadenas nativas en un fragmento de anticuerpo. Agentes reductores preferidos para su uso en la presente invención son agentes reductores de trialquilfosfina (Ruegg UT y Rudinger, J., 1977, Methods in Enzymology, 47, 111-126; Bums J *et al.*, 1991, J.Org.Chem, 56, 2648-2650; Getz *et al.*, 1999, Analytical Biochemistry, 273, 73-80; Han y Han, 1994, Analytical Biochemistry, 220, 5-10; Seitz *et al.*, 1999, Euro.J.Nuclear Medicine, 26, 1265-1273; Cline *et al.*, 2004, Biochemistry, 43, 15195-15203), incluyendo los ejemplos particulares de los mismos tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), tris-butilfosfina (TBP), tris-(2-cianoetil)fosfina, tris-(3-hidroxipropil)fosfina (THP) y tris-(2-hidroxietil)fosfina. Lo más preferiblemente el agente reductor para su uso en la presente invención es o bien TCEP o bien THP. Resultará evidente para un experto en la técnica que la concentración de agente reductor para su uso en la presente invención puede determinarse empíricamente, por ejemplo, variando la concentración de agente reductor y midiendo el número de tioles libres producidos. Normalmente, el agente reductor para su uso en la presente invención se usa en exceso con respecto al fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un exceso molar de entre 2 y 1000 veces. Preferiblemente, el agente reductor está en un exceso de 2, 3, 4, 5, 10, 100 ó 1000 veces. En una realización, el reductor se usa a entre 2 y 5 mM.

Las reacciones en las etapas (a) y (b) del método descrito anteriormente pueden realizarse generalmente en un disolvente, por ejemplo una disolución tampón acuosa tal como acetato o fosfato, a pH aproximadamente neutro, por ejemplo a de aproximadamente pH 4,5 a aproximadamente pH 8,5, normalmente de pH 4,5 a 8, de manera adecuada de pH 6 a 7. La reacción puede realizarse generalmente a cualquier temperatura adecuada, por ejemplo entre aproximadamente 5°C y aproximadamente 70°C, por ejemplo a temperatura ambiente. El disolvente puede contener opcionalmente un agente quelante tal como EDTA, EGTA, CDTA o DTPA. Preferiblemente, el disolvente contiene EDTA a entre 1 y 5 mM, preferiblemente 2 mM. Alternativamente o además, el disolvente puede ser un tampón de quelación tal como ácido cítrico, ácido oxálico, ácido fólico, bicina, tricina, tris o ADA. La molécula efectora se empleará generalmente en una concentración en exceso con relación a la concentración del fragmento de anticuerpo. Normalmente, la molécula efectora está en un exceso molar de entre 2 y 100 veces, preferiblemente un exceso de 5, 10 ó 50 veces.

Cuando sea necesario, puede separarse el producto deseado que contiene el número deseado de moléculas efectoras y que conserva el enlace disulfuro entre cadenas entre las cisteínas, modificadas por ingeniería, de cualquier material de partida y otro producto generado durante el procedimiento de unión de una molécula efectora mediante medios convencionales, por ejemplo mediante técnicas de cromatografía tales como cromatografía de intercambio iónico, exclusión de tamaño, de afinidad con proteína A, G o L o cromatografía de interacción hidrófoba. Por consiguiente, el método de la presente invención puede comprender además opcionalmente una etapa adicional, (c), en la que se purifica el fragmento de anticuerpo al que se unen una o más moléculas efectoras y en la que se conserva el enlace disulfuro entre cadenas, modificado por ingeniería.

Los fragmentos de anticuerpo según la descripción pueden ser útiles en la detección o el tratamiento de varias enfermedades o trastornos. Tales enfermedades o trastornos pueden incluir los descritos en el encabezado general de enfermedad infecciosa, por ejemplo infección bacteriana; infección fúngica; enfermedad inflamatoria/autoinmunitaria por ejemplo artritis reumatoide, osteoartritis, enfermedad inflamatoria del intestino; cáncer; enfermedad alérgica/atópica por ejemplo asma, eccema; enfermedad congénita, por ejemplo fibrosis quística, anemia falciforme; enfermedad dermatológica por ejemplo psoriasis; enfermedad neurológica, por ejemplo esclerosis múltiple; trasplantes por ejemplo rechazo de trasplante de órgano, enfermedad de injerto contra huésped; y enfermedad idiopática/metabólica por ejemplo diabetes.

Los fragmentos de anticuerpo según la descripción pueden formularse para su uso en terapia y/o diagnóstico y según un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un fragmento de anticuerpo al que se unen una o más moléculas efectoras caracterizadas porque está ausente el enlace disulfuro entre cadenas nativas entre las regiones constantes de la cadena pesada (C_{H1}) y ligera (C_L) y las regiones constantes de la cadena pesada (C_{H1}) y la cadena ligera (C_L) se unen mediante un enlace disulfuro entre cadenas entre un par de cisteínas, modificadas por ingeniería, una en la región constante de la cadena ligera (C_L) y la otra en la región constante de la cadena pesada (C_{H1}) junto con uno o más excipientes, diluyentes o vehículos

farmacéuticamente aceptables.

Ejemplos

5 La presente invención se describirá ahora a modo de ejemplo únicamente.

10 El objetivo era identificar pares de cisteínas, modificadas por ingeniería, que se puede demostrar que forman un enlace disulfuro mediante el uso de SDS-PAGE no reductora y de inmunotransferencia. Se identificaron pares de cisteínas usando una estructura de monocristal de una superficie de contacto κ :C_{H1} humana. El objetivo era hallar residuos que tuvieran una distancia C α -C α próxima al valor óptimo de aproximadamente 5,8 Å, pero también se identificaron residuos dentro del intervalo de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 10 Å. También se consideraron pares fuera del intervalo de distancia teórica C α -C α puesto que se sabe tanto que las estructuras cristalinas representan una única conformación estática de múltiples proteínas de conformación como que todas las proteínas y proteínas diméricas y regiones polipeptídicas particulares de las mismas son flexibles y móviles y por tanto pueden adaptarse a distancias teóricas C α -C α mayores o menores. Además, se sometieron a prueba una variedad de ubicaciones en la superficie de contacto κ :C_{H1} puesto que es menos probable que las ubicaciones con una ubicación muy central estén expuestas al disolvente.

20 Se usó una única región de entramado de Fab' humanizada (g165) en su totalidad como proteína de Fab' modelo. Se usaron tres constructos para ayudar en las comparaciones mediante SDS-PAGE:

25 i) un γ 1 Fab' de tipo natural designado como LC-C HC-C, bisagra-CAA que contiene las cisteínas con enlaces disulfuro entre cadenas nativas y un único tiol bisagra. Esta proteína corre como una banda de ~50 kDa durante SDS-PAGE no reducida y puede ofrecer 1, 2 ó 3 (generalmente 1 ó 3) cisteínas para la unión de la molécula efectora con la reducción dependiendo de las condiciones usadas.

30 ii) un γ 1 Fab' ' Δ -inter' designado como LC-S HC-S, bisagra-CAA en la que las cisteínas con enlaces disulfuro entre cadenas nativas se han mutado a serina mientras que conservan un único tiol bisagra. Esta proteína corre como dos bandas de 25 kDa en SDS-PAGE no reducida y proporciona sólo 1 cisteína para la unión de la molécula efectora con la reducción.

35 iii) un γ 1 Fab' 'cola de perro' designado como LC-C HC-S, bisagra-CAA en la que la cisteína nativa de cadena pesada entre cadenas se ha mutado a serina mientras que se conservan la cisteína nativa entre cadenas de la cadena ligera y un único tiol bisagra. Se ha observado que Fab' 'cola de perro' forma eficazmente un enlace disulfuro entre cadenas entre κ y la región bisagra y también se observa como una banda de ~50 kDa durante SDS-PAGE no reducida y puede proporcionar 2 cisteínas para la unión de la molécula efectora con la reducción.

40 Se produjeron moléculas de Fab' en *E. coli* y se purificaron usando métodos convencionales (véase por ejemplo, Humphreys *et al.*, 2002, Protein Expression and Purification, 26, 309-320). Se usó mutagénesis por PCR para cambiar las cisteínas entre cadenas de C_L y C_{H1} a serinas e introducir codones que codifican para cisteína en otros sitios en los fragmentos de anticuerpo.

Ejemplo 1: Formación de enlaces disulfuro entre cadenas, modificados por ingeniería, en g165 LC-S HC-S, bisagra-CAA Fab' y g165 LC-S HC-S, bisagra-SAA Fab'.

45 Se introdujeron codones que codifican para cisteína usando técnicas de ADN recombinante convencionales en una γ 1 g165 Fab' ' Δ -inter' (LC-S HC-S, bisagra-CAA). Puesto que la cadena ligera (LC) y la cadena pesada (HC) de ' γ 1 g165 Fab' ' Δ -inter' se asocian de manera no covalente, la formación de un nuevo enlace disulfuro podría analizarse simplemente haciendo correr muestras de Fab' en una SDS-PAGE no reductora y mediante detección por inmunotransferencia con reactivos anti- κ y anti-C_{H1}. Se expresaron a mayor escala tres pares de cisteínas identificadas como útiles mediante la expresión a pequeña escala y el análisis por SDS-PAGE, para permitir la purificación y someter a prueba la reducción y modificación. Además, puesto que se conoce que la región bisagra que contiene tiol es sumamente flexible y podría formar posiblemente un enlace disulfuro con una cisteína de κ , modificada por ingeniería, también se construyeron estas cuatro variantes en un Fab' con una región bisagra nula, es decir, designada como LC-S HC-S, bisagra-SAA. Por tanto, cualquier enlace disulfuro formado en estas variantes de 'bisagra-SAA' podrían haberse debido únicamente a las mutaciones de κ y C_{H1} introducidas.

60 Se identificaron los pares de cisteínas 1 a 7 mediante el análisis de una estructura cristalina de κ :C_{H1} humana. El par 8 era introducir la cisteína de C_{H1} en la ubicación que se halló que era una cisteína en IgM, IgG2, 3 y 4 para realizar un 'pseudo γ 4 Fab'. Anteriormente se habían realizado mutaciones similares: tanto convertir una IgG1 para que fuera 'similar a IgG4' (Dorai *et al.*, Mol. Immunol. 1992 29: 1487-1491) como cambiar a la inversa una IgG3 para que fuera 'similar a IgG1' (Brekke *et al.*, 1993. Mol Immunol. 30:1419-1425). Los aminoácidos cambiados y sus números de Kabat se muestran en la tabla 1. Los plásmidos producidos se muestran en la tabla 2.

65

Tabla 1- Aminoácidos mutados.

| Notación de Kabat (kappa:CH1) | Distancia C α -C α (Å) (cristal 4D5) | D.i. del par de cisteínas |
|-------------------------------|--|---------------------------|
| F116C:A138C | 8,73 | Par 1 |
| P119C:A125C | 6,4 | Par 2 |
| P119C:S128C | 6,4 | Par 3 |
| F209C:S128C | 5,74 | Par 4 |
| F209C:K129C | 5,89 | Par 5 |
| N210C:K129C | 7,71 | Par 6 |
| F116C:A139C | 5,96 | Par 7 |
| C214C:S127C | 12,65 | Par 8 |

Tabla 2 - Plásmidos

5

| Plásmido | Detalles de Fab' | Mut. de kappa | Mut. de CH1 | D.i. del par de cisteínas |
|----------|----------------------------------|---------------|-------------|---------------------------|
| pDPH147 | g165 Fab' LC-C HC-C, bisagra-CAA | - | - | Fab' clásico |
| pDPH197 | g165 Fab' LC-S HC-S, bisagra-CAA | - | - | Fab' Δ -inter |
| pDPH225 | g165 Fab' LC-C HC-S, bisagra-CAA | - | - | Fab' cola de perro |
| pDPH295 | g165 Fab' LC-S HC-S, bisagra-CAA | F116C | A138C | Par 1 |
| pDPH296 | g165 Fab' LC-S HC-S, bisagra-CAA | P119C | A125C | Par 2 |
| pDPH297 | g165 Fab' LC-S HC-S, bisagra-CAA | P119C | S128C | Par 3 |
| pDPH298 | g165 Fab' LC-S HC-S, bisagra-CAA | F209C | S128C | Par 4 |
| pDPH299 | g165 Fab' LC-S HC-S, bisagra-CAA | F209C | K129C | Par 5 |
| pDPH300 | g165 Fab' LC-S HC-S, bisagra-CAA | N210C | K129C | Par 6 |
| pDPH306 | g165 Fab' LC-S HC-S, bisagra-CAA | F116C | A139C | Par 7 |
| pDPH329 | g165 Fab' LC-C HC-S, bisagra-CAA | wt (C214C) | S127C | Par 8 - pseudo γ 4 |
| pDPH330 | g165 Fab' LC-C HC-S, bisagra-SAA | wt (C214C) | S127C | Par 8 |
| pDPH331 | g165 Fab' LC-S HC-S, bisagra-SAA | F116C | A138C | Par 1 |
| pDPH332 | g165 Fab' LC-S HC-S, bisagra-SAA | P119C | S128C | Par 3 |
| pDPH333 | g165 Fab' LC-S HC-S, bisagra-SAA | N210C | K129C | Par 6 |

Se detectaron inmunotransferencias de SDS-PAGE no reducida de extractos periplasmáticos de expresiones a pequeña escala en *E. coli* de g165 LCS HC-S, bisagra-CAA Fab' con pares introducidos de cisteínas de cKappa:C_{H1} con reactivos anti-Kappa y anti-C_{H1}. Se observó que todos los pares de cisteínas introducidos formaban cierta proteína cKappa-C_{H1} (Fab') con enlaces covalentes con la misma movilidad que un Fab' purificado convencional. Se observó un aumento de la proteólisis con algunos de los constructos, lo que sugiere que el enlace disulfuro introducido provocó cambios en la tasa de plegamiento o la estabilidad física del Fab' en el periplasma. Se observó que tres constructos tenían el mejor equilibrio de formación de enlaces disulfuro, rendimiento y mínima proteólisis: pDPH295 g165 Fab' LC-S HC-S, bisagra-CAA F116C:A138C, pDPH297 g165 Fab' LC-S HC-S, bisagra-CAA P119C:S128C y pDPH300 g165 Fab' LC-S HC-S, bisagra-CAA N210C:K129C.

10

15

También se detectaron inmunotransferencias de SDS-PAGE no reducida de extractos periplasmáticos de expresiones a pequeña escala en *E. coli* de g165 LCS HC-S, bisagra-SAA Fab' con pares introducidos de cisteínas de cKappa:C_{H1}, con reactivos anti-Kappa y anti-C_{H1}. La mutación de cisteína a serina de la región bisagra elimina cualquier posibilidad de formación de enlaces disulfuro entre cKappa y la región bisagra o el bloqueo de la cisteína de C_{H1} por la cisteína de la región bisagra. Todavía se observó la formación de enlaces disulfuro tal como se pone de manifiesto por la presencia de la banda de ~50 kDa Fab cuando se detecta con un reactivo anti-C_{H1}. La detección usando un reactivo anti-cKappa mostró algunas diferencias, en particular la desaparición de una banda de alto peso molecular de un doblete en el par 6 con la mutación de la región bisagra a -SAA, lo que sugiere que la mutación de cKappa N210C hallada en el par 6 está disponible parcialmente para la formación de enlaces disulfuro con la cisteína de la región bisagra.

Ejemplo 2: Estabilidad térmica de g165 LC-S HC-S, bisagra-CAA Fab' y formación de enlaces disulfuro *in vivo*.

Se agitaron extracciones periplasmáticas de sedimentos celulares de fermentación durante la noche a 30°C, 50°C o 65°C en presencia o ausencia de NEM 10 mM antes del análisis por SDS-PAGE e inmunotransferencia. Se detectaron inmunotransferencias de SDS-PAGE no reducida de extractos periplasmáticos de fermentaciones con *E. coli* que expresaban g165 LC-S HC-S, bisagra-CAA Fab' con pares introducidos de cisteínas de cKappa:C_{H1} (pares 1, 3 y 6) con un reactivo anti-C_{H1}. Para los tres mutantes sometidos a prueba (pares 1, 3 y 6) se halló que todos eran estables con incubaciones durante la noche hasta 65°C que demostraron que tanto se formaba la banda de ~50 kDa mediante un enlace disulfuro estable como que las mutaciones no habían desestabilizado radicalmente la estructura global de Fab. La inclusión de N-etilmaleimida (NEM) 10 mM que bloquea irreversiblemente los tioles libres en la extracción a temperatura durante la noche no afectó a la cantidad ni a la estabilidad de los enlaces disulfuro formados. Esto sugiere que la enorme proporción de formación de enlaces disulfuro de LC-HC se había producido antes de la extracción, lo más probablemente *in vivo* en el periplasma de *E. coli*.

Se muestran pruebas adicionales de la estabilidad térmica conferida por la presencia de un enlace disulfuro intacto entre cadenas en la tabla 3. Se extrajo Fab' de las fermentaciones con *E. coli* a 30°C y 55°C y se purificó mediante cromatografía con proteína G. Entre el 55 y el 100% del Fab producido pudo resistir la incubación a mayor temperatura durante la noche, lo que sugiere que había un enlace disulfuro intacto presente en esta proporción del Fab' periplasmático.

Tabla 3. Purificación de g165 Fab' procedente de fermentaciones con *E. coli*.

| Plásmido | Tipo de Fab | Rendimiento de Fab', extracción a 30°C | Rendimiento de Fab', extracción a 55°C | 55°C/30°C |
|----------|---|---|---|-----------|
| pDPH295 | g165 Fab' LC-S HC-S, bisagra-CAA F116C: A138C | 32,3 mg/l | 26,3 mg/l | 81% |
| pDPH297 | g165 Fab' LC-S HC-S, bisagra-CAA P119C: S128C | 68,5 mg/l | 38,0 mg/l | 55% |
| pDPH300 | g165 Fab' LC-S HC-S, bisagra-CAA N210C: K129C | 65,1 mg/l | 65,1 mg/l | 100% |
| pDPH329 | g165 Fab' LC-C HC-S, bisagra-CAA C214C: S127C | - | 104 mg/l | - |

Ejemplo 3: Formación de enlaces disulfuro entre cadenas en g165 'pseudo $\gamma 4$ ' Fab'.

La IgG1 es única entre las estructuras de anticuerpo porque usa una cisteína de C_{H1} en la región bisagra superior (Kabat n.º 233) para unirse a la cadena ligera mientras que otras tales como IgG4 usan una cisteína más N-terminal en la secuencia de C_{H1} (Kabat n.º 127). Para preparar el par 8, se mutó la cisteína de C_{H1} de un $\gamma 1$ Fab a serina (C233S) y luego se realizó la mutación de compensación S127C. En una estructura cristalina de $\gamma 1$ Fab', la distancia C α -C α calculada es de 12,65 Å bastante más allá del intervalo normal para la formación de enlaces disulfuro. En cambio, la distancia C α -C α para el enlace disulfuro de $\gamma 1$ cKappa-C_{H1} nativo es de 5,32 Å. Los geles de SDS-PAGE no reductora mostraron que a pesar de estas observaciones, la formación de enlaces disulfuro de LC-HC era bastante eficaz entre estas dos cisteínas en estas posiciones. La comparación de las variantes de bisagra-CAA y bisagra-SAA sugirió que no hay una implicación de la cisteína de la región bisagra en este enlace disulfuro. También se observó algún dímero de LC.

Estas observaciones sugieren que el extremo C-terminal de cKappa es lo suficientemente móvil y flexible para reducir algo el tramo de 12,65 Å a uno más creíble de 5-7 Å.

5 **Ejemplo 4: Modificación de fragmentos de anticuerpo que contienen pares de cisteínas, modificados por ingeniería, con una molécula efectora reactiva con cisteína usando reductores fuertes y débiles.**

10 PEG-maleimida es un reactivo de prueba adecuado para demostrar la accesibilidad al disolvente de los pares de cisteínas novedosos. La adición de masa molecular adicional significativa tal como un PEG de 20 kDa se detecta fácilmente usando SDS-PAGE. Los enlaces disulfuro que están enterrados con profundidad dentro o entre dominios de proteína no serán accesibles para los reductores que porta el disolvente.

15 Se sometió a prueba el efecto de la reducción con β -MA 5 mM a temperatura ambiente durante una hora en tampón fosfato 0,1 M, EDTA 2 mM pH 6,0. Todos los Fab' estaban a 1,4 mg/ml durante la reducción, y se eliminó el reductor usando una columna de desalación PD 10 después de que la concentración de Fab' fuese de aproximadamente 0,8 mg/ml. Se añadió maleimida-PEG de 20 kDa a un exceso 5x (mg/mg) dando como resultado un exceso de aproximadamente 6 M. Se usó SDS-PAGE no reductora para analizar los fragmentos resultantes. Los polipéptidos asociados de manera covalente corren como una banda de ~50 kDa a menos que se modifiquen mediante la adición de múltiples cadenas de PEG de 20 kDa. Los polipéptidos asociados de manera no covalente tales como los
20 hallados en el constructo de control Δ -inter o en los que se ha reducido un enlace disulfuro, migrarán como bandas de ~25 kDa separadas. Los fragmentos de control se comportaron tal como se esperaba tras pegilación y reducción suave con β -MA. El enlace disulfuro entre cadenas hallado en el Fab' 'cola de perro' estaba bastante intacto tras la reducción y pegilación, sin embargo, un pequeño porcentaje de Fab' 'cola de perro' se redujo a LC y HC y éstas también se pegilaron cada una. El Fab' de control Δ -inter se monopegiló en la región bisagra tal como se esperaba.
25 El control de Fab' clásico también se monopegiló en la región bisagra y el enlace disulfuro entre cadenas nativas permaneció intacto. Los tres nuevos emparejamientos disulfuro, diseñados por ingeniería, pudieron resistir la reducción suave con β -MA y se produjo un Fab' con un enlace disulfuro entre cadenas, diseñado por ingeniería, intacto que se monopegiló en la región bisagra. Las preparaciones de proteína purificadas de pDPH297 (par 3) y pDPH300 (par 6) también contenían algunas LC y HC asociadas de manera no covalente, algunas de las cuales
30 también se pegilaron. Un material de este tipo puede purificarse fácilmente retirando el fragmento Fab' modificado deseado usando métodos convencionales en la técnica tales como la cromatografía de exclusión molecular.

También se sometieron a prueba condiciones reductoras más fuertes, esta vez usando TCEP 10 mM como reductor (todas las demás condiciones permanecieron iguales). La SDS-PAGE no reductora mostró que el Fab' clásico se
35 comportó como se esperaba, reduciéndose sustancialmente la mayoría de esta proteína y pegilándose para dar como resultado LC monopegilada y HC dipegilada. La reducción y pegilación de los fragmentos de anticuerpo, modificados por ingeniería, codificados por pDPH295 (par 1), pDPH297 (par 3) y pDPH300 (par 6) produjeron un Fab' con un enlace disulfuro entre cadenas intacto que se monopegiló en la región bisagra. Esto son pruebas adicionales de que estos pares disulfuro tienen una oclusión mejorada con respecto al entorno acuoso. También se
40 observó una proporción tanto de cadenas ligera y pesada libres no pegiladas como de cadenas ligera y pesada libres pegiladas. Un material de este tipo puede purificarse fácilmente retirando el fragmento Fab' modificado deseado usando métodos convencionales en la técnica tales como la cromatografía de exclusión molecular.

45 **Ejemplo 5: Efecto de los enlaces disulfuro novedosos sobre la afinidad de unión a antígenos.**

La afinidad de unión a antígenos de fragmentos Fab' puede verse afectada por sutiles perturbaciones estructurales. La afinidad de unión por el antígeno de g165 Fab' no se vio afectada por la modificación por ingeniería de la proteína implicada en la preparación de los pares 1, 3 y 6.

50

REIVINDICACIONES

1. Fragmento de anticuerpo de IgG al que se une una o más moléculas efectoras seleccionadas de un polímero con un peso molecular promedio en el intervalo de 500 Da a 100.000 Da caracterizado porque está ausente el enlace disulfuro entre cadenas nativas entre las regiones constantes de la cadena pesada (C_{H1}) y ligera (C_L) y las regiones constantes de la cadena pesada (C_{H1}) y la cadena ligera (C_L) están unidas mediante un enlace disulfuro entre cadenas entre un par de cisteínas, modificadas por ingeniería, una en la región constante de la cadena ligera (C_L) y la otra en la región constante de la cadena pesada (C_{H1}), en el que el último enlace disulfuro está ampliamente inaccesible para agentes reductores y moléculas efectoras, de tal manera que permanece intacto durante la unión a molécula efectora y en el que la posición del par de cisteínas, modificadas por ingeniería, se selecciona de la posición 116 de la cadena ligera y 138 de la cadena pesada, la posición 119 de la cadena ligera y 128 de la cadena pesada o la posición 210 de la cadena ligera y 129 de la cadena pesada (numeración de Kabat).
2. Fragmento de anticuerpo según la reivindicación 1, en el que al menos una molécula efectora se une a una cisteína en el fragmento de anticuerpo.
3. Fragmento de anticuerpo en el que las regiones constantes de la cadena pesada (C_{H1}) y la cadena ligera (C_L) están unidas mediante un enlace disulfuro entre cadenas entre un par de cisteínas, modificadas por ingeniería, caracterizado porque la posición del par de cisteínas se selecciona de la posición 116 de la cadena ligera y 138 de la cadena pesada, la posición 119 de la cadena ligera y 128 de la cadena pesada o la posición 210 de la cadena ligera y 129 de la cadena pesada (numeración de Kabat).
4. Fragmento de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el fragmento de anticuerpo es Fab o Fab'.
5. Fragmento de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que las cisteínas entre cadenas nativas se han sustituido por otro aminoácido.
6. Fragmento de anticuerpo según la reivindicación 5, en el que las cisteínas entre cadenas nativas se han sustituido por serina.
7. Fragmento de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el fragmento de anticuerpo es Fab' y una molécula efectora se une a una cisteína en la región bisagra.
8. Fragmento de anticuerpo según la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que la molécula efectora es PEG.
9. Método de producción de un fragmento de anticuerpo según la reivindicación 1 que comprende:
 - a) tratar un fragmento de anticuerpo en el que las regiones constantes de la cadena pesada (C_{H1}) y la cadena ligera (C_L) están unidas mediante un enlace disulfuro entre cadenas entre un par de cisteínas, modificadas por ingeniería, una en la región constante de la cadena ligera (C_L) y la otra en la región constante de la cadena pesada (C_{H1}) con un agente reductor que puede generar un grupo tiol libre en una cisteína del fragmento de anticuerpo en el que la posición del par de cisteínas, modificadas por ingeniería, se selecciona de la posición 116 de la cadena ligera y 138 de la cadena pesada, la posición 119 de la cadena ligera y 128 de la cadena pesada o la posición 210 de la cadena ligera y 129 de la cadena pesada,
 - b) hacer reaccionar el fragmento tratado con una molécula efectora.
10. Método según la reivindicación 9, que comprende además una etapa (c) en la que se purifica el fragmento de anticuerpo según la reivindicación 1.
11. Método según la reivindicación 9 o reivindicación 10, en el que el agente reductor es un agente reductor distinto de tiol.

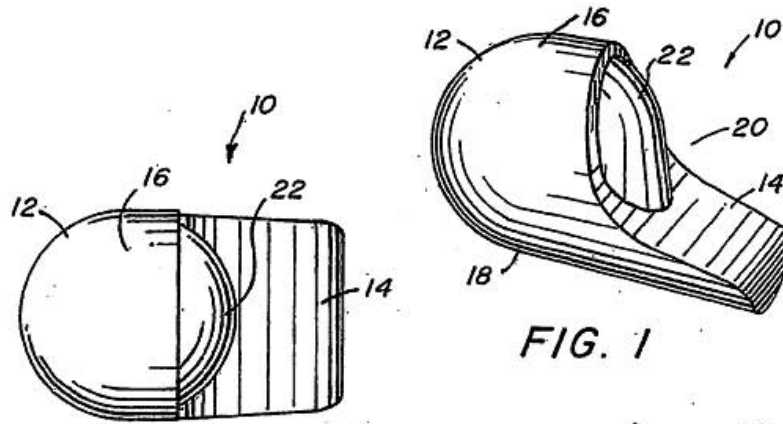


FIG. 1

FIG. 2

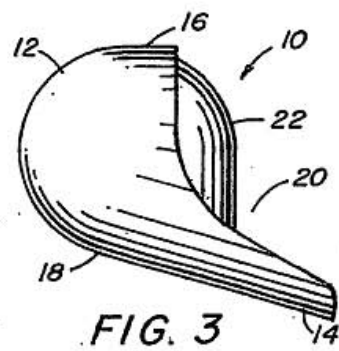


FIG. 3

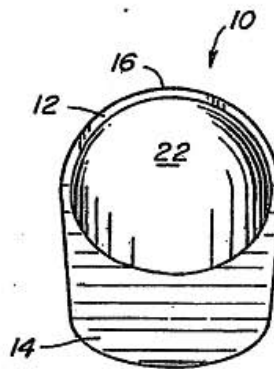


FIG. 4

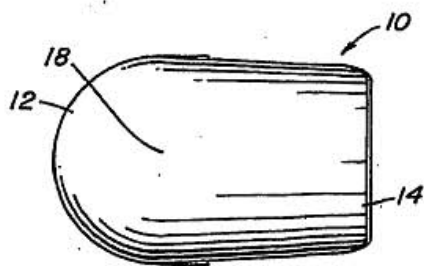


FIG. 5

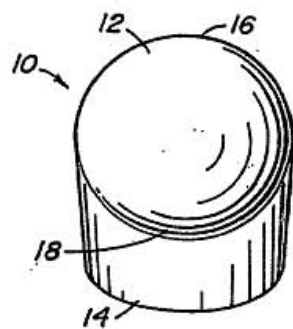


FIG. 6

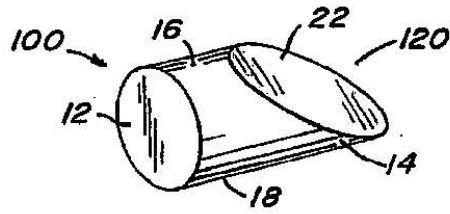


FIG. 7

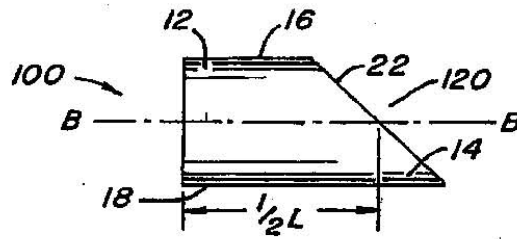


FIG. 8

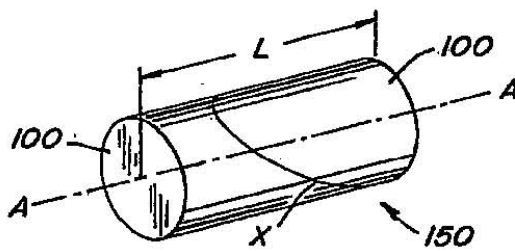


FIG. 9

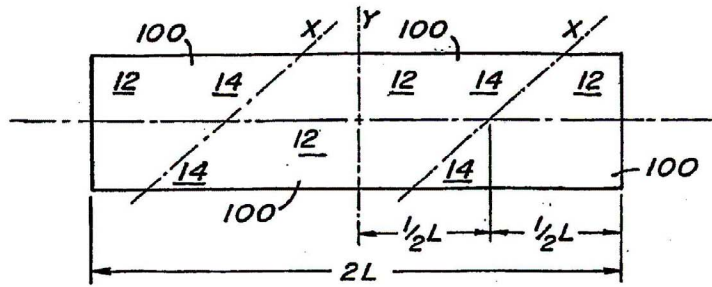


FIG. 10

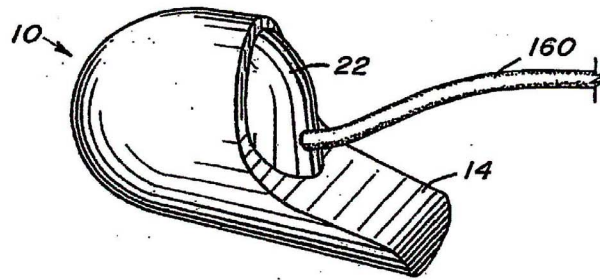


FIG. 11

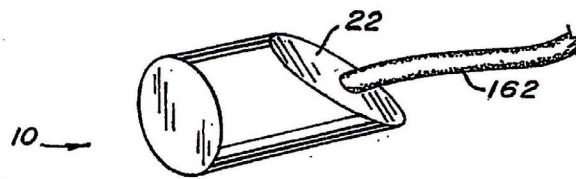


FIG. 12