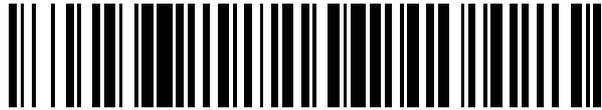


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 413 493**

51 Int. Cl.:

A61P 35/02 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.11.2006 E 06817559 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2013 EP 1962961**

54 Título: **Semicuerpos: agentes terapéuticos activados por dimerización**

30 Prioridad:

29.11.2005 US 741030 P
02.03.2006 AU 2006901059

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.07.2013

73 Titular/es:

THE UNIVERSITY OF SYDNEY (100.0%)
Sydney, NSW 2000, AU

72 Inventor/es:

CHRISTOPHERSON, RICHARD IAN;
MATTHEWS, JACQUELINE MARY y
MACKAY, JOEL PETER

74 Agente/Representante:

PÉREZ BARQUÍN, Eliana

ES 2 413 493 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

Semicuerpos: agentes terapéuticos activados por dimerización

5 **Antecedentes de la invención**Campo de la invención

10 La presente invención se refiere de forma general a un conjunto de inmunoglobulinas modificadas que comprende dos inmunoglobulinas complementarias, que en el presente documento se denominan "semicuerpos" que son útiles para dirigirse a células en particular de un sujeto. Más en particular, la presente invención proporciona un conjunto de anticuerpos en el que es necesario que al menos dos moléculas del conjunto, cada una específica para un antígeno diferente sobre una célula objetivo, interactúen entre sí en la superficie celular para formar un complejo activo que dirige la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos o por el complemento y/o la función indicadora y/o la actividad terapéutica. Los anticuerpos de la presente invención son útiles para dirigirse a células en particular tales como células cancerosas, incluyendo células de leucemia, patógenos, incluyendo agentes de malaria, bacterianos y víricos, y células madre, incluyendo células madre embrionarias y adultas y células patógenas. Por lo tanto, la presente invención proporciona métodos de tratamiento, diagnóstico y realización de investigaciones y composiciones que comprenden anticuerpos útiles para los mismos.

Descripción de la técnica anterior

25 Al final de la descripción se recogen los datos bibliográficos de las publicaciones mencionadas por autor en la presente memoria descriptiva.

Las referencias a cualquier técnica anterior en la presente memoria descriptiva no son, y no deberían considerarse como, un reconocimiento o cualquier otra forma de sugerencia de que esta técnica anterior forma parte del conocimiento general en ningún país.

30 Una característica clave en la búsqueda y el desarrollo de agentes terapéuticos es la discriminación de objetivos o toxicidad selectiva. En particular, es de importancia capital la capacidad para distinguir células objetivo tales como células cancerosas o células infectadas con células patógenas entre una población de células sanas en un sujeto. Este es, en particular, el caso de los tratamientos contra el cáncer donde las células cancerosas objetivo tienen muchas propiedades fisiológicas, anatómicas y bioquímicas en común con las células sanas circundantes. Aunque algunos fármacos antineoplásicos provocan daños colaterales a células sanas, su uso puede estar indicado, o al menos justificado, para cánceres de crecimiento rápido, particularmente agresivos.

40 Los anticuerpos terapéuticos son el campo farmacéutico que está creciendo más rápido, con más de 30 anticuerpos en fases finales de ensayos clínicos (Hudson y Souriau, *Nat Med* 9:129-134, 2003). Existen muchas variaciones de anticuerpos genomanipulados (por ejemplo, monoclonales de ratón, quiméricos, humanizados, monoclonales humanos, fragmentos de anticuerpo variables monocatenarios (scFv), minicuerpos, aptámeros). Los anticuerpos desarrollados usando tecnología de ADN recombinante, contienen dos o más fragmentos de anticuerpo variables monocatenarios (scFv) con especificidades de unión diferentes y una separación apropiada entre estos dominios para permitir que ambos scFv se unan a antígenos de forma simultánea (Hudson y Souriau, *supra* 2003). Se han formado anticuerpos scFv bivalentes y biespecíficos usando casetes de dimerización a base de cremalleras de leucina unidos a diferentes scFv (de Kruif y Logtenberg, *J Biol Chem* 271:7630-7634, 1996). Se han diseñado anticuerpos biespecíficos con diferentes dominios scFv conectados por una cadena polipeptídica para entrecruzar linfocitos T con tumores. Las dos o más interacciones que tienen estos anticuerpos quiméricos con diferentes antígenos de superficie sobre una célula aumentarían enormemente la fuerza de unión, dado que las constantes de disociación de las interacciones individuales se multiplican.

55 Aunque los anticuerpos terapéuticos son importantes, los anticuerpos multiespecíficos no han tenido tanto éxito. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar fármacos y otros agentes terapéuticos a base de anticuerpos que sean más altamente selectivos para las células objetivo.

60 Se han propuesto anticuerpos completos como agentes dirigidos altamente específicos (Carter, *Nature Reviews* 1:118-128, 2001). En una propuesta, se enlazan agentes citotóxicos a un anticuerpo específico para un antígeno sobre una célula objetivo. Sin embargo, aunque los anticuerpos tienen un alto grado de especificidad por el objetivo, no han alcanzado un uso terapéutico patológico extendido y se usan principalmente en aplicaciones clínicas de formación de imágenes. Esto puede ser debido a sus semividas en circulación relativamente largas y a sus funciones efectoras asociadas.

65 No obstante, los anticuerpos modificados han alcanzado cierto nivel de aceptación en aplicaciones inmunoterápicas (Carter (2001) *supra*; de Haard *et al.*, *Adv. Drug Delivery Rev.* 31:5-31, 1998; Chames y Baty, *FEMS Microbiol. Lett.* 189:1-8, 2000; Funaro *et al.*, *Biotechnol. Adv.* 18:385-401, 2000; Hudson, *Exp. Opin. Invest Drugs* 9:1231-1242, 2000).

En la tabla 1 de Carter (2001) *supra*, se revisan ejemplos que implican anticuerpos terapéuticos.

5 Todos estos anticuerpos contienen el dominio Fc que es necesario para la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

Ohiro *et al.* (*Anal. Chem.* 74:5786-5792, 2002) describen un inmunoensayo homogéneo y no competitivo basado en la transferencia de energía de resonancia por fluorescencia potenciada por la interacción con cremalleras de leucina.

10 Otro desarrollo útil en el uso de fragmentos de anticuerpo es su fusión con agentes activos tales como isótopos radioactivos (Wu *et al.*, *Immunotechnology* 2:21-36, 1996; Wu *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:8495-8500, 2000; Adams *et al.*, *Nuc. Med. Biol.* 27:330-346, 2000), enzimas para producir tratamiento (Bagshawe y Begent, *Adv. Drug Delivery Rev.* 22:365-367, 1996) y toxinas para la destrucción dirigida de células (Reiter y Pastan, *Tibtech* 16:51-520, 1998; Kreitman, *Curr. Opin. Immunol.* 11:570-578, 1999).

15 Son anticuerpos modificados de particular interés los fragmentos variables monocatenarios (scFv) que llevan las secuencias de la región variable de las cadenas ligera y pesada unidas. Los fragmentos de anticuerpo scFv derivan de porciones de fragmento de unión a antígeno (Fab) de un anticuerpo que comprende la región V de una cadena pesada enlazada por un tramo de péptido sintético a una región V de una cadena ligera.

20 Aunque los fragmentos de anticuerpo scFv han alcanzado un nivel de utilidad razonable como moléculas dirigidas, carecen del dominio Fc y no pueden inducir ADCC o CDC.

25 La presente invención permite el uso de formas modificadas de fragmentos de anticuerpo scFv en tratamiento celular dirigido y/o diagnóstico y/o investigación.

Sumario de la invención

30 A lo largo de la presente memoria descriptiva, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que la palabra "comprende", o variaciones tales como "comprenden" o "comprendiendo", implica la inclusión de un elemento o entero o grupo de elementos indicado pero no la exclusión de cualquier otro elemento o entero o grupo de elementos o enteros.

35 La presente invención proporciona un conjunto de inmunoglobulinas modificadas que comprende dos inmunoglobulinas complementarias que pueden formar un agente o agentes combinados funcionales con propiedades específicas después de la unión de la primera y la segunda inmunoglobulinas complementarias a una célula objetivo; en el que cada inmunoglobulina comprende una primera, segunda y tercera porciones en las que:

40 (a) cada primera porción es un scFv u otro fragmento de unión a antígeno de una inmunoglobulina y la primera porción de la primera inmunoglobulina complementaria puede interaccionar con un primer antígeno sobre la célula objetivo y la primera porción de la segunda inmunoglobulina complementaria puede interaccionar con un antígeno diferente sobre dicha célula objetivo;

45 (b) cada segunda porción es un agente o una porción incompleta, no funcional de un agente, de forma que las dos segundas porciones son:

(i) moléculas indicadoras distintas que, en combinación, proporcionan una señal combinada,

50 (ii) porciones no funcionales complementarias de una única molécula indicadora, o

(iii) dominios Fc no funcionales, incompletos que pueden formar un dominio Fc funcional; y

(c) cada tercera porción es un miembro diferente de un par de unión complementario que comprende un primer y un segundo miembros, en la que el par de unión comprende porciones complementarias de una cremallera de leucina, un par ligando-receptor, actina y una proteína de unión a actina o aptámeros de ADN;

55 en el que después de la unión de las inmunoglobulinas complementarias a los dos antígenos se combinan los pares de unión:

60 (i) permitiendo que las moléculas indicadoras proporcionen una señal combinada,

(ii) permitiendo que las porciones no funcionales complementarias de una única molécula indicadora reconstituyan una única molécula indicadora, o

65 (iii) permitiendo que los dominios Fc no funcionales incompletos formen un dominio Fc completo.

En lo sucesivo, las inmunoglobulinas modificadas se denominan "semicuerpos".

La presente invención combina la especificidad de las interacciones anticuerpo-antígeno para generar moléculas inmunointeractivas que se pueden dirigir a células en particular e inducir citotoxicidad y/o función indicadora y/o facilitar el tratamiento celular. En el presente documento se divulgan conjuntos de al menos dosemicuerpos en los que cada semicuerpo comprende una porción de unión a antígeno, un agente o porción del mismo y uno u otro miembro de un par de unión. Dos semicuerpos están diseñados de forma que, cuando están muy próximos, cada miembro constituyente de un par de unión complementario interacciona formando un par de unión. Esto permite a su vez la interacción de porciones del agente para generar un agente funcional o la interacción de dos agentes, agente o agentes que tienen propiedades que dan lugar, por ejemplo, a muerte celular, tratamiento celular o la proporción de una señal indicadora. Por lo tanto, el agente sobre los semicuerpos puede actuar como o formar una molécula indicadora, una molécula terapéutica o una molécula citotóxica. Preferentemente, los semicuerpos comprenden porciones no funcionales del agente. Cuando están muy próximas, las porciones de molécula indicadora o terapéutica o citotóxica se unen y se reconstituye una molécula funcional que puede proporcionar una señal o inducir citoterapia o citotoxicidad. Esto aumenta la especificidad para fines de formación de imágenes, diagnósticos y terapéuticos. Los semicuerpos también son herramientas de investigación útiles tal como para FACS, citometría de flujo y cromatografía de afinidad. Los semicuerpos también se pueden usar para detectar productos de células tales como proteínas o diferentes modificaciones fosforiladas o glucosiladas u otras modificaciones postraduccionales de las mismas. En esencia, los semicuerpos de la presente invención permiten una selección inmunofenotípica potenciada de células, virus o productos de los mismos, tales como proteínas.

La porción de unión a antígeno puede derivar de una inmunoglobulina tal como un scFv (o fragmento F'ab) o cualquier estructura de afinidad tal como una microestructura de afinidad. Los ejemplos incluyen dAb, nanocuerpos, microproteínas, fibronectinas, microcuerpos, anticinas, aptámeros, darpinas, avímeros, aflinas y dominios de Kunitz.

Los semicuerpos tienen una especificidad por el objetivo potenciada, ya que cada semicuerpo del conjunto es específico para un antígeno en particular. Por lo tanto, la selección de células o virus que tienen un par de antígenos inusual reduce el riesgo de unión no específica.

En una realización, cada semicuerpo lleva un dominio Fc incompleto pero, después de la unión del par de semicuerpos, los dos dominios Fc incompletos forman un dominio Fc funcional o una porción funcional del mismo. Juntos, los semicuerpos unidos tienen un dominio Fc biológicamente funcional y pueden iniciar actividades asociadas tales como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). En otra realización, los dos dominios incompletos forman, cuando se reconstituyen, un agente tal como una molécula indicadora, un agente terapéutico o un agente citotóxico. En otra realización, los agentes son colorantes tales como fluorocromos que, cuando están juntos, proporcionan una señal en particular.

Por lo tanto, la presente invención engloba una composición que comprende un conjunto de semicuerpos de acuerdo con la invención que, juntos, pueden inducir una citotoxicidad altamente selectiva. La toxicidad selectiva es consecuencia de la interacción de los semicuerpos con al menos dos antígenos diferentes sobre la superficie de una célula objetivo. De forma predominante los dos antígenos se expresan sólo simultáneamente sobre una población de células objetivo. Incluso si uno de estos antígenos (o antígenos análogos) está representado sobre células sanas, a menos que ambos antígenos estén presentes sobre la misma célula, el par de semicuerpos no se juntará en la superficie de la célula por medio de los pares de unión complementarios para formar un dominio citotóxico funcional tal como un dominio Fc funcional, una molécula terapéutica, una molécula citotóxica o una molécula indicadora.

En otra realización, la reconstitución de los pares de semicuerpos da lugar a una molécula citotóxica o terapéutica funcional. Son ejemplos de estas moléculas funcionales reconstituidas las moléculas apoptósicas, estáticas de ciclo celular, líticas o citotóxicas, antibióticos, péptidos y citocinas.

En una realización alternativa, cada semicuerpo lleva una molécula indicadora funcional tal como un colorante o marcador fluorescente y cuando los semicuerpos se reconstituyen juntos, la señal combinada (o colorante combinado) o señal fluorescente combinada es diferente de las señales (o colorantes) individuales. Los ejemplos de marcadores fluorescentes incluyen hidroxycumarina, aminocumarina, metoxicumarina, azul Cascade, amarillo Lucifer, NBD, ficoeritrina (PE), PerCP, aloficocianina, Hoechst 33342, DAP1, azul SYTOX, Hoechst 33258, cromomicina A3, mitramicina, YOYO-1, verde SYTOX, naranja SYTOX, 7-AAD, naranja de acridina, TOTO-1, To-PRO-1, naranja de tiazol, TOTO-3, TO-PRO-3, LDS 751, colorantes Alexa Fluor incluyendo Alexa Fluor-350, -430, -488, -532, -546, -555, -556, -594, -633, -647, -660, -680, -700 y -750; colorantes BoDipy, incluyendo BoDipy 630/650 y BoDipy 650/665; colorantes CY, en particular Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy 5,5 y Cy7; 6-FAM (fluoresceína); PE-Cy5, PE-Cy7, fluoresceína dT; hexaclorofluoresceína (Hex); 6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína (JOE); colorantes Oregon Green, incluidos 488-X y 514; colorantes de rodamina, incluyendo X-rodamina, lisamina rodamina B, verde rodamina, rojo rodamina y ROX; TRITC, tetrametilrodamina (TMR); carboxitetrametilrodamina (TAMRA); tetraclorofluoresceína (TET); Rojo 6B, FluorX, BODIPY-FL y rojo Texas.

Los semicuerpos de la presente invención son útiles en el tratamiento de una variedad de afecciones que incluyen el

cáncer, infecciones por agentes patógenos o la dirección selectiva a cualquier tipo de célula de un sujeto. También son útiles para dirigirse a células tales como células madre.

5 La referencia a un sujeto incluye un ser humano u otro primate, animal de cría, animal de laboratorio, animal de compañía o especie aviar. Un sujeto también se puede considerar un paciente.

10 Por lo tanto, la presente invención contempla un método de tratamiento en un sujeto, tal como un paciente, que comprende administrar al sujeto un conjunto de semicuerpos de acuerdo con la invención que, cuando se unen por medio de pares de unión, forman un dominio citotóxico funcional tal como un dominio Fc o una porción funcional del mismo que puede inducir citotoxicidad celular tal como ADCC o CDC. De forma alternativa, los semicuerpos reconstituyen un agente citotóxico o una molécula terapéutica.

15 También forman parte de la presente invención composiciones de diagnóstico y métodos de diagnóstico y/o formación de imágenes y/o tratamiento.

El par de molécula inmunointeractivas se puede administrar simultáneamente o de forma secuencial.

20 La presente invención proporciona además un método *in vitro* para identificar selectivamente una célula, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha célula con un conjunto de inmunoglobulinas como se define en el presente documento, en el que dichas primeras porciones pueden interaccionar diferentes antígenos sobre la célula, dichas segundas porciones comprenden distintas moléculas indicadoras o porciones complementarias no funcionales de una única molécula indicadora y dichas terceras porciones son pares de unión complementarios, en el que después de la unión de las inmunoglobulinas individuales a los diferentes antígenos, los pares de unión se combinan en la superficie celular permitiendo que las moléculas indicadoras proporcionen una señal combinada o reconstituyan una única molécula indicadora.

30 La presente invención también proporciona un método para detectar una célula objetivo, comprendiendo dicho método poner en contacto una muestra que, supuestamente, comprende dicha célula objetivo con un conjunto de inmunoglobulinas como se define en el presente documento, en el que dichas primeras porciones pueden interaccionar diferentes antígenos sobre dicha célula, dichas segundas porciones comprenden distintas moléculas indicadoras o porciones no funcionales complementarias de una única molécula indicadora, en el que después de la unión de las inmunoglobulinas individuales a los diferentes antígenos, los pares de unión se combinan en la superficie celular permitiendo que las moléculas indicadoras proporcionen una señal combinada o reconstituyan una única molécula indicadora.

35 En la tabla 1 se proporciona una lista de abreviaturas usadas en el presente documento.

Tabla 1

Abreviaturas	
ABREVIATURA	DESCRIPCIÓN
Ab	anticuerpo
ADCC	citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
Ag	antígeno
Región C	región constante
Antígeno CD	agrupación de antígenos de diferenciación
CDC	citotoxicidad dependiente del complemento
Fragmento Fab	fragmento de unión a antígeno
Fc	fragmento cristalizabile
FcR	receptor Fc
Fv	fragmento variable
Cadena H	cadena pesada
Ig	inmunoglobulina
Cadena L	cadena ligera
sc	monocatenario
scFv	fragmento variable monocatenario, Fab recombinante que comprende región V de cadenas pesada y ligera

Región V	región variable
----------	-----------------

Breve descripción de las figuras

- 5 Las figuras 1A y B son representaciones de las secuencias de aminoácidos para los conjugados de tiorredoxina-semicuerpo. Trx-CD45-mOrange-E3 (semicuerpo A, DBA, A) y Trx-CD20-T-Sapphire-K3 (semicuerpo B, DBB, B).
- Las figuras 2A a 2D son representaciones fotográficas de geles de proteínas.
- 10 La figura 3 es una representación gráfica que muestra los espectros de excitación de fluorescencia de los semicuerpos TRX replegados. La longitud de onda de emisión se fijó a 580 nm para TRX-DBA y a 510 nm para TRX-DBB. Las anchuras de rendija eran ambas de 10 nm y las concentraciones de proteínas eran de 0,1 mg/ml y ~0,9 mg/ml, respectivamente. Se registraron los espectros de excitación de fluorescencia desde 400-560 nm para TRX-DBA (naranja) y de 350-460 nm para TRX-DBB (azul).
- 15 La figura 4 es una representación gráfica que muestra los espectros de emisión de fluorescencia de los semicuerpos TRX replegados. La longitud de onda de excitación se fijó a 510 nm para TRX-DBA y a 400 nm para TRX-DBB. Las anchuras de rendija eran ambas de 10 nm y las concentraciones de proteínas eran de 0,1 mg/ml y ~0,9 mg/ml, respectivamente. Se registraron los espectros de emisión de fluorescencia desde 550-650 nm para TRX-DBA (naranja) y de 450-600 nm para TRX-DBB (azul).
- 20 La figura 5 es una representación gráfica que muestra propiedades de fluorescencia relativas de los semicuerpos. Se excitó una proteína de fusión eGFP (1 μ M) a 430 nm (cian oscuro); se excitó el Trx-DBA replegado (~1,5 μ M) a 510 nm (naranja); se excitó el Trx-DBB (~15 μ M) a 400 nm (azul). Las rendijas de excitación y emisión eran ambas de 5 nm en todos los casos.
- 25 La figura 6 es una representación gráfica que muestra las propiedades de fluorescencia de una mezcla de TRX-DBA y TRX-DBB. La longitud de onda se fijó a 400 nm para TRX-DBB; las anchuras de rendija eran ambas de 10 nm y las concentraciones de proteínas eran de 0,05 mg/ml y ~0,45 mg/ml, respectivamente para TRX-DBA y TRX-DBB. Esto corresponde a concentraciones activas estimadas de \leq ~ 130 nM y \leq ~75 nM. Se registró un espectro de emisión de fluorescencia desde 450-600 nm para una mezcla de TRX-DBA y TRX-DBB (ABMIX; verde) y se compara con el de TRX-DBB solo (azul).
- 30 La figura 7 es una representación fotográfica de la identificación de pET32a-30103 S1 en BL21 de *E. coli*. M = Marcador; 1 = Colonia no inducida; 2 = Colonia 1; 3 = Colonia 2; 4 = Colonia 3.
- 35 La figura 8 es una representación fotográfica que muestra la detección de la solubilidad de 30103 S1. 1 = sobrenadante de 30103 S1 inducida a 15 °C durante la noche; 2 = sobrenadante de 30103 S2 inducida a 25 °C durante 6 horas; 3 = precipitado de 30103 S1 inducida a 15 °C durante la noche; 4 = precipitado de 30103 S1 inducida a 25 °C durante 6 horas; M = marcador de bajo peso.
- 40 La figura 9 es una representación diagramática que muestra una SDS-PAGE de 30103 S1 replegada. M = marcador; 1 = 30103 S1 replegada.
- 45 La figura 10 es una representación fotográfica de la identificación de pET32a-30103s2 en BL21 de *E. coli*. 1 = marcador; 2 = colonia n.º 1 no inducida; 3-7 = colonia n.º 2-n.º 6 inducidas.
- 50 La figura 11 es una representación fotográfica que muestra la detección de la solubilidad de 30103s2. 1 = precipitado de 30103s2 inducida a 15 °C durante la noche; 2 = sobrenadante de 30103s2 inducida a 15 °C durante la noche; 3 = precipitado de 30103s2 inducida a 25 °C durante 6 horas; 4 = sobrenadante de 30103s2 inducida a 25 °C durante 6 horas.
- La figura 12 es una representación fotográfica del SDS-PAGE de 30103S2 replegada. 1 = marcador; 2 = 30103 S2 replegada.
- 55 La figura 13 es una representación esquemática que muestra los dominios polipeptídicos del anticuerpo quimérico propuesto (semicuerpo).
- 60 La figura 14 es una representación diagramática que muestra la estructura de los componentes proteicos del complejo fragmento Fc de h1gG1-Fc RIII. El fragmento Fc de h1gG1 se muestra como un diagrama de cintas con la cadena A en color claro y la cadena B en color oscuro. Se indican los extremos N y C. Se muestra el sFc III como una representación de conexiones (coordenadas tomadas del código de acceso a RCSB Protein Databank:1e4k; Sondermann *et al.*, *Nature* 406:267-273, 2000).
- La figura 15 es una representación diagramática que muestra la heterodimerización de cremalleras de leucina. Parte

superior: representación de rueda helicoidal (mirando hacia abajo a lo largo del eje largo de las hélices) de heterodimerización. Parte inferior: muestra esquemática de que cargas electrostáticas complementarias median la heterodimerización, no la homodimerización. A = CD19, B = α -CD19-zip-N'-GFP, C = verde, D = CD5, E = α -CD5-zip-C'-GFP.

5

La figura 16 es una representación diagramática de FACS potenciada usando semicuerpos.

FACS potenciada - un color para dos marcadores

Tipo de célula	Especificidad del semicuerpo	Dominios Fc reconstituido	Detección por
TC CD4+	CD4 CD3	Ig1	anti-Ig1-verde
TC CD8+	CD8 CD3	Ig2a	anti-Ig2a-rojo
Monocito	CD14 Clase II	IgM	anti-IgM-amarillo
Célula dendrítica	CD83 Clase II	IgD	anti-IgD-azul

10 La figura 17 es una representación diagramática que muestra inmunoensayos potenciados usando semicuerpos donde A = α -fosfotirosina, B = α -proteína-epítipo y C = por ejemplo, detección de proteínas multiméricas modificadas en una etapa

La figura 18 es una representación diagramática que muestra una cromatografía de inmunoafinidad potenciada usando semicuerpos donde A = α -fosfotirosina, B = α -Fc, por ejemplo, proteína A, y C = α -proteína-epítipo.

15

La figura 19 es una representación diagramática que muestra la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) mediada contra células de leucemia linfocítica crónica (CLL) CD5⁺ CD19⁺ por un par de semicuerpos.

20 **Descripción detallada de la invención**

La presente invención se refiere a un conjunto de moléculas de inmunoglobulina modificadas que forman una molécula inmunointeractiva de tipo anticuerpo. El término "inmunointeractivo" en este contexto se usa para destacar una de las características principales de un anticuerpo, es decir, la capacidad de un anticuerpo para interactuar específicamente con un antígeno. Como cada molécula es realmente la mitad de una molécula de tipo anticuerpo, se denomina en el presente documento "semicuerpo". La presente invención engloba, por lo tanto, anticuerpos modificados de forma recombinante y/o química para formar un fragmento variable monocatenario (por ejemplo, scFv) con especificidad para un antígeno. Dichos semicuerpos también se pueden denominar en el presente documento moléculas inmunointeractivas o inmunoglobulinas modificadas o quiméricas o anticuerpos modificados o quiméricos.

25

30

Los semicuerpos descritos en el presente documento comprenden:

35

(i) una porción de unión a antígeno scFv;

(ii) un agente o porción no funcional del mismo; y

40

(iii) un miembro de un par de unión que puede interactuar con un miembro o un segundo semicuerpo, formando de este modo un par de heterodímeros pero no homodímeros.

En uso, se seleccionan al menos dos semicuerpos que tienen:

45

(i) porciones de unión a antígeno scFv dirigidas a diferentes antígenos sobre una célula objetivo;

(ii) un agente o porción no funcional del mismo de modo que si se unieran entre sí ambos semicuerpos, se forma un agente funcional; y

50

(iii) dos miembros de unión de modo que, cuando están muy próximos, ambos miembros pueden interactuar para formar un par de unión entre compañeros complementarios.

En una realización de la invención, la porción incompleta no funcional de un agente es un dominio Fc o una porción

funcional del mismo. En este caso, se usan dominios Fc complementarios, incompletos y no funcionales sobre cada semicuerpo. En otra realización, las porciones incompletas no funcionales son moléculas indicadoras distintas o porciones no funcionales complementarias de una única molécula indicadora. Las porciones no funcionales podrían ser una molécula citotóxica o una molécula indicadora o una molécula terapéutica. En otra realización más, el agente es funcional pero cuando ambos agentes están juntos, se produce un resultado particular (tal como una señal) en ausencia de un agente anterior.

Por tanto, el agente, cuando se reconstituye, puede tener propiedades citotóxicas, medicinales, terapéuticas o indicadoras de señalización.

Los semicuerpos tienen una serie de aplicaciones, incluyendo dirección citotóxica a células cancerosas o patógenos, detección selectiva de células tales como células cancerosas, células madre (embrionarias o adultas) o células infectadas con patógenos. Se puede facilitar la detección celular con FACS, citometría de flujo y microscopía fluorescente. Los semicuerpos también tienen aplicaciones en investigación tales como cromatografía de afinidad. Los semicuerpos también se pueden usar para detectar productos de células tales como proteínas o diferentes modificaciones fosforiladas o glucosiladas u otras modificaciones postraduccionales de las mismas. La detección de diferentes formas de proteínas es particularmente útil para diagnosticar o pronosticar estados de enfermedad o niveles de salud.

En relación con una realización, la formación del par de unión da como resultado la formación de un dominio Fc funcional o porción del mismo. En general, el dominio Fc corresponde a dominios C_H2 y C_H3 apareados y es la parte de un anticuerpo que interacciona con moléculas efectoras y células que llevan receptores de Fc. La unión de los dominios Fc incompletos para formar un dominio Fc funcional quiere decir que se forma una cantidad suficiente de Fc necesaria para interactuar con moléculas efectoras o receptores de Fc sobre las células. Aún puede representar un dominio Fc incompleto. La presente invención engloba, por lo tanto, el uso de dominios Fc completos o incompletos siempre que el dominio Fc sea funcional con respecto a la interacción con moléculas o células efectoras cuando dos semicuerpos se unen entre sí. Las moléculas inmunointeractivas individuales tienen dominios Fc incompletos no funcionales.

En una realización preferida, los dominios Fc incompletos no funcionales corresponden a las cadenas γ 2a y γ 2b. Cada semicuerpo, en una realización preferida, lleva una cadena γ 2a o bien una cadena γ 2b del dominio Fc.

Por lo tanto, se apreciará que en funcionamiento, se necesita un conjunto de al menos dos semicuerpos que sean complementarios con respecto a los dominios Fc y los miembros de unión y que tengan porciones de unión a antígeno dirigidas a diferentes antígenos, antígenos que se coexpresan sobre una célula objetivo.

En consecuencia, un semicuerpo puede comprender una primera, segunda y tercera porciones en las que:

dicha primera porción puede interactuar con un primer antígeno sobre una célula objetivo;

dicha segunda porción es un dominio Fc incompleto no funcional; y

dicha tercera porción es un miembro de un par de unión complementario;

en el que dicho semicuerpo puede formar un dominio Fc cuando el semicuerpo se une a un segundo semicuerpo complementario que comprende una porción que interacciona con otro antígeno sobre dicha célula objetivo.

El dominio Fc funcional es útil para mediar la ADCC de células objetivo.

Un conjunto de semicuerpos puede comprender un primer semicuerpo con primera, segunda y tercera porciones en las que:

dicha primera porción puede interactuar con un primer antígeno sobre una célula objetivo;

dicha segunda porción es un dominio Fc no funcional incompleto; y

dicha tercera porción es un miembro de un par de unión complementario; y

un segundo semicuerpo comprende una primera porción que puede interactuar con un antígeno diferente sobre dicha célula objetivo;

una segunda porción que, en combinación con la segunda porción del primer semicuerpo mencionado forma un dominio Fc funcional Fc; y

una tercera porción que es el miembro de unión complementario de dicho par de unión.

Un método para inducir selectivamente la citotoxicidad de una célula puede comprender poner en contacto células con el primer y segundo semicuerpos en el que dicho primer semicuerpo comprende una primera, segunda y tercera porciones en las que:

5 dicha primera porción puede interactuar con un primer antígeno sobre una célula objetivo;

dicha segunda porción es un dominio Fc incompleto no funcional; y

dicha tercera porción es un miembro de un par de unión complementario; y

10 dicho segundo semicuerpo comprende una primera porción que puede interactuar con un antígeno diferente sobre dicha célula objetivo;

15 una segunda porción que, en combinación con la segunda porción del primer semicuerpo mencionado forma un dominio Fc funcional Fc; y

una tercera porción que es el miembro de unión complementario de dicho par de unión;

20 administrados dichos semicuerpos durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para que se reconstituya un anticuerpo que contiene un Fc funcional y para mediar la lisis de dicha célula.

Aunque estos aspectos se refieren al dominio Fc como la porción funcional (es decir, el agente), se pueden emplear otros dominios citotóxicos tales como dominios apoptóticos o dominios de lisis de agentes que inducen la detención del ciclo celular, y dominios de moléculas terapéuticas.

25 Como alternativa a los dominios Fc incompletos, por lo tanto se pueden emplear dominios incompletos para moléculas citotóxicas, moléculas terapéuticas y moléculas indicadoras.

En consecuencia, un semicuerpo puede comprender una primera, segunda y tercera porciones en las que:

30 dicha primera porción puede interactuar con un primer antígeno sobre una célula objetivo;

dicha segunda porción es un dominio incompleto no funcional de molécula citotóxica o terapéutica o indicadora; y

35 dicha tercera porción es un miembro de un par de unión complementario;

en el que dicho semicuerpo puede formar una molécula funcional citotóxica o terapéutica o indicadora cuando el semicuerpo se une a un segundo semicuerpo complementario que comprende una primera porción que puede interactuar con otro antígeno sobre dicha célula objetivo;

40 una segunda porción que, en combinación con la segunda porción del primer semicuerpo mencionado forma un dominio Fc funcional Fc; y

una tercera porción que es el miembro de unión complementario de dicho par de unión.

45 El semicuerpo es, en efecto, una molécula modular o quimérica que tiene un primer, segundo y tercer módulos equivalentes a la primera, segunda y tercera porciones definidas anteriormente.

50 Un conjunto de semicuerpos también puede comprender un primer semicuerpo con primera, segunda y tercera porciones en las que:

dicha primera porción puede interactuar con un primer antígeno sobre una célula objetivo;

dicha segunda porción es una molécula no funcional, incompleta citotóxica o terapéutica o indicadora; y

55 dicha tercera porción es un miembro de un par de unión complementario; y

un segundo semicuerpo que comprende una primera porción que puede interactuar con un antígeno diferente sobre dicha célula objetivo;

60 una segunda porción que, en combinación con la segunda porción del primer semicuerpo mencionado forma una molécula funcional citotóxica o terapéutica o indicadora; y

una tercera porción que es el miembro de unión complementario de dicho par de unión.

65 Un método para detectar o dirigir selectivamente una célula puede comprender poner en contacto células con el

primer y segundo semicuerpos en el que dicho primer semicuerpo comprende una primera, segunda y tercera porciones en las que:

dicha primera porción puede interactuar con un primer antígeno sobre una célula objetivo;

5

dicha segunda porción es una molécula no funcional, incompleta citotóxica o terapéutica o indicadora; y

dicha tercera porción es un miembro de un par de unión complementario; y

10 dicho segundo semicuerpo comprende una primera porción que puede interactuar con un antígeno diferente sobre dicha célula objetivo;

una segunda porción que, en combinación con la segunda porción del primer semicuerpo mencionado forma una molécula funcional citotóxica o terapéutica o indicadora; y

15

una tercera porción que es el miembro de unión complementario de dicho par de unión.

En una realización de la invención, cada semicuerpo lleva una molécula indicadora tal como un colorante que, cuando los dos semicuerpos se reconstituyen conjuntamente, las moléculas indicadoras combinadas (por ejemplo, colorantes combinados) proporcionan una señal distintiva. Los ejemplos de colorantes incluyen colorantes fluorescentes tales como hidroxycumarina, aminocumarina, metoxicumarina, azul Cascade, amarillo Lucifer, NBD, ficoeritrina (PE), PerCP, aloficocianina, Hoechst 33342, DAPI, azul SYTOX, Hoechst 33258, cromomicina A3, mitramicina, YOYO-1, verde SYTOX, naranja SYTOX, 7-AAD, naranja de acridina, TOTO-1, To-PRO-1, naranja de tiazol, TOTO-3, TO-PRO-3, LDS 751, colorantes Alexa Fluor incluyendo Alexa Fluor-350, -430, -488, -532, -546, -555, -556, -594, -633, -647, -660, -680, -700 y -750; colorantes BoDipy, incluyendo BoDipy 630/650 y BoDipy 650/665; colorantes CY, en particular Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy 5,5 y Cy7; 6-FAM (fluoresceína); PE-Cy5, PE-Cy7, fluoresceína dT; hexaclorofluoresceína (Hex); 6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína (JOE); colorantes Oregon Green, incluyendo 488-X y 514; colorantes de rodamina, incluyendo X-rodamina, lisamina rodamina B, verde rodamina, rojo rodamina y ROX; TRITC, tetrametilrodamina (TMR); carboxitetrametilrodamina (TAMRA); tetraclorofluoresceína (TET); Rojo 6B, FluorX, BODIPY-FL y rojo Texas.

20

Un método para identificar selectivamente una célula puede comprender poner en contacto dicha célula con un par de semicuerpos en el que cada semicuerpo comprende una primera, segunda y tercera porciones en el que dichas primeras porciones pueden interactuar con uno o dos antígenos sobre la célula, dichas segundas porciones comprenden distintas moléculas indicadoras o porciones complementarias no funcionales de una única molécula indicadora y dichas terceras porciones son pares de unión complementarios, en el que después de la unión de los semicuerpos individuales con los dos antígenos, los pares de unión se combinan permitiendo que las moléculas indicadoras proporcionen una señal combinada o reconstituyan una única molécula indicadora.

25

40 En los aspectos anteriores, la porción de unión a antígeno se puede derivar de una inmunoglobulina o puede ser cualquier estructura de afinidad tal como pero sin limitación, dAb, nanocuerpos, microproteínas, fibronectinas, microcuerpos, anticualinas, aptámeros, darpinas, avímeros, aflinas, y dominios de Kunitz.

La administración puede ser secuencial o simultánea. La administración secuencial incluye la administración separada de ambos semicuerpos en nanosegundos, segundos, minutos, horas o días. La administración simultánea incluye la coadministración en una única composición o en dos composiciones separadas.

45

El sujeto puede ser un ser humano u otro primate, un animal de cría (por ejemplo, oveja, vaca, cerdo, caballo, burro, cabra), animales de laboratorio (por ejemplo, ratón, rata, conejo, cobaya), animal salvaje en cautiverio o especie aviar (por ejemplo, aves de corral, aves enjauladas, aves de aviario, aves de caza, aves salvajes en cautiverio). Un sujeto también se puede considerar un paciente.

50

La porción de unión a antígeno, en general, es un fragmento Fab recombinante. Este fragmento corresponde a los brazos de una molécula de anticuerpo que contiene las cadenas ligeras completas apareadas con los dominios V_H y C_H de las cadenas pesadas.

55

En general, la porción de unión a antígeno es una porción scFv de un anticuerpo. En general, los scFv son monoméricos aunque el grado de monomerismo en comparación con dimerismo o multivalentismo puede depender del tamaño del enlazador entre los dominios V_H y V_L. La construcción de moléculas de scFv se describe en Hudson (1999) *supra* y en Kortt *et al*, *Biomolecular Engineering* 18:95-108, 2001.

60

La presente invención se extiende a otras porciones de unión a antígeno de inmunoglobulinas tales como pero sin limitación, dAb, nanocuerpos, microproteínas, fibronectinas, microcuerpos, anticualinas, aptámeros, darpinas, avímeros, aflinas, y dominios de Kunitz u otras estructuras de afinidad tales como pero sin limitación microestructuras.

65

La porción de unión a antígeno es específica para un antígeno sobre la superficie o una subsuperficie co-continua con el entorno externo sobre una célula objetivo. La célula objetivo puede ser una célula cancerosa, una célula infectada por un patógeno o parásito u otra célula no deseada. Un patógeno incluye un microorganismo eucariota o procarionta incluyendo un parásito de la malaria. También incluye un virus. Además, una célula infectada víricamente puede expresar receptores derivados víricamente sobre su superficie. La dirección específica de una célula de este tipo puede dar como resultado la pérdida de células productoras de virus. Este podría ser un ejemplo de una célula no deseada.

La presente invención es particularmente útil en la generación de agentes terapéuticos para células cancerosas objetivo incluyendo subconjuntos de leucocitos. En general, las células cancerosas se definen por la expresión de antígenos CD particulares. Sin embargo, la dirección de un único antígeno CD puede provocar un daño colateral a células sanas que llevan el mismo antígeno CD. Se propone que se resuelva este problema por la presente invención ya que un único tipo de semicuerpo solo no podría inducir ADCC ni CDC debido a la ausencia de un dominio Fc funcional y a una incapacidad para entrecruzarse. Sin embargo, cuando se usan dos semicuerpos que tienen miembros de unión complementarios que se dirigen a dos antígenos CD diferentes u otros antígenos presentes sobre una célula cancerosa, entonces sólo las células con este par inusual de moléculas de superficie se dirigen citotóxicamente después de que se hayan unido ambos semicuerpos. Una vez unidos, el antígeno CD se moverá libremente en las dos dimensiones de la bicapa lipídica y finalmente los semicuerpos estarán muy próximos entre sí. En ese punto, los miembros del par de unión interactúan dando como resultado un par de unión y los dos dominios Fc incompletos forman un dominio Fc funcional. La citotoxicidad selectiva se induce ahora para esa célula. La esencia de este aspecto de la presente invención es la combinación inusual de moléculas de superficie que corresponden a células no deseadas o cancerosas particulares u otras células objetivo.

Con respecto al tratamiento del cáncer, son particularmente preferentes los antígenos CD tales como dos o más antígenos CD seleccionados de los enumerados en la tabla 2.

Tabla 2

Resumen de antígenos CD	
Denominación CD	Cáncer hematológico
CD5 + CD19/CD20	leucemia linfocítica crónica (CLL)
CD19/CD20 + κ (o λ)	se dirigiría a la mayoría de las poblaciones de linfocitos clonales
CD19/CD20 + CD10	linfoma no hodgkiniano folicular (NHL)
CD19/CD20 + bcl-2	linfoma folicular (FL) CLL
CD103 + CD22 (o CD25) (o CD19)	leucemia de células pilosas (HCL)
CD4 + CD8	leucemia linfocítica aguda de linfocitos T (T-ALL) ("timocito cortical")
CD8 + CD57	leucemia de linfocitos granulares grandes/células NK
CD10 + CD34	ALL pre-B
CD34 + marcador mielóide (es decir, CD13 o CD33)	leucemia mielógena aguda (AML)
CD117 (c-kit) + marcador mielóide	AML
CD13 o CD33 (My) + CD14 (Mo)	leucemias
CD41 o CD61 + CD33	leucemias megacariocíticas

Los compañeros de unión pueden constituir cualquiera de un número de entidades que pueden interactuar entre sí para formar una asociación o enlace. En la presente invención, los compañeros de unión pueden ser porciones complementarias de una cremallera de leucina, un receptor-ligando (por ejemplo citocina y receptor de citocinas), actina y una proteína de unión a actina o aptámeros de ADN. La naturaleza real de los pares de unión no es crítica para la presente invención siempre que después de la unión en dos dimensiones de forma muy próxima, ambos miembros del par de unión formen una asociación o enlace.

En una realización preferida, los pares de unión comprenden porciones complementarias de una cremallera de leucina. Las secuencias de aminoácidos de cremallera de leucinas se muestran en la tabla 3. La heterodimerización se produce entre, por ejemplo, SEQ ID NO:1 y 2, SEQ ID NO:3 y 4, y SEQ ID NO:3 y 5. La longitud de la cremallera de leucina u otras porciones de unión complementarias incluyen, pero sin limitación, de 10 aminoácidos a 100 aminoácidos tales como 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64,

ES 2 413 493 T3

65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 aminoácidos.

Tabla 3

Secuencia de cremallera de leucina	
SEQ ID NO:	SECUENCIA
1	LEI EAAFLEQ ENTALET EVAELEQ EVQRLEN EVSQYET RYGPLGGGK
2	KGGGLEI RAAFLRR RNTALRT RVAELRQ RVQRARN RVSQYRT RYGPL
3	LEI RAAFLRQ RNTALRT EVAELEQ EVQRLEN EVSQYET RYGPLGGGK
4	KGGGLEI EAAFLER ENTALET RVAELRQ RVQRARN RVSQYRT RYGPL
5	LEI EAAFLER ENTALET RVAELRQ RVQRLRN RVSQYRT RYGPLGGGK
6	GGTACCGATGATGATGATAAACAGGTGCAGCTGGTTGAAAGCGGCGGTTGGTCTGGTTTCAG CCGGGTGGCTCTCTGAAACTGAGCTGCGCGGGCTGGCTTTGATTTTAGTCGTTATTGG ATGAGCTGGGTTTCGTCAGGCACCGGGTAAAGGCCTGGAATGGATTGGCGAAATTAATCCG ACGAGTAGCACCATTAATTTTACCCGAGCCTGAAAGATAAAAGTGTTCATTAGCCGTGAT AACGCGAAAAACACCCTGTACCTGCAGATGAGTAAAAGTTCGCAGCGAAGATACCGCCCTG TATTATTGCGCACGTGGTAACTATTACCGTTACGGCGATGCCATGGATTATTGGGGTCAG GGCACCACTGTACCGTTAGCAAAATTAGCGGCGGGTGGTAGCGGTGGCGGTGGCAGC GCGGTGGCGGCAGCGGTGGTGGCGGTAGCGGCGGGTGGTTCTAGTGATATCGTGCTG ACCAGAGTCCGGCGAGCCTGGCCGTTTCTCTGGGTCAAGCGTGAACCATCAGCTGCCGC GCGAGCAAAAGTGTGAGCACCTCTGGTTATTCTTATCTGCATTGGTATCAGCAGAAACCG GGCCAGCCCGGAAACTGCTGATTTATCTGGCGTCTAATCTGGAATCTGGCTGCCGGCG CGCTTCAGCGGTTCTGGCAGTGGCACCGATTTTACCCTGAACATTCATCCGGTGGAAAGAA GAAGATGCCGCCACCTATTACTGCCAGCATAGCCGTGAACTGCCGTTTACCTTTGGCAGC GGTACGAAACTGGAAATCAAAGTCGACGGTGGTGGTGGTCTGGTGGTGGTGGTAGCGGT GGCGGTGGTAGCGGTGGTGGCAGATCTATGGTCAGCAAAGGCGAAGAAAACAACATGGCA ATCATCAAAGAATTTATGCGTTTTAAAGTTCGCATGGAAGGCAGCGTTAACGGCCATGAG TTTGAAATCGAAGGCGAAGGTGAAGGCCGCTTATGAAGGCTTCAGACTGCTAAACTG AAAGTCACAAAAGGCGGTCCGCTGCCTTTTGCATGGGATATTCTGAGCCCTCAATTTACA TACGGCAGCAAAGCGTATGTTAAACATCCGGCTGATATCCCTGATTATTTAAGCTGTCT TTTCCGGAAGGCTTTAAGTGGGAACGTGTGATGAACTTCGAAGATGGGGGGTGTGACC GTGACCCAGGATTCATCTCTGCAGGATGGAGAATTTATTTATAAGGTAAAACCTGCGTGGC ACGAATTTCCCTAGCGATGGCCAGTGTGATGCAGAAAAAGACCATGGGTTGGGAAGCTAGC TCTGAACGTATGTATCCGGAGGATGGCGCTCTGAAAGGCGAGATCAAAATGCGTCTGAAA CTGAAAGATGGTGGCCACTATACGTCCGAAGTAAAAACGACCTACAAAGCAAAAAAGCCG GTTCAGCTGCCGGTGCATATATTGTCGGGATTAAACTGGATATTACAAGCCATAATGAA GATTATACGATGTGGAGCAATATGAACGTGCGGAAGGCCGCCACAGTACGGGTGGTATG GATGAACTGTACAAACTCGAGGGTGGTGGTGGTAGCGGTGGTGGTGGTCTGGTGGTGGC GGTAGCGGTGGCGGTACTAGTGAATTAGCGCCCTGGAAAAAGAAATCAGCGCGCTGGAA AAAGAAATTAGCGCGCTGGAAAAAGCGAGCTAATAAGAATTC

<p>7</p>	<p>GGTACCGACGACGACGACAAGATGGATGTGGTGTGATGACCCAGACCCCGGCGAGCCTGAGC GCGAGCGTGGGCGAAACCGTGACCATTACCTGCCGTGCGAGCGGCAGCATTTCATAACTAT CTGGCGTGGTATCAGCAGAAACTGGGTAAGCCCGCAGCTGCTGGTGTATAACGCGAAA ACCCTGGCGGATGGTGTGCCGAGCCGTTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCCAGTTTAGC CTGAAAATTAACAGCCTGCAGCCGGAAGATTTTGGCAGCTATTATTGCCAGCATTTTTGG AGCATTCCGTGGACCTTTGGTGGTGGCACCAACTGGAAGTGAACAGTGGTGGCGGTGGT GGCGGCGGTGGTAGCGGTGGCGGCGGCAGCGGTGGCGGTGGCAGCCAGGTGCAGCTGCAG CAGAGCGGCACCGAACTGGTGAACCCGGTGGCGAGCGTGAAAATGAGCTGCAAGCGGAGC GGCTTTACCTTTACCGATTATAATATGCATTGGGTGAAACAGACCCCGGTCAGGGCCTG GAATGGATTGGCGGATTTATCCGAAAACGGCGATACCAGCTATAACCAGCGCTTTAAA GGCAAAGCGACCCTGACCGCGGATAAAAGCTTTAGCACCGGTATATGCATCTGAGCAGC CTGACCAGCGAAGATACCGCGGTGTATTTTGGCGCGCTTTTTATTATTATGGCAGCTAT TATGGCGCGCTGGATTATTGGGGCCAGGGCACCAGCGTGACCGTGAGCAGCGATAGCGGC GCGGAATTTGAAGTCGACCGTGGTGGCGGTCTGGTGGTGGTGGTAGCGGTGGTGGTGGT AGCGGCGGTGGTAGATCTATGAGCAAAGCGAAGAAGTGTACCAGCGCTTGTCCGATC CTGGTGGAACTGGATGGCGATGTGAATGGCCATAAATTTAGCGTTAGCGGCGAAGGCGAA GGCGATGCCACCTATGGCAAACCTGACCCGAAATTCATTTGCACCACCGGTAACCTGCCG GTGCCGTGGCCGACCCTGGTGACCACCTTAGCTATGGTGTGATGGTGTTAGCCGTAT CCGATCATATGAAACAGCATGATTTCTTTAAAAGCGCGATGCCGAAGGCTATGTGCAG GAACGTACCATTTCTTTAAAGATGATGGCAATTATAAAACCCGTGCGGAAGTAAAATTT GAAGGTGATAACCTGGTGAACCGCATGAACTGAAAGGCATTGATTTTAAAGAAGATGGT AATATCCTGGGCCACAACTGGAATATAATATAATAGCCATAATGTGTATATTATGGCG GATAAACAGAAAATGGCATCAAAGCGAACTTCAAATTCGCCATAATATTGAAGATGGT GGTGTGCAGCTGGCGGATCATTATCAGCAGAATACCCCGATTGGCGATGGCCCGTTCTG CTGCCGGATAACCATTATCTGAGCATTACAGAGCGCGCTGAGCAAAGATCCGAATGAAAA CGTGATCACATGGTTCTGCTGGAATTTGTGACCGCGGCGGATACCCATGGTATGGAT GAACTGTATAAACTCGAGGGTGGTGGTGGTCTGGTGGTGGTGGTAGCGGCGGCGGTGGT AGCGGTGGTGGTACTAGTAAATTAGCGCGCTGAAAGAAAAAATTAGCGCCCTGAAAGAA AAAATCAGCGCGCTGAAAGAAGCGAGCTAATAAGAATTC</p>
<p>8</p>	<p>GGGGS GGGGS GGGGS GGG</p>
<p>9</p>	<p>MSDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWCGPCKMIAPILDEIADEY QGLKLTVAKLNI DQNPGTAPKYGIRGIPTLLLFKNGEVAATKVGALSSKQL KEFLDANLAGSGSGHMHHHHSSGLVPRGSGMKETAAAKFERQHMDSPD LGTDDDDKQVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDFSRYWMSWVRQAPG KLEWIGEINPTSSTINFTPSLKDKVFISRDNAKNTLYLQMSKVRSEDTA LYYCARGNYRYGDAMDYWGQTSVTVSKISGGGGSGGGSGGGSGGGG SGGGGSSDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYLHWYQOK PGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEDAATYYCQ HSRELPFTFGSGTKLEIKvdGGGGSGGGSGGGSGGGrsmVSKGEENNM AIIKEFMRFKVRMEGSVNGHEFEIEGEGEGRPYEGFQTAKLKVTKGGPLP FAWDILSPQFTYGSKAYVKHPADIPDYFKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVV TVTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPSDGPVMOQKKTMGWEASSERMYPEDG ALKGEIKMRLKLDGGHYTSEVKTTYKAKKPVQLPGAYIVGIKLDITSHN EDYTIVEQYERAEGRHSTGGMDELYKleGGGGSGGGSGGGSGGGTSEI SALEKEISALEKEISALEKAS</p>

x e y son compañeros de unión que pueden formar una asociación o unirse entre sí en la que los pares de unión comprenden porciones complementarias de una cremallera de leucina, un par receptor-ligando, actina y una proteína de unión a actina o aptámeros de ADN;

- 5 (Mo^I)_i y (Mo^{II})_i son cada uno porciones de una molécula indicadora que pueden formar un indicador funcional después de la unión de x e y; y

scFv(Ag¹) y scFv(Ag²) son fragmentos variables monocatenarios que tienen especificidad por dos antígenos (Ag) diferentes, Ag¹ o Ag².

- 10 Con relación a las fórmulas anteriores, el scFv se puede reemplazar por otra porción de unión a antígeno de una inmunoglobulina o cualquier estructura de afinidad tal como pero sin limitación dAb, nanocuerpos, microproteínas, fibronectinas, microcuerpos, anticalinas, aptámeros, darpinas, avímeros, aflinas, y dominios de Kunitz.

- 15 Los semicuerpos pueden estar en diferentes composiciones o en la misma composición. Como se establece anteriormente, se contemplan envases farmacéuticos con compartimentos múltiples en los que los semicuerpos se mezclan antes de su uso.

- 20 Puede ser necesario desinmunizar los semicuerpos de la presente invención antes de su administración. El término "desinmunizado" incluye, con relación a seres humanos, la humanización. Se puede usar cualquier técnica de desinmunización incluyendo generación de anticuerpos quiméricos o inserción de CDA en un anticuerpo.

- 25 La composición de este aspecto también puede incluir uno o más vehículos y/o diluyentes farmacéuticos. La preparación de composiciones farmacéuticas se describe bien en la técnica, tal como Remington's Pharmaceutical Sciences; 18ª ed. (Mack Publishing Company, Easton, PA, EE. UU., 1990). Como se establece anteriormente, una realización particularmente útil se refiere a semicuerpos específicos para antígenos CD sobre células cancerosas. Convenientemente, los repertorios de los antígenos CD expresados por células cancerosas se determinan por una micromatriz de anticuerpos CD.

- 30 Una micromatriz particularmente útil se divulga en la solicitud de patente internacional n.º PCT/AU99/01156 (documento WO 00/39580).

- 35 Una vez se ha determinado el patrón de expresión de antígeno CD, los semicuerpos específicos para los dos antígenos CD que ese expresan sobre las células objetivo, por ejemplo células cancerosas, pero no comúnmente sobre células sanas se seleccionan y se usan en tratamiento, por ejemplo en tratamiento del cáncer.

Se puede adoptar un enfoque similar para dirigir otras células tales como células infectadas víricamente.

- 40 En una realización alternativa, la porción Fc comprende partes de una molécula indicadora. Cuando dos semicuerpos están muy próximos, se reconstituye una molécula indicadora funcional que puede dar una señal identificable. Esto permite el diseño de agentes de diagnóstico e imagen altamente específico.

- 45 Un semicuerpo puede comprender una porción de un fármaco u otro agente terapéutico que se reconstituye cuando se une un par de semicuerpos. El fármaco o agente terapéutico también se puede internalizar.

- 50 Un método para diagnosticar cáncer en un sujeto puede comprender poner en contacto dicha célula con un par de semicuerpos en el que cada semicuerpo comprende una primera, segunda y tercera porciones en el que dichas primeras porciones pueden interaccionar con uno o dos antígenos específicos de cáncer sobre la célula, dichas segundas porciones comprenden distintas moléculas indicadoras o porciones complementarias no funcionales de una única molécula indicadora y dichas terceras porciones son pares de unión complementarios, en el que después de la unión de los semicuerpos individuales con los dos antígenos, los pares de unión se combinan permitiendo que las moléculas indicadoras proporcionen una señal combinada o reconstituyan una única molécula indicadora. La primera porción puede ser una porción de unión a antígeno de una inmunoglobulina u otra estructura de afinidad tal como pero sin limitación dAb, nanocuerpos, microproteínas, fibronectinas, microcuerpos, anticalinas, aptámeros, darpinas, avímeros, aflinas, y dominios de Kunitz.

- 55 Un método para detectar una molécula objetivo puede comprender poner en contacto una muestra que comprende supuestamente dicha molécula objetivo con un par de semicuerpos en el que cada semicuerpo comprende una primera, segunda y tercera porciones en el que dichas primeras porciones pueden interaccionar con un epítipo específico de molécula diana, dichas segundas porciones comprenden distintas moléculas indicadoras o porciones complementarias no funcionales de una única molécula indicadora y dichas terceras porciones son pares de unión complementarios, en el que después de la unión de los semicuerpos individuales con los dos epítopos, los pares de unión se combinan permitiendo que las moléculas indicadoras proporcionen una señal combinada o reconstituyan una única molécula indicadora. Preferentemente, la molécula objetivo es un producto celular tal como una proteína incluyendo una proteína modificada postraduccionalmente. Los ejemplos incluyen una proteína fosforilada o glucosilada. Dichas proteínas o su nivel de modificación postraduccionales pueden ser indicativas de un estado de

enfermedad o nivel de salud.

La presente invención se describe adicionalmente por los siguientes ejemplos no limitantes.

5 En los ejemplos, se emplearon los siguientes materiales y métodos:

Materiales

10 Se adquirió medio RPMI 1640 (modificación Hepes) de Sigma Aldrich (Castle Hill, NSW, Australia). Gentamicina (50 mg de sulfato de gentamicina/ml), L-glutamina (200 mM) y suero fetal bovino (FCS) eran de Invitrogen (Mulgrave, Victoria, Australia).

Diseño de semicuerpos

15 Las secuencias de proteínas (figuras 1A y B) se derivaron de:

- la variante de dsRED de proteínas de fluorescencia (FP) mOrange (Shaner *et al*, *Nature Biotechnology* 22:1567-1572, 2004) y la variante de GFP T-Sapphire (Zappater-Hommer y Griesbeck, *BMC Biotechnol* 3:5, 2003);

20 • un scFV CD45 (Lin *et al*, *Cancer Res* 66:3884-92, 2006);

- un scFV CD20 (Shan *et al*, *J. Immunol* 162:6589-95, 1999); y

25 • cremalleras de leucina artificiales (LZ) ISAL E3 y ISAL K3 (Litowski y Hodges, *J. Biol. Chem.* 277:37272-37279, 2002).

Los semicuerpos se diseñaron como scFV-enlazador-FP-enlazador-LZ, en las siguientes disposiciones:

- Semicuerpo A (DBA; CD45-mOrange-E3); y

30

- Semicuerpo B (DBB; CD20-Sapphire-K3).

Los enlazadores fueron (GGGGS GGGGS GGGGS GGG glicina serina) [SEQ ID NO:8]. Un único sitio de endonucleasa de restricción de 6 pb colocado en cada lado de cada enlazador en el nivel génico dio lugar a pares de residuos adicionales.

35

Síntesis génica de semicuerpos, expresión de proteínas y purificación

Las secuencias génicas se diseñaron basándose en estas secuencias de proteínas usando preferencias de codones de *E. coli*.

40

Concentraciones de proteínas

Las concentraciones de proteínas se estimaron a $A_{280\text{ nm}}$ usando coeficientes de extinción teóricos de Ab 0,1% de 1,26 y 1,21 para Trx-DBA y Trx-DBB, respectivamente.

45

SEC/MALLS

Los estados de agregación de las proteínas se evaluaron por SEC/MALLS (cromatografía de exclusión por tamaño monitorizada por dispersión de luz láser multiángulo). Se filtraron las muestras usando un filtro de 0,22 μM y se sometieron a SEC en un Äkta Basic (GE Healthcare) usando una columna Superose-6 (GE Healthcare) usando un caudal de 0,4 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Además de monitorizar la absorbancia a (215 nm, 280 nm y 400 o 550 nm), se monitorizaron el índice de refracción de la muestra y los datos de dispersión en tres ángulos diferentes por un refractómetro interferométrico Optilab DSP en línea e instrumentos MiniDawn (Wyatt). Se usó BSA como estándar de calibración.

55

Análisis de fluorescencia

Se midieron experimentos de fluorescencia en un espectrofotómetro de fluorescencia Cary Eclipse (Varian Inc., Palo Alto, CA). Se usaron proteínas (0,1-0,9 mg/ml) en Tris-HCl (100 mM) NaCl (50 mM), pH 8,5 que contenía glicerol al 5 % v/v (0,1 % v/v) 5 mm manteniendo un volumen de $\sim 250\ \mu\text{l}$. Se midieron la fluorescencia de T-Sapphire y FRET por excitación a 400 nm, y los espectros de emisión de fluorescencia registrados de 450-600 nm, usando anchuras de rendija de 10 nm. Se midió la fluorescencia de mOrange por excitación a 510 nm y los espectros de emisión de fluorescencia registrados de 550-650 nm, usando anchuras de rendija de 10 nm. Se registraron barridos a una tasa de 60 $\text{nm}\cdot\text{min}^{-1}$. Se procesaron los datos usando el Scan Software v.1.1.

65

Líneas celulares y su cultivo

Las células MEC1 se obtuvieron del Dipartimento di Scienze Biomediche e Oncologia Umana, Università di Torino, Ospedale Mauriziano Umberto 1°, Italia. Las células Raji (linfoma de Burkitt de linfocitos B) y las células CCRF-CEM (leucemia linfocítica aguda de linfocitos T) fueron de la American Type Culture Collection (Manassas, VA, EE. UU.). Se hicieron crear las líneas celulares en medio RPMI 1640 complementado con FCS al 10% v/v, 50 µg/ml de gentamicina y L-glutamina 2 mM a 37 °C en una atmósfera no humidificada. Se cultivaron muestras de cultivos celulares (10 ml) a una densidad de 8×10^5 células/ml por centrifugación (600 g, 10 min, 4 °C), se lavaron en un volumen igual de solución de Hank y se resuspendieron en solución de Hank para la interacción de uno o ambos semicuerpos.

Citometría de flujo

Se lavaron dos veces las células (2×10^6) en PBS y se resuspendieron en 2,0 ml de tampón FACS (PBS con suero fetal bovino al 5% v/v, FCS). Se mezclaron alícuotas (300 µl, 3×10^5 células) con el semicuerpo (~200 µg/ml, 20 µl) y se incubaron a temperatura ambiente, en la oscuridad, durante una hora. Se analizaron las muestras en un citómetro de flujo LSR II (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.). Se recogieron los datos y se analizaron usando LSR software (Becton Dickenson). Se recogieron los datos desde un mínimo de 10.000 acontecimientos.

Ejemplo 1Generación de semicuerpos

Se sintetizaron los genes que codifican DBA y DBB (esquemas 1 y 2) y se clonaron en el vector pET32a para generar pET32a-30103s1, y pET32a-30103s2. Después de la transformación en BL-21(DE3) de *E. coli*, se seleccionaron varias colonias de cada transformación, y se probaron para determinar la expresión de proteínas. Se tomó la aparición de una banda a ~ 78 kDa de una muestra inducida para representar la expresión exitosa de las proteínas y se usaron colonias que expresaron altamente (colonia 5 para pET32a-30103s2, y colonia 3 para pET32a-30103s2) en experimentos de expresión sucesivos (figuras 2A, B). En ambos casos, las proteínas se expresaron como cuerpos de inclusión de modo que después de la expresión a gran escala (1 l), las proteínas se purificaron por cromatografía de afinidad de metal bajo condiciones de desnaturalización, y se replegaron para proporcionar una concentración de proteína final de 0,1 y 0,9 mg/ml para Trx-DBA y Trx-DBB, respectivamente. Las proteínas replegadas eran puras al ~80% a juzgar por SDS-PAGE (figura 2C).

Esquema 1: Secuencia de ADN de 30103 S1 sintética

```
GGTACCGATGATGATGATAAACAGGTGCAGCTGGTTGAAAGCGGCGGTGGTCTGGTTTCAG
CCGGGTGGCTCTCTGAAACTGAGCTGCGCGGCGTCTGGCTTTGATTTTAGTCGTTATTGG
ATGAGCTGGGTTCGTCAGGCACCGGGTAAAGGCCTGGAATGGATTGGCGAAATTAATCCG
ACGAGTAGCACCATTAATTTTACCCCGAGCCTGAAAGATAAAGTGTTCATTAGCCGTGAT
AACGCGAAAAACACCCTGTACCTGCAGATGAGTAAAGTTCGCAGCGAAGATACCGCCCTG
TATTATTGCGCACGTGGTAACCTATTACCGTTACGGCGATGCCATGGATTATTGGGGTCAG
GGCACCAGTGTACCCTTAGCAAATTAGCGGCGGCGGTGGTAGCGGTGGCGGTGGCAGC
GGCGGTGGCGGCAGCGGTGGTGGCGGTAGCGGCGGCGGTGGTCTAGTGATATCGTGCTG
ACCCAGAGTCCGGCGAGCCTGGCCGTTTCTCTGGGTGAGCGTGCAACCATCAGCTGCCGC
GCGAGCAAAGTGTGAGCACCTCTGGTTATCTTATCTGCATTGGTATCAGCAGAAACCG
GGCCAGCCCGCGAAACTGCTGATTTATCTGGCGTCTAATCTGGAATCTGGCGTGCCGGCG
CGCTTCAGCGGTTCTGGCAGTGGCACCAGATTTTACCCTGAACATTCATCCGGTGGAAGAA
GAAGATGCCGCCACCTATTACTGCCAGCATAGCCGTGAACTGCCGTTTACCTTTGGCAGC
GGTACGAAACTGGAAATCAAAGTGCACGGTGGTGGTGGTCTGGTGGTGGTGGTAGCGGT
GGCGGTGGTAGCGGTGGTGGCAGATCTATGGTCAGCAAAGGCGAAGAAAACAACATGGCA
ATCATCAAAGAATTTATGCGTTTTAAAGTTCGCATGGAAGGCAGCGTTAACGGCCATGAG
TTTGAAATCGAAGGCGAAGGTGAAGGCCGCTCTTATGAAGGCTTCCAGACTGCTAAACTG
AAAGTCACAAAAGGCGTCCGCTGCCTTTTGCATGGGATATTCTGAGCCCTCAATTTACA
TACGGCAGCAAAGCGTATGTTAAACATCCGGCTGATATCCCTGATTATTTTAAGCTGTCT
TTTCCGGAAGGCTTTAAGTGGGAACGTGTGATGAACTTCGAAGATGGGGGGTGTGACC
GTGACCCAGGATTCATCTCTGCAGGATGGAGAATTTATTTATAAGGTAAAACCTGCGTGGC
ACGAATTTCCCTAGCGATGGCCAGTGTATGCAGAAAAGACCATGGGTGGGAAGCTAGC
TCTGAACGTATGTATCCGGAGGATGGCGCTCTGAAAGGCGAGATCAAAATGCGTCTGAAA
```


y son solubles. Por tanto, se usó fluorescencia relativa para calcular la concentración aproximada de proteína activa en cada muestra. Se evaluaron las propiedades de fluorescencia de una muestra de 1 μM de una proteína de fusión eGFP conocida. Cuando se usó una longitud de onda de excitación de 430 nm (próxima al máximo de excitación de fluorescencia) la muestra mostró una fuerte emisión de fluorescencia a ~ 510 nm (figura 5). Esto se comparó con las propiedades de fluorescencia de las muestras de TRX-DBA y TRX-DBB registradas bajo condiciones similares (figura 4). La señal del máximo de fluorescencia en cada caso fue del $<10\%$ de la eGFP. Como las concentraciones de esas proteínas fueron de $\sim 1,5 \mu\text{M}$ y $\sim 15 \mu\text{M}$, respectivamente, era probable que las preparaciones replegadas de Trx-DBA y Trx-DBB contenían proteína replegada apropiadamente al $\leq 8\%$ y $\leq 0,5\%$, respectivamente.

10 *Fraccionamiento de sulfato de amonio*

Debido a que la mayoría de la proteína de DBA y DBB estaba plegada incorrectamente, la muestra total (~ 30 ml) de cada semicuerpo se sometió a fraccionamiento con sulfato de amonio con saturación del 60%. El AS sólido se añadió gota a gota a la solución de semicuerpos diluida y se disolvió triturando con una varilla de vidrio. Entonces, se dejaron las soluciones durante 30 min en hielo. Se recogió la precipita precipitada por centrifugación (10.000 g, 30 min, 4 °C), se secó cuidadosamente el interior del tubo y se redisolvió la proteína en 0,5 ml de PBS, de nuevo con trituración usando una varilla de vidrio. Se retiró el material insoluble, probablemente semicuerpo inactivo desnaturalizado, por centrifugación (10.000 g, 30 min, 4 °C). Se retiró el sulfato de amonio residual en estas soluciones de semicuerpos concentradas por intercambio de tampón usando concentradores de centrifuga Centricon. Los resultados citométricos de flujo obtenidos con estas soluciones de semicuerpos fraccionados y concentrados mostraron una retirada significativa de proteína inactiva en esta etapa.

Transferencia de energía por resonancia Förster

25 En ausencia de células a las que se unen tanto DBA como DBB, a concentraciones de proteínas inferiores a 10^{-5}M^{-1} , no se debería observar FRET. Se registró el espectro de emisión de una mezcla de TRX-DBA y TRX-DBB (figura 6). Fue esencialmente idéntica a la de TRX-DBB, que no muestra indicación de FRET (lo que se demuestra por una disminución en la intensidad del pico de emisión a 510 nm y la aparición de un pico adicional a ~ 560 nm).

30 *Análisis de fluorescencia de células marcadas con semicuerpos por citometría de flujo*

Se cultivaron suspensiones de líneas celulares humanas Raji ($\text{CD}20^+$, $\text{CD}45^+$), MEC-2 ($\text{CD}20^+$, $\text{CD}45^+$), CCRF-CEM ($\text{CD}20^-$, $\text{CD}45^+$) (500 g, 10 min, temperatura ambiente), se lavaron con PBS + FCS al 5% v/v, se centrifugó y se resuspendió en PBS + FCS al 5% v/v hasta una concentración final de 1×10^6 células/ml. Para las células marcadas con uno o ambos semicuerpos, se incubaron 300 μl de suspensión celular (3×10^5 células) con 30 μl de semicuerpo (200 $\mu\text{g/ml}$, semicuerpo A (DBA; CD45-mOrange-E3), semicuerpo B (DBB; CD20-T-Sapphire-K3)) durante 60 min en la oscuridad a temperatura ambiente. Basándose en los inmunofenotipos conocidos de estas líneas celulares, se esperaron los siguientes patrones.

DBA	CD45-mOrange-E3	unión a Raji, MEC-2, CCRF-CEM
DBB	CD20-T-Sapphire-K3	unión a Raji, MEC-2

40 Después de la incubación, se analizaron las células marcadas por citometría de flujo usando un Becton Dickinson LSR II. La longitud de onda para la detección de la emisión se enumera seguido de la anchura de banda del filtro.

	DBA (mOrange)	DBB (T-Sapphire)	DBA+DBB FRET
Excitación	488 nm	407 nm	407 nm
Emisión	575/26 nm	525/50 nm	585/42 nm

45 Los resultados obtenidos usando citometría de flujo se resumen en la tabla 4. El desplazamiento de más de 7 veces en la fluorescencia media detectada a 575 nm (números en rojo) indica la unión de DBA a las tres líneas celulares como se esperaba, puesto que expresan CD45 que se une a DBA. Se detectó un desplazamiento menor en la fluorescencia para la unión de DBB en células Raji y MEC-2. Se detectó una señal FRET menor para la línea celular d de Raji. Estos datos también se presentan en la tabla 5 como una proporción con valores de fluorescencia para las células solas. La presencia de unión y FRET para combinaciones de células y semicuerpos se resume en la tabla 6.

55 Los datos (tablas 4-6) muestran que DBA (CD45-mOrange-E3) se une fuertemente a las 3 líneas celulares, ya que todas expresan el marcador panleucocitario, CD45. Los datos también muestran una unión significativamente mayor de DBB (CD20-T-Sapphire-K3) para células Raji y MEC-2 que expresan el marcador B-linfoide, CD20. Se observó FRET significativa para Raji + DBA + DBB, pero no para MEC-2. Esta discrepancia podría deberse a la menor expresión de CD20 en MEC-2, y a la baja proporción de DBB activos en la preparación actual. La excitación de (células Raji + DBA + DBB) con luz de 407 nm proporcionó FRET con luz emitida a la longitud de onda de 585 nm. Esta FRET sólo se puede explicar por combinación de DBA y DBB en la superficie de células Raji por medio de las

cremalleras de leucina complementarias incluidas en las construcciones (figuras 1A y B). No se observó dicha FRET para DBA + DBB con células omitidas (figura 6).

Tabla 4

Análisis de citometría de flujo de células marcadas con semicuerpos

La fluorescencia media se proporciona para combinaciones de células y semicuerpos en las longitudes de onda indicadas. La fluorescencia de T-Sapphire en DBB (CD20-T-Sapphire-K3) está destacada en azul, la fluorescencia de mOrange en DBA (CD45-mOrange-E3) en naranja, y la transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) en rojo.

Excitación/emisión	407/525 nm	488/575 nm	407/585 nm
Línea celular/semicuerpo	unión de DBB	unión de DBA	FRET
Células Raji	222	218	998
Raji+DBA	293	1678	1399
Raji+DBB	380	306	1408
Raji+DBA+DBB	387	1301	1551
Células MEC-2	210	247	929
MEC-2+DBA	242	1926	1139
MEC-2+DBB	375	307	1231
MEC-2+DBA+DBB	335	1416	1239
Células CCRF-CEM	280	323	1261
CCRF-CEM+DBA	289	2411	1414
CCRF-CEM+DBB	379	384	1360
CCRF-CEM+DBA+DBB	389	1623	1454

5

Tabla 5

Análisis de citometría de flujo de células marcadas con semicuerpos

Los valores para la fluorescencia se expresan como proporciones de (células + semicuerpo)/(células) como se indica usando los datos de la tabla 4.

Línea celular	Unión de DBB	Unión de DBA	FRET
	Proporción de la fluorescencia media (células + semicuerpo/células)	Proporción de la fluorescencia media (células + semicuerpo/células)	Proporción de la fluorescencia media (células + semicuerpo/células)
Raji	1,7	7,7	1,6
MEC-2	1,8	7,8	1,3
CCRF-CEM	1,4	7,5	1,2

Tabla 6

Análisis de citometría de flujo de células marcadas con semicuerpos

La observación de la unión de un semicuerpo a una línea celular particular está indicada por +/-notación con FRET hallada sólo para células Raji con DBA + DBB, usando los datos de la tabla 4. ++ unión fuerte de semicuerpo a la célula, + unión de semicuerpo a la célula, +/- unión débil de semicuerpo a la célula (fondo).

Línea celular	Unión de DBB	Unión de DBA	DBA + DBB FRET
Raji	+	++	Sí
MEC-2	+	++	No
CCRF-CEM	+/-	++	No

10 **Ejemplo 2**

Expresión y purificación

Subclonación de 30103 S1 en el vector pET32

- 5 (1) Se sintetizó el gen de 30103 S1 y se clonó para el vector pET32 usando Kpn I y Hind III.
(2) El clon resultante pET- 30103 S1 se verificó por secuenciación de ADN.

10 Transformación de BL-21(DE3) de *E. coli*

- (3) Se transformaron cinco nanogramos del plásmido pET-30103 S1 en BL-21 (DE3) de *E. coli*.
(4) Se seleccionaron tres colonias. Se inocularon estos clones y se hicieron crecer en medio LB y se indujeron por 0,5 mM/l de IPTG durante 4 h a 37 °C. Los resultados de expresión se detectaron por SDS-PAGE (12% p/v) (figura 7). Se seleccionó la colonia 3 para la futura expresión.

Optimización

- 20 (5) Se expresó la proteína de fusión a 25 °C y 15 °C . Los resultados se muestran en la figura 8.

Expresión de proteínas

- 25 (6) Se cultivó la cepa de *E. coli* en 1 l de medio LB durante 4 horas y después de indujo por 0,5 mM/l de IPTG durante 4 horas adicionales a 37 °C.
(7) Se cultivaron las células por centrifugación. Se resuspendió la pasta celular en 70 ml de PBS y después se sonicó en hielo.

30 Purificación de proteínas

- (8) Se centrifugó el lisado después de la sonicación a alta velocidad durante 10 min, y se recogieron los cuerpos de inclusión.
(9) Se lavaron dos veces los cuerpos de inclusión con urea 2 M, Triton X-100 al 2 % v/v, EDTA 5 mM, BME al 0,5 %, NaCl 1 M, tampón Tris-HCl 100 mM, pH 8,0 y agua, respectivamente.
(10) Se redisolviaron los cuerpos de inclusión por urea 8 M, tampón fosfato 20 mM, pH 8,0 y después de centrifugó para mantener el sobrenadante.
(11) Se replegaron los cuerpos de inclusión dializando frente a Tris Cl 100 mM, NaCl 50 mM y glicerol al 5% v/v, pH 8,5 con una concentración final de 0,1 mg/ml. Se detectó la proteína replegada por SDS-PAGE como se muestra en la figura 9.

45 **Ejemplo 3**

Expresión y purificación

Subclonación de 30103 S2 en el vector pET32

- 50 (1) Se sintetizó el gen de 30103 S2 y se clonó para el vector pET32 usando Kpn I y Hind III.
(2) El clon resultante pET- 30103 S2 se verificó por secuenciación de ADN.

55 Transformación de BL-21(DE3) de *E. coli*

- (3) Se transformaron cinco nanogramos del plásmido pET-30103 S2 en BL-21 (DE3) de *E. coli*.
(4) Se seleccionaron siete colonias. Se inocularon estos clones y se hicieron crecer en medio LB y se indujeron por 0,5 mM/l de IPTG durante 4 h a 37 °C. Los resultados de expresión se detectaron por SDS-PAGE (12% p/v) (figura 10). Se seleccionó la colonia 5 para la futura expresión.

Optimización

- 65 (5) Se expresó la proteína de fusión a 25 °C y 15 °C. Los resultados se muestran en la figura 11.

Expresión de proteínas

(6) Se cultivó la cepa de *E. coli* en 1 l de medio LB durante 4 horas y después de indujo por 0,5 mM/l de IPTG durante 4 horas adicionales a 37 °C.

(7) Se cultivaron las células por centrifugación. Se resuspendió la pasta celular en 70 ml de PBS y después se sonicó en hielo.

Purificación de proteínas

(8) Se centrifugó el lisado después de la sonicación a alta velocidad durante 10 min, y se recogieron los cuerpos de inclusión.

(9) Se lavaron dos veces los cuerpos de inclusión con urea 2 M, Triton X-100 al 2 % v/v, EDTA 5 mM, BME al 0,5 %, NaCl 1 M, tampón Tris-HCl 100 mM, pH 8,0 y agua, respectivamente.

(10) Se redisolvieron los cuerpos de inclusión por urea 8 M, tampón fosfato 20 mM, pH 8,0 y después de centrifugó para mantener el sobrenadante.

(11) Se replegaron los cuerpos de inclusión dializando frente a Tris Cl 100 mM, NaCl 50 mM y glicerol al 5%, pH 8,5 con una concentración final de 0,1 mg/ml. Se detectó la proteína replegada por SDS-PAGE como se muestra en la figura 12.

Ejemplo 4

Construcción de fragmentos scFv

Los fragmentos scFv se derivan de anticuerpos completos. Se construyen enlazando los dominios V_H y V_L de unión a antígeno de un anticuerpo con un enlazador de polipéptido flexible. El enlazador puede comprender una combinación de residuos glicina y serina para proporcionar flexibilidad y para potenciar hidrofiliidad del esqueleto peptídico para permitir la unión a hidrógeno con moléculas de disolvente así como que sea resistente a la digestión por proteasas. La construcción de fragmentos scFv se describe en Kort *et al.* (2001) *supra* y en publicaciones descritas en ella. En la figura 13 se muestra una representación esquemática que muestra segmentos de polipéptidos en el semicuerpo. En la figura 14 se muestra un diagrama de los componentes estructurales del fragmento Fc de IgG1 humana. El dominio Fc se divide preferentemente en las cadenas $\gamma 2a$ y $\gamma 2b$. Esto es útil en la generación de la porción Fc del semicuerpo. La figura 15 muestra la heterodimerización de la cremallera de leucina.

Ejemplo 5

Generación de anticuerpos

Se usan anticuerpos específicos para antígenos objetivo para desarrollar fragmentos scFv. Se usan antígenos (por ejemplo antígenos CD) de células objetivo en forma aislada o en forma recombinante o sintética, o células completas que expresan antígenos de superficie, para desarrollar anticuerpos monoclonales o policlonales. Los anticuerpos se aíslan y los fragmentos scFv se generan como se describe en los ejemplos 1 y 2.

Ejemplo 6

Herramientas para diagnóstico e investigación

Se usan anticuerpos biespecíficos para el diagnóstico como reactivos que se unen a un marcador específico y proporcionan un sitio de unión para un agente que permitiría la detección del anticuerpo. Por ejemplo, en aplicaciones de tomografía de emisión de positrones (PET), el anticuerpo biespecífico proporciona un sitio de unión para un radiomarcador.

Los semicuerpos permiten aplicaciones de diagnóstico potenciadas tales como clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), microscopía de fluorescencia e inmunoensayos. El principio unificador es que una señal sólo se obtiene después del apareamiento de cremallera de las dos proteínas de fusión scFv, por marcado indirecto de dominio Fc recién formado con un anticuerpo anti-Fc marcado con enzima o de fluorescencia, o bien por la denominada "complementación de fragmentos de proteínas" (PCA), donde cada una de las proteínas de fusión scFv podrían contener la mitad de una enzima o proteína fluorescente y sólo después del apareamiento de cremallera dicha enzima o proteína fluorescente se vuelve activa. En principio, esto sería una combinación de los enfoques de complementación fluorescente bimolecular (BiFC)/PCA y semicuerpo.

FACS

Para la FACS, se tiñen las mismas combinaciones de antígenos/epítomos. Los semicuerpos diseñados específicamente permiten la tinción de combinaciones de antígenos/epítomos sólo con un color y por tanto quedan "libres" otros colores para antígenos adicionales (por ejemplo CD4+ linfocito T auxiliar: CD3 y CD4 - rojo y verde real, con el semicuerpo sólo en rojo o verde). Los semicuerpos que forman diferentes dominios Fc (por ejemplo, isotipos de IgG) permiten el marcado diferencial con anticuerpos específicos de subtipo de IgG secundarios. En combinación con BiFC o incluso transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (o transferencia de energía de resonancia Förster, FRET) en lugar del marcado indirecto del dominio Fc con un anticuerpo marcado, cada proteína de fusión scFv podría llevar una parte de una proteína fluorescente, que después del apareamiento de cremallera podría complementarse cada una con una proteína fluorescente (en el caso de FRET una proteína de fluorescencia completa que en combinación podría permitir la transferencia FRET). Véanse las figuras 16A y B.

Microscopía de fluorescencia

Para la microscopía de fluorescencia, se usan los mismos reactivos que para las aplicaciones de FACS, incluyendo histología con fines de diagnóstico clínico.

Inmunoensayos

Los semicuerpos diseñados específicamente permiten la detección de proteínas modificadas multiméricas y permiten su diferenciación, por ejemplo proteínas fosforiladas (1 scFv frente a fosfotirosina, 1 scFv frente a la proteína, anticuerpo de captura frente a una segunda subunidad), o isoformas glucosiladas (1 scFv frente a ácido siálico, 1 scFv frente a la proteína, anticuerpo de captura frente a la segunda subunidad) [figura 17].

Herramientas de investigación

Los reactivos de semicuerpos útiles para diagnóstico se podrían usar en investigación básica como herramientas para, por ejemplo, marcado y clasificación celular avanzados, o análisis basados en anticuerpos novedosos.

Ejemplo: Purificación de proteínas

Los semicuerpos se pueden usar para la purificación de complejos, tales como proteínas multiméricas, o proteínas modificadas por purificación de afinidad. Un ejemplo sería la purificación en una etapa de una proteína fosforilada (anti-proteína scFv, anti-fosfo-tirosina scFv) [figura 18].

Ejemplo 7

Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos

La figura 19 es una representación diagramática que muestra el uso de dos semicuerpos específicos para CD5 o CD19. Los semicuerpos comprenden una porción scFv que se puede unir a CD5 o CD19, una porción Fc incompleta, no funcional y mitad de una cremallera de leucina. Las secuencias de aminoácidos de porciones de la cremallera de leucina se muestran en la tabla 3 (véanse SEQ ID NO:1-5). Los pares apropiados incluyen SEQ ID NO:1 y 2, SEQ ID NO:3 y 4, y SEQ ID NO:3 y 5.

Los dos semicuerpos se unen a una célula objetivo que expresa tanto CD5 como CD19. Cuando los dos semicuerpos unidos están muy próximos, las porciones de cremallera de leucina interaccionan y las dos porciones de Fc incompletas forman un dominio Fc funcional (véase la figura 19). Una célula citotóxica (por ejemplo neutrófilo, macrófago, linfocito citolítico) con un receptor Fc (FcR; por ejemplo CD16, CD23, CD32, CD64, CD89) media entonces la lisis celular.

Los expertos en la técnica apreciarán que la invención descrita en el presente documento es susceptible a variaciones y modificaciones distintas de aquellas específicamente descritas. Se debe entender que la invención incluye todas estas variaciones y modificaciones en la medida en que entren dentro del alcance de las reivindicaciones. La invención también incluye todas las etapas, características, composiciones y compuestos referidos o indicados en esta memoria descriptiva, de forma individual o colectiva, y cualquiera o todas las combinaciones de cualquiera de dos o más de dichas etapas o características en la medida en que entren dentro del alcance de las reivindicaciones.

Bibliografía

- Adams *et al*, *Nuc. Med. Biol.* 27:330-346,2000
- Bagshawe y Begent, *Adv. Drug Delivery Rev.* 22:365-367, 1996
- Carter, *Nature Reviews* 1:118-128, 2001

Chames y Baty, *FEMS Microbiol. Lett.* 189:1-8, 2000
 de Haard et al, *Adv. Drug Delivery Rev.* 31:5-31, 1998
 5 de Kruif y Logtenberg, *J Biol Chem* 271:7630-7634, 1996
 Funaro et al, *Biotechnol. Adv.* 18:385-401, 2000
 Hudson, *Exp. Opin. Invest Drugs* 9:1231-1242, 2000
 10 Hudson y Souriau, *Nat Med* 9:129-134, 2003
 Kreitman, *Curr. Opin. Immunol.* 11: 570-578, 1999
 15 Lin et al, *Cancer Res* 66:3884-92, 2006
 Litowski y Hodges, *J. Biol. Chem.*277:37272-37279, 2002
 Reiter y Pastan, *Tibtech* 16:51-520, 1998
 20 Shan et al, *J. Immunol* 162:6589-95, 1999
 Shaner et al, *Nature Biotechnology* 22:1567-1572, 2004
 25 Sondermann et al, *Nature* 406:267-273, 2000
 Wu et al, *Immunotechnology* 2; 21-36, 1996
 Wu et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 8495-8500, 2000
 30 Zappater-Hommer y Griesbeck, *BMC Biotechnol* 3:5, 2003

Listado de secuencias

35 <110> UNIVERSIDAD DE SYDNEY
 CHRISTOPHERSON, Richard Ian (SÓLO EE. UU.)
 MATTHEWS, Jacqueline Mary (SÓLO EE. UU.)
 MACKAY, Joel Peter (SÓLO EE. UU.)
 40 <120> Agentes terapéuticos
 <130> 30139794/EJH
 <150> US 60/741030
 <151> 29/11/2005
 <150> AU 2006901059
 45 <151> 02/03/2006
 <160> 10
 <170> PatentIn versión 3.2
 <210> 1
 <211> 47
 50 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> cremallera de leucina
 <400> 1
 Leu Glu Ile Glu Ala Ala Phe Leu Glu Gln Glu Asn Thr Ala Leu Glu
 1 5 10 15
 Thr Glu Val Ala Glu Leu Glu Gln Glu Val Gln Arg Leu Glu Asn Glu
 20 25 30
 Val Ser Gln Tyr Glu Thr Arg Tyr Gly Pro Leu Gly Gly Gly Lys
 35 40 45
 55 <210> 2

ES 2 413 493 T3

<211> 47
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 5 <223> cremallera de leucina
 <400> 2
 Lys Gly Gly Gly Leu Glu Ile Arg Ala Ala Phe Leu Arg Arg Arg Asn
 1 5 10 15

 Thr Ala Leu Arg Thr Arg Val Ala Glu Leu Arg Gln Arg Val Gln Arg
 20 25 30

 Ala Arg Asn Arg Val Ser Gln Tyr Arg Thr Arg Tyr Gly Pro Leu
 35 40 45
 <210> 3
 <211> 47
 10 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> cremallera de leucina
 <400> 3
 Leu Glu Ile Arg Ala Ala Phe Leu Arg Gln Arg Asn Thr Ala Leu Arg
 1 5 10 15

 Thr Glu Val Ala Glu Leu Glu Gln Glu Val Gln Arg Leu Glu Asn Glu
 20 25 30

 Val Ser Gln Tyr Glu Thr Arg Tyr Gly Pro Leu Gly Gly Gly Lys
 35 40 45
 15 <210> 4
 <211> 47
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 20 <220>
 <223> cremallera de leucina
 <400> 4
 Lys Gly Gly Gly Leu Glu Ile Glu Ala Ala Phe Leu Glu Arg Glu Asn
 1 5 10 15

 Thr Ala Leu Glu Thr Arg Val Ala Glu Leu Arg Gln Arg Val Gln Arg
 20 25 30

 Ala Arg Asn Arg Val Ser Gln Tyr Arg Thr Arg Tyr Gly Pro Leu
 35 40 45
 25 <210> 5
 <211> 47
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> cremallera de leucina
 30 <400> 5
 Leu Glu Ile Glu Ala Ala Phe Leu Glu Arg Glu Asn Thr Ala Leu Glu
 1 5 10 15

 Thr Arg Val Ala Glu Leu Arg Gln Arg Val Gln Arg Leu Arg Asn Arg
 20 25 30

 Val Ser Gln Tyr Arg Thr Arg Tyr Gly Pro Leu Gly Gly Gly Lys
 35 40 45
 <210> 6

ES 2 413 493 T3

<211> 1722

<212> ADN

<213> 30103 S1 sintético

<400> 6

ggtaccgatg atgatgataa acaggtgcag ctggttgaaa gcggcgggtgg tctggttcag 60
 ccgggtggct ctctgaaact gagctgcgcg gcgtctggct ttgattttag tctgtattgg 120
 atgagctggg ttcgtcaggc accgggtaaa ggcctggaat ggattggcga aattaatccg 180
 acgagtagca ccattaatth taccocgagc ctgaaagata aagtgttcat tagccgtgat 240
 aacgcgaaaa acaccctgta cctgcagatg agtaaagtto gcagcgaaga taccgccctg 300
 tattattgcg cacgtggtaa ctattaccgt tacggcogat ccatggatta ttggggtcag 360
 ggcaccagtg ttaccgttag caaaattagc ggcgcggtg gtagcgggtg cgggtggcagc 420
 ggcggtggcg gcagcgggtg tggcggtagc ggcgcggtg gttctagtga tatcgtgctg 480
 acccagagtc cggcgcgact gcccgttct ctgggtcagc gtgcaacct cagctgccgc 540
 gcgagcaaaa gtgtgagcac ctctggttat tcttatctgc attggtatca gcagaaaccg 600
 ggccagccgc cgaactgct gatttatctg gcgtctaato tggaaatctg cgtgccggcg 660
 cgcttcagcg gttctggcag tggcaccgat tttaccctga acattcatcc ggtggaagaa 720
 gaagatgccg ccacctatta ctgccagcat agccgtgaac tgccgtttac ctttggcagc 780
 ggtacgaaac tggaaatcaa agtcgacggt ggtggtggtt ctggtggtgg tggtagcgg 840
 ggcggtggta gcggtggtg cagatctatg gtcagcaaag gcgaagaaaa caacatggca 900
 atcatcaaag aatttatgcg ttttaaagt cgcatggaag gcagcgttaa cggccatgag 960
 tttgaaatcg aaggcgaagg tgaaggccgt ccttatgaag gcttccagac tgctaaactg 1020
 aaagtcaaaa aaggcgttc gctgccttt gcatgggata ttctgagccc tcaatttaca 1080
 tacggcagca aagcgtatgt taaacatccg gctgatatcc ctgattatt taagctgtct 1140
 tttccggaag gctttaagt ggaacgtgtg atgaacttcg aagatggggg ggttgtgacc 1200
 gtgaccocagg atctatctct gcaggatgga gaatttattt ataaggtaaa actgcgtggc 1260
 acgaatttcc ctagcgtatg ccagtgatg cagaaaaaga ccatggggtg ggaagctagc 1320
 tctgaaactg tgtatccgga ggatggcgt ctgaaaggcg agatcaaaat gcgtctgaaa 1380
 ctgaaagatg gtggccacta tacgtccgaa gtaaaaaaga cctacaaagc aaaaagccg 1440
 gttcagctgc cgggtgcgta tattgtcggg attaaactgg atattacaag ccataatgaa 1500
 5 gattatacga ttgtggagca atatgaactg gcggaaggcc gccacagtac ggtggtatg 1560
 gatgaaactg acaaaactga ggggtggtg ggtagcgtg gtggtggttc tgggtggtggc 1620
 ggtagcgggtg gcggtactag tgaaattagc gccctggaaa aagaaatcag cgcgctggaa 1680
 aaagaaatta gcgcgctgga aaaagcagc taataagaat tc 1722

<210> 7

<211> 1719

<212> ADN

10 <213> 30103 S2 sintético

<400> 7

ES 2 413 493 T3

ggtaccgacg acgacgacaa gatggatgtg gtgatgaccc agaccccgcc gagcctgagc 60
 gcgagcgtgg gcgaaaccgt gaccattacc tgccgtgcga gcggcagcat tcataactat 120
 ctggcgtggt atcagcagaa actgggtaaa agcccgacgc tgctggtgta taacgcgaaa 180
 accctggcgg atggtgtgcc gagccgtttt agcggcagcg gcagcggcac ccagtttagc 240
 ctgaaaatta acagcctgca gccggaagat tttggcagct attattgcca gcatttttgg 300
 agcattccgt ggacctttgg tggcggcacc aaactggaac tgaaacgtgg tggcgggtgg 360
 ggcggcgggtg gtacgggtgg cggcggcagc ggtggcgggtg gcagccaggt gcagctgcag 420
 cagagcggca ccgaaactggt gaaaccggtg gcgagcgtga aatgagctg caaagcagc 480
 ggctttacct ttaccgatta taatatgcat tgggtgaaac agaccccgcc tcagggcctg 540
 gaatggattg gcgcgattta tccggaaaac ggcgatacca gctataacca gcgctttaa 600
 ggcaaagcga cctgaccgcg ggataaaagc tttagcaccg cgtatatgca tctgagcagc 660
 ctgaccagcg aagataccgc ggtgtatttt tgccgcggtt tttattatta tggcagctat 720
 tatggcgcgc tggattattg gggccagggc accagcgtga ccgtgagcag cgatagcggc 780
 gcggaatttg aagtcgacgg tggcggcggc tctggtggtg gtggtagcgg tggcgggtgg 840
 agcggcgggtg gtagatctat gagcaaagc gaagaactgt ttaccggcgt tgttccgac 900
 ctggtggaac tggatggcga tgtgaatggc cataaattta gcgttagcgg cgaagcggaa 960
 ggcgatgcca cctatggcaa actgaccctg aaattcattt gcaccaccgg taaactgccg 1020
 gtgccgtggc cgaccctggt gaccaccttt agctatgggt tgatggtggt tagccgttat 1080
 ccggtacata tgaacagca tgatttcttt aaaagcgcga tgccggaagg ctatgtcag 1140
 gaacgtacca ttttctttaa agatgatggc aattataaaa cccgtgcgga agtgaattt 1200
 gaagtgata cctggtgaa ccgcattgaa ctgaaaggca ttgattttaa agaagatggt 1260
 aatatcctgg gccacaaact ggaatataat tataatagcc ataatgtgta tattatggcg 1320
 gataaacaga aaaatggcat caaagcgaac ttcaaaattc gccataatat tgaagatggt 1380
 ggtgtgcagc tggcggatca ttatcagcag aataccccga ttggcagatg ccoggttctg 1440
 ctgcccggata accattatct gagcattcag agcgcgctga gcaaagatcc gaatgaaaa 1500
 cgtgatcaca tggttctgct ggaatttgtg accgcggcgg gtatcaccca tggatggat 1560
 gaactgtata aactcgaggg tggcgggtgt tctggtggtg gtggtagcgg cggcgggtgg 1620
 agcggcgggtg gtactagtaa aattagcgcg ctgaaagaaa aaattagcgc cctgaaagaa 1680
 aaaatcagcg cgctgaaaga agcagactaa taagaattc 1719

<210> 8

<211> 18

5 <212> PRT

<213> glicina serina

<400> 8

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Gly Gly

<210> 9

10 <211> 721

<212> PRT

<213> secuencia artificial

ES 2 413 493 T3

<220>

<223> Trx-CD45-mOrange-E3

<400> 9

Met Ser Asp Lys Ile Ile His Leu Thr Asp Asp Ser Phe Asp Thr Asp
1 5 10 15

Val Leu Lys Ala Asp Gly Ala Ile Leu Val Asp Phe Trp Ala Glu Trp
20 25 30

Cys Gly Pro Cys Lys Met Ile Ala Pro Ile Leu Asp Glu Ile Ala Asp
35 40 45

Glu Tyr Gln Gly Lys Leu Thr Val Ala Lys Leu Asn Ile Asp Gln Asn
50 55 60

ES 2 413 493 T3

Pro Gly Thr Ala Pro Lys Tyr Gly Ile Arg Gly Ile Pro Thr Leu Leu
65 70 75 80

Leu Phe Lys Asn Gly Glu Val Ala Ala Thr Lys Val Gly Ala Leu Ser
85 90 95

Lys Gly Gln Leu Lys Glu Phe Leu Asp Ala Asn Leu Ala Gly Ser Gly
100 105 110

Ser Gly His Met His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
115 120 125

Arg Gly Ser Gly Met Lys Glu Thr Ala Ala Ala Lys Phe Glu Arg Gln
130 135 140

His Met Asp Ser Pro Asp Leu Gly Thr Asp Asp Asp Asp Lys Gln Val
145 150 155 160

Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
165 170 175

Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr Trp Met
180 185 190

Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu
195 200 205

Ile Asn Pro Thr Ser Ser Thr Ile Asn Phe Thr Pro Ser Leu Lys Asp
210 215 220

Lys Val Phe Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
225 230 235 240

Met Ser Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg
245 250 255

Gly Asn Tyr Tyr Arg Tyr Gly Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
260 265 270

Thr Ser Val Thr Val Ser Lys Ile Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
275 280 285

ES 2 413 493 T3

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 290 295 300

Gly Ser Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val
 305 310 315 320

Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val
 325 330 335

Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 340 345 350

Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly
 355 360 365

Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
 370 375 380

Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
 385 390 395 400

His Ser Arg Glu Leu Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu
 405 410 415

Ile Lys Val Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 420 425 430

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Arg Ser Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Asn
 435 440 445

Asn Met Ala Ile Ile Lys Glu Phe Met Arg Phe Lys Val Arg Met Glu
 450 455 460

Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe Glu Ile Glu Gly Glu Gly Glu Gly
 465 470 475 480

Arg Pro Tyr Glu Gly Phe Gln Thr Ala Lys Leu Lys Val Thr Lys Gly
 485 490 495

Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro Gln Phe Thr Tyr
 500 505 510

ES 2 413 493 T3

Gly Ser Lys Ala Tyr Val Lys His Pro Ala Asp Ile Pro Asp Tyr Phe
 515 520 525

Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly Phe Lys Trp Glu Arg Val Met Asn Phe
 530 535 540

Glu Asp Gly Gly Val Val Thr Val Thr Gln Asp Ser Ser Leu Gln Asp
 545 550 555 560

Gly Glu Phe Ile Tyr Lys Val Lys Leu Arg Gly Thr Asn Phe Pro Ser
 565 570 575

Asp Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Met Gly Trp Glu Ala Ser Ser
 580 585 590

Glu Arg Met Tyr Pro Glu Asp Gly Ala Leu Lys Gly Glu Ile Lys Met
 595 600 605

Arg Leu Lys Leu Lys Asp Gly Gly His Tyr Thr Ser Glu Val Lys Thr
 610 615 620

Thr Tyr Lys Ala Lys Lys Pro Val Gln Leu Pro Gly Ala Tyr Ile Val
 625 630 635 640

Gly Ile Lys Leu Asp Ile Thr Ser His Asn Glu Asp Tyr Thr Ile Val
 645 650 655

Glu Gln Tyr Glu Arg Ala Glu Gly Arg His Ser Thr Gly Gly Met Asp
 660 665 670

Glu Leu Tyr Lys Leu Glu Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 675 680 685

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Thr Ser Glu Ile Ser Ala Leu Glu
 690 695 700

Lys Glu Ile Ser Ala Leu Glu Lys Glu Ile Ser Ala Leu Glu Lys Ala
 705 710 715 720

Ser

<210> 10

<211> 720

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> Trx-CD20-T-Sapphire-K3

<400> 10

ES 2 413 493 T3

Met Ser Asp Lys Ile Ile His Leu Thr Asp Asp Ser Phe Asp Thr Asp
 1 5 10 15

Val Leu Lys Ala Asp Gly Ala Ile Leu Val Asp Phe Trp Ala Glu Trp
 20 25 30

Cys Gly Pro Cys Lys Met Ile Ala Pro Ile Leu Asp Glu Ile Ala Asp
 35 40 45

Glu Tyr Gln Gly Lys Leu Thr Val Ala Lys Leu Asn Ile Asp Gln Asn
 50 55 60

Pro Gly Thr Ala Pro Lys Tyr Gly Ile Arg Gly Ile Pro Thr Leu Leu
 65 70 75 80

Leu Phe Lys Asn Gly Glu Val Ala Ala Thr Lys Val Gly Ala Leu Ser
 85 90 95

Lys Gly Gln Leu Lys Glu Phe Leu Asp Ala Asn Leu Ala Gly Ser Gly
 100 105 110

Ser Gly His Met His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
 115 120 125

Arg Gly Ser Gly Met Lys Glu Thr Ala Ala Ala Lys Phe Glu Arg Gln
 130 135 140

His Met Asp Ser Pro Asp Leu Gly Thr Asp Asp Asp Asp Lys Met Asp
 145 150 155 160

Val Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Glu
 165 170 175

Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Ser Ile His Asn Tyr Leu
 180 185 190

ES 2 413 493 T3

Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Leu Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val Tyr
 195 200 205

Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 210 215 220

Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu
 225 230 235 240

Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Ile Pro Trp Thr
 245 250 255

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Gly Gly Gly Gly Gly
 260 265 270

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Val
 275 280 285

Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Glu Leu Val Lys Pro Val Ala Ser Val
 290 295 300

Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Asn Met
 305 310 315 320

His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala
 325 330 335

Ile Tyr Pro Glu Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Arg Phe Lys Gly
 340 345 350

Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Phe Ser Thr Ala Tyr Met His
 355 360 365

Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg
 370 375 380

Phe Tyr Tyr Tyr Gly Ser Tyr Tyr Gly Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
 385 390 395 400

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Asp Ser Gly Ala Glu Phe Glu Val
 405 410 415

ES 2 413 493 T3

Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 420 425 430

Gly Gly Gly Arg Ser Met Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val
 435 440 445

Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe
 450 455 460

Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr
 465 470 475 480

Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr
 485 490 495

Leu Val Thr Thr Phe Ser Tyr Gly Val Met Val Phe Ser Arg Tyr Pro
 500 505 510

Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly
 515 520 525

Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys
 530 535 540

Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile
 545 550 555 560

Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His
 565 570 575

Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp
 580 585 590

Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile
 595 600 605

Glu Asp Gly Gly Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro
 610 615 620

Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Ile
 625 630 635 640

ES 2 413 493 T3

Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val
645 650 655

Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr His Gly Met Asp Glu
660 665 670

Leu Tyr Lys Leu Glu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
675 680 685

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Thr Ser Lys Ile Ser Ala Leu Lys Glu
690 695 700

Lys Ile Ser Ala Leu Lys Glu Lys Ile Ser Ala Leu Lys Glu Ala Ser
705 710 715 720

REIVINDICACIONES

1. Un conjunto de inmunoglobulinas modificadas que comprende dos inmunoglobulinas complementarias que pueden formar un agente o agentes combinados funcionales con propiedades específicas después de la unión de la primera y la segunda inmunoglobulinas complementarias a una célula objetivo; en el que cada inmunoglobulina comprende una primera, segunda y tercera porciones en las que:
- (a) cada primera porción es un scFv u otro fragmento de unión a antígeno de una inmunoglobulina y la primera porción de la primera inmunoglobulina complementaria puede interactuar con un primer antígeno sobre la célula objetivo y la primera porción de la segunda inmunoglobulina complementaria puede interactuar con un antígeno diferentes sobre dicha célula objetivo;
- (b) cada segunda porción es un agente o una porción incompleta, no funcional de un agente, de forma que las dos segundas porciones son:
- (i) moléculas indicadoras distintas que, en combinación, proporcionan una señal combinada,
- (ii) porciones no funcionales complementarias de una única molécula indicadora, o
- (iii) dominios Fc no funcionales, incompletos que puede formar un dominio Fc funcional; y
- (c) cada tercera porción es un miembro diferente de un par de unión complementario que comprende un primer y un segundo miembros en la que el par de unión comprende porciones complementarias de una cremallera de leucina, un par ligando-receptor, actina y una proteína de unión a actina o aptámeros de ADN;
- en el que después de la unión de las inmunoglobulinas complementarias a los dos antígenos se combinan los pares de unión:
- (i) permitiendo que las moléculas indicadoras proporcionen una señal combinada,
- (ii) permitiendo que las porciones no funcionales complementarias de una única molécula indicadoras reconstituyan una única molécula indicadora, o
- (iii) permitiendo que los dominios Fc no funcionales incompletos formen un dominio Fc completo.
2. El conjunto de inmunoglobulinas como se define en la reivindicación 1, en el que la primera porción es una estructura de afinidad seleccionada de dAb y nanocuerpos.
3. El conjunto de inmunoglobulinas como se define en la reivindicación 1 o 2 para su uso en tratamiento o para diagnóstico.
4. El conjunto de inmunoglobulinas como se define en la reivindicación 1 o 2, en el que la segunda porción de cada inmunoglobulina es un dominio Fc no funcional incompleto que puede formar un dominio Fc funcional para su uso en el tratamiento de cáncer o una infección induciendo una respuesta citotóxica sobre una célula objetivo en un sujeto, en el que dichas inmunoglobulinas complementarias se unen a dichos diferentes antígenos sobre la célula objetivo y después se unen entre sí en la superficie de la célula para formar un dominio Fc activo a través del cual se media la ADCC o la CDC.
5. El conjunto de inmunoglobulinas como se define en la reivindicación 1 o 2 para su uso en el diagnóstico del cáncer, en el que dichas primeras porciones pueden interactuar diferentes antígenos específicos de cáncer sobre la célula y dichas segundas porciones comprenden distintas moléculas indicadoras o porciones no funcionales complementarias de una única molécula indicadora, en el que después de la unión de las inmunoglobulinas individuales a los diferentes antígenos, los pares de unión se combinan en la superficie celular permitiendo que las moléculas indicadoras proporcionen una señal combinada o reconstituyan una única molécula indicadora.
6. El conjunto de inmunoglobulinas para su uso en el diagnóstico del cáncer de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la molécula o moléculas indicadora(s) es/son colorantes fluorescentes.
7. Uso de las inmunoglobulinas como se definen en la reivindicación 1 o 2 para preparar un agente medicinal, de diagnóstico o de afinidad.
8. El conjunto de inmunoglobulinas para su uso en el tratamiento del cáncer o una infección de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el sujeto es un ser humano, primate, animal de cría, animal de laboratorio, animal salvaje en cautiverio o especie aviar.
9. El conjunto de inmunoglobulinas o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que cada

inmunoglobulina es específica para un antígeno CD.

10. Un conjunto de inmunoglobulinas como se reivindica en la reivindicación 1, en el que cada conjunto comprende al menos dos inmunoglobulinas, teniendo cada una la estructura:

5 $x - (Fc^I)_i - scFv(Ag^1);$

ó

10 $y - (Fc^{II})_j - scFv(Ag^2);$

en la que:

15 x e y son compañeros de unión que pueden formar una asociación o unirse entre sí en la que los pares de unión comprenden porciones complementarias de una cremallera de leucina, un par receptor-ligando, actina y una proteína de unión a actina o aptámeros de ADN;

20 $(Fc^I)_i$ y $(Fc^{II})_j$ con cada uno dominio Fc incompletos, no funcionales que pueden formar un dominio Fc funcional después de la unión de x e y ; y

20 $scFv(Ag^1)$ y $scFv(Ag^2)$ son fragmentos variables monocatenarios que tienen especificidad por dos antígenos (Ag) diferentes, Ag^1 o Ag^2 sobre la célula objetivo.

25 11. Un conjunto de inmunoglobulinas como se reivindica en la reivindicación 1, en el que cada conjunto comprende al menos dos inmunoglobulinas, teniendo cada una la estructura:

$x - (Mo^I)_i - scFv(Ag^1);$

ó

30 $y - (Mo^{II})_j - scFv(Ag^2);$

en la que:

35 x e y son compañeros de unión que pueden formar una asociación o unirse entre sí en la que los pares de unión comprenden porciones complementarias de una cremallera de leucina, un par receptor-ligando, actina y una proteína de unión a actina o aptámeros de ADN;

40 $(Mo^I)_i$ y $(Mo^{II})_j$ son cada uno porciones de una molécula indicadora que puede formar un indicador funcional después de la unión de x e y ; y

$scFv(Ag^1)$ y $scFv(Ag^2)$ son fragmentos variables monocatenarios que tienen especificidad por dos antígenos (Ag) diferentes, Ag^1 o Ag^2 sobre la célula objetivo.

45 12. Un método *in vitro* para identificar selectivamente una célula, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha célula con un conjunto de inmunoglobulinas como se define en la reivindicación 1 o 2, en el que dichas primeras porciones pueden interaccionar diferentes antígenos sobre la célula, dichas segundas porciones comprenden distintas moléculas indicadoras o porciones complementarias no funcionales de una única molécula indicadora y dichas terceras porciones son pares de unión complementarios, en el que después de la unión de las
50 inmunoglobulinas individuales a los diferentes antígenos, los pares de unión se combinan en la superficie celular permitiendo que las moléculas indicadoras proporcionen una señal combinada o reconstituyan una única molécula indicadora.

55 13. El método de la reivindicación 12, en el que la molécula o moléculas indicadora(s) es/son colorantes fluorescentes.

14. El método de la reivindicación 12 o 13, en el que la célula es una célula cancerosa o una célula madre.

60 15. El método de la reivindicación 12 o 13 para identificar células cancerosas en un sujeto, comprendiendo dicho método poner en contacto células supuestamente cancerosas con un conjunto de inmunoglobulinas como se define en la reivindicación 1 o 2, en el que dichas primeras porciones de dichas inmunoglobulinas pueden interaccionar con diferentes antígenos específicos de cáncer sobre la célula.

65 16. Un método para detectar una célula objetivo, comprendiendo dicho método poner en contacto una muestra que, supuestamente, comprende dicha célula objetivo con un conjunto de inmunoglobulinas como se define en la reivindicación 1 o 2, en el que dichas primeras porciones pueden interaccionar diferentes antígenos sobre dicha

célula, dichas segundas porciones comprenden distintas moléculas indicadoras o porciones no funcionales complementarias de una única molécula indicadora, en el que después de la unión de las inmunoglobulinas individuales a los diferentes antígenos, los pares de unión se combinan en la superficie celular permitiendo que las moléculas indicadoras proporcionen una señal combinada o reconstituyan una única molécula indicadora.

- 5 17. El método de la reivindicación 16, en el que la molécula o moléculas indicadora(s) es/son colorantes fluorescentes.
- 10 18. El método de la reivindicación 16 o 17, en el que el antígeno objetivo es una proteína.
19. El método de la reivindicación 18, en el que dicha proteína es una proteína con modificación postraduccional.
20. El método de la reivindicación 19, en el que dicha proteína es una proteína fosforilada o glucosilada.
- 15 21. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20, en el que la muestra se ha retirado de un sujeto.
22. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 21, en el que el sujeto es un ser humano.
- 20 23. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 22, en el que la célula objetivo es indicativa de una enfermedad o afección.
24. El conjunto de inmunoglobulinas como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 9, 10 o 11 para su uso en el tratamiento del cáncer.
- 25 25. El conjunto de inmunoglobulinas o su uso como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el par de unión es un par receptor-ligando que comprende una citocina y un receptor de citocina.

Trx-CD45-mOrange-e3

MSDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWCGPCKMIAPILDEIAD EYQGKLTVAKLN
 IDQNPGTAPKYGIRGIPTLLLFKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLAGSGSGHMHHH
 HHSSGLVPRGSGMKETA AAKFERQHMDSPDLGTD DDDDKQVQLVESGGGLVQPGGSLKLS
 AASGFDFSRYWMSWVRQAPGKGLEWIGEINPTSSTINFTPSLKDKVFISRDNAKNTLYLQ
 MSKVRSEDTALYYCARGNYRYGDAMDYWGQTSVTVSKI SGGGSGGGGSGGGGSGGGG
 SGGGSSDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYLHWYQOKPGQPPKLLIY
 LASNLESGVPARFSGSGGTDFTLNHPVEEEDAATYYCQHSREL PFTFGSGTKLEIKvd
 GGGGSGGGGSGGGGSGGGrsMVSKGEENMAI I KEFMRFKVRMEGSVNGHEFEIEGEGEG
 RPYEGFQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQFTY GSKAYVKHPADIPDYFKLSFPEGFKWER
 VMNFEDGGVVTVTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFP SDGPVMQKKTMGWEASSERMPEDG
 ALKGEIKMRLKLDGGHYTSEVKTTYKAKKPVQLPGAYIVGIKLDITSHNEDYTIVEQYE
 RAEGRHSTGGMDELYKleGGGSGGGGSGGGGSGGGTSEISALEKEISALEKEISALEKA
 S

Número de aminoácidos: 721

Peso molecular: 76713,6

pI teórico: 5,86

Coefficientes de extinción: ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$, a 280 nm).

Coefficiente de extinción 97095

Abs. 0,1 % (=1 g/l) 1,266, suponiendo que los residuos de Cys de ALL aparecen como medias cistinas

Figura 1A

Trx-CD20-T-Sapphire-k3

MSDKI IHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWCGPCKMIAPILDEIAD EYQGKLTVAKLN
 IDQNPGTAPKYGIRGIPTLLLFKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLAGSGSGHMHHH
 HSSGLVPRGSGMKETA AAKFERQHMDSPDLGTDDDDKMDVMTQT PASLSASVGETVTI
 TCRASGSIHNYLAWYQOKLGKSPQLLVYNAKTLADGVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLOPE
 DFGSYCQHFWSI PWTFGGGTKLELKRGGGGGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQQSGTELVKP
 VASVKMSCKASGFTFTDYNMHVVKQTPGQGLEWIGAIYPENGDTSYNQRFK GKATLTADK
 SFSTAYMHLSSLTSED TAVYFCARFY YGALDYWGQTSVTVSSDSGAEFEvdGGG
 GSGGGGSGGGGSGGGrsMSKGEELFTGVVPI LVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT
 LKFICTTGKLPVPWP TLVTTFSYGMVFSRYPDHMKQHDFK SAMPEGYVQERTIFFKDD
 GNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHN VYIMADKQKNGIKA
 NFKIRHNIEDGGVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYL SIQSALS KDPNEKRDMVLEF
 VTAAGITHGMDELYKleGGGGSGGGGSGGGGSGGGGtsKISALKEKISALKEKISALKEAS

Número de aminoácidos: 720

Peso molecular: 76888,9

pI teórico: 5,92

Coefficientes de extinción: ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$, a 280 nm).

Coefficiente de extinción 93085

Abs. 0,1 % (=1 g/l) 1,211, suponiendo que los residuos de Cys de ALL aparecen como medias cistinas

Coefficiente de ext. 92710

Figura 1B

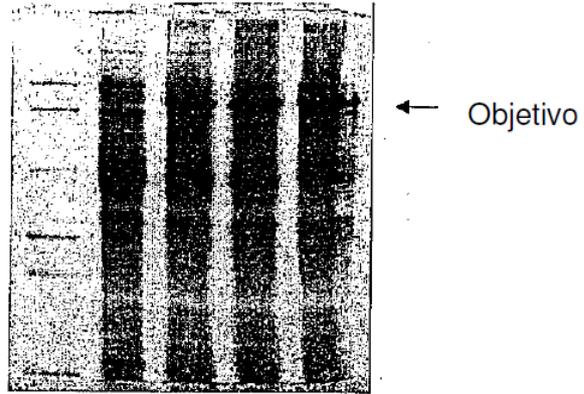


Figura 2A



Figura 2B

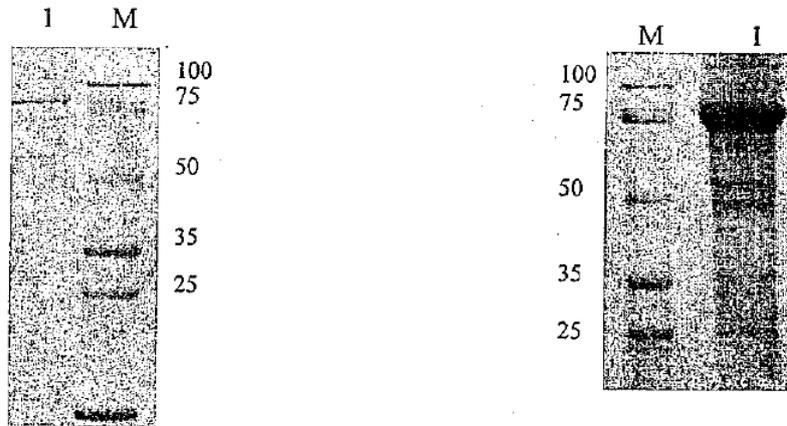


Figura 2C

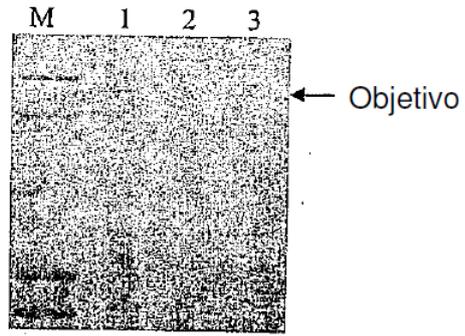


Figura 2D

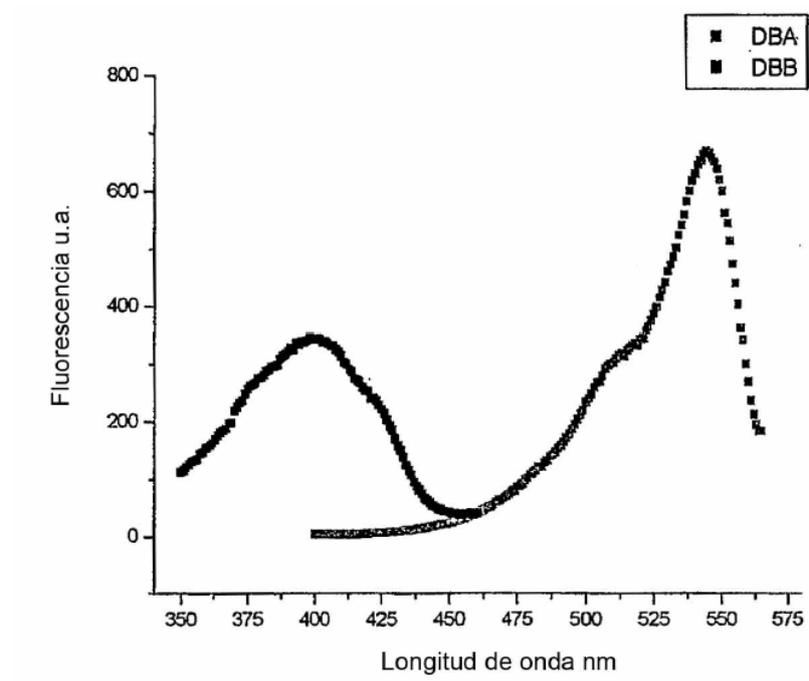


Figura 3

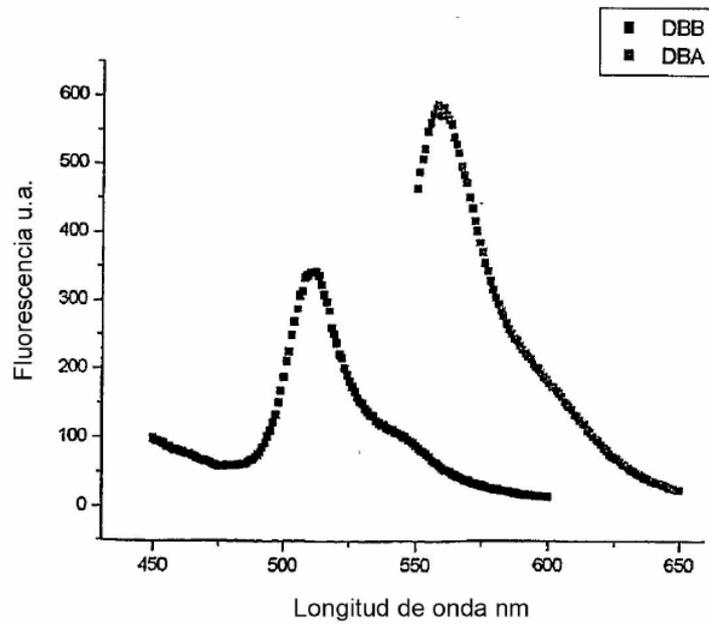


Figura 4

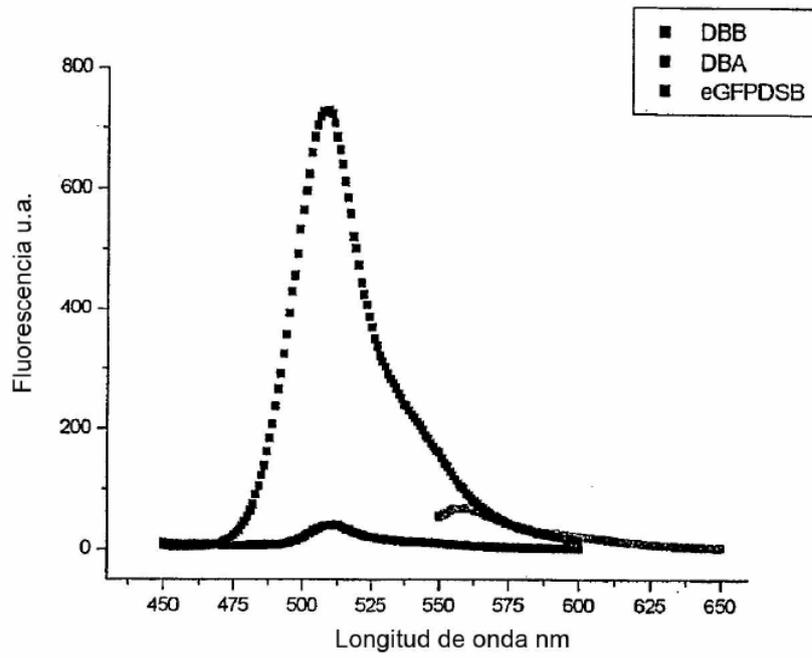


Figura 5

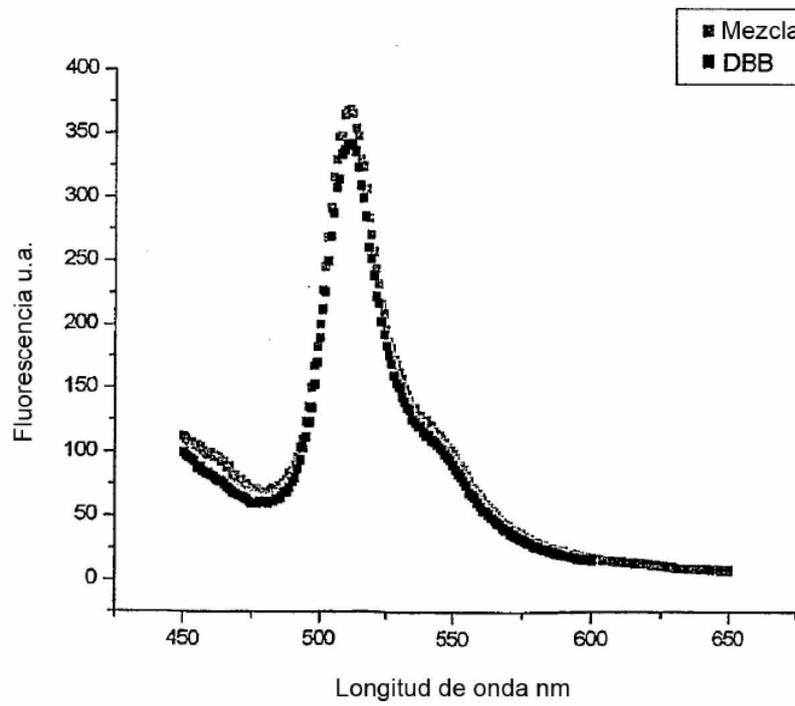


Figura 6

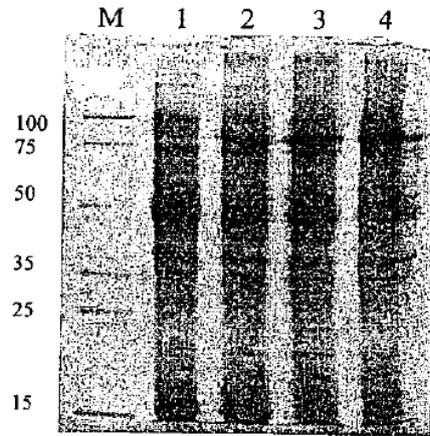


Figura 7

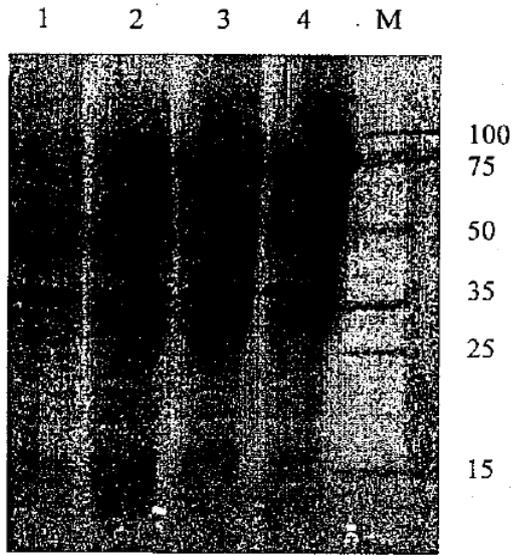


Figura 8

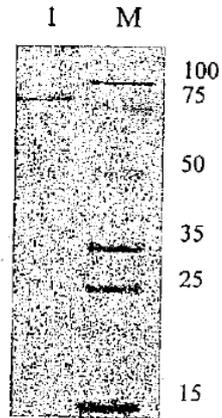


Figura 9

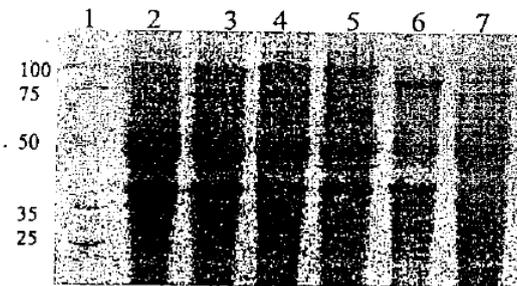


Figura 10

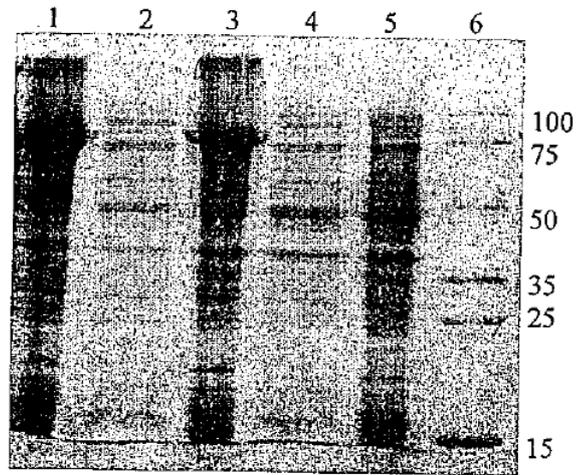


Figura 11

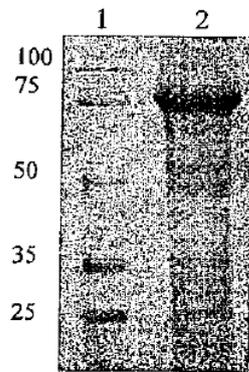


Figura 12

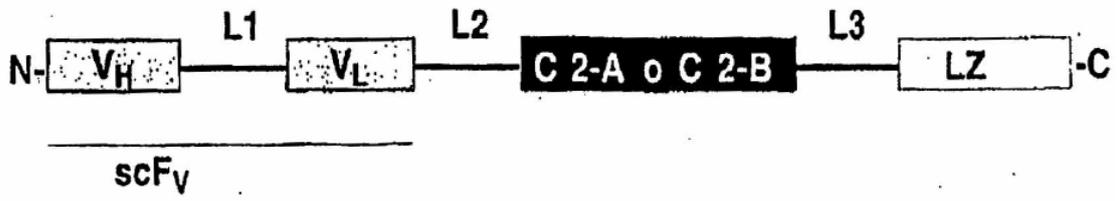


Figura 13

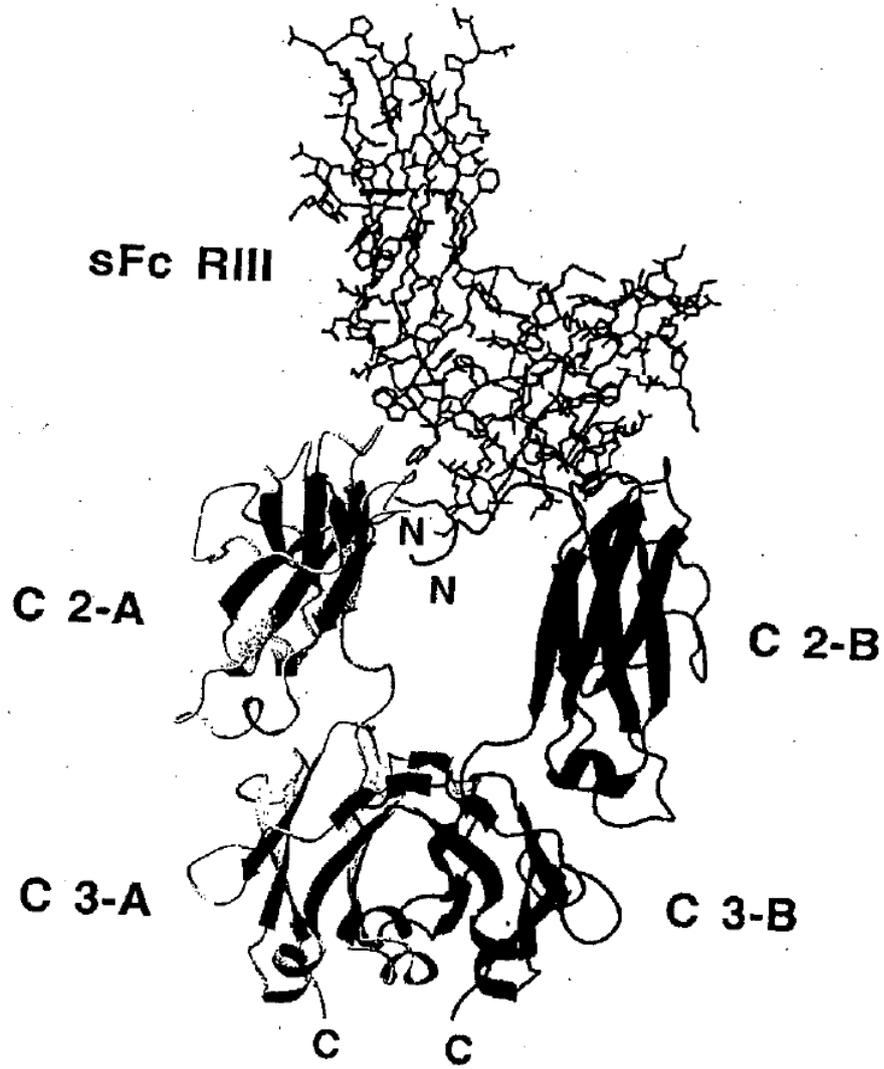


Figura 14

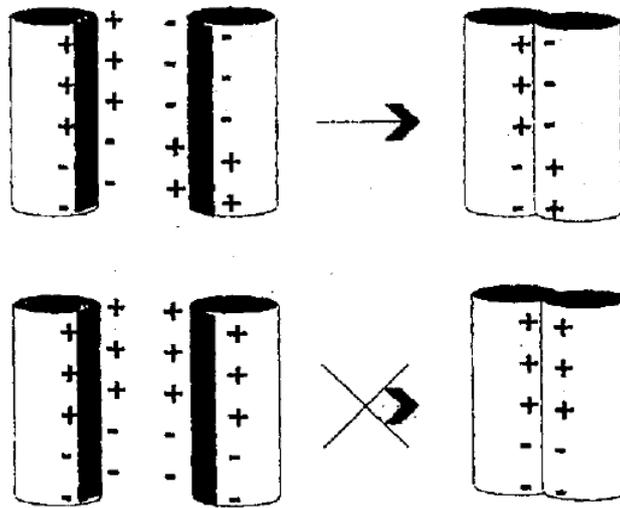
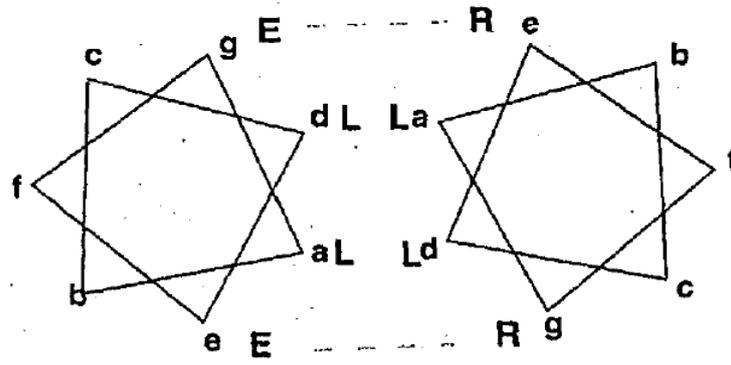


Figura 15

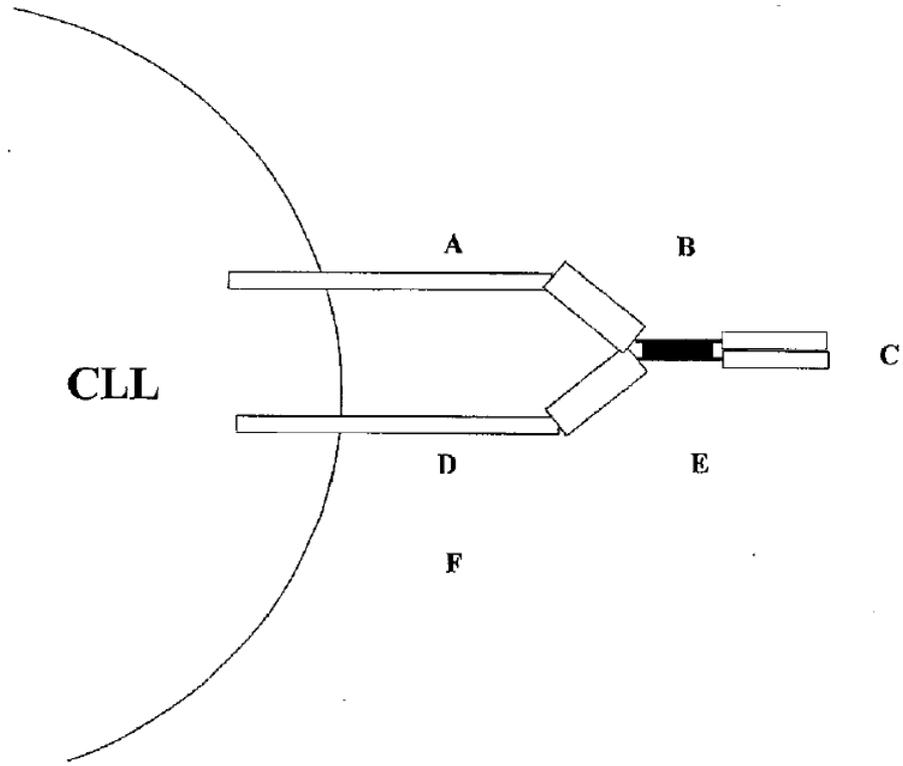


Figura 16

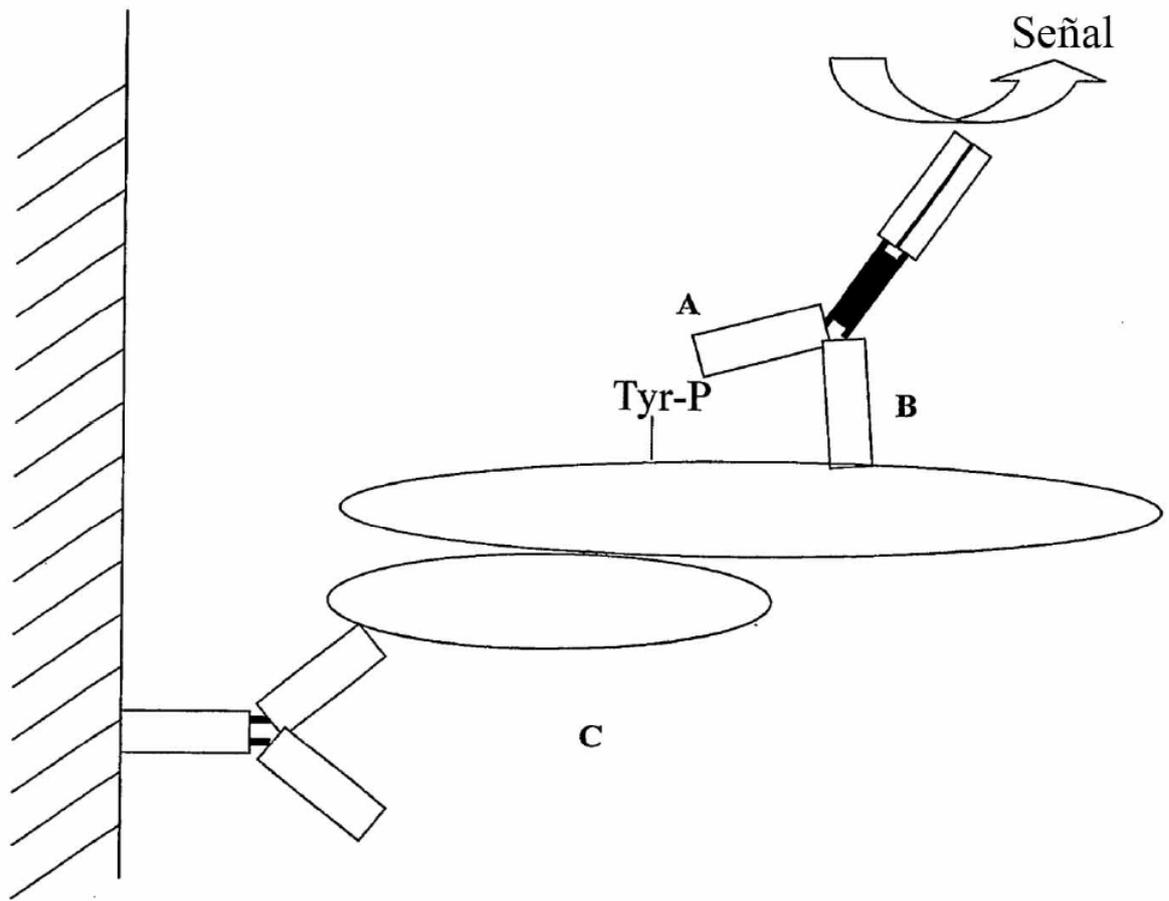


Figura 17

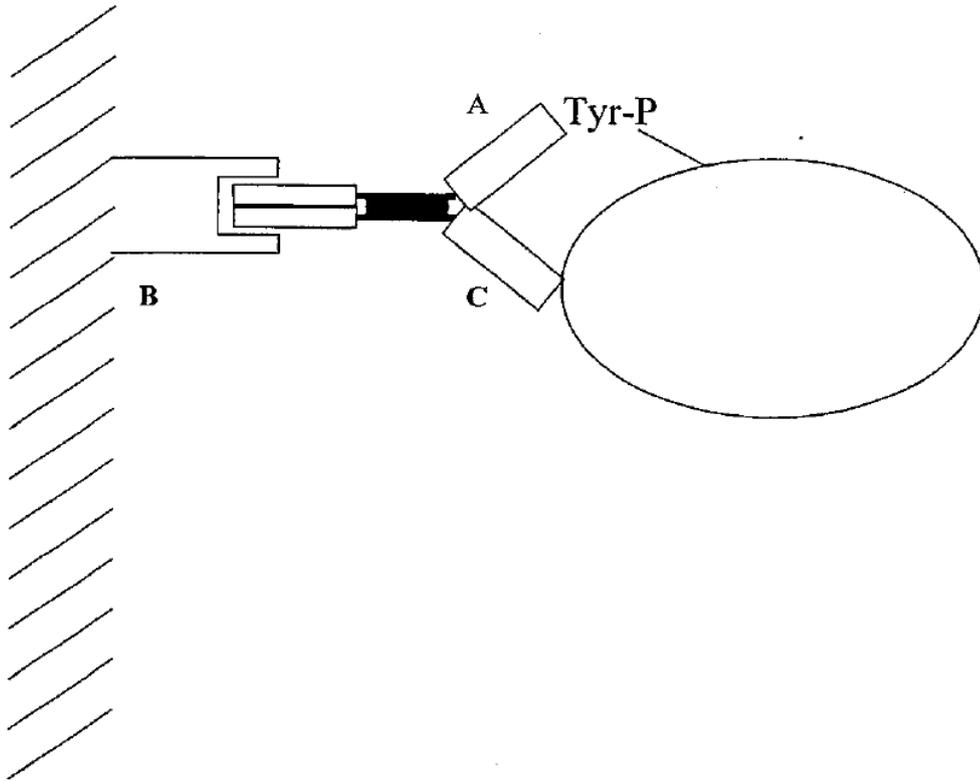


Figura 18

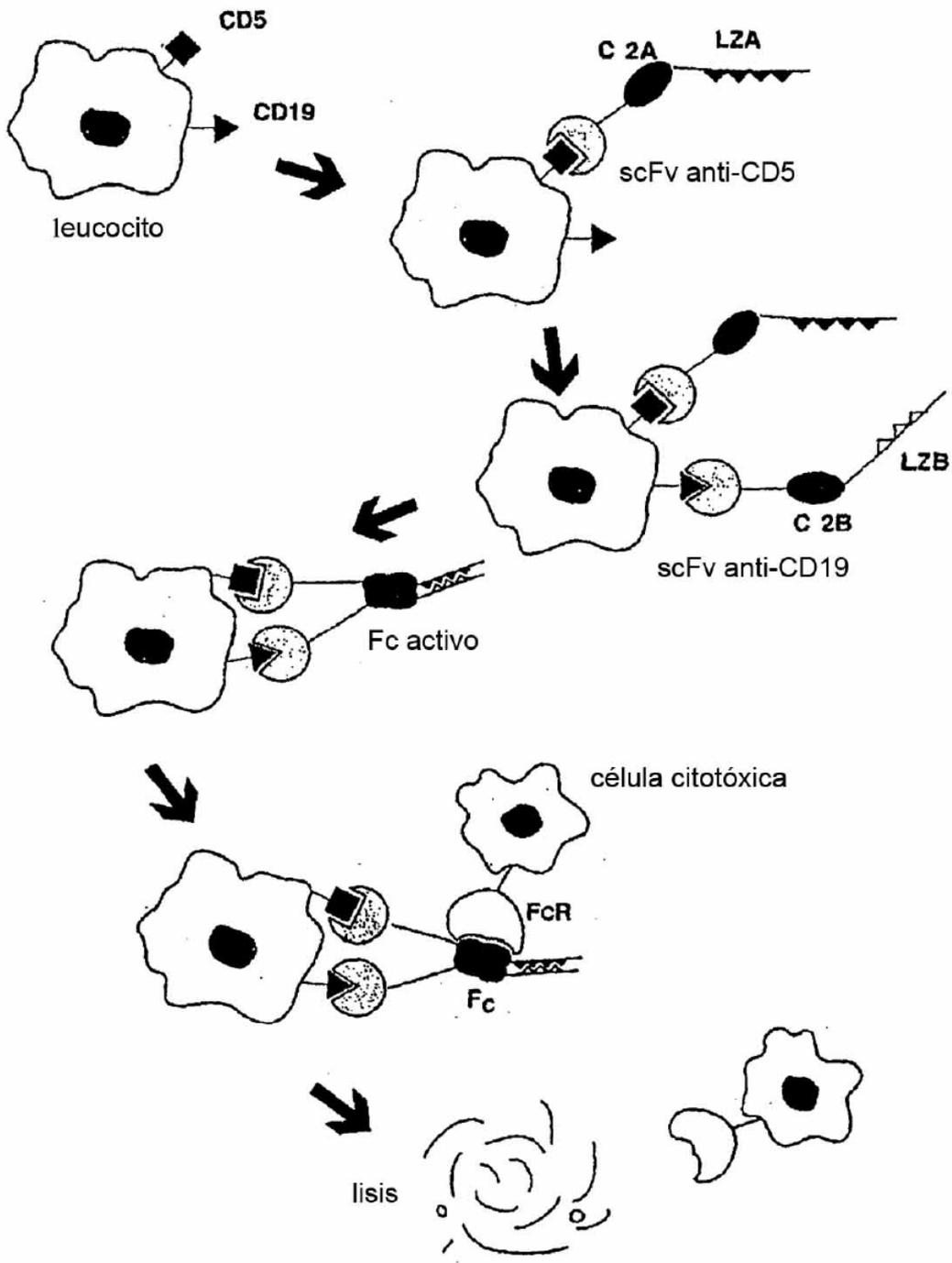


Figura 19