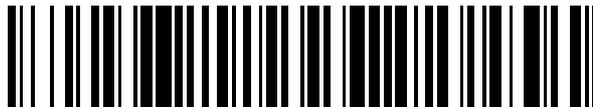


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 445 455**

51 Int. Cl.:

C07K 14/435 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.01.2009 E 09703503 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2013 EP 2235052**

54 Título: **Moléculas de unión proteínaceas que comprenden marcadores de purificación**

30 Prioridad:

21.01.2008 EP 08100707

22.01.2008 US 22661 P

22.04.2008 US 46957 P

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

03.03.2014

73 Titular/es:

MORPHOSYS AG (100.0%)

LENA-CHRIST-STRASSE 48

82152 PLANEGG-MARTINSRIED, DE

72 Inventor/es:

STEIDL, STEFAN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 445 455 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

Moléculas de unión proteínaceas que comprenden marcadores de purificación

Antecedentes de la invención

5 Las inmunoglobulinas, tales como los anticuerpos, constituyen un interés continuo y creciente para la industria farmacéutica. Más de 20 anticuerpos monoclonales (mAb) están comercializados y más de 100 están en ensayos clínicos. En la última década, se han diseñado numerosos derivados y fragmentos de inmunoglobulinas que tienen ciertas propiedades diferentes en comparación con los anticuerpos e inmunoglobulinas convencionales, las cuales pueden ser convenientes para ciertas aplicaciones terapéuticas y diagnósticas. Algunos ejemplos son los fragmentos de anticuerpos recombinantes (tales como los fragmentos de anticuerpos monovalentes clásicos (Fab, scFv)) o variantes manipuladas (diacuerpos, triacuerpos, minicuerpos y anticuerpos con un único dominio), algunos de los cuales están surgiendo en la actualidad como alternativas fiables. Las variantes y fragmentos de este tipo normalmente retienen la afinidad por la diana de las inmunoglobulinas completas pero a menudo se pueden producir de manera más económica. Además, se han desarrollado nuevas estructuras de base que presentan proteínas "similares a los anticuerpos", las cuales, asimismo, poseen ciertas propiedades diferentes en comparación con los anticuerpos e inmunoglobulinas convencionales.

15 Para ciertas aplicaciones terapéuticas, sería conveniente disponer de una interacción antígeno-anticuerpo monovalente, es decir, una inmunoglobulina, u otra estructura de base, con tan solo un dominio variable que se une a una molécula diana de interés. Se ha observado que algunas IgG se entrecruzan con los receptores diana y de este modo mimetizan el efecto del ligando natural. El entrecruzamiento puede provocar la activación del receptor (p. ej., la fosforilación del receptor). Por el contrario, los Fab monovalentes derivados del mismo anticuerpo no dan lugar al entrecruzamiento con el receptor y, si la diana es el epítipo adecuado, evita la unión del ligando natural. Por lo tanto, mientras la IgG actúa como un agonista, el fragmento Fab del mismo anticuerpo actúa como un antagonista. Algunos ejemplos son el receptor de insulina (Kahn *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A.* (1978) 75:4209-13), el receptor de EGF (Schreiber *et al.*, *J Biol Chem.* (1983) 258:846-53), el receptor de EPO (Schneider *et al.*, *Blood* (1997) 89:473-82), el receptor de GH (Wan *et al.*, *Mol Endocrinol.* (2003) 17:2240-50) o el receptor beta 2-adrenérgico (Mijares *et al.*, *Mol Pharmacol.* (2000) 58:373-9).

20 Sin embargo, los constructos con este tipo de propiedades monovalentes, p. ej., fragmentos Fab, pueden ser desfavorables, debido a otras propiedades, tales como una semivida *in vivo* corta. Por lo tanto, sería sumamente conveniente combinar una interacción antígeno-anticuerpo monovalente con las propiedades de una inmunoglobulina completa que comprende el dominio Fc. En la presente invención se proporcionan moléculas de este tipo.

Compendio de la invención

25 Es un objeto de la presente invención proporcionar una inmunoglobulina que comprende al menos dos dominios variables, donde un dominio variable incluye la región completa de unión al antígeno de una rama de la molécula de inmunoglobulina, donde un dominio variable se une a una molécula diana, y donde al menos otro dominio variable comprende un marcador de purificación, donde el dominio variable que comprende el marcador de purificación no se une a la molécula diana, y donde dicho marcador de purificación está comprendido en la región CDR del otro dominio variable mencionado y se selecciona entre un marcador de histidina, un marcador de hexahistidina, un marcador Strep, un marcador myc, un marcador Flag y un marcador V5, o una variante sustancialmente idéntica de estos la cual retiene la propiedad del marcador de purificación de unirse específicamente a un resto que reconoce de manera específica el marcador de purificación y donde la inmunoglobulina es monovalente respecto a la unión de la molécula diana pero retiene las propiedades de una inmunoglobulina completa en lo que respecta al tamaño y presencia del dominio Fc.

En una realización, dicho marcador de purificación está comprendido en la H-CDR3 o en la H-CDR2.

45 En otra realización, dicho marcador de purificación está comprendido en la L-CDR2.

Es un objeto de la presente invención proporcionar una secuencia de ácido nucleico que codifica una inmunoglobulina que comprende al menos dos dominios variables, donde un dominio variable incluye la región completa de unión al antígeno de una rama de la molécula de inmunoglobulina, donde un dominio variable se une a una molécula diana, y donde al menos otro dominio variable comprende un marcador de purificación.

50 En otra realización, la presente invención proporciona un vector que comprende dicha secuencia de ácido nucleico.

En otra realización, la presente invención proporciona una célula que comprende dicho vector. En una realización adicional dicha célula es una célula de mamíferos.

Es un objeto de la presente invención proporcionar una composición farmacéutica que comprende una

inmunoglobulina de la presente invención.

En una realización dicha inmunoglobulina se utiliza en el diagnóstico de una enfermedad o trastorno.

En una realización dicha inmunoglobulina se utiliza en el tratamiento de una enfermedad o trastorno.

5 Es un objeto de la presente invención proporcionar un método para purificar dicha inmunoglobulina, que comprende los siguientes pasos: (a) proporcionar una solución que comprende una inmunoglobulina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, (b) poner en contacto la solución del paso (a) con un resto con afinidad por el marcador de purificación de dicha inmunoglobulina, (c) permitir la unión de la inmunoglobulina a dicho resto, (d) eliminar todos o sustancialmente todos los componentes de la solución que no se unen al resto y (e) recuperar la inmunoglobulina a partir del resto.

10 Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la purificación de las moléculas de unión proteináceas de la presente invención mediante cromatografía con Ni-NTA.

15 El eje x es el eje temporal. El eje y indica la concentración del ingrediente utilizado para eluir el material de la columna (en el presente caso imidazol). Los "círculos negros" indican que el respectivo VH o VL no comprende un marcador de purificación. Cuando se combina un VH de este tipo con un VL que tampoco comprende un marcador de purificación, la rama respectiva es específica respecto a una molécula diana. Los "círculos blancos" indican que al menos un CDR del respectivo VH o VL comprende un marcador de purificación. Las tres especies de inmunoglobulinas diferentes eluyen en fracciones diferentes con un gradiente de imidazol. La especie de inmunoglobulina sin un marcador de purificación se detecta en el flujo a lo largo de las fracciones, y las especie de inmunoglobulina que comprende un marcador de purificación en una rama de la molécula se eluye antes en comparación con la especie de inmunoglobulina que comprende un marcador de purificación en ambas ramas de la molécula.

25 La Figura 2 muestra la especificidad de unión de cuatros fragmentos Fab analizada mediante ELISA. Se recubrió con la lisozima de huevo de gallina o CD38-Fc (5 µg/mL) una placa de ELISA Maxisorp (Nunc). Se añadieron los fragmentos Fab y después del lavado se detectaron los fragmentos Fab unidos específicamente mediante incubación con AP conjugada con anticuerpos específicos contra la (Fab)₂ de la IgG humana y a continuación mediante desarrollo con el sustrato Atto-Phos soluble (Roche) diluido en agua. Las medidas de fluorescencia se realizaron en un lector de placas Tecan a una emisión de 535 nm. Los Fab estudiados fueron MOR03207 (específico respecto a la lisozima de huevo de gallina), MOR03080 (específico respecto a CD38), MOR08428 (GYSGHHHHHSGDY reemplazó a H-CDR3 de MOR03207) y MOR08441 (VH de MOR08428 y VL de MOR03080).

35 La Figura 3 muestra la unión específica de tres fragmentos Fab analizados mediante FACS utilizando células CHO-K1 que expresan de manera recombinante la CD38 humana. Se añadieron los fragmentos Fab a las células y después del lavado, se detectaron los fragmentos Fab unidos específicamente mediante incubación con PE conjugada con anticuerpos específicos contra la (Fab)₂ de la IgG humana (Jackson Immuno Research). Se determinó la fluorescencia de la mediana mediante un instrumento FACSArray (Becton Dickinson). Los Fab estudiados fueron MOR03207 (específico respecto a la lisozima de huevo de gallina), MOR03080 (específico respecto a CD38) y MOR08441 (VH de MOR08428 y VL de MOR03080).

40 La Figura 4 muestra una SDS-PAGE reductora de las fracciones proteicas obtenidas a partir de la purificación IMAC utilizando una columna con His-Bind Fractogel (Merck #70693-3) aplicando un gradiente de imidazol para la elución. Las fracciones de IgG1 prepurificadas en una columna con proteína A obtenidas tras la cotransfección de pMorph2_h_IgG1_MOR08428, pMorph2_h_IgG1_MOR03080 y pMorph2_h_Ig_lambda2_MOR03080 se aplicaron sobre un gel de SDS reductor. Se tomaron fracciones de 1 mL con un flujo de 1 mL/min. Se utilizó Na-fosfato 20 mM, pH 7,4/NaCl 500 mM/imidazol 10 mM como tampón de migración. Se utilizó tampón de migración + imidazol 250 mM como tampón de elución, mientras se aplicaba un gradiente (0 – 100%) del tampón de elución. LRM: Marcadores del tamaño proteico; CL: Fracciones de IgG1 prepurificadas aplicadas sobre la columna; FT: Flujo a través de la columna; los números indican las diferentes fracciones de elución.

50 La Figura 5 muestra una SDS-PAGE reductora de fracciones proteicas obtenidas a partir del flujo a través de la cromatografía de afinidad (carril 3) y las muestras a partir de las fracciones #30-58 combinadas (carril 2) y las #70-90 (carril 1). En el carril 4 se añadieron los marcadores del tamaño proteico. Para más detalles remítase al Ejemplo 3.

Descripción detallada de la invención

- La presente descripción proporciona moléculas de unión proteínaceas, tales como inmunoglobulinas, con ventajas superiores respecto a otras moléculas conocidas en la técnica. A menudo, las inmunoglobulinas dan lugar al entrecruzamiento con las dianas respectivas debido al carácter bivalente de estas moléculas. Asimismo, otros constructos conocidos en la técnica, tales como, p. ej., moléculas biespecíficas que resultan de la fusión génica de los fragmentos scFv, tal como se describen en Mueller *et al.*, 1998; *FEBS Letters*, también inducen entrecruzamiento debido a su estructura bivalente. Este tipo de actividad reticuladora también puede dar lugar a varios efectos no deseados en una aplicación particular, por ejemplo, la activación del receptor (p. ej., mediante la fosforilación del receptor).
- Por otra parte, muy a menudo se necesitan inmunoglobulinas completas. Esta necesidad puede deberse a varias razones, tales como la necesidad de moléculas con una semividua más larga (las moléculas Fab, por ejemplo, tienen una semividua muy corta en comparación con las inmunoglobulinas) o la necesidad de moléculas con todas las propiedades de una inmunoglobulina, especialmente inmunoglobulinas completas (la función efectora, por poner un ejemplo).
- La presente invención resuelve este dilema aparente. Las moléculas de unión proteínaceas descritas en la presente son de naturaleza monovalente pero comprenden todas las propiedades de una inmunoglobulina completa. Además, por el modo en el que se construyen las moléculas de unión proteínaceas, la presente invención también proporciona métodos que posibilitan la purificación práctica de estas moléculas.
- Tal como se emplea en la presente, una molécula, tal como una molécula de unión proteínacea, "se une específicamente a", es "específica para/respecto" o "reconoce específicamente" una molécula diana, tal como un antígeno, si tal molécula de unión proteínacea es capaz de distinguir entre tal molécula diana y una o más moléculas de referencia, ya que la especificidad de unión no es una propiedad absoluta, sino relativa. De manera más general (y cuando no se menciona ninguna referencia definida), la "unión específica" se refiere a la capacidad de la molécula de unión proteínacea para distinguir entre las moléculas diana de interés y una molécula no relacionada, tal como se determina, por ejemplo, de acuerdo con uno de los siguientes métodos. Tales métodos comprenden, sin carácter limitante, la inmunoelectrotransferencia, ensayos de ELISA, RIA, ECL e IRMA y barrido de péptidos. Por ejemplo, se puede llevar a cabo un ensayo de ELISA estándar. Se puede llevar a cabo la puntuación mediante el desarrollo de color estándar (p. ej., anticuerpo secundario con peroxidasa de rábano picante y tetrametilbencidina con peróxido de hidrógeno). Se puntúa la reacción en ciertos pocillos mediante la densidad óptica, por ejemplo, a 450 nm. El ruido de fondo típico (= reacción negativa) puede ser de 0,1 OD; la reacción positiva típica puede ser de 1 OD. Esto significa que la diferencia positivo/negativo puede ser superior a un factor de 10. Normalmente, la determinación de la especificidad de unión se realiza utilizando no una única molécula de referencia, sino un conjunto de aproximadamente 3-5 moléculas no relacionadas, tal como leche en polvo, BSA, transferrina o similares.
- Sin embargo, la "unión específica" también puede referirse a la capacidad de una molécula de unión proteínacea para distinguir entre la molécula diana y una o más moléculas estrechamente relacionadas, que se utilizan como puntos de referencia, p. ej., entre la diana X y la diana Y. De manera adicional, la "unión específica" puede referirse a la capacidad de una molécula de unión proteínacea para distinguir entre las diferentes partes de su molécula diana, p. ej., diferentes dominios o regiones de la molécula diana, tal como epítopos en la región del extremo N o del extremo C de la molécula diana, o entre uno o más residuos de aminoácidos o tramos de residuos de aminoácidos claves de la molécula diana.
- La expresión "molécula de unión proteínacea" tal como se emplea en la presente se refiere a una molécula que comprende al menos dos aminoácidos unidos entre sí mediante un enlace peptídico. La molécula proteínacea es preferentemente una molécula producida por un organismo biológico o una parte, derivado y/o análogo de esta. Es obvio que los derivados generados mediante modificación del compuesto tras la producción por parte de una molécula biológica también son compuestos preferidos de la invención. En una realización particularmente preferida, las moléculas de unión proteínaceas son inmunoglobulinas, tales como anticuerpos o fragmentos de estos. Otras moléculas de unión proteínaceas preferidas incluyen estructuras de base con propiedades similares a las de los anticuerpos, tales como los aficuerpos (los cuales comprenden el dominio Z de una proteína A), proteínas inmunitarias (tales como ImmE7), citocromo b₅₆₂, proteínas que comprenden repeticiones de anquirina, dominios PDZ o dominios Kunitz, la defensina A de insecto, toxinas de escorpión (tales como la caribdotoxina o la CTLA-4), miniproteínas anudadas (tales como Min-23, neocarcinostatina, CBM4-2 o tendamistat), anticalinas o proteínas con repeticiones armadillo.
- Una "inmunoglobulina" (Ig), tal como se emplea en la presente, se refiere a una proteína que pertenece a las clases IgG, IgM, IgE, IgA o IgD (o cualquier subclase de estas) e incluye todos los anticuerpos y fragmentos funcionales de estos conocidos convencionalmente. Un "fragmento funcional" de un anticuerpo/inmunoglobulina tal como se

define en la presente se refiere a un fragmento de un anticuerpo/inmunoglobulina (p. ej., una región variable de una IgG) que comprende al menos dos dominios variables en los cuales el primer dominio variable conserva las propiedades de unión de la inmunoglobulina completa respectiva respecto a la molécula diana. Los fragmentos funcionales de la invención incluyen los fragmentos F(ab')₂ o los fragmentos Fab-dHLX. Tales fragmentos pueden manipularse para minimizar o eliminar completamente las interacciones disulfuro intermoleculares que tienen lugar entre los dominios CH1 y CL. La expresión "fragmento funcional" de una molécula de unión proteinácea de la presente invención se refiere a cualquier resto proteináceo, en el cual un primer dominio variable, pero ninguno de los otros dominios variables, se une a una molécula diana de interés. En ciertas realizaciones preferidas, la inmunoglobulina de la presente invención es una inmunoglobulina completa o una inmunoglobulina sustancialmente completa.

La expresión "dominio variable" se refiere a la porción de una molécula de unión proteinácea que difiere en gran medida en la secuencia entre diferentes moléculas de unión proteináceas, y que confiere la especificidad y unión de la molécula de unión proteinácea a una molécula diana de interés (o la falta de estas). De acuerdo con la presente invención, las secuencias peptídicas, en particular los marcadores de purificación tal como se definen en la presente, se introducen en los dominios variables de tal manera que un dominio variable ya no se une más de manera específica a una molécula diana. Los dominios variables pueden tener cualquier forma o contorno. Pueden estar constituidos por tramos de polipéptidos comprendidos en una, dos o incluso más de dos cadenas polipeptídicas. Un dominio variable de una inmunoglobulina, tal como un anticuerpo, o un fragmento funcional de esta, normalmente comprende la región completa de unión al antígeno de una rama de la molécula de inmunoglobulina. Incluye las regiones CDR de ambas cadenas variables de una rama de la molécula de inmunoglobulina, es decir, las regiones H-CDR3, H-CDR2, H-CDR1, L-CDR3, L-CDR2 y L-CDR1 y las regiones de armazón adyacentes requeridas para la unión específica a una molécula diana dada.

Normalmente, se observa una "región de unión al antígeno" de un anticuerpo en una o más regiones hipervariables de un anticuerpo, es decir, las regiones CDR-1, -2 y/o -3; sin embargo, las regiones "de armazón" variables también pueden jugar un papel importante en la unión al antígeno, por ejemplo proporcionando una estructura de base para las CDR. Preferentemente, la "región de unión al antígeno" comprende al menos del residuo aminoacídico 4 al 103 de la cadena ligera variable (VL) y del 5 al 109 de la cadena pesada variable (VH), más preferentemente del residuo aminoacídico 3 al 107 de la VL y del 4 al 111 de la VH, y son particularmente preferidas las cadenas VL y VH completas (de la posición aminoacídica 1 a la 109 de la VL y de la 1 a la 113 de la VH; numeradas de acuerdo con el documento WO 97/08320). Las IgG son una clase preferida de inmunoglobulinas para su uso en la presente invención.

De acuerdo con la presente invención, el primer dominio variable de una molécula de unión proteinácea se une a una molécula diana. Los otros dominios variables de la molécula de unión proteinácea no presentan especificidad de unión respecto a la misma molécula diana. La molécula de unión proteinácea es, por lo tanto, monovalente en lo que se refiere a la unión con la molécula diana. Además, al menos uno de los otros dominios variables, es decir, los dominios variables que no se unen a la molécula diana, comprende un marcador de purificación adecuado para la purificación de dicha molécula de unión proteinácea.

Se puede obtener un anticuerpo de la invención a partir de una colección de anticuerpos recombinantes que se basa en secuencias de aminoácidos que se han diseñado por ordenador y que están codificadas por ácidos nucleicos generados sintéticamente. El diseño por ordenador de una secuencia de anticuerpos se consigue, por ejemplo, analizando una base de datos de secuencias humanas e ideando una secuencia polipeptídica utilizando los datos obtenidos a partir de ella.

Los métodos para diseñar y obtener secuencias creadas por ordenador se describen, por ejemplo, en Knappik *et al.*, *J. Mol. Biol.* (2000) 296:57; Krebs *et al.*, *J. Immunol. Methods.* (2001) 254:67; Rothe *et al.*, *J. Mol. Biol.* (2008) en la imprenta y la patente de los EE. UU. N.º 6.300.064 publicada por Knappik *et al.*, las cuales se incorporan a la presente en su totalidad por referencia.

La expresión "molécula diana" tal como se menciona en la presente se refiere a cualquier molécula de interés que se une al primer dominio variable de la molécula de unión proteinácea. La molécula diana se refiere a la molécula con la cual se desea la unión de la molécula de unión proteinácea a fin de obtener un cierto efecto biológico y ha de distinguirse del ligando del segundo o de cualquier dominio variable subsiguiente que comprenda el marcador de purificación, o que sea inerte. Normal y preferentemente, la molécula diana es un péptido, una proteína o cualquier otra molécula proteinácea. Como alternativa, las moléculas diana pueden ser cualesquiera otras molécula orgánicas o inorgánicas, tales como hidratos de carbono, ácidos grasos, lípidos, colorantes o fluoróforos.

La expresión "marcador de purificación" tal como se emplea en la presente se refiere a una secuencia peptídica seleccionada entre un marcador de histidina, un marcador de hexahistidina, un marcador Strep, un marcador myc,

un marcador Flag y un marcador V5, o una variante sustancialmente idéntica de estos la cual retiene la propiedad del marcador de purificación de unirse específicamente a un resto que reconoce de manera específica el marcador de purificación adecuado para la purificación o identificación de una molécula de unión proteínica. El marcador de purificación se une específicamente a otro resto con afinidad por el marcador de purificación. Tales restos, que se unen específicamente a un marcador de purificación, se fijan normalmente sobre una matriz o resina, tal como microesferas de agarosa. Los restos que se unen específicamente a marcadores de purificación incluyen anticuerpos, resinas o iones de cobalto o níquel, biotina, amilosa, maltosa y ciclodextrina. Los marcadores de purificación ilustrativos incluyen marcadores de histidina (tales como un péptido de hexahistidina), el cual se unirá a iones metálicos tales como iones de cobalto o níquel. Por lo tanto, en ciertas realizaciones el marcador de purificación comprende una secuencia peptídica que se une específicamente a iones metálicos. El marcador myc (EQKLISEEDL), el marcador Strep (WSHPQFEK), el marcador Flag (DYKDDDDK) y el marcador V5 (GKPIPPLLGLDST) son marcadores de purificación ilustrativos. A modo de ejemplo, el anticuerpo anti-FLAG monoclonal reconoce específicamente el marcador FLAG. La secuencia peptídica reconocida por el anticuerpo anti-FLAG está constituida por la secuencia DYKDDDDK o una variante sustancialmente idéntica de esta. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, el marcador de purificación o comprende o está constituido por una secuencia peptídica que es reconocida específicamente por un anticuerpo. La expresión "marcador de purificación" también incluye variantes sustancialmente idénticas de marcadores de purificación. La "variante sustancialmente idéntica" tal como se emplea en la presente se refiere a derivados o fragmentos de marcadores de purificación que están modificados en comparación con el marcador de purificación original (p. ej., mediante sustituciones, eliminaciones o inserciones de aminoácidos), pero que conservan la propiedad del marcador de purificación de unirse específicamente a un resto que reconoce específicamente el marcador de purificación.

La presente descripción también se refiere a moléculas de unión proteínicas que comprenden al menos dos dominios variables, donde un dominio variable se une a una molécula diana y donde los otros dominios variables son inertes.

El término "inerte" tal como se emplea en la presente en el contexto de la especificidad de unión de un dominio variable se refiere a un dominio variable que no presenta especificidad de unión respecto a otra molécula. En concreto, un dominio variable inerte no se une a una molécula diana ni a cualquier otra molécula y no comprende un marcador de purificación. Las moléculas de unión proteínicas que comprenden al menos dos dominios variables, donde un dominio variable se une a una molécula diana y donde los otros dominios variables son inertes, poseen especificidad de unión monovalente por una molécula diana y se pueden utilizar de acuerdo con la presente invención.

También se describen en la presente moléculas de unión proteínicas en las cuales se pueden introducir marcadores de purificación en el dominio variable. Preferentemente, dichas moléculas de unión proteínicas ya no se unen a la molécula diana de las moléculas de unión progenitoras originales de las cuales se derivan la VH y la VL. Como alternativa, dicha molécula de unión proteínica se une a la molécula diana con una afinidad al menos 10 veces, al menos 100 veces o al menos 1000 veces menor en comparación con la molécula de unión progenitora original a partir de la cual se derivan la VH y la VL. Como alternativa, dichas moléculas de unión proteínicas únicamente muestran una afinidad de unión residual respecto a la molécula diana en comparación con la molécula de unión progenitora original a partir de la cual se derivan la VH y la VL. El experto en la técnica conoce los métodos y ensayos para medir y comparar las afinidades y estos se describen en la sección de procedimientos experimentales.

De acuerdo con la presente invención, se puede introducir un marcador de purificación en el dominio variable, tal como el dominio variable de una inmunoglobulina. Se puede introducir el marcador de purificación en cualquier región CDR de una inmunoglobulina. Las regiones CDR de las inmunoglobulinas están flanqueadas por regiones de armazón. El experto en la técnica conoce las estructuras y límites respectivos de las regiones CDR y las regiones de armazón. Se puede introducir el marcador de purificación en el dominio variable de varias maneras diferentes. Se puede introducir el marcador de purificación en una región CDR de manera que el marcador de purificación reemplace la región CDR original completa. También se puede introducir el marcador de purificación de manera que el marcador de purificación reemplace uno o más de los aminoácidos originales de la región CDR original pero de manera que todavía estén presentes uno o más de los aminoácidos originales de la región CDR original. También se puede introducir el marcador de purificación de manera que este se inserte en una región CDR, es decir, no se eliminan ni reemplacen ninguno de los aminoácidos originales de la región CDR. También se puede introducir el marcador de purificación en la región de armazón del dominio variable, es decir, de manera que el dominio variable respectivo ya no se una a la molécula diana tras la introducción de dicho marcador de purificación, p. ej., debido a cambios conformacionales. También se puede introducir el marcador de purificación en una región del dominio variable que se solape con la región CDR y la región de armazón. Todas las posibilidades y opciones de este tipo, así como las combinaciones de estas, serán evidentes por sí mismas para el experto en la técnica.

La presente invención también se refiere a moléculas de ADN que codifican las moléculas de unión proteínicas de la invención. Las moléculas de ADN de la invención no se limitan a las secuencias descritas en la presente, sino que también incluyen variantes de estas. Las variantes de ADN comprendidas en la invención se pueden describir haciendo referencia a sus propiedades físicas en la hibridación. El experto en la técnica reconocerá que el ADN se puede utilizar para identificar su complementario y, ya que el ADN es bicatenario, su equivalente u homólogo, utilizando técnicas de hibridación de ácidos nucleicos. También reconocerá que la hibridación puede tener lugar con menos de un 100% de complementariedad. Sin embargo, con la elección de condiciones apropiadas, se pueden emplear técnicas de hibridación para distinguir entre secuencias de ADN a partir de su similitud estructural respecto a una sonda concreta. Para una guía acerca de las condiciones de este tipo remítase a, Sambrook *et al.*, 1989 (Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, EE. UU.) y Ausubel *et al.*, 1995 (Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Sedman, J. G., Smith, J. A., & Struhl, K. eds. (1995). *Current Protocols in Molecular Biology*. Nueva York: John Wiley and Sons).

La presente invención además proporciona constructos de ADN recombinante que comprenden una o más secuencias de nucleótidos de la presente invención. Se puede utilizar un constructo recombinante de la presente invención en relación con un vector, tal como un vector vírico, un fago, un fagómido o un plásmido, en los cuales se inserta una molécula de ADN que codifica una molécula de unión proteínica de la invención. Se puede producir el gen codificado mediante las técnicas descritas en Sambrook *et al.*, 1989 y Ausubel *et al.*, 1989. Como alternativa, las secuencias de ADN se pueden sintetizar químicamente utilizando, por ejemplo, sintetizadores. Remítase, por ejemplo, a las técnicas descritas en *Oligonucleotide Synthesis* (1984, Gait, ed., IRL Press, Oxford), que se incorpora a la presente por referencia en su totalidad. Los constructos recombinantes de la invención se incluyen con vectores de expresión que son capaces de expresar el ARN y/o productos proteínicos del o los ADN codificados. El vector además puede comprender secuencias reguladoras, incluido un promotor ligado operablemente al marco de lectura abierto (ORF, por sus siglas en inglés). El vector además puede comprender una secuencia de un marcador seleccionable. También pueden requerirse señales secretoras bacterianas y una iniciación específicas para una traducción eficaz de las secuencias codificantes del gen diana insertadas.

La presente invención además proporciona células hospedadoras que contienen al menos uno de los constructos de ADN de la presente invención. La célula hospedadora puede ser virtualmente cualquier célula para la cual hay disponibles vectores de expresión. Puede ser, por ejemplo, una célula hospedadora eucariota superior, tal como una célula de mamífero, una célula hospedadora eucariota inferior, tal como una célula de levadura, y puede ser una célula procariota, tal como una célula bacteriana. La introducción del constructo recombinante en la célula hospedadora se puede efectuar, por ejemplo, mediante transfección con fosfato cálcico, DEAE, transfección mediada por dextrano, electroporación o infección por fago.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona moléculas de unión proteínicas que comprenden al menos dos dominios variables, donde un dominio variable se une a una molécula diana y donde al menos otro dominio variable comprende un marcador de purificación. La molécula de unión proteínica puede comprender dos, tres, cuatro o más dominios variables. En realizaciones preferidas, la molécula de unión proteínica comprende dos dominios variables.

De acuerdo con la presente invención, un dominio variable de la molécula de unión proteínica se une a una molécula diana. Ninguno de los otros dominios variables se une a la molécula diana, en particular, el dominio variable que comprende el marcador de purificación. En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a moléculas de unión proteínicas que comprenden al menos dos dominios variables, donde el primer dominio variable se une a una molécula diana y donde al menos otro dominio variable comprende un marcador de purificación adecuado para la purificación de dicha molécula de unión proteínica, y donde ninguno de dichos dominios variables diferentes se une a dicha molécula diana. En otras realizaciones, la molécula de unión proteínica comprende al menos dos dominios variables donde el primer dominio variable se une a una molécula diana, pero ninguno de los otros dominios variables mencionados se une a dicha molécula diana.

En ciertas realizaciones, el marcador de purificación se selecciona entre un marcador de histidina, un marcador Strep, un marcador myc, un marcador Flag y un marcador V5, o una variante sustancialmente idéntica de estos. En las realizaciones preferidas, el marcador de purificación es un marcador de histidina (marcador His), más preferentemente un péptido de hexahistidina. En realizaciones alternativas, el marcador de purificación es una variante sustancialmente idéntica de un marcador de histidina, tal como un péptido de pentahistidina o un péptido de heptahistidina. Otros marcadores de histidina con aun más residuos de histidina, tal como ocho, nueve, diez o incluso más residuos de histidina, o tramos de polihistidina, en los cuales uno o más residuos de histidina se han sustituido por otro aminoácido, pero que aún son capaces de unirse a Ni-NTA, se pueden igualmente usar de acuerdo con la presente invención.

En ciertas realizaciones, la molécula de unión proteínica es una inmunoglobulina o un fragmento funcional de esta. En realizaciones preferidas, dicha inmunoglobulina es un anticuerpo, más preferentemente un anticuerpo completo.

En ciertas realizaciones, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina humana. En realizaciones alternativas, dicha

inmunoglobulina es una inmunoglobulina procedente de un roedor, tal como un ratón o una rata.

En ciertas realizaciones, la inmunoglobulina pertenece a cualquiera de las siguientes clases: IgG, IgM, IgE, IgA e IgD. En realizaciones preferidas, la inmunoglobulina pertenece a la clase IgG. En ciertas realizaciones, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina humana perteneciente a cualquiera de las siguientes clases: IgG, IgM, IgE, IgA e IgD. En realizaciones preferidas, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina humana perteneciente a la clase IgG.

En ciertas realizaciones, la inmunoglobulina pertenece a cualquiera de las siguientes subclases: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En realizaciones preferidas, la inmunoglobulina pertenece a la subclase IgG1. En ciertas realizaciones, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina humana perteneciente a cualquiera de las siguientes subclases: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En realizaciones preferidas, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina humana perteneciente a la subclase IgG1.

En realizaciones preferidas, la molécula de unión proteínica es una inmunoglobulina. En estas realizaciones, los dominios variables comprenden una cadena pesada variable (VH) y una cadena ligera variable (VL). En realizaciones preferidas, la molécula de unión proteínica es una inmunoglobulina que comprende dos dominios variables, donde cada dominio variable comprende una cadena pesada variable (VH) y una cadena ligera variable (VL).

En ciertas realizaciones, la cadena pesada variable (VH) comprende tres regiones determinantes de la complementariedad, H-CDR. En realizaciones preferidas, la molécula de unión proteínica es una inmunoglobulina que comprende una cadena pesada variable (VH) que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad: H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3.

En ciertas realizaciones, la cadena ligera variable (VL) comprende tres regiones determinantes de la complementariedad, L-CDR. En realizaciones preferidas, la molécula de unión proteínica es una inmunoglobulina que comprende una cadena ligera variable (VL) que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad: L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3.

En ciertas realizaciones, el marcador de purificación está comprendido en la cadena pesada variable (VH) o en la cadena ligera variable (VL) de la molécula de unión proteínica o inmunoglobulina. En realizaciones preferidas, dicho marcador de purificación está comprendido en la cadena pesada variable (VH) de la molécula de unión proteínica o inmunoglobulina. En realizaciones más preferidas, el marcador de purificación está comprendido en cualquiera de las tres regiones determinantes de la complementariedad (H-CDR) de la cadena pesada variable (VH). En realizaciones todavía más preferidas, el marcador de purificación está comprendido en la H-CDR3, la H-CDR2 o la H-CDR1, más preferentemente la H-CDR3 o la H-CDR2 y más preferentemente la H-CDR3.

En ciertas realizaciones, el marcador de purificación está comprendido en la cadena ligera variable (VL) de la molécula de unión proteínica o inmunoglobulina. En realizaciones más preferidas, el marcador de purificación está comprendido en cualquiera de las tres regiones determinantes de la complementariedad (L-CDR) de la cadena ligera variable (VL). En realizaciones todavía más preferidas, el marcador de purificación está comprendido en la L-CDR3, la L-CDR2 o la L-CDR1, y en las realizaciones aún más preferidas todavía en la L-CDR3.

La expresión "región CDR" se refiere a las regiones de una inmunoglobulina que contienen normalmente cualquier región determinante de la complementariedad. Las regiones determinantes de la complementariedad de una inmunoglobulina están comprendidas en la cadena pesada variable (VH) y en la cadena ligera variable (VL). Específicamente, las regiones determinantes de la complementariedad de una inmunoglobulina son la región H-CDR1, la H-CDR2, la H-CDR3, la L-CDR1, la L-CDR2 o la L-CDR3.

La presente invención además proporciona secuencias de ácido nucleico que codifican las moléculas de unión proteínicas de la presente invención. Las moléculas de unión proteínicas de la presente invención pueden estar constituidas por uno, dos, tres, cuatro o incluso más polipéptidos. Cada uno de dichos polipéptidos puede estar codificado por los mismos o por diferentes ácidos nucleicos. De manera similar, los ácidos nucleicos que codifican dichos péptidos individuales de una molécula de unión proteínica de la presente invención pueden estar presentes en el mismo o en diferentes vectores.

La presente invención además proporciona secuencias de ácido nucleico que codifican un dominio variable que comprende un marcador de purificación. Preferentemente, dicho dominio variable está comprendido en una inmunoglobulina o en un fragmento funcional de esta. En ciertas realizaciones, dicho dominio variable está comprendido en la cadena pesada variable (VH) o en la cadena ligera variable (VL) de dicha inmunoglobulina, preferentemente en la cadena pesada variable (VH) y más preferentemente en la H-CDR3 de dicha cadena pesada variable (VH).

La presente invención además proporciona vectores que comprenden las secuencias de ácido nucleico de las moléculas de unión proteínicas o que comprenden secuencias de ácido nucleico de dominios variables que comprenden un marcador de purificación de acuerdo con la presente invención.

La presente invención además proporciona células y células hospedadoras que comprenden dichos vectores.

Preferentemente, dichas células o células hospedadoras son células de mamífero. También preferentemente, dichas células o células hospedadoras son células aisladas o células hospedadoras aisladas.

La presente invención además proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula de unión proteinácea de la p invención y un excipiente o portador farmacéuticamente aceptables para estas.

5 También se describen en la presente métodos terapéuticos para tratar una enfermedad o trastorno que comprenden el paso de administrar a un individuo que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica que comprende una molécula de unión proteinácea de la presente invención y un excipiente o portador farmacéuticamente aceptables para esta. Preferentemente, dicha enfermedad o trastorno está asociado con la presencia no deseada de la molécula diana.

10 En la presente se define una cantidad "terapéuticamente eficaz" como la cantidad de una molécula de unión proteinácea que o bien sola o bien combinada con otras terapias, proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o manejo de un estado adverso. La expresión también puede englobar una cantidad que mejora la terapia global, reduce o evita los efectos no deseados, o potencia su eficacia terapéutica o las sinergias con otro agente terapéutico. El "individuo" que necesite un tratamiento puede ser un animal humano o no humano (p. ej., un conejo, rata, ratón, mono u otro primate inferior).

15 Una molécula de unión proteinácea de la descripción se puede administrar conjuntamente con medicamentos conocidos y, en algunos casos, puede modificarse la propia molécula de unión proteinácea. Por ejemplo, se puede conjugar una molécula de unión proteinácea con una inmunotoxina o un radioisótopo para incrementar potencialmente aún más su eficacia.

20 Las moléculas de unión proteináceas se pueden utilizar como una herramienta diagnóstica o terapéutica en una variedad de situaciones en las que, de manera no deseada, la molécula diana se expresa o se detecta. Para tratar cualesquiera enfermedades o trastornos, se pueden formular composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con la presente invención de modo convencional utilizando uno o más excipientes o portadores fisiológicamente aceptables. Se puede administrar una molécula de unión proteinácea de la invención mediante cualquier medio apropiado, el cual puede variar, dependiendo del tipo de trastorno que se está tratando. Las posibles vías de administración incluyen la administración parenteral (p. ej., intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea), intrapulmonar e intranasal y, si se desea en el caso de un tratamiento inmunosupresor local, intralesional. Además, se podría administrar una molécula de unión proteinácea de la invención mediante infusión pulsada con, p. ej., dosis decrecientes de la molécula de unión proteinácea. Preferentemente, la dosis se suministra mediante inyecciones, más preferentemente inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración será crónica o corta. La cantidad que se ha de administrar dependerá de varios factores tales como los síntomas clínicos, el peso del individuo y si se administran otros fármacos. El experto en la técnica reconocerá que la vía de administración variará dependiendo del trastorno o afección que se ha de tratar.

35 La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula de unión proteinácea, de acuerdo con esta invención, dependerá principalmente de la naturaleza del trastorno que se está tratando, de la vía de administración y de características del paciente concretas. Se puede encontrar una guía general, por ejemplo, en las publicaciones de la International Conference on Harmonisation y en Remington's Pharmaceutical Sciences, capítulos 27 y 28, págs. 484-528 (18.^a ed. Alfonso R. Gennaro, Ed., Easton, Pa.: Mack Pub Co., 1990). Más concretamente, la determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz dependerá de factores tales como la toxicidad y eficacia del medicamento. La toxicidad puede determinarse utilizando métodos de uso común en la técnica y que se encuentran en las referencias anteriores. La eficacia puede determinarse utilizando la misma guía.

40 También se describen en la presente métodos para detectar una molécula diana en un individuo o en una muestra que comprenden el paso de poner en contacto dicho individuo o muestra con una molécula de unión proteinácea de la presente invención.

45 También se describen en la presente métodos para diagnosticar una enfermedad o trastorno en un individuo que comprenden el paso de poner en contacto a dicho individuo o muestra con una molécula de unión proteinácea de la presente invención.

También se describe en la presente la utilización de una molécula de unión proteinácea de la presente invención para la producción de un medicamento.

50 La presente invención además proporciona una molécula de unión proteinácea de la presente invención para el tratamiento de una enfermedad o trastorno.

La presente invención además proporciona la utilización de una molécula de unión proteinácea de la presente invención para el diagnóstico de una enfermedad o trastorno.

55 También se describe en la presente la utilización de una molécula de unión proteinácea de la presente invención para la detección de una molécula diana.

En ciertas realizaciones, la molécula de unión proteinácea es una inmunoglobulina, tal como un anticuerpo. En tales

caso, la línea celular transfectada con las moléculas de ácidos nucleicos de la presente invención produce dos cadenas pesadas variables (VH) diferentes – una cadena VH que es parte del dominio variable que se une a la molécula diana (de aquí en adelante en la presente “VH-dian”) y una cadena VH que es parte del dominio variable que comprende el marcador de purificación (de aquí en adelante en la presente “VH-puri”; como alternativa, esta cadena VH puede ser inerte). Únicamente se produce una cadena ligera variable (VL). Esto da lugar a la producción de tres especies de inmunoglobulinas diferentes:

- La especie A comprende dos cadenas pesadas variables (VH) del tipo VH-dian.
- La especie B comprende una cadena pesada variable (VH) del tipo VH-dian y una cadena pesada variable (VH) del tipo VH-puri.
- La especie C comprende dos cadenas pesadas variables (VH) del tipo VH-puri.

Todas las especies de inmunoglobulinas comprenden dos cadenas ligeras variables (VL) idénticas.

La especie A de las inmunoglobulinas descritas anteriormente no comprende un marcador de purificación. La especie B comprende un marcador de purificación, la especie C comprende dos marcadores de purificación. La especie B es la especie con la propiedad deseada de acuerdo con la presente invención, es decir, un enlace monovalente con la molécula diana.

Ambas especies, la B y la C, pueden purificarse mediante un resto que posea afinidad por el marcador de purificación, p. ej., mediante Ni-NTA, si el marcador de purificación es un marcador His. Debido a que la avidez de la especie C de inmunoglobulinas es mucho mayor en comparación con la especie B debido a la presencia de un segundo marcador de purificación, estas especies pueden separarse convenientemente mediante pasos de purificación apropiados. Las posibles técnicas de purificación incluyen la cromatografía, tal como la cromatografía en columna. La elución puede conseguirse de varias maneras. Preferentemente, se aplica un gradiente. El experto en la técnica conocerá las técnicas respectivas. Si se utiliza un marcador de histidina, la elución se logra más convenientemente mediante un gradiente de imidazol. El proceso se representa en la Figura 1. Debido a su mayor avidez, la especie C posee una mayor afinidad por la columna, y por consiguiente, se necesitarán concentraciones mayores de una solución, tal como una solución que comprenda imidazol, para recuperar dicha especie de la columna cromatográfica. Por medio de esta técnica, es decir, elución por una concentración mayor de imidazol, puede separarse convenientemente la especie B de la especie C.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un método para purificar una molécula de unión proteínica de la presente invención que comprende los siguientes pasos: (a) proporcionar una solución que comprende una molécula de unión proteínica de la presente invención, (b) poner en contacto la solución del paso (a) con un resto con afinidad por el marcador de purificación de dicha molécula de unión proteínica, (c) permitir la unión de la molécula de unión proteínica con dicho resto, (d) eliminar todos o sustancialmente todos los componentes de la solución que no se unen al resto y (e) recuperar la molécula de unión proteínica a partir del resto.

La solución que comprende una molécula de unión proteínica de la presente invención es, preferentemente, el sobrenadante del cultivo de una célula que expresa dicha molécula de unión proteínica. Como alternativa, se puede emplear cualquier otra solución que comprenda una molécula de unión proteínica de acuerdo con la presente invención.

En otro aspecto la solución que comprende una molécula de unión proteínica de la presente invención puede además comprender una molécula de unión proteínica que comprende dos marcadores de purificación.

Preferentemente, la molécula de unión proteínica de la presente invención se separa de la solución que comprende moléculas de unión proteínicas que comprenden dos marcadores de purificación mediante un gradiente, preferentemente un gradiente de imidazol.

En ciertos aspectos, la presente descripción proporciona un método para separar una primera molécula de unión proteínica que comprende al menos dos dominios variables, donde un dominio variable se une a una molécula diana y donde otro dominio variable comprende un marcador de purificación procedente de una segunda molécula de unión proteínica que comprende dos marcadores de purificación, y que comprende los siguientes pasos: (a) proporcionar una solución que comprende la primera y la segunda molécula de unión proteínica, (b) poner en contacto la solución del paso (a) con un resto con afinidad por el marcador de purificación de dichas moléculas de unión proteínicas, (c) permitir la unión de las moléculas de unión proteínicas con dicho resto, (d) eliminar todos o sustancialmente todos los componentes de la solución que no se unen al resto y (e) recuperar las moléculas de unión proteínicas a partir del resto de modo que la primera molécula de unión proteínica se separe de la segunda molécula de unión proteínica. En realizaciones preferidas, el paso (e) comprende la aplicación de un gradiente para recuperar la molécula de unión proteínica a partir del resto con afinidad por el marcador de purificación. Si el marcador de purificación es un marcador de histidina, entonces se prefiere un gradiente de imidazol.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona una inmunoglobulina, o un fragmento funcional de esta, que comprende al menos dos dominios variables, donde un dominio variable se une a una molécula diana y donde al menos otro dominio variable comprende un marcador de purificación y donde dicho marcador de purificación está comprendido en la región CDR de dicho dominio de purificación diferente. Más preferentemente, dicha

inmunoglobulina es una inmunoglobulina completa.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona moléculas de unión proteínaceas que comprenden al menos dos dominios variables, donde un dominio variable se une a una molécula diana y donde al menos otro dominio variable comprende un marcador de purificación o es inerte. En ciertas realizaciones, dichas moléculas de unión proteínaceas pueden comprender dos dominios variables. En ciertas realizaciones, el dominio variable que comprende el marcador de purificación no se une con la molécula diana. En ciertas realizaciones, el marcador de purificación se selecciona entre un marcador de histidina, un marcador Strep, un marcador myc, un marcador Flag, un marcador V5 y una variante sustancialmente idéntica de los anteriores. En ciertas realizaciones, el marcador de purificación es un marcador de histidina o una variante sustancialmente idéntica de este. En ciertas realizaciones, el marcador de histidina es un péptido de hexahistidina. En ciertas realizaciones, la molécula de unión proteínacea es una inmunoglobulina o un fragmento funcional de esta. En ciertas realizaciones, la inmunoglobulina es un anticuerpo. En ciertas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humano, humanizado o quimérico. En ciertas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humano. En ciertas realizaciones, el anticuerpo humano pertenece a la clase IgG. En ciertas realizaciones, el anticuerpo humano pertenece a cualquiera de las siguientes subclases: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En ciertas realizaciones, el anticuerpo humano pertenece a la subclase IgG1. En ciertas realizaciones, cada uno de dichos dominios variables comprende una cadena pesada variable (VH) y una cadena ligera variable (VL). En ciertas realizaciones, la cadena pesada variable (VH) comprende tres regiones determinantes de la complementariedad (H-CDR). En ciertas realizaciones, la cadena ligera variable (VL) comprende tres regiones determinantes de la complementariedad (L-CDR). En ciertas realizaciones, el marcador de purificación está comprendido en la cadena pesada variable (VH) o en la cadena ligera variable (VL). En ciertas realizaciones, el marcador de purificación está comprendido en la cadena pesada variable (VH). En ciertas realizaciones, el marcador de purificación está comprendido en cualquiera de las tres regiones determinantes de la complementariedad (H-CDR) de la cadena pesada variable (VH). En otras realizaciones, el marcador de purificación está comprendido en más de una de las tres regiones determinantes de la complementariedad (H-CDR) de la cadena pesada variable (VH). En ciertas realizaciones, el marcador de purificación está comprendido en la H-CDR3 o en la H-CDR2. En ciertas realizaciones, el marcador de purificación está comprendido en la H-CDR3. En ciertas realizaciones, el marcador de purificación está comprendido en la cadena ligera variable (VL). En ciertas realizaciones, el marcador de purificación está comprendido en cualquiera de las tres regiones determinantes de la complementariedad (L-CDR) de la cadena ligera variable (VL). En otras realizaciones, el marcador de purificación está comprendido en más de una de las tres regiones determinantes de la complementariedad (L-CDR) de la cadena ligera variable (VL). En ciertas realizaciones, el marcador de purificación está comprendido en la L-CDR2.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona secuencias de ácido nucleico que codifican una molécula de unión proteínacea de acuerdo con la presente invención, incluidas las moléculas de unión proteínaceas enumeradas en el párrafo anterior. En ciertas realizaciones, estas secuencias de ácido nucleico codifican un dominio variable que comprende un marcador de purificación. En ciertas realizaciones, el dominio variable está comprendido en una inmunoglobulina o en un fragmento funcional de esta. En ciertas realizaciones, el dominio variable de estas secuencias de ácido nucleico está comprendido en la cadena pesada variable (VH) o la cadena ligera variable (VL) de dicha inmunoglobulina. En ciertas realizaciones, el dominio variable de estas secuencias de ácido nucleico está comprendido en la cadena pesada variable (VH) de dicha inmunoglobulina. En ciertas realizaciones, el dominio variable de estas secuencias de ácido nucleico está comprendido en la H-CDR3 de dicha cadena pesada variable (VH).

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico del párrafo precedente.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona una célula que comprende un vector de la presente invención, incluidos los vectores del párrafo anterior. En ciertas realizaciones, la célula es una célula de mamífero. En ciertas realizaciones, la célula es una célula aislada.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula de unión proteínacea tal como se ha descrito anteriormente en la presente y un excipiente o portador farmacéuticamente aceptables para esta.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un método para tratar una enfermedad o trastorno que comprende el paso de administrar a un individuo que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica de la presente invención, incluidas las composiciones farmacéuticas del párrafo precedente. En ciertas realizaciones, la enfermedad o trastorno está asociado con la presencia no deseada de la molécula diana.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona moléculas de unión proteínaceas tal como se han descrito anteriormente en la presente para el tratamiento de una enfermedad o trastorno.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona la utilización de una molécula de unión proteínacea tal como se ha descrito anteriormente en la presente para el diagnóstico de una enfermedad o trastorno.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona la utilización de una molécula de unión proteínacea tal

como se ha descrito anteriormente en la presente para la detección de una molécula diana.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un método para purificar una molécula de unión proteínica tal como se ha descrito anteriormente en la presente que comprende los siguientes pasos: (a) proporcionar una solución que comprende una unión proteínica, (b) poner en contacto la solución del paso (a) con un resto con afinidad por el marcador de purificación de dicha molécula de unión proteínica, (c) permitir la unión de la molécula de unión proteínica con dicho resto, (d) eliminar todos o sustancialmente todos los componentes de la solución que no se unen al resto y (e) recuperar la molécula de unión proteínica a partir del resto. En ciertas realizaciones la solución además contiene moléculas de unión proteínicas que comprenden dos marcadores de purificación. En ciertas realizaciones la molécula de unión proteínica que comprende un marcador de purificación se separa de las moléculas de unión proteínicas que comprenden dos marcadores de purificación mediante un gradiente. En ciertas realizaciones, el gradiente es un gradiente de imidazol.

Ejemplos

Ejemplo 1: Generación de fragmentos Fab que contienen un marcador de purificación en la región H-CDR3

MOR03207_FS es un Fab con especificidad respecto a la lisozima de huevo de gallina. Comprende un marcador Flag y un marcador Strep en el extremo C de la cadena VH, es decir, fuera del dominio variable. Mediante el diseño del cebador adecuado y técnicas de clonación convencionales, se introdujo un marcador de hexahistidina en la H-CDR3 de la cadena pesada variable del vector de expresión codificante pMx9_MOR03207_FS (Rauchenberger *et al.*, 2003) para obtener pMx9_MOR08428, el cual codifica la siguiente secuencia H-CDR3: GYSGHHHHHSGDY. MOR08428 comprende un marcador Flag y un marcador Strep (FS) en el extremo C de la cadena VH.

Las pruebas de purificación confirmaron que tanto MOR03207_FS como MOR08428_FS pueden purificarse mediante el marcador Strep. Sin embargo, MOR08428_FS se puede purificar de manera alternativa mediante cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC, por sus siglas en inglés), lo que confirma que se puede acceder libremente al marcador de hexahistidina y que, por tanto, se puede utilizar con fines cromatográficos. Finalmente, mediante pruebas de ELISA se confirmó que MOR03207_FS, pero no MOR08428_FS, es capaz de unirse a la lisozima de huevo de gallina, lo que indica que la especificidad del fragmento Fab original se perdió como consecuencia de la incorporación del marcador de hexahistidina en la H-CDR3 (Figura 2).

A continuación, se combinó la VH de MOR08428_FS por clonación con la VL de MOR03080. MOR03080 es un Fab con especificidad por la CD38 humana. El constructo resultante, denominado MOR08441_FS, por consiguiente contiene la VH de MOR08428 y la VL de MOR03080.

Mediante análisis FACS (Figura 3) y pruebas de ELISA (Figura 2) se confirmó que MOR03080, pero no MOR08428 ni MOR08441, es capaz de unirse a la CD38 humana. Asimismo, MOR03207_FS, pero no MOR08428 ni MOR08441, es capaz de unirse a la lisozima de huevo de gallina. Finalmente, MOR08428_FS puede purificarse mediante cromatografía con Ni-NTA, lo que muestra que la secuencia de 6His incorporada en la H-CDR3 está accesible para la matriz de la columna de afinidad.

En resumen, se ha demostrado que mediante la incorporación de un marcador de purificación, tal como un marcador de hexahistidina, en el dominio variable de la molécula de unión proteínica, tal como la incorporación de un marcador de hexahistidina en la H-CDR3 de un fragmento Fab humano, es posible generar Fab que (a) pueden purificarse fácilmente mediante su unión a las respectivas resinas de afinidad y (b) ya no son capaces de unirse a la molécula diana de las moléculas de unión progenitoras originales, de las que se derivaron la VH y la VL.

Ejemplo 2: Generación de IgG completas que contienen un marcador de purificación en la región H-CDR3

Se pueden generar las inmunoglobulinas monovalentes de la presente invención tal como se describe en este ejemplo. Como alternativa, se pueden emplear otras técnicas. Por ejemplo, existen ciertas técnicas experimentales que permiten el emparejamiento favorable de las cadenas pesadas de inmunoglobulinas deseadas. Por ejemplo, se pueden generar IgG biespecíficas mediante una tecnología que utiliza enlaces disulfuro manipulados y mutaciones "knob into holes" (Merchant *et al.*, *Nature Biotechnology* (1998) 16, 677), que hace posible el emparejamiento eficaz de las cadenas pesadas deseadas. Asimismo se pueden emplear otras técnicas relacionadas de uso común en la técnica.

A continuación, se convierten los fragmentos Fab del Ejemplo 1 al formato de la IgG1. Por lo tanto, se clonan los respectivos constructos en vectores apropiados.

Se clonaron las cadenas pesadas variables de MOR08428 y MOR03080 en pMorph2_hulgG1, un vector que albergaba la región constante gamma1 humana constante, generando de este modo los vectores pMorph2_h_IgG1_MOR08428 y pMorph2_h_IgG1_MOR03080 respectivamente. Se clonó la cadena ligera variable de MOR03080 en pMorph2_h_Ig_lambda2, un vector que albergaba la cadena ligera lambda humana constante, dando lugar al vector pMorph2_h_Ig_lambda2_MOR03080. Se cotransfectaron los tres constructos y se expresaron en una línea celular humana, tal como HKB11 (número ATCC: CRL-12568; Cho *et al.*, *J. Biomed. Sci.* (2002):631-8). Se utilizó el sobrenadante del cultivo celular para experimentos adicionales. Se prepurificó el sobrenadante del

cultivo celular mediante una cromatografía por afinidad con proteína A convencional.

Ya que se producen una cadena ligera y dos cadenas pesadas diferentes en la línea celular transfectada, en total se producen tres especies de inmunoglobulinas diferentes. Una especie contiene dos cadenas pesadas de MOR03080. Esta especie de inmunoglobulina no contiene un marcador de hexahistidina y por lo tanto no posee afinidad por Ni-NTA y posee una especificidad por CD38 no monovalente, sino bivalente. La segunda especie de inmunoglobulina contiene una cadena pesada de MOR03080 y una cadena pesada de MOR08428. Esta especie de inmunoglobulina es la especie con las propiedades deseadas de acuerdo con la presente invención. Posee afinidad por Ni-NTA, debido a su marcador de hexahistidina en la H-CDR3 de la cadena pesada sencilla de MOR08428. Finalmente, la tercera especie de inmunoglobulina contiene dos cadenas pesadas de MOR08428. Esta especie no presenta afinidad por la molécula diana (en este caso, la CD38 humana). Sin embargo, esta especie contiene un marcador de hexahistidina en ambas ramas de la inmunoglobulina y, por lo tanto, presenta una unión bivalente con la resina de la columna de IMAC (p. ej., Ni-NTA (Qiagen) o His-Bind Fractogel (Merck)) y por lo tanto tiene una mayor avidez por la resina. Ya que la avidez por la resina de esta especie es mucho mayor que la afinidad monovalente de la segunda y deseada especie de inmunoglobulina puede separarse convenientemente mediante cromatografía de afinidad, p. ej., mediante un gradiente de imidazol. En la Figura 1 se representa este proceso de elución.

Se sometió a purificación IMAC esta mezcla de moléculas de IgG1 purificadas con proteína A. La mezcla de IgG1 prepurificada se cargó sobre una columna His-Bind Fractogel (Merck #70693-3) en un sistema Akta-FPLC. Se tomaron fracciones de 1 mL con un flujo de 1 mL/min.

Como tampón de migración se utilizó Na-fosfato 20 mM pH 7,4/NaCl 500 mM/imidazol 10 mM. Como tampón de elución se utilizó tampón de migración + imidazol 250 mM, mientras se aplicaba un gradiente 0 – 100% de tampón de elución. Se cargaron fracciones representativas en una SDS PAGE reductora analítica (Figura 4). Tal como se esperaba, se observó una única banda para la cadena ligera a ~30 KD. En cambio se pudieron distinguir dos bandas diferentes para la cadena pesada (ambas – 50 KD). Se observó la banda inferior en el flujo a través de la columna y, en cambio, la banda superior apareció únicamente tras elución con imidazol. Con concentraciones elevadas de imidazol (es decir, las últimas fracciones) únicamente se eluyó la banda superior de la cadena pesada. Se concluye que la banda inferior de la cadena pesada representa la cadena pesada de MOR03080, mientras la banda superior representa la cadena pesada de MOR08428, que porta el marcador de hexahistidina.

Por lo tanto, la IgG1 MOR03080 (bivalente) no marcada se puede separar fácilmente mediante especies de IgG marcadas con hexahistidina. Además, la elución mediante un gradiente de imidazol permite una separación adicional de especies de IgG1 marcadas con una única hexahistidina y marcadas con una doble hexahistidina.

Ejemplo 3: Análisis funcional de las especies de IgG1 separadas

Se combinaron las fracciones #30-58 y las fracciones #70-90 (remítase a la Figura 4). Se sustituyó el tampón de estas fracciones combinadas, así como el del flujo a través de la columna, por PBS mediante diálisis. Se determinaron las concentraciones proteicas de estas muestras mediante medidas de absorbancia a 280 nm. Se analizaron estas tres muestras con SDS-PAGE en condiciones reductoras (Figura 5). La cadena pesada de MOR03080 presentó un peso molecular aparente menor en comparación con la cadena pesada de MOR08428. La muestra del flujo a través únicamente contuvo la cadena pesada de MOR03080, mientras la muestra combinada procedente de las fracciones #70-90 contuvo predominantemente la cadena pesada de MOR08428. En cambio, la muestra combinada procedente de #30-58 contuvo una proporción aproximada de 1:1 de ambas cadenas pesadas. Estos datos muestran que se separó la IgG1 bivalente de la IgG1 monovalente marcada con una única hexahistidina y de la IgG1 marcada con una doble hexahistidina utilizando cromatografía de afinidad mientras se aplicaba un gradiente de imidazol para la elución.

Determinación de la CE₅₀ mediante FACS

Para caracterizar las propiedades de unión de estas fracciones de IgG1, se realizaron determinaciones de la CE₅₀ mediante FACS sobre células RPMI8226 que expresaban CD38. Para este fin se utilizó como anticuerpo primario IgG con una concentración definida (de 250 nM a 0,24 pM). Se llevó a cabo la detección utilizando 50 µL/pocillo del anticuerpo secundario (anticuerpos caprinos contra la IgG humana (fragmento específico (Fab)₂); JIRLlaboratories #109-116-097) conjugado con PE y con una dilución de 1:200. Se determinaron los valores de CE₅₀ utilizando el software Prism 3.03 (Software GraphPad) aplicando un modelo de ajuste a la curva de regresión no lineal (dosis-respuesta sigmoidea; pendiente variable). La Tabla 1 muestra los valores de CE₅₀ obtenidos en este experimento de valoración de FACS.

IgG	EC ₅₀ (nM)
IgG1 MOR03080	0,4
Fab MOR03080	1,2
Flujo a través	0,5
IgG1 de las fracciones # 30-58	1,5

IgG	EC ₅₀ (nM)
IgG1 de las fracciones # 70-90	13,4
IgG1 MOR08588	Sin unión
IgG1 MOR03207	Sin unión

El valor de CE₅₀ de la fracción de IgG1 del flujo a través resultó ser muy similar a la IgG1 de referencia MOR03080, lo que muestra que el flujo a través estuvo constituido por la IgG1 de unión a CD38 bivalente. Por el contrario, las fracciones #30-58 mostraron una CE₅₀ tres veces menor (1,5 nM) que está en el mismo intervalo que la del fragmento Fab de referencia de MOR03080. Esto indica que la IgG1 de las fracciones #30-58 estuvo constituida por la IgG1 de unión a CD38 monovalente. Tal como se esperaba, la IgG1 de referencia MOR08588, que está constituida únicamente por la VH de MOR08428 y la VL de MOR03080 está marcada por tanto con una doble hexahistidina y no se une a CD38. Las fracciones #70-90, que se eluyeron con concentraciones elevadas de imidazol están constituidas principalmente por la especie de IgG1 marcada con una doble hexahistidina, tal como evidencia la CE₅₀ 10 veces menor en comparación con la CE₅₀ de las fracciones #30-58. Las propiedades de unión residuales son atribuibles a impurezas de la muestra de la especie de IgG1 marcada con una única hexahistidina coeluida.

Determinación de la afinidad por resonancia de plasmones superficiales (Biacore)

Se determinaron las constantes cinéticas k_{on} y k_{off} mediante diluciones en serie de los respectivos anticuerpos purificados que se unían covalentemente al CD38-Fc humano inmovilizado utilizando el instrumento Biacore 3000 (Biacore, Uppsala, Suecia). La inmovilización covalente del antígeno se logró mediante un procedimiento de acoplamiento EDC-NHS estándar. Se realizaron las medidas cinéticas en PBS, pH 7,2 con un flujo de 20 µL/min utilizando una concentración de anticuerpos comprendida en el intervalo de 1,5-500 nM. El tiempo de inyección para cada concentración fue de 1 min, seguido de una fase de disociación de 3 min. Para la regeneración se emplearon dos inyecciones de 5 µL de tampón de glicina 10 mM, pH 1,5. Se ajustaron todos los sensogramas utilizando el software de evaluación 3.2 de BIA (Biacore), suponiendo una cinética de unión de 1:1.

La Tabla 2 muestra los valores de afinidad aparentes obtenidos a partir del experimento con el Biacore

Anticuerpo	R _{máx}	k _{on} aparente	k _{off} aparente	K _D (nM) aparente
IgG1 MOR03080	275	9,13E+04	2,60E-04	3
Fab MOR03080	100	6,07E+04	1,64E-03	27
Flujo a través	182	9,80E+04	2,84E-04	3
IgG1 de las fracciones # 30-58	140	4,46E+04	1,39E-03	31
IgG1 de las fracciones # 70-90	44	2,80E+04	1,38E-03	49
IgG1 MOR08588	-	-	-	Sin unión

La K_D aparente de la muestra de flujo a través resultó ser muy similar a la de la IgG1 MOR03080 purificada, lo que indica que esta muestra está constituida por una IgG1 bivalente. En cambio, la muestra combinada procedente de #30-58 mostró una K_D aparente muy similar a la del fragmento Fab MOR03080, la cual es diez veces inferior en comparación con la de la IgG1 MOR03080. Este resultado indica que la muestra combinada procedente de las fracciones #30-58 presenta las mismas propiedades de unión monovalentes que el fragmento Fab MOR03080. La IgG1 MOR08588 no mostró ninguna unión con CD38-Fc, tal como se esperaba. La IgG1 de las fracciones #70-90, sin embargo, no mostraron unión con CD38-Fc. Las fracciones #70-90, que se eluyeron con concentraciones elevadas de imidazol deberían estar constituidas principalmente de la especie de IgG1 marcada con una doble hexahistidina. Esto queda ilustrado por la menor R_{máx} en comparación con, p. ej., las fracciones #30-58. Las K_{on} y K_{off} observadas en estas muestras son, con toda probabilidad, atribuibles a impurezas de las muestras de la especie de IgG1 marcada con una única hexahistidina coeluida.

En resumen, se han generado inmunoglobulinas completas con una afinidad monovalente por una molécula diana. Estas moléculas pueden generarse y purificarse fácilmente mediante cromatografía con Ni-NTA empleando el marcador de purificación, separándolas de esta manera de las moléculas de inmunoglobulina de unión bivalente que no portan tal marcador de purificación.

40

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una inmunoglobulina que comprende al menos dos dominios variables, donde un dominio variable incluye la región completa de unión al antígeno de una rama de la molécula de inmunoglobulina, donde un dominio variable se une a una molécula diana, y donde al menos otro dominio variable comprende un marcador de purificación, donde el dominio variable que comprende el marcador de purificación no se une a la molécula diana, y donde dicho marcador de purificación está comprendido en la región CDR del otro dominio variable mencionado y se selecciona entre un marcador de histidina, un marcador de hexahistidina, un marcador Strep, un marcador myc, un marcador Flag y un marcador V5, o una variante sustancialmente idéntica de estos la cual retiene la propiedad del marcador de purificación de unirse específicamente a un resto que reconoce de manera específica el marcador de purificación y donde la inmunoglobulina es monovalente respecto a la unión de la molécula diana pero retiene las propiedades de una inmunoglobulina completa en lo que respecta al tamaño y presencia del dominio Fc.
- 10 2. La inmunoglobulina de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho marcador de purificación está comprendido en la H-CDR3 o en la H-CDR2.
- 15 3. La inmunoglobulina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde dicho marcador de purificación está comprendido en la L-CDR2.
4. Una secuencia de ácido nucleico que codifica una inmunoglobulina de cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
5. Un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 4.
- 20 6. Una célula que comprende un vector de acuerdo con la reivindicación 5.
7. La célula de acuerdo con la reivindicación 6, donde dicha célula es una célula de mamíferos.
8. Una composición farmacéutica que comprende una inmunoglobulina de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y un excipiente o portador farmacéuticamente aceptables de esta.
- 25 9. Una inmunoglobulina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para su uso en el diagnóstico de una enfermedad o trastorno.
10. Una inmunoglobulina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno.
- 30 11. Un método para purificar una inmunoglobulina, que comprende los siguientes pasos: (a) proporcionar una solución que comprende una inmunoglobulina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, (b) poner en contacto la solución del paso (a) con un resto con afinidad por el marcador de purificación de dicha inmunoglobulina, (c) permitir la unión de la inmunoglobulina a dicho resto, (d) eliminar todos o sustancialmente todos los componentes de la solución que no se unen al resto y (e) recuperar la inmunoglobulina a partir del resto.

Figura 1

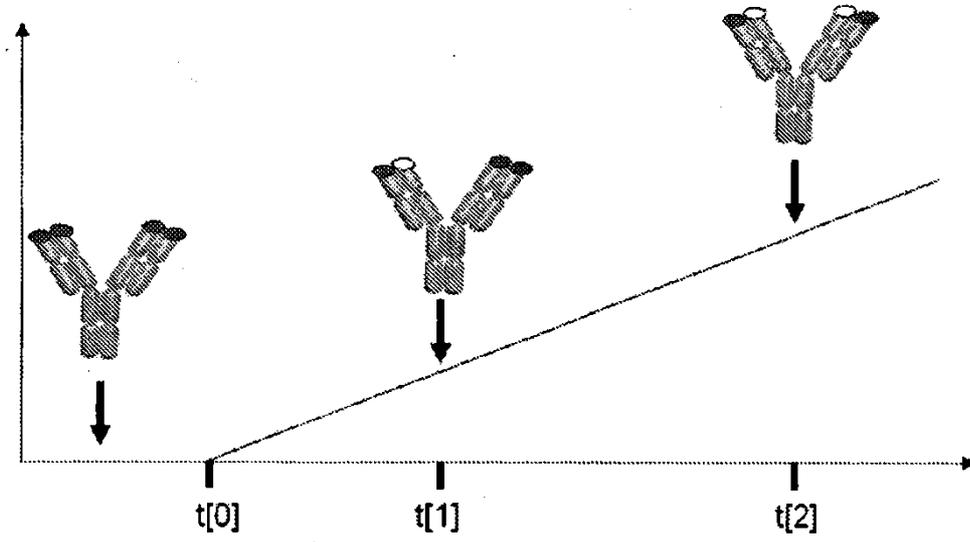


Figura 2

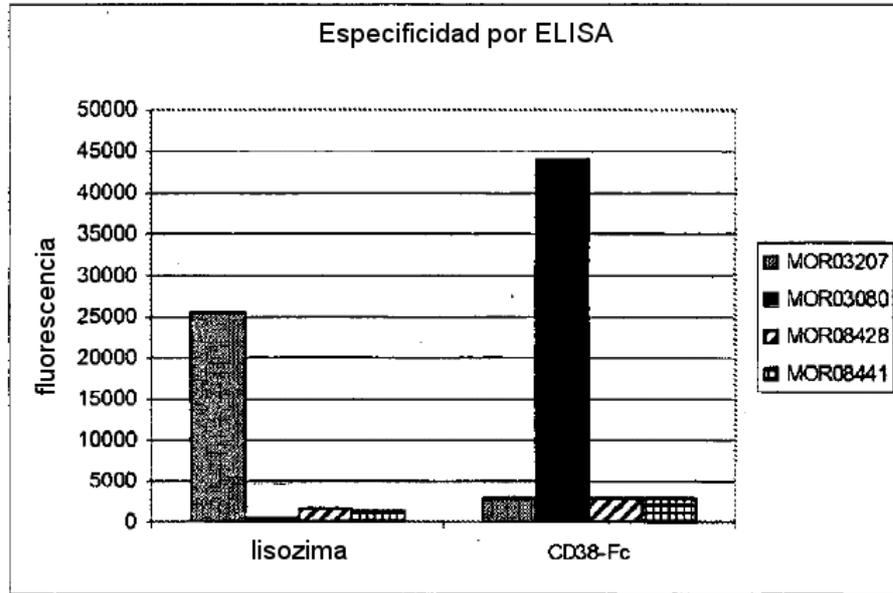


Figura 3

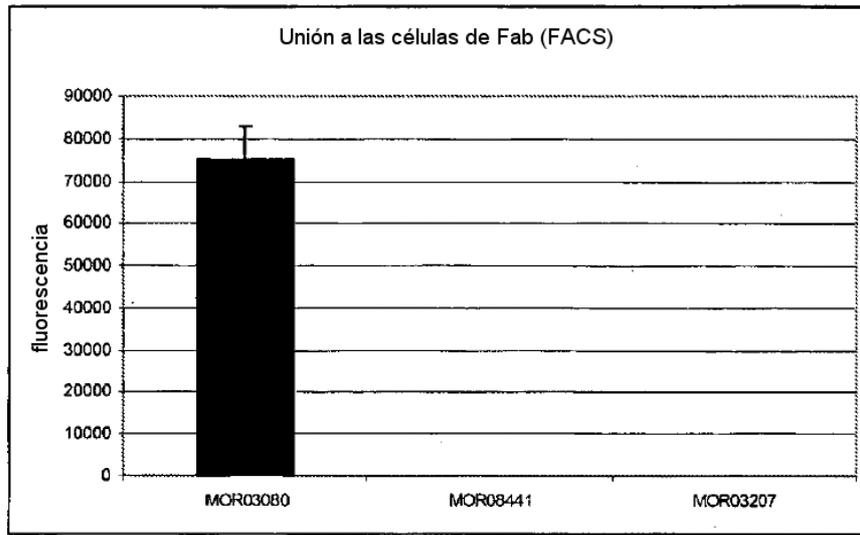


Figura 4

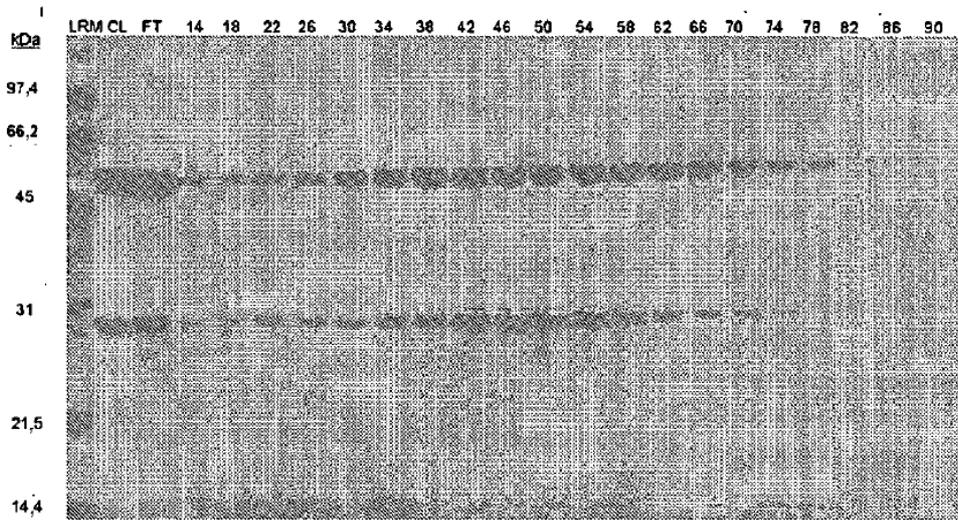


Figura 5

